

Lipotoxicitás ellen védő hatóanyagok vizsgálata inzulinóma sejteken

Doktori értekezés

Simon-Szabó Laura

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezetők: prof. Kéri György, DSc., kutatóprofesszor
Dr. Csala Miklós, DSc., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Töröcsik Beáta, Ph.D., adjunktus
Dr. Venekei István, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: prof. Török Tamás, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Klebovich Imre, DSc., egyetemi tanár
Dr. Bajtay Zsuzsa, DSc., egyetemi docens

Budapest
2016

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
Ábrák és Táblázatok jegyzéke	7
1. Bevezetés	8
1.1. Inzulintermelés és inzulinhatás	10
1.2. Az elhízáshoz kapcsolódó anyagcsere-betegségek	15
1.2.1. Inzulinrezisztencia	15
1.2.2. Metabolikus szindróma	18
1.2.3. A 2-es típusú diabétesz	19
1.2.4. Glükotoxicitás és lipotoxicitás	21
1.3. Az endoplazmatikus retikulum és kapcsolata a metabolikus szindrómával	23
1.3.1. Az endoplazmatikus retikulum felépítése és fontosabb funkciói	23
1.3.1.1. Kalciumhomeosztázis	24
1.3.1.2. Fehérjeszintézis és –érés	25
1.3.1.3. Diszulfid hidak kialakulása	25
1.3.1.4. Fehérjeglikoziláció és minőségellenőrzés	26
1.3.2. Az endoplazmatikus retikulum stressz	26
1.3.2.1. Az UPR jelensége	27
1.3.3. JNK	30
1.4. Metformin	32
1.5. Kinázgátlók és jelterápia	33
2. Célkitűzések	35
3. Módszerek	36
3.1. Sejtkultúrák fenntartása és kezelése	36
3.2. Életképesség vizsgálata	37
3.3. Apoptózis és nekrozis vizsgálata	37
3.4. Western blot analízis	37
3.5. XBP-1 mRNS hasításának vizsgálata	38
3.6. Statisztikai módszerek	39

4. Eredmények	40
4.1. Palmitát indukált apoptózis RINm5F sejtekben	40
4.2. Metformin hatása a palmitát által indukált ER-stresszre	41
4.3. A PERK útvonal vizsgálata	43
4.4. Az IRE1 útvonal vizsgálata	47
4.5. Metformin hatása önmagában.....	50
4.6. JNK-aktiválódás és IRS-1 Ser307-foszforiláció gátlószereinek szelektálása.....	50
4.7. Szelektált gátlószerek vizsgálata lipotoxicitás-modellben.....	58
5. Megbeszélés	61
6. Következtetések	65
7. Összefoglalás	67
8. Summary	68
9. Irodalomjegyzék	69
10. Saját publikációk jegyzéke	82
11. Köszönetnyilvánítás	83

Rövidítések jegyzéke

Akt	= PKB (protein kináz B)
AMPK	AMP-aktivált protein kináz
AP-1	aktivátor protein 1
APAF1	apoptotikus proteáz aktiváló faktor 1
AS160	Akt szubsztrát (160 kDa)
ATF4	„activating transcription factor 4”
ATF6	„activating transcription factor 6”
Bad	„Bcl-2-associated death promoter”
Bcl2	„B-cell lymphoma 2”
BH3	"Bcl2 homology domain 3"
Bip	=GRP78 = „glucose regulated protein 78 kDa”
BMI	„body mass index”
BSA	„bovine serum albumin”
cDNS	komplementer DNS
CGMP	ciklikus guanozin monofoszfát
CHO	Chinese hamster ovary cells
CHOP	„CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein”
CPE	„carboxipeptidáz E”
DAG	diacilglicerol
DER	durva felszínű endoplazmatikus retikulum
DMEM	„dulbecco's modified eagle's medium”
ECL	„enhanced chemiluminescence”
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
eIF2 α	eukarióta iniciációs faktor α
eIF2B	eukarióta iniciációs faktor 2 B
eNOS	endoteliális nitrogén monoxid szintáz
ER stressz	endoplazmatikus retikulum stressz
ERAD	endoplazmatikus retikulum asszociált protein degradáció
ERK	extracelluláris szignál szabályozott kináz

ERO1 α	„ER resident protein oxidoreductase 1 α ”
EVL	„extended validation library”
FBS	„foetal bovine serum”
FDA	"food and drug administration"
FFA	„free fatty acid”
FFAR1	„free fatty acid receptor 1”
FOXO1	„forkhead box protein O1”
GADD34	„growth arrest and DNA damage-inducible protein”
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GEF	guanin nukleotid kicserélő faktor
Glp1	„glucagon-like peptide-1
GLUT4	glükóz transzporter 4
GPI	gliko-foszfatidil-inozitol
GRB2	növekedési faktor receptor-kötő protein 2
GRP40	(FFAR1) „G protein-coupled receptor 40”
GRP78	= Bip = „glucose regulated protein 78 kDa”
GS	glikogén szintáz
GSK3	glikogén szintáz kináz 3
GTP	guanozin-trifoszfát
HDL	high density lipoprotein
HEK293	„human embryonic kidney 293”
HEPES	„4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid”
HepG2	máj sejtvonal
HER2	humán epidermális növekedési faktor receptor 2
HFD	high fat diet
HRP	„horse radish peroxidase” tormaperoxidáz
HTS	high-throughput screening
IC50	azon inhibitor koncentráció, amely 50%-kal gátolja az enzim aktivitását
IGF	„insulin-like growth factor”
I κ B	inhibitor kappa B
IKK β	inhibitor kappa B kináz β
IL-1b	interleukin1b

IL-6	interleukin-6
iNOS	indukálható nitrogén monoxid szintáz
IP3R	inozitol 1,4,5-triszfoszfát-receptor
IRE-1	„inozitol-requiring enzyme 1”
IRS-1	inzulin receptor szubsztrát-1
JIP	JNK interacting protein
JNK	c-Jun N-terminális kináz
MALA	metformin-asszociált tejsavas acidózis
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
mTOR	mechanistic target of rapamycin
NADPH	nikotinamid-adenin dinukleotid foszfát
NAFLD	„non-alcoholic fatty acid disease”
NASH	"non-alcoholic steatohepatitis"
NEFA	„non-esterified fatty acids”
NF- κ B	„nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”
NO	nitrogén monoxid
OGT	orális glükóz tolerancia teszt
PAGE	poliakrilamid gél elektroforézis
PBS	„phosphate-buffered saline”
PDI	proteindiszulfid-izomeráz
PDK	foszfatidil-inozitol-függő kináz
PERK	„RNA dependent protein kinase-like ER kinase”
PH	„plecstrin homológ” domén
PI3K	foszfatidil-inozitol 3-kináz
PIP2	foszfatidil-inozitol 4,5 biszfoszfát
PIP3	foszfatidil-inozitol 3,4,5 triszfoszfát
PKB	protein kináz B = Akt
PKC λ	protein-kináz C lambda
PMSF	„phenylmethylsulfonyl fluoride”
PP-1	protein phosphatase 1
PPAR	peroxiszóma-proliferátor aktivált receptorok
PTB domén	foszfortirozin-kötő domén

PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
PTP	protein-tirozin foszfatáz
RINm5F	patkány eredetű inzulin termelő sejtvonal
ROS	reaktív oxigén származékok
RTK	receptor tirozin kinázok
RT-PCR	„reverse transcription polymerase chain reaction”
RyR	rianodin receptor
SAPK	stressz-aktivált protein kináz
SDS	„sodium dodecyl sulphate”
SER	sima felszínű endoplazmatikus retikulum
SERCA	szarkoplazmatikus retikulum Ca ²⁺ ATP-áz 2b
SH2	„sarc homológ” domén
SHIP2	SH2 containing inozitol 5'-phosphatase 2
SOS	(son of sevenless)
SRP	signal recognition particle
sXBP-1	„spliced” hasított XBP-1
TLR	„toll-like” receptor
TNF α	tumor nekrosis faktor α
UPR	„unfolded protein response”
uXBP-1	„unspliced” hasítatlan XBP-1
XBP-1	„X-boksz-binding protein”

Ábrák és Táblázatok jegyzéke

1. ábra: Inzulin-jelátvitel.....	12
2. ábra: Inzulinrezisztencia kialakulásának főbb okai	17
3. ábra: Orális Glükóz Tolerancia (OGT) teszt	20
4. ábra: Az UPR három főbb útvonala	29
5. ábra: Sejtek életképességének vizsgálata	41
6. ábra: Apoptózis és nekrozis index RINm5F patkány inzulinóma sejtvonalon.....	42
7. ábra: ER chaperonok, GRP78 és PDI indukciója	44
8. ábra: eIF2 α -foszforiláció	45
9. ábra: CHOP-indukció és kaszpáz-3-hasítás.....	46
10. ábra: IRE1-függő XBP-1 mRNS-hasítás	48
11. ábra: JNK-, c-Jun- és IRS-1-foszforiláció	49
12. ábra: Metformin kezelés önmagában.....	51
13. ábra: A JNK, a c-Jun és az IRS-1 Ser307 foszforilációjának gátlása HEK293 sejtekben	52
14. ábra: Lipotoxicitás által indukált JNK-foszforiláció gátlása RINm5F sejtekben.....	59
15. ábra: Lipotoxicitás által indukált IRS-1 Ser307-foszforiláció gátlása RINm5F sejtekben	60
1. táblázat: Az alkalmazott JNK-gátló referenciamolekulák.....	53
2. táblázat: A szintetizált új 7-oxo-pirido-[2,3-d]pirimidinek	54

1. Bevezetés

A 2-es típusú diabétesz világszerte nagy számban előforduló betegség, mely főként a jóléti társadalmakra jellemző [1]. A túlzott táplálékbevitel és a fizikai aktivitás hiánya, valamint a gyakran ezek következtében fellépő elhízás a betegség kialakulásának legfőbb okai [2, 3]. Az elhízás napjainkban már gyermekkorban is egyre elterjedtebb [4]. A 2-es típusú diabétesz komplex metabolikus betegség, melynek egyik kísérőjelensége a tartósan emelkedett vércukorszint (hiperglikémia). A normál glükóz koncentráció értéke 3,5 és 5,5 mM között van a vérben, melynek szinten tartása esszenciális a szervezet normális működése szempontjából. Az ettől bármely irányban való eltérés kóros állapotokat idéz elő. A vércukorszint szabályozásában alapvetően két hormon játszik döntő szerepet, az inzulin és a glukagon. Mindkettőt a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteinek sejtjei termelik; a glukagont az α -sejtek, az inzulint pedig a β -sejtek. Glukagon hatására emelkedik a vércukorszint, míg inzulin hatására csökken. Az izom-zsír tömegarány csökkenése gyengült inzulinválaszt eredményez, melyet inzulinrezisztenciának nevezünk. Az inzulinrezisztencia korai stádiumában túlzott inzulintermelés figyelhető meg a hasnyálmirigy β -sejtjeiben. Amikor a β -sejtek már nem tudnak elegendő inzulint termelni az inzulinrezisztencia kompenzálásához, akkor megemelkedik a vércukorszint. A túlzott táplálékbevitel megterheli a sejtek intermedier anyagcseréjét, és stressz szignálokat generál, ami – eleinte relatív, majd abszolút – inzulindeficienciához vezethet [5]. Az inzulinrezisztencia a májban túlzott glükóztermelést, az izomban csökkent glükózfelvételt okoz. Emellett fokozza a zsírszövetben a zsírsavak felszabadulását, és így növeli a vérben a szabad zsírsavszintet, ami a legtöbb szövetben lipotoxicitást okoz [6].

A lipotoxicitás összetett stressz állapotot alakít ki a sejtekben, melynek része az endoplazmatikus retikulum (ER) stressz. Az ER igen érzékeny a környezeti hatásokra, és az organelumot érő szélsőséges hatások stresszt idézhetnek elő, ami fehérjeérési zavart okoz a lumenben, és az úgynevezett UPR (unfolded protein response) aktiválódását eredményezi [3]. Az UPR beindulását – nevének megfelelően – alapvetően a rosszul feltekeredett fehérjék ER-ben való felhalmozódása okozza, és három fő útvonalon aktiválódhat. Mindhárom útvonal aktiválódásának elsődleges célja az ER-homeosztázis helyreállítása, aminek eléréséhez az organelum fehérjeterhelését

csökkenteni, a folding, illetve a selejtfehérje-lebontás kapacitását pedig növelni kell [7]. Amennyiben ez nem billenti helyre az egyensúlyt, a sejt apoptózisban elpusztulhat.

A legújabb kutatások az inzulinrezisztencia kialakulásának egyik felelőseként a JNK-t (c-Jun N-terminális kináz) vagy más néven SAPK (stressz aktivált protein kináz) említik. A JNK tehát stresszkináz, amely az UPR egyik jelátviteli útvonalán, az IRE-1 (inositol-requiring enzyme 1) stressz receptoron keresztül is aktiválódik. A foszforilált, aktív JNK az IRS-1-et (inzulin receptor szubsztrát 1) szerin oldalláncon foszforilálja, ami gátolja e jelátviteli fehérje inzulin-receptor általi tirozin foszforilációját. Ily módon sérül az inzulinjelpálya, és az inzulin bekötődése nem tud kellő mértékű glükózfelvétel-fokozódást, illetve glükóztermelés-gátlást kiváltani.

Több gyógyszer is forgalomban van, melyek az inzulinrezisztencia megjelenésekor, a további romlást és a 2-es típusú diabétesz kialakulását megelőzendően adható. Az egyik ilyen gyógyszer a metformin. Ez a biguanidok csoportjába tartozó hatóanyag csökkenti a máj glükóztermelését, serkenti az izom glükózfelvételét, így megelőzi a hiperglikémia kialakulását [8]. Csökkenti az éhséget, és segíti a súlycsökkenést [9]. Gátolja a glükoneogenezist és a mitokondriális sejthalált. Egyik lehetséges targetje a mitokondrium légzési láncának első komplexe [10]. Emellett azonban új hatóanyagok keresése is fontos inzulinrezisztencia esetében, melyek lehetőleg kevésbé okoznak gyomorpanaszokat, és a vese-, tüdő- és szívbetegek is szedhetik, ugyanis az ő esetükben a metformin egyik mellékhatásaként felléphet a tejsavas acidózis [11]. Tejsavas acidózis során megemelkedik a vérben a tejsav koncentrációja, ami a fiziológias pH-t savas irányba tolja el. Ez adott esetben súlyos, akár életveszélyes állapotot is előidézhethet.

Egyre nagyobb teret kezd nyerni a célzott jelterápia, mely során a stressz hatására aktiválódott pályák egyikének szelektív gátlása történik. Ilyen például az IRS-1 szerin foszforilációjának gátlása közvetlenül, vagy közvetetten a JNK gátlásán keresztül.

Az így ható szerek segítenek a megbomlott egyensúlyi állapotok helyreállításában, ugyanakkor nem változtatnak azon, hogy az elhízás által okozott metabolikus betegségek – köztük a 2-es típusú diabétesz – megelőzése és kezelése elsősorban a helyes életmód kialakításán (megfelelő diéta, testmozgás) alapul.

1.1. Inzulintermelés és inzulinhatás

Az inzulin a tápanyagok felhasználását és raktározását (ezáltal a vércukorszint csökkenését is) előidéző hormon, melynek fontos szerepe van a sejtek túlélésében és növekedésben is. Jóllakott állapotban emelkedik az inzulin szekréciója a β -sejtekben, és ez elengedhetetlen a posztprandiális hiperglikémia elkerüléséhez.

A peptid hormon termeléséért a hasnyálmirigy Langerhans szigeteinek β -sejtjei felelősek. A β -sejtek a szekrécióra érett inzulint membránnal burkolt granulumokba csomagolva tárolják, és ezekből sejtenként több ezer is lehet [12]. A szekréció alapvető stimulusa a glükóz koncentráció növekedése, melynek hatására fokozódik az ATP-termelés, és változik a membránpotenciál. Amikor a glükóz koncentráció elér egy bizonyos határértéket, az elektromos aktivitás oszcillációt okoz a membránpotenciálban a depolarizációs plató érték közelében. Az elektromos aktivitással párhuzamosan Ca^{2+} -koncentráció is emelkedik, ami a granulumok membránja és a sejtmembrán fúziójához, végső soron az előkészített inzulin szekréciójához vezet [13].

Az inzulinszekréció elsődleges szabályozója tehát a plazma glükóz koncentrációja, ez a stimulus azonban szabad zsírsavakkal (FFA), valamint aminosavakkal is kiváltható. Az aminosavak egyenként, fiziológias koncentrációban csak gyenge aktivátorok, de bizonyos aminosavak együtt hatva már a fiziológias koncentrációtartományban az inzulinszekréció fokozódását tudják kiváltani. A szabad zsírsavak receptoron keresztül és metabolikus utak révén egyaránt képesek az inzulinszekréció kiváltására. A β -sejtek membránjában van egy úgynevezett szabad zsírsav receptor 1 (FFAR-1), amelyen keresztül a szabad zsírsavak befolyásolni tudják a β -sejtek működését. Az intracelluláris szabad zsírsavak metabolizmusa lipid jellegű szignálmolekulák szintézisének forrása, mint például a hosszúláncú acil-KoA és a DAG. A protein kináz C (PKC) DAG általi aktiválódása hozzájárul az inzulinszekréció fokozódásához [14].

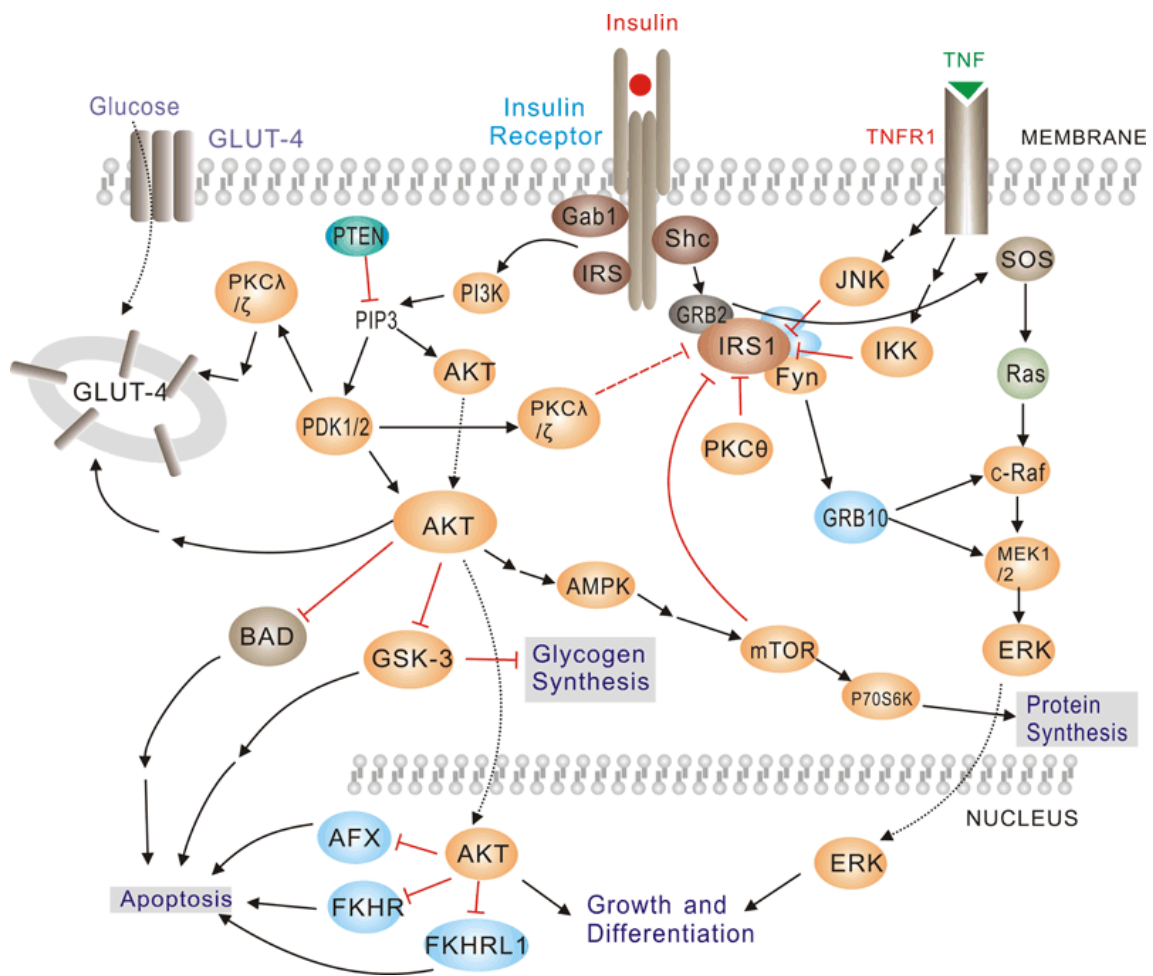
Az emelkedett inzulinszint több szövetben is felgyorsítja a glükóz felhasználását. Tömege miatt kiemelhető a harántcsíktal izom és a zsírszövet, melyek GLUT4 transzportert tartalmaznak, így glükózfelvételük közvetlenül függ az inzulinhatásától. A magas inzulinszint azonban nem csupán a glükóz, hanem minden

tápanyag molekula felhasználását fokozza. A fehérje- és triglicerid-anyagcsere egyensúlyát a szintézis irányába tolja, ezáltal a plazma aminosavak és lipidek felvételét favorizálja.

Az inzulin-receptor a vörösvérsejtek kivételével minden sejtünkben megtalálható heterotetramer (didimer) glikoprotein. Génje a 19-es kromoszómán helyezkedik el. Az enzimaktivitással rendelkező receptorok között a receptor tirozin-kinázok (RTK) családjába tartozik. A receptor 2 α és 2 β alegységből áll, melyeket diszulfid hidak kötnék össze [1]. A β , katalitikus alegység tirozin-kináz aktivitással rendelkezik. Az α , regulátor alegység gátolja a β alegység aktivitását [15]. Ha a hasnyálmirigy Langerhans szigetének β -sejtjei által termelt inzulin bekötődik az extracelluláris α alegységekhez, ez a gátlás megszűnik, és a β alegységek intracelluláris doménjein autofoszforyláció történik [16]. A foszfortirozinok létrejötte alkalmassá teszi a receptort foszfortirozin-kötő (PTB) doménnel rendelkező adapter fehérjék kapcsolódására. Ezek közül a legfontosabb az IRS.

Az IRS-nek 4 izoformája ismert. Közülük az IRS-1 és IRS-2 jelentőségét bizonyították az inzulin különböző hatásaiban [17, 18]. PH (Plecstrin homológ), PTB doméneket, valamint több foszforilálható tirozin és szerin oldalláncot tartalmaz. A PTB doménon keresztül történik az inzulin receptor foszfortirozinjaihoz való kötődés [19]. Az IRS izoformák N terminális végükön a PH doménnel a sejtmembrán savanyú foszfolipidjeihez [foszfatidil-inozitol foszfát (PIP), foszfatidil-szerin (P-Ser)] kapcsolódnak. Az IRS C terminális végén tirozint és szerin/treonint tartalmazó foszforilációs helyek találhatóak. Amennyiben tirozinon történik a foszforiláció, az inzulinjelvény aktiválódik.

Innentől két fő jelátviteli útvonalon folytatódik a szignál, a MAPK kaszkád, valamint a PKB (protein kináz B vagy Akt) aktiválódásával.



1. ábra: Inzulin-jelátvitel

Az inzulin-receptor a receptor tirozin-kinázok (RTK) családjába tartozik. Jellemző rájuk, hogy növekedési jelpályákat is beindítanak a MAPK (mitogén aktivált protein kináz) útvonalon, mellyel a sejtproliferációt serkentő transzkripciós faktorokat aktiválnak. A másik útvonalon pedig a PKB (Akt) aktiválódása révén, elősegítik a GLUT 4 kihelyeződést, ezáltal a glükóz felvételt a vérből; valamint gátolják a proapoptotikus fehérjéket és aktiválják az antiapoptotikus fehérjéket, ezzel elősegítve a túlélést és a növekedést [20].

MAPK kaszkád aktiválódása:

Az IRS tirozinfoszforilációjának hatására egy adapter fehérje, a GRB2 („growth factor receptor-bound protein 2”) a SOS-al („son of sevenless”) komplexet képez. Ez utóbbi egy guanin-nukleotid kicserélő faktor (GEF), mely a Ras kis GTP-kötő fehérjét egy GDP-GTP cserével [21] bekapcsolja. Innen indul a tényleges kináz kaszkád [22]. A Ras hatására ugyanis működésbe lép a MEKK (MAP kináz-kináz-kináz), majd a MEK (MAP kináz-kináz) és végül az ERK1/2 (MAP kináz), amely már különböző transzkripciós faktorokat foszforilál [23]. Kialakul a c-Jun, c-Fos dimerje, melyet AP-1-nek nevezünk, és a sejtciklus G1 szakaszának előre hajtásával a mitotikus osztódás irányába tereli a sejteket.

PKB aktiválódása:

Az IRS tirozinfoszforilációjával másik útvonalon is elindul a jelátvitel. A PI3 kinázok (foszfatidil-inozitol-3-kináz) intracelluláris lipid-kinázok, melyek egy katalitikus (110 kDa) és egy regulátor (85 kDa) alegységgel rendelkeznek [24]. Amennyiben a gátló regulátor alegységeik tirozinfoszforilált IRS-hez dokkolódnak, olyan foszfatidil-inozitol származékokat termelnek, amelyek lehetővé teszik a PDK (foszfatidil-inozitol-dependens kináz), valamint a PKB szerin/treonin-kinázok kötődését a plazmamembrán belső rétegéhez. A PKB PDK-általi foszforilálódásakor disszociál a plazmamembránról, és számos fehérjét foszforilál a citoszólban, illetve a magban [25]. Ezek közé tartozik a FOXO, a GSK3, az mTOR, az AS160, a kaszpáz-9 és a Bad.

A GSK3 (glikogén-szintáz-kináz 3) foszforilálja és inaktíválja a GS-t, mely a glikogénszintézis kulcsenzime. A GSK3 PKB-általi gátlása tehát felszabadítja a GS-t, így az inzulin fokozza a glikogenezist [26]. A GSK3 foszforilálja az eIF2B-t (eukarióta iniciációs faktor 2 B) is, mely egy GEF, azaz az eIF2 transzlációs iniciációs faktoron a GDP-t GTP-re cseréli ki, ezzel aktiválva azt. Az eIF2B foszforilációja meggátolja ezt a guanin-nukleotidcserét, így a transzláció iniciációjának gátlásához vezet. A PKB GSK3-ra kifejtett gátló hatása következtében pedig a fehérjeszintézis fokozódni tud.

Az AS160 (Akt szubsztrát 160 kDa) rendelkezik egy GAP (GTP-áz aktiváló fehérje) doménnel, mely a Ras szupercsaládba tartozó egyik GTP-áz, egy Rab fehérje nukleotidáz működését aktiválja, így a fehérje auto-inaktíválódását segíti elő. A Rab fehérjék számos vezikuláris transzport folyamatban vesznek részt, és az AS160 által

aktivált változat a GLUT 4 kihelyeződésében játszik kulcsszerepet (harántcsíkolt izomban és zsírszövetben), ami a glükóz felvételét teszi lehetővé e sejtekben [27, 28]. Amennyiben a PKB foszforilálja az AS160-at, a GTP-áz aktivitás stimulálása elmarad. Tehát inzulin hatására a Rab GTP-kötött formában marad, amely ily módon segíteni tudja a vezikuláris transzportot, és fokozza az izom- és zsírsejtek glükózfelvételét [29]. A Rab fehérjét a PDK-n keresztül a PKC λ is foszforilálhatja, ezáltal elősegítve és gyorsítva a GLUT4 kihelyeződését. A GLUT4 főként kis vezikulákban és tubulovezikuláris struktúrákban található, kis mennyiségben előfordul a transz-Golgi hálózatban, klatrin-burkolt vezikulákban és az endoszómában [30, 31]. Folyamatos cirkuláció figyelhető meg a plazmamembrán és a vezikulumok között; inzulinhatás hiányában az összes GLUT4-nek mindössze 5%-a kötődik a plazmamembránhoz [29]. Inzulin bekötődése hatására a GLUT4 transzporterek közel 50 %-a exocitózissal kijut a sejtfelszínre, ezzel mintegy megtízszerezve a vérglükóz számára hozzáférhető transzporterek számát. Ilyenkor tehát lényegesen nagyobb sebességgel áramolhat a glükóz a sejtekbe [32]. A hormonhatás lecsengése után ismét visszaáll az alacsony transzportkapacitással jellemezhető alapállapot.

A kaszpáz-9 iniciátor kaszpáz, mely az apoptózis mitokondriális útvonala során, az apoptoszómában aktiválódik. Normál inzulin-jelátvitelkor az aktivált PKB/Akt gátolja a kaszpáz-9 fehérjét, ami akadályozza az apoptózis beindulását [33]. A programozott sejthalál különböző okból történő stimulálása rendszerint a mitokondriális membrán permeabilitásának fokozódásával és így az APAF-1 apoptoszóma létrejöttével, valamint a kaszpáz-9 aktiválódásával is jár [34, 35]. Ilyen hatást válthat ki az ER-stressz során aktiválódó JNK/SAPK működése is [36].

A Bad a Bcl2 fehérjecsald csak BH3 (Bcl2 homology domain 3) doménnel rendelkező proapoptotikus tagja. Ha heterodimert képez a Bcl2 család antiapoptotikus tagjaival, ez lehetővé teszi a mitokondriális membrán permeabilitásának fokozódását, vagyis elősegíti az apoptózist. Mivel azonban a PKB által foszforilált Bad inaktív és szekvesztrált, az inzulin-jelátvitel ezen a ponton is a sejtek túlélését segíti elő [37].

A túltáplálás növeli a β -sejtek inzulintermelési kényszerét. Amíg a fő metabolikus szövetek (máj, harántcsíkolt izom és zsírszövet) képesek a nagy mennyiségű glükóz felvételére, addig nem borul fel a homeosztázis. Az, hogy kinél meddig feszegethető ez a határ, azt genetikai és környezeti tényezők befolyásolják.

1.2. Az elhízáshoz kapcsolódó anyagcsere-betegségek

Az obezitást, azaz az elhízás mértékét a BMI index-el (azaz testsúly (kg) / magasság² (m²)) lehet számszerűsíteni. Ennek értéke 18,5-25 között optimális. 25 feletti BMI esetében elhízásról, 30 feletti BMI értékeknél pedig súlyos elhízásról beszélünk [38, 39].

Az elhízás hátterében mind genetikai hajlam, mind környezeti tényezők szerepet játszanak. Ezek együttes hatása okozza e komplex krónikus betegség kialakulását. Természetesen mindezek mellett a kulturális és viselkedési mintázatok is erősen befolyásoló tényezők. Az elhízással számos más betegség kialakulásának kockázata is megnő, mint például a magas vérnyomás, szív- és érrendszeri betegségek, sztrók, légúti betegségek, valamint bizonyos daganatos megbetegedések [40].

Minél nagyobb a BMI index, annál nagyobb a 2-es típusú diabétesz kialakulásának valószínűsége is. A férfiaknál azonban azonos BMI index mellett nagyobb a diabétesz kialakulásának esélye, mint az azonos életkorú nők esetében [41].

Míg a szervezetben működő homeosztázis igyekszik az energiamérleget egyensúlyban tartani, a túlzott táplálékbevitel az energiaraktározás felé tolja el a mérleget, mégpedig zsír (triglicerid) raktározásával. Ha pedig kisebb az energiabevitel, akkor ezek a trigliceridraktárak ürülnek, és a zsírsejtek (adipociták) térfogata csökken. A preadipociták differenciálódás útján válnak érett, lipiddel teli sejtekké (hiperplázia), aminek mértéke arányos a sejtek halálzási arányával, azaz a sejttömeg nem változik, és az adipociták száma is konstans marad [42].

A zsírszövet diszfunkcióját (adipozopátia) a meglévő adipociták térfogatnövekedése (hipertrófia), valamint a hasüregi (viszcerális) zsír akkumulációja okozza [43]. Elhízásban ezért jellemzően megnő a vérben keringő szabad zsírsavak (FFA) koncentrációja, amely befolyásolja az inzulinra adott sejtválaszt és növeli az inzulinrezisztencia kialakulásának valószínűségét.

1.2.1. Inzulinrezisztencia

Az inzulin a sejtek növekedésére, proliferációjára és túlélésére, valamint a glükózhomeosztázisra kifejtett hatásai miatt esszenciális hormon. Anabolikus

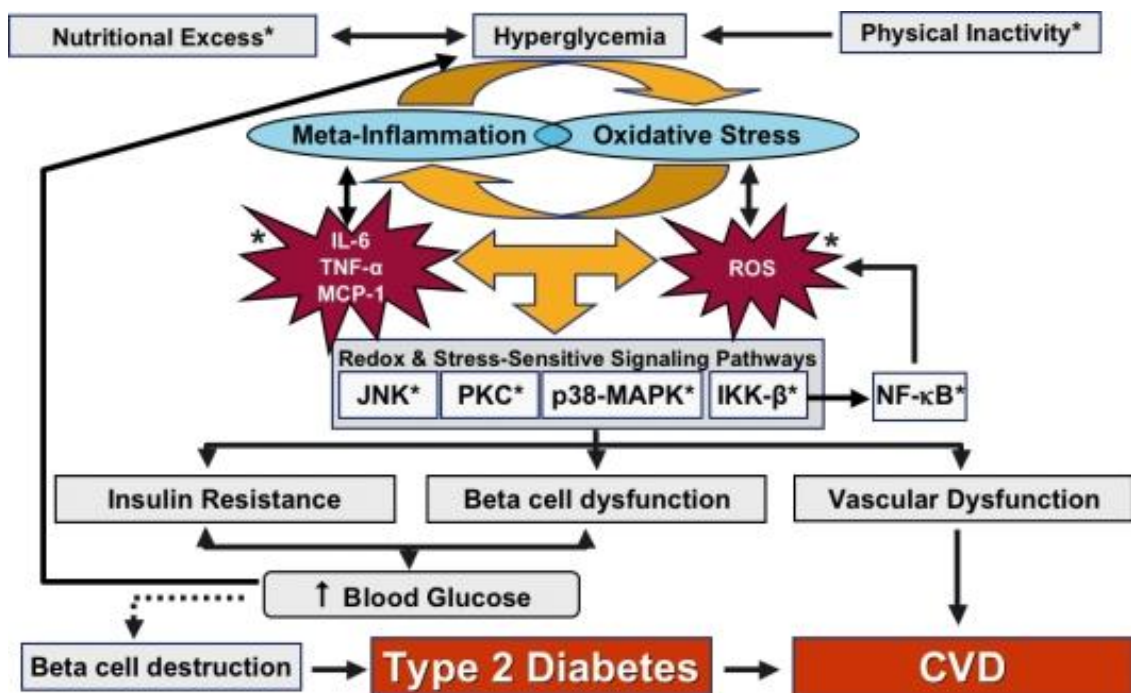
hormonként sok szempontból ellentétesen működik a szintén a pancreasban termelődő glukagon katabolikus hormonnal [44]. A glükóz termelését csökkenti a májban, vesében és vékonybélben, a glükóz felhasználását pedig minden szövetben fokozza.

Amikor az inzulinjelpálya sérül, a sejtek inzulin iránti érzékenysége is károsodik, ekkor beszélünk inzulinrezisztenciáról [45]. Inzulinrezisztenciában szenvedő betegeknél megfigyelték a csökkent PI3K aktivitást a vázizomban és a zsírszövetben [28].

Az inzulinrezisztencia létrejöttében szerepet játszhatnak a protein-tirozin-foszfatazok (PTP) is, melyek negatívan szabályozzák az inzulinjelpálya működését, ezek közül a PTP-1B szerepe kulcsfontosságú. A SHIP2 („SH-2-containing inozitol 5'-phosphatase 2'") és a PTEN („phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10'") is csökkenti az inzulinérzékenységet [28].

Nagyon gyakori azonban, hogy az inzulinrezisztencia kialakulásának hátterében az IRS-1 szerin/treonin-foszforilációja áll. Több mint 50 ilyen foszforilációs helyet térképeztek már fel tömegspektrometria segítségével. A foszforilációjukat okozhatja IKK β , p38–MAPK, JNK, mTOR vagy PKC, és ezáltal IRS-degradáció vagy csökkent IRS-asszociált PI3K-aktiváció alakulhat ki patológias körülmények között [46]. Az inzulinrezisztenciát ezért kiválthatják gyulladáshoz vezető egyéb hatások, mint például a tumor nekrozis faktor α (TNF α), interleukin-6 (IL-6), interleukin 1 β (IL1 β) vagy az NF- κ B aktiválódásához vezető egyéb hatások [47, 48].

Mutációs analízis során azt találták, hogy a rágcsálók IRS-1 Ser307-es foszforilációja (ami humánban a Ser312-es foszforilációs helynek felel meg) a JNK egyik fő targetje, mely az aktivált inzulin-receptor és az IRS-1 PTB doménje közötti interakciót megzavarja [49]. Az IRS-1 Ser307-foszforilációjáért főként a JNK1 altípus felelős [50] (lásd még: JNK fejezet).



2. ábra: Inzulínrezisztencia kialakulásának főbb okai

A túlzott táplálékbevitel és a fizikai aktivitás hiányának következtében hiperglikémia lép fel. A gyulladós mediátorok, valamint az oxidatív stressz hatására aktiválódó ER-stressz fehérjék inzulinrezisztenciát okoznak, ami β -sejtpusztuláshoz és 2-es típusú diabétesz kialakulásához vezet [51].

Ha a sejtek inzulinra adott válasza gyengül, hiperinzulinémia léphet fel. A β -sejtek próbálják ugyanis kompenzálni a normál sejtválasz fenntartását azzal, hogy nagyobb mennyiségben termelik az inzulint. Azonban ez sokszor nem elegendő a megfelelő hormonhatás fenntartásához, és végül a β -sejtek pusztulásához is vezethet.

Az inzulinrezisztencia elősegíti tehát a hiperglikémiát, hiperinzulinémiát, diszlipidémiát és magas vérnyomást, melyek nem-alkoholos zsírmáj (NAFLD), 2-es típusú diabétesz, valamint szívbetegségek és keringési zavarok kialakulásához vezethetnek.

1.2.2. Metabolikus szindróma

A metabolikus szindróma komplex rendellenesség, mely diszlipidémiával, glükóz intoleranciával, keringési zavarokkal, magas vérnyomással, nem-alkoholos zsírmájjal (NAFLD) és obesitással jellemezhető. A glükóz intolerancia a hiperglikémia pre-diabetikus állomása, amikor a sejtek már nem vesznek fel annyi glükózt, amennyi a normál vércukorszint fenntartásához szükséges lenne. Mindezen rendellenességek kialakulásának oka az inzulinrezisztencia jelensége, mely az inzulinjelpálya sérülését, ezáltal a glükóz vérből való felvételének zavarát vonja maga után [52, 53]. Ez a szindróma lassan kezd a világ egyik legnagyobb egészségügyi problémájává előlépni.

Metabolikus szindrómáról beszélhetünk abban az esetben, ha az alábbi 5 tünetből legalább 3 fennáll: [54-57]

1. Törzs körüli elhízás. Ha a derékbőség: férfiaknál 102 cm-nél, nőknél 88 cm-nél nagyobb.
2. Emelkedett artériás vérnyomás. Ha 130/85 Hgmm-nél nagyobb.
3. Ingadozó vércukorszint (diszglykémia). Ha az éhgyomri plazma glükózsztint 100 mg/dl felett van.
4. Emelkedett triglicerid-koncentráció. Ha 150 mg/dl feletti érték.
5. Alacsony HDL-koleszterinsztint. Kevesebb mint 40 mg/dl férfiak esetében, és kevesebb mint 50 mg/dl nőknél.

Magas vérnyomásos betegek esetében kevésbé működik jól az endogén és exogén antioxidáns védelem [58]. Az eNOS hatására képződő NO az endotél sejtek körüli simaizmok relaxációját okozza a guanilcikláz aktiválódására képződő cGMP-n keresztül, ami ily módon vazodilatációt okoz. Inzulinrezisztenciában az erek relaxációja is károsul, ami miatt hipertenzió lép fel. Metabolikus szindróma hatására az erek öregedése felgyorsul, és a hipertenzió okozta keringési megbetegedések valószínűsége megnő [56].

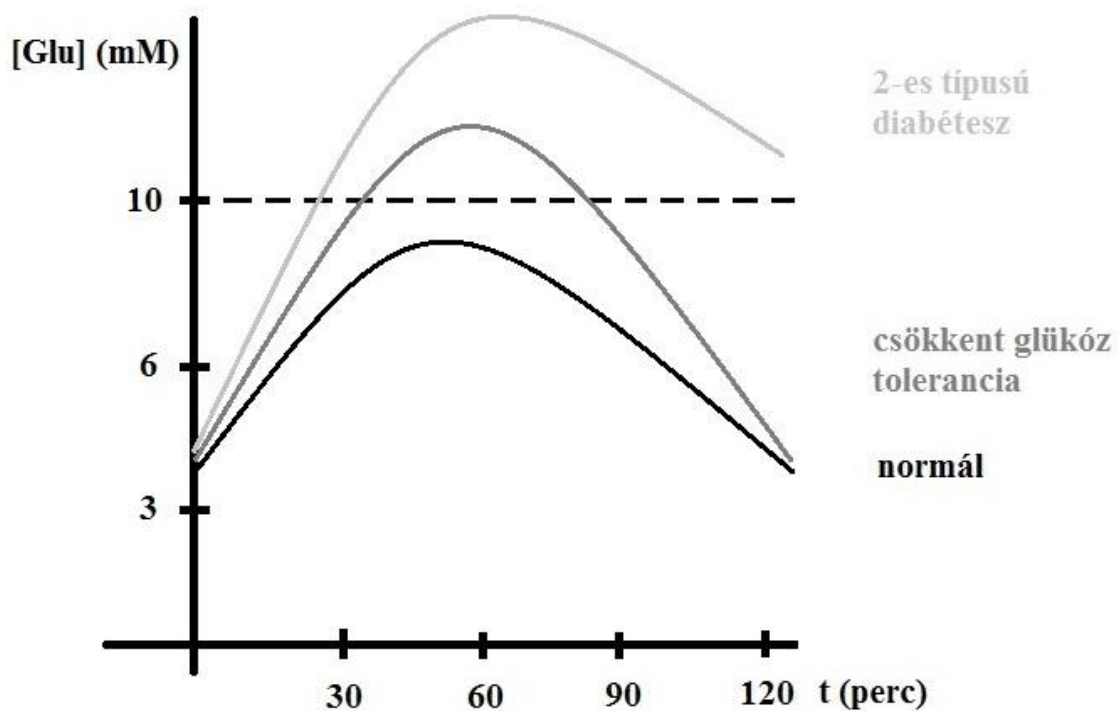
1.2.3. A 2-es típusú diabétesz

A diabetes mellitusnak alapvetően két főbb formája ismert [1].

Az 1-es típusú diabétesz (inzulinfüggő) krónikus autoimmun betegség. Ennek lényege, hogy a szervezet nem tud inzulint termelni. Viszonylag fiatal korban diagnosztizálható. Ezek a betegek egész életük során inzulin adagolására szorulnak, azonban a korszerű technikának köszönhetően ez már egyre könnyebben kivitelezhető, és teljes értékű életet tudnak élni.

A 2-es típusú diabétesz (nem inzulinfüggő) fordul elő az összes diabéteszes beteg 90%-ánál. Erre a betegségre heterogén metabolikus állapotok jellemzőek, úgy mint a vércukorszint megemelkedése, valamint az inzulin-jelátvitel, illetve inzulinszekréció zavara [1]. Ebben az esetben a szervezet eredetileg képes inzulin termelésére, azonban ez a folyamat felnőtt-, vagy sajnos egyre inkább már gyermekkorban is károsul, aminek hatására részben vagy teljesen leállhat az inzulin termelése a pancreas Langerhans-szigeteinek β -sejtjeiben [7]. A diabétesz kialakulását megelőzően fellép az inzulinrezisztencia [5], mely sokszor hiperglikémiát von maga után az inzulin-jelátvitel zavarának következtében. Ez nagyobb inzulinprodukciót igényel a β -sejtben, hogy megpróbálják ezt a felbomlott egyensúlyi állapotot helyreállítani. A kompenzálás egy ideig sikeres lehet, azonban nagyon gyakran a β -sejtek kimerülnek, és az inzulinrezisztencia következtében megemelkedett szabad zsírsavszint, vagy egyéb ER-stresszt kiváltó hatás, illetve ROS (Reaktív Oxigén Származék) felszaporodása által előidézett oxidatív stressz hatására apoptotizálnak [59]. Az inzulinrezisztencia, amennyiben időben diagnosztizálják, gyógyszeresen kordában tartható, bizonyos esetekben a folyamatot akár vissza is lehet fordítani. A 2-es típusú diabétesz elterjedésének oka az egyre nagyobb méreteket öltő elhízás, az ülő munka, valamint a fizikai aktivitás hiánya [60].

A magas vércukorszint következményeként különböző keringési megbetegedések léphetnek fel; szívelégtelenség, sztrók, veseelégtelenség és diabéteszes retinopátia. Valamint a gyenge véráram következtében végtag amputációra is sor kerülhet. Klasszikus jelei a poliúria, polidipszia és polifágia, valamint súlycsökkenés.



3. ábra: Orális Glükóz Tolerancia (OGT) teszt

A normál vércukorszint 3,5 mM és 5,5 mM között van. 60 percnél éri el maximumát 1g/testsúly kg cukros víz megivása után. Azonban ekkor sem érheti el normál állapotban a 10 mM-t. 2 óra után pedig egészséges embernél visszatér normál szintre. Inzulinrezisztenciára akkor van okunk gyanakodni, ha 1 óra után meghaladja a 10 mM-os értéket a vércukorszint (ekkor már csökkent glükóz toleranciáról beszélhetünk), vagy ha az érték 2 óra után nem tér vissza a normál szintre. Ez esetben már a 2-es típusú diabétesz is valószínűsíthető.

Orális glükóztolerancia teszttel (vagy terheléses vércukorszint-mérés) lehet vizsgálni az inzulinrezisztenciát. Ennek során reggeli éhgyomorra 1g/testsúly kg

szőlőcukrot tartalmazó folyadékot kell a páciensnek meginnia, majd 0 perc, 30 perc, 1 óra és 2 óra elteltével nézik a vércukorszintet. A normál éhgyomri vércukorszint 3,5 mM és 5,5 mM között van. A terhelés során 1 óránál mutatkozik a legmagasabb érték, azonban 2 óránál visszatér az éhgyomri normál szintre. Két esetben van ok feltételezni inzulinrezisztenciát. Amennyiben az 1 órás, legmagasabb érték meghaladja a 10 mM-t, vagy ha az érték 2 óra után nem tér vissza a normál szintre. Ez esetben már a 2-es típusú diabétesz is valószínűsíthető.

Érdemes minél hamarabb felismerni az inzulinrezisztencia kialakulását, hogy még meg lehessen előzni a további β -sejtpusztulást, valamint a tényleges diabétesz kialakulását. Fontos ebben a gyógyszeres kezelés, mely segíti helyreállítani a normál mértékű inzulintermelődést, valamint fontos új hatóanyagok fejlesztése, melyek akár kevesebb mellékhatással, hatékonyabb eredményeket tudnak elérni.

1.2.4. Glükotoxicitás és lipotoxicitás

Krónikusan sok tápanyagbevitel a szervezetbe hiperglikémiát okoz. A magas vércukorszint a β -sejtek igénybevételét növeli az inzulin fokozott mértékű termelésével. Mindez a metabolikus útvonalak aktiválódását, valamint ER- vagy oxidatív stresszt idéz elő, melyek a β -sejtek inzulintermelési zavarához, vagy azok túlélésének csökkenéséhez vezet [61]. A túlzott glükóz fogyasztás alapvetően redukzív stresszt okoz a megemelkedett NADH-szintnek köszönhetően, ez azonban mégis végül oxidatív stresszhez vezet különböző alternatív anyagcsere útvonalak felerősödésének következtében. Ezt a hosszas folyamatot nevezzük glükotoxicitásnak [59].

A táplálékkal elfogyasztott és felszívódott zsírokat a kilomikron szállítja el a bélből a nyirok- és vérkeringésbe. A vérben található szabad zsírsav, vagy más néven nem észteresített zsírsav (NEFA) a már raktározott zsírok mobilizálásából, vagyis a zsírszövetből származik. Elhízás esetén, amikor túlzott mértékű táplálékbevitel van, megemelkedik a szabad zsírsavszint, ami az inzulinrezisztencia kialakulását segíti elő. A lipotoxicitás az emelkedett szabad zsírsavszint sejtekre gyakorolt káros hatásait

jelenti. Amennyiben ez a káros hatás a sejt pusztulásához vezet, lipoapoptózisnak nevezzük.

A zsírsavak szignál molekula funkcióval is rendelkeznek. A lipid metabolizmus szabályozásában részt vesznek a peroxiszóma-proliferátor aktivált receptorok (PPAR), melyek ligandjai a telítetlen zsírsavak és származékaik. Ezek olyan ligand által szabályozott transzkripciós faktorok, melyek a sejt differenciálódásával kapcsolatos géneket, és rengeteg metabolikus folyamatot szabályoznak, mint például a lipid- és glükóz homeosztázist. Három izoformája ismert, a PPAR α , a PPAR β/δ és a PPAR γ [62].

A PPAR α a vázizomban és a májban β -oxidatív gének expresszióját szabályozza, mellyel csökkenti a lipotoxicitást és növeli az inzulin iránti érzékenységet. A PPAR α agonisták csökkentik a lipidakkumulációt a perifériás szövetekben, mint például a májban, védenek a palmitát indukált lipotoxicitás ellen a mitokondriális és peroxiszómális β -oxidáció fokozásával; ezáltal meggátolják a β -sejtek diszfunkcióját is [63]. E hatásuknak köszönhetően a diszlipidémia és diabétesz mellitus gyógyszeres kezelésében igen fontos szerepet játszanak.

Az extracelluláris szabad zsírsavak (FFA) aktiválhatják a „toll-like” receptorcsalád (TLR) egyes tagjait is. A TLR-ek a patogének molekuláris mintázatait felismerő receptorok, melyek szerepe elsősorban az immunrendszerhez köthető, azonban az emlős májban nem csak a Kupffer-sejtek, hanem maguk a hepatociták is tartalmazzák [64]. A TLR-ek aktiválni tudják mind a JNK-t, mind az I κ B (inhibitor kappa B) kináz komplexet, mellyel az IRS szerinfoszforilációját, ezáltal az inzulinrezisztencia kialakulását segítik elő [65]. A JNK aktivációját ROS-termelés révén, vagyis oxidatív stresszt indukálva tudják előidézni [66]. A TLR2 és TLR4 expressziója magas glükóz koncentrációnál, valamint telített zsírsavak hatására fokozódhat, mely gyulladásos citokinek (IL-1 β , IL-6 és TNF- α) termelését, valamint a nukleáris faktor- κ B (NF- κ B) aktiválását idézi elő. Szerepet játszanak a β -sejtek lipotoxicitásában is [67].

Az FFA aktiválja a GRP40-et (vagy FFAR1-et) mely a humán és rágcsálók β -sejtjeinek felszínén expresszálódik, és az inzulinszekréciót, valamint β -sejtek túlélését segíti elő. INS-1 sejtekben a telített zsírsavak csökkentették az FFAR1-et, míg a

telítetlen zsírsavak növelték azt, mellyel a lipotoxicitással szembeni védekezést segítették elő [68].

A lipotoxicitás által előidézett hatások közül kritikus az inzulinrezisztencia kialakulása, valamint a β -sejtek diszfunkciója illetve apoptózisa. A FFA által indukált inzulinrezisztencia mellett az ER- és oxidatív stressz is szerepet játszik a sejtpusztulásban.

1.3. Az endoplazmatikus retikulum és kapcsolata a metabolikus szindrómával

Az endoplazmatikus retikulum olyan organelum az eukarióta sejtekben, melynek egyik legfontosabb feladata a fehérjeszintézis és -érés, valamint a megfelelően feltekeredett fehérjék továbbítása azok végső rendeltetési helye felé [3]. Mivel ezek igen szigorúan szabályozott mechanizmusok, bármilyen zavaruk a homeosztázis felborulását eredményezheti. Az endoplazmatikus retikulum működészavarai a metabolikus szindróma kialakulásához is hozzájárulhatnak.

1.3.1. Az endoplazmatikus retikulum felépítése és fontosabb funkciói

Az endoplazmatikus retikulum minden eukarióta sejtben megtalálható organelum, mely folytonos membránhálózatot képez a citoszólban [69, 70]. Mérete a sejt funkciójától nagymértékben függ. Két fő típusa van, a durva felszínű endoplazmatikus retikulum (DER), mely nevét onnan kapta, hogy igen riboszómadús, valamint a sima felszínű endoplazmatikus retikulum (SER) mely riboszómákban szegényebb. A két típus funkcióját tekintve is eltérő. A DER-ben inkább a fehérjeszintézis és fehérjék érése zajlik. Májsejtekben a SER felelős a detoxifikációért, izomsejtekben, ahol szarkoplazmatikus retikulumnak is nevezik, a kalcium raktározásában és gyors kiürítésében van szerepe. A SER és a DER folytonos átmenetet képez egymással, valamint a sejtmagburokkal [71].

Rengeteg metabolikus útvonal helyszínét képezi az ER. Különösen sok enzim található a membránba ágyazottan, és fontos reakciók zajlanak az organelum lumenében [69]. Jelentős kalciumraktár található meg itt, mely a kalcium homeosztázisában játszik fontos szerepet [72]. Itt történik a fehérjék szintézise, foldingja, módosítása, vagyis érése [73]. A szénhidrát-anyagcsere egyik enzime a glükóz-6-foszfátáz is itt található, amely éhezés során a glükóztermelést teszi lehetővé [74]. A glükóz-6-foszfát oxidálódásának ugyanakkor fontos szerepe van a lokális redox homeosztázis létrejöttében [75]. A lipidanyagcsere számos folyamata is az ER-hez kötött, a foszfolipidek és a koleszterin zöme, valamint a triacilgliceridek és koleszteril-észterek is itt termelődnek [76]. Itt található a biotranszformáció előkészítő fázisának fontos enzime, a citokróm P450 monooxygenázok [77], valamint a második fázis legfontosabb enzime, az UDP-glukurozil transzferázok is [78].

1.3.1.1. Kalciumhomeosztázis

A kalcium az egyik legfontosabb másodlagos hírvivő a sejtekben. A kalcium-jelátvitel rengeteg biológiai funkciót válthat ki, mint például fehérjeszintézist, proliferációt, szekréciót, génexpressziót, ATP-termelést, vagy akár apoptózist [79].

A legfontosabb kalciumraktárunk az endoplazmatikus retikulumban található. Nemcsak hogy nagy mennyiségben található itt meg a kalcium, hanem gyorsan is mobilizálható. Az aktív transzportot a SERCA nevű pumpa végzi a citoplazmából az ER lumenébe, mely a PII típusú ATP-áz család tagja [80]. A kalcium ionok spontán citoplazmába áramlása a RyR vagy inozitol 1,4,5-triszfoszfát-receptor (IP3R) csatornákon keresztül történik [81]. Az ER-stressz kiváltásának egyik leghatékonyabb és legelterjedtebben alkalmazott módja a kalcium homeosztázis felborítása a SERCA gátlása révén. Így hat pl. a thapsigargin nevű ER-stresszor. Ha pedig az ER-stressz bármely okból kialakul, ez tartós kalciumkiáramlással jár, ami az endoplazmatikus retikulum működését tovább rontja.

1.3.1.2. Fehérjeszintézis és –érés

A fehérjék transzportja az ER-be a riboszómákon szintetizálódó polipeptidek egy részén megjelenő amino-terminális szignál szekvenciának köszönhető [82]. Ilyenkor egy SRP („signal recognition particle”) kötődik a riboszómához, mely az mRNS-ről történő translációt leállítja, és a riboszómát a DER-hez kapcsolja [83]. A transláció itt tovább folytatódik, és a szintetizálódó fehérje a transzlokon csatornán keresztül bekerül az ER lumenébe, ahol natív konformációja kialakul, valamint itt történnek a ko- és poszttranszlációs módosulásai is. Végül az érett fehérje vezikuláris transzporttal jut tovább a megfelelő helyre.

Számos ER chaperon és enzim segít a szerkezeti és konformációs érés során. Az ER-ben zajló protein folding jellegzetes részfolyamatai között említhető a szignál peptid lehasítása, az N-glikoziláció, a diszulfid hidak kialakítása és a gliko-foszfatidil-inozitol (GPI) horgony létrejötte [84].

1.3.1.3. Diszulfid hidak kialakulása

A diszulfid hidak, melyek a cisztein oldalláncok tiol csoportjainak oxidációjával keletkeznek, növelik a fehérjék stabilitását. A tiol-diszulfid-oxidoreduktázok katalizálják a folyamatot, melyet tiol-diszulfid kicserélődésnek hívunk.

A PDI az ER protein diszulfid izomeráz család legjelentősebb tagja, három folyamatot is katalizál; a tiol-oxidációt (diszulfidképződés), a diszulfidok redukcióját (diszulfidhasítás), valamint a diszulfidok átrendeződését (diszulfidizomerizáció). Ez utóbbi két lépés a rossz helyen képződött diszulfidok esetében szükséges [85].

A folyamatban részt vesz még az ERO1 („endoplasmic reticulum oxidoreductase 1”) tiol-oxidáz flavoprotein is, melynek a fő feladata az oxidatív környezet fenntartása, amit a natív fehérje tioljairól származó elektronok oxigénre juttatásával biztosít.

1.3.1.4. Fehérjeglikoziláció és minőségellenőrzés

Az ER-ben a szintetizálódó fehérjék gyakran oligoszacharid láncokkal egészülnek ki, melynek a minőségellenőrzésben van szerepe. Az N-glikozilációs folyamat két fő fázisból áll: a lipid-kötött oligoszacharidoknak a polipeptidek megfelelő aszparaginil oldalláncjaihoz való kötődéséből, valamint a fehérjekötött oligoszacharidok szerkezeti módosításaiból. A lipid-kötött oligoszacharidok szintézise az ER membránjának mindkét oldalán zajlik, melynek katalízisében specifikus glikoziltranszferázok vesznek részt. Az oligoszacharidok kötődése a polipeptidlánchoz amid csoporton keresztül történik az aszparaginil oldalláncon [86]. A polipeptidlánc ily módon oldatban tud maradni, valamint a natív fehérjéhez lektinek tudnak kötődni, ami a folding hatékonyságát növeli.

Az ER-ben a chaperonok [pl. Bip (GRP78)], lektinek (pl. kalnexin, kalretikulin), valamint foldázok (pl. PDI) nem csak a fehérjeérés katalizátoraként működnek, hanem a minőségellenőrzésért is felelősek. Azokat a fehérjéket, melyek szerkezete eltér a natív konformációtól felismerik, hozzákötődnek, és nem engedik távozni az ER lumenéből, amíg a helyes konformáció helyre nem állt. Amennyiben a megfelelő natív konformáció kialakul, vezikuláris transzporttal elhagyják az ER lumenét.

Azok a fehérjék, amelyeket nem sikerül kijavítani, végleges lebontásra kerülhetnek az ERAD („endoplasmic reticulum-associated protein degradation”) nevű folyamat során. A javíthatatlannak ítélt polipeptidek retrotranszlokációval a citoplazmába kerülnek, ahol ubiquitinálódnak és a proteozómában lebomlanak [81].

1.3.2. Az endoplazmatikus retikulum stressz

Az endoplazmatikus retikulum rengeteg esszenciális funkcióval rendelkező intracelluláris organelum, mely igen érzékenyen reagál a változásokra. A sejtet érő stressz hatások az UPR kaskád aktiválódását vonja maga után. Az ER-t érő fontosabb

stresszhatások: a kalciumhomeosztázis-, a redox státusz-, illetve a fehérjeglikoziláció zavara.

Az ER stressz hatására beinduló adaptív mechanizmus, az UPR, a felborult egyensúlyt próbálja helyrehozni. A fehérjeszintézis ilyenkor csökken, az ER térfogata, a chaperon termelés és az ERAD kapacitása pedig nő. Ha a stressz leküzdhetetlen, mert helyrehozhatatlan hiba okozta, az UPR a sejt apoptózisát is kiválthatja.

1.3.2.1. Az UPR jelensége

Az UPR során sok rosszul feltekeredett fehérje halmozódik fel az ER belső kompartmentjében, és ez három főbb jelátviteli útvonal aktiválódásán keresztül változtatja meg a sejt működését. Az ER-stressz három transzmembrán receptora a PERK („RNA dependent protein kinase-like ER kinase”), az ATF6 („activating transcription factor 6”), valamint az IRE-1 („inositol-requiring enzyme 1”) [7, 87, 88]. Az UPR celluláris megjelenésének alapvető célja az ER homeosztázisának helyreállítása. Ezt a célt szolgálja a fehérjeszintézis gátlása, valamint az ER chaperon fehérjéinek és selejt fehérjét kiürítő-lebontó rendszerének up-regulációja, amely helyreállítja a fehérjetermelés és -érés egyensúlyát, és hatékonyabbá teszi a rosszul feltekeredett fehérjék eliminálását [5]. A PERK, IRE-1 és ATF6 membránfehérjék inaktív állapotukban a Bip-hez („immunoglobulin heavy-chain-binding protein”) vagy másik nevén GRP78-hoz kötődnek. A GRP78 disszociációjakor aktiválódnak, és iniciálják a fő ER-stressz útvonalakat [89].

Az IRE-1 aktiválódása során autofoszforilálódik. Ennek hatására az egyik szubsztrátja, az XBP-1 (X-box-binding protein) mRNS-éből kihalad 26 bázispárnyi fragment, ami a hasított forma (sXBP-1) szintézisét, és a DNS „UPR elemeihez kötődését” okozza. Mindez a folding kapacitás megnövekedéséhez, valamint az ER chaperonok és az ERAD indukciójához vezet [90, 91].

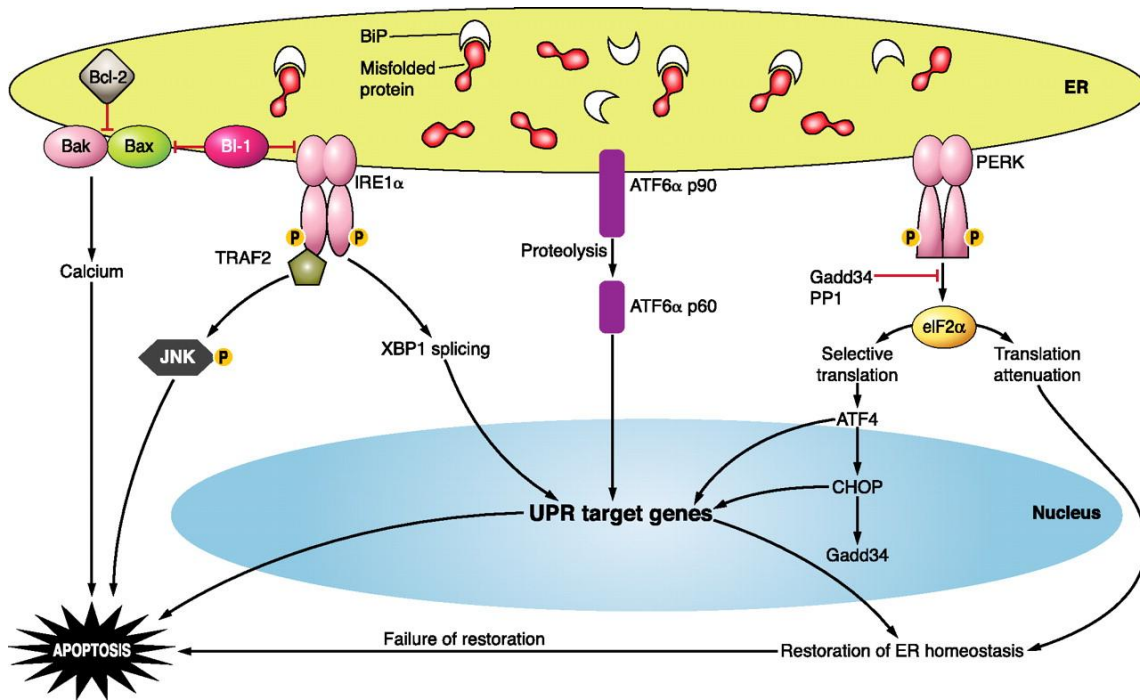
Ezen az útvonalon, IRE-1 autofoszforilációjának hatására aktiválódik a JNK is (lásd JNK fejezet).

Az aktív ATF6 a Golgihoz transzlokálódik, és proteolízissel felszabadul a citoplazmái doménje, mely transzkripciós faktorként működik. Ez a transzkripciós

faktor az „ER stress response” elemeihez kötődve ER chaperonok, valamint a CHOP [„C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) homologous protein”], vagy más néven GADD153 („growth-arrest and DNA-damageinducible protein”) indukcióját okozza.

A PERK ER stressz hatására szintén autofoszforilálódik és foszforilálja a szerin 51-en az eIF2 α -t (eukarióta iniciációs faktor 2 α), amivel csökkenti az általános fehérjetranszlációt. Ez a transzláció gátlás az ATF4 transzkripció faktor szintézisének fokozódását okozza, mely a CHOP/GADD153-t indukálja [44]. Bizonyos tanulmányok szerint a magas glükózsint aktiválja az ERO1 α -t, ami a PDI-n (Protein Diszulfid Izomeráz) keresztül oxidálva fehérjetiolokat, a diszulfidhidak kialakításában játszik fontos szerepet. Így tehát az ERO1 α indukciója és/vagy aktiválódása elősegíti az inzulin bioszintézisét is [44].

Az ER-stressz válasz főbb szerepe az ER folding kapacitás erősítése a fehérje transzláció mérséklésével, valamint a rosszul feltekeredett fehérjék degradációja. Ha ezzel nem állítható helyre az ER homeosztázis, akkor apoptózis fog fellépni.



4. ábra: Az UPR három főbb útvonala

Az UPR („Unfolded Protein Response”) során a rosszul feltekeredett fehérjék endoplazmatikus retikulum stresszt indukálhatnak, mely három útvonalon aktiválódhat: a PERK („RNA dependent protein kinase-like ER kinase”), ATF6 („activating transcription factor 6”), valamint IRE-1 („inositol-requiring enzyme 1”). Ezen membránfehérjék inaktív állapotukban a Biphez, vagy más néven GRP78-hoz kötődnek. Stressz során a Bip ledisszociál, és beindulnak a stressz útvonalak. Ha az ER homeosztázisa nem hozható helyre, a folding kapacitás erősítésével, akkor a sejt apoptózissal elpusztul [92].

A CHOP, mely mindhárom jelpályán keresztül indukálódhat, proapoptotikus irányban befolyásolja a Bcl-2 család tagjainak (Bcl-2, Bim, PUMA, NOXA) expresszióját [93]. A CHOP szabályozza a GADD34 expressziót is, ami a PP-1-el („protein phosphatase 1”) asszociálódva negatív visszacsatolásként defoszforilálja az eIF2α-t, vagyis a transzlációt általánosan fokozza, mellyel az apoptózis irányába tolja el

a folyamatokat [94]. A CHOP emellett aktiválja az ERO1-et is, mi pedig kalciumkiáramlást eredményez.

Az IRE-1 útvonalon stressz kinázok aktiválódnak, mint például a JNK, p38 vagy az IKK, melyek apoptózist indukálhatnak, többek között a prokaspáz-12 hasításának indukálásával.

1.3.3. JNK

A c-Jun N-terminális kináz (JNK), mely a mitogén aktivált protein-kináz (MAPK) család tagja, egy stressz-aktivált kináz. Három izoformája van: JNK1, JNK2, JNK3, melyeket jnk1, jnk2 és jnk3 gének kódolják. A jnk1 és jnk2 gén minden sejtünkben expresszálódik, míg a jnk3 leginkább csak az agyban, szívben és a gonádokban [95].

A JNK jelátviteli útvonal főként metabolikus stimulusok, citokinek (pl. TNF α), glükokortikoidok, szabad zsírsavak (FFA) és környezeti stressz, valamint ER-stressz hatására aktiválódik [96, 97]. A JNK-nak mint a MAPK család tagjának a sejtproliferációban, túlélésben és DNS-hibajavításban szabályozó szerepe van, mivel számos transzkripciósfaktort foszforilál (pl. c-Jun, p53) [95]. In vivo kísérletekben igazolták, hogy míg a JNK1 foszforilálni képes a c-Jun-t, addig a JNK2 nem, sőt akár gátolni is tudja. Az in vitro kísérletek azonban inkább azt mutatják, hogy ugyanaz a hatása mindkét altípusnak [98].

A JNK kulcsszereplő az elhízás és a 2-es típusú diabétesz kialakulásában. A JNK különböző oldalláncokon képes foszforilálni az IRS-1-et, ezek közül a Ser307-es oldalláncon (rágcsálókban Ser307, humán sejtekben Ser312) történő foszforilációnak kiemelt szerepe van az inzulinrezisztencia és a β -sejtek diszfunkciójának kialakulásában. Amennyiben az IRS-1 szerin oldalláncon foszforilálódik, csökken az inzulin általi IRS-1 tirozinfoszforiláció. A JNK a túltáplálást következményeként több módon is aktiválódhat. Az elhízás következtében megemelkedik a szabad zsírsavszint, és ez a lipotoxicitás szintén elősegíti az IRS-1 Ser307-foszforilációt. A JNK interacting proteinek (JIP) pányvázófehérjéi a különböző JNK izoformáknak, és meghatározzák azok kináz aktivitását. Például a JIP-1 kiütése, hasonló tüneteket produkál egerekben,

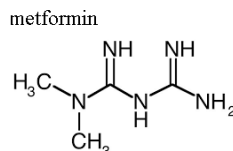
mint a JNK1 hiánya. Csökken a JNK-aktiváció, és nő az inzulin iránti érzékenység [99]. A dolgozatban leírt kísérletekben alkalmazott BI-78D3 nevű hatóanyag a JIP-1-JNK kötődést akadályozva gátolja a JNK aktiválódását [100]. A *Streptomyces griseolus* által termelt antibiotikum, az anisomycin pedig a JNK általánosan alkalmazott (ER stressztől független) aktivátora [101].

A JNK inzulinrezisztencia kialakulásában betöltött szerepe ma már sokszorosan bizonyított. A nem-alkoholos zsírmáj (NAFLD) olyan metabolikus zavar, mely elhízással és inzulinrezisztenciával jellemezhető. A túlzott kalóriabevitel első lépésként egyszerű szteatózist okoz, ezután második lépésként, amikor ehhez már oxidatív stressz is járul, okoz gyulladást. A JNK aktiválódása a NAFLD kialakulását is elősegíti. Magas zsírtartalmú diétán tartott egerekben a JNK erősen aktiválódott a máj-, zsír-, és izomsejtekben. A vad típusú egerek kezelése elhízáshoz vezetett, de a *jnk1* knock out egerekben ilyen nem észleltek, sőt náluk csökkent az IRS-1 szerin307-foszforiláció, és nőtt az IRS-1 tirozinfoszforilációja [102].

A JNK1-deficiencia két különböző elhízási egér modellben is növelte az inzulinérzékenységet [103]. Mindez megerősíti azt, hogy a JNK fontos farmakológia célpont lehet elhízás és inzulinrezisztencia esetében [104, 105]. Számos inhibitor növelte az inzulinérzékenységet, és glükóztoleranciát db/db diabéteszes [100, 106, 107] és HFD ("high fat diet") [108] egérmodellben. A JNK aktivitását a diabéteszes terápiák során széles körben használt metformin is csökkentette [109]. A JNK egy másik specifikus inhibitora az SP600123, mely csökkenti az oxidatív stressz következtében fellépő lipotoxicitást, valamint a glükolipotoxicitást β -sejtekben [110]. Habár néhány tanulmány megkérdőjelezi a JNK pro-apoptotikus szerepét [111] a β -sejtek lipotoxicitásában, a JNK-gátlók továbbra is ígéretes antidiabetikus hatóanyagoknak tekintendők [112-114]. Szerepük tumornövekedés [115] és autofágia szabályozás [116] szempontjából is egyre inkább előtérbe kerül.

1.4. Metformin

A metformin a biguanidok családjába tartozó antidiabetikus hatóanyag.



Inzulinrezisztencia megjelenésekor adható a 2-es típusú diabétesz kialakulásának megelőzése céljából, vagy a már kialakult cukorbetegség esetén a vércukorszint csökkentésére. A metformin növeli az inzulin iránti érzékenységet a perifériás szövetek glükózfelvételének fokozásával, valamint a máj glükóztermelésének csökkentésével, miközben a plazma inzulinszintjét is mérsékli [117]. Gátolja a glükoneogenezist a mitokondriális glicerofoszfát-dehidrogenáz gátlásával [118]. Ezen antidiabetikus hatásait az AMP-függő protein-kináz (AMPK) aktiválásán keresztül fejt ki. Gátolja ugyanis a mitokondriális légzési lánc első komplexét, a NADH-KoQ-reduktázt, és így csökkenti az ATP-szintézist [119]. Az AMPK aktiválása ráadásul csökkenti a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázatát is [117].

A metforminról nemrég kimutatták, hogy NIT-1 inzulinóma sejtekben csökkenti a klasszikus ER-stresszor thapsigarginnal kiváltott JNK-foszforilációt, és egyben a kaszpáz-3 hasítását is [120]. HepG2 sejtekben pedig azt találták, hogy a metformin fékezte a palmitáttal kiváltott IRS-1 Ser307-foszforilációt, és csökkentette a palmitáttal kezelt HepG2 sejtek apoptózisának mértékét is [121]. A hatóanyag lipotoxicitás és lipoapoptózis elleni védő hatását azonban β -sejtekben, illetve inzulinóma sejtvonalon nem vizsgálták, és ugyancsak tisztázatlan, hogy miként befolyásolja a β -sejtekben zsírsavak hatására kialakuló ER-stresszt, illetve UPR-t.

Százezer metformint szedő beteg közül háromban lép fel a biguanidkezelés egyik legjelentősebb mellékhatása, a tejsavas acidózis [122]. Ennek kimenetele súlyos, akár halálos is lehet. Mivel a metformin-asszociált tejsavas acidózis (MALA) gyakoriságát és kockázatát vese-, tüdő-, és szívbetegségek jelentősen fokozzák, ilyen esetekben a metformin szedése nem javallott [11, 123]. Fontos tehát az

inzulinrezisztencia és a β -sejtpusztulás ellen védő, új gyógyszermolekulák fejlesztése a diabétesz minél hatékonyabb és biztonságosabb kezelése céljából.

1.5. Kinázgátlók és jelterapia

Az értekezésben leírt munka során vizsgált inhibitor molekulákat a Vichem Chemie Research Ltd. (Budapest) gyártotta, és saját EVL könyvtárakat használták JNK-inhibitorok keresésére. Két olyan molekulacsaládot azonosítottak, amely gyógyszerfejlesztés szempontjából ígéretes, és ezért optimalizálására érdemes. Az 1. táblázatban szereplő vegyületekről irodalmi adatok álltak rendelkezésre, és ezeket kísérleteinkben referenciamolekulaként használtuk.

A bisz-fenilamino-pirimidinek (az 1. táblázatban 1, 2 és 3) nanomólos IC₅₀ értékkel bíró JNK-gátlók, melyek szintézisének általános módszertana jól kidolgozott [124]. A család reprezentatív tagja apazopanib multitarget receptor-tirozin-kinázgátló, amely vese karcinómában és lágyszöveti szarkómában gátolja az angiogenezist [125]. Körülbelül 32000 vegyület található a SciFinder-ben, amelynek van bisz-fenilamino-pirimidin magstruktúrája és ezek esetében 610 biológiai hatást publikáltak 1776 cikkben, beleértve 353 összefoglaló közleményt. Mindez mutatja, hogy az ilyen központi szerkezetű hatóanyagok intenzív kutatás tárgyát képezik.

A másik vegyületcsoportba a 2,6-diszubsztituált 7-oxo-pirido-[2,3-d]pirimidinek (WO02064594) (az 1. táblázatban 4, 5 és 6) tartoznak, melyek p38 MAPK-inhibitorok (nanomólos IC₅₀) és JNK1-gátlók (mikromólos tartományban). Ennek az egymagos családnak legkiemelkedőbb tagja a palbociclib (Pfizer) (PD-0332991), amely szelektív CDK4- és CDK6-gátló, és melyet – aletrozollal együtt – nemrégiben a Food and Drug Administration (FDA) jóváhagyott olyan postmenopauzás nők terápiája számára, akik ösztrogén-receptor pozitív, valamint HER2 (humán epidermal növekedési faktor receptor 2) negatív mellrákban szenvednek. A pirido[2,3-d]-pirimidin-7-egymagvú vegyületekre irányuló SciFinder keresés 9123 származékot eredményezett, melyek 681 publikációban szerepelnek, beleértve 27 összefoglaló közleményt.

A kinázgátlók tesztelése során a Vichem új pirido-[2-3d]pirimidin-7-egymagvú vegyületeket tervezett és szintetizált (2. táblázat), így végül összesen 57 molekula

hatását tanulmányoztuk. A szerkezeti és biológiai adatok kezeléséhez Instant JChem szoftvert használtak [126].

2. Célkitűzések

Mivel a 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő betegek száma folyamatosan nő, fontosak azon kutatások, melyek a betegség gyógyszeres kezelésére irányulnak. A célzott jelterápiás eljárások egyre inkább tért hódítanak. Érdeklődésünk középpontjában a β -sejtekben kialakuló lipotoxicitás és lipoapoptózis állt. Ennek vizsgálatára alkalmas sejttes modellrendszerben kívántuk tanulmányozni az ismert antidiabetikum, metformin protektív hatását, illetve ezzel összefüggésben az ER-stressz esetleges gátlását. E kísérleteinkhez RINm5F patkány izulinóma sejteket használtunk, melyekben a lipotoxicitást albuminhoz konjugált palmitát segítségével váltottuk ki.

Kiemelt figyelmet fordítottunk a JNK-aktiváció és a részben ennek következményeként kialakuló IRS-1 Ser307-foszforiláció jelenségére, ami az inzulinjelátvitel zavarát és a β -sejtek károsodását előidéző egyik legfontosabb tényező. A metformin hatásainak tanulmányozása mellett, a β -sejt-lipotoxicitás modell felhasználásával célzottan e mechanizmus gátlására alkalmas vegyületek kifejlesztését tűztük ki célként. A tesztelni kívánt gyógyszerjelölt kinázgátlók előzetes szelektálásához HEK293 humán vese sejteket használtuk, és ennek során az IRS-1 Ser307-foszforilációt a JNK anisomycin általi aktiválásával provokáltuk.

Munkánk során tehát alábbi specifikus célokat kívántuk elérni:

- Kideríteni, hogy védi-e a metformin a β -sejteket lipotoxicitás és lipoapoptózis ellen.
- Feltárni, hogy befolyásolja-e a metformin a β -sejtekben kifejtett lipotoxicitás során fellépő UPR részjelenségeit.
- Azonosítani olyan gyógyszerjelölt molekulákat, amelyek a lipotoxicitás hatására erősödő IRS-1 Ser307-foszforiláció hatékony gátlása révén antidiabetikus hatóanyagok kifejlesztésének alapjául szolgálhatnak.

3. Módszerek

A tenyésztőmédiomot és kiegészítő anyagokat a Life Technologies-tól rendeltük. A metformint a Vichem Chemie LTD adta; a palmitát, zsírsav-mentes borjú szérum albumin, thapsigargin, anisomycin és BI-78D3 a Sigma Aldrichtól származott. Az összes felhasznált reagens analitikai minőségű volt.

3.1. Sejtkultúrák fenntartása és kezelése

HEK293 humán veseeredetű fibroblaszt sejteket DMEM médiumban növesztettünk, mely tartalmazott 4,5 g/l D-glükózt, L-glutamint, valamint adtunk hozzá 10% FBS-t és 1% antibiotikum/antimikotikumot. A sejteket 37 °C-on és 5% CO₂-koncentráció mellett tenyésztettük.

A tenyészetet anisomycinnel (50 ng/ml), BI-78D3-al (50 μM) és kinázinhibitorokkal (10 μM) kezeltük 30 percig, miután hatlyukú plateben felnövesztettük őket 70-80%-os konfluenciára. Ezután a sejteket felkapartuk a tenyésztőedény aljáról, és fehérjéiket lízispufferben készítettük elő a Western blot vizsgálatokhoz (lásd lejjebb).

A RINm5F patkány inzulinóma sejtvonalat (ATTC) flaskában növesztettünk 37 °C-on, 5%-os CO₂-koncentráció mellett. A sejtek médiuma RPMI 1640, mely tartalmaz 2 mM L-glutamint, nátrium-bikarbonátot, 4,5 g/l glükózt, 10 mM HEPES-t, valamint 1 mM nátrium-piruvátot, melyet kiegészítettünk 10% FBS-el és 1% antibiotikum/antimikotikummal.

A sejteket 500 μM palmitáttal és 10 μM, illetve 100 μM metforminnal vagy 10 μM kinázinhibitorral kezeltük 8 órán keresztül 70-80%-os konfluencia szint mellett hatlyukú platekben Western blot analízis céljából. A palmitátot zsírsavmentes BSA-hoz konjugáltuk 3:1 arányban 37 °C-on 1 órán át a kezelést megelőzően. A kontroll minta azonos mennyiségű BSA-t kapott palmitát hozzáadása nélkül.

3.2. Életképesség vizsgálata

A sejtek életképességét tripánkék-kizárás segítségével vizsgáltuk. A médiumot begyűjtöttük, majd az adherens sejteket tripszin segítségével szedtük le a lemezek faláról. A 0,25%-os Tripszin-EDTA oldatot PBS segítségével százszorosra hígítottuk a RINm5F sejtek érzékenysége miatt. Az így kinyert sejtuszuspenziót 5 percig 200 x g-n 37°C-on centrifugáltuk. A sejt pelletet újraszuszpendáltuk 200 µl friss médiummal, majd ebből 10 µl -t elkevertük 10 µl 0,4% tripánkék oldattal, amiből végül 10 µl-t pipettáztunk a tárgylemezre. Az élő (tripánkéket kizáró) és halott (tripánkéket felvett) sejtek számlálását automata sejtszámlálóval végeztük (Invitrogen).

3.3. Apoptózis és nekrozis vizsgálata

Az apoptózis és nekrozis vizsgálata Annexin-V-Fluos Staining Kit (Roche) segítségével történt fluoreszcens mikroszkópia alkalmazásával. A foszfatidil-szerint prezentáló, így annexint adszorbeáló apoptotikus sejtek zöld fluoreszcencia, míg a propidium-jodidot felvevő nekrotizáló sejtek piros fluoreszcencia alapján azonosíthatók. A duplán jelölődő (pirosan és zölden egyaránt fluoreszkáló) sejteket nekrotikusnak tekintettük. Kísérletenként legalább 1000 sejtet számoltunk le, majd a kapott eredményekből apoptózis indexet, valamint nekrozis indexet számoltunk (apoptotikus vagy nekrotikus sejtek / összes sejt x 100).

3.4. Western blot analízis

A sejteket kétszeres PBS mosást követően lizáltuk. A lizáló oldat 0,1% SDS-t, 5 mM EDTA-t, 150 mM NaCl-t, 50 mM Tris-t, 1% Tween 20-at, 1 mM Na₃VO₄-ot, 1 mM PMSF-et, 10 mM benzamidint, 20 mM NaF-t, 1 mM pNPP-t és proteázinhibitor koktélt tartalmazott. A mintákat -20 °C-on tároltuk, majd felhasználásukkor 10 percig 10000 x g-n 4°C-on centrifugáltuk. A fehérjekoncentráció mérése Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) segítségével történt.

A lizátumokból 50 µg fehérjét tartalmazó mennyiségeket loadoltunk, majd Poliakrilamid Gélelektroforézist (PAGE) követően Western blottal vizsgáltunk. Az elektroforézishez 10 illetve 12%-os SDS gélt használtunk. A fehérjéket PVDF membránra (Millipore) transzferáltuk. Az elsődleges antitestekkel történő inkubáció egész éjszaka 4 °C-on, míg a másodlagos antitestekkel történő inkubáció 1 óráig szobahőmérsékleten történt 1%-os tejben. A fehérjekoncentrációk egyenletes felvitelét β-aktin antitesttel ellenőriztük, amihez tormaperoxidáz (HRP)-konjugált kecske poliklonális anti-β-aktin (Santa Cruz, sc-1616) antitestet használtunk 1:1,000 hígításban.

Elsődleges antitestek: nyúl anti-P-Ser(307) IRS-1 (A7120) Assay Biotechnology-tól, nyúl anti-P-Thr(183)/Tyr(185)-JNK (#9251S), nyúl anti-P-eIF2a (#9721L), nyúl anti-eIF2a (#9722S), nyúl anti-P-c-Jun (#9261S), nyúl anti-c-Jun (#9165S), nyúl hasított caszpáz-3.(#9661) Cell Signalingtől; nyúl anti-CHOP (sc-575), kecske anti-GRP78 (sc-1050), nyúl anti-PDI (sc-20132) Santa Cruztól. Másodlagos antitestek: kecske anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004), szamár anti-goat IgG-HRP (sc-2020) Santa Cruztól. A HRP-t kemilumineszcenciával vizsgáltuk Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer) segítségével.

3.5. XBP-1 mRNS hasításának vizsgálata

A sejtekből RNeasy Plus Mini Kit (Quagen) segítségével totál RNS-t izoláltunk. Az RNS-minták (0,5-1 µg) reverz transzkripciójával RT-PCR Kit SuperScript III first-strand Synthesis System (Invitrogen) használatával cDNS-t állítottunk elő. A hasított és hasítatlan XBP-1 szekvenciák (421 és 447 bp) PCR-el lettek felsokszorozítva SY121041268-007 XBP-1 sense (patkány) és ST00450236-001 XBP-1 antisense (egér, patkány) primerekkel (Sigma) iProof High-Fidelity DNS Polimeráz Kit (Bio Rad) segítségével. A PCR-fázisok a következők voltak: előkészítésként 98 °C, 3 perc; majd 30 cikluson át 98 °C, 10 másodperc; 57 °C, 30 másodperc és 72 °C, 15 másodperc; végül 72 °C, 10 perc. A PCR-termékeket PEG-precipitációval tisztítottuk, és koncentrációikat Nanodrop 1000 Spektrofotométer (Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg.

A hasított XBP-1 szekvenciából hiányzik egy PstI-hasítási hely, ami a hasítatlanban jelen van. Ezért a két változat hatékonyabb és könnyebben értékelhető elkülönítése céljából a tisztított PCR-termékeket (200 ng) FastDigest PStI-gyel (Thermo Scientific) restrikciós endonukleázzal inkubáltuk 30 percig 37 °C-on a gyártó utasításai szerint. A hasítatlan XBP-1 szekvenciák 2 fragmenst (153 és 294 bp) eredményeznek, míg a hasított változat nem vágódik el [127]. A PstI-gyel kezelt PCR-termékek azonos mennyiségeit (250 ng) agaróz gélelektroforézissel (1,5%-os) választottuk el, és a fragmenseket etídium-bromid segítségével tettük láthatóvá.

3.6. Statisztikai módszerek

A Western-blotok eredményeit Image Quant 5.2-es program segítségével végzett denzitometrálással számszerűsítettük. Az adott kép háttérének levonása után kapott számokat minden esetben egy referenciafehérje denzitására normalizáltuk. A párhuzamos mérések eredményeiből átlagot és szórást számítottunk, a statisztikai szignifikancia vizsgálatot ANOVA „Tukey’s multiple comparison post hoc test”-el végeztük. A 0,05 alatti P értékeket tekintettük szignifikáns különbségnek.

4. Eredmények

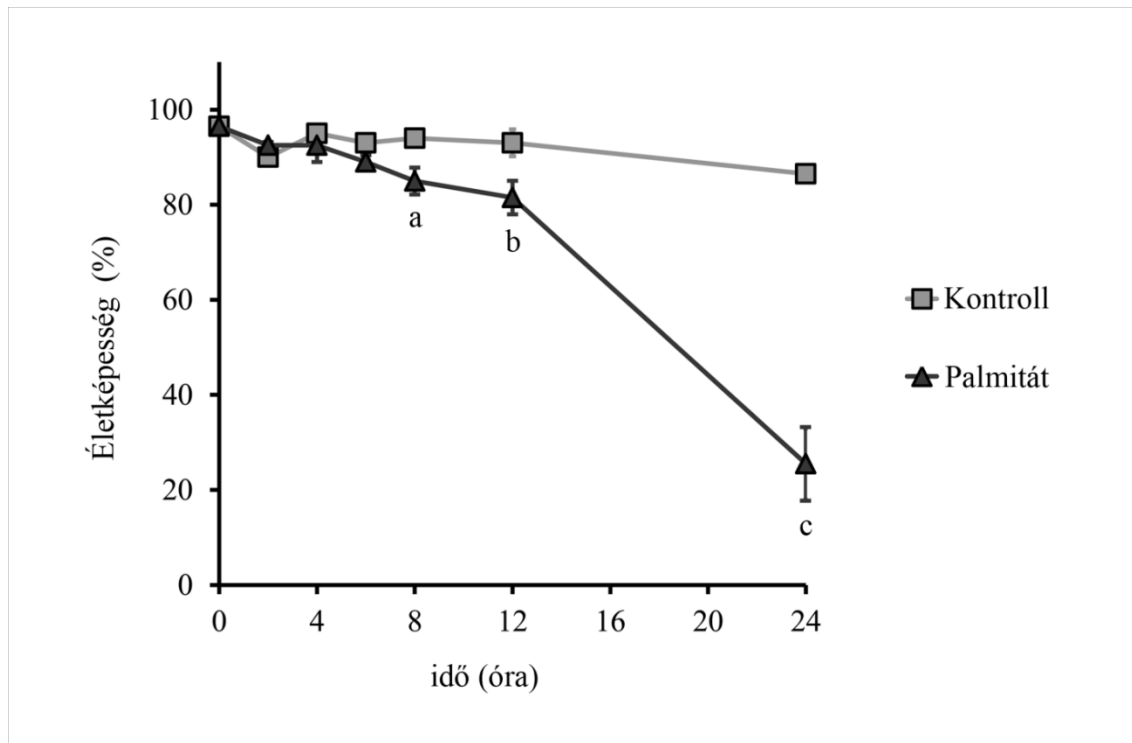
4.1. Palmitát indukált apoptózis RINm5F sejtekben

A metformin lipotoxicitással szembeni védőhatását RINm5F patkány inzulinóma sejtvonalon kívántuk vizsgálni, ezért először beállítottuk a palmitát kezelés optimális időtartamát. Az albuminnal konjugált palmitátot 500 μM -os koncentrációban adtuk a sejtekhez azon tanulmányok alapján, melyek ugyanezt a sejtvonalat használták a lipotoxicitás vizsgálatához [128]. A sejtek életképességét a tripánkék-kizárásos módszer segítségével számszerűsítettük (5. ábra).

Az első hat órában nem történt szignifikáns eltérés a sejtek viabilitásában; az életképes sejtek aránya csak 8 óránál kezdett jelentősen csökkenni. 24 óra elteltével azonban a palmitátkezelt sejtek 75 %-a elpusztult, míg a kontroll (kezeletlen) sejtek életképessége gyakorlatilag a kiindulási értéken maradt (5. ábra).

E méréseink – számos sejtvonalon [129-131] és más sejtípusokon [132-134] végzett munkákkal összhangban – azt mutatták, hogy a korai lipoapoptózist 6-8 órás kezelésekkel érdemes vizsgálni.

A sejtek pusztulását tovább tanulmányoztuk az apoptózis és a nekrosis megkülönböztetésével, amihez Annexin-V-Fluos Staining Kitet és fluoreszcens mikroszkópiát használtunk (6. ábra). 500 μM -os palmitát kezelésnél 6 óra elteltével közel megháromszorozódott az apoptózis index (a palmitátkezelt sejtekben 11,2%-ra nőtt a kontrollban észlelt 4,4%-hoz képest; $p < 0,001$; $n = 3$). Önmagában adva a metformin nem fejtett ki hatást a sejteken, azonban palmitátkezelt sejteknél mind 10 μM , mind 100 μM -os koncentrációban szignifikánsan csökkentette az apoptózist egészen a kezeletlen kontroll szintjére. Ugyanakkor sem a palmitátnak, sem a metforminnak nem volt hatása a sejtek nekrozisának mértékére (6. ábra).



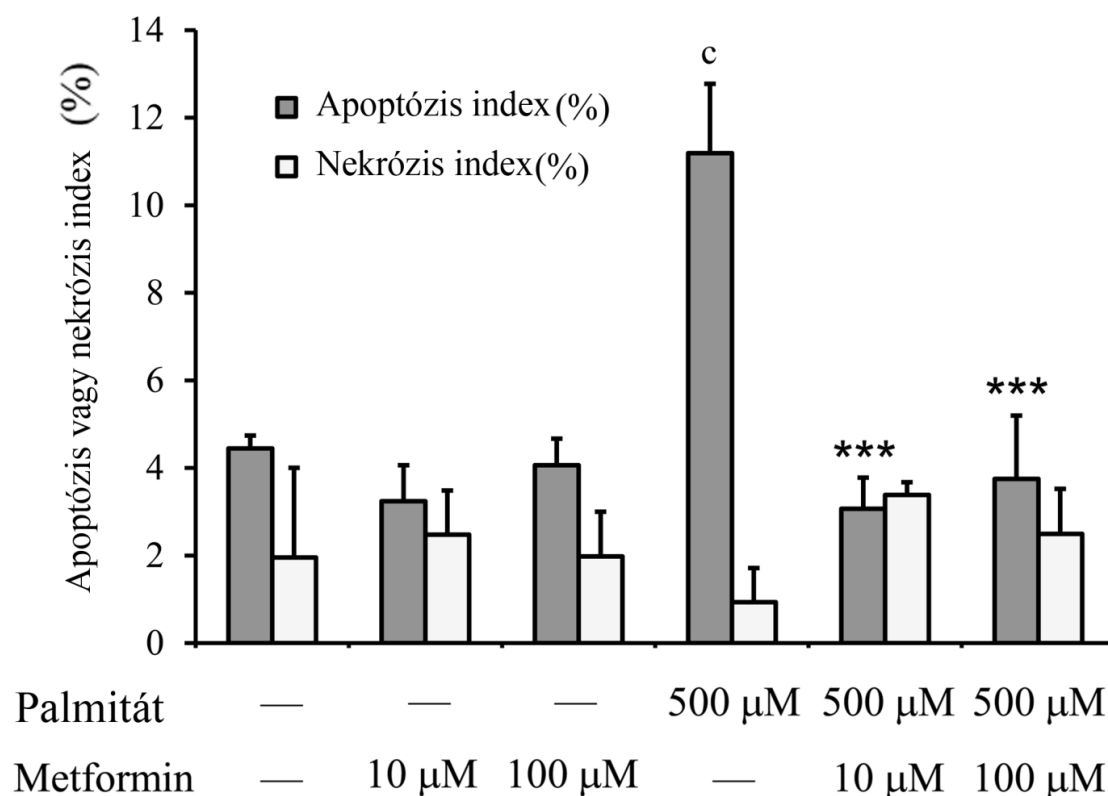
5. ábra: Sejtek életképességének vizsgálata

RINm5F patkány inzulinóma sejteket palmitáttal kezeltük (500 μ M), majd tripánkek kizárása alapján ellenőriztük az életképességet 0, 4, 8, 12, 16, 20 és 24 óránál. Az életképességet az élő sejtek/összes sejt aránya szerint ábrázoltuk. Az ábra három kísérletből számított átlag és szórás értékeket mutat. A szignifikancia értékek: ^a $P < 0,05$, ^b $P < 0,01$, ^c $P < 0,001$ a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Szignifikáns különbséget 8h-nál tapasztaltunk először, és a sejtek 75%-a 24 óránál elpusztult.

4.2. Metformin hatása a palmitát által indukált ER-stresszre

Az ER-chaperonok indukálása jellemző velejárója az UPR jelenségének, ezért az ER-stressz gyakran alkalmazott markerének tekinthető. Kísérleteinkben két fő ER-chaperont vizsgáltunk lipotoxicitás során Western blot segítségével (7. ábra). Mind a GRP78 vagy másik nevén BiP, mind a PDI mennyisége megnőtt a palmitátkezelt

mintákban a kontrollhoz képest, ami azt mutatja, hogy a lipotoxicitás ER-stresszel járt a sejtekben. Metformin egyidejű alkalmazása mindkét chaperon fehérje indukcióját csökkentette, és 100 μM -os metformin kezelés hatására mindkét chaperon mennyisége a kontroll szintjén maradt (7. ábra).



6. ábra: Apoptózis és nekrózis index RINm5F patkány inzulinóma sejtvonalon

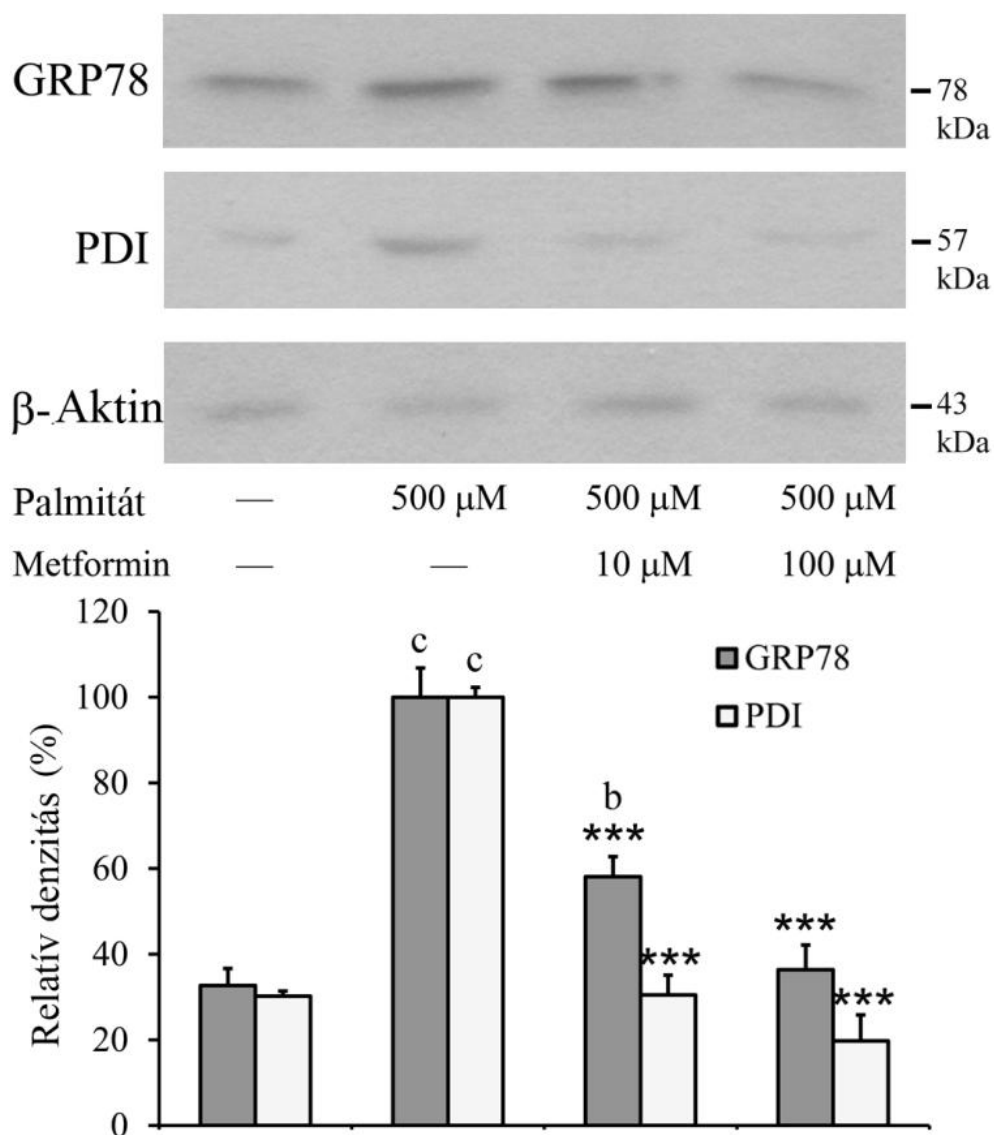
*RINm5F patkány inzulinóma sejteket kezeltünk palmitáttal (500 μM) illetve metforminnal (10 μM , 100 μM) 70-80%-os konfluencia mellett. A kezelési idő 6 óra volt. A fluoreszcens mikroszkópiához Fluo-V-Staining Kit-et használtunk, mely során Annexint, valamint Propídium-jodidot adtunk a mintákhoz. Annexin segítségével az apoptózist tudtuk detektálni (zöld szín), propídium jodid segítségével pedig a nekrózist (piros szín). Az ábra három kísérletből számított átlag és szórás értékeket mutat. ^c $P < 0,001$ v.s. kezeletlen kontroll; ^{***} $P < 0,001$ v.s. palmitátkezelt.*

4.3. A PERK útvonal vizsgálata

Az UPR során aktiválódó PERK az eIF2 α foszforilációjával csökkenti a sejtek általános translációs aktivitását. A részjelenség vizsgálatát Western blot segítségével végeztük RINm5F patkány inzulinóma sejtvonalon, melyhez specifikus P-eIF2 α elleni antitestet használtunk (8. ábra).

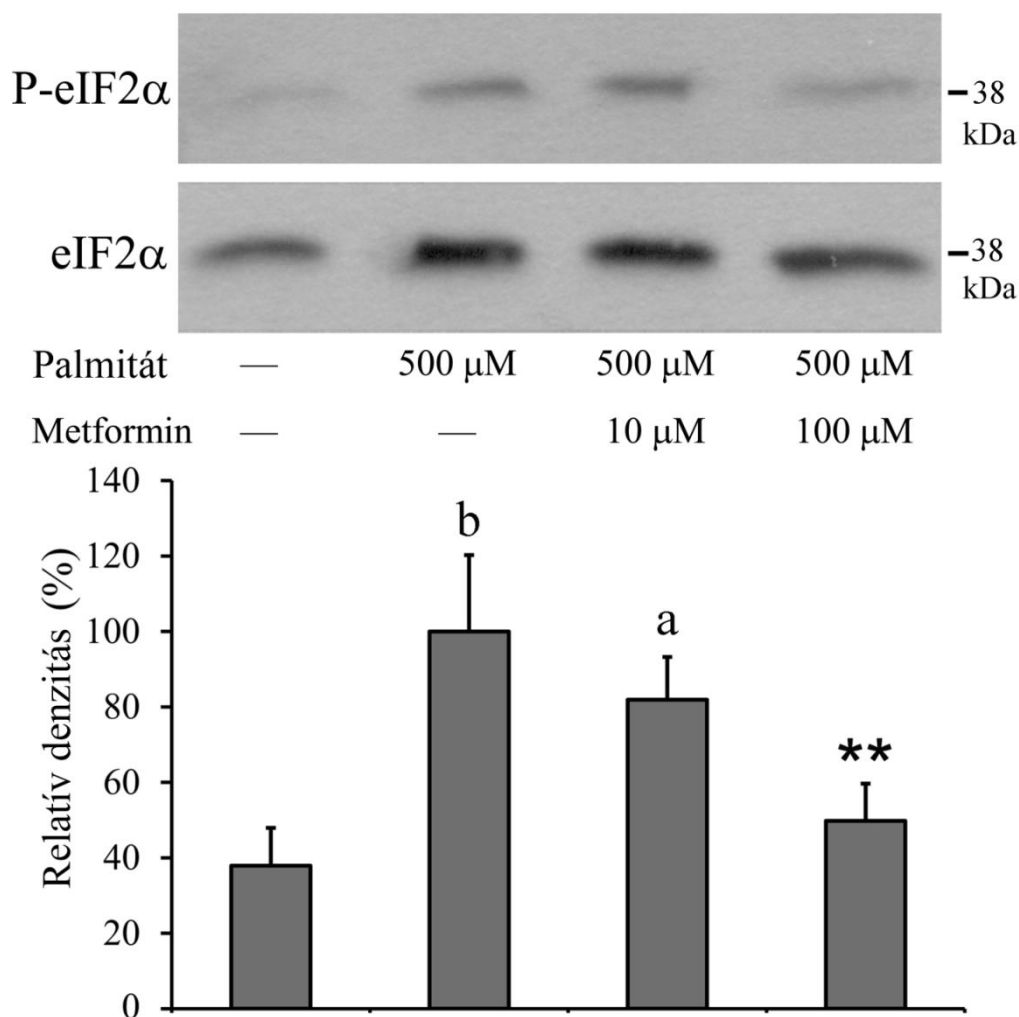
A foszforilált eIF2 α mennyisége hozzávetőlegesen háromszor nagyobb volt a kezelt mintákban, mint a kezeletlenekben, mely jól mutatja a PERK aktiválódását a lipotoxicitás által kiváltott UPR részjelenségeként. 10 μ M-os metformin kezelés esetében már csökkent a foszforiláció mértéke, és még erősebb hatás volt megfigyelhető a 100 μ M-os metformin kezelést követően. Ezeknél a mintáknál sem maradt el teljesen az eIF2 α foszforilációja, azaz a kontrolléhoz képest kétszeres aktiválódást láttunk (8. ábra). Az eIF2 α -foszforiláció az ATF4 termelődésén keresztül a CHOP proapoptotikus fehérje termelődését is serkenti. Az eIF2 α foszforilációjának csökkentésével összhangban, az egyidejű metformin kezelés mérsékelte a palmitát indukált CHOP-indukciót is (9. ábra).

Majdnem 30-szoros CHOP-indukció volt megfigyelhető a palmitátkezelt sejtek esetében a kontrollhoz képest. Ezt a jelentős CHOP-indukciót a metformin egyidejű alkalmazása azonban koncentrációfüggő mértékben gátolta: körülbelül a felére csökkent 10 μ M-os metformin kezelés hatására, és szinte a kontroll szintjén maradt 100 μ M-os metformin kezelést esetén, ahogy a Western blot analízis eredménye mutatja (9. ábra). A CHOP-indukció visszaszorítása mellett, az apoptózis kivédésének másik jeleként, a kaszpáz-3 aktiválódásának csökkenése – vagyis a hasított kaszpáz-3 fehérje mennyiségének kisebb mértékű emelkedése – is megfigyelhető volt a metformin hatására (9. ábra). Habár a kaszpáz-3 a metforminnal kezelt sejtekben is kimutatható, az aktiválódás a gyógyszer koncentrációjától függő – igaz, a CHOP-indukció gátlásánál kisebb – mértékben csökkent.



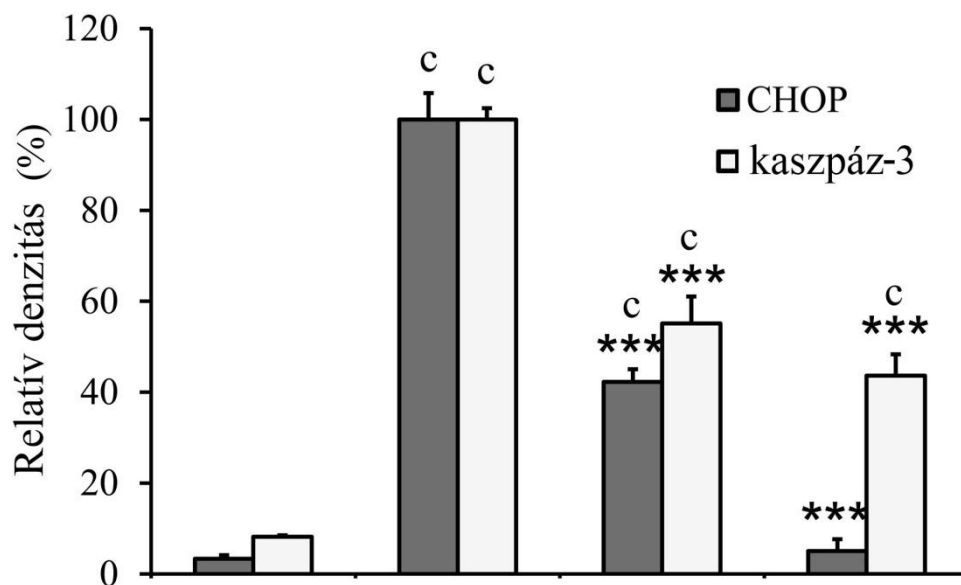
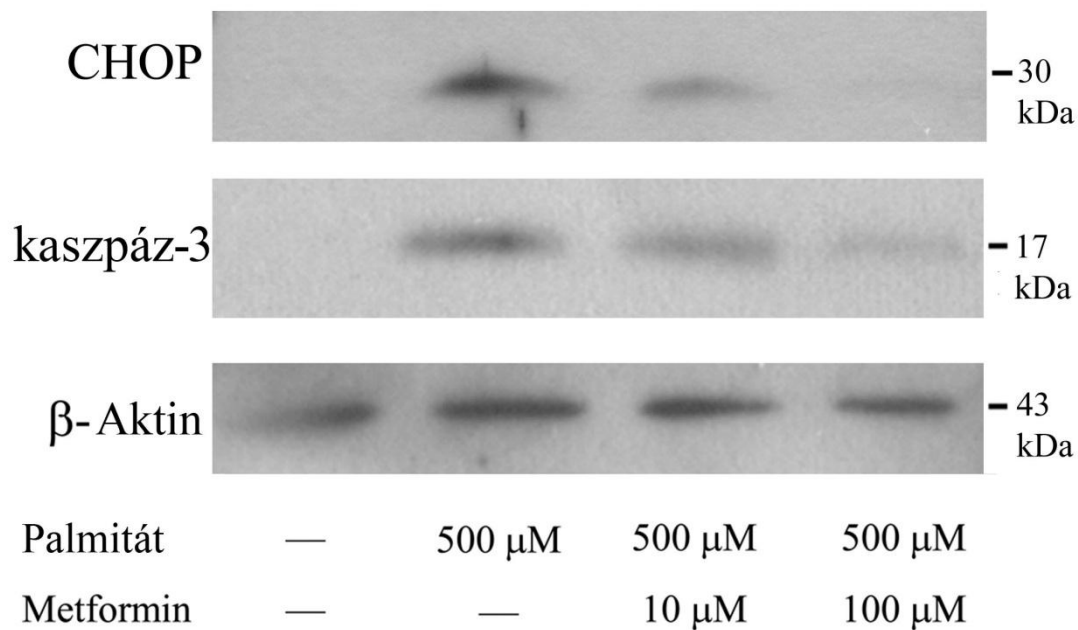
7. ábra: ER chaperonok, GRP78 és PDI indukciója

*RINm5F patkány inzulinóma sejteket kezeltünk palmitáttal (500 μM) önmagában, vagy metforminnal (10 μM, 100 μM) együtt 70-80%-os konfluencia mellett. Mindkét chaperon indukcióját Western blot segítségével detektáltunk 8 órás kezelési idő után. A fenti ábra három független kísérlet egy jellemző eredményét mutatja. A denzitásokat a β-aktinéra mint referencia proteinre normalizáltuk, majd átlag és szórás formájában ábrázoltuk. A palmitátkezelt minták normalizált denzitását tekintettük 100%-nak. ^bP<0,01, ^cP<0,001 v.s. kezeletlen kontroll; ***P<0,001 v.s. palmitátkezelt.*



8. ábra: eIF2 α -foszforiláció

RINm5F patkány inzulinóma sejteket kezeltünk palmitáttal (500 μ M) önmagában, valamint metforminnal együtt (10 μ M, 100 μ M) 70-80%-os konfluenciánál. Az eIF2 α foszforilációt Western blot analízissel vizsgáltuk 8 órás kezelési idő után. Specifikus ellenanyagokkal detektáltuk mind a foszforilált, mind a teljes eIF2 α fehérjét, ezek mennyiségét pedig a „band”-intenzitások alapján becsültük. A fenti ábra három független kísérlet egy jellemző eredményét mutatja. A denzitásokat a foszforilálatlan eIF2 α értékekre mint referenciára normalizáltuk, és átlag \pm szórás formában, a palmitátkezelt minták értékeit 100%-nak tekintve ábrázoltuk. ^a $P < 0,05$, ^b $P < 0,01$ v.s. kezeletlen kontroll; ^{**} $P < 0,01$ v.s. palmitátkezelt.



9. ábra: CHOP-indukció és kaszpáz-3-hasítás

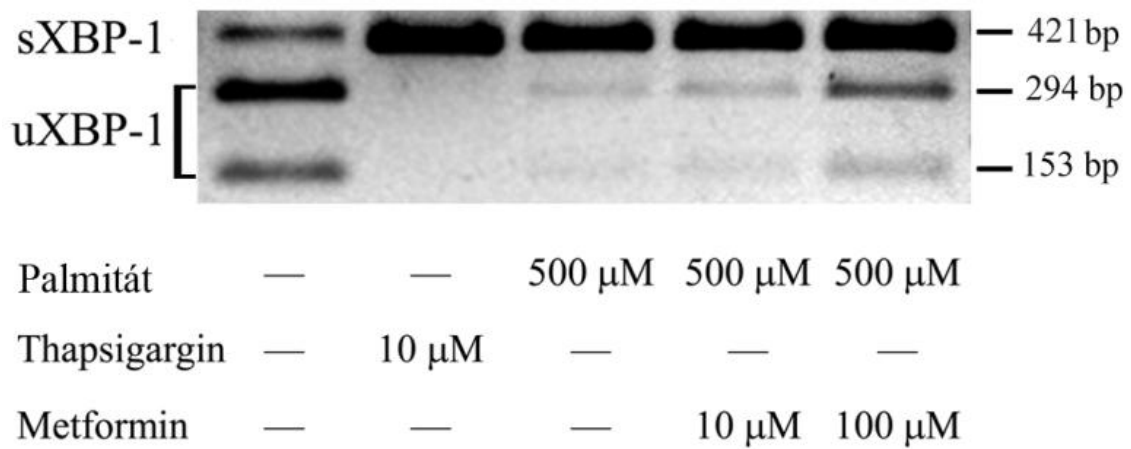
*RINm5F patkány inzulinóma sejteket kezeltünk palmitáttal (500 μ M) önmagában, valamint metforminnal (10 μ M, 100 μ M) együtt 70-80%-os konfluencia mellett. A CHOP és hasított kaszpáz-3 vizsgálata Western blot analízissel történt 8 órás kezelési időt követően. A fenti ábra három független kísérlet egy jellemző eredményét mutatja. A β -aktin referenciafehérjére normalizált relatív denzitások átlagát és szórását úgy ábrázoltuk, hogy a palmitátkezelte minták relatív denzitását tekintettük 100%-nak. ^c $P < 0,001$ v.s. kezeletlen kontroll; ^{***} $P, 0,001$ v.s. palmitátkezelte.*

4.4. Az IRE1 útvonal vizsgálata

Az IRE1-aktiváció közvetlen következménye és jól detektálható markere az XBP-1 mRNS-ének jellegzetes „spliceing”-ja, melynek során az IRE1 egy 26 bp-nyi szakaszt vág ki a nukleinsav-szekvenciából. A jelenséget az RT-PCR-rel amplifikált cDNS-szakasz endonukleázzal végzett emésztését követő agaróz gél-elektroforézisével lehet jól láthatóvá tenni. Az UPR részjelenségének tekinthető specifikus kivágódás, várakozásunknak megfelelően a palmitátkezelt sejtekben is végbe ment, csakúgy, mint a thapsigarginnal kiváltott ER-stressz (pozitív kontroll) esetében (10. ábra).

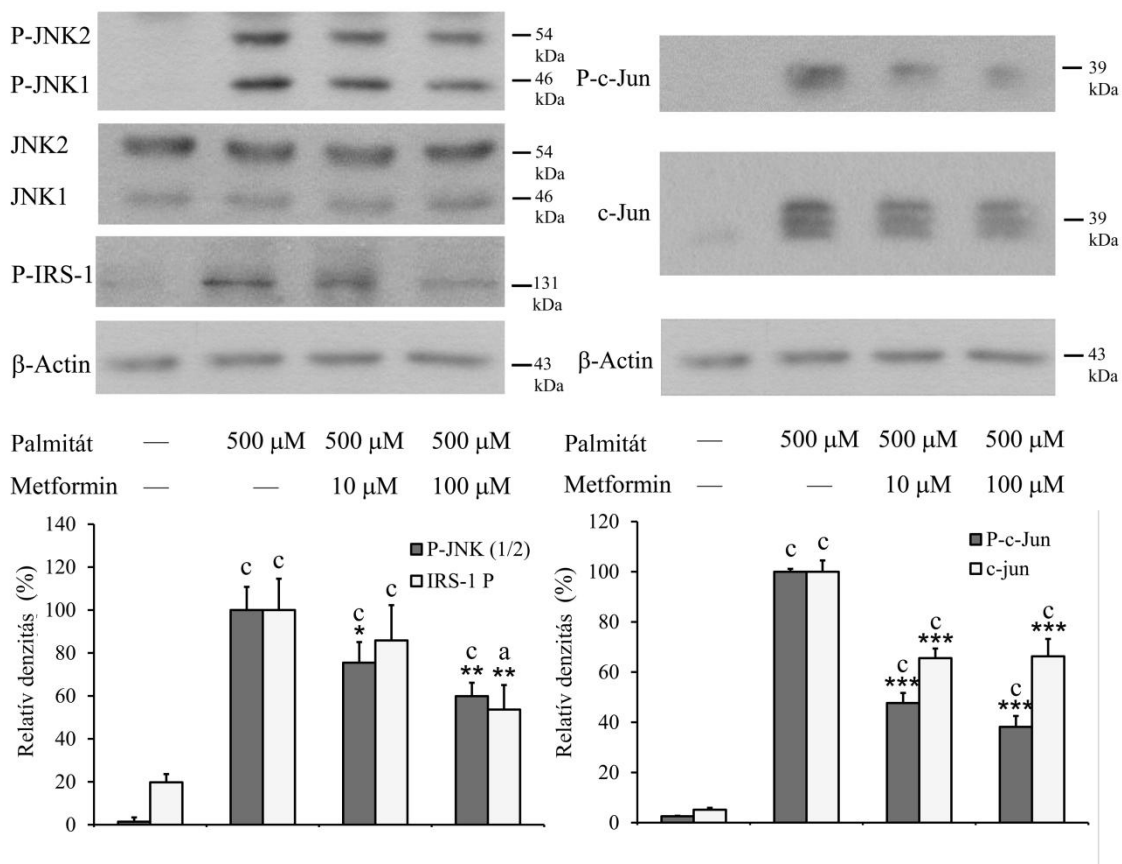
Metformin hatására jól látható mértékben nőtt a hasítatlan XBP-1 mRNS mennyisége, ami a hatóanyag koncentrációfüggő gátló hatását mutatja a palmitát által indukált IRE-1-aktiváció vonatkozásában is. Kétségtelen, hogy a hasított mRNS a metforminnal együtt inkubált és a csak palmitáttal kezelt sejtekben hasonló mennyiségben van jelen, ami azt mutatja, hogy a gyógyszermolekula viszonylag kis hatékonysággal gátolja az UPR IRE-1 ágát (10. ábra).

A JNK-foszforiláció szintén az aktiválódott IRE-1 közvetítésével fokozódik ER-stresszben. Az aktivált JNK két legfontosabb szubsztrátja a c-Jun és az IRS-1 fontos szerepet játszanak az apoptózis, valamint az inzulinrezisztencia kialakulásában. A JNK izoformák (JNK1 és JNK2), illetve a c-Jun és az IRS-1 foszforilációját Western blot segítségével detektáltuk, melyhez a foszforilációra specifikus ellenanyagokat használtunk (11. ábra). Erős JNK-aktiváció volt megfigyelhető a palmitáttal kezelt minták esetében, mely hatást a metformin koncentrációfüggő módon gátolt. Az XBP-1 mRNS-hasításhoz hasonlóan azonban itt is azt észleltük, hogy az aktiválódás nem függesztődött fel teljesen: a magas koncentrációjú metformin kezelés mintegy 40%-os csökkenést eredményezett a P-JNK szintje esetében (11. ábra).



10. ábra: IRE1-függő XBP-1 mRNS-hasítás

RINm5F patkány inzulinóma sejteket kezeltünk thapsigarginnal pozitív kontrollként, valamint palmitáttal (500 μM) önmagában, vagy metforminnal (10 μM, 100 μM) együtt 70-80%-os konfluencia mellett. A teljes RNS-izolálása 8-órás kezelés után történt. A hasítatlan (uXBP-1) valamint a hasított (sXBP-1) mRNS szekvenciákat RT-PCR segítségével amplifikáltuk. *PstI* restrikciós endonukleázzal végzett hasítást követően az uXBP-1 két fragmentumra esett szét (153 és 294 bp), míg az sXBP-1 egyben maradt (421 bp). A termékeket 2%-os agaróz gél-elektroforézissel választottuk szét, és etidium-bromiddal tettük láthatóvá. Az ábra három független kísérlet egy jellemző eredményét mutatja.



11. ábra: JNK-, c-Jun- és IRS-1-foszforiláció

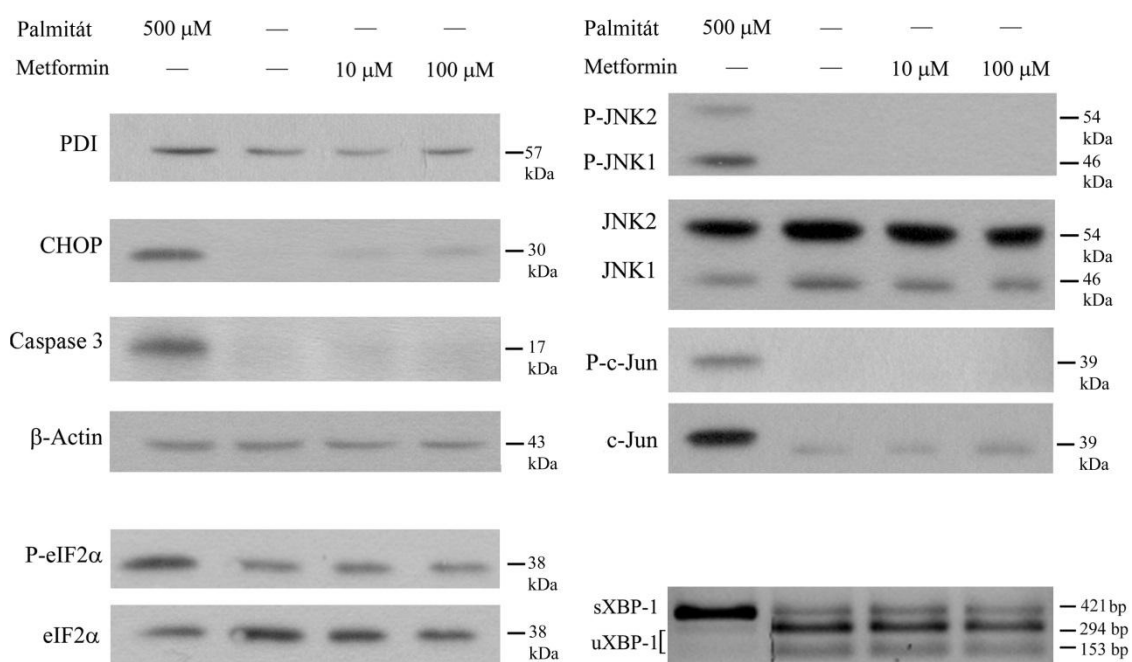
Az inzulinóma sejteket palmitáttal kezeltük (500 μM) önmagában vagy metforminnal (10 μM és 100 μM) együtt 70-80%-os konfluencia mellett. Az összes és a foszforilált JNK (JNK1 és JNK2 izoformák), a foszforilált IRS-1 (Ser307-en), valamint az összes és a foszforilált c-Jun mennyiségét Western blot analízissel vizsgáltuk 8-órás kezelést követően. A fenti ábra három független kísérlet egy-egy jellemző eredményét mutatja. Az eredményeket denzitometrálassal számszerűsítettük, és a β-aktinra mint referencia fehérjére normalizált relatív denzitásokat tüntettük fel a diagramokon a palmitátkezelt mintákat 100%-nak tekintve. ^aP<0,05, ^cP<0,001 v.s. kezeletlen kontroll; *P<0,05, **P<0,01 ***P<0,001 v.s. palmitátkezelt.

4.5. Metformin hatása önmagában

Ahogy az 5.1. fejezetben és az 5. ábrán látható, a metforminnak önmagában nincs hatása sem az apoptózisra, sem a nekrozisra RINm5F patkány inzulinóma sejtekben. Lehetséges hatásait az UPR-re, és a többi vizsgált paraméterre (pl. kaspáz-3 aktiválódása és a c-Jun foszforilációja) egyaránt ellenőriztük. A sejtek metforminnal való kezelése 10 μ M illetve 100 μ M-os koncentrációban sem a PDI, CHOP, eIF2 α , c-Jun vagy JNK expressziós szintjében, sem az utóbbi három fehérje foszforilációjában, illetve a kaspáz-3 aktiválódásában nem okozott szignifikáns változást (12. ábra), vagyis hatásai csak a palmitáttal kiváltott lipotoxicitás esetén érvényesültek.

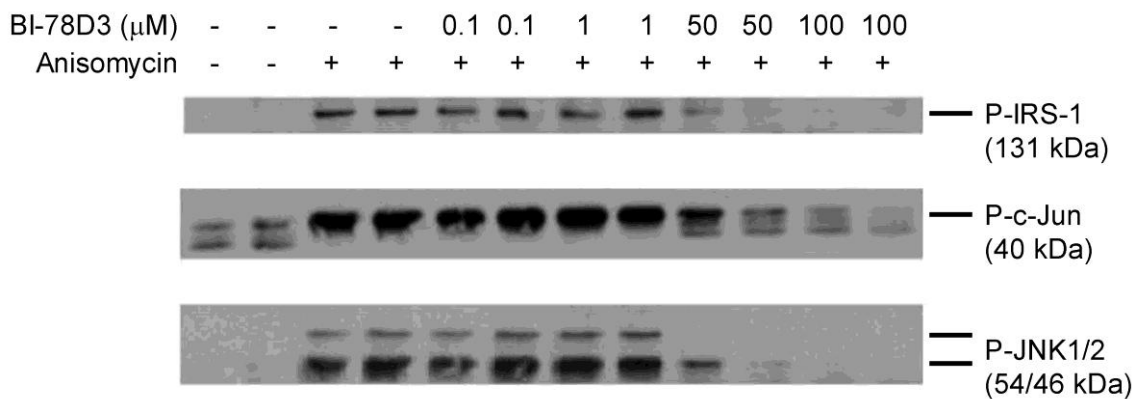
4.6. JNK-aktiválódás és IRS-1 Ser307-foszforiláció gátlószereinek szelektálása

A Vichem EVL molekulakönyvtárakból kiválogatott JNK-gátlók elsődleges szűréséhez a kináz anisomycinnel való – széles körben alkalmazott és jól dokumentált – aktiválásán alapuló modellt alkalmaztunk HEK293 humán vese eredetű fibroblaszt sejteken. A gátlás pozitív kontrolljaként az irodalomból ismert BI-78D3 hatóanyagot választottuk, és mindenek előtt ennek hatékonyságát, illetve koncentrációfüggését teszteltük rendszerünkben. Az anisomycinnel (50 ng/ml) és BI-78D3-al szimultán kezelt sejtekből 30 perc után készítettünk lizátumot, és ebben vizsgáltuk a JNK-aktiválódás jeleit. Anisomycin hatására – a várakozásnak megfelelően – a JNK-, a c-Jun- és az IRS-1 Ser307-foszforiláció egyaránt fokozódott (13. ábra). A BI-78D3 egyidejű jelenléte pedig ezeket a hatásokat párhuzamosan és koncentrációfüggő módon tompította. A hatóanyag 50 μ M-os koncentrációban már mindhárom fehérje foszforilációját csaknem a kezeletlen kontroll szintjére csökkentette, ezért a további kísérleteinkben így használtuk a gátlás pozitív kontrolljaként.



12. ábra: Metformin kezelés önmagában

RINm5F patkány inzulinóma sejteket kezeltünk palmitáttal (500 μ M) pozitív kontrollként és metforminnal önmagában (10 μ M és 100 μ M) 70-80%-os konfluencia mellett. Western blot segítségével vizsgáltuk az alábbi fehérjéket 8-órás kezelési idő elteltével: PDI, CHOP, hasított kaszpáz-3, összes és foszforilált eIF2 α , összes és foszforilált JNK, összes és foszforilált c-Jun, illetve β -aktin mint referenciafehérje. A sejtekből teljes RNS-t is preparáltunk, majd a hasított (sXBP-1) és hasítatlan (uXBP-1) XBP-1 mRNS mennyiségét RT-PCR amplifikálás és *Pst*I restrikciós endonukleázzal végzett hasítás után vizsgáltuk. Két fragmentum (153 és 294 bp) jelzi az uXBP-1 és egy polimer (421 bp) az sXBP-1 változatot. A termékeket 2%-os agaróz gélelektroforézissel választottuk szét, és etídium-bromiddal tettük láthatóvá. Az ábra három független kísérlet egy jellemző eredményét mutatja.



13. ábra: A JNK, a c-Jun és az IRS-1 Ser307 foszforilációjának gátlása HEK293 sejtekben

A sejteket 70-80%-os konfluencia mellett kezeltük anisomycinnel (50 ng/ml) önmagában, illetve BI-78D3-al együtt különböző koncentrációban. A kontroll mintákat csak oldószerrel (DMSO) kezeltük. A Ser307-en foszforilált IRS-1-et, a foszforilált c-Jun-t és a foszforilált JNK-t (mindkét izoformáját) Western blot analízissel vizsgáltuk 30-perces kezelési idő után. Az ábra három független kísérlet egy jellemző eredményét mutatja.

A kiválogatott referenciamolekulák (1. táblázat), valamint az újonnan szintetizált származékok (2. táblázat) JNK-, c-Jun- és IRS-1 Ser307-foszforilációra gyakorolt hatásait elsőként tehát az anisomycin-kezelt HEK293 sejtekben vizsgáltuk egyaránt 10 μM -os végkoncentrációban. Várakozásunknak megfelelő módon, erős korrelációt figyelhettünk meg a JNK és a c-Jun foszforilációjának gátlása esetében. A JNK és az IRS-1 foszforilációjának mértéke (vagyis a P-JNK és a P-IRS-1 Ser307 denzitása) azonban kevésbé szoros összefüggést mutatott a vizsgált gátlószerek esetében (1. és 2. táblázat), ami összefügghet azzal, hogy az IRS-1 fehérjét több szerinkináz is foszforilálja.

1. táblázat: Az alkalmazott JNK-gátló referenciamolekulák

Az inhibitorokat HEK293 fibroblaszt sejteken vizsgáltuk anisomycines (50 ng/ml) JNK-aktiválást követően. Az anisomycint önmagában, illetve a különböző inhibitor molekulákkal (10 μ M) együtt adtuk a sejtekhez 70-80%-os konfluencia mellett, majd 30-perces kezelési idő után Western blottal vizsgáltuk a JNK-, IRS-1 Ser307- és c-Jun foszforiláció mértékét. A csak anisomycint tartalmazó mintában észlelt szinteket tekintettük 100%-nak.

Cpd	Structure	Irodalmi JNK1 IC ₅₀ (μ M) [28]	JNK1 IC ₅₀ (μ M) saját mérés	IRS-1-P az anisomycin kontroll %-a 10 μ M koncentrációnál	c-jun-P az anisomycin kontroll %-a 10 μ M koncentrációnál
1		0,009	0,17	97	104
2		0,028	0,05	69	46
3		0,025	0,04	161	88
4			2,75	0	42
5			5,42	14	94
6			4,22	15	81

2. táblázat: A szintetizált új 7-oxo-pirido-[2,3-d]pirimidinek

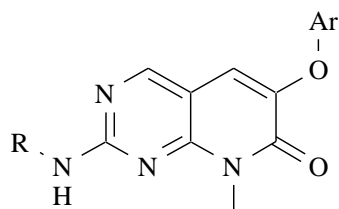
Az inhibitorokat HEK293 fibroblaszt sejteken vizsgáltuk anisomycines (50 ng/ml) JNK-aktiválást követően. Az anisomycint önmagában, illetve a különböző inhibitor molekulákkal (10 μ M) együtt adtuk a sejtekhez 70-80%-os konfluencia mellett, majd 30-perces kezelési idő után Western blottal vizsgáltuk a JNK-, IRS-1 Ser307- és c-Jun-foszforiláció mértékét. A csak anisomycint tartalmazó mintában észlelt szinteket tekintettük 100%-nak.

Cpd	Ar	R	JNK1 IC ₅₀ (μ M) saját mérés	IRS-1-P az anisomycin kontroll %-a 10 μ M koncentrációnál	JNK-P az anisomycin kontroll %-a 10 μ M koncentrációnál	c-jun-P az anisomycin kontroll %-a 10 μ M koncentrációnál
12	2,4-F ₂ -Ph	1-Methane- sulfonyl-piperidin- 4-yl	0,65	2,72	77,17	87,07
13	2,4-F ₂ -Ph	Piperidin-4-yl	10,93	0,00	80,95	118,95
14	2,4-F ₂ -Ph	Cyclopentyl	5,93	0,00	40,03	66,47
15	2,4-F ₂ -Ph	4-(4-Hydroxy- piperidin-1-yl)- phenyl	3,79	0,00	29,64	57,48
16	2,4-F ₂ -Ph	3-Trifluoro-methyl- benzyl	>23	0,00	94,08	100,89
17	2,4-F ₂ -Ph	3-(4-Methyl- piperazin-1-yl)- propyl	19,10	0,00	152,84	137,28
18	2,4-F ₂ -Ph	Cyclohexyl	16,14	0,00	37,58	32,37

19	2,4-F ₂ -Ph	Cycloheptyl	6,73	0,00	84,01	118,90
20	2,4-F ₂ -Ph	3-Methane-sulfonamido-propyl	2,77	0,00	52,85	73,54
21	2,4-F ₂ -Ph	1-Aminos-ulfonyl-piperidin-4-yl	0,91	0,00	30,50	89,38
22	2,4-F ₂ -Ph	4-(4-Methyl-piperazin-1-yl)-phenyl	3,34	2,08	133,12	76,93
23	2,6-Cl ₂ -Ph	Pyridin-2-yl-methyl	>23	2,15	35,29	114,89
24	2,4-F ₂ -Ph	Cyclopropyl	7,17	2,61	173,60	142,31
25	2,6-Cl ₂ -Ph	Tetrahydro-pyran-4-yl	2,48	8,05	55,20	68,02
26	2,6-Cl ₂ -Ph	Cyclopentyl	19,32	8,18	108,40	114,87
27	2,6-Cl ₂ -Ph	4-(4-Hydroxy-piperidin-1-yl)-phenyl	>23	9,09	58,93	74,00
28	2,4-F ₂ -Ph	2-Methane-sulfonamido-ethyl	18,94	12,21	75,80	67,53
29	2,6-Cl ₂ -Ph	4-(4-Methyl-piperazin-1-yl)-phenyl	>23	13,20	45,05	60,88
30	2,6-Cl ₂ -Ph	2-(Pyridine-2-yl)-ethyl	>23	14,31	81,60	115,66
31	2,6-Cl ₂ -Ph	Cyclopropyl	14,92	14,66	96,10	127,74

32	2,4-F ₂ -Ph	2-Morpholin-4-yl-ethyl	>23	26,71	96,14	102,06
33	2,6-Cl ₂ -Ph	4-Hydroxy-piperidin-1-yl	>23	40,48	96,27	99,10
34	2,6-Cl ₂ -Ph	4-Piperidin-1-yl-phenyl	>23	46,31	129,39	107,95
35	2,4-F ₂ -Ph	3-Hydroxy-pyrrolodon-1-yl	>23	51,06	131,36	111,23
36	2,4-F ₂ -Ph	Pyridin-2-methyl	>23	68,20	68,20	86,15
37	2,6-Cl ₂ -Ph	2-Morpholin-4-yl-ethyl	27,07	71,26	138,96	114,48
38	2,6-Cl ₂ -Ph	3-Hydroxy-pyrrolodin-1-yl	>23	74,50	74,50	82,55
39	2,4-F ₂ -Ph	3-Hydroxy-methyl-piperidin-1-yl	>23	79,38	21,12	103,36
40	2,4-F ₂ -Ph	2-Pyridin-2-yl-ethyl	6,75	81,98	81,98	96,42
41	2,4-F ₂ -Ph	4-Piperidin-1-yl-phenyl	>23	84,01	148,70	130,80
42	2,4-F ₂ -Ph	3-Hydroxy-piperidin-1-yl	>23	88,71	38,07	103,90
43	2,6-Cl ₂ -Ph	3-Hydroxy-piperidin-1-yl	>23	93,59	36,24	133,35
44	2,4-F ₂ -Ph	4-Pyrrolidin-1-yl-phenyl	>23	98,90	98,90	107,86

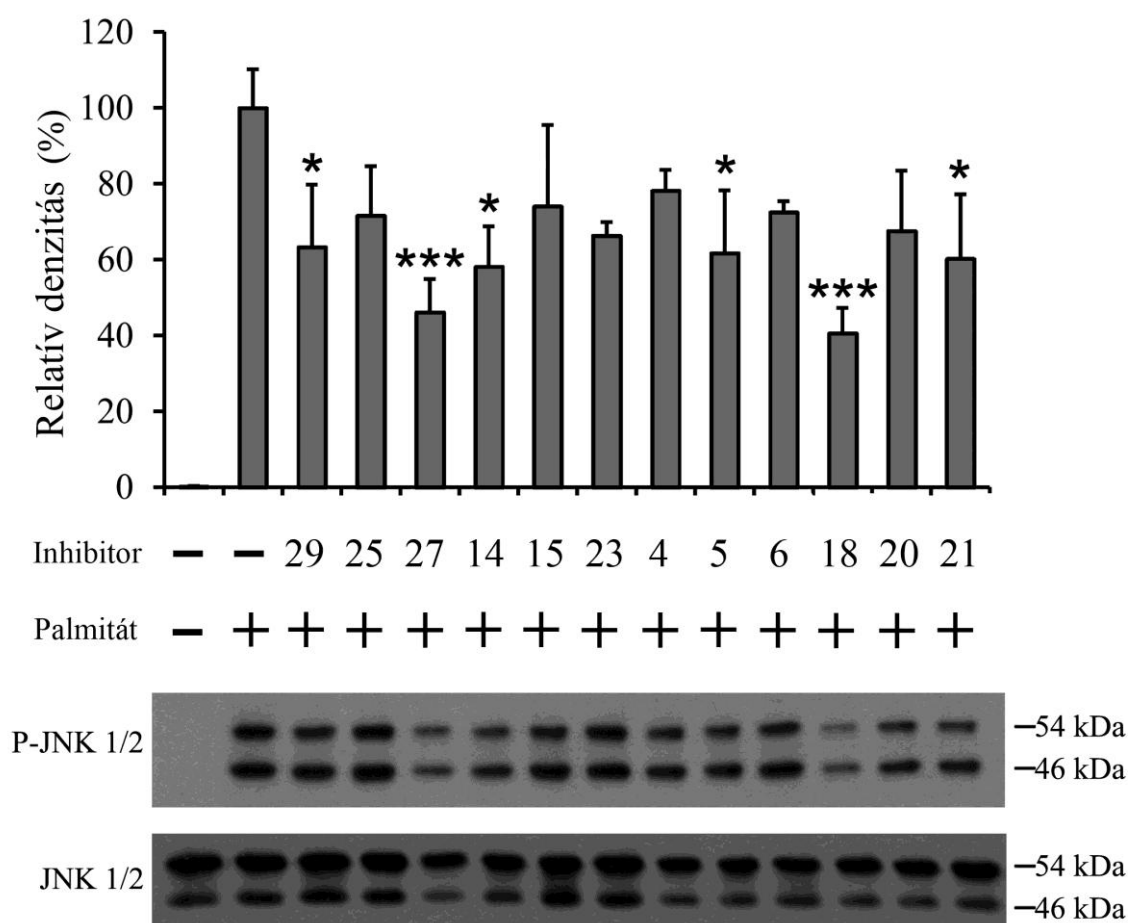
45	2,6-Cl ₂ -Ph	3-Hydroxy-methyl-piperidin-1-yl	>23	99,30	99,30	102,90
46	2,4-F ₂ -Ph	4-Hydroxy-methyl-piperidin-1-yl	>23	102,35	91,58	120,51
47	2,4-F ₂ -Ph	2-Dimethyl-amino-ethyl	>23	104,31	104,31	110,16
48	2,6-Cl ₂ -Ph	2-Hydroxy-methyl-piperidin-1-yl	>23	110,36	110,36	117,82
49	2,4-F ₂ -Ph	4-Hydroxy-piperidin-1-yl	>23	123,96	121,82	131,10
50	2,6-Cl ₂ -Ph	4-Hydroxy-methyl-piperidin-1-yl	>23	127,11	119,26	148,70
51	2,6-Cl ₂ -Ph	4-Pyrrolidin-1-yl-phenyl	>23	165,10	135,70	103,97



Az első szűrésben tesztelt, összesen 57 molekulából tizenkettőt választottunk ki további kísérletekhez. A válogatás kritériumaként 65% alatti JNK-foszforilációt, valamint 15% alatti IRS-1 Ser307-foszforilációt jelöltünk meg. Az e feltételeknek megfelelő vegyületek mind 2,6-diszubsztituált 7-oxo-pyrido-[2,3-d]pyrimidin magstruktúrájúak voltak.

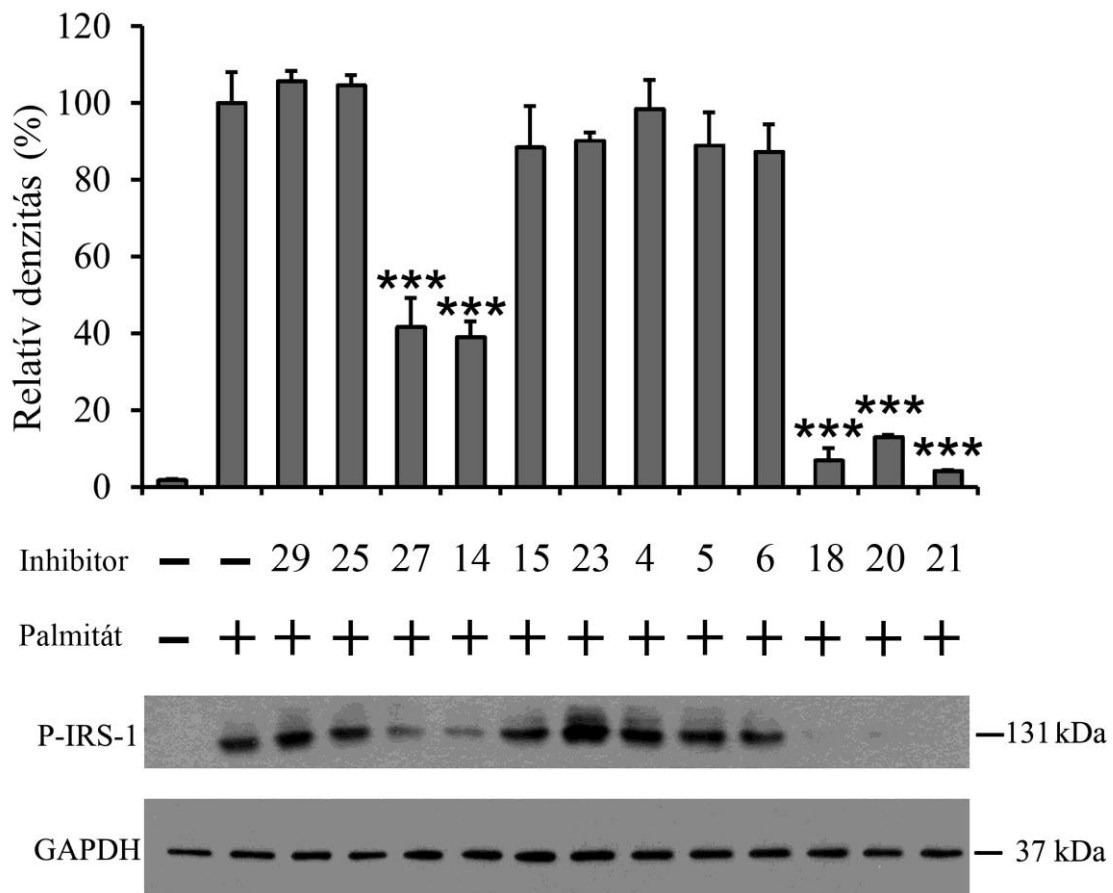
4.7. Szelektált gátlók vizsgálatát lipotoxicitás-modellben

Az anisomycinnel kezelt HEK293 sejteken hatékonynak bizonyult gátlószereket a biológiai szempontból relevánsabb lipotoxicitási sejtmodellben is megvizsgáltuk. RINm5F patkány inzulinóma sejtekben – korábban leírt módon (lásd 5.1. fejezet) – albuminhoz konjugált palmitáttal (500 μM) váltottunk ki stresszt, és a tizenkét féle gátlószer (10 μM) JNK- és IRS-1 Ser307-foszforilációra gyakorolt hatását 8-órás kezelési idő után Western blot analízis segítségével vizsgáltuk (14. és 15. ábra). Két vegyület (27 és 18 jelű) hozzáadásakor észleltünk igen erős (54% és 59%-os mértékű) gátlást a JNK-foszforiláció vonatkozásában (14. ábra). Ez a két hatóanyag jelentős – meglehetősen különböző mértékű (58%, illetve 93%-os) – gátlást eredményezett az IRS-1 Ser307-foszforilációban is (15. ábra). Érdekes, hogy az IRS-1 Ser307-foszforilációt még három további vizsgált vegyület, nevezetesen a 14-es, a 20-as és a 21-es jelű is hatásosan (61%, 87% és 96%-kal) csökkentette (15. ábra), holott ezek a foszforilált JNK szintjére nem hatottak hasonló mértékben (14. ábra).



14. ábra: Lipotoxicitás által indukált JNK-foszforiláció gátlása RINm5F sejtekben

Patkány inzulinóma sejteket kezeltünk 70-80%-os konfluencia mellett albumin-konjugált palmitáttal (500 μM) önmagában, vagy tizenkét szelektált hatóanyaggal valamelyikével (10 μM) együtt. A teljes és a foszforilált JNK (két izoforma) mennyiségét specifikus antitestek felhasználásával Western blot módszerrel vizsgáltuk 8-órás kezelési idő után. A kép három független kísérlet egy tipikus eredményét mutatja. A jelölődési intenzitásokat denzitometrálással számszerűsítettük, és a relatív denzitásokat a totál JNK-ra normalizálva, valamint a csak palmitáttal kezelt mintát 100%-nak tekintve ábrázoltuk. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ statisztikailag szignifikáns különbség a csak palmitáttal kezelt mintához képest.



15. ábra: Lipotoxicitás által indukált IRS-1 Ser307-foszforiláció gátlása RINm5F sejtekben

*Patkány inzulinóma sejteket kezeltünk 70-80%-os konfluencia mellett albumin-konjugált palmitáttal (500 μ M) önmagában, vagy tizenkét szelektált hatóanyaggal valamelyikével (10 μ M) együtt. A GAPDH (referenciafehérje) és a foszforilált IRS-1 mennyiségét specifikus antitestek felhasználásával Western blot módszerrel vizsgáltuk 8-órás kezelési idő után. A kép három független kísérlet egy tipikus eredményét mutatja. A jelölődési intenzitásokat denzitometrállással számszerűsítettük, és a relatív denzitásokat a GAPDH-ra normalizálva, valamint a csak palmitáttal kezelt mintát 100%-nak tekintve ábráztuk. *** $P < 0,001$ statisztikailag szignifikáns különbség a csak palmitáttal kezelt mintához képest.*

5. Megbeszélés

A túltáplálás és a mozgásszegény életmód anyagcserezavarokat okozhat, amelyek következményeként, erre hajlamosító genetikai háttér esetén, akár 2-es típusú diabétesz is kialakulhat. A betegség elterjedése manapság egyre nagyobb méreteket ölt [45]. Az említett tényezők először rendszerint inzulinrezisztenciához vezetnek, ami gyakran jellegzetes tünetegyüttesként jelentkezik, és ilyenkor metabolikus szindrómáról beszélhetünk. Az elhízás és a metabolikus szindróma részeként megnő a vérplazma FFA-szintje, ami kiváltója, illetve súlyosbítója az inzulinrezisztencia kialakulásának [135]. Az inzulinjelpálya sérülése, akadályozottsága miatt a szövetek nem tudják felvenni a túlzott mennyiségű glükózt a vérből, és a tartós hiperglikémia tovább rontja a sejtek működését (glükotoxicitás). A kombinált gluko-lipotoxicitás nagymértékben hozzájárul a β -sejtek pusztulásához, és egyre csökkenti az inzulintermelő kapacitást. A 2-es típusú diabétesz megelőzésében és korai stádiumának gyógyításában fontos az életmódváltozás (diéta, sport). Amennyiben ez önmagában már nem elegendő, gyógyszeres kezelés is szükséges az inzulinválasz erősítése és β -sejtek védelme érdekében.

A megnövekedett szérum-FFA-szint és a következtében kialakuló lipotoxicitás tehát az inzulinrezisztencia és a β -sejt pusztulás előidézésében egyaránt fontos tényező. A lipotoxicitás diabéteszben betöltött szerepe már régóta ismert [136], és egyre növekvő érdeklődés irányul a lipotoxicitás által kiváltott ER-stressz felé is. A magas intracelluláris acil-KoA-tartalom és az ER-stressz közötti ok-okozati összefüggés nem teljesen tisztázott, de szerepe lehet ebben az organelum megváltozott kalcium homeosztázisának, illetve legújabb adatok szerint az ER-membrán lipid telítettségi szintjének is [137].

Az ER-stressz mindig együtt jár az éretlen fehérjék luminális felhalmozódásával, ami a GRP78/Bip chaperon asszociálódása révén stresszreceptorokat aktivál az ER membránjában. Az így beinduló UPR három fő jelátviteli útvonalon keresztül (PERK, ATF6, valamint IRE-1) próbálja helyreállítani a fehérjetermelés és -érés egyensúlyát. A komplex sejtválasz azonban öngerjesztő ciklusokat is generálhat, ugyanis fokozhatja az

inzulinrezisztenciát, csökkentheti a β -sejtek inzulintermelő kapacitását, sőt akár apoptózist indukálhat, és így csökkenti a β -sejtek mennyiségét is.

A lipotoxicitásban oxidatív és ER-stresszen keresztül egyaránt aktiválódó JNK az inzulinrezisztenciához és az apoptózishoz is jelentős mértékben hozzájárul. Az IRS-1 Ser307-en történő foszforilációja azt eredményezi, hogy e jelátviteli fehérje tirozinfoszforilációja gátlás alá kerül, és az inzulin legtöbb hatása tompul vagy elmarad [138]. Ez a hatás nem csupán a szervezet össz-anyagcseréje szempontjából legjelentősebb szöveteket (harántcsíkolt izmot, zsírszövetet és májat) érinti, hanem a β -sejtek alapvető túlélési stimulusának csökkenését vagy kiesését is eredményezi [139].

A metformin napjaink vezető anti-diabetikus gyógyszere, melynek sokrétű hatásai sok adat szerint a mitokondriális ATP-termelés gátlásán és az AMP-aktivált protein-kináz (AMPK) következményes aktiválódásán alapulnak. Elsősorban „inzulin szenzitizálónak” tekinthető, azaz javítja a sejtek inzulin iránti érzékenységét. E mellett védi a hepatocitákat az oxidatív stressz által indukált kaspáz aktivációval, PARP-hasítással és apoptózissal szemben, és ez együtt jár a JNK-foszforiláció gátlásával [140]. NIT-1 egér hasnyálmirigy β -sejtekben az AMPK és a foszfadilinozilto1-3 kináz (PI3K) aktivációja révén csökkenti az ER-stresszt, és ugyancsak gátolja a sejthalált [120]. A metformin β -sejtvédő hatását már korábban is kimutatták [141]. HepG2 hepatóma sejtekben hatásosnak találták a palmitát által indukált ER-stressz és kaspáz-3-mediált sejthalál mérséklésére [121].

Korábbi megfigyelések alapján célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy metformin hatékonyan védi-e a β -sejtmodellként használt inzulinóma sejteket palmitáttal kiváltott lipoapoptózissal szemben, illetve hogy ebben milyen szerepet játszik az ER-stressz esetleges csökkentése. Eredményeink pedig azt mutatják, hogy a RINm5F sejtek lipotoxicitását a metformin jelentősen csökkenti. A palmitát által indukált sejthalál és az ER-stresszre adott UPR főbb elemeit (pl. PDI-, GRP78-indukció és eIF2 α -foszforiláció) a metformin koncentráció-függő módon gátolta. A gátlás mértéke az IRE-1 útvonalon (XBP-1 mRNS-hasítás, JNK-, c-Jun- és IRS-1 Ser307-foszforiláció) viszonylag kisebb mértékű volt. Azonban az ER-stresszhez köthető proapoptotikus transzkripciós faktor (CHOP) indukcióját és a kaspáz-3 hasítás általi

aktivációját a hatóanyag nagymértékben gátolta, ami legalább részben magyarázhatja a palmitát-indukált apoptózis gátlását. Az IRE-1 útvonal viszonylag kisebb mértékű csillapítása nem mond ellent a CHOP-indukció hatásos csökkentésének, hiszen CHOP-expressziót az UPR mindhárom útvonala egy-egy transzkripciós faktor (az ATF6, a PERK-függő ATF4 és az IRE-1-függő XBP-1) révén összehangoltan szabályozza [142].

Az inzulinóma sejtvonalon kapott eredményeink alátámasztják a metformin β -sejtvédő hatását a palmitáttal kiváltott toxicitásban is, és erősen valószínűsítik az ER-stressz illetve az UPR modulálásának szerepét a gyógyszer hatásmechanizmusában. Az észlelt jelenség nem csak a metforminnal kapcsolatos ismeretek bővülését jelenti, hanem az inzulinrezisztencia talaján kialakuló β -sejtpusztulás fékezése, vagyis a metabolikus szindróma és a kezdődő 2-es típusú diabétesz kezelése és megelőzése szempontjából is jelentős.

Az elhízáshoz kapcsolódó anyagcsere-betegségek hátterének, és ezen belül elsősorban a lipotoxicitás, illetve az IRS-1-szerinfoszforiláció szerepének megismerése új gyógyszer támadáspontokat kínál a 2-es típusú diabétesz megelőzésére és gyógyítására. Mivel a konvergáló metabolikus és stresszhatások folytán aktiválódó JNK kulcsszerepet játszik a patológiás állapot kialakulásában, az IRS-1 szerin307 foszforilációjának csökkentésére irányuló hatóanyag fejlesztést e kináz rendelkezésünkre álló, potenciális vagy ismert gátlószereinek, majd ezek újonnan létrehozott módosulatainak vizsgálatával indítottuk.

Első lépésben 57 db kinázgátlót teszteltünk olyan sejtes modellben, ahol a JNK-aktivációt közvetlenül anisomycin-kezeléssel váltottuk ki. Az így kapott eredmények alapján, a JNK és IRS-1 foszforilációjának mértékére vonatkozó kritériumok szerint kiválasztottunk tizenkét hatóanyagot, amelyeket lipotoxicitási sejtmodellben is tovább vizsgáltunk. A palmitáttal kezelt inzulinóma sejtekben azt találtuk, hogy öt molekula fejtett ki számottevő gátlást az IRS-1 Ser307-foszforilációra, és közülük négy a JNK foszforilációját is csökkentette. Valószínűsíthető tehát, hogy ezek a molekulák más kinázokon keresztül is hatnak az inzulinrezisztencia kialakulásának legfontosabb mechanizmusára. A molekuláris támadáspontok azonosítása, illetve a hatóanyagok egyéb tulajdonságainak, valamint in vivo hatásainak feltárása további munkát igényel.

A IRS-1-foszforiláció leghatékonyabb inhibitorai diszubsztituált fenoxi szubsztituenset tartalmaznak a pirido-pirimidin mag 6-os pozíciójában. A 2,4-difluorfenoxi származékok közel 100%-os gátlást mutattak számos szubsztituensnél a 2-es amino csoport pozícióban, pl. a ciklopentilamino, ciklohexilamino, metánszulfonamino-propilamino, 1-aminoszulfonil-piperidin-4-il szubsztituensek kiváló eredményt mutattak. A 2,6-diklorofenoxi szubsztituens a 6-os pozícióban még mindig 10% alá csökkentette az IRS-1-foszforilációt, pl. terahidropirán-4-il szubsztituenssel 2-es pozícióban, de számos más szubsztituens is hasonló eredményt produkált a 2-es pozícióban (2. táblázat). Az eredmények alapján az alábbi kinázok tekinthetők jelentős hit molekuláknak: Abl, c-kit, DDR1, JNK1, PDGFR β , Ret, c-Src, VEGFR2. HEK293 sejtvonalon végzett 24-órás citotoxicitási vizsgálattal meghatároztuk a különböző vegyületek IC50 értékeit. Azt találtuk, hogy minden vegyület IC50 értéke 10 μ M felett van és a legtöbb esetében 30 μ M-nál is nagyobb.

6. Következtetések

Munkánk alapvető célja a lipotoxicitás és lipoapoptózis, illetve az ezekkel szorosan összefüggő, és az inzulinrezisztencia kialakulásában központi szerepet játszó IRS-1-foszforiláció csökkentésére alkalmas hatóanyagok vizsgálata volt. Ennek végrehajtásához sikerült olyan sejes modellrendszert beállítanunk, amelyben tanulmányozhatók voltak a palmitáttal kiváltott, összetett stressz egyes részjelenségei (fehérjeindukciók, proteinfoszforilációk és mRNS-hasítások), illetve az apoptózis intenzitása, így alkalmas volt a forgalomban lévő (pl. metformin), vagy akár újonnan szintetizált vegyületek hatásainak vizsgálatára.

Az albuminhoz konjugált palmitáttal kezelt RINm5F patkány inzulinóma sejtvonalon egyrészt az ismert antidiabetikum, metformin effektusát teszteltük a sejtek életképessége, az apoptózis mértéke, valamint az ER-stressz erőssége vonatkozásában. Külön figyelmet fordítottunk a központi stresszkináz JNK aktiválódására és az IRS-1 részben ennek tulajdonítható Ser307-foszforilációjára. Megállapítottuk, hogy

- A metformin kivédte a palmitát által indukált apoptózist, amit a kaszpáz-3 aktiválódásának jelentős csökkenése is jelzett, míg a nekrozis mértékére nem volt hatással.
- Metformin alkalmazása jelentősen enyhítette a lipotoxicitás részeként fellépő UPR több részjelenségét, így az eIF2 α PERK működéséhez köthető foszforilációját és az XBP-1 mRNS-ének IRE-1-függő, jellegzetes hasítását, illetve a JNK, az IRS-1 Ser307, valamint a c-Jun IRE-1-en keresztül inicializálódó foszforilációját. Ezekkel összhangban, ugyancsak gátlódott metformin jelenlétében az ER-chaperon PDI és GRP78 indukciója, és nem utolsósorban a proapoptotikus CHOP termelődése.

Az albuminhoz konjugált palmitáttal kezelt RINm5F inzulinóma sejtek modellként szolgáltak olyan molekulák teszteléséhez is, amelyek az IRS-1 Ser307 foszforilációja és ezáltal az inzulinrezisztencia, illetve β -sejthalál kivédésében hatékony gyógyszerek kifejlesztéséhez járulhatnak hozzá. A Vichem EVL molekulakönyvtárából referenciamolekulákat, majd a vizsgálatok során ezek újonnan szintetizált módosulatait

– összesen 57 potenciális JNK-gátlót – szűrtünk anisomycinnel kezelt HEK293 sejtekben a JNK-aktiválódásra, illetve az IRS-1 Ser307 foszforilációjának mértékére kifejtett effektusuk alapján.

- A tizenkét szelektált molekula közül öt esetben észleltünk számottevő gátlást az IRS-1 Ser307-foszforiláció vonatkozásában, és ezek közül négy jelentősen csökkentette a JNK-foszforiláció mértékét is. Ezek a hatóanyagok antidiabetikus gyógyszerfejlesztés ígéretes kiinduló molekulái lehetnek, ezért indokolt további vizsgálatuk, beleértve in vivo hatásosságuk tanulmányozása is.

7. Összefoglalás

A 2-es típusú diabétesz kialakulása szoros összefüggésben áll az elhízással, és a kapcsolat hátterében kiemelt szerepet játszik a vér szabad zsírsavszintjének emelkedése. A legtöbb sejtben megfigyelhető lipotoxicitás ugyanis inzulinrezisztenciát vált ki, ráadásul a β -sejtek alkalmazkodását és túlélését is akadályozza. A lipotoxicitás sejten belüli mechanizmusának egyik kulcsszereplője a JNK stresszkináz, amely az IRS-1 Ser307-es oldalláncának foszforilációja révén gátolja az inzulin-jelátvitelt, a c-Jun foszforilációján keresztül pedig fokozza az apoptóziskészséget. A JNK lipotoxicitás során észlelt aktiválódásához a gyulladásoz jelátvitel és az oxidatív stressz mellett jelentős mértékben hozzájárul az ER-stressz is.

Munkánk során beállítottunk egy, a β -sejt-lipotoxicitás vizsgálatára alkalmas modellt, és ennek felhasználásával bizonyítottuk az ismert antidiabetikum, a metformin védő hatását. A RINm5F patkány inzulinóma sejtek lipoapoptózisának kivédése hátterében az ER-stressz mérséklődését és a JNK-aktiválódás csökkenését is kimutattuk. Az észlelt jelenség – a hatóanyag ismert inzulinszenzitizáló aktivitása mellett – fontos szerepet játszhat a metformin antidiabetikus hatásában.

A palmitáttal kezelt inzulinóma sejtekben kinázgátló molekulákat is teszteltünk, és sikerült olyan hatóanyagokat azonosítanunk, amelyek hatékonyan csökkentették az IRS-1 Ser307-foszforilációt, így potenciális gyógyszerjelölt vegyületek lehetnek a 2-es típusú diabétesz kezelésében.

8. Summary

Development of type 2 diabetes is tightly related to obesity, and elevation of plasma free fatty acid levels plays an outstanding role in this correlation. Excessive fatty acid supply causes lipotoxicity in most cell types, and it provokes insulin resistance. Moreover, it hinders adaptation and survival of the pancreatic β -cells. JNK stress kinase is one of the key players of intracellular mechanisms underlying lipotoxicity. It interferes with insulin signaling through the phosphorylation of Ser307 residue in IRS-1, and it facilitates apoptosis via phosphorylation of c-Jun transcription factor. Beside inflammatory signaling and oxidative stress, ER stress also largely contributes to lipotoxicity-induced JNK activation.

We established a cellular model suitable to investigate β -cell lipotoxicity. This model was successfully employed to reveal the protective effect of the well known antidiabetic. We demonstrated a remarkable attenuation of ER stress and reduction of JNK activation beyond prevention of lipoapoptosis in RINm5F rat insulinoma cells. This phenomenon likely plays an important role in the antidiabetic effects of metformin besides its well-characterized insulin sensitizer activity.

Palmitate-treated insulinoma cells were also used to test selected kinase inhibitors, and this approach led to identification of a cluster of molecules that effectively reduce IRS-1 Ser307 phosphorylation, and hence can be considered as promising drug candidates in the treatment of type 2 diabetes.

9. Irodalomjegyzék

1. Lin Y, Sun Z. (2010) Current views on type 2 diabetes. *J Endocrinol*, 204(1):1-11.
2. Hooper PL, Balogh G, Rivas E, Kavanagh K, Vigh L. (2014) The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones*, 19(4):447-464.
3. Hotamisligil GS. (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, 140(6):900-917.
4. Reinehr T. (2013) Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *World J Diabetes*, 4(6):270-281.
5. Montane J, Cadavez L, Novials A. (2014) Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 7:25-34.
6. Yang R, Trevillyan JM. (2008) c-Jun N-terminal kinase pathways in diabetes. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(12):2702-2706.
7. Foufelle F, Ferre P. (2007) [Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]. *Med Sci (Paris)*, 23(3):291-296.
8. Ohta A, Tanaka Y. (2015) [Biguanide]. *Nihon Rinsho*, 73(3):397-401.
9. Nasri RH. (2013) Renoprotective effects of metformin. *Daru*, 21(1):36.
10. Garabadu D, Krishnamurthy S. (2014) Diazepam potentiates the antidiabetic, antistress and anxiolytic activities of metformin in type-2 diabetes mellitus with cooccurring stress in experimental animals. *Biomed Res Int*, 2014:693074.
11. Inzucchi SE, Lipska KJ, Mayo H, Bailey CJ, McGuire DK. (2014) Metformin in patients with type 2 diabetes and kidney disease: a systematic review. *JAMA*, 312(24):2668-2675.
12. Hoang Do O, Thorn P. (2015) Insulin secretion from beta cells within intact islets: location matters. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 42(4):406-414.
13. Rorsman P, Renstrom E. (2003) Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 46(8):1029-1045.
14. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. (2013) Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev*, 9(1):25-53.

15. Wilcox G. (2005) Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*, 26(2):19-39.
16. Choi K, Kim YB. (2010) Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med*, 25(2):119-129.
17. Kerouz NJ, Horsch D, Pons S, Kahn CR. (1997) Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse. *J Clin Invest*, 100(12):3164-3172.
18. Szanto I, Kahn CR. (2000) Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(5):2355-2360.
19. Hubbard SR. (2013) The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(3):a008946.
20. [<http://www.sabbiotech.com/a-111-Insulin-Glucose-Metabolism-Pathway.html>]
21. Rojas JM, Oliva JL, Santos E. (2011) Mammalian son of sevenless Guanine nucleotide exchange factors: old concepts and new perspectives. *Genes Cancer*, 2(3):298-305.
22. Manchester J, Kong X, Lowry OH, Lawrence JC, Jr. (1994) Ras signaling in the activation of glucose transport by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(11):4644-4648.
23. Gysin S, Salt M, Young A, McCormick F. (2011) Therapeutic strategies for targeting ras proteins. *Genes Cancer*, 2(3):359-372.
24. Okamoto M, Hayashi T, Kono S, Inoue G, Kubota M, Okamoto M, Kuzuya H, Imura H. (1993) Specific activity of phosphatidylinositol 3-kinase is increased by insulin stimulation. *Biochem J*, 290 (Pt 2):327-333.
25. Risso G, Blaustein M, Pozzi B, Mammi P, Srebrow A. (2015) Akt/PKB: one kinase, many modifications. *Biochem J*, 468(2):203-214.
26. Seo YH, Jung HJ, Shin HT, Kim YM, Yim H, Chung HY, Lim IK, Yoon G. (2008) Enhanced glycogenesis is involved in cellular senescence via GSK3/GS modulation. *Aging Cell*, 7(6):894-907.

27. Mackenzie RW, Elliott BT. (2014) Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 7:55-64.
28. Montecucco F, Steffens S, Mach F. (2008) Insulin resistance: a proinflammatory state mediated by lipid-induced signaling dysfunction and involved in atherosclerotic plaque instability. *Mediators Inflamm*, 2008:767623.
29. Hou JC, Pessin JE. (2007) Ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUT4 trafficking. *Curr Opin Cell Biol*, 19(4):466-473.
30. Koumanov F, Jin B, Yang J, Holman GD. (2005) Insulin signaling meets vesicle traffic of GLUT4 at a plasma-membrane-activated fusion step. *Cell Metab*, 2(3):179-189.
31. Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker KJ, Okada S. (1999) Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J Biol Chem*, 274(5):2593-2596.
32. Lizunov VA, Matsumoto H, Zimmerberg J, Cushman SW, Frolov VA. (2005) Insulin stimulates the halting, tethering, and fusion of mobile GLUT4 vesicles in rat adipose cells. *J Cell Biol*, 169(3):481-489.
33. Hermann C, Assmus B, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. (2000) Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signaling cascade for endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(2):402-409.
34. Sharoar MG, Islam MI, Shahnawaz M, Shin SY, Park IS. (2014) Amyloid beta binds procaspase-9 to inhibit assembly of Apaf-1 apoptosome and intrinsic apoptosis pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1843(4):685-693.
35. Reubold TF, Eschenburg S. (2012) A molecular view on signal transduction by the apoptosome. *Cell Signal*, 24(7):1420-1425.
36. Selimovic D, Ahmad M, El-Khattouti A, Hannig M, Haikel Y, Hassan M. (2011) Apoptosis-related protein-2 triggers melanoma cell death by a mechanism including both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysregulation. *Carcinogenesis*, 32(8):1268-1278.
37. Danial NN, Walensky LD, Zhang CY, Choi CS, Fisher JK, Molina AJ, Datta SR, Pitter KL, Bird GH, Wikstrom JD, Deeney JT, Robertson K, Morash J, Kulkarni A, Neschen S, Kim S, Greenberg ME, Corkey BE, Shirihai OS,

- Shulman GI, Lowell BB, Korsmeyer SJ. (2008) Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat Med*, 14(2):144-153.
38. Hrabce JE, Sherman SK, Charlton ME, Cromwell JW, Byrn JC. (2014) Effect of BMI on outcomes in proctectomy. *Dis Colon Rectum*, 57(5):608-615.
39. Eldaw A. (2011) Nanotechnology in elevation of the worldwide impact of obesity and obesity-related diseases: potential roles in human health and disease. *J Diabetes Sci Technol*, 5(4):1005-1008.
40. (1998) Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: executive summary. Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight in Adults. *Am J Clin Nutr*, 68(4):899-917.
41. Logue J, Walker JJ, Colhoun HM, Leese GP, Lindsay RS, McKnight JA, Morris AD, Pearson DW, Petrie JR, Philip S, Wild SH, Sattar N, Scottish Diabetes Research Network Epidemiology G. (2011) Do men develop type 2 diabetes at lower body mass indices than women? *Diabetologia*, 54(12):3003-3006.
42. Arner P, Spalding KL. (2010) Fat cell turnover in humans. *Biochem Biophys Res Commun*, 396(1):101-104.
43. Bays H. (2014) Central obesity as a clinical marker of adiposopathy; increased visceral adiposity as a surrogate marker for global fat dysfunction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 21(5):345-351.
44. Karunakaran U, Kim HJ, Kim JY, Lee IK. (2012) Guards and culprits in the endoplasmic reticulum: glucolipotoxicity and beta-cell failure in type II diabetes. *Exp Diabetes Res*, 2012:639762.
45. Ye J. (2013) Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med*, 7(1):14-24.
46. Guo S. (2014) Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol*, 220(2):T1-T23.
47. Gesing A, Bartke A, Wang F, Karbownik-Lewinska M, Masternak MM. (2011) Renal pro-apoptotic proteins are reduced by growth hormone resistance but not by visceral fat removal. *Biol Chem*, 392(5):475-481.

48. Ndisang JF. (2010) Role of heme oxygenase in inflammation, insulin-signalling, diabetes and obesity. *Mediators Inflamm*, 2010:359732.
49. Hancer NJ, Qiu W, Cherella C, Li Y, Copps KD, White MF. (2014) Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 289(18):12467-12484.
50. Hotamisligil GS. (2008) Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond)*, 32 Suppl 7:S52-54.
51. Lamb RE, Goldstein BJ. (2008) Modulating an oxidative-inflammatory cascade: potential new treatment strategy for improving glucose metabolism, insulin resistance, and vascular function. *Int J Clin Pract*, 62(7):1087-1095.
52. Bence KK. (2010) Hepatic PTP1B Deficiency: The Promise of a Treatment for Metabolic Syndrome? *J Clin Metab Diabetes*, 1(1):27-33.
53. Shin JA, Lee JH, Lim SY, Ha HS, Kwon HS, Park YM, Lee WC, Kang MI, Yim HW, Yoon KH, Son HY. (2013) Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *J Diabetes Investig*, 4(4):334-343.
54. Liu X, Tao L, Cao K, Wang Z, Chen D, Guo J, Zhu H, Yang X, Wang Y, Wang J, Wang C, Liu L, Guo X. (2015) Association of high-density lipoprotein with development of metabolic syndrome components: a five-year follow-up in adults. *BMC Public Health*, 15(1):412.
55. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC, Jr., Spertus JA, Costa F. (2006) Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Curr Opin Cardiol*, 21(1):1-6.
56. Mule G, Calcaterra I, Nardi E, Cerasola G, Cottone S. (2014) Metabolic syndrome in hypertensive patients: An unholy alliance. *World J Cardiol*, 6(9):890-907.
57. Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. (2015) Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis*, 6(2):109-120.

58. Russo C, Olivieri O, Girelli D, Faccini G, Zenari ML, Lombardi S, Corrocher R. (1998) Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens*, 16(9):1267-1271.
59. Leibowitz G, Bachar E, Shaked M, Sinai A, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Kaiser N. (2010) Glucose regulation of beta-cell stress in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, 12 Suppl 2:66-75.
60. Sarvas JL, Otis JS, Khaper N, Lees SJ. (2015) Voluntary physical activity prevents insulin resistance in a tissue specific manner. *Physiol Rep*, 3(2).
61. Mandl J, Meszaros T, Banhegyi G, Hunyady L, Csala M. (2009) Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. *Trends Endocrinol Metab*, 20(4):194-201.
62. Grygiel-Gorniak B. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J*, 13:17.
63. Hogh KL, Uy CE, Asadi A, Baker RK, Riedel MJ, Gray SL. (2013) Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in pancreatic beta-cells improves glucose tolerance in diet-induced obese mice. *Exp Physiol*, 98(2):564-575.
64. Aoyama T, Paik YH, Seki E. (2010) Toll-like receptor signaling and liver fibrosis. *Gastroenterol Res Pract*, 2010.
65. Tsaousidou E, Paeger L, Belgardt BF, Pal M, Wunderlich CM, Bronneke H, Collienne U, Hampel B, Wunderlich FT, Schmidt-Supprian M, Kloppenburg P, Bruning JC. (2014) Distinct Roles for JNK and IKK Activation in Agouti-Related Peptide Neurons in the Development of Obesity and Insulin Resistance. *Cell Rep*, 9(4):1495-1506.
66. Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. (2012) NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver*, 6(2):149-171.
67. Yin J, Peng Y, Wu J, Wang Y, Yao L. (2014) Toll-like receptor 2/4 links to free fatty acid-induced inflammation and beta-cell dysfunction. *J Leukoc Biol*, 95(1):47-52.
68. Sharma RB, Alonso LC. (2014) Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well? *Curr Diab Rep*, 14(6):492.

69. Csala M, Banhegyi G, Benedetti A. (2006) Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment. *FEBS Lett*, 580(9):2160-2165.
70. Csala M, Marcolongo P, Lizak B, Senesi S, Margittai E, Fulceri R, Magyar JE, Benedetti A, Banhegyi G. (2007) Transport and transporters in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 1768(6):1325-1341.
71. Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. (2002) Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*, 3(10):944-950.
72. Groenendyk J, Lynch J, Michalak M. (2004) Calreticulin, Ca²⁺, and calcineurin - signaling from the endoplasmic reticulum. *Mol Cells*, 17(3):383-389.
73. Braakman I, Balleid NJ. (2011) Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*, 80:71-99.
74. van Schaftingen E, Gerin I. (2002) The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J*, 362(Pt 3):513-532.
75. Hino Y, Minakami S. (1982) Hexose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases of rat liver microsomes. Involvement in NADPH and carbon dioxide generation in the luminal space of microsomal vesicles. *J Biochem*, 92(2):547-557.
76. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2):112-124.
77. Murakami K, Mihara K, Omura T. (1994) The transmembrane region of microsomal cytochrome P450 identified as the endoplasmic reticulum retention signal. *J Biochem*, 116(1):164-175.
78. Radominska-Pandya A, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Magdalou J. (2005) Structure of UDP-glucuronosyltransferases in membranes. *Methods Enzymol*, 400:116-147.
79. Popugaeva E, Bezprozvanny I. (2013) Role of endoplasmic reticulum Ca²⁺ signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci*, 6:29.
80. Bublitz M, Musgaard M, Poulsen H, Thogersen L, Olesen C, Schiott B, Morth JP, Moller JV, Nissen P. (2013) Ion pathways in the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem*, 288(15):10759-10765.
81. Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E, Quest AF, Lavandero S. (2013) Endoplasmic

- reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol*, 301:215-290.
82. Dudek J, Pfeffer S, Lee PH, Jung M, Cavalie A, Helms V, Forster F, Zimmermann R. (2015) Protein transport into the human endoplasmic reticulum. *J Mol Biol*, 427(6 Pt A):1159-1175.
 83. Mandon EC, Trueman SF, Gilmore R. (2013) Protein translocation across the rough endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(2).
 84. Araki K, Nagata K. (2011) Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(11):a007526.
 85. Feige MJ, Hendershot LM. (2011) Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Curr Opin Cell Biol*, 23(2):167-175.
 86. Breitling J, Aebi M. (2013) N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(8):a013359.
 87. Jeschke MG, Boehning D. (2012) Endoplasmic reticulum stress and insulin resistance post-trauma: similarities to type 2 diabetes. *J Cell Mol Med*, 16(3):437-444.
 88. Mandl J, Meszaros T, Banhegyi G, Csala M. (2013) Minireview: endoplasmic reticulum stress: control in protein, lipid, and signal homeostasis. *Mol Endocrinol*, 27(3):384-393.
 89. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell*, 3(1):99-111.
 90. Kamimura D, Bevan MJ. (2008) Endoplasmic reticulum stress regulator XBP-1 contributes to effector CD8⁺ T cell differentiation during acute infection. *J Immunol*, 181(8):5433-5441.
 91. Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. (2011) A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng*, 108(12):2777-2793.
 92. Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. (2010) Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol Rev*, 90(3):1165-1194.
 93. Banhegyi G, Mandl J, Csala M. (2008) Redox-based endoplasmic reticulum dysfunction in neurological diseases. *J Neurochem*, 107(1):20-34.

94. Cnop M, Igoillo-Esteve M, Cunha DA, Ladriere L, Eizirik DL. (2008) An update on lipotoxic endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 5):909-915.
95. Yao K, Cho YY, Bode AM, Vummenthala A, Park JG, Liu K, Pang YP, Dong Z. (2009) A selective small-molecule inhibitor of c-Jun N-terminal kinase 1. *FEBS Lett*, 583(13):2208-2212.
96. Ho DT, Bardwell AJ, Abdollahi M, Bardwell L. (2003) A docking site in MKK4 mediates high affinity binding to JNK MAPKs and competes with similar docking sites in JNK substrates. *J Biol Chem*, 278(35):32662-32672.
97. Unger EK, Piper ML, Olofsson LE, Xu AW. (2010) Functional role of c-Jun-N-terminal kinase in feeding regulation. *Endocrinology*, 151(2):671-682.
98. Czaja MJ. (2010) JNK regulation of hepatic manifestations of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab*, 21(12):707-713.
99. Hotamisligil GS. (2005) Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH₂-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes*, 54 Suppl 2:S73-78.
100. Stebbins JL, De SK, Machleidt T, Becattini B, Vazquez J, Kuntzen C, Chen LH, Cellitti JF, Riel-Mehan M, Emdadi A, Solinas G, Karin M, Pellecchia M. (2008) Identification of a new JNK inhibitor targeting the JNK-JIP interaction site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(43):16809-16813.
101. Bachar E, Ariav Y, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Kaiser N, Leibowitz G. (2009) Glucose amplifies fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells via activation of mTORC1. *PLoS One*, 4(3):e4954.
102. Seki E, Brenner DA, Karin M. (2012) A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology*, 143(2):307-320.
103. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420(6913):333-336.
104. Bennett BL, Satoh Y, Lewis AJ. (2003) JNK: a new therapeutic target for diabetes. *Curr Opin Pharmacol*, 3(4):420-425.

105. Liu G, Rondinone CM. (2005) JNK: bridging the insulin signaling and inflammatory pathway. *Curr Opin Investig Drugs*, 6(10):979-987.
106. Ijaz A, Tejada T, Catanuto P, Xia X, Elliot SJ, Lenz O, Jauregui A, Saenz MO, Molano RD, Pileggi A, Ricordi C, Fornoni A. (2009) Inhibition of C-jun N-terminal kinase improves insulin sensitivity but worsens albuminuria in experimental diabetes. *Kidney Int*, 75(4):381-388.
107. Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Kajimoto Y, Ichijo H, Yamasaki Y, Hori M. (2004) Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med*, 10(10):1128-1132.
108. Cho H, Black SC, Looper D, Shi M, Kelly-Sullivan D, Timofeevski S, Siegel K, Yu XH, McDonnell SR, Chen P, Yie J, Ogilvie KM, Fraser J, Briscoe CP. (2008) Pharmacological characterization of a small molecule inhibitor of c-Jun kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(5):E1142-1151.
109. Lu J, Ji J, Meng H, Wang D, Jiang B, Liu L, Randell E, Adeli K, Meng QH. (2013) The protective effect and underlying mechanism of metformin on neointima formation in fructose-induced insulin resistant rats. *Cardiovasc Diabetol*, 12:58.
110. Prause M, Christensen DP, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. (2014) JNK1 protects against glucolipotoxicity-mediated beta-cell apoptosis. *PLoS One*, 9(1):e87067.
111. Nemcova-Furstova V, Balusikova K, Sramek J, James RF, Kovar J. (2013) Caspase-2 and JNK activated by saturated fatty acids are not involved in apoptosis induction but modulate ER stress in human pancreatic beta-cells. *Cell Physiol Biochem*, 31(2-3):277-289.
112. Datar PA, Deokule TA. (2014) Development of thiazolidine as an antidiabetic agent- a review. *Mini Rev Med Chem*, 14(2):136-153.
113. Li H, Yu X. (2013) Emerging role of JNK in insulin resistance. *Curr Diabetes Rev*, 9(5):422-428.
114. Mosa RM, Zhang Z, Shao R, Deng C, Chen J, Chen C. (2015) Implications of ghrelin and hexarelin in diabetes and diabetes-associated heart diseases. *Endocrine*, 49(2):307-323.

115. Lei YY, Wang WJ, Mei JH, Wang CL. (2014) Mitogen-activated protein kinase signal transduction in solid tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(20):8539-8548.
116. Shimizu S, Yoshida T, Tsujioka M, Arakawa S. (2014) Autophagic cell death and cancer. *Int J Mol Sci*, 15(2):3145-3153.
117. Gundewar S, Calvert JW, Jha S, Toedt-Pingel I, Ji SY, Nunez D, Ramachandran A, Anaya-Cisneros M, Tian R, Lefer DJ. (2009) Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. *Circ Res*, 104(3):403-411.
118. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang XM, Braddock DT, Albright RA, Prigaro BJ, Wood JL, Bhanot S, MacDonald MJ, Jurczak MJ, Camporez JP, Lee HY, Cline GW, Samuel VT, Kibbey RG, Shulman GI. (2014) Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*, 510(7506):542-546.
119. Bridges HR, Jones AJ, Pollak MN, Hirst J. (2014) Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J*, 462(3):475-487.
120. Jung TW, Lee MW, Lee YJ, Kim SM. (2012) Metformin prevents endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through AMPK-PI3K-c-Jun NH2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 417(1):147-152.
121. Kim DS, Jeong SK, Kim HR, Kim DS, Chae SW, Chae HJ. (2010) Metformin regulates palmitate-induced apoptosis and ER stress response in HepG2 liver cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 32(2):251-257.
122. Wang DS, Kushihara H, Kato Y, Jonker JW, Schinkel AH, Sugiyama Y. (2003) Involvement of organic cation transporter 1 in the lactic acidosis caused by metformin. *Mol Pharmacol*, 63(4):844-848.
123. Friesecke S, Abel P, Roser M, Felix SB, Runge S. (2010) Outcome of severe lactic acidosis associated with metformin accumulation. *Crit Care*, 14(6):R226.
124. Liu M, Wang S, Clampit JE, Gum RJ, Haasch DL, Rondinone CM, Trevillyan JM, Abad-Zapatero C, Fry EH, Sham HL, Liu G. (2007) Discovery of a new class of 4-anilinopyrimidines as potent c-Jun N-terminal kinase inhibitors: Synthesis and SAR studies. *Bioorg Med Chem Lett*, 17(3):668-672.

125. Li H, Wozniak A, Sciort R, Cornillie J, Wellens J, Van Looy T, Vanleeuw U, Stas M, Hompes D, Debiec-Rychter M, Schoffski P. (2014) Pazopanib, a Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Suppresses Tumor Growth through Angiogenesis in Dedifferentiated Liposarcoma Xenograft Models. *Transl Oncol*, 7(6):665-671.
126. [<http://www.chemaxon.com>]
127. Williams BL, Lipkin WI. (2006) Endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration in rats neonatally infected with borna disease virus. *J Virol*, 80(17):8613-8626.
128. Beeharry N, Chambers JA, Green IC. (2004) Fatty acid protection from palmitic acid-induced apoptosis is lost following PI3-kinase inhibition. *Apoptosis*, 9(5):599-607.
129. Oh YS, Lee YJ, Kang Y, Han J, Lim OK, Jun HS. (2013) Exendin-4 inhibits glucolipotoxic ER stress in pancreatic beta cells via regulation of SREBP1c and C/EBPbeta transcription factors. *J Endocrinol*, 216(3):343-352.
130. Sommerweiss D, Gorski T, Richter S, Garten A, Kiess W. (2013) Oleate rescues INS-1E beta-cells from palmitate-induced apoptosis by preventing activation of the unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun*, 441(4):770-776.
131. Baldwin AC, Green CD, Olson LK, Moxley MA, Corbett JA. (2012) A role for aberrant protein palmitoylation in FFA-induced ER stress and beta-cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302(11):E1390-1398.
132. Olsen GS, Hansen BF. (2002) AMP kinase activation ameliorates insulin resistance induced by free fatty acids in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283(5):E965-970.
133. Tao JL, Wen YB, Shi BY, Zhang H, Ruan XZ, Li H, Li XM, Dong WJ, Li XW. (2012) Endoplasmic reticulum stress is involved in podocyte apoptosis induced by saturated fatty acid palmitate. *Chin Med J (Engl)*, 125(17):3137-3142.
134. Cho H, Wu M, Zhang L, Thompson R, Nath A, Chan C. (2013) Signaling dynamics of palmitate-induced ER stress responses mediated by ATF4 in HepG2 cells. *BMC Syst Biol*, 7:9.
135. Frohnert BI, Jacobs DR, Jr., Steinberger J, Moran A, Steffen LM, Sinaiko AR. (2013) Relation between serum free fatty acids and adiposity, insulin resistance,

- and cardiovascular risk factors from adolescence to adulthood. *Diabetes*, 62(9):3163-3169.
136. Unger RH. (1995) Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes*, 44(8):863-870.
 137. Volmer R, van der Ploeg K, Ron D. (2013) Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(12):4628-4633.
 138. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. (2000) The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem*, 275(12):9047-9054.
 139. Accili D. (2004) Lilly lecture 2003: the struggle for mastery in insulin action: from triumvirate to republic. *Diabetes*, 53(7):1633-1642.
 140. Conde de la Rosa L, Vrenken TE, Buist-Homan M, Faber KN, Moshage H. (2015) Metformin protects primary rat hepatocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Pharmacol Res Perspect*, 3(2):e00125.
 141. Lupi R, Del Guerra S, Fierabracci V, Marselli L, Novelli M, Patane G, Boggi U, Mosca F, Piro S, Del Prato S, Marchetti P. (2002) Lipotoxicity in human pancreatic islets and the protective effect of metformin. *Diabetes*, 51 Suppl 1:S134-137.
 142. Kim I, Xu W, Reed JC. (2008) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 7(12):1013-1030.

10. Saját publikációk jegyzéke

A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk jegyzéke:

Simon-Szabo L, Kokas M, Mandl J, Keri G, Csala M. (2014) Metformin attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress, serine phosphorylation of IRS-1 and apoptosis in rat insulinoma cells. PLoS One, 9(6):e97868.

IF: 3,234

Simon-Szabo L, Kokas M, Greff Z, Boros S, Banhegyi P, Zsakai L, Szantai-Kis C, Vantus T, Mandl J, Banhegyi G, Valyi-Nagy I, Orfi L, Ullrich A, Csala M, Keri G. (2016) Novel compounds reducing IRS-1 serine phosphorylation for treatment of diabetes. Bioorg Med Chem Lett, 26(2):424-428.

IF: 2,420

Zambo V, **Simon-Szabo L**, Szelenyi P, Kereszturi E, Banhegyi G, Csala M. (2013) Lipotoxicity in the liver. World J Hepatol, 5(10):550-557.

A dolgozat témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk jegyzéke:

Varga A, Gyulavari P, Greff Z, Futosi K, Nemeth T, **Simon-Szabo L**, Kerekes K, Szantai-Kis C, Brauswetter D, Kokas M, Borbely G, Erdei A, Mocsai A, Keri G, Vantus T. (2015) Targeting vascular endothelial growth factor receptor 2 and protein kinase D1 related pathways by a multiple kinase inhibitor in angiogenesis and inflammation related processes in vitro. PLoS One, 10(4):e0124234.

IF: 3,234

11. Köszönetnyilvánítás

Nagyon köszönöm mindkét témavezetőmnek prof. Kéri Györgynek és dr. Csala Miklósnak a belém vetett bizalmukat, hogy PhD hallgatójuk lehettem, valamint azt a rengeteg energiát, és törődést, amivel munkámat segítették az évek során.

Szeretném megköszönni az Intézet jelenlegi igazgatójának, prof. Bánhegyi Gábornak, valamint az Intézet volt igazgatójának prof. Mandl Józsefnek, hogy lehetővé tették számomra, hogy az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetben végezzem a munkámat.

Köszönöm Wunderlich Líviusnak, hogy megtanított a különböző labor technikákra, valamint köszönöm dr. Kokas Márton PhD hallgatónak a sok közös munkát.

Köszönöm a Vichem Chemie Ltd. dolgozóinak, hogy segítették a munkámat, valamint, hogy cikkem kémiai részének megírásában segédkeztek.

Köszönöm a labor összes dolgozójának a segítségét, támogatását, bátorítását, valamint a labor általános jó hangulatát, ami olyan helyet biztosított, ahová az ember minden nap szívesen jár be dolgozni. Különösképpen köszönöm Mile Valériának, laborunk asszisztensének a munkáját és segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak az odaadó támogatásukat, amellyel mindvégig támogattak a PhD tanulmányaim során. Köszönöm szüleimnek, dr. Orbán Krisztinának és Szabó Sándornak az útmutatásukat, drága férjemnek, Simon Balázsnak, hogy mindvégig mellettem állt, biztatott akkor is, amikor épp nem működtek a kísérleteim, valamint kislányomnak, Simon Réka Liliannának, és kisfiamnak, Simon Benedek Máténak, hogy türelmesen viselték a disszertációm megírása alatt, hogy kevesebb időt foglalkoztam velük, és mosolyukkal mindvégig bátorítottak. Köszönöm mindenkinek, aki a dolgozat megírása alatt vigyázott rájuk, amellyel lehetővé tették, hogy én tudjak a disszertációmra fókuszálni.