

Az Ncb5or flavohem reduktáz sejten belüli lokalizációjának és egyes humán mutációinak vizsgálata

Doktori értekezés

Zámbó Veronika

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Csala Miklós, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Kereszturi Éva, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Töröcsik Beáta, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Horváth V. Gábor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság

elnöke: Dr. Tretter László, D.Sc., egyetemi tanár
tagjai: Dr. Komorowicz Erzsébet, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Jemnitz Katalin, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2017

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	5
Ábrák és Táblázatok jegyzéke.....	8
1. Irodalmi áttekintés.....	9
1.1. Az endoplazmás retikulum redox rendszerei.....	10
1.1.1. <i>A lúminális NADP⁺-NADPH ciklus.....</i>	<i>12</i>
1.1.2. <i>A zsírsav-deszaturációs elektrontranszfer-lánc.....</i>	<i>14</i>
1.2. Az endoplazmás retikulum redox rendszerei és a diabétesz.....	17
1.2.1. <i>A prereceptorális kortizoltermelés és a metabolikus szindróma.....</i>	<i>18</i>
1.2.2. <i>A zsírsav-deszaturáció és lipotoxicitás.....</i>	<i>19</i>
1.3. A NAD(P)H citokróm b5 oxidoreduktáz	23
1.3.1. <i>Az Ncb5or doménszerkezete és feltételezett funkciója.....</i>	<i>26</i>
1.3.2. <i>Az Ncb5or génkiütött egér jellemzői.....</i>	<i>29</i>
1.3.3. <i>Humán NCB5OR-variánsok</i>	<i>32</i>
2. Célkitűzések.....	34
3. Módszerek.....	36
3.1. In silico analízis	36
3.1.1. <i>Intracelluláris lokalizáció predikciója</i>	<i>36</i>
3.1.2. <i>Mutációk keresése.....</i>	<i>37</i>
3.1.3. <i>Fehérje térszerkezetének predikciója</i>	<i>37</i>
3.2. RNS-izolálás, cDNS-szintézis	37
3.3. RT-PCR, qPCR.....	37
3.4. PCR-termékek elválasztása gélelektroforézissel.....	39
3.5. Expressziós vektor készítése	39
3.5.1. <i>Fúziós-fehérjét kifejező vektor előállítása.....</i>	<i>39</i>
3.5.2. <i>Ncb5or expressziós vektor konstrukciók készítése „overlap extension PCR” módszerrel</i>	<i>40</i>
3.6. Sejtes rendszerek	43
3.6.1. <i>Sejtvonalak.....</i>	<i>43</i>
3.6.2. <i>Patkány májszövet</i>	<i>43</i>
3.6.3. <i>Tranziens transzfekció</i>	<i>43</i>

3.6.4. <i>Sejtek begyűjtése, feltárása</i>	44
3.6.5. <i>Sejtfrakciók készítése ultracentrifugálással</i>	44
3.6.5.1. Szubcelluláris frakciók készítése HEK293T és HepG2 sejtekből.....	45
3.6.5.2. Szubcelluláris frakciók készítése patkány májszövetből.....	45
3.6.6. <i>Western blot</i>	46
3.6.7. <i>Mikroszomális NAD(P)H fluoreszcens detektálása</i>	47
3.6.8. <i>Impulzus jelölés / izotóphígítás kísérletek</i>	47
3.7. Mikroszkópos vizsgálatok	48
3.7.1. <i>Fluoreszcens mikroszkópia</i>	48
3.7.2. <i>Immuncitokémia</i>	49
3.8. Statisztika	50
4. Eredmények	51
4.1. Az Ncb5or szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata	51
4.1.1. <i>A szubcelluláris lokalizáció in silico predikciója</i>	51
4.1.2. <i>Endogén Ncb5or-expresszió</i>	53
4.1.3. <i>Sejtfrakcionálás</i>	54
4.1.3.1. <i>Sejtvonalak vizsgálata</i>	55
4.1.3.2. <i>Patkány májszövet</i>	57
4.1.4. <i>Ncb5or-EGFP fúziós fehérje lokalizációjának vizsgálata HEK293T sejtekben</i>	59
4.1.4.1. <i>Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje termelődésének és stabilitásának ellenőrzése</i>	59
4.1.4.2. <i>Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje intracelluláris lokalizációja</i>	62
4.1.5. <i>Endogén Ncb5or vizsgálata immuncitokémiai módszerrel HepG2 sejtvonalon</i>	64
4.1.6. <i>Sztearil-KoA hatása a mikroszóma NADH-NADPH-készletére</i>	67
4.2. A humán Ncb5or természetes variánsainak molekuláris biológiai vizsgálata	69
4.2.1. <i>Az Ncb5or overexpressziója</i>	69
4.2.2. <i>Természetes variánsok azonosítása adatbázisok segítségével</i>	71
4.2.3. <i>Az Ncb5or variánsainak mRNS-szintű expressziója</i>	71
4.2.4. <i>Az Ncb5or-variánsok fehérjeszintű expressziója</i>	73
4.2.4.1. <i>Glu-Glu jelölő címkével ellátott mutánsok vizsgálata két sejtvonalban</i>	74
4.2.5. <i>A mesterségesen létrehozott E/Q mutánsok fehérjeszintű expressziója</i>	76
4.2.6. <i>A p.E87G és p.E93G variánsok fokozott intracelluláris degradációja</i>	78

4.2.6.1. A fehérjelebomlás vizsgálata a transzláció gátlását követően.....	78
4.2.6.2. A p.E87G fehérjevariáns féléletidejének meghatározása az impulzus jelölés/izotóphígítás (pulse-chase) módszerével	80
4.2.7. <i>Proteaszómagátlókkal kivédhető a p.E87G és p.E93G variánsok intracelluláris degradációja</i>	82
4.2.8. <i>A két vizsgált mutáció együttes hatásának elemzése</i>	84
5. Megbeszélés	88
6. Következtetések.....	99
7. Összefoglalás.....	101
8. Summary.....	102
9. Irodalomjegyzék.....	103
10. Saját publikációk jegyzéke.....	119
11. Köszönetnyilvánítás	120

Rövidítések jegyzéke

6PG	6-foszfo-glukonát
ACAT	acil-KoA:koleszterin-aciltranszferáz
Arg/R	arginin
AT	aciltranszferáz
bp	bázispár
cDNS	komplementer DNS
DAPI	4,6-diamidin-2-fenilindol
DGAT	diacil-glicerin-aciltranszferáz
DMEM	„Dulbecco’s Modified Eagle Medium”
DTT	ditiotritol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ER	endoplazmás retikulum
Ero1	ER-oxidoreduktáz 1
EST	„expressed sequence tag”
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FBS	fötális marhaszérum („fetal bovine serum”)
FFA	szabad zsírsav („free fatty acid”)
G6P	glukóz-6-foszfát
G6PD	glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz
G6PT	glukóz-6-foszfát-transzporter
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
Gln/Q	glutamin
Glu/E	glutamát
Gly/G	glicin
GSH	glutation
GSSG	glutation-diszulfid
H6PD	hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz
HDL	nagy sűrűségű lipoprotein („high density lipoprotein”)
HEK293T	humán embrionális veséből izolált sejtvonal („Human Embryonic Kidney 293T”)

HepG2	humán hepatóma sejtvonala
HRP	tormaperoxidáz („horseradish peroxidase”)
11 β HSD1	1-es típusú 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz
11 β HSD2	2-es típusú 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz
IRE-1	„inozitol-requiring enzyme 1”
I κ B	inhibitor kappa B
JNK	c-Jun N-terminális kináz
kb	kilobázis
KoA	koenzim-A
LB	Luria-Bertani táptalaj
LXR	„liver X receptor” transzkripció faktor
MODY	felnőtt diabétesz, amely fiataloknál jelentkezik („maturity-onset diabetes of the young”)
MOPS	3-N-morforlin-propánszulfonsav
mRNS	messenger vagy hírvivő RNS
MUFA	egyszeresen telítetlen zsírsav
NAD ⁺	oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP ⁺	oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NADPH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NEFA	nem észteressített zsírsav
NF- κ B	nukleáris faktor- κ B
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PBS	foszfátpufferes sóoldat („phosphate buffered saline”)
PCR	polimeráz láncreakció („polymerase chain reaction”)
PDB	„Protein Data Bank”
PDI	proteindiszulfid-izomeráz
PERK	„RNA dependent protein kinase-like ER kinase”
PPAR	„peroxisome proliferator-activated receptor”
PUFA	többszörösen telítetlen zsírsav
PVDF	polivinilidén-fluorid
qPCR	kvantitatív vagy valós idejű PCR
ROS	reaktív oxigén intermedierék („reactive oxygen species”)
RT-PCR	reverz transzkripciót követő PCR

SCD	sztearil-KoA-deszaturáz
SDS	nátrium-dodecil-szulfát („sodium dodecyl sulfate”)
SFA	telített zsírsav („saturated fatty acid”)
SNP	egyponos nukleotid polimorfizmus („single nucleotide polymorphism”)
SREBP-1c	szterol szabályozó elemet kötő fehérje („sterol regulatory element-binding protein-1c”)
TAE	Tris-acetát-EDTA puffer
TG	triglicerid
T _m	olvadáspont („melting temperature”)
UPR	„unfolded protein response”
VLDL	nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein („very low density lipoprotein”)

Ábrák és Táblázatok jegyzéke

1. ábra: A glukóz-6-foszfát-transzporter – a hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz és az 1-es típusú 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz által alkotott katalitikus triád ...	13
2. ábra: A sztearil-KoA-deszaturáz által katalizált reakció és a hozzá kapcsolódó elektrontranszfer-lánc	16
3. ábra: A telített zsírsavak (SFA) toxikus hatása és a mikroszomális acil-KoA deszaturáció	21
4. ábra: Az azonosított Cyb5R izoformák és szekvencia motívumainak sematikus ábrája	24
5. ábra: Az Ncb5or fehérje doménszerkezete	26
6. ábra: A telített zsírsavak (SFA) lipotoxikus hatása és az Ncb5or feltételezett funkciója a zsírsav-deszaturációban	28
7. ábra: Immunhisztokémia a Langerhans szigetsejtek inzulin- és glukagontermelésére	30
8. ábra: Endogén Ncb5or mRNS-szintek HEK293T és HepG2 sejtvonalakban, endogén fehérjeexpresszió patkány májszövetben	53
9. ábra: Az endogén Ncb5or fehérje lokalizációjának vizsgálata két sejtvonalban	56
10. ábra: Az endogén Ncb5or fehérje lokalizációjának vizsgálata patkány májszövetben	58
11. ábra: Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje expressziójának és stabilitásának ellenőrzése Western blottal	60
12. ábra: Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje stabilitásának ellenőrzése az EGFP autofluoreszcenciájának detektálásával	61
13. ábra: Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje lokalizációjának immunfluoreszcens detektálása HEK293T sejtekben	63
14. ábra: HepG2 sejtek endogén Ncb5or expressziójának fluoreszcens immuncitokémiai vizsgálata	65
15. ábra: Ncb5or lokalizációja HepG2 sejtekben	66
16. ábra: A mikroszóma luminális NAD(P)H-szintjének változása	68
17. ábra: Az Ncb5or mRNS és fehérje overexpressziójának kimutatása HEK293T és HepG2 sejtvonalakban	70

18. ábra: Az <i>NCB5OR</i> -génvariánsok mRNS-expressziójának vizsgálata.....	72
19. ábra: Az <i>NCB5OR</i> -génvariánsok fehérjeexpressziójának vizsgálata Western blottal	73
20. ábra: A Glu-Glu címkével ellátott p.E87G és p.E93G Ncb5or-mutánsok vizsgálata immunoblot segítségével.....	75
21. ábra: Az E/Q mutánsok	76
22. ábra: Az E/Q mutációk hatása az Ncb5or fehérje mennyiségére	77
23. ábra: Az Ncb5or vad típusú és p.E87G és p.E93G mutáns változatainak intracelluláris degradációja a transláció gátlását követően	79
24. ábra: A vad típusú és p.E87G variáns Ncb5or fehérjék féléletidejének meghatározása.....	81
25. ábra: A laktaciszтин és az MG132 proteaszómagátlók legkisebb, hatékony koncentrációjának megállapítása HEK293T sejteken.....	82
26. ábra: Proteaszómagátlók hatása a p.E87G és a p.E93G Ncb5or-variánsok fehérjeszintjére	83
27. ábra: A p.E87G_p.E93G kettős mutáns mRNS-szintű expressziója.....	84
28. ábra: A p.E87G_p.E93G kettős mutáns fehérje intracelluláris degradációja.....	86
29. ábra: A proteaszómagátlók hatása a p.E87G_p.E93G kettős mutáns csökkent fehérjeszintjére	87
30. ábra: A p.E87G és p.E93G természetes aminosavcserek valószínűsíthető hatása az Ncb5or fehérje b5 doménjének 3D szerkezetére.....	95
31. ábra: A p.E87Q és p.E93Q mesterséges aminosavcserek valószínűsíthető hatása az Ncb5or fehérje b5 doménjének 3D szerkezetére.....	97
32. ábra: Az Ncb5or fehérje valószínűsített funkciója és a féléletidejét rövidítő misszensz mutációk feltételezett <i>in vivo</i> következményei	98
1. táblázat: Az Ncb5or fehérje sejten belüli elhelyezkedésének jóslásához használt programok és azok elérhetőségei	36
2. táblázat: A mutagenézishez használt primerpárok és jellemzőik	42
3. táblázat: A humán Ncb5or fehérje lokalizációjának <i>in silico</i> predikciója.....	52
4. táblázat: A humán <i>NCB5OR</i> gén NCBI SNP és 1000 Genom adatbázisokban azonosított misszensz mutációinak összefoglaló táblázata.....	71

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Az endoplazmás retikulum redox rendszerei

Az endoplazmás retikulum (ER) a sejtmagmembránhoz kapcsolódva, ciszternákból és tubulusokból álló összefüggő membránrendszert alkot kiterjedt hálózattal a sejtek citoplazmájában. Az egybefüggő membrán egyben meghatározza a citoplazmától teljesen elkülönülő belső teret, a lument, amely a sejt teljes térfogatának átlagosan 10%-át teszi ki [1]. Számos biokémiai, farmakológiai és genetikai adat támasztja alá, hogy membránjának barrier funkciója és specifikus transzportfolyamatai révén az ER a sejt önálló metabolikus kompartmentjeként jellemezhető [2]. Az organelumban ezáltal jellegzetes luminális mikrokörnyezet alakul ki, amelyet a citoplazmával összehasonlításban magas Ca^{2+} -, aszkorbát/dehidroaszkorbát-koncentráció, valamint alacsony [tiol]:[diszulfid] arány jellemez [3-5]. A szelektív és gyakran sebességmeghatározó transzport folyamatok nagymértékben befolyásolják a megfelelő luminális enzimek aktivitását, kinetikai jellemzőit és szubsztrátspecificitását egyaránt [6]. Az így kialakuló speciális milió egyben elengedhetetlen az ER-ben zajló számos enzimatis reakció megfelelő aktivitásához. Az intenzív fehérjeszintézis és -érés mellett az organelum ad helyet a szénhidrát- és lipidanyagcsere, valamint a biotranszformáció egyes reakciói számára [7]. Az ER-hez köthető redox-reakciókat az organelum lumenében elhelyezkedő és membránjához kötött (luminális vagy citoplazmai aktív centrummal rendelkező) enzimek katalizálják. Hasonlóan a citoplazmához az ER-lumenben is meghatározó redox-rendszerek a tiol-diszulfid és piridin-dinukleotid redox-párok, amelyek azonban az ER-membrán két oldalán karakterisztikusan eltérő státuszt (oxidált/redukált állapotot) mutatnak [3]. Az értekezés tézisei szempontjából nem releváns, azonban nem lehet említés nélkül hagyni az ER oxidatív fehérjeérésben betöltött szerepét. Poszttranszlációs módosításként a fehérjék ciszteinil oldalláncain tiol (-SH) csoportjainak oxidációjával létrejövő diszulfid hidak stabilizálják a szekrécióna kerülő és membránfehérjék harmadlagos és negyedleges szerkezetét [8]. A natív fehérje ciszteinil tioljainak elektronjait a proteindiszulfid-izomeráz (PDI) veszi át és az ER-oxidoreduktáz 1 (Ero1) flavoprotein juttatja a végső elektronakceptor oxigén molekulára, hidrogén-peroxid keletkezését eredményezve. A folytonos elektrontranszfer következtében jellemezhető az ER-lumen tiol-oxidáló környezetként [5]. A luminális

fehérjeteriol-oxidációt jól tükrözi a citoplazmához képest lényegesen (mintegy 30-100-szor) alacsonyabb (oxidáltabb) [glutation (GSH)]:[glutation-diszulfid (GSSG)] arány [9]. A membrán ugyanakkor nem átjárható a GSSG és piridin-dinukleotidok (NAD(P)H) számára. A luminális tiol-diszulfid és a piridin-dinukleotid redox-rendszerek nemcsak citoplazmai megfelelőjüktől különülnek el (fizikailag és funkcionálisan), hanem a közös kompartmentben funkcionálisan egymástól is. Így lehetséges, hogy a lumen tiol-oxidáló környezete mellett fenntartható az ER piridin-dinukleotid-készletének redukált állapota (magas redukált-oxidált piridin-dinukleotid ([NADPH]:[NADP⁺] arány). A luminális NADPH-készletet a hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PD) tartja fenn, és ez elsősorban a prereceptorális glukokortikoid-aktiváláshoz szükséges, melyet a biotranszformáció első fázisához tartozó enzim, az 1-es típusú 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (11 β HSD1) katalizál. Az ER-ben a két redox rendszer elkülönülését a glutation-reduktáz enzim luminális hiánya teszi lehetővé [7, 10].

Az ER membránjában helyezkednek el a biotranszformáció előkészítő fázisában kulcsszereplő citokróm P450 monooxygenázok és a telítetlen zsírsavak szintézisét végző acil-KoA-deszaturázok enzimrendszerei is. Ezek az organelum membránjának integráns fehérjéi, aktív centrumuk a membrán külső felszínén helyezkedik el [11, 12]. A citokróm P450 enzimek és a deszaturázok egy-egy elektrontranszfer-lánc végső tagjaként szerepelnek, ahol membránkötött oxidoreduktázok közvetítésével NAD(P)H-től kapják az elektronokat. A monooxygenálási reakció eredményeként a két elektron által az oxigén molekula egyik atomja vízzé redukálódik, a másik oxigénatom a citokrómok által beépül a szubsztrátba, míg ez a beépülés a deszaturáció esetében átmeneti, és az oxigénatom kettős kötés hátrahagyásával víz formájában ki is lép a szubsztrátból [13, 14].

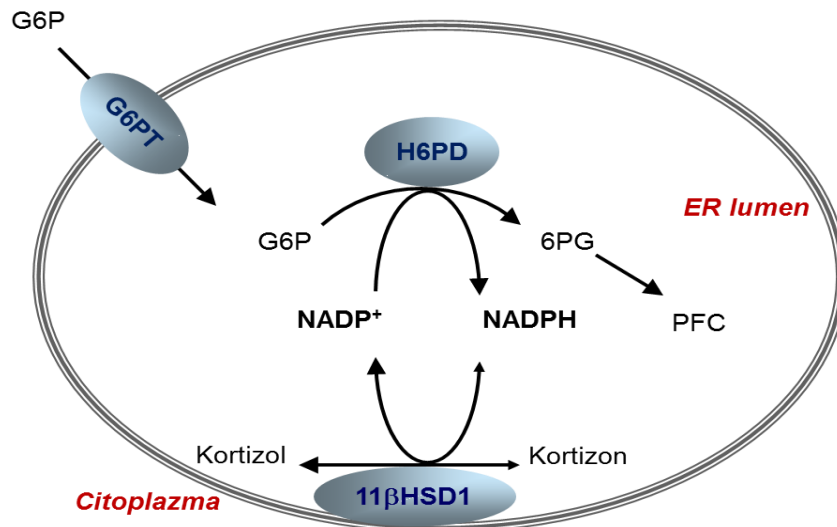
1.1.1. A lúminális $NADP^+$ – $NADPH$ ciklus

A piridin-dinukleotidok a sejt redox háztartásának központi elektronszállítói. A katabolikus folyamatok számos olyan enzimreakciót tartalmaznak, amelyek redukált piridin-dinukleotid ($NADH/NADPH$) termelésével járnak. Míg a lebontó folyamatok oxidoredukcióiból származó elektronokat a $NADH$ a légzési láncba szállítja, addig foszforilált analógja, a $NADPH$ redukáló erőt biztosít a bioszintetikus és biotranszformációs enzimreakciókhoz, valamint az antioxidáns védelem számára [15].

Az ER is számos $NADPH$ -fogyasztó enzimnek ad helyet. Ezek közül a bioszintetikus lépést katalizáló vagy a biotranszformációban résztvevő integráns membránfehérjék (pl. citokróm P450-reduktáz, 3-hidroxi-3-metil-glutaril-KoA-reduktáz, szkvalén-szintáz, biliverdin-reduktáz) aktív centruma a membrán külső (citoplazma felőli) felszínén helyezkedik el, és így ezen enzimek a citoszólban termelődő $NADPH$ -t használják [3]. Ugyanakkor magában a lumenben is elhelyezkednek olyan dehidrogenáz (reduktáz) enzimek, amelyek piridin-dinukleotiddal ($NADPH$) működnek [16-18]. Fontos azonban kiemelni, hogy mivel az ER membránja nem átjárható e piridin-dinukleotidok számára, az organelumban belsejében zajló enzimreakciók kofaktorigényének kielégítésére kizárólag a lumen elkülönült $NADPH$ készlete áll rendelkezésre [10].

A perifériás szövetek lokális glukokortikoid-metabolizmusáért a 11β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1-es (11β HSD1) és 2-es (11β HSD2) típusú izoenzime felelős. A két izoenzim intracelluláris lokalizációja és kofaktorigénye eltér, továbbá jellegzetesen különbözik a glukokortikoid hormonhatás az őket tartalmazó célszervekben [19, 20]. *In vitro* mindkét típusú izoenzim a prohormon kortizon (11-oxo-szteroid) és az aktív glukokortikoid hormon, kortizol (11-hidroxi-szteroid) reverzibilis egymásba alakítását katalizálja. Az *in vivo* reakció aktuális irányát, azaz, hogy az enzim reduktázként vagy dehidrogenázként működik az adott célsejtben, a kofaktorellátottság, vagyis a $[NAD(P)H]:[NAD(P)^+]$ arány határozza meg [21]. A 11β HSD1 az ER membránjához kötötten, intraluminálisan helyezkedik el [17]. Ez az enzim a glukokortikoid-célszervekben, -szövetekben (májban, vázizomban, valamint a zsírszövetben) jellemzően reduktázként működik, vagyis $NADPH$ felhasználásával a kortizon kortizollá történő prereceptorális aktiválását végzi. *In vivo* megfigyelések alapján kivételt képez ez alól a szubkután zsírszövet, ahol a 11β HSD1 éppen ellentétes irányú átalakulást, a kortizol

oxidációját (inaktiválását) katalizálja NADP^+ felhasználásával [22]. E kivételtől eltekintve, a reakció fiziológias körülmények között a legtöbb szövetben megfigyelt iránya (kortizolképződés) közvetett bizonyítékkal szolgál arra vonatkozólag, hogy az ER lumenében magas a redukált-oxidált piridin-dinukleotid $[\text{NADPH}]:[\text{NADP}^+]$ arány, aminek fenntartása nyilván szükséges az enzim kortizoltermelő funkciójának fenntartásához. Az ER NADP-függő izocitrát-dehidrogenáz aktivitásának kimutatása [23] dacára általánosan elfogadott tény, hogy a lumen fő NADPH-termelő enzime a hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PD) [24, 25]. A H6PD tandem enzimként a pentóz-foszfát ciklus első két lépését katalizálja az ER lumenében: elsőként a glukóz-6-foszfátot (G6P) 6-foszfoglukonolaktonná oxidálja NADPH képződése mellett, majd laktonáz aktivitása a köztitermék 6-foszfoglukonolakton hidrolízisét eredményezi 6-foszfoglukonáttá (6PG) [26]. Szubsztrátellátását, vagyis a G6P lumenbe történő bejuttatását fehérjemediált transzporttal, a glukóz-6-foszfát-transzporter (G6PT) végzi [27] (1. ábra).



1. ábra. A glukóz-6-foszfát-transzporter – a hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz és az 1-es típusú 11β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz által alkotott katalitikus triád. A lokális glukokortikoid-aktiválódást az endoplazmás retikulumban elhelyezkedő fehérjehármas katalizálja. A glukóz-6-foszfát (G6P) specifikus transzportere, a G6P-transzporter (G6PT) segítségével jut be az ER lumenébe, ahol a hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PD) 6-foszfoglukonáttá (6PG) alakítja. Az enzim működése során termelődő NADPH biztosítja az 1-es típusú 11β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (11β HSD1) által katalizált kortizon-kortizol átalakulás kofaktorellátottságát.

A H6PD és a 11 β HSD1 enzimek lumenális lokalizációját aktivitásuk közel 100%-os látenciája is alátámasztja [28], ami egyúttal további bizonyítékként szolgál amellyel is, hogy az ER membránja nem átjárható kofaktoruk, a NADP(H) számára. A két enzim egymás kofaktorellátását biztosítja, a 11 β HSD1 használja a H6PD által termelt NADPH-t, ugyanakkor a kortizol prerreceptorális aktiválódása során képződő NADP⁺ pedig a H6PD szubsztrátjául szolgál. Az enzimek közvetlen fizikai kapcsolatát, fehérje-fehérje kölcsönhatását és funkcionális kapcsoltságát [29] kofaktorellátottságukon kívül további biokémia [30] és genetikai [31] bizonyítékok is alátámasztják. Hepatocitákban [30], adipocitákban [21] és neutrofil granulocitákban [32] egyaránt kimutatták a G6PT, H6PD és a 11 β HSD1 fehérjék jelenlétét és funkcionális együttműködését. Számos kísérleti eredmény utal arra, hogy patkány májmikroszómában magas a [NADPH]:[NADP⁺] arány, vagyis hogy a NADPH-NADP⁺ redox rendszer redukált állapotban van [10], ami összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a 11 β HSD1 fiziológiásan a kortizon redukcióját katalizálja. A triád két enzime közül a 11 β HSD1 esetében jelentős indukció figyelhető meg például differenciálódó zsírsejtekben [21], a H6PD azonban különböző patkány és humán szövetekben mRNS- és fehérjeszinten egyaránt konstitutívan fejeződik ki [24].

A triád működését meghatározza a transzportfolyamat révén a lumenbe kerülő, oxidálható G6P mennyisége, amely a táplálkozási tényezők szerepét veti fel. A szervezet tápanyag-ellátottsága képes tehát befolyásolni az ER lumenális redox állapotát és ezzel összefüggésben az ER kortizoltermelő kapacitását. Ezáltal a G6PT-H6PD-11 β HSD1 rendszer működésének, amely összekapcsolja az intermedier anyagcserét a hormonmetabolizmussal, fiziológiásan metabolikus tápanyagszenzor funkció tulajdonítható [33, 34].

1.1.2. A zsírsav-deszaturációs elektrontranszfer-lánc

A *de novo* zsírsav-bioszintézis dominánsan a 16-szénatomos telített palmitinsavat eredményezi végtermékként. A komplex lipidek szintéziséhez szükséges további endogén zsírsavak a palmitinsav szénláncának két szénatomos egységekkel történő hosszabbításával (elongáció) és adott pozícióban kettős kötés létrehozásával (deszaturáció) alakulnak ki [35]. A telítetlen zsírsavak szintézisének elkötelező lépése az első cisz kettős kötés kialakítása a zsíracyl-KoA szubsztrát Δ 9-es pozíciójában

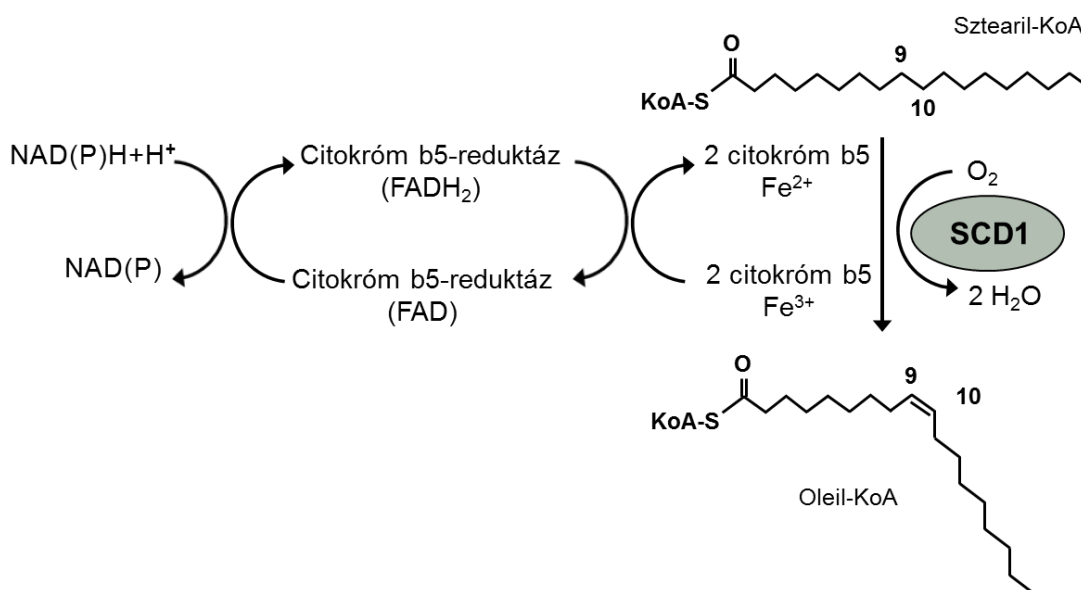
(a 9. és 10. szénatom között) [36]. Ezt az oxidatív reakciót a nem hem-vasat tartalmazó sztearil-KoA-deszaturáz (SCD) enzim katalizálja. A 4 transzmembrán doménnel rendelkező, és az ER membránjában (citoszolikus aktív centrummal) elhelyezkedő enzim preferált szubsztrátjaiként a 16 szénatomos palmitoil-KoA (C16:0) és a 18 szénatomos sztearil-KoA (C18:0) szolgál. Az enzim a cisz kettős kötés kialakításával az egyszeresen telítetlen palmitoleil-KoA (16:1 cisz Δ 9) és oleil-KoA (18:1 cisz Δ 9) aktivált zsírsavakat hozza létre [37, 38]. A hosszú szénláncú zsírcil-KoA származhat részben a *de novo* szintézisből részben a táplálékkal elfogyasztott telített zsírsavakból. A képződő telítetlen zsírsavak fontos szubsztrátként szolgálnak a komplex lipidek, azaz glicerofosfolipidek, trigliceridek, koleszteril-észterek, szfingolipidek felépítéséhez. Az SCD által katalizált reakció egyben a nem esszenciális többszörösen telítetlen zsírsavak bioszintézisének sebességmeghatározó lépése. A különböző specificitású deszaturáz enzimek a már Δ 9 helyzetben telítetlen zsírsavban képesek újabb kettős kötések kialakítására a Δ 4, 5, illetve 6-os pozíciókban [12, 39].

A humán szövetekben két SCD-izoformát azonosítottak. A fő deszaturáz enzim, az SCD1 széleskörűen megtalálható a szövetekben, magas szinten expresszálódik a májban, tüdőben és a zsírszövetben. Magas szénhidráttartalmú diéta hatására nagymértékben indukálódik a gén expressziója a májban, a vázizomban és a szívben [40]. A humán SCD1 85%-os aminosavszekvencia-azonosságot mutat az egér és patkány SCD izoformákkal [12]. Az SCD5 izoformára ez a szekvenciahomológia már nem jellemző, megjelenése egyedülálló a főemlősök körében, kifejeződése a központi idegrendszerre és a pankréászra korlátozódik [41]. Rágcsálókban 4 SCD izoforma (SCD1-4) fordul elő. Az SCD1 magas szinten expresszálódik a máj- és zsírszövetben, az SCD2 az agyban és neuronális szövetekben fordul elő, az SCD3 pedig specifikusan a sebocitákban és a Harder-mirigyben, az SCD4 kizárólag a szívben fejeződik ki [35].

Az SCD1 gén expressziója táplálkozási tényezők (glukóz, fruktóz, koleszterin, telített/telítetlen zsírsavak), hormonok (inzulin, leptin) és számos transzkripciófaktor (SREBP-1c, LXR α és β , PPAR α , β , γ and δ) által szabályozott [12, 42].

A humán Δ 5 és Δ 6 deszaturázokkal ellentétben, amelyek mintegy fúziós fehérjeként citokróm b5-szerű és deszaturáz doménekből állnak, a Δ 9 deszaturáz enzimek nem rendelkeznek „belső” citokróm b5-szerű doménnel [43, 44]. A működésükhöz szükséges elektronokat különálló elektronszállítók biztosítják, amelyek az ER integráns

membránfehérjéiként elektrontranszfer-láncot alkotnak [45]. Az enzim molekuláris oxigént és a láncon keresztül NAD(P)H-tól származó elektronokat használ szubsztrátként. Az SCD1 az elektrontranszfer-lánc terminális tagjaként szerepel, ugyanis a működéséhez szükséges és NAD(P)H-tól származó elektronokat a NAD(P)H citokróm b5-reduktáz (b5R) flavoprotein és az elektron-karrier citokróm b5 (b5) hemoprotein közvetítésével kapja. A NAD(P)H elektronjait a citokróm b5-reduktáz egyenként továbbítja a hozzá asszociálódó citokróm b5 enzim hem prosztetikus csoportjának, a fehérje Fe^{3+} ionját Fe^{2+} ionná redukálva. Az elektronok ezt követően kerülnek a deszaturáz enzim Fe^{3+} ionjára, majd az oxigén molekula egyik atomját vízzé redukálják. A másik oxigén atom a zsírsav két szomszédos szénatomjáról származó hidrogénnel víz formájában lép ki és ezáltal a cisz kettős kötés kialakulásával a sztearil-KoA-ból oleil-KoA jön létre [12, 14, 46] (2. ábra).



2. ábra. A sztearil-KoA-deszaturáz által katalizált reakció és a hozzá kapcsolódó elektrontranszfer-lánc. Az ER integráns membránfehérjei által alkotott elektrontranszfer-lánc tagjai a NAD(P)H citokróm b5-reduktáz flavoprotein, az elektronok továbbításában szerepet játszó citokróm b5 enzim és a kevert funkciójú oxigenázként működő sztearil-KoA-deszaturáz. Az SCD1 az elektrontranszfer-lánc végső tagja, a működéséhez szükséges és NAD(P)H-tól származó elektronokat a citokróm b5-reduktáz (b5R) és a citokróm b5 (b5) közvetítésével kapja. Az enzim molekuláris oxigént használ, amely során az egyik oxigén atom a NAD(P)H hidrogénjeivel képez vizet. A másik oxigén atom a zsírsav két szomszédos szénatomjáról származó hidrogénnel víz formájában lép ki, miközben a $\Delta 9$ -deszaturáz enzim a kettős kötés kialakításával sztearil-KoA-ból oleil-KoA-t képez [12].

A deszaturáz enzimek tehát az endogén vagy exogén forrásból származó telített zsírsavakból egy vagy további kettős kötés kialakításával egyszeresen (MUFA) vagy többszörösen telítetlen (PUFA) zsírsavakat hoznak létre. Funkciójuk meghatározó szereppel bír a lipidmetabolizmusban. A telítetlen (oleát) és telített (sztearát) zsírsavak egymáshoz viszonyított aránya (illetve a zsírsavak telítetlenségi foka) nagymértékben meghatározó a membránfluiditás szempontjából. Ezen túlmenően a többszörösen telítetlen zsírsavak (pl. arachidonsav) fontos szignál molekulák szintézisének prekursoraiként szolgálnak. A létrejövő egyszeresen telítetlen zsírsavak szükségesek a komplex lipidekbe történő beépítéshez. Az oleát az acil-KoA: koleszterin-aciltranszferáz (ACAT) és a diacil-glicerín-aciltranszferáz (DGAT) enzimek preferált szubsztrátja, amely enzimek a koleszteril-észterek és trigliceridek szintézisét végzik [42].

1.2. Az endoplazmás retikulum redox rendszerei és a diabétesz

Az ER-nek mint az eukarióta sejtek önálló metabolikus kompartmentjének meghatározó szerepe van az intracelluláris homeosztázis fenntartásában. Az ER érzékenyen reagál a külső és belső környezet változásaira, és kiemelkedő szerepe van a celluláris adaptációban [2, 7]. Egyre nagyobb figyelem irányul az ER redox rendszereit és az általuk szabályozott celluláris mechanizmusokat érintő hatások szerepére a metabolikus szindróma és 2-es típusú diabétesz szempontjából kulcsfontosságú inzulinrezisztencia és β -sejtkárosodás kialakulásában [47-49].

Az organelum működését számos szélsőséges hatás zavarhatja meg, amelyek végsősoron a poszttranszlációs módosítások folyamatát, vagyis a fehérjeérést érintik, és ezáltal ER-stresszt idéznek elő. ER-stresszt okozhat a lumenális tiol-diszulfid redox státusz eltolódása (ún. redox-stressz), a tápanyaghiány, különösen a glukóze (fehérjeglukoziláció zavara), a Ca^{2+} homeosztázisában bekövetkezett zavar, a szekréciós fehérjék szintézisének hirtelen fokozódása, aminek hátterében akár vírusfertőzés is állhat. Ezekben az állapotokban a fehérjeérés elégtelensége a helytelenül, illetve részlegesen tekeredett fehérjék felhalmozódását, esetleges aggregációját okozzák a lumenben. Az ER ún. stresszreceptorai érzékelik e fehérjék akkumulációját és beindítják az „unfolded protein response” (UPR) jelátviteli mechanizmusát. Az UPR elsődlegesen az adaptációt szolgálja [50-52], de az autofágia és apoptózis aktiválódását is okozhatják [53, 54].

Az organellum működését és metabolizmusát érintő hatások számottevően az ER luminális redox rendszerein keresztül képesek hatni a reguláció egyes elemeire. Az oxidatív fehérjeérés zavarát előidéző stresszhatások alapvetően az UPR jelátviteli útvonalainak aktiválását váltják ki. Azok (az elsősorban táplálkozási) a következőkben részletezendő tényezők, amelyek a lumen piridin-dinukleotid redox státuszának eltolódását eredményezik, a prereceptorális kortizoltermelés befolyásolása révén hatnak a sejt további anyagcserefolyamataira [55].

1.2.1. A prereceptorális kortizoltermelés és a metabolikus szindróma

Az ER a sejt tápanyagszenzoraként működik. Egyes anyagcsere-intermedierek (például a koleszterin, triglicerid, zsírsavak, G6P) szintje és luminális redox rendszereinek státusza által képes érzékelni a sejt aktuális metabolikus állapotát. A tápanyagellátottság érzékelésében az ER endogén jelátviteli útvonalai aktiválódnak vagy prereceptorális hormonmetabolizmusa módosul. A fiziológiás szabályozás erőteljes, illetve hosszan elnyúló zavara számos betegség patomechanizmusának alapjául szolgálhat [3, 7].

In vivo kísérlet támasztja alá, hogy míg éhezés során fokozatosan csökken a májsejtek mikroszomális [NADPH]:[NADP⁺] aránya és ezzel összefüggésben a kortizonredukáló kapacitása, addig jóllakott állapotban NADPH-túlsúly és az organellum kortizoltermelő kapacitásának fokozódása észlelhető. A sejtek tápanyagellátottsága tehát jelentősen befolyásolja a lokális glukokortikoid hormonaktiválást, a G6PT-H6PD-11βHSD1 katalitikus triád működését [33]. A fruktóz-6-foszfát (F6P) a G6P-hoz hasonlóan képes hozzájárulni a H6PD által katalizált NADPH-termeléshez és ezáltal a kortizolaktiválás fokozásához [56]. A tápanyagkínálat túlsúlya és folyamatos fennállása azonban nagymértékű terhelést okoz a fiziológiás körülmények között finomszabályozást megvalósító szenzor számára, amely a glukokortikoid-hatás kóros mértékű modulálásával képes válaszolni. Egyre több adat utal arra, hogy a glukokortikoid-célszervek lokális kortizolmetabolizmusának jelentős fokozódása – a plazma kortizolszintjének emelkedése nélkül – képes hozzájárulni az elhízás, inzulinrezisztencia és ezáltal a metabolikus szindróma és 2-es típusú cukorbetegség kialakulásához [26, 57].

A 11 β HSD1 enzimet a májban, illetve a zsírszövetben szelektíven túltermelő, transzgenikus egerekben metabolikus szindróma alakul ki, azonban a tünetek eltérnek az egyes szöveti overexpresszió hatására. A májban kifejezett 11 β HSD1 transzgen hatására az elhízás kivételével a metabolikus szindróma valamennyi tünete kialakul az egerben [58]. Zsírszöveti túltermeltetése esetén a metabolikus szindróma összes tünete jellemezhető, úgymint a viscerális elhízás, hipertónia, inzulinrezisztencia, glükózintolerancia, diszlipidémia [59]. A kortizol prereceptorális aktiválódásának tartós fennállása tehát hasonlóan képes a hiperkortizolémián alapuló Cushing-szindrómához hasonló tünetek kiváltására [60]. Ezzel szemben a 11 β HSD1 knock-out egerek ellenállóak a metabolikus szindróma kialakulásával szemben, magas zsírtartalmú táplálás sem okoz elhízást [20, 61]. Az állatok inzulinérzékenysége fokozott, szérum lipidprofilja kardioprotektív mintázatot mutat, alacsony szérum-trigliceridszinttel és emelkedett HDL-koleszterinszinttel jellemezve [62]. A H6PD génkiütött egermodellben is csökkent súlygyarapodás, hipoglikémia és fokozott inzulinérzékenység alakul ki. A kortizonredukció a NADPH ellátottságát biztosító enzim hiánya következtében nem biztosított, a 11 β HSD1 dehidrogenáz aktivitása válik meghatározóvá [63, 64]. A G6PT specifikus gátlása képes kivédeni *in vitro* a G6P adásával járó fokozott kortizoltermelődés hatását [10].

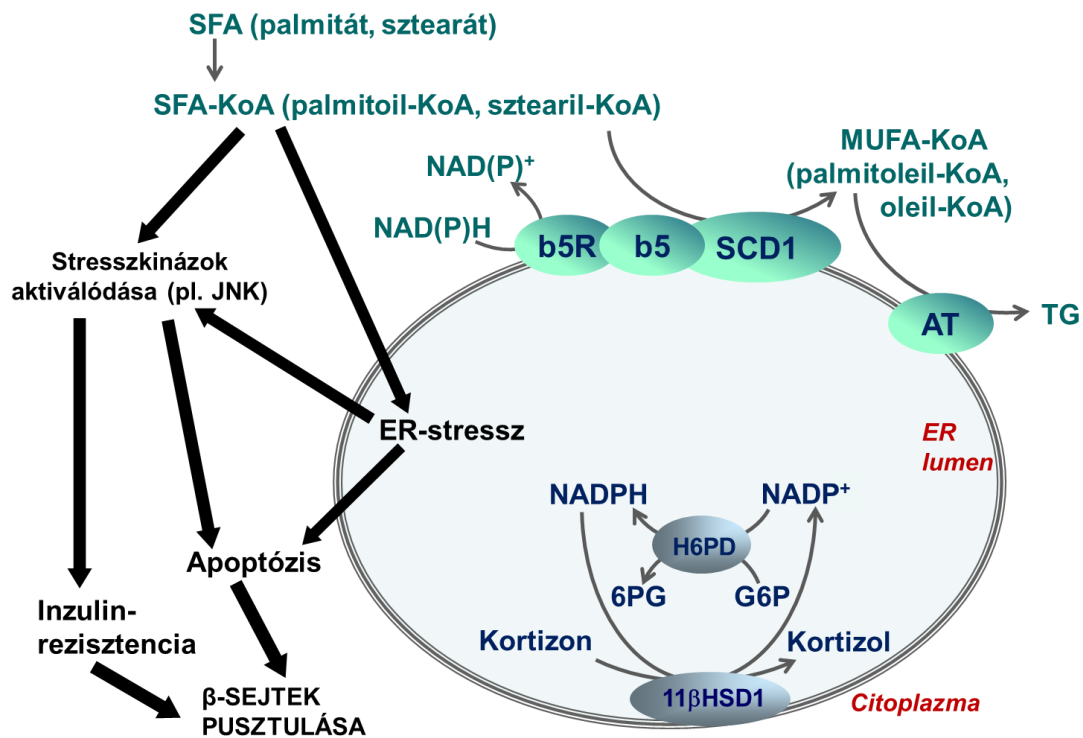
A 2-es típusú diabétesz kísérleti állatmodelljében a 11 β HSD1 szelektív gátlása szintén együtt járt az inzulinérzékenység fokozódásával és súlyvesztéssel [65]. A metabolikus szindróma és a diabétesz kezelése szempontjából éppen ezért ígéretes gyógyszercélpontnak bizonyult a 11 β HSD1 gátlása [28]. Fontos kérdés, hogy egyes táplálkozási tényezők hogyan befolyásolják a lúminális piridin-dinukleotid redox státusz alakulását.

1.2.2. A zsírsav-deszaturáció és lipotoxicitás

A zsírsavak jelentős energiaforrást jelentenek a legtöbb aerob anyagcserét folytató sejt számára a humán szervezetben. Néhány szövet, például az agy számára korlátozott a plazmalipidek elérése, míg a legtöbb szövet ezeket a tápanyagokat lipoproteinekbe csomagolva (kilomikron, VLDL) vagy közvetlenül szabad zsírsavak (FFA), más néven nem-észterestett zsírsavak (NEFA) formájában veszi fel. A zsírsavak albuminhoz kötött formában szállítódnak, és szérumszintjük rendszerint elhúzódó éhe-

zés vagy megerőltető fizikai aktivitás során emelkedik a zsírsejtekben raktározódó trigliceridek intenzív hidrolízise következtében. A zsírsavak szekrécióját a mobilizálandó zsírraktárakból az alacsony inzulin/glukagon arány mellett a glukokortikoid és katekolamin stressz hormonok stimulálják. A kiegyensúlyozott zsírsav-metabolizmus kritikus szereppel bír az energiahomeosztázis, a membránfluiditás és az intracelluláris jelátvitel modulálásában [66]. Kóros állapotban (pl. elhízás következtében) a szabad zsírsavak hosszan tartó túlkínálata különböző sejtekben metabolikus és jelátviteli stresszfolyamatokat indít be. A zsírsavellátottság felborult egyensúlya és mindezen káros, celluláris diszfunkciót eredményező hatásai jelentik a lipotoxicitást, amely egyben a sejtek programozott halálát, lipoapoptózist is okozhatja [67]. A különböző zsírsavak fehérjemediált transzportfolyamat révén [68] jutnak a citoplazmába, ahol elsőként koenzim-A-val (KoA) aktiválódnak, és ilyen formában (zsíracyl-KoA) metabolizálódnak. Magas zsírsavszint következtében az intracelluláris zsíracyl-KoA-túlkínálatot a mitokondriális β -oxidáció és a kapcsolt oxidatív foszforiláció intenzív működése révén a reaktív oxigénszármazékok (ROS) fokozott keletkezése kíséri. Az így kialakuló FFA-indukált oxidatív stressz az inhibitor- κ B-kináz (I κ B) komplex és a c-Jun N-terminális kináz (JNK) aktiválása által vesz részt a gyulladásos jelátviteli folyamatok kialakításában [69, 70].

A zsíracyl-KoA citoplazmai felhalmozódása az ER normál működését is befolyásolja. Egyrészt a hosszú láncú acil-KoA (palmitoil-KoA) membránpermeabilizáló hatása [71] révén idézi elő a luminális milió megváltozását, főként az organelum Ca^{2+} -homeosztázisának zavarát. Másrészt a telített zsírsavak (palmitát) sejt felszíni receptorhoz (FAT/CD36) kötődve, foszfolipáz C (PLC) aktiválódásán keresztül is az ER Ca^{2+} -deplícióját váltják ki [72]. A Ca^{2+} kiáramlása a kalciumfüggő chaperonok és foldázok elégtelen működése következtében járul hozzá a fehérjeérés és minőségellenőrzés zavarához, és ezáltal az éretlen fehérjék luminális felhalmozódása az ER transzmembrán receptorai közvetítésével alakítja ki az UPR-t [5]. A zsírsavtúltengés következtében kialakuló oxidatív és ER-stressz szinergisztikusan aktiválja a c-Jun N-terminális kinázt (JNK), amely az inzulin jelátvitelének gátlását is okozza az inzulin-receptor-szubsztrát (IRS) fehérjék szerin oldalláncon történő foszforilációjával [73] (3. ábra). A β -sejtek vonatkozásában az inzulinrezisztencia kialakulásában és a lipoapoptózis indukciójában főként a p38 MAPK játszik szerepet [74].



3. ábra. A telített zsírsavak (SFA) toxikus hatása és a mikroszomális acil-KoA deszaturáció. A telített zsírsavak sejtfelszíni receptorokhoz kötődve, illetve a sejtekben koenzim-A-hoz kapcsolódva (SFA-KoA) jelátviteli és metabolikus stressz folyamatokat indítanak be, amelyek végső soron az inzulin-jelpálya gátlását (inzulinrezisztenciát) és a sejtek apoptózisát eredményezik. Az SCD1 az aktivált telített zsírsavakból (SFA-KoA) egyszeresen telítetlen zsírsavakat (MUFA-KoA) képez, amelyek aciltranszferázok (AT) szubsztrátjaként hozzájárulnak a trigliceridek (TG) szintéziséhez. Az SCD1 a működéséhez szükséges NAD(P)H-t a citoszólból az ER b5R és b5 integráns membránfehérjéi közvetítésével kapja. A vékony, szürke nyilak átalakulást, a vastag, fekete nyilak a lipotoxicitás mechanizmusát jelölik.

Számos *in vivo* és *in vitro* tanulmány kísérleti eredményei támasztják alá, hogy a telített zsírsavak (pl. palmitát; 16:0 és sztearát; 18:0) toxicitása lényegesen felülmúlja a telítetlenekét (pl. oleát; 18:1 *cisz*Δ9), sőt az utóbbiak sokszor képesek csökkenteni vagy akár kivédeni a telítettek káros hatásait [75-80].

Egyre inkább nagy figyelem irányul a szisztémás magas zsírsavszint és a telített zsírsavak káros hatásainak patológiás állapotokban betöltött szerepére és azokra az endogén mechanizmusokra egyaránt, amelyek képesek lehetnek a metabolizálandó zsíracil-KoA túlkínálat csökkentésére. A telítetlen zsírsavak szükségszerű építőelemként (acil-KoA donorként) vesznek részt (sn-2 pozícióban) a trigliceridek szintézisében a telített zsírsav komponensek hozzájárulása mellett [81]. Így ha a telített zsírsavak (nagy

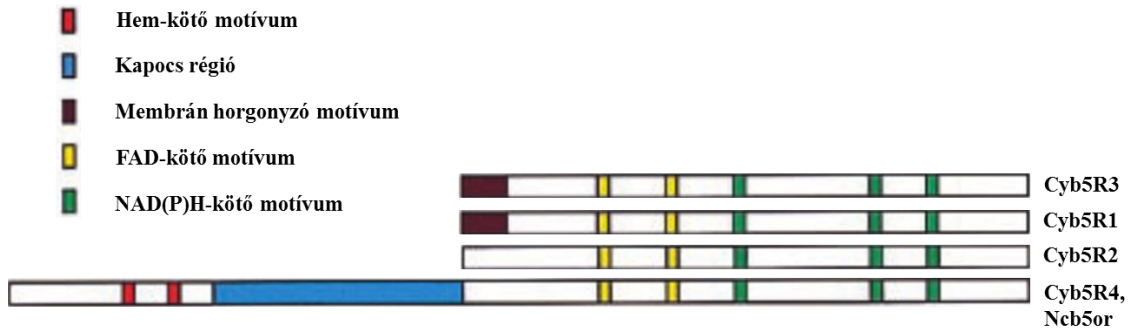
aránya) mellett biztosított a telítetlenek kínálata is a különböző szöveti sejtekben, akkor a lipotoxikus hatások kivédésére (a zsíracil-KoA felhalmozódás csökkentésére) irányuló ektópiás zsírraktározásnak – éles ellentétben korábbi álláspontokkal – protektív szerep tulajdonítható [82] (3. ábra). Máj, harántcsíkolt izom, szívizom és pankreász β -sejteken *in vitro* egyaránt megfigyelhető, hogy az exogén vagy endogén módon rendelkezésre álló telítetlen zsírsavak e menekülő útvonal biztosításával (a palmitát trigliceridekbe épülésének elősegítésével) eredményezik a lipoapoptózis elkerülését [77, 83, 84]. Ha a zsírsavak egymáshoz viszonyított aránya oly mértékben tolódik el, hogy a telítetlen zsírsavak kínálata korlátozott, akkor a sejtek túlélését ily módon segítő trigliceridek képzése zavart szenved, és az intracelluláris telített acil-KoA intermedierek felhalmozódása súlyosbítja a sejtkárosodást [66, 85]. A telített és telítetlen zsírsavak eltérő celluláris hatásai a membrán foszfolipidek telítettségi állapotának befolyásolásán keresztül is megvalósul. Az ER IRE-1 α és PERK stresszreceptorai transzmembrán doménjeik által képesek érzékelni a membrán lipidkomponensei telített-telítetlen zsírsav arányának eltolódását. A membrán telítettségének fokozódása közvetlenül – éretlen fehérjék luminális felhalmozódásának érzékelésétől függetlenül – önálló stimulusként eredményezi az UPR aktiválódását [66, 86].

Ez a jelenség egyben ráirányítja a figyelmet a zsírsav-deszaturációs enzimek, elsősorban a folyamat sebességmeghatározó lépését katalizáló SCD1 enzim aktivitásának szerepére. A telített zsíracil-KoA szubsztrátokban $\Delta 9$ -es pozícióban cisz kettős kötést kialakító SCD1 enzim közreműködése, az (endogén) telítetlen acil-KoA-készlet előállítására révén meghatározó a trigliceridek szintézise szempontjából. Az összehangolt működéshez hozzájárul, hogy az SCD1 az ER-ben a diacilgliceril-aciltranszferáz 2 (DGAT2) enzimmel kolokalizált [35]. Bebizonyosodott, hogy az SCD1-deficiens sejtek fokozottan, míg az SCD1-túltermelő sejtek kevésbé érzékenyek a lipotoxicitásra [87-90]. Ezzel látszólagos ellentmondásban áll az SCD1 gén kiütése következtében kialakuló fenotípus. A génkiütött egerekben (SCD1^{-/-}) jelentős a zsírszövet állományának csökkenése (sovány testalkatúak), és egyúttal rezisztensek a táplálkozás (magas zsír/szénhidrát-tartalmú diéta) okozta elhízással szemben. A jelenség magyarázata, hogy az enzim hiánya akadályozza a komplex lipidek, köztük trigliceridek szintézisét, és így az adipociták működését és a raktárzsír felhalmozását [91]. Az enzim májra korlátozott inaktivációja véd a magas szénhidrát-tartalmú étrend okozta

elhízással szemben, de ez a hatás már nem érvényesül magas zsírtartalmú étrend esetén. Ez mutatja a hepaticus SCD1 kulcsszerepét a magas szénhidrátellátottság által indukált lipogenezisben [92]. Telített zsírsavakkal *in vitro* kezelt különböző típusú sejtek esetében a deszaturáció kapacitásának fokozása védelmet jelent, míg a deszaturáz defektusa súlyosbítja a lipotoxicitás által okozott károsodást [87, 90, 93, 94]. A pankreász β -sejtek különösen érzékenyek a telített zsírsavakra. A lipotoxicitás jelensége egyaránt megfigyelhető a β -sejtek diszfunkciójában és apoptózisában, amelyhez az oxidatív és ER-stressz, valamint a gyulladásos folyamatok aktiválódása egyaránt köthető [95, 96]. MIN6 egér β -sejtekben az SCD1 kifejeződésének csendesítése fokozta a telített zsírsavak (palmitát) citotoxikus hatását [89]. INS-1 patkány β -sejtekben az SCD1 gátlása szintén jelentősen csökkentette a palmitát deszaturációját, és ezáltal a telítetlen zsírsavak hozzájárulását a komplex lipidek képzéséhez. Ez a palmitát által kiváltott ER-stressz és apoptózis erősödéséhez vezet. A deszaturáz fokozott expressziója β -sejtekben pedig védelmet jelent mindezen hatások ellen. Az *in vitro* megfigyelésekkel összhangban a β -sejtek SCD1 és SCD2 indukciója protektív hatásként megfigyelhető Zucker patkányok prediabetés stádiumában. Míg a már kialakult diabéteszben az SCD1 és SCD2, valamint a zsírsav elongáz 6 (Elovl6) mRNS expressziója jelentősen csökken a szigetsejtekben [97].

1.3. A NAD(P)H citokróm b5 oxidoreduktáz

A NAD(P)H citokróm-b₅-oxidoreduktáz enzimet (Ncb5or vagy Cyb5R4) Hao Zhu és munkatársai, a kansasi egyetem kutatói írták le elsőként mintegy másfél évtizede [98]. Az új fehérje azonosítását bioinformatikai eszközökkel végezték. Az EST („expressed sequence tag”) adatbázisban a humán citokróm b₅-reduktáz (Cyb5R3) fehérjeszekvencia felhasználásával meghatározott NAD(P)H és FAD kötéséért felelős konzervált szekvencia motívumok alapján BLAST (*tblastn*) keresési módszerrel három citokróm b₅-reduktáz fehérjehomológot azonosítottak, köztük az Ncb5or-t és a Cyb5R1 és Cyb5R2 izoformákat (4. ábra).



4. ábra. Az azonosított Cyb5R izoformák és szekvencia motívumainak sematikus ábrája [98].

A humán citokróm b5-reduktáz négy izoformája különíthető el tehát (Cyb5R1-Cyb5R4), amelyek egyaránt a ferredoxin-NADP⁺-reduktáz szuperfamilia tagjai. A fehérje-szuperfamilia valamennyi tagja rendelkezik FAD prosztetikus csoport és NAD(P)H koenzim kötőhellyel. A négy izoenzim közül a Cyb5R3 variánsai mirisztóil csoport révén az ER és a mitokondrium külső membránjában egyaránt előfordulnak. A Cyb5R1 szintén tartalmaz N-terminális membránhorgonyzó régiót, ami azonban a Cyb5R2 és Cyb5R4 homológokból hiányzik. Az Ncb5or (Cyb5R4) az egyedüli b5-reduktáz izoforma, amely több szerkezeti domént tartalmaz. A citokróm b-típusú NAD(P)H oxidoreduktáz természetes fúziós fehérjeként került azonosításra [99]. A humán fúziós fehérje ortológjai egérben, patkányban, fonalféregben egyaránt megtalálhatók. A humán és az egér aminosav-szekvenciák összehasonlítása alapján a kapocs régió (CS domén) kevésbé konzervált struktúra szemben a b5- és b5R-szerű domének esetében megfigyelt nagyfokú homológiával [98].

A humán *NCB5OR* gén a 6. kromoszóma hosszú karján, a 6q14.2 régióban helyezkedik el. A gén 16 exont tartalmaz konzervált splicing helyekkel. Érdekes, hogy patkányban és egérben azonosítottak egy splice-variánst, amely emberben hiányzik. Az alternatív splicing során a 12-es exon kiesése („exon skipping”) történik és az így létrejövő mRNS, illetve a róla képződő fehérje expressziója a patkány és egér agy, vázizomzat és here szöveteire korlátozódik. Feltételezik e variáns oxidatív stressz elleni védekezésben betöltött szerepét ezekben a kitüntetett szövetekben [100]. *NCB5OR*^{-/-} egerek hasnyálmirigy szigetsejtjein végzett microarray analízisének eredményeként azt találták, hogy az antioxidáns enzimek közül különösen a glutation-peroxidáz (Gpx-2-4) enzimek expressziója fokozódott jelzetten. Rövid ideig (1h) tartó terc-butil-hidrokinon antioxidáns kezelés hatással volt a promóter aktivitására [101]. Az Ncb5or antioxidáns

válaszban betöltött esetleges szerepét a promóter régiójában azonosított konszenzus ARE (antioxidáns válasz elem) szekvencia is megerősíti. A promóter régió karakterizálása során meghatározták a transzkripció starthelyét és a szabályozásban résztvevő proximális promóter elhelyezkedését. Az alap promóter aktivitásában meghatározó a GC gazdag régió, amely kritikus a transzkripció iniciációjában azoknál a promótereknél, ahol hiányzik a TATA-box, akárcsak az *NCB5OR* gén esetén. Az azonosított transzkripció faktor kötőhelyek (c-Maf, NRSF) a proximális promóter régió belül lokalizálódnak, és szerepük a β -sejtek génregulációjához köthető [102].

Az *Ncb5or* fehérje valamennyi humán szövetben (és humán eredetű sejtvonalakban egyaránt) kifejeződik [98]. Különböző egér szöveteket vizsgálva a legmagasabb expressziós szintek a hasnyálmirigyben, a szívben és a vesében voltak kimutathatók. Ugyanakkor jelentős mennyiségű *Ncb5or* fehérje van jelen a májban, a vázizomban és az agyban is [102].

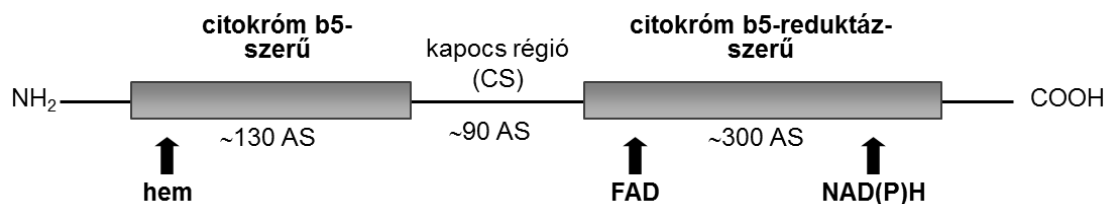
A fehérjéről elsőként megjelent publikációban szubcelluláris lokalizációját is jellemezték. Elhelyezkedését tranziensen transzfektált COS-7 sejtekben, konfokális mikroszkópiával vizsgálták. *Zhu és mtsai* az általuk akkor még b5+b5R fúziós flavohemoproteinnek nevezett fehérje citoszolikus, perinukleáris térhez közeli lokalizációját állapították meg [98]. Öt évvel később ugyanez a munkacsoport a lokalizációra irányuló, újabb eredményeket közölt. Ezúttal szubcelluláris frakcionálást végeztek egér májból, illetve a HepG2 sejtekben endogén, a COS-7 sejtekben pedig exogén módon kifejeződő *Ncb5or* elhelyezkedését fluoreszcens immuncitokémiával vizsgálták. A szubcelluláris frakciók és a mikroszkópos felvételek analízise során az *Ncb5or* kolokalizációját észlelték az ER markerfehérjéjeként használt kalretikulinnal (szolúbilis ER-dajkafhérje) [103], és az irodalom ettől kezdve az *Ncb5or*-t mikroszomális fehérjeként tartja számon.

A citokróm b5-fehérjecsaldában egyedülálló az *Ncb5or* b5-szerű doménjének hemkötő környezete. Ennek röntgen krisztallográfiás módszerrel meghatározott szerkezetében a két hemkötő hisztidin (His^{89} és His^{112}) imidazol gyűrűi közel ortogonális síkban helyezkednek el, szemben a fehérjecsald egyéb ismert tagjaiban észlelt geometriával. Közel ortogonális hisztidin ligandokkal rendelkező hemoproteint a mitokondriális légzési láncban találunk még, a citokróm bc₁ komplex esetén. Az *Ncb5or* b5-szerű doménjének hemkötő régiója kevesebb negatív töltésű aminosavat tartalmaz,

így a klasszikus citokróm b5 fehérjéhez (Cyb5A) képest kevésbé negatív felszín jellemzi [99].

1.3.1. Az Ncb5or doménszerkezete és feltételezett funkciója

Számos olyan természetes fúziós fehérje ismert, amely a b5-szerű domén mellett egy második redox-aktív szerkezeti elemet is tartalmaz. Ilyen enzimek például a szulfid-oxidázok, a $\Delta 5$, $\Delta 6$ zsírsav-deszaturázok, a nitrát-reduktázok algákban és növényekben, a laktát-dehidrogenáz és $\Delta 9$ zsírsav-deszaturáz élesztőben. Az Ncb5or azonban a citokróm b5 enzimes család egyetlen olyan tagja, amelynek szerkezete három, jól elkülönülő doménből áll. A fehérje a mikroszomális citokróm b5 (b5) hemoproteinnel és citokróm b5-reduktáz (b5R) flavoproteinnel homológ doméneket tartalmaz. Az 521 aminosavból álló, 58 kDa nagyságú fehérje N-terminálisán helyezkedik el a b5-szerű domén, amelyet a mintegy 90 aminosav hosszú kapocs régió (CS: CHORD-SGT1) köt össze a fehérje C-terminális b5R-szerű doménjével. A b5 és b5R fehérjékhez hasonlóan az Ncb5or b5-szerű doménje hem, a b5R-szerű domén FAD proszтетikus csoportot tartalmaz, és utóbbi NAD(P)H koenzim kötésére képes. A flavohemoprotein azonban a klasszikus b5R és b5 fehérjékkel ellentétben nem rendelkezik membránhorgonyzó régióval, tehát nem integráns membránfehérjeként, hanem szolubilis formában van jelen a sejtekben [98, 99] (5. ábra).



5. ábra. Az Ncb5or fehérje doménszerkezete. Az 521 aminosav hosszú fehérje N-terminális részén található a hemkötő citokróm b5-szerű domén, C-terminális régiójában a FAD és NAD(P)H kötésére képes citokróm b5-reduktáz-szerű domén helyezkedik el. A két, a mikroszomális Cyb5 (Cyb5A) és Cyb5R (Cyb5R3) fehérjékkel homológ domént a körülbelül 90 aminosavból álló kapocs régió, a CHORD-SGT1 konzervált motívumokat tartalmazó CS domén köt össze ([99] alapján).

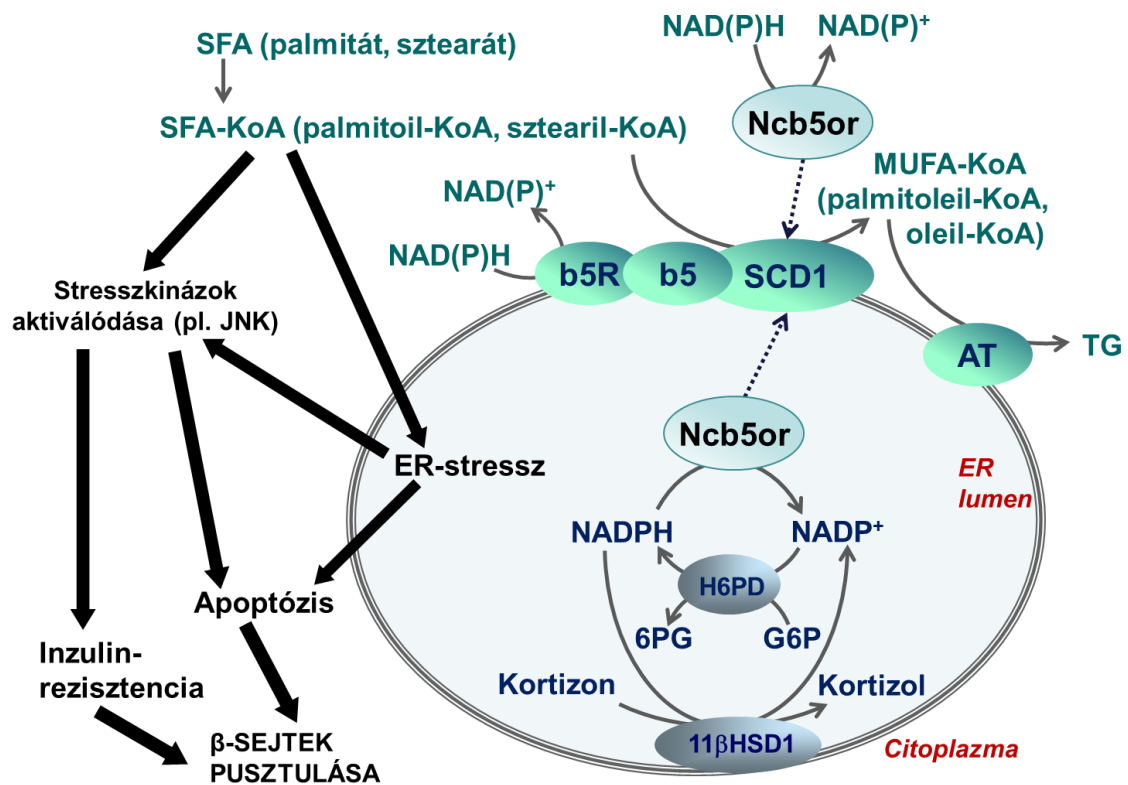
A CS domén (CHORD-SGT1) szekvencia motívumai prokariótákban, eukariótákban egyaránt reprezentáltak, és a különböző fehérjecsaldokban a fehérjeszerkezet stabilitásában és/vagy a fehérje-fehérje kölcsönhatások közvetítésében vesznek részt. A domén távoli homológiáját írták le a humán Hsp20 hő sokkfehérjével, a Hsp90 ko-

chaperonjával [104]. Az Ncb5or fehérje vonatkozásában a redox aktivitással nem rendelkező domén funkciója még nem minden részletében tisztázott. A kapocs régió meghatározó a fúziós fehérje NAD(P)H-oxidoreduktáz aktivitásában. A kapocs régiót nem tartalmazó rekombináns fehérje esetében sem NAD(P)H reduktáz, sem NAD(P)H oxidáz aktivitás nem mérhető *in vitro*, ezért e szekvenciárszletnek fontos szerepe lehet a megfelelő konformáció és a két funkcionális domén közötti elektronáramlás biztosításában a b5- és b5R-szerű domének fizikai közelségének kialakításával. A kapocs régió azonban valószínűleg több mint egyszerű strukturális összekötő elem, az itt található szekvenciárszletek részt vehetnek eddig ismeretlen fehérjékkel történő kölcsönhatásban, eddig még ismeretlen funkciók betöltésében [98].

A rekombináns Ncb5or fehérje abszorpciós spektrumából kiderül, hogy NAD(P)H hozzáadásakor az elektronok b5R-szerű doménon (FAD) keresztül történő transzferével a b5 domén hem prosztetikus csoportja azonnal redukálódik. Kinetikai mérésekkel kimutatták, hogy az egér és humán Ncb5or feleslegben hozzáadott NADH vagy NADPH jelenlétében számos mesterséges szubsztrátot, úgymint a citokróm c-t, methemoglobint, ferricianidot és molekuláris oxigént képes *in vitro* redukálni [98, 103]. A citokróm b5-fehérjecsald egyes tagjainak összehasonlításában az Ncb5or-t hem redox centrumának viszonylag alacsony redox potenciálja ($E_0 = -108$ mV) igen hatékony elektron donorra teszi [103].

In vitro rekonstrukciós kísérletek is jól mutatják, hogy a SCD1 enzim által katalizált reakcióban, vagyis a zsírsav-deszaturáció működésében a mikroszomális citokróm b5 (Cyb5A) és citokróm b5-reduktáz (Cyb5R3) enzimek hatékonyan vesznek részt elektron donorokként [45, 105]. Meglepő módon a Cyb5A génkiütött egerek hepatocitáiban az telítetlen/telített zsírsavak SCD1 működését jelző aránya nem változik meg jelentősen [106]. Ellentétben a fenotípusnak az *NCB5OR* gén kiütése esetén tapasztalt markáns változásaival, amelyeket károsodott SCD1 aktivitás, lipoatrófia és inzulinfüggő diabétesz jellemez [107]. Az eredmények arra utalnak, hogy bár *in vitro* jól demonstrált az ER-membránkötött Cyb5 és Cyb5R fehérjék közreműködése a zsírsav-deszaturációhoz, ez azonban nem jelenti azt, hogy kizárólagos redox partnerei a SCD1 enzimeknek. Alternatív *in vivo* elektronforrás is közreműködhet a $\Delta 9$ deszaturációban, amely funkciót az Ncb5or képes lehet betölteni [108]. A szolubilis Ncb5or fehérjét alkotó egy-egy b5R- és b5-szerű domének jelenléte, azaz a szerkezeti hasonlóság is arra

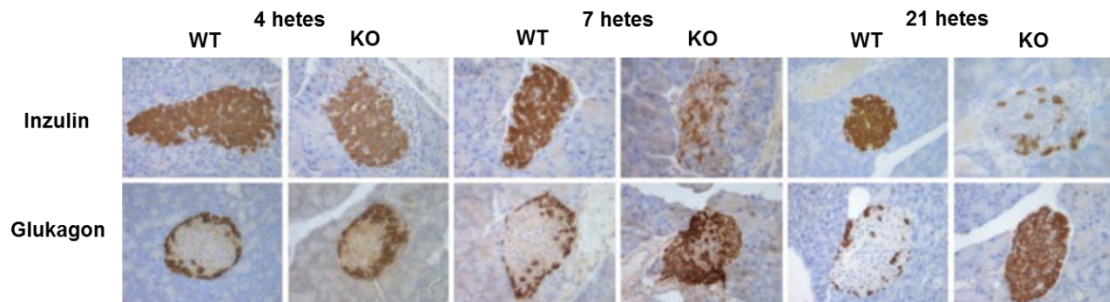
utal, hogy az oxidoreduktáz képes lehet a zsírsav-deszaturáció enzime, az SCD1 számára alternatív elektrondonorként szolgálni *in vivo* [109]. Feltételezett funkciójához kapcsolódóan bizonytalan szubcelluláris lokalizációjának tisztázása elengedhetetlen (6. ábra). Fontos annak megállapítása, hogy az Ncb5or fehérje a citoplazma redox rendszerét használja-e, amely a b5R és b5 enzimek közvetítésével amúgy is táplálja a zsírsav-deszaturációt vagy az ER lumenében elhelyezkedve képes az organelum elzárt NAD(P)H-készletét hozzáférhetővé tenni az SCD1 számára. Az Ncb5or fehérje luminális elhelyezkedése esetén felvetődik az ER-ben zajló glukokortikoid-aktiválódás és a zsírsav-anyagcsere funkcionális kapcsoltságának lehetősége, ami fiziológiás és patológias szempontból egyaránt nagy jelentőséggel bírna.



6. ábra. A telített zsírsavak (SFA) lipotoxikus hatása és az Ncb5or feltételezett funkciója a zsírsav-deszaturációban. Az SCD1 a működéséhez szükséges NAD(P)H-t a citosólból az ER b5R és b5 integráns membránfehérjéi közvetítésével kapja. Az Ncb5or fehérje alternatív elektrondonorként szolgálhat az SCD1 számára. Ha azonban az ER elkülönült NAD(P)H-készletét használja, akkor egyúttal a kortizoltermelést is funkcionálisan összekapcsolja a deszaturációval. A vékony, szürke nyilak átalakulást, a vastag, fekete nyilak a lipotoxicitás mechanizmusát jelölik.

1.3.2. Az *Ncb5or* génkiütött egér jellemzői

Hao Zhu és munkacsoportja *Ncb5or* génkiütött egerek ($NCB5OR^{-/-}$) létrehozásával elsőként jellemezte a fehérje hiányában kialakuló fenotípusos változásokat és az *Ncb5or* lehetséges biológiai szerepét *in vivo*. Egerekben az *NCB5OR* gén célzott inaktivációja nincs hatással a normális embrionális és magzati fejlődésre, valamint nem befolyásolja az embriók életképességét. Az állatok négy hetes korában normál vércukorszint mérhető, de csökkent glukóztolerancia és szérum inzulinszint, valamint az izolált pankreász csökkent *in vitro* inzulinszekrécója figyelhető meg, vagyis prediabetikus állapot alakul ki. Az $NCB5OR^{-/-}$ egerek hét hetes korában hiperglikémia lép fel, háromszor magasabb vércukorszint mérhető jóllakott és éhező állapotban egyaránt a vad típusú egerekhez képest. Inzulintolerancia teszt alapján a szövetek inzulin iránti érzékenysége nem változott. A hisztokémiai vizsgálatokból kiderül, hogy $NCB5OR^{+/+}$ egerekhez hasonlóan az $NCB5OR^{-/-}$ egerek Langerhans-szigeteiben 4 hetes korban még nagy tömegben vannak jelen az inzulinjelöléssel pozitívan festődő, inzulintermelő β -sejtek, amelyeknek száma azonban 6-7 hetes korra drasztikusan lecsökken, és a sejtek elhalása az állatok 21 hetes koráig folyamatos. A β -sejtek ily módon megfigyelt progresszív pusztulása következtében az $NCB5OR^{-/-}$ egerek 4-6-hetes korára tehető az inzulinfüggő diabetes mellitus kialakulása. A β -sejtekben megfigyelhető ultrastrukturális változásokra a kitágult ER-ciszternák és a mitokondriumok méretének és számának jelentős mértékű növekedése jellemző [107, 110, 111]. Az *NCB5OR* gén kiütése a Langerhans-szigetek egyéb endokrin, hormontermelő sejtjeinek életképességére nincs hatással, sőt az α -sejtek nagy arányban reprezentáltak 21 hetes korra a csekély számban megmaradó β -sejtek mellett (7. ábra). A gén kiütése tehát szelektíven okozza a pankreász β -sejtjeinek elhalását. Az $NCB5OR^{+/-}$ heterozigóta egerekre a vad típushoz hasonlóan normál vércukorszint és glukóztolerancia jellemző és a fehér zsírszövet tömege sem változik, ellentétben az $NCB5OR^{-/-}$ egerekkel, ahol a fehér zsírszövet erőteljes csökkenése, lipoatrófia figyelhető meg [107, 110]. Az $NCB5OR^{-/-}$ egerek súlygyarapodása 5 hetes kortól elmarad a vad típushoz képest, a teljes testzsírtartalom sem növekszik, jelentősen alacsonyabb érték mérhető a vad típus összehasonlításában. Az $NCB5OR^{-/-}$ egerek fehér zsírszövetállományának progresszív atrófiája a preparált gonadális zsírszövet méretének jelentős csökkenésében is megfigyelhető [109].



7. ábra. Immunhisztokémia a Langerhans szigetsejtek inzulin- és glukagontermelésére. Az immunhisztokémiai vizsgálat során inzulin és glukagon elleni antitesteket alkalmaztak az NCB5OR^{+/+} és NCB5OR^{-/-} különböző időpontokban izolált pankreász α és β szigetsejteinek jelölésére [107].

A négy hetes, Ncb5or-hiányos állatok β -sejtjei rendkívül érzékenyen reagáltak a streptozotocinkezelésre. A streptozotocin szelektíven halmozódik fel a β -sejtekben, ahol hidrogén-peroxid generálásával és DNS-fragmentáció előidézésével fejt ki toxikus hatását. A streptozotocinnal kezelt NCB5OR^{-/-} egereket súlyosabb β -sejtkárosodás, nagyobb mértékben csökkent glukóztolerancia és jelentősebben emelkedett vércukorszint jellemezte a kezelést nem kapott NCB5OR^{-/-} és a streptozotocinkezelt NCB5OR^{+/+} egerekhez képest. Az *in vivo* megfigyelésekkel összhangban, az NCB5OR^{-/-} β -sejtek is a vad típusúaknál nagyobb mértékű életképesség-csökkenéssel reagáltak az *in vitro* streptozotocinkezelésre [101, 107]. Az 5 hetes egerekből származó NCB5OR^{-/-} β -sejtek különböző glukózkoncentrációval való kezelésekor szignifikánsan magasabb oxidatív stresszválasz és magasabb ROS-képződés volt mérhető [110]. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a flavohem reduktáznak szerepe lehet a β -sejtek oxidatív stressz elleni védelmében.

A fehérje funkciójának pontosabb megismerése céljából vizsgálták, hogy a kialakuló lipoatrófia közvetlenül az Ncb5or-hiány következtében, vagy a megváltozott anyagcsere, a felerősödő katabolikus folyamatok következményeként kíséri a kialakuló cukorbetegséget. Ezen hatások elkülönítésére szigetsejt-transzplantációt végeztek az NCB5OR^{-/-} egerek 6-hetes korában. A génkiütött egerek a sikeres transzplantáció hatására 12 hetes korukban normál vércukorszinttel rendelkeztek, és glukóztolerancia tesztjük is negatív volt. A diabétesz metabolikus hatásainak megszüntetésével azonban a lipoatrófia továbbra is fennállt a szigetsejt-transzplantáción átesett NCB5OR^{-/-} egerekben, amelyekben sikerült a szénhidrát-anyagcsere fiziológias szabályozásának

visszaállítása a prediabétesz stádiumában. Az epididimális fehér zsírszövet csökkenésével összefüggésben rendkívül alacsony leptinszintek mérhetők a vad típushoz képest. A szigetsejt-transzplantációval kapott eredmények alapján az NCB5OR^{-/-} egerekben megfigyelhető lipoatrófia tehát önmagában az enzim hiányának tulajdonítható. Kiderült továbbá, hogy a károsodott zsírsav-deszaturáció valószínűleg nagyban hozzájárul az NCB5OR^{-/-} egerek diabéteszt és lipoatrófiát mutató fenotípusához. Az egyszeresen telítetlen/telített zsírsavak egerek májából meghatározott aránya (palmitoleát/palmitát; oleát/sztearát), valamint ezzel összefüggésbe hozhatóan a triglicerid-, diglicerid-, koleszteril-észter-szint szignifikánsan csökkent a vad típusú májszövet lipidprofiljához képest [109]. A deszaturációs kapacitás csökkenése ellenére a máj SCD1-expressziója jelentősen megemelkedett. Továbbá az NCB5OR^{-/-} primer hepatociták fokozott érzékenységet mutattak palmitátkezeléssel szemben, ami oleátkezelés esetén nem volt megfigyelhető [108, 109, 112].

A prediabétesz stádiumú (4 hetes) Ncb5or génkiütött egerek májában a deszaturációs indexszel jellemzett egyszeresen telítetlen/telített zsírsavak aránya a vad típusú májban mért értékekhez képest szignifikánsan alacsonyabb, és 12 hetes korra a különbség háromszorosra tehető. Microarray analízisből kiderül, hogy prediabétesz stádiumban az NCB5OR^{-/-} májban emelkedik a mitokondriális biogenezisben (PGC-1 α), a zsírsav-deszaturációban (SCD1, SCD2), a zsírsavszintézisben (zsírsav-szintáz), a zsírsavfelvételben (lipoprotein-lipáz), a zsírsavaktivációban (acil-KoA-szintetáz-3), oxidatív stressz válaszbán (GST izoenzimek) és az ER-stressz jelátvitelében (eIF2s1/eIF2 α) szerepet játszó gének expressziója. Fehérjeszinten is kifejezett a PGC-1 α , Scd1 és a foszforilált eIF2 α emelkedett szintje, valamint a máj oxidált glutation (GSSG) tartalma is magasabb, mint a vad típusú szövetben. A máj trigliceridtartalma prediabéteszben (5. hét) és a diabétesz kialakulását követően (12. hét) egyaránt szignifikánsan alacsonyabb. Az alacsony trigliceridtartalommal összefüggésben az azt alkotó zsírsav szubsztituensek közül a telítetlen oleát szintje csökkent szignifikánsan NCB5OR^{-/-} hepatocitákban a vad típushoz képest. A jelenséget Ncb5or hiányában a 16 és 18 C-atomból álló telítetlen/telített zsírsavak csökkent deszaturációs indexe is jól magyarázza.

A NCB5OR^{-/-} egerek fokozott zsírsavérzékenysége abban is kifejeződik, hogy magas zsírtartalmú tápon nevelve őket, a hiperglikémia előbb jelentkezik és vele együtt

a diabétesz is mintegy 1 héttel korábbra tehető, mint a normál tápon tartott génkiütött egerekhez képest. A magas zsírtartalmú diéta hatására az 5 hetes egerek inzulinpozitív β -sejtjeinek száma is szignifikáns csökkenést mutat [110, 111].

Az $NCB5OR^{-/-}$ egerekben megfigyelhető zsírszöveti atrófia és a károsodott zsírsav-deszaturáció nagyfokú hasonlóságot mutat az egerekben az *SCD1* gén kiütése következtében kialakuló fenotípussal [113]. Az *Ncb5or*-génkiütött egerek májának megváltozott lipidmetabolizmusára a fokozott zsírsavfelvétel és -szintézis, ugyanakkor növekvő akkumuláció és zsírsavoxidáció, a zsírsav-deszaturáció csökkent kapacitása és egyaránt csökkent triglicerid-felhalmozás jellemző. Ezek a hatások nagymértékben hasonlítanak az $SCD1^{-/-}$ egerek esetében tapasztalt zsírsavcsere-változásokhoz, így a gén hiánya nagymértékben hasonló biokémia defektust eredményez [108].

1.3.3. Humán *NCB5OR*-variánsok

Az *NCB5OR* gén kiütése következtében az egerekben kialakuló diabétesz ismeretében a humán *NCB5OR* gén variánsait, valamint azok nem autoimmun folyamat eredményeként jelentkező diabétesz típusokkal való asszociációját is vizsgálták. Andersen és munkatársai 22 új *NCB5OR* nukleotid variánst azonosítottak MODY-X típusú diabéteszrel rendelkezők és 2-es típusú, valamint gesztációs diabétesz betegek *NCB5OR* kódoló régiójának (beleértve az intron-exon határokat is) szekvencia analízise során [114]. Speciális diabéteszforma a genetikai eredetű (monogénes öröklésmentű) „felnőtt diabétesz, amely fiataloknál jelentkezik” (MODY) és amelyet egy-egy gén heterozigóta mutációja okoz. Az eddig azonosított mutációk a β -sejtek funkciózavarát, károsodott inzulinszekrúciót eredményeznek. További csoportot alkotnak azok az esetek, amelyeknél nem ismert, hogy mely gén érintettsége következtében alakul ki a β -sejt diszfunkciót eredményező MODY fenotípus (MODY-X) [115].

Az újonnan azonosított *NCB5OR* variánsok eset-kontroll analízise során végzett genotipizálás eredményeként egy esetben (IVS5+7del(CT) variáns) találtak szignifikáns asszociációt 2-es típusú diabéteszrel. Összefüggés azonban nem volt kimutatható a prediabéteszrel és/vagy az elhízással kapcsolatos metabolikus paraméterek között. A gesztációs diabétesz csoportból azonosított Gln187Arg variánst nagyobb gesztációs diabéteszes populációban is genotipizálták, azonban további hordozót nem találtak. Az aminosavcsere okozó variáns a fehérje citokróm b5 és citokróm b5-reduktáz

doménjeit összekötő kapocs régió (CS domén) kódoló szekvenciájában lokalizálódik. A citokróm b5-reduktáz domént érintő His223Arg variáns sem mutatott asszociációt a vizsgált 2-es típusú beteg populációval, amelyhez hozzájárulhat az aminosavcsere neutráliis jellege [114]. A vizsgált polimorfizmusokkal kapcsolatban azonban meg kell jegyezni, hogy e két aminosavcsere eredményező kivétellel intronikus variánsok szerepeltek az elemzésben. Ugyanakkor nem ismert, hogy ezek és további misszensz mutációk milyen hatással vannak az Ncb5or fehérje szerkezetére és funkciójára és ezáltal mennyiben járulhatnak hozzá a diabétesz patomechanizmusához.

Az egyes génavariánsok szerepére irányuló vizsgálatok fontosságát erősíti, hogy teljes genomszűrés során a 6-os kromoszómán, közel az *NCB5OR* lókuszhhoz (6q14.2) mikroszatellita markerek alapján kapcsoltságot találtak a korai életszakaszban kezdődő, nem autoimmun diabétesz fenotípusokkal (MODY-X) [116]. Finn populációban, a 2-es típusú diabéteszes testvéreken és (a betegséggel nem érintett) családtagjaikon elvégzett teljes genom analízist követően szintén kapcsoltságot találtak a 6-os kromoszóma *NCB5OR* régiójához közel a betegséggel összefüggésben [117].

Az egyetlen eredeti közlemény mellett az online adatbázisok is számos információt tartalmaznak az *NCB5OR* gén azonosított szekvenciavariánsairól. Az Ncb5or fehérje funkciójának pontosabb megismeréséhez fontos információkkal szolgálhat az exonikus, aminosavcserevel járó mutációk elemzése, amelyek hatással lehetnek a fehérje szerkezetének kialakulására és stabilitására, valamint fehérje kölcsönhatásaira. A humán Ncb5or esetén ilyen variánsok vizsgálatára vonatkozó tanulmányt még nem közöltek.

2. Célkitűzések

Az újonnan felfedezett természetes fúziós fehérjéről, az Ncb5or-ról doménszerkezete és a génkiütött állatmodelljében tapasztalható fenotípusos változások alapján feltételezhető, hogy közreműködik a zsírsav-deszaturációban, azaz képes lehet redukáló erőt biztosítani a telítetlen zsírsavak szintéziséhez. Tényleges biológiai szerepe kapcsán ugyanakkor számos kérdés még megválaszolatlan. Mindenekelőtt tisztázásra szorul a flavohem reduktáz enzim intracelluláris lokalizációja. Az irodalomban elsőként citoplazmai, majd később ER-ben való elhelyezkedését közölték. Szolubilis fehérjéről lévén szó, az ER-ben való elhelyezkedés csak lumenális lokalizációként értelmezhető. Alapvető jelentőséggel bír annak tisztázása, hogy a mikroszomálisként emlegetett fehérje az ER-membrán melyik oldalán található. ER-beli elhelyezkedése felveti azt a lehetőséget, hogy a zsírsav-deszaturáció lumenális NADPH-t fogyaszt, vagyis összeköttetésben állhat a prereceptorális kortizoltermeléssel is. Az Ncb5or-hiányos egerekben megfigyelt β -sejtpusztulás és diabétesz megalapozza azt a feltételezést, hogy a humán *NCB5OR* gén egyes mutációinak szintén szerepe lehet a diabétesz kialakulásában. Az Ncb5or fehérje hiánya és a diabétesz kialakulása között állatmodellben egyértelműen kimutatott összefüggés ellenére a humán génvariánsok – különösen az exonikus mutációk – lehetséges szerepéről rendkívül kevés adat áll rendelkezésre az irodalomban.

Célul tűztük ki az Ncb5or fehérje szubcelluláris lokalizációjának tisztázását és annak vizsgálatát, hogy a humán *NCB5OR* gén néhány természetes exonikus misszensz mutációja hogyan befolyásolja a fehérje mennyiségét *in vitro* (sejtes) rendszerben. Munkánk során tehát az alábbi vizsgálatokat kívántuk elvégezni:

Az Ncb5or fehérje intracelluláris lokalizációjának tisztázását:

- lokalizációs szignálok keresése a humán Ncb5or ismert aminosav-szekvenciájában és a kapott adatok alapján az elhelyezkedés *in silico* predikciója;
- fluoreszcens Ncb5or-EGFP konstrukció létrehozása és az exogén fúziós fehérje fluoreszcens mikroszkóppal való detektálása transzfektált HEK293T sejtekben;

- az endogén Ncb5or fehérje kimutatása immunoblot módszerrel humán sejtvonalakból, valamint patkány májszövetből preparált szubcelluláris frakciókban;
- az endogén fehérje detektálása fluoreszcens immuncitokémia módszerével humán hepatóma sejtvonalban.

Természetes humán *NCB5OR* misszensz mutációk hatásának vizsgálatát *in vitro* sejtrendszerben:

- az adatbázisokban (a vizsgálat megkezdésekor) rendelkezésre álló szekvenciainformációk alapján a humán *NCB5OR* gén egyes természetesen előforduló, aminosavcserét eredményező variánsainak *in silico* azonosítása;
- az *NCB5OR* gén kiválasztott misszensz mutációit kódoló pcDNA3.1- alapú expressziós konstrukciók létrehozása „overlap extension” mutagenezissel;
- a vad típusú és mutáns variánsok kifejezése transzfektált HEK293T sejtekben, és a fehérjeszintek összehasonlítása Western blot módszerrel;
- a csökkent fehérjeszintet mutató mutáns fehérjevariánsok degradációjának monitorozása Western blot segítségével, valamint a fehérje féléletidejének meghatározásával;
- a természetes mutációk hatásainak további tanulmányozását mesterséges variációk létrehozásával és kifejezésének nyomon követésével;
- a fehérjeszintet befolyásoló mutációk térszerkezetre gyakorolt hatásának modellezését szerkezeti predikciós programok segítségével.

3. Módszerek

3.1. *In silico* analízis

A humán *NCB5OR* gén természetes, aminosav-kicserélődést okozó mutációinak *in silico* keresését (a vizsgálat idejében fellelhető, addig ismert misszensz mutációinak azonosítását), valamint az egyes mutációk fehérjeszerkezetre gyakorolt hatását bioinformatikai módszerekkel vizsgáltuk. Elemeztük továbbá az Ncb5or fehérje szubcelluláris lokalizációját különböző, fehérjeszekvencia alapú predikciós programok segítségével.

3.1.1. Intracelluláris lokalizáció predikciója

A vizsgált fehérje sejten belüli elhelyezkedésének elemzéséhez, előzetes jóslásához hat különböző, az interneten szabadon hozzáférhető, a fehérjék szubcelluláris lokalizációját prediktáló programot és háttéradatbázist használtunk. Ezek egymástól eltérő algoritmusok és kiértékelési metodikák alapján képzik találati listájukat. A predikciós vizsgálatokhoz használt online eszközök adatait a 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. Az Ncb5or fehérje sejten belüli elhelyezkedésének jóslásához használt programok és azok elérhetőségei.

Rövidített név	Teljes név	Website	Hivatkozás
BaCello	Balanced subcellular Localization predictor	http://gpcr2.biocomp.unibo.it/bacello/	[118]
CELLO v.2.5	Subcellular Localization predictor	http://cello.life.nctu.edu.tw/	[119]
eSLDB	Eukaryotic Subcellular Localization DataBase	http://gpcr.biocomp.unibo.it/esldb/	[120]
Euk-mPLOC 2.0	Predicting subcellular localization of eukaryotic proteins including those with multiple sites	http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2	[121]
ProteinProwler	Subcellular Localisation Predictor version 1.2	http://bioinf.scmb.uq.edu.au:8080/pprowler_webapp_1-2	[122]
YLoc	Interpretable Subcellular Localization Prediction	http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi	[123]

3.1.2. Mutációk keresése

Az *NCB5OR* génben található misszensz mutációk azonosítását az NCBI SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) és az 1000 Genom (<http://www.1000genomes.org/>) adatbázisokból végeztük. A génhez kapcsolódó szekvencia adatokat szintén az NCBI génbankjából töltöttük le.

3.1.3. Fehérje térszerkezetének predikciója

A vad típusú humán Ncb5or fehérje b5 doménjének háromdimenziós szerkezetét a PDB (Protein Data Bank) adatbázisából (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3LF5>) nyertük. A vizsgált mutációk fehérjeszerkezetre gyakorolt hatását az I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) online elérhető, fehérjeszerkezet-jósló program segítségével elemeztük és a DeepView/Swiss-Pdb Viewer version 4.0.2 (www.expasy.org/spdbv/) program segítségével jelenítettük meg.

3.2. RNS-izolálás, cDNS-szintézis

A génextpressziós vizsgálatokhoz HEK293T és HepG2 sejtekből RNAqueous[®] - 4PCR kit (Ambion) segítségével össz RNS-t izoláltunk a gyártó utasításai szerint. Az esetleges DNS szennyeződést DN-ázos emésztéssel elimináltuk. A tisztított RNS-ek minőségéről agaróz gélelektroforézissel (1,5% agaróz gél, 1x TAE elektroforézis pufferben) győződünk meg, koncentrációjukat NanoDrop spektrofotométer segítségével mértük. A reverz transzkripció során 0,2-0,5 µg RNS-t használtunk. A cDNS-szintézis random primerrel, SMART High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies) felhasználásával történt.

3.3. RT-PCR, qPCR

A szemi-kvantitatív PCR során a cDNS-ből az *NCB5OR* mRNS-re specifikus, 267 bp hosszúságú szakasz sokszorosítását az *NCB5OR* sense (5' - ATG AAC TAA TGA GAG CAG CAG - 3') és az *NCB5OR* antisense (5' - TGG CAA TGG TGA CTA AAG AG - 3') primerekkel végeztük. A PCR reakciókat HotStarTaq DNA-polymerase

kit (Qiagen, Valencia, CA) segítségével állítottuk össze, és az alábbi termociklust alkalmaztuk. A ciklus 95 °C-on 15 percig tartó elődenaturációval kezdődött, amely során a HotStarTaq polimeráz enzim is aktiválódott. Ezután 28 ciklus következett, ciklusonként három lépéssel: denaturálás (94 °C, 30 sec), anneálás (50 °C, 30 sec), és extenzió 72 °C, 1 perc. A végső extenzió 72 °C-on 10 percig tartott a PCR utolsó lépéseként, majd a mintákat a gép 8 °C-ra hűtötte le a felhasználásig, illetve a -20 °C-on történő tárolásig. Kontroll génként a humán *GAPDH* (glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz) 261 nukleotid hosszúságú szakaszát sokszorosítottuk fel a *GAPDH* sense 5' - GTC CAC TGG CGT CTT CAC CA - 3' és a *GAPDH* antisense 5'- GTG GCA GTG ATG GCA TGG AC -3' primerek használatával. E kontroll gén esetében Harper és munkatársai által kidolgozott ún. pszeudogénmentes amplifikációs körülményeket alkalmaztunk [124].

A kvantitatív génexpressziós vizsgálatokat real-time PCR (qPCR) segítségével és az *NCB5OR* (Hs00953391_m1), illetve a referencia génként alkalmazott *GAPDH* (Hs99999905_m1) specifikus TaqMan[®] próbák (Life Technologies) és primerek alkalmazásával végeztük el. A qPCR 15 µl-es végtérfogatban zajlott, a reakcióelegy a következő komponenseket tartalmazta: 1× ABI PCR Master Mix (AmpliAq Gold[®] DNS Polimeráz, UNG: uracil-N-glikoziláz, dNTP Mix dUTP-vel, TaqMan PCR Puffer és MgCl₂), 1× *NCB5OR*, illetve *GAPDH* specifikus TaqMan[®] próba és primerek, valamint 3 µL cDNS. Az amplifikáció és a detektálás ABI 7300 Real-Time PCR készülékben zajlott (Life Technologies), a termociklus 10 perces denaturációval kezdődött 95 °C-on. Ezután 40, két lépésből álló ciklus követte egymást: 15 másodpercig 95 °C majd 1 percig 60 °C. A génexpressziós méréseket három független biológiai kísérlet sorozat cDNS mintáin is elvégeztük, valamint a qPCR reakciót háromszori ismétlésben mértük össze az egyes templátokból. Negatív kontroll esetén „templátként” RN-ázmentes vizet használtunk. A küszöb-ciklusszámot (C_T) a 7300 System Sequence Detection Software 1.3 segítségével úgy határoztuk meg, hogy a PCR exponenciális fázisába essen, ahol a fluoreszcens jel arányos a kiindulási DNS mennyiségével. A relatív génexpresszió számításához a $2^{-\Delta\Delta C_T}$ módszert alkalmaztuk, melyhez elsőként a transzfektált és kontroll minták mindegyikénél a vizsgált gén (*NCB5OR*) és a referencia gén (*GAPDH*) C_T értékeit a három ismétlés átlagával határoztuk meg. A normalizálást a vizsgálni kívánt gén C_T értékéből a referencia gén C_T értékének kivonásával (ΔC_T) vé-

geztük el. A $\Delta\Delta C_T$ értékek megadása a következő képlet szerint történt: ΔC_T (vizsgált gén a transzfektált mintákban) - ΔC_T (kontroll, transzfektálatlan minta).

Az Ncb5or különböző variánsait kifejező plazmidokkal transzfektált minták qPCR analízise fokozott körültekintést igényelt. Mivel a sejtek rendelkeznek endogén Ncb5or expresszióval, valamint az expressziós vektorok szintén intron nélküli géneket tartalmaznak, a fals eredmény elkerülése végett több normalizációs lépésre is szükség volt. A transzfektált minták esetén tapasztalt NCB5OR-specifikus jelből egyrészt levontuk az endogén NCB5OR mRNS-nek megfelelő jelet. Ezen kívül az RNS mintákat még a cDNS-szintézis előtt erőteljes DN-ázos emésztésnek vetettük alá, mellyel az esetleges plazmidszennyeződésektől tudtunk megszabadulni. Ennek sikerességét kontroll mérésekkel ellenőriztük. Az így előkezelt és módosított NCB5OR-specifikus jelet normalizáltuk GAPDH-ra a fent leírt módon.

3.4. PCR-termékek elválasztása gélelektroforézissel

Az amplifikációk során kapott fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel választottuk el. A PCR-termékek méretétől függően 1-2,5%-os agaróz géleket futtattunk, amelyek 0,5 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban etídium-bromidot tartalmaztak. Az elektroforézis 1x TAE pufferrel (10 mM Tris-acetát pH = 8,5; 2mM Na₂EDTA) feltöltött futtatókádban történt 110 V feszültség alatt 1 órán át. A fragmentumok megjelenítése UV fény megvilágítással, BioRad GelDoc 1000 gél dokumentációs rendszerrel történt.

3.5. Expressziós vektor készítése

3.5.1. Fúziós-fehérjét kifejező vektor előállítása

Az Ncb5or fehérje lokalizációjának fluoreszcens mikroszkóppal történő vizsgálatához egy Ncb5or-GFP fúziós fehérje termeltetéséhez szükséges plazmid konstrukciót hoztunk létre. Elsőként a célfehérjét kódoló génszakasz amplifikálását végeztük az alábbi két primer segítségével: NCB5OR_XhoI sense 5' - AAA TTT CTC GAG GGG TTT GAA GAT GCT GAA C - 3', NCB5OR_HindIII antisense 5' - AAA TTT AAG CTT TGC TGT AAA ACT ATG GAT CTC - 3'. A sense primer az XhoI, az antisense a HindIII restrikciós endonukleáz hasítóhelyét tartalmazza. Pozíciójukat a szekvencia

aláhúzott része jelzi. Templátként HepG2 sejtekből, RNS-izolálást követő reverz transzkripcióval nyert cDNS szolgált. A PCR után a keletkezett terméket 1%-os agaróz gélelektroforézissel tettük láthatóvá, majd gélből oszlopon tisztítottuk a gyártó protokollja alapján (PureLink Quick Gel Extraction and Combo Kit, Invitrogen). Ezt követően a tisztított inszertet és a gyári p.EGFP-N1 (Clontech) vektort *XhoI* és *HindIII* FastDigest (Fermentas) restrikciós endonukleázokkal emésztettük 37 °C-on 20 percig. Az emésztést követően, újbóli gélelektroforézis segítségével választottuk el az emésztett termékeket, kontrollként emésztetlen PCR-termék és plazmid futtatása mellett. A DNS-ek oszlopon végzett tisztítását követően a létrehozott ragadós végű inszertet és plazmidot egy éjszakán át 4 °C-on ligáltuk 5 U/μl T4 ligáz enzimmal (Fermentas) 10 μl ösztérfogatban. A ligátumot (5 μl) XL10-Gold ultrakompetens sejtekbe (50 μl, Agilent Technologies) transzformáltuk az alábbiak szerint. A -80 °C-ról kiolvasztott kompetens sejteket, a hozzájuk adott ligátumot és 4 V/V% merkaptotetanolt tartalmazó elegyet 20 percig jégen tartottuk, majd a transzformálást 42 °C-os, 30 másodpercig tartó hősokkal végeztük. Újbóli 2-perces jégen való inkubációt követően 200 μl gyári SOC oldatot pipettáztunk a baktériumszuszpenzióhoz, majd 220 rpm-en 1 órán át 37 °C-os termosztátban rázattuk. Az inkubáció elteltével kanamicintartalmú szilárd LB táptalajra szélesztettük a baktériumszuszpenziót, a lemezt pedig egy éjszakán át 37 °C-os légtermosztátban inkubáltuk. A különálló kolóniákat tartalmazó lemezekről egy-egy telepet kanamicin tartalmú folyékony LB tápoldatba oltottunk le. A konstrukció termelődését követően PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) segítségével izoláltuk a plazmidot. Az inszert beépüléséről és a bázissorrend helyességéről szekvenálással (Macrogen, Hollandia) győződünk meg. Nagyobb mennyiségű plazmidot Qiagen Plasmid Midi Kit segítségével tisztítottuk, és a preparátumokat -20 °C-on tároltuk a későbbi felhasználásig.

3.5.2. *Ncb5or* expressziós vektor konstrukciók készítése „overlap extension PCR” módszerrel

Az *Ncb5or* fehérje kifejeződését *in vitro* sejtes rendszerben vizsgáltuk. Az ehhez szükséges konstrukciókat a pcDNA3.1- eukarióta expressziós vektor segítségével hoztuk létre. A vad típusú *Ncb5or* klónozásához HepG2 sejtekből RNS-t izoláltunk, és ebből készítettük el a templátként szolgáló cDNS-t. A génszakasz amplifikálását az alábbi, *XhoI* és *HindIII* hasítóhelyet hordozó primerek segítségével végeztük:

NCB5OR_XhoI sense 5' - AAA TTT CTC GAG GGG TTT GAA GAT GCT GAA C - 3', NCB5OR_HindIII antisense 5' - AAA TTT AAG CTT GTT GAA TAA AGG ACA ATG ACA G - 3'. (A restrikciós endonukleáz hasítási helyét a szekvenciában aláhúzás jelöli.) Az Ncb5or misszensz mutációt tartalmazó variánsait (lásd 5.2.2. fejezet) kódoló konstruktokat (p.E87G, p.E93G, p.E118A, p.R140H, p.N249S, p.E87G_p.E93G, p.E87Q, p.E93Q) a vad típusú expressziós vektorból kiindulva, PCR-alapú, ún. „overlap extension” mutagenezissel hoztuk létre. A módszer során a létrehozni kívánt mutáció környékére az eredeti DNS-sel komplementer sense és antisense primereket terveztünk, melyek csupán egyetlen (a mutációt jelentő) nukleotidban tértek el a vad típusú szekvenciától. A hét, mutagén primerpár szekvenciája és jellemzői a 2. táblázatban összefoglalva megtalálhatók. A mutagén primerekkel kétlépéses PCR reakciót végeztünk iProof High-Fidelity DNS-polimeráz segítségével (Bio-Rad). Az első PCR reakciók során a mutagén és a klónozó primer segítségével külön reakcióban amplifikáltuk a gén 5' és 3' részét. A mutagén primereknek köszönhetően az így képződött termékek már hordozzák a létrehozni kívánt mutációt, valamint – szintén a mutagén primer okán – egy rövid, egymással átfedő régiót is. Ennek megfelelően a második PCR reakcióban az 5' és 3' génszakasz együttesen szolgált mintaként. Az átfedő szakasz miatt a mutációt is tartalmazó teljes gén felsokszorozható a klónozáshoz használt, ún. külső primerek segítségével (lásd feljebb).

A vad típus, valamint a p.E87G és a p.E93G variánsok esetében elkészítettük a Glu-Glu epitóp címkével ellátott változatokat is. Ennek a glutamát gazdag jelölésnek előnye egyfelől a kiváló immundetektálhatóság, másfelől hogy a címke segítségével könnyen elkülöníthető a plazmidról kifejeződő fehérje az endogén expressziótól. A konstrukciókat a fentebb már részletesen ismertetett „overlap PCR extension” módszerrel készítettük el a 2. táblázatban feltüntetett Glu-Glu specifikus mutagén primerek segítségével. Az elkészült PCR-termékek vektorba klónozása a 4.5.1 fejezetben leírtakal megegyezően történt.

2. táblázat: A mutagenézishez használt primerpárok és jellemzőik. A táblázat tartalmazza a mutagén primerek nevét, az általuk létrehozott bázis- és aminosavcserét, szekvenciájukat és a számított T_m értékeket. A szekvenciában a cserélni kívánt nukleotid pozícióját aláhúzott, dőlt betű mutatja. A primerek nevében a szám a mutáció által érintett aminosav helyét jelöli, a szám előtt az eredeti aminosavat, a szám mögött az eredetit cserélő aminosav betűjelzése található.

E: glutamát, **G:** glicin, **A:** alanin, **R:** arginin, **H:** hisztidin, **N:** aszparagin, **S:** szerin, **Q:** glutamin. A primerek nevének végén az S: sense primer, az AS: antisense primer.

Primer név	Aminosav cseré	Bázis cseré	Szekvencia (5'→3')	T_m (°C)
E87G_S	E→G	A→G	GCC TTA TAT <u>GGG</u> GTA TCA TCC T	53,0
E87G_AS		T→C	AGG ATG ATA <u>C</u> C CAT ATA AGG C	
E93G_S	E→G	A→G	CCT GGT GGA <u>GGA</u> GAT GAA CTA	54,4
E93G_AS		T→C	TAG TTC ATC <u>T</u> C TCC ACC AGG	
E118A_S	E→A	A→C	GTC AAT TAT <u>GCA</u> TCC ATG CTG	50,5
E118A_AS		T→G	CAG CAT GGA <u>T</u> G ATA ATT GAC	
R140H_S	R→H	G→A	AAA GAC TAT <u>CA</u> T GAG GAG GAA	48,5
R140H_AS		C→T	TTC CTC CTC <u>A</u> TG ATA GTC TTT	
N249S_S	N→S	A→G	CAA AAA AAA GAG <u>AG</u> TA CTT CTT GG	50,6
N249S_AS		T→C	CCA AGA AGT <u>A</u> CT CTC TTT TTT TTG	
E87Q_S	E→Q	G→C	GCC TTA TAT <u>GCA</u> GTA TCA TCC T	51,1
E87Q_AS		C→G	AGG ATG ATA <u>CTG</u> CAT ATA AGG C	
E93Q_S	E→Q	G→C	CCT GGT GGA <u>CAA</u> GAT GAA CTA	52,4
E93Q_AS		C→G	TAG TTC ATC <u>TTG</u> TCC ACC AGG	
Ncb5or_GluGlu tag				
GluGlu_S	<u>GAA TAT ATG CCT ATG GAA</u> TAA TGA AGA GCT GTC ATT GTC CTT			52,3
GluGlu_AS	<u>TTC CAT AGG CAT ATA TTC</u> TGC TGT AAA ACT ATG GAT CTC ATT			50,6

3.6. Sejtes rendszerek

3.6.1. Sejtvonalak

Kísérleteink során humán embrionális fibroblaszt (HEK293T) és humán hepatóma (HepG2) sejtvonalat használtunk. A sejtkultúrák tenyésztését 10% FBS-sel (magzati borjúsérum), 1% antibiotikum/antimikotikum oldattal (100 egység/ml penicillin, 100 µg/ml sztreptomycin, 0,25 µg/ml amfotericin B) kiegészített és 4,5 g/l D-glükózt és L-glutamint tartalmazó DMEM médiumban végeztük 37 °C-on, 5%-os CO₂-koncentráció mellett. A sejtenyésztéshez használt anyagokat a Thermo Fisher Scientific cégtől szereztük be.

3.6.2. Patkány májszövet

Kísérleteinkhez egy éjszakán át éheztetett, hím Wistar patkányok máját is felhasználtuk. Dekapitálást követően hosszanti bemetszést ejtettünk a hasfalra és a peritoneumon, majd mindkét izolált májlebenset kimetszettük és felhasználásukig fiziológiai sóoldatba tettük. A májszövetből a 3.6.5. fejezetben leírtak szerint sejtfrakciókat izoláltunk.

3.6.3. *Tranziens transzfecció*

A HEK293T és HepG2 sejteket kb. 6×10^5 , illetve 5×10^5 sejt/well arányban osztottuk szét 6-, valamint 12-lyukú lemezre 24 órával a transzfecciót megelőzően. A HEK293T sejtvonal tranziens transzfeccióját Lipofectamine[®] 2000 reagenssel (Invitrogen) végeztük a gyártó protokollja alapján. A transzfecció hatékonyságát zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) kifejező plazmid használatával fluoreszcens mikroszkópos vizsgálattal ellenőriztük. A HEK293T esetén a transzfecció minden alkalommal minimum 80%-os hatékonyságú volt. A technikailag nehezebben transzfecciózható HepG2 sejtek esetében az ExGen 500 (Fermentas) reagenst alkalmaztuk a gyártó utasításai alapján. E sejtvonal esetén a transzfecció hatékonyságát 50% körülre mértük.

Az Ncb5or expressziójának transzfecciót követő dinamikáját Western blot-tal vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a transzfecció után mindössze négy órával a fehérje szintje már jól detektálható. A termelődő fehérje mennyisége a transzfecciót követő 36 és 48 óra között éri el a maximumát, majd lassú csökkenést mutat, azonban még három

nap elteltével is jelentős kifejeződés detektálható. Mindezek alapján a sejtek begyűjtését általában 36 órával a transzfekciót követően végeztük el.

A fehérjestabilitás és proteaszómális degradáció vizsgálata során a transzfekciót követően 12 órával médiumcserét végeztünk, és a friss médium tartalmazta a translációgátló cikloheximid (50 µg/ml) vagy a kétféle proteaszómainhibitor, az MG132 (2 µM) vagy a laktacisztin (5 µM) egyikét. A különböző inhibitorokkal 1, 2, 4 és 24 órán keresztül kezeltük a sejteket. Minden kísérleti összeállításnál alkalmaztunk egy nem transzfektált, valamint GFP expressziós vektorral transzfektált kontroll kísérleti pontot.

3.6.4. *Sejtek begyűjtése, feltárása*

A transzfekció, illetve a kezelési idő lejárta után a médiumot leszívtuk, a sejteket kétszer mostuk 1ml PBS-ben, majd 100-150 µl gyári lízis pufferben (Promega) gyűjtöttük be őket mikrocentrifuga csövekbe. Időnkénti vortexelés mellett, 15 perc szobahőmérségleten történő inkubálás után a mintákat 5 percig, 13 000 rpm-en 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszót felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

A natív p.EGFP-NCB5OR fehérje fluoreszcenciájának vizsgálata során a transzfekciót követő sejtfeltárást háromszori, 15 másodpercig történő fagyasztás (folyékony nitrogénben) - olvasztás (37 °C-on) ciklussal végeztük.

A sejt-lizátumok fehérjekoncentrációját Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) segítségével, marha-szérumalbumin standarddal határoztuk meg.

3.6.5. *Sejtfrakciók készítése ultracentrifugálással*

A különböző szubcelluláris sejtfrakciók (sejtmag, mitokondrium, mikroszóma és citoplazma) differenciál-centrifugálással történő elválasztását mind HEK293T és HepG2 sejteken, mind patkány májszövetből elvégeztük. A posztmitokondriális felülúszóból ultracentrifugálással ülepedő mikroszóma frakció valójában mesterséges vezikulumokból áll. E vezikulumok membránja – sejt-, illetve szövettípustól függően eltérő arányban ugyan – mégis leginkább az ER-ből és a plazmamembránból származik. A sajátosan nagy mennyiségű plazmamembránt (pl. mielin) tartalmazó idegszövettől eltekintve a mikroszómában az ER-ből keletkezett vezikulumok dominálnak. Májszövet esetén a mikroszóma 90-95%-a ebből az organelumból származik, ezért a

májmikroszóma az ER vizsgálatának kiterjedten alkalmazott *in vitro* modellje. Ráadásul többszörösen bebizonyított és általánosan elfogadott tény, hogy a feltárás során a mikroszomális vezikulumok megtartják eredeti orientációjukat, és az intravezikuláris tér az eredeti organelum luminális kompartmentjének felel meg.

3.6.5.1. Szubcelluláris frakciók készítése HEK293T és HepG2 sejtekből

A 10 cm-es Petri-csészében tenyésztett sejteket PBS-sel végzett kétszeri mosást követően, 1 ml PBS-ben az erre a célra használt kaparó eszközzel („scrapper”) mechanikusan felszedtük a lemez aljáról. A sejtmembránokat Dounce homogenizátorban roncsoltuk szét, majd az így nyert sejthomogenizátum összetevőit többlépéses differenciál-centrifugálással választottuk különálló frakciókra. Az első lépéssel (800 x g, 2 perc, 4 °C) megszabadultunk az inhomogén sejtörmeléktől, és a különböző sejtalkotókat tartalmazó felülúszóval dolgoztunk tovább. A második centrifugálás (1000 x g, 10 perc, 4 °C) során ülepedett ki a sejtmagi frakció. A felülúszó újabb centrifugálásakor (11 000 x g, 20 perc, 4 °C) a mitokondriális fázis került a pelletbe. Utolsó lépésben a „posztmitokondriális” felülúszót ultracentrifugáltuk (100 000 x g, 60 perc, 4 °C), így elválasztva a kiülepedő mikroszomális frakciót a felülúszóként megmaradt citoszolikus frakciótól. Az így előállított, pelletbe került sejtfrakciókat egyaránt 1 ml PBS-ben szuszpendáltuk és 4 °C-on tároltuk. A preparált szubcelluláris frakciók „tisztaságát” a sejtmag, mitokondrium, citoszól és ER egy-egy általunk választott specifikus markerfehérjéjének Western blottal történő kimutatásával ellenőriztük.

3.6.5.2. Szubcelluláris frakciók készítése patkány májszövetből

A differenciál-centrifugálást patkány máj homogenizátumból is elvégeztük. Az eltávolított máj egy darabját (kb. 1 cm x 1 cm) szacharóz-HEPES puffer oldatban (0,3 M szacharóz, 20 mM HEPES, pH 7,0), Potter-Elvehjem készülék segítségével homogenizáltuk. A kapott szuszpenziót ugyanebben a szacharóz-HEPES pufferben ötszöröse hígítottuk és a sejteknél alkalmazott és az előző fejezetben leírt centrifugálási lépéseket hajtottuk végre. A kapott pelleteket a felülúszóval megegyező térfogatú MOPS-KCl pufferben (100 mM KCl, 20 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM MOPS, pH 7,2) szuszpendáltuk. A sejtfrakciókat rendszerint frissen használtuk fel, de későbbi

vizsgálatok céljából folyékony nitrogénben is fagyasztottunk és tároltuk belőlük mintákat.

A preparált szubcelluláris frakciók „tisztaságát” a sejtmag, mitokondrium, citoszól és ER egy-egy általunk választott specifikus markerfehérjéjének Western blottal történő kimutatásával ellenőriztük.

3.6.6. Western blot

A sejtekből készített fehérjelizátumok koncentrációjának meghatározása után 50 µg fehérjét tartalmazó minták elválasztását végeztük 10-12%-os gélen SDS-PAGE módszerrel. A mintákhoz futtatás előtt 2x SDS DTT mintapuffert adtunk, és 95 °C-on, 5 percig inkubáltuk őket. Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérjeminták SDS-poliakrilamid gélen történő futtatásakor a mintaelőkészítés során nem alkalmaztunk DTT-t, illetve hődenaturálást. A gélfuttatást 1x Laemmli futtató pufferrel végeztük festett fehérje-marker alkalmazásával. A géleken elválasztott fehérjéket PVDF membránra (Millipore, Billerica, MA) blottoltuk Bio-Rad transzfer egységgel. A membránok blokkolását 5% (m/v) zsírszegény tejport és 0,05% Tween 20-at tartalmazó PBS oldatban (PBST) végeztük szobahőmérsékleten, 1 órán át billegtetve. Ezt követően az elsődleges antitestekkel egy éjszakán át, 4 °C-on inkubáltuk a membránokat, majd PBST pufferben történő háromszor 10 perces mosást követően a HRP-konjugált másodlagos antitesteket 1 órán át szobahőmérsékleten alkalmaztuk.

Az egyes fehérjék és a Glu-Glu jelölő címke detektálásához felhasznált elsődleges antitestek és hígításaik a következők voltak: humán és patkány Ncb5or elleni poliklonális kecskeantitest, 1:1000 (Santa Cruz, sc-68684); humán Ncb5or elleni monoklonális egérantitest, 1:2000 (Santa Cruz, sc-100529); β-aktin elleni HRP-konjugált poliklonális kecskeantitest, 1:2000 (Santa Cruz, sc-1616); Glu-Glu címke elleni HRP-konjugált poliklonális kecskeantitest, 1:2000 (Abcam, Cambridge, MA; ab1267-100). Az MG132 és laktacisztin proteaszómagátlók hatékony koncentrációjának megállapítását a degradációra ítélt fehérjék ubikvitinre specifikus poliklonális antitesttel (Santa Cruz, sc-9133) történő kimutatásával végeztük 1:5000-es hígításban.

A differenciál-centrifugálást követően az egyes sejt- és szövetfrakciók tisztaságának ellenőrzését különböző organellummarker fehérjék segítségével végeztük a megadott hígításban: CREB1 elleni monoklonális egér, 1:2000 (Santa Cruz, sc271);

Lamin A/C elleni monoklonális egér, 1:1000 (Cell Signaling, 4777); Bcl-X_L elleni monoklonális egér, 1:1000 (Santa Cruz, sc-8392); Cyclophilin D elleni monoklonális egér, 1:1000 (MitoSciences, MSA04); PDI elleni poliklonális nyúl, 1: 4000 (Santa Cruz, sc-20132); prokaspáz-3 elleni monoklonális egér, 1:4000 (Santa Cruz, sc7272); GAPDH elleni monoklonális egér (Santa Cruz, 6C5), 1:20000 antitesteket használtuk. A fluorimetriás NAD(P)H-mérést megelőzően a mikroszomális SCD1 enzim jelenlétének ellenőrzését az SCD1 elleni monoklonális egérantitesttel, 1:4000-es hígításban végeztük. A másodlagos antitesteket 1:2000-1:5000-es hígításban használtuk, amelyek a következők voltak: kecskében termeltetett nyúl-ellenes IgG-HRP (Cell Signaling 7074S); lóban termeltetett egér ellenes IgG-HRP (Cell Signaling 7076S) és számban termeltetett kecske ellenes IgG-HRP (Santa Cruz cs-2020).

A másodlagos HRP-konjugált antitestek alkalmazása után újabb mosási lépéseket követően a detektálást kemilumineszcens technikával, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) elnevezésű gyári kit segítségével végeztük. A specifikus csíkokat denzitometriával értékeltük ki ImageQuant 5.2 program segítségével. Az értékeket β -aktinra normalizáltuk és az eredményeket relatív denzitásként tüntettük fel.

3.6.7. Mikroszomális NAD(P)H fluoreszcens detektálása

Az intakt patkány mikroszóma endogén redukált piridin-dinukleotidjait, illetve ezek szintjének változását fluorimetriával detektáltuk 1 mg/ml fehérjekoncentráció mellett MOPS-KCl pufferben. A NAD(P)H-specifikus fluoreszcenciát valós időben, 340 nm excitációs és 460 nm emissziós hullámhosszok alkalmazásával, Cary Eclipse spektrofluoriméter (Varian, Woburn, MA) segítségével mértük. A luminális piridin-dinukleotidkészlet oxidációját metiraponnal (5 μ M), redukcióját pedig glukóz-6-foszfáttal (100 μ M) váltottuk ki. A sztearoil-KoA-t e kísérletekben a membrán-permeabilizáló hatás [71] elkerülése céljából 100 μ M-nál kisebb (10 és 50 μ M) koncentrációban használtuk.

3.6.8. Impulzus jelölés / izotóphígítás kísérletek

A vad típusú és a p.E87G mutációt tartalmazó Ncb5or fehérjék intracelluláris degradációjának nyomon követésére az ún. „pulse-chase” jelölést alkalmaztuk.

A fehérjék féléletidejének meghatározásához HEK293T sejteket transzfektáltunk e két fehérjét expresszáló plazmid konstrukcióval. A sejteket 36 órával a transzfekciót követően 45 percig metionin- és cisztein-mentes médiumban tartottuk, majd 100 μCi ^{35}S -Tran-jelölt (MP Biomedicals) [^{35}S] metioninnal és [^{35}S] ciszteinnel kezeltük 1 órán át. Ezt követően a médiumot eltávolítottuk, a sejteket hűtött PBS-sel kétszer mostuk, majd már jelöletlen metionint és ciszteint tartalmazó (2 mM végkoncentrációban) DMEM-re cseréltük. A (6 cm átmérőjű Petri csészében növény) sejtek lízisét különböző időpontokban (0, 1, 3 és 22 óra elteltével) végeztük PBS-es mosást követően 1 ml NP-40 lízis pufferben (0,15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1% NP-40, 0,2% Na-deoxikolát). Feltárás után a sejtízátumot asztali centrifugával maximális fordulaton, 5 percig 4 °C-on centrifugáltuk a sejtörmelék eltávolítása érdekében. A radioaktívan jelölt vad típusú és p.E87G Ncb5or fehérjéket immunprecipitációval, az Ncb5or elleni monoklonális egérantitest (Santa Cruz, sc-100529) és Protein-A sepharose (Sigma) gyöngyök segítségével kötöttük ki a teljes sejtízátumból. Az immunkomplexhez kötött gyöngyöket ezután háromszor mostuk NP-40 mosó pufferben (0,4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1% NP-40, 0,2% Na-deoxikolát), majd SDS-mintapufferben eluáltuk. A fehérjék szeparálását 10%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük. A kapott gélt szárítás után kazettába tettük és foszfo-screen segítségével 24 órán keresztül exponáltuk, majd Typhoon Phosphoimager (Amersham Biosciences) segítségével hívtuk elő. A relatív radioaktivitás természetes alapú logaritmusát az egyes vizsgált időpontok függvényében ábrázoltuk, a fehérjedegradáció sebességi állandóját pedig lineáris regresszió segítségével állapítottuk meg. A fehérje féléletidejének meghatározása a $t_{1/2} = \ln(2)/k$ képlet szerint történt.

3.7. Mikroszkópos vizsgálatok

3.7.1. Fluoreszcens mikroszkópia

Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje intracelluláris expresszióját 48 órával a p.EGFP-NCB5OR plazmid HEK293T sejtekbe történő transzfekciója után fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A transzfekciót követően a sejtekről eltávolítottuk a médiumot, majd háromszor PBS-sel mostuk őket. A sejteket 3,7%-os formaldehid oldattal 10 percig, szobahőmérsékleten fixáltuk majd újbóli háromszori mosást

végeztünk. A már fixált sejteket 0,2%-os Triton X-100-at tartalmazó PBS oldattal permeabilizáltuk 5 percig, amelyet újbóli PBS-sel végzett mosási lépés követett. A sejtmagok festéséhez 4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI) oldatban (2 µg/ml) inkubáltuk a sejteket 5 percig. PBS-sel végzett háromszoros mosás után a sejteket PBS oldatban hagytuk. Az ER jelölésére BODIPYTM TR-X thapsigargin (1 µM) (Invitrogen) oldatot használtunk, amelyet közvetlenül a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat előtt adtuk hozzá a sejtekhez. A fluoreszcens felvételeket Leica DMI6000B (DFCU80 kamera) mikroszkóppal készítettük.

3.7.2. Immuncitokémia

Az endogén Ncb5or szubcelluláris elhelyezkedését HepG2 sejteken vizsgáltuk fluoreszcens immuncitokémia segítségével. A sejteket mikroszkópos tárgylemezre növesztettük a sejtuszpenzió kicseppentésétől számított 6 órán keresztül ún. nedves kamrában 37 °C-on, 5%-os CO₂-koncentráció mellett. A médium PBS-sel történő mosása után a sejteket metanol-aceton 1:1 arányú keverékében fixáltuk 10 percig szobahőmérsékleten. PBS-sel történő, háromszori, egyenként 5 percig tartómosást követően a lemezeket DAKO Serum free protein blocking oldattal (X0909; DAKO, Glostrup Denmark) blokkoltuk és permeabilizáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. A primer és másodlagos ellenanyagok hígítását egyaránt gyári, ún. Antibody diluent (Ventana) oldattal végeztük. Kettős jelölésként az Ncb5or elleni monoklonális egér (1:200 hígításban, Santa Cruz Biotechnology; sc-100529) és a PDI elleni poliklonális nyúl (1:100 hígításban, Santa Cruz Biotechnology; sc-20132) elsődleges ellenanyagokat használtuk a vizsgált fehérje és az ER egyidejű megjelenítésére. Az elsődleges ellenanyagokkal egész éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk a lemezeket, majd mosási lépést követően Alexa Fluor 488 számár anti-egér IgG and Alexa Fluor 568 kecske anti-nyúl IgG (Life Technologies) fluoreszcens festékekkel konjugált másodlagos antitesteket alkalmaztunk 1:200-as hígításban, 1 órán keresztül. A sejtmagokat DAPI-t tartalmazó Vecteshield fedő médiummal (Vector Laboratories, Burlingame, CA) festettük, és fedőlemezzel takartuk le a mintákat.

Az immunfluoreszcens felvételek készítése Leica DM RXA motorizált fluoreszcens mikroszkóppal (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), Leica DFC 365FX CCD monokróm kamerával, Leica CW4000 FISH szoftverrel (Leica

Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK) történt. Nomarski differenciál interferencia kontraszt (DIC) technikát használtunk továbbá a sejthatárok vizualizálásához.

3.8. Statisztika

Az adatok statisztikai elemzését a Tukey-Kramer féle többszörös összehasonlítási teszttel végeztük GraphPad InStat program segítségével. Szignifikánsnak tekintettük a különbséget, ha a p értéke kisebb volt, mint 0,01, illetve 0,001.

4. Eredmények

4.1. Az Ncb5or szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata

Egymásnak ellentmondó adatokat közöltek arra vonatkozóan, hogy a szolubilis (nem membránhoz kötött) Ncb5or fehérje a sejt melyik kompartmentjében (a citoplazmában vagy az ER lumenében) helyezkedik el. A kérdés rendkívül fontos, mivel a citoplazma és az ER lumen NADPH-készlete teljesen elkülönül egymástól és ezáltal a fehérje lokalizációjától függ, hogy a luminális vagy a citoszólban termelődő NADPH-t képes-e a zsírsav-deszaturáció számára hozzáférhetővé tenni. A következőkben bemutatott *in silico* és kísérleti eredményeink a fehérje sejten belüli lokalizációjának pontos meghatározására, annak tisztázására irányultak.

4.1.1. A szubcelluláris lokalizáció *in silico* predikciója

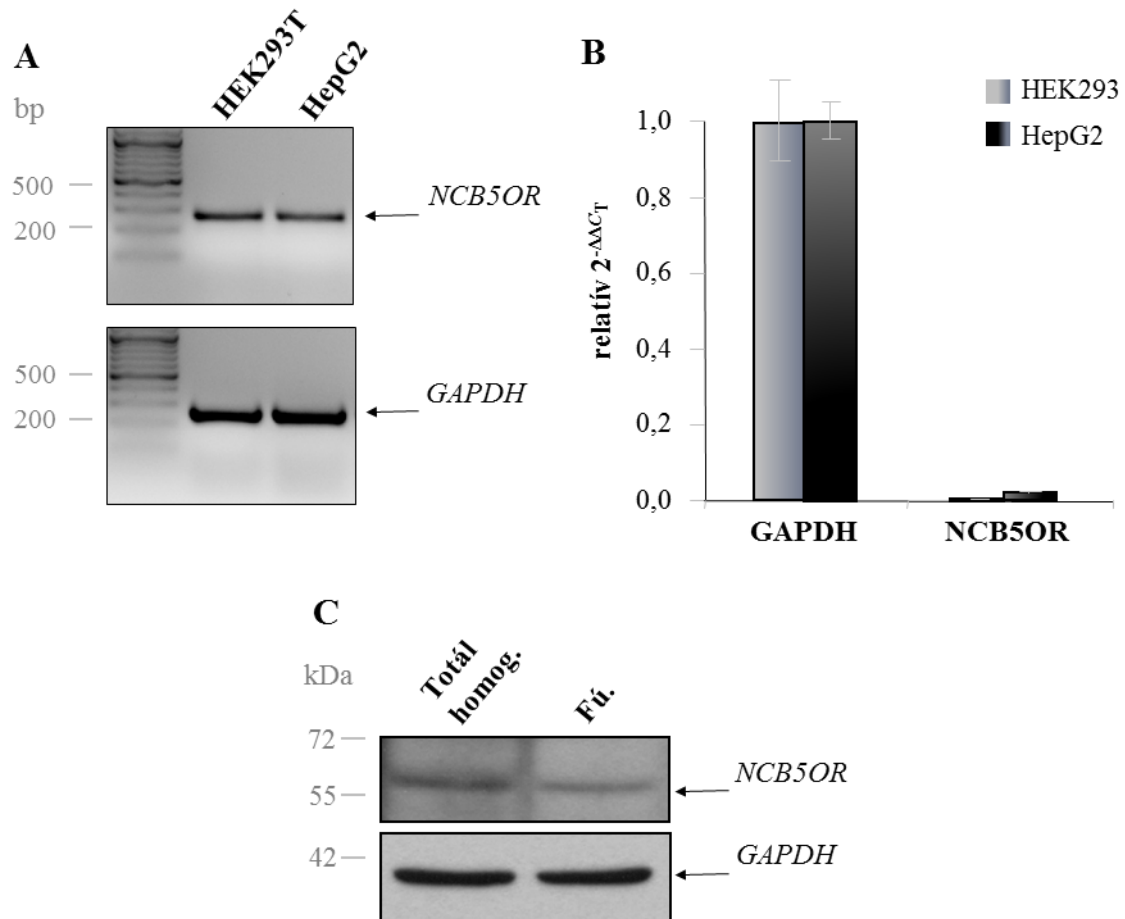
A humán Ncb5or fehérje aminosavszekvenciáját [NCBI: NP_057314.2] különböző, online elérhető, szubcelluláris lokalizációját prediktáló programok segítségével analizáltuk. Az általunk használt hat program, illetve adatbázis által kapott eredményeket a 3. táblázat foglalja össze. A táblázat tartalmazza továbbá, hogy a különböző predikciós algoritmusok milyen szempontok (szekvenciainformációk) szerint képezik találati listájukat. Az eredményeket tekintve az alkalmazott programok egyike sem talált szignálpeptid motívumot vagy ER-retenciós szignált a polipeptid láncban. Az egyes találati listák második vagy harmadik helyen feltételezik az esetleges mitokondriális vagy sejtmagi lokalizáció lehetőségét, azonban a programok mindegyike egybehangzóan az Ncb5or fehérje citoplazmatikus elhelyezkedését ítéli legvalószínűbbnek.

3. táblázat: A humán Ncb5or fehérje lokalizációjának *in silico* predikciója. Az Ncb5or teljes aminosavszekvenciáját [NCBI: NP_057314.2] hat különböző, az interneten szabadon hozzáférhető program segítségével elemeztük. A táblázat tartalmazza az általunk használt programok nevét, a meghatározott lokalizációt (illetve lokalizációkat a valószínűségük csökkenő sorrendjében, ahol a program megadott ilyet), valamint a predikciós algoritmus alapját címszavakban, hivatkozva a program működését tartalmazó eredeti közleményre.

Program neve	Lokalizáció	Predikció alapja
BaCello	Citoplazma <i>Lokalizáció meghatározásának lépései:</i> Intracelluláris → Sejtmagi vagy citoplazmai → Citoplazmai	N- és C-terminális szekvencia összetétel [118]
CELLO v.2.5	Citoplazma <i>Megbízhatósági érték:</i> Citoplazmai: 1.969 Sejtmagi: 1.510 Mitokondriális: 1.092 Peroxiszómális: 0.049 Plazmamembrán: 0.048 ER: 0.032	Aminosav-összetétel [119]
eSLDB	Citoplazma	Homológia alapú annotációk [120]
Euk-mPLOC 2.0	Citoplazma	Funkcionális domén és szekvenciális evolúciós információk [121]
ProteinProwler	Citoplazma	N-terminális szekvenciamotívumok [122]
YLoc	Citoplazma <i>Lokalizáció valószínűsége:</i> Citoplazma: 84.6% Mitokondrium 9.1% Sejtmag 6.3%	Szignál szekvencia alapú predikció [123]

4.1.2. Endogén Ncb5or-expresszió

Az Ncb5or fehérje a legtöbb humán szövetben és humán eredetű sejtvonalakban egyaránt kifejeződik [98]. A legmagasabb mRNS-szintek a szívben, a vázizomban, a vesében és a hasnyálmirigyben mutathatók ki különböző egér szövetekből elvégzett Northern blot alapján [102].



8. ábra: Endogén Ncb5or mRNS-szintek HEK293T és HepG2 sejtvonalakban, endogén fehérjeexpresszió patkány májszövetben. A: RT-PCR-t követő agaróz gélelektroforézis elektroforetogramja. A szemi-quantitatív PCR-hez mintaként HEK293T és HepG2 sejtek cDNS-e szolgált. Az Ncb5or-specifikus primerpárokkal felsokszorozott termék mérete 267 bp, a kontroll génként alkalmazott GAPDH PCR-termék 261 bp méretű. Az első oszlop 100 bp-s létra. A PCR-termékeket 2%-os agaróz gélen futtattuk. **B:** Az NCB5OR gén expressziójának vizsgálata qPCR-rel. Mindkét sejtvonal relatív expressziós szintjeit tüntettük fel. **C:** Immunoblot patkány májszövetből. A gélkép patkány májszövet totál homogenizátumát (totál homog.) és centrifugálást (800 x g, 2 perc, 4 °C) követő felülúszó (fü.) frakcióját mutatja patkány Ncb5or elleni antitesttel való előhívás után. Belső kontrollként a konstitutívan expresszáló GAPDH szolgált.

In silico elemzéseinket követően megvizsgáltuk a tervezett kísérleteinkben használni kívánt két humán sejtvonalt (az embrionális vese eredetű HEK293T és a humán hepatóma eredetű HepG2 sejtvonalt), valamint patkány májszövet endogén Ncb5or-expresszióját mRNA-, illetve fehérjeszinten. A két sejtvonalból teljes RNS-t izoláltunk, majd cDNS-t készítettünk. A cDNS-ből történő PCR-amplifikáció során az Ncb5or-specifikus primerpárok 267 bp, a GAPDH specifikus primerek pedig 261 bp méretű terméket képeztek genomiális eredetű DNS-szennyeződés nélkül. Az RT-PCR eredményeként kapott termékeket 2%-os agaróz gélen választottuk el (8./A ábra). A kísérlet során azt találtuk, hogy a várt méretű PCR-termékek gélelektroforézissel is jól kimutatható mennyiségben keletkeztek, vagyis mind a HEK293T, mind a HepG2 sejtvonalt kifejezi az Ncb5or génjét. A sejtvonalakban termelődő endogén Ncb5or mRNA relatív (a belső kontrollként általánosan használt GAPDH mRNA-hez viszonyított) mennyiségét qPCR módszerrel becsültük meg. A 8./B ábrán a relatív expressziós szinteket ($2^{-\Delta\Delta C_T}$ értékeket) tüntettük fel. A qPCR alapján az Ncb5or endogén mRNA-expressziója alacsony, de jól detektálható. E megfigyelésünkkel összhangban, a vizsgált sejtvonalakban, illetve azokból preparált sejtfrakcióban az endogén Ncb5or fehérje is kimutatható volt Western blot módszerrel (lásd 4.1.3.1. fejezet) és immuncitokémia során (lásd 4.1.5. fejezet).

A patkány májszövet előzetes immunoblot analízisét a teljes szövethomogenizátumból, illetve a sejttörmelék ülepítése (800 x g, 2 perc, 4 °C-on történő centrifugálás) után nyert felülülő fázisból végeztük el. Az immunoblot elvégzésével egyben az újonnan beszerzett patkány Ncb5or elleni antitestet is teszteltük (8./C ábra). A kísérlet során mindkét fázisból sikerült az Ncb5or-specifikus jelet detektálnunk, bizonyítva ezzel annak fehérjeszintű jelenlétét a patkány májszövetben.

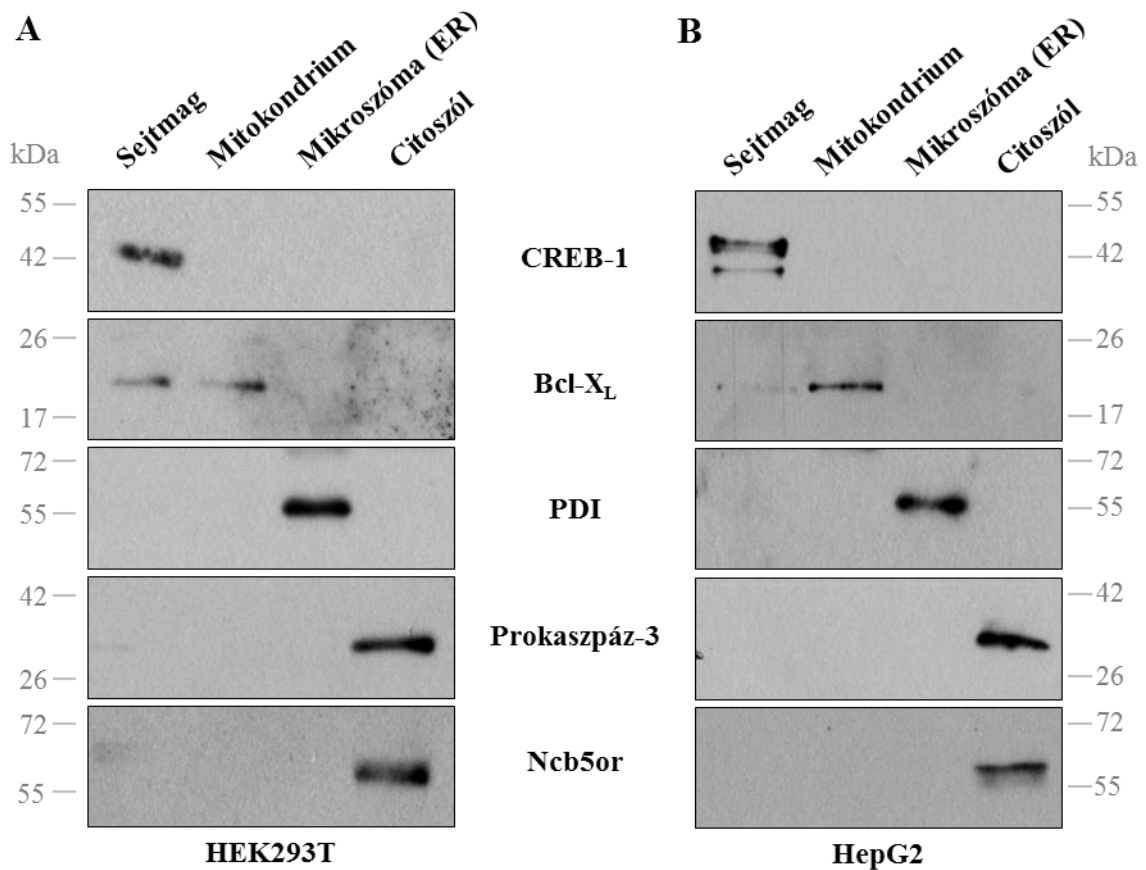
4.1.3. Sejtfrakcionálás

A lokalizáció *in silico* jóslását követően az Ncb5or fehérje sejten belüli elhelyezkedését elsőként sejt- és szövetfrakcionálással vizsgáltuk. A különböző szubcelluláris kompartmenteket tartalmazó sejtfrakciókat HEK293T és HepG2 sejtekből, valamint patkány máj szövethomogenizátumból többlépcsős differenciálcentrifugálással állítottuk elő. Az így kapott sejt- és szövetfrakciók tisztaságát oly módon igazoltuk, hogy az egyes organelumokra (frakciókra) kizárólagosan jellemző

„markerfehérjék” jelenlétét immunoblottal ellenőriztük. Ezt követően, szintén specifikus antitest segítségével vizsgáltuk, hogy az Ncb5or jelenléte melyik kompartmentben kimutatható.

4.1.3.1. *Sejtvonalak vizsgálata*

A humán eredetű HEK293T és HepG2 sejtekből előállított frakciók tisztaságáról, valamint a differenciál-centrifugálás sikerességéről, az egyes sejtalkotókra jellemző fehérjék immunoblottjával győződünk meg. A sejtmagi frakció ellenőrzését a CREB-1 (cAMP-reszponzív elem kötő fehérje 1) transzkripciós faktor elleni specifikus antitest alkalmazásával végeztük. A mitokondriális frakcióban a Bcl-2 fehérje család egy antiapoptotikus tagja, a Bcl-X_L fehérje jelenlétét mutattuk ki. A mikroszóma sejtfrakció markerfehérjeként az ER lumenében elhelyezkedő, és ott az oxidatív fehérjeérést katalizáló, proteindiszulfid-izomeráz (PDI) fehérjét vizsgáltuk. A citoszolikus frakció tisztaságának ellenőrzéséhez a prokaspáz-3 fehérjét jelöltük, amely az apoptózis során effektor kaspáz zimogénjeként a citoplazmában lokalizálódik (9. ábra).



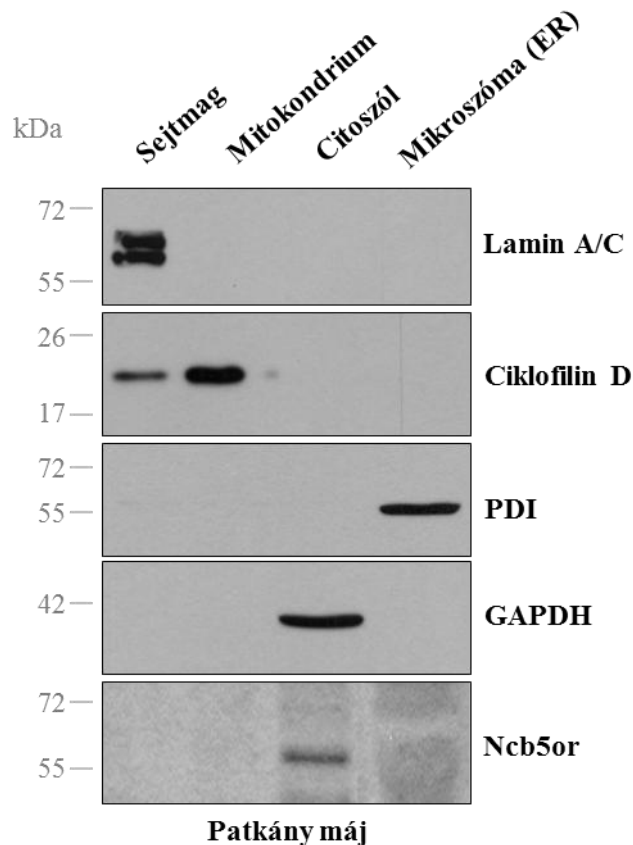
9. ábra: Az endogén Ncb5or fehérje lokalizációjának vizsgálata két sejtvonalban. A HEK293T (A) és HepG2 (B) sejtek homogenizálását követően az egyes sejtfrakciókat többlépcsős differenciál-centrifugálással választottuk külön. A frakciók tisztaságának ellenőrzésére különböző organellumspecifikus fehérjéket detektáltunk. A sejtmagi CREB-1, a mitokondriális Bcl-X_L, a mikroszomális PDI, a citoplazmára specifikus prokaspáz-3 fehérjék elleni antitesteket alkalmaztuk. A képek három független kísérlet egy reprezentatív Western blot képét mutatják.

A HEK293T és HepG2 sejtekből differenciál-centrifugálással elválasztott sejtfrakciók immunoblottját elvégezve azt tapasztaltuk, hogy sikerült az egyes organelumoknak megfelelő sejtpreparátumokat izolálni. Mind az előállított mitokondriális, mind a mikroszomális és a citoszolikus mintákban, az egyes organelumokra specifikus marker fehérjék jelenléte kizárólag a rájuk jellemző frakcióban volt kimutatható. Mindkét sejtvonal esetében egyedül – a szóban forgó fehérje lokalizációjának eldöntésében kevésbé releváns – sejtmagi frakció mutatott enyhe mitokondriális szennyezettséget (9./A-B ábra). A frakcionálás sikerességének ellenőrzése után a mintákat megvizsgáltuk az Ncb5or elleni specifikus antitesttel is. Eredményeink egybehangzóan mutatják, hogy

a sejtfrakciók közül az Ncb5or kizárólag a citoszolikus frakcióban volt kimutatható, így a differenciál-centrifugálás eredménye a fehérje citoplazmatikus elhelyezkedésére utal.

4.1.3.2. *Patkány májszövet*

A sejtvonalak alkalmazása mellett szöveti mintát is vizsgáltunk. Patkánymájak egy-egy darabját homogenizáltuk majd a sejtekhez hasonlóan a májszövetből is elvégeztük a szubcelluláris frakciók elválasztását. A sejtvonalaknál alkalmazott szubcelluláris kompartmentekre jellemző markerfehérjék elleni ellenanyagok némelyikének patkányspecifikus változata nem állt rendelkezésre, így ezek helyett más organellum-markerfehérjéket választottunk. A patkány eredetű mintáknál a szintén jól definiált lokalizációjú, sejtmagi lamin A/C, mitokondriális ciklofilin D, mikroszomális PDI, valamint citoszolikus GAPDH fehérjék kimutatásával ellenőriztük a szövetfrakciók tisztaságát.



10. ábra: Az endogén Ncb5or fehérje lokalizációjának vizsgálata patkány májszövetben. A patkány májszövet homogenizálását követően az egyes frakciókat többlépéses differenciál-centrifugálással választottuk külön. A frakciók tisztaságának ellenőrzésére sejtmagi fehérjeként a lamin A/C, mitokondriális markerként a ciklofilin D, mikroszomális markerként az ER-ben lokalizálódó PDI-t, citoplazmai fehérjeként pedig a GAPDH-t detektáltuk. Az ábra három független frakcionálás egy reprezentatív Western blot eredményét mutatják.

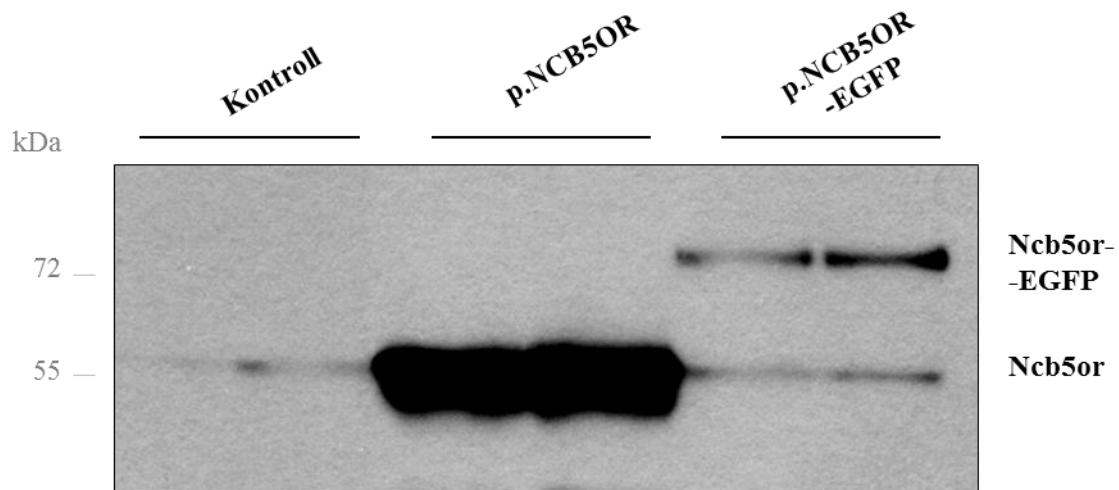
Az ultracentrifugálást követően a patkány májszövetből izolált frakciók tisztaságát szintén immunoblottal ellenőriztük. A sejtmag (lamin A/C), az ER (PDI) és a citoszól (GAPDH) markerfehérjei a nekik megfelelő kompartmenteket tartalmazó mintákból voltak egyedül kimutathatók, amely a frakcionálás sikerességét bizonyítja. A HEK293T és HepG2 sejtek esetében kapott eredményekhez hasonlóan a patkány májszövetből szeparált minták közül a sejtmagi frakció mutatott némi mitokondriális eredetű kontaminációt (10. ábra). Mindez nem befolyásolja azonban annak az eredménynek az értékelését, miszerint az endogén Ncb5or fehérje patkány májszövet szubcelluláris frakciói közül is kizárólag a citoplazmatikus frakcióban volt detektálható.

4.1.4. Ncb5or-EGFP fúziós fehérje lokalizációjának vizsgálata HEK293T sejtekben

Az Ncb5or fehérje intracelluláris lokalizációját sejtes rendszerben EGFP-vel jelölten is teszteltük. Elkészítettük az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje eukarióta expresszióra alkalmas vektorkonstrukcióját, melynek segítségével a fehérje lokalizációját a sejtek szerkezetének megtartásával vizsgáltuk fluoreszcens mikroszkóppal. A konstrukcióval tranziensen transzfektált sejtekben a morfológiai vizsgálatokat megelőzően ellenőriztük a mesterségesen létrehozott fúziós fehérje stabilitását és az expresszió hatékonyságát.

4.1.4.1. Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje termelődésének és stabilitásának ellenőrzése

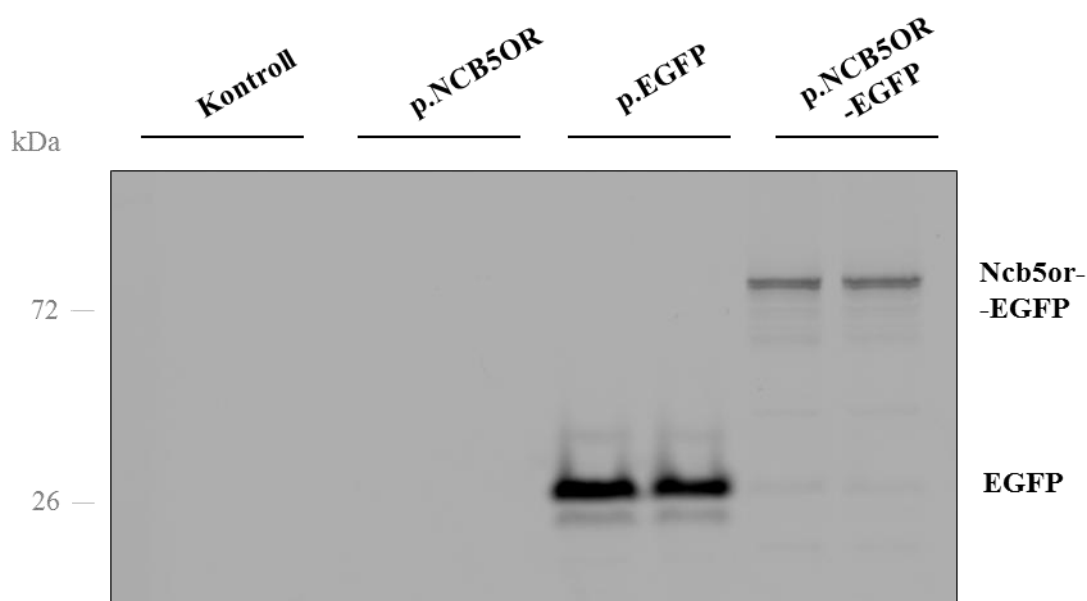
Mivel a sejtekben észlelt zöld fluoreszcencia az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje mellett az Ncb5or-ról esetlegesen lehasadó, szabad EGFP fehérjétől is származhat, a kísérletek elvégzése előtt ellenőriztük a fehérjetermék stabilitását. A fúziós fehérje stabil expressziójának bizonyításához transzfektálatlan, valamint p.NCB5OR és p.NCB5OR-EGFP vektorokkal transzfektált sejtek fehérjéit futtattunk redukáló és denaturáló, illetve redukáló, de nem denaturáló poliakrilamid gélen. Ezt követően külön-külön detektáltuk az Ncb5or fehérje jelenlétét, illetve az EGFP autofluoreszcenciáját (11-12. ábra).



11. ábra: Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje expressziójának és stabilitásának ellenőrzése Western blottal. Kontroll (nem transzfektált), illetve a p.NCB5OR és p.NCB5OR-EGFP expressziós vektorokkal transzfektált HEK293T sejtek begyűjtését 48 órával a transzfekciót követően végeztük. A fehérje mintákból egyenlő mennyiségeket (50 µg) 12%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattunk, majd PVDF membránra blottoltunk. A Western blot analízist az Ncb5or elleni specifikus ellenanyaggal végeztük. Az Ncb5or és az Ncb5or-EGFP fúziós fehérjék számított molekulatömeg értékei 59 kDa és 86 kDa.

A futtatást követő, Ncb5or-specifikus immunobloton a fehérjét overexpresszáló sejtek esetében, a várt molekulatömegben (59 kDa) nagymértékű, intenzív jelet tapasztaltunk, ami az exogén Ncb5or expressziójának magas hatékonyságát mutatja (11. ábra). A p.NCB5OR-EGFP konstrukcióval transzfektált sejtek fehérjelizátumában kettős jelet detektáltunk: az intenzívebb jel az EGFP-vel megnövelt fehérjeméretnek megfelelő 86 kDa-os molekulatömegnél a fúziós fehérje sikeres expresszióját jelzi, míg a lényegesen halványabb, 59 kDa-nál látható jel az EGFP nélküli Ncb5or fehérjének felel meg. Az itt tapasztalt jelintenzitás megegyezik a kontroll mintákban észlelttel, vagyis feltehetőleg az endogén Ncb5or expressziójának felel meg, amihez nem adódott hozzá a fúziós fehérje hasadásából származó többlet. Mindez tehát a plazmidkonstrukcióból származó mRNA-ről transzlálódott Ncb5or-EGFP polipeptid megfelelő stabilitására utal. Összességében a Western blot analízis megerősíti, hogy a p.NCB5OR-EGFP-vel transzfektált sejtek hatékonyan expresszálják az Ncb5or-EGFP fúziós fehérjét, és abból nem keletkezik szabad Ncb5or, ugyanakkor mindez nem zárja ki, hogy esetlegesen önmagában termelődő vagy lehasadt, szabad EGFP fehérje is jelen lehet a sejtekben, ami az Ncb5or intracelluláris lokalizációjának értékelését megzavarhatná.

A fúziós fehérje sejten belüli intaktságának további ellenőrzése és a szabad EGFP jelenlétének kizárása érdekében az elektroforézissel elválasztott Ncb5or-EGFP fúziós fehérje autofluoreszcenciájának detektálását is elvégeztük. A HEK293T sejteket a p.NCB5OR és a p.NCB5OR-EGFP, valamint az üres p.EGFP-N1 vektor konstrukciókkal tranziensen transzfektáltuk. A 48 órás poszttranszfekciós idő leteltével megfelelő mintaelőkészítés (lásd „Módszerek” fejezet) után, a fehérjéket nem denaturáló körülmények között végzett SDS-PAGE-vel választottuk el, majd a gélben a megfelelő hullámhosszakkal jellemezhető fluoreszcenciát Typhoon 9400 variable mode imager készülék (Amersham Biosciences) segítségével detektáltuk.



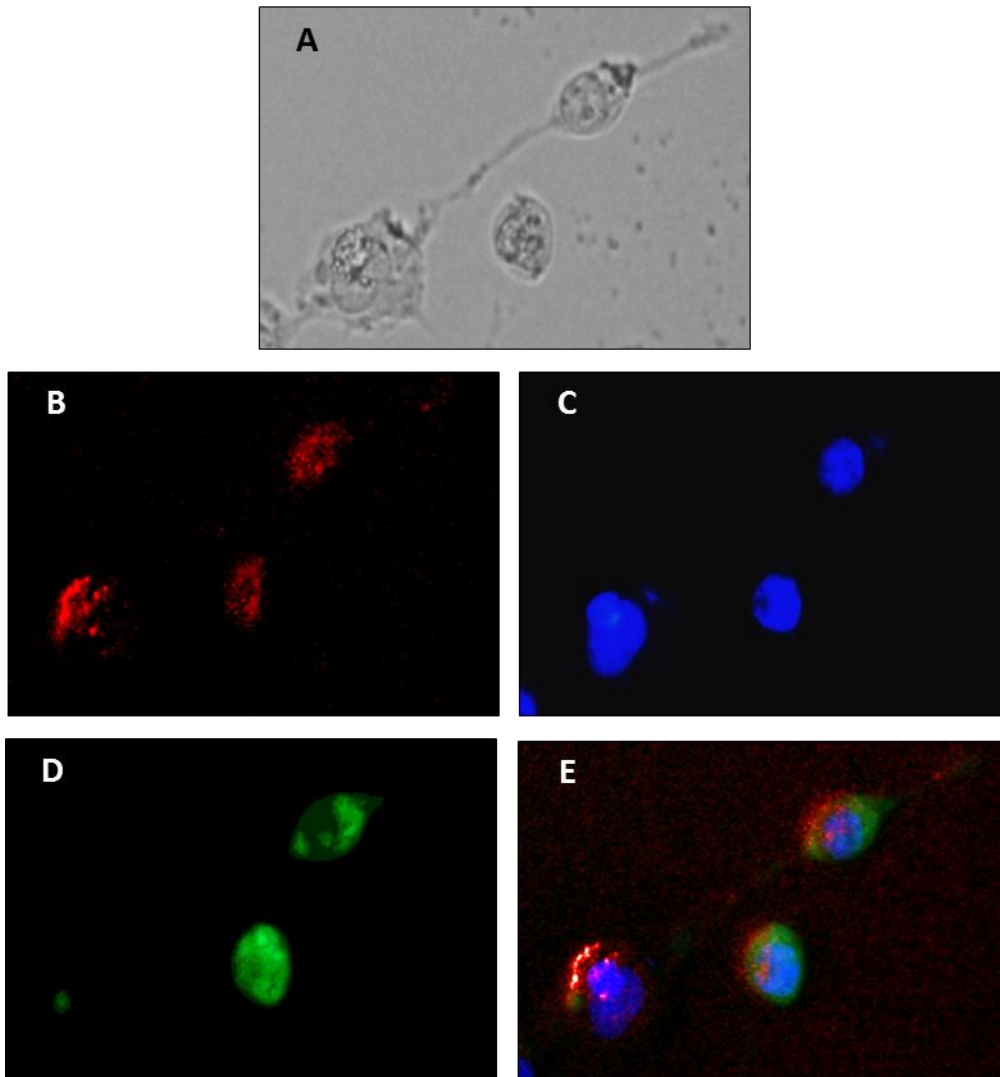
12. ábra: Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje stabilitásának ellenőrzése az EGFP autofluoreszcenciájának detektálásával. Kontroll (nem transzfektált), illetve a p.NCB5OR, p.EGFP és p.NCB5OR-EGFP expressziós vektorokkal transzfektált HEK293T sejtek begyűjtését 48 órával a transzfekciót követően végeztük. A fehérjemintákból egyenlő mennyiségeket (50 µg) 12%-os SDS-poliakrilamid gélen, nem denaturáló körülmények között futtattunk, majd ezt követően detektáltuk a gélben az EGFP riporterfehérje által kibocsátott zöld fluoreszcens fényt (488 nm excitációs és 509 nm emissziós hullámhossz mellett) Typhoon 9400 variable mode imager készülék segítségével. Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje, az Ncb5or és EGFP fehérjék számított molekulatömeg értékei, 86 kDa, 59 kDa és 27 kDa.

Az EGFP által emittált zöld fluoreszcens fényt a kizárólag EGFP-t expresszáló sejtek esetében a fehérje méretének megfelelően 27 kDa-nál detektáltuk, az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje pedig a prediktált méretének megfelelően csak a 86 kDa-os méretnél adott intenzív fluoreszcens jelet (12. ábra). A gélkép alapján a fúziós fehérjét kifejező sejtek

mintában az EGFP-nek megfelelő fluoreszcens jel 27 kDa-nál nem volt detektálható, kizárólag a stabilan termelődő Ncb5or-EGFP fehérje jelent meg a gélben. Mindez megerősíti, hogy intracellulárisan az EGFP jelölő címke nem hasadt le, és önmagában nem termelődött, így a konstrukció alkalmas a tervezett fluoreszcens mikroszkópia elvégzésére.

4.1.4.2. Az *Ncb5or-EGFP* fúziós fehérje intracelluláris lokalizációja

Az *Ncb5or-EGFP* konstrukciót HEK293T sejtekbe transzfektáltuk. A sejtek fixálását és permeabilizálását követően, kontrollként a sejtmagot DAPI-val, az ER-t BODIPYTM TR-X thapsigarginnal jelöltük. A transzfekció hatékonyságát meghatározó EGFP-expresszió a sejtek több mint 80%-ában volt kimutatható (a vizsgált 100 sejt közül mintegy 80 sejt felett volt detektálható zöld autofluoreszcencia).

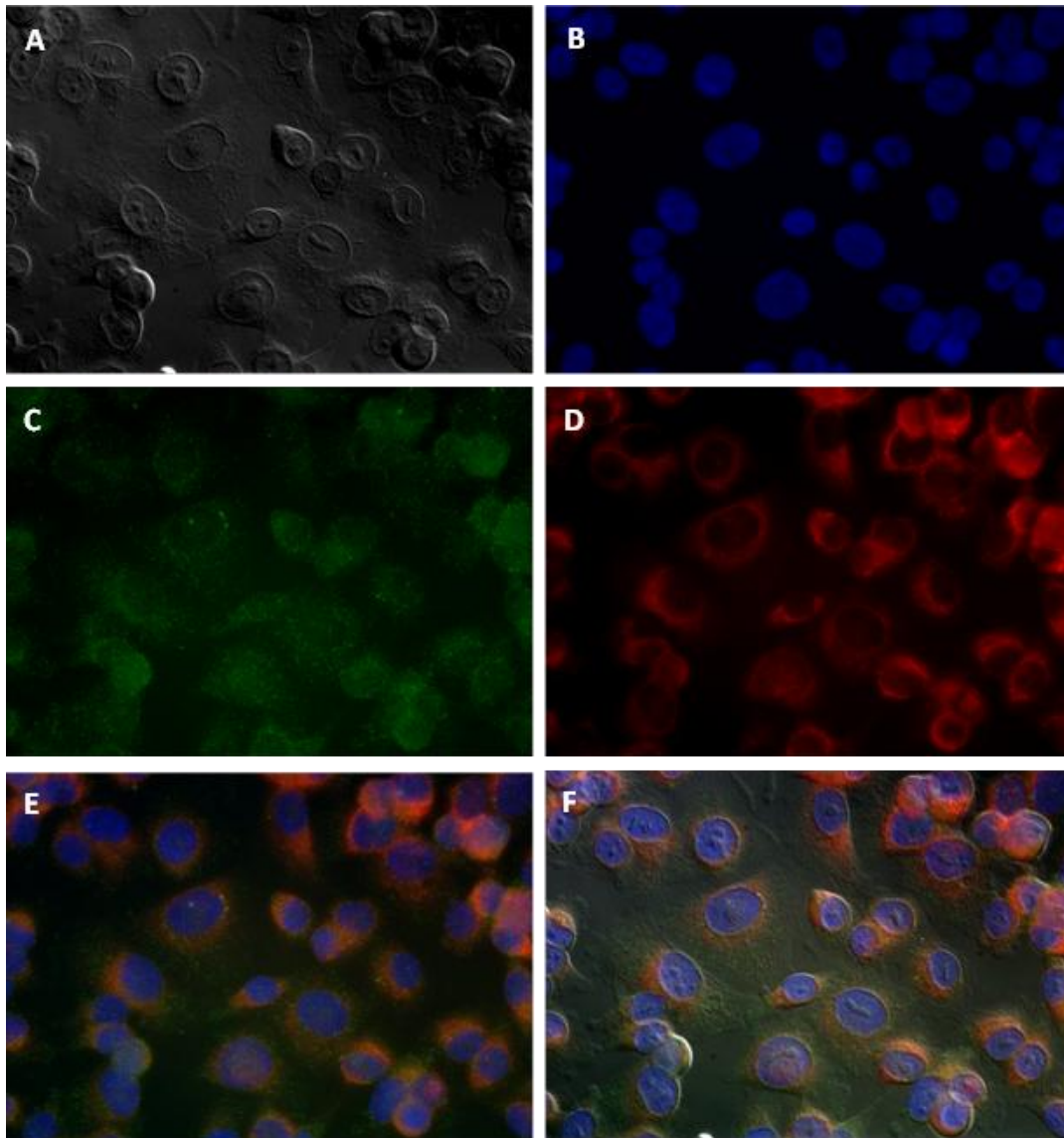


13. ábra: Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje lokalizációjának immunfluoreszcens detektálása HEK293T sejtekben. **A:** Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje intracelluláris expresszióját 48 órával a p.EGFP-NCB5OR plazmid HEK293T sejtekben történő transzfekciója után fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk; **B:** Az ER jelölését BODIPYTM TR-X thapsigargin (piros) fluorofórral végeztük; **C:** A sejtmagot DAPI festéssel tettük láthatóvá; **D:** Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje által emittált zöld fluoreszcens fényt 100 sejtől több mint 80 sejtben detektáltuk (a fúziós fehérje 80% fölötti transzfekciós hatékonysággal fejeződött ki); **E:** B, C és D felvételek egymásra vetített képe.

A mikroszkópos felvételeken (13. ábra) jól látszik, hogy az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje diffúzan kitölti a sejtek citoplazmáját (13./D ábra), és nem mutat ko-lokalizációt sem a sejtmag (DAPI, kék), sem az ER (BODIPYTM TR-X thapsigargin, piros) jelölésével (13./E ábra). Az exogén, fúziós fehérjeként expresszált Ncb5or fehérje sejten belüli eloszlása tehát szintén a citoszolikus elhelyezkedést támasztja alá.

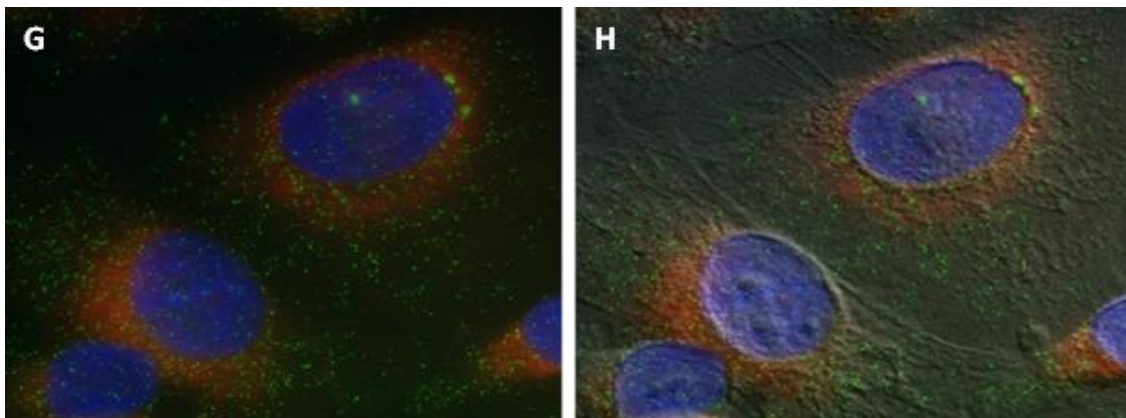
4.1.5. Endogén Ncb5or vizsgálata immuncitokémiai módszerrel HepG2 sejtvonalon

Az Ncb5or enzim viszonylag alacsony endogén szintje miatt a fehérje lokalizációját elsőként overexpresszált és EGFP fehérjével fuzionált formában vizsgáltuk HEK293T sejtekben. A módszer alkalmazása mellett azonban felmerül, hogy maga a fehérje túltermeltetése, illetve az EGFP jelenléte hatással lehet a fehérje sejten belüli célba juttatására, tényleges intracelluláris lokalizációjára. Éppen ezért a Western blot kimutatásoknál eredményesen alkalmazott Ncb5or elleni antitest segítségével az endogén, natív fehérje sejten belüli elhelyezkedését immuncitokémiai módszerrel is vizsgáltuk. A kettős immuncitokémiai festést kezeletlen, transzfekció nélküli HepG2 sejteken végeztük el.



14. ábra: HepG2 sejtek endogén Ncb5or expressziójának fluoreszcens immuncitokémiai vizsgálata. A kettős immunfluoreszcens festés az Ncb5or fehérje (zöld) szubcelluláris lokalizációját, valamint az ER markerfehérjéjeként használt PDI-t (piros) jelöli letapadó HepG2 sejtekben. **A:** Differenciál interferencia kontraszt (DIC) felvétel; **B:** Sejtmagok festése DAPI-val; **C:** Ncb5or fehérje elleni specifikus elsődleges ellenanyagot követő Alexa 488 konjugált (zöld) másodlagos ellenanyaggal történő immunfestés; **D:** Az ER vizualizálását a PDI elleni specifikus ellenanyag majd az Alexa 568 fluoreszcens festékkal (piros) jelölt másodlagos ellenanyaggal végeztük; **E:** B, C és D felvételek egymásra vetített képe; **F:** B, C és D felvételek egyesített képe DIC alkalmazásával; A képek három független kettős fluoreszcens immuncitokémiai jelölés egy-egy tipikus felvételét mutatják. (eredeti nagyítás: 630x)

Az Ncb5or specifikus (zöld) fluoreszcenciája láthatóan kiterjedt a citoplazmában és egyértelműen eltérő mintázatot mutat az ER (sejtmag körüli) festődésétől (piros) (14. ábra). A mikroszkópizálás során ellenőriztük az elsődleges antitest kihagyásával készült negatív kontroll minták festődését, amelyek a másodlagos antitestek által okozott esetleges nem specifikus jelölődést kizárták. A Nomarski DIC technika alkalmazása lehetővé teszi a sejtek vizualizálását és a sejthatárok megjelenítését. Ezzel a fáziskontraszt eljárással az optikai út denzitáskülönbségeiből adódóan térhatású kép készíthető (14./F és 15./H ábrák). A HepG2 sejtekben expresszálandó Ncb5or fehérje szintje meglehetősen alacsony, de a gyenge festődés ellenére az immuncitokémiával detektálható jel specifikus. Az Ncb5or-specifikus szignálok (kis, zöld pontok) határozottan a DIC által megjelenített sejthatárokon belül, a citoplazmában elszórtan láthatók. Bizonyos sejtekben a specifikus festődés a sejt nyúlványait is kirajzolja (14./E-F ábra). Néhány sejt esetében a zöld jelölődés sejtmag körüli akkumulációja is megfigyelhető volt.

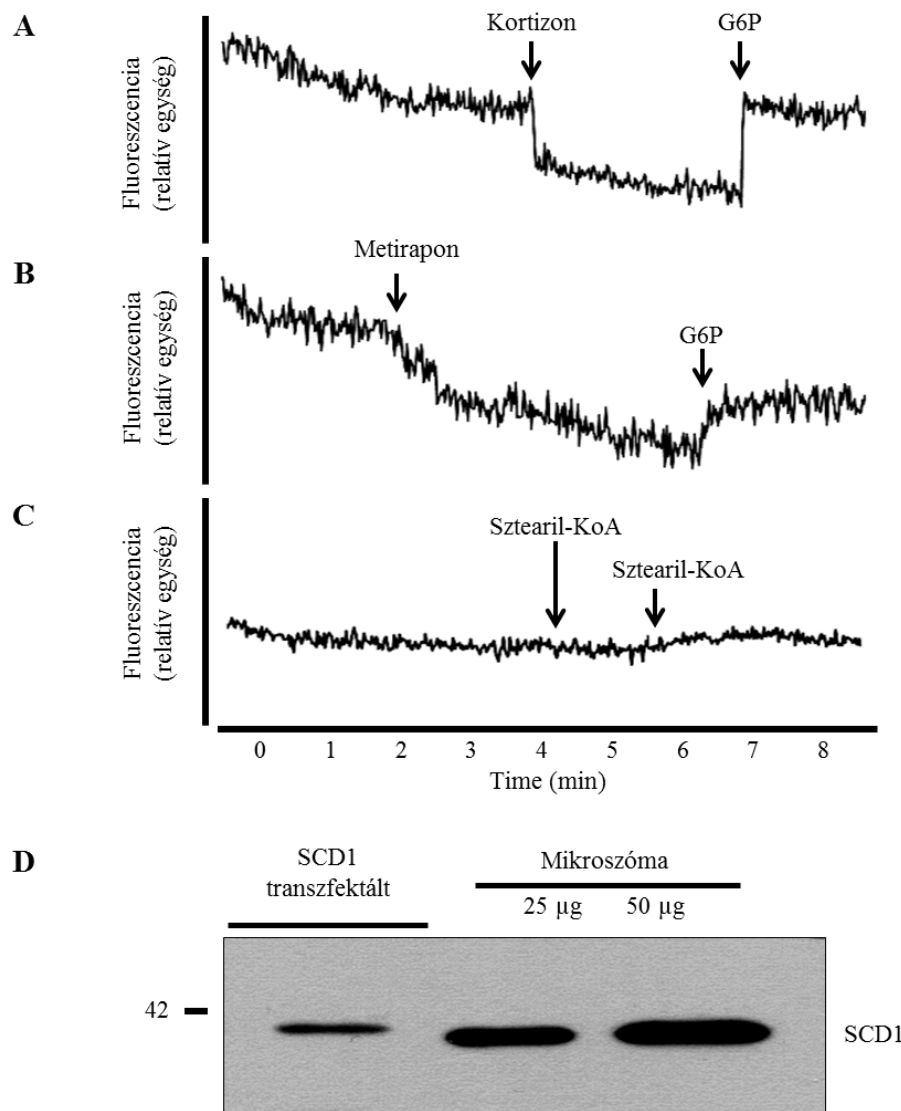


15. ábra: Ncb5or lokalizációja HepG2 sejtekben. Kettős immuncitokémiai jelölés az Ncb5or (zöld) és az ER-t jelölő PDI (piros) fehérjére. **G** és **H:** 14. ábra E és F felvételeinek (azonos) kinagyított részlete.

Mindemellett az endogén Ncb5or fehérje kettős fluoreszcens jelölés során egyértelműen kitölti a sejtek citoplazmáját, és nem mutat ko-lokalizációt az ER festésével.

4.1.6. Sztearil-KoA hatása a mikroszóma NAD(P)H-készletére

Habár az eddigi citoszolikus lokalizációt megerősítő eredményeink nem támogatják azt a feltevést, miszerint az Ncb5or képes az ER luminális NAD(P)H-készletét a zsírsav-deszaturáció számára hozzáférhetővé tenni, kísérletesen közvetlenül is megvizsgáltuk a sztearil-KoA esetleges hatását a luminális redox állapotokra patkány máj mikroszómapreparátumon. A mérés előtt Western blot analízissel megbizonyosodtunk róla, hogy a használni kívánt mikroszóma tartalmazza az SCD1 fehérjét. Az immunoblot során pozitív kontrollként SCD1-transzfektált HEK293T sejtlizátum szolgált (16./D ábra). A funkciós vizsgálatunkhoz alkalmazott fluoreszcens módszer széles körben elterjedt, és alkalmas a mikroszóma belső NADH-, illetve NADPH-szintjének folyamatos detektálására, és ezáltal a luminális redox állapot eltolódásának észlelésére. A kísérlet kivitelezése során a mikroszómahoz kortizont (16./A ábra), metirapont (16./B ábra), illetve sztearil-KoA-t (16./C ábra) és G6P-t adtunk, miközben folyamatosan detektáltuk a NAD(P)H jellegzetes fluoreszcenciáját.



16. ábra: A mikroszóma luminális NAD(P)H-szintjének változása. Intakt patkány mikroszóma endogén NADH-NADPH szintjét 1 mg/ml fehérjekoncentráció mellett MOPS-KCl pufferben mértük 340 nm excitációs és 460 nm emissziós hullámhosszok alkalmazásával. A fluoreszcens jel csökkenése a luminális piridin-dinukleotidok oxidációját jelenti. Kortizont (A) és metirapont (B) 10 µM végkoncentrációban alkalmaztuk, majd ezt követően 100 µM glukóz 6-foszfátot (A és B) adtuk a mikroszómához (a nyilak jelzik a hozzáadott anyagot és a hozzáadás idejét is). A sztearil-KoA (C) hozzáadásának hatását 10 és 50 µM-os koncentrációban vizsgáltuk. (D) Az alkalmazott mikroszómápreparátum SCD1-specifikus Western blot analízise, pozitív kontrollként SCD1-transzfektált sejtek lizátumát alkalmaztuk. Az ábrán három független kísérlet egy tipikus eredménye szerepel.

A NAD(P)H oxidációja metirapon vagy kortizon (11βHSD1 szubsztrátjai) hozzáadását követően egyaránt jól detektálható volt, és ez G6P (H6PD szubsztrátja) (100 µM) hozzáadásával ellensúlyozható volt (munkacsoportunk korábbi kísérleteivel megegyezően).

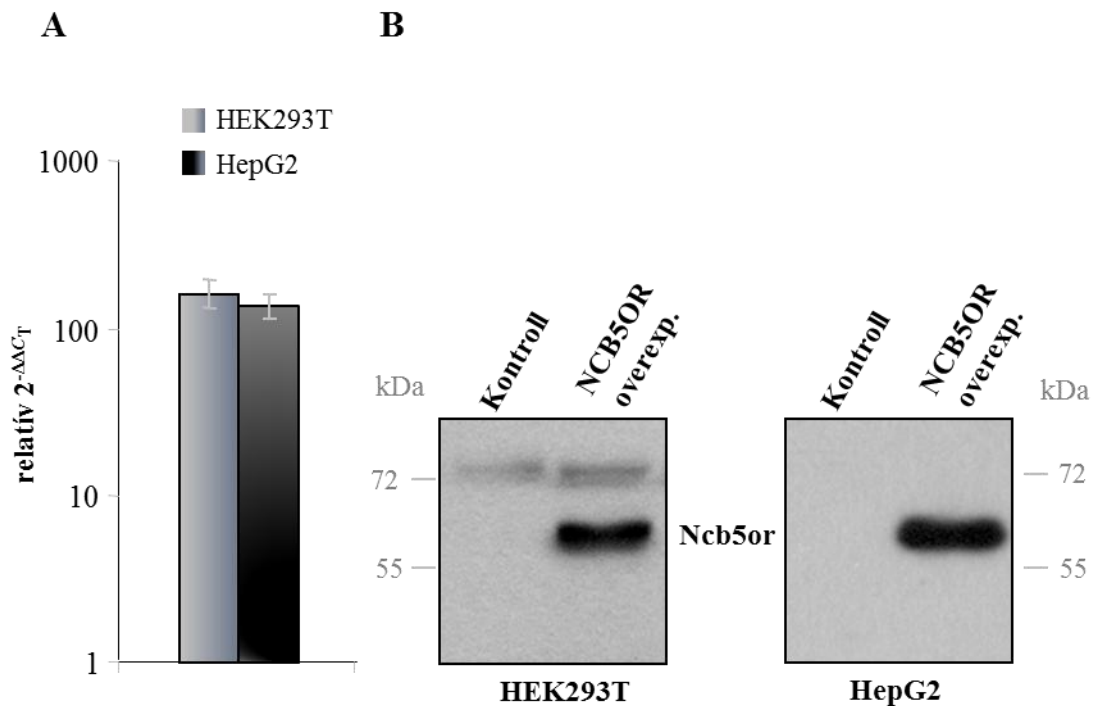
Emellett a sztearil-KoA többszöri hozzáadásával sem változott a fluoreszcens jel, ami azt jelenti, hogy a luminális NAD(P)H-szint sem változott a mikroszomális sztearil-KoA-deszaturáz (SCD1) külsőleg hozzáadott szubsztrátja hatására.

4.2. A humán Ncb5or természetes variánsainak molekuláris biológiai vizsgálata

Az a megfigyelés, hogy az Ncb5or-defektus a knock-out állatmodellben diabétesz kialakulásához vezet, humán vonatkozásban is felveti az enzim hiánya és a diabétesz közti összefüggés lehetőségét. Munkánk során ezért megvizsgáltuk a humán *NCB5OR* gén aminosav-kicserélődést okozó természetes mutációinak az enzim fehérje expressziójára gyakorolt hatását.

4.2.1. Az *Ncb5or* overexpressziója

Az Ncb5or fehérje kódoló szekvenciáját pcDNA3.1- eukarióta expressziós vektorba klónoztuk a módszerek 3.5.2. fejezetében leírtak szerint. A létrehozott és szekvenálással ellenőrzött konstrukciót transziensen transzfektáltuk HEK293T és HepG2 sejtekbe egyaránt. Az overexpresszió hatékonyságát az *NCB5OR* mRNS-szintek qPCR-rel történő meghatározásával, valamint a képződő fehérje expressziójának immunoblot detektálásával végeztük. Az mRNS-szintű expresszió szintjének megbízható meghatározása érdekében nagy gondot fordítottunk az esetleges plazmid DNS-szennyezések DN-ázos emésztéssel történő eliminálására az izolált RNS-mintáinkból.



17. ábra: Az Ncb5or mRNS és fehérje overexpressziójának kimutatása HEK293T és HepG2 sejtvonalakban. A: Az *NCB5OR* gén overexpressziójának vizsgálata qPCR-rel. HEK293T és HepG2 sejtek transzfekcióját követő 36 óra elteltével RNS-t izoláltunk. Templátként a DN-ázos emésztést követően átírt cDNS szolgált. A diagramon a specifikus Taqman próbákkal végzett qPCR során kapott, majd normalizált relatív expressziós szinteket tüntettük fel, kontroll génként pedig a *GAPDH* szolgált. **B:** Az Ncb5or fehérje overexpressziójának kimutatása immunoblottal. Kontroll (transzfektálatlan), illetve p.NCB5OR expressziós vektorral transzfektált sejtek lizátumát (50 μ g fehérje) 12%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, majd PVDF membránra blottoltuk. A Western blot analízist az Ncb5or elleni specifikus ellenanyaggal végeztük. A képek három párhuzamos kísérlet reprezentatív eredményeit mutatják.

Az oszlopdiaagrammal ábrázolt relatív expressziós szintek a HEK293T sejtek esetén mintegy 300-szoros, a HepG2 sejtekben pedig 170-szeres mRNS-szintemelkedést mutatnak a kontroll, transzfektálatlan sejtekhez viszonyítva (17./A ábra). A fehérje szintek Western blottal történő ellenőrzése során pedig megállapítható, hogy mindkét sejtvonalban jelenős az overexpresszált Ncb5or fehérje mennyisége, és az lényegesen magasabb az endogén fehérjeszinteknél (17./B ábra). Az így kialakított kísérleti rendszer megfelelőnek bizonyult az Ncb5or és természetes variánsainak további mRNS- és fehérjeszintű vizsgálatához.

4.2.2. Természetes variánsok azonosítása adatbázisok segítségével

Vizsgálataink kezdetekor az NCBI SNP és 1000 Genom adatbázisokban öt olyan természetes *NCB5OR*-génvariánst tudtunk azonosítani *in silico*, amelyek aminosavcserét eredményeznek a fehérjében (4. táblázat). Az ilyen jellegű variánsok száma azóta jelentősen megnőtt. Az általunk fellelt és a továbbiakban vizsgálni kívánt misszensz mutációk a következők voltak: p.E87G (rs28675051), p.E93G (rs11539439), p.E118A (rs11539440), p.R140H (rs61762820), p.N249S (rs13194584).

4. táblázat: A humán *NCB5OR* gén NCBI SNP és 1000 Genom adatbázisokban azonosított misszensz mutációinak összefoglaló táblázata.

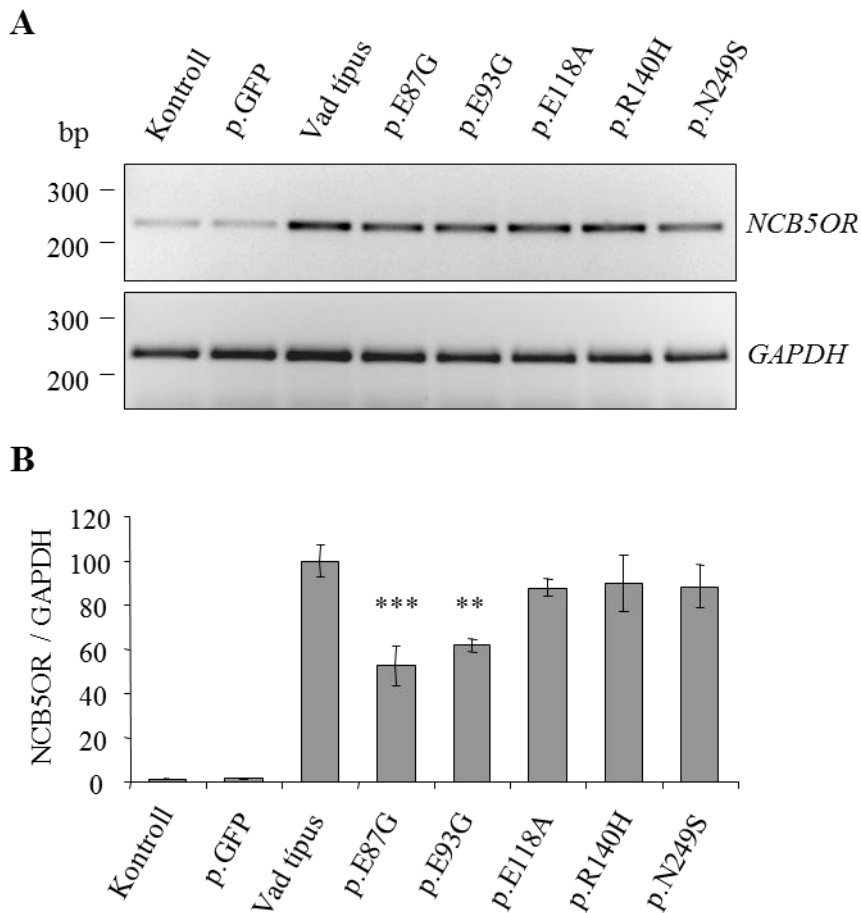
Aminosav-csere	Rövidítés	Báziscsere	Azonosító	Frekvencia
Glu87Gly	p.E87G	A→G	rs28675051	nincs adat
Glu93Gly	p.E93G	A→G	rs11539439	nincs adat
Glu118Ala	p.E118A	A→C	rs11539440	nincs adat
Arg140His	p.R140H	G→A	rs61762820	nincs adat
				98% vs. 2%
Asn249Ser	p.N249S	A→G	rs13194584	nincs adat

A 87-es és 93-as pozícióban lévő Glu Gly aminosavcserét eredményező mutációk a harmadik exonban, míg a p.E118A, p.R140H és a p.N249S variánsok a negyedik, az ötödik és a tizedik exonban foglalnak helyet. E természetesen előforduló mutációk fehérje szerkezetére, illetve funkciójára gyakorolt hatását ezidáig még nem vizsgálták.

4.2.3. Az *Ncb5or* variánsainak *mRNS*-szintű expressziója

Az *Ncb5or* variánsainak jellemzését kísérleteink döntő többségében a könnyebb transzfektálhatóság miatt HEK293T sejteken végeztük. A humán *Ncb5or* egyes vizsgálni kívánt allélváltozatait tartalmazó konstrukciókat irányított mutagenézissel hoztuk létre, és ezekkel a sejteket tranziensen transzfektáltuk. A variánsok túltermeltetése mellett, a kísérleti összeállításban egy indifferens plazmidot (p.GFP), valamint a vad típusú fehérjét kifejező konstrukciót is transzfektáltuk. 36 órával a

transzfekeióót követően végeztük el az RNS-izolálást, majd DN-ázzal végzett kezelés után cDNS-re írtuk át a mintákat.



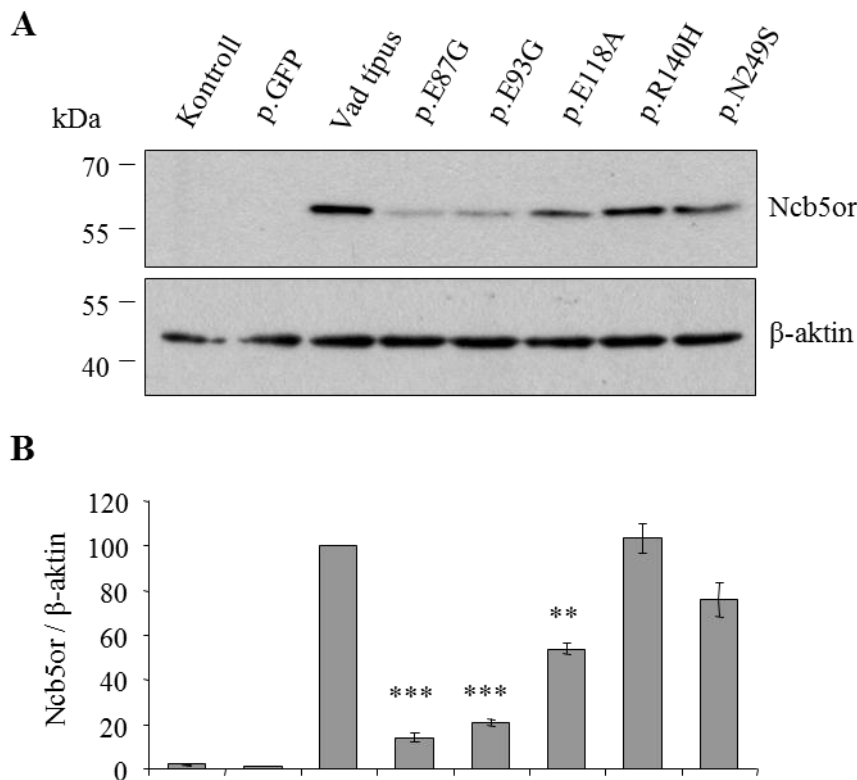
18. ábra: Az *NCB5OR*-génvariánsok mRNA-expressziójának vizsgálata. A HEK293T sejtek begyűjtését, illetve az RNS-izolálást 36 órával a transzfekeióót követően végeztük el. **A:** Az *NCB5OR*-variánsok mRNA-expressziójának vizsgálata RT-PCR-rel. Az izolált RNS-mintákból cDNS-t készítettünk, amely a PCR során templákként szolgált. Az *Ncb5or*-specifikus primerpárokkal felszorzott termék mérete 267 bp, a kontroll géneként alkalmazott *GAPDH* PCR-termék 261 bp méretű. A PCR-termékeket 2%-os agaróz gélen futtattuk és etídium-bromiddal tettük láthatóvá. **B:** Az *NCB5OR*-variánsok vizsgálata qPCR-rel. A diagramon a specifikus Taqman próbákkal végzett qPCR során kapott, majd *GAPDH* belső kontroll gén expressziójával normalizált relatív expressziós értékeket tüntettük fel. Az ábrák három független kísérlet egy tipikus eredményét mutatják. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

A szemi-kvantitatív RT-PCR alapján elmondható, hogy az *Ncb5or* endogén mRNA-expressziójához (transzfekeióóálatlan, illetve GFP-t kifejező vektorral transzfekeióóált sejtek) képest az egyes *Ncb5or*-variánsokkal transzfekeióóált sejtek jelentős *Ncb5or* mRNA-szintnövekedést mutattak. Az elektroforetogramon láthatóan az egyes *Ncb5or* variánsok

közötti expresszió mértéke közel azonosnak tekinthető (18./A ábra). Az mRNA-szintek pontosabb analizisét is elvégeztük, ehhez az érzékenyebb és megbízhatóbb qPCR módszert használtuk. A kiértékelés során azt találtuk, hogy a transzfektálatlan mintákhoz képest minden kifejezett konstrukció esetén erőteljes mRNA-expresszió volt mérhető, az p.E87G és p.E93G mutánsok expressziója statisztikailag eltért ugyan a vad típustól (18./B ábra), de a különbség nem volt nagymértékű.

4.2.4. Az *Ncb5or*-variánsok fehérjeszintű expressziója

A HEK293T sejtek p.GFP, p.NCB5OR, p.E87G, p.E93G, p.E118A, p.R140H és a p.N249S konstrukciókkal történő transzfekcióját követően fehérjeizolálást végeztünk, és az így kapott mintákban vizsgáltuk az egyes *Ncb5or*-variánsok intracelluláris fehérjeszintjét.

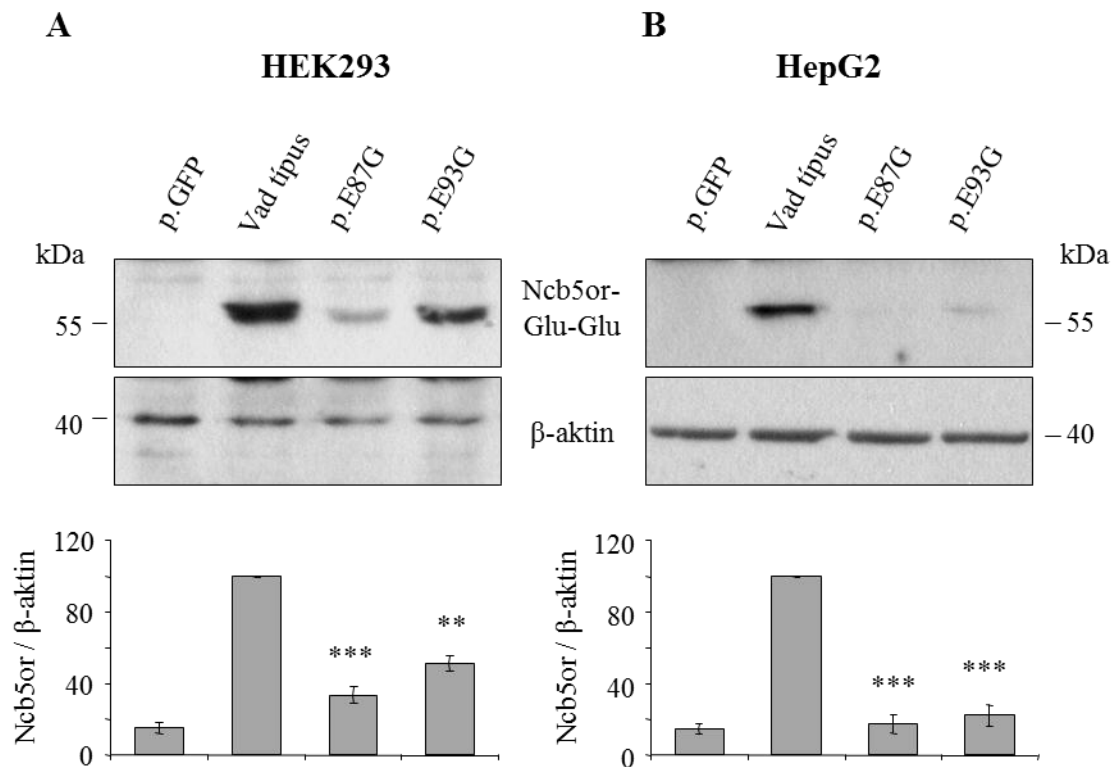


19. ábra: Az *NCB5OR*-génvariánsok fehérjeexpressziójának vizsgálata Western blottal. A fehérjemintákból egyenlő mennyiségeket (50 μ g) 12%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattunk, majd PVDF membránra blottoltuk. **A:** Az *Ncb5or* variánsok fehérjeszintjei. Kontrollként β -aktin szolgált. **B:** Densitometriás kiértékelés. A jelölődés intenzitásának densitometriás kiértékelését ImageQuant 5.2 program segítségével végeztük. Az oszlopdiagramok (3 független kísérletből származó eredmények) a β -aktinra normalizált és a vad típusúhoz viszonyított relatív denzitás értékeket ábrázolják. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

A p.E87G és a p.E93G természetes variánsok szignifikánsan kisebb mértékben voltak jelen a sejtekben a vad típushoz képest (19. ábra). A denzitometriás kiértékelés alapján a p.E87G és a p.E93G variánsok fehérjeszintjei tizede, illetve ötöde a vad típusú fehérjének. A kísérletből az is látszik, hogy egy harmadik variáns, a p.E118A szintén csökkent fehérjeszinttel jellemezhető, mennyisége kb. fele, a vad típusú fehérjének. Munkánk során azonban a nagyobb hatások kimutatására és vizsgálatára törekedtünk, ezért a továbbiakban a két Glu-Gly aminosavcserét eredményező mutációval foglalkoztunk részletesen.

4.2.4.1. *Glu-Glu jelölő címkével ellátott mutánsok vizsgálata két sejtvonalban*

Az alacsony intracelluláris szinttel jellemezhető p.E87G és p.E93G variánsokból elkészítettük a Glu-Glu epitóp „tag”-gel ellátott változatokat. Erre a C-terminálison létrehozott glutamátgazdag jelölő címkére rendkívül specifikus ellenanyag kapható a kereskedelmi forgalomban. E jelölés és a rá specifikus ellenanyag használata a fehérjeszintek összehasonlításakor kiküszöböli azokat a hibalehetőségeket, amelyek az Ncb5or elleni antitest különböző fehérjevariánsok iránti affinitásának esetleges eltéréseiből adódhatnak. A létrehozott jelölő címke nagyfokú detektálhatósága lehetővé teszi továbbá, hogy egy másik, kisebb hatékonysággal transzfektálható sejtvonalon, a HepG2-n is vizsgálni tudjuk e két Ncb5or-variáns expressziós szintjeit. Munkánk következő lépéseként tehát a Glu-Glu epitóp „tag”-gel ellátott p.NCB5OR, p.E87G és p.E93G variánsokat kifejező expressziós vektorokkal transzfektáltuk mind a HEK293T, mind pedig a HepG2 sejteket. A transzfekciót követően elvégeztük az immunoblot analízist a Glu-Glu címkére és a β -aktinra specifikus ellenanyagok segítségével.

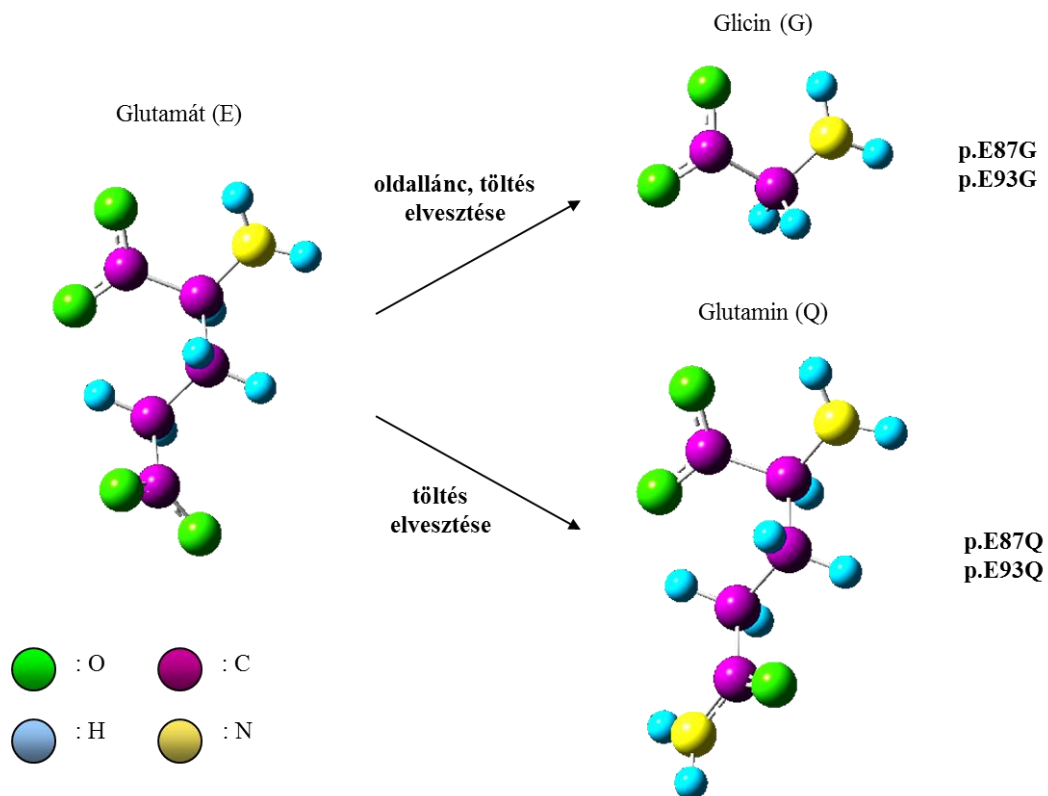


20. ábra: A Glu-Glu címkével ellátott p.E87G és p.E93G Ncb5or-mutánsok vizsgálata immunoblot segítségével. Kontroll (p.GFP vektorral transzfektált), illetve a Glu-Glu epitóp „tag”-gel ellátott p.NCB5OR, p.E87G és p.E93G expressziós vektorral transzfektált HEK293T (A) és HepG2 (B) sejtek lizátumát (50 µg fehérje) 12%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, majd PVDF membránra blottoltuk. A Western blot analízist a Glu-Glu tag és a β-aktin elleni specifikus ellenanyagokkal végeztük. A jelölődés intenzitását denzitometriával számszerűsítettük ImageQuant 5.2 program segítségével. Az oszlopdiaagramok (3 független kísérletből származó eredmények) a β-aktinra normalizált és a vad típusúhoz viszonyított relatív denzitás értékeket mutatják. ** P<0,01; *** P<0,001.

A 20. ábra A részén látható, hogy a Glu-Glu epitóp „tag”-gel ellátott mutáns fehérjék expressziójának vizsgálata a címke nélkül végzett kísérletekéhez (19. ábra) nagyon hasonló eredményt mutatnak. Akár jelölve, akár jelölés nélkül, a p.E87G fehérje jelentősebb, a p.E93G fehérje pedig valamivel kisebb, de szintén szignifikáns csökkenést mutat a vad típusúhoz képest HEK293T sejtekben. A jelölt konstrukciókat egy másik sejtvonalban is vizsgáltuk (20./B ábra). A HepG2 sejtekkel végzett kísérlet során szintén sikerült megerősítenünk az alapjelenséget, a p.E87G fehérje szintje e sejtekben kb. ötöde, míg a p.E93G fehérjéé mintegy negyede volt a vad típusú Ncb5or mennyiségének.

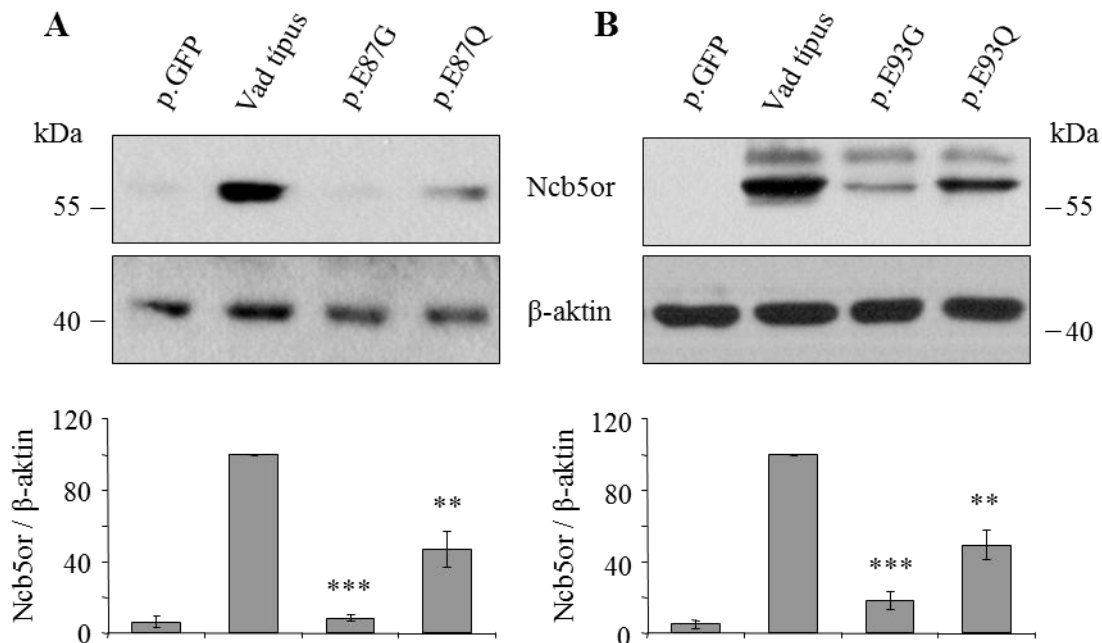
4.2.5. A mesterségesen létrehozott E/Q mutánsok fehérjeszintű expressziója

Az adatbázisokból azonosított *NCB5OR* misszensz mutációk közül a p.E87G és p.E93G glutamát-glicin aminosavcserét eredményező variánsok esetében tapasztaltunk jelentős fehérjeszint-csökkenést a vad típushoz képest. E két, természetesen előforduló variáns esetében a pontmutáció hatására a transzlálódó fehérjében a glutamát glicinre történő cseréje az aminosav-oldallánc és a negatív töltés elvesztését is jelenti egyben. Felmerül a kérdés, hogy a fehérje szintjének ilyen mértékű csökkenését a mutációt érintő aminosav oldalláncának, töltésének vagy mindkettőnek együttes elvesztése okozza-e. Ennek kiderítésére létrehoztunk két mesterséges mutánst, melyek a 87-es, illetve a 93-as pozícióban glutamát helyett glutamint tartalmaznak (p.E87Q és p.E93Q). Ezekben a mutánsokban az oldallánc mérete nem változott, viszont fiziológiás pH-n töltéssel már nem rendelkeznek (21. ábra). A mesterséges variánsokat expresszáló konstrukciókat ezután tranziens transzfekcióval fejeztük ki HEK293T sejtekben, majd a fehérjemennyiségük nyomon követését immunoblottal végeztük.



21. ábra. Az E/Q mutánsok. A 87-es és 93-as pozíciókban lévő Glu-Gly, valamint a mesterségesen létrehozott, Glu-Gln aminosavcserét okozó mutációk molekulászerkezetre gyakorolt hatásának szemléltetése. A színes körök az atomokat (zöld: oxigén, lila: szén, kék: hidrogén, sárga: nitrogén), a vonalak a kovalens kötések jelölik.

Glu-Gln aminosavcsereét okozó mutációk (p.E87Q és p.E93Q) esetében önmagában az aminosav-oldallánc töltésváltozásának fehérjeszintre gyakorolt hatását tudtuk vizsgálni.



22. ábra. Az E/Q mutációk hatása az Ncb5or fehérje mennyiségére. A HEK293T sejteket p.E87G és p.E87Q (A), valamint p.E93G és p.E93Q (B) expressziós vektorokkal transzfektáltuk, majd a fehérjeszinteket immunoblottal detektáltuk. A fehérjeexpressziók kimutatását Ncb5or és β-aktin elleni specifikus ellenanyagokkal végeztük. A jelölődés intenzitásának denzitometriás kiértékelését ImageQuant 5.2 program segítségével végeztük. Az oszlopdiaagramok (3 független kísérletből származó eredmények) a β-aktinra normalizált és a vad típushoz viszonyított relatív denzitás értékeket mutatják. ** P<0,01; *** P<0,001.

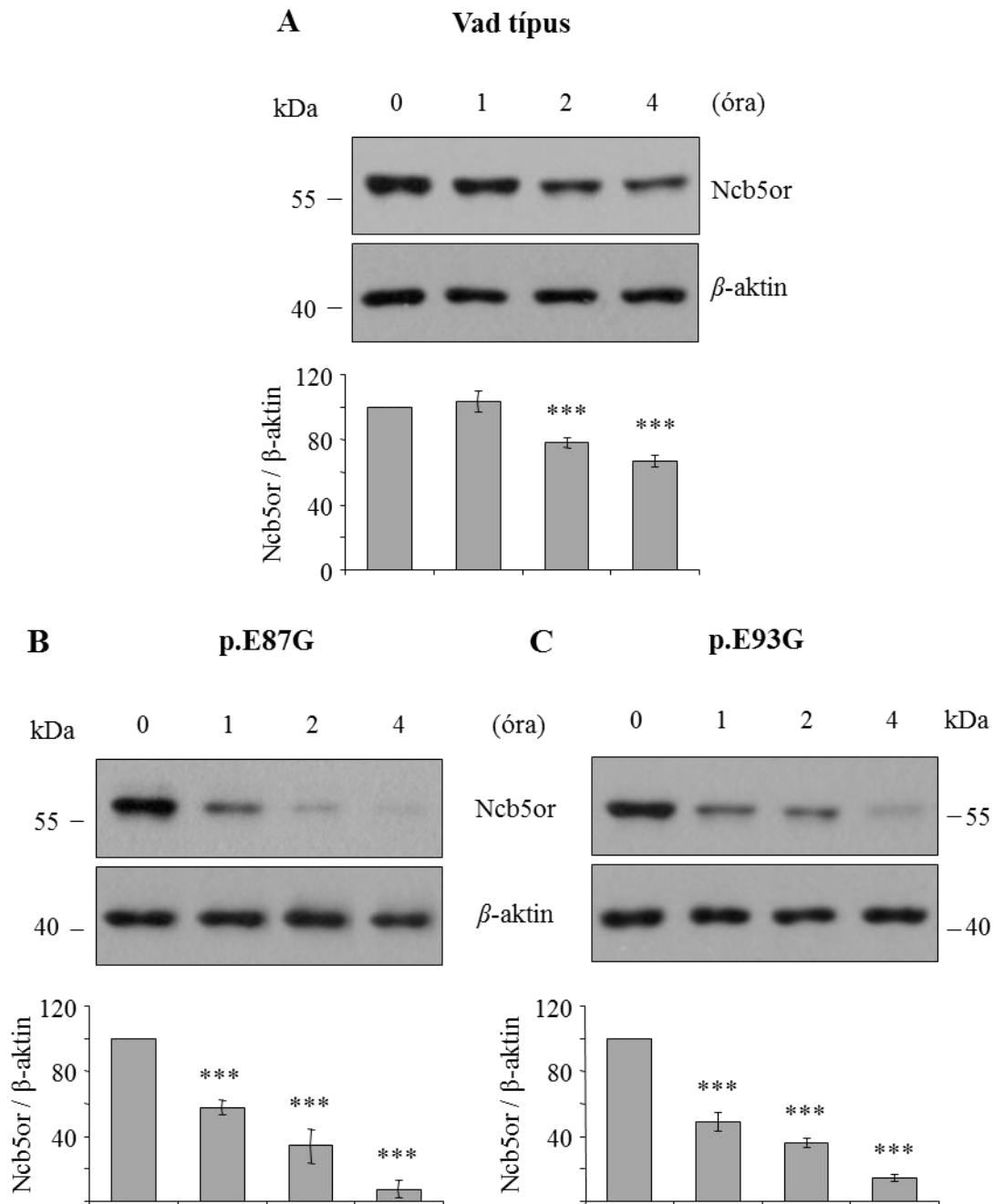
Az Ncb5or fehérje intracelluláris mennyiségét mindkét E/Q mutáció szignifikánsan csökkentette, azonban a Glu-Gly variánsokhoz képest kisebb mértékű csökkenést eredményeztek (22. ábra). A p.E87Q mutáns fehérjeszintje mintegy fele (50%) a vad típusú fehérjének és a p.E87G mutációhoz képest pedig ötször nagyobb fehérjeszintet detektáltunk (22./A ábra). A 93-as pozícióban lévő Glu-Gly és Glu-Gln aminosavcsereket vizsgálva hasonló mintázatot kaptunk. Jól látszik az alapeffektus, mely szerint a p.E93G mennyisége jelentősen, ötödére csökken, és ehhez képest a Q mutáns ezt meghaladó 2,5-szer nagyobb expressziót mutat (22./B ábra). A vad típushoz képest ugyanúgy a fehérje 50%-a mutatható ki. Mindez azt mutatja, hogy a töltés elvesztése, bár csökkenti a sejten belül detektálható fehérje mennyiségét, önmagában nem felelős a Ncb5or fehérjeszint markáns csökkenésért. Megállapítható ugyanakkor, hogy a töltés megváltozása is hozzájárul a fehérje intracelluláris szintjének csökkenéséhez.

4.2.6. *A p.E87G és p.E93G variánsok fokozott intracelluláris degradációja*

A p.E87G és p.E93G Ncb5or-variánsok mRNS-szintű expressziójának a vad típuséhoz viszonyított mérsékelt eltérése ellenére a két mutáns változat fehérjeszintjének nagymértékű csökkenését mutattuk ki (4.2.4. fejezet). A háttérben két mechanizmus lehetősége vetődik fel: elképzelhető, hogy a mutációk következtében kevesebb fehérje képződik, de az is, hogy a nem megfelelő konformációjú fehérjék intenzív intracelluláris lebontásra kerülnek. A vad típusú, a p.E87G és a p.E93G Ncb5or fehérjék intracelluláris degradációját a transzláció gátlásával, valamint a fehérje féléletidejének meghatározásával követtük nyomon.

4.2.6.1. *A fehérjelebomlás vizsgálata a transzláció gátlását követően*

A vad típusú fehérje és a két, Glu-Gly aminosavcserét eredményező variánsainak intracelluláris degradációját a transzláció gátlását követően hasonlítottuk össze. A transzláció gátlószereként a peptidil-transzferáz enzim működését gátló sejtparameábilis cikloheximidet használtuk. HEK293T sejtek tranziens transzfekcióját követően 12 órával médiumcserét végeztünk, amely 50 µg/ml végkoncentrációban tartalmazta a gátlószert. A transzláció gátlását követően 1, 2 és 4 óra elteltével gyűjtöttük be a sejteket és készítettünk fehérjelizátumot. A transzláció leállításával az egyes mutáns fehérjék mennyiségének időbeli alakulását tudtuk Western blot segítségével nyomon követni, illetve a vad típusával összehasonlítani.

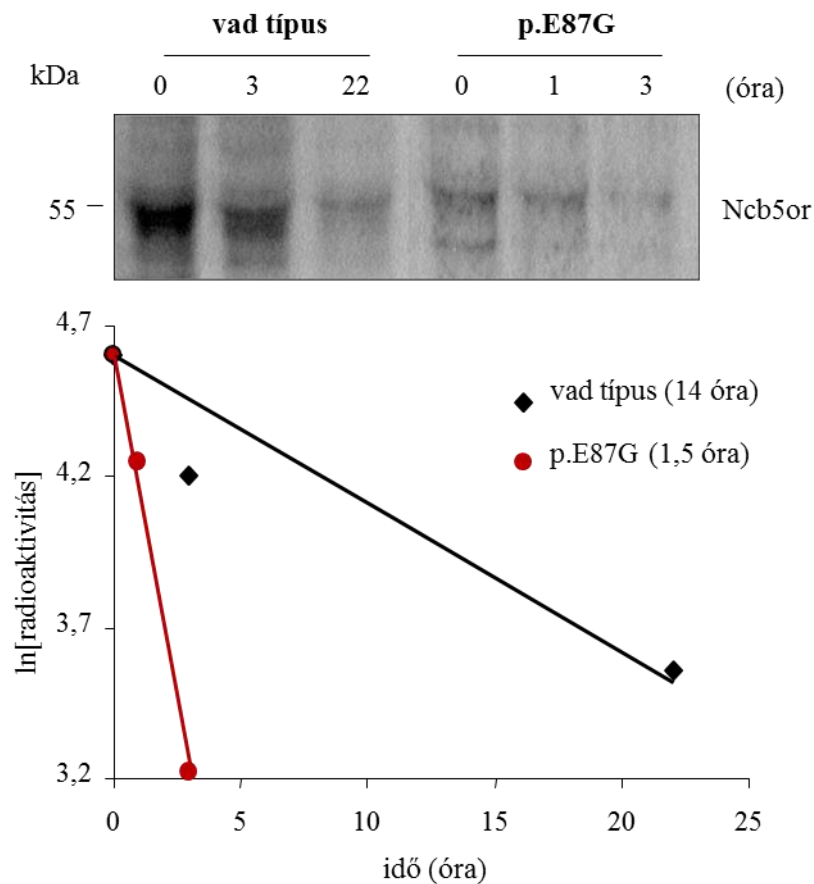


23. ábra. Az Ncb5or vad típusú és p.E87G és p.E93G mutáns változatainak intracelluláris degradációja a transzláció gátlását követően. A vad típust (A) és a mutáns variánsokat (B és C) tranziens transzfekcióval fejeztük ki HEK293T sejtekben pcDNA3.1- expressziós vektor segítségével. A transzfekciót követően 12 órával kezeltük a sejteket cikloheximiddel (50 μ g/ml), majd az 1, 2 és 4 óra elteltével begyűjtött mintákat Western blot segítségével vizsgáltuk, amihez Ncb5or és β -aktin elleni specifikus ellenanyagokat használtunk. A jelölődés intenzitásának denzitometriás kiértékelését ImageQuant 5.2 program segítségével végeztük. Az oszlopdiagramok (3 független kísérletről származó eredmények) a β -aktinra normalizált és a „0” időponthoz viszonyított relatív denzitás értékeket mutatják. *** $P < 0,001$.

A 23. ábrán bemutatott immunoblottok képein, illetve a denzitometriás kiértékelés oszlopdigramjain is igen szembeütő az idő előre haladtával a fehérje specifikus jel intenzitásának fokozatos csökkenése, amely a progresszív fehérjedegradáció folyamatára utal. Az egyes Ncb5or-variáns fehérjék eliminálásának időbeli lefolyásában azonban jelentős különbség mutatkozik. A 23. ábra A részén a vad típusú Ncb5or fehérjével végzett kísérlet látható. A fehérje mennyisége lassan és dinamikusan csökken a négy órás cikloheximidkezelés során, valamint a kezdeti („0” időpontban meghatározott) fehérjeszint mintegy 70%-a detektálható még a 4. óra végére. Ezzel ellentétben a két Glu-Gly Ncb5or-mutáns fehérje esetén jóval erőteljesebb fehérjeszint-csökkenést tapasztaltunk (23./B és C ábra). A p.E87G és p.E93G Ncb5or-variáns fehérjék mennyisége szinte párhuzamosan a gátlást követő 1-2 órán belül a kiindulásként meghatározott szint felére csökkent. A transzlációgátlást követő 4. óra végére pedig az Ncb5or fehérje kiindulási mennyiségének a p.E87G mutáns esetében körülbelül 10%-a (23./B ábra), a p.E93G variánsnál pedig mintegy 20%-a (23./C ábra) maradt kimutatatható. Mindezen eredmények alapján elmondható, hogy a humán *NCB5OR* gén általunk vizsgált két, Glu-Gly aminosavcserét eredményező mutációja hatására a fehérjék valóban gyorsabban degradálódnak, a fehérjeszintek jelentős csökkenésének háttérében a felgyorsult intracelluláris lebontás állhat.

4.2.6.2. *A p.E87G fehérjevariáns féléletidejének meghatározása az impulzus jelölés/izotóphígítás (pulse-chase) módszerével*

A sejten belüli fehérjelebontás pontos meghatározásához izotópos jelölést alkalmaztunk a vad típus és az előzőekben gyorsabb degradációval jellemzett p.E87G fehérjevariáns féléletidejének megállapításához. A kísérletekhez ugyancsak HEK293T sejteket transzfektáltunk a vad típusú és a p.E87G fehérjét expresszáló plazmidkonstrukcióval. A sejteket a tranziens transzfekciót követően jelöltük rövid ideig [³⁵S] metioninnal és [³⁵S] ciszteinnel („impulzus jelölés”) majd e két aminosav jelöletlen változatával végeztük el „az izotóp hígítását” (lásd „Módszerek” 3.6.8. fejezet). Az izotóphígítást követően különböző időpontokban (a vad típusú fehérje vizsgálatakor 0, 3 és 22 óra elteltével, a p.E87G fehérjevariáns vizsgálatakor 0, 1 és 3 óra után) végeztük el az autoradiográfias analízist.

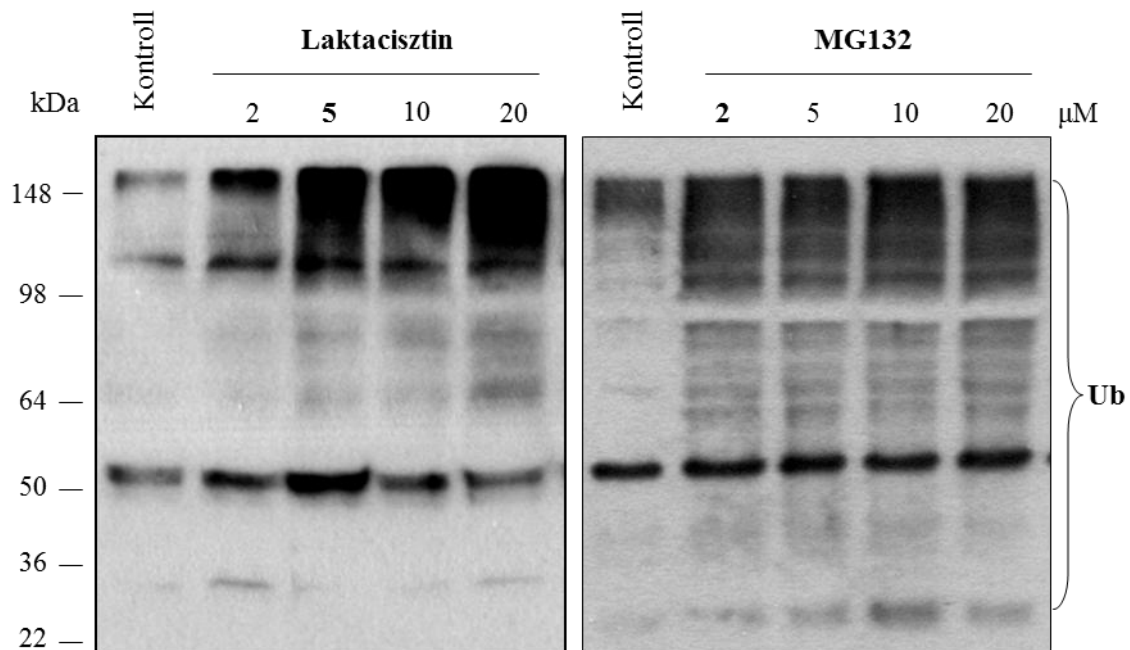


24. ábra. A vad típusú és p.E87G variáns Ncb5or fehérjék féléletidejének meghatározása. Az impulzus jelölés/izotóphígítás (pulse-chase) metodikáját, valamint immunprecipitációt alkalmaztunk a módszerek 3.6.8. fejezetében részletesen ismertetett módon. Az autoradiográfiát Typhoon Phosphoimager (Amersham Biosciences) segítségével készítettük el. A relatív radioaktivitás természetes alapú logaritmusát az idő (vizsgált időpontok) függvényében ábrázoltuk, valamint a fehérjedegradáció sebességi állandóját lineáris regresszió segítségével állapítottuk meg. A fehérje féléletidő meghatározása a $t_{1/2} = \ln(2)/k$ képlet szerint történt.

A jelölt fehérjék degradációjának nyomon követésével és féléletidejük pontos meghatározásából kiderül, hogy a képződő vad típusú fehérje 14,2 óra, míg a 87-es pozícióban Glu-Gly aminosavcserét hordozó mutáns Ncb5or fehérje mennyisége mindössze 1,5 óra alatt csökken a felére (24. ábra). Ezzel a pontos meghatározással igazolni tudtuk, hogy az *NCB5OR* gént érintő, általunk vizsgált p.E87G mutáció hatására a képződő fehérje lebomlási sebessége jelentősen felgyorsult a vad típuséhoz képest.

4.2.7. Proteaszómagátlókkal kivédhető a p.E87G és p.E93G variánsok intracelluláris degradációja

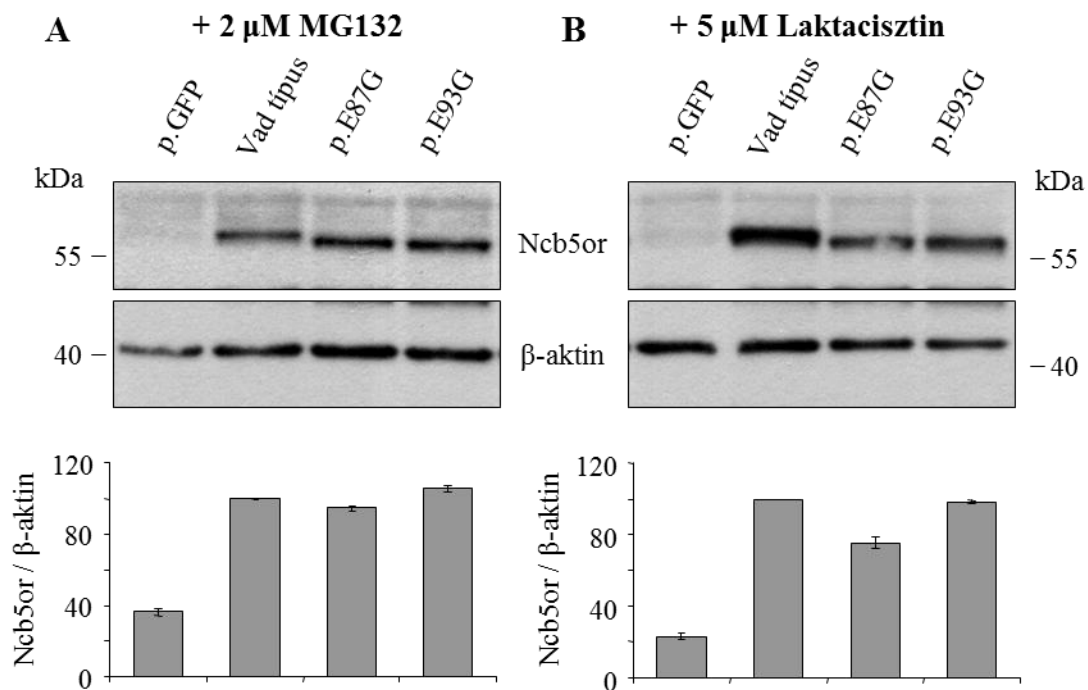
A p.E87G és p.E93G variánsok esetében észlelt nagymértékű fehérjeszint csökkenés, valamint a fehérje-féléletidő jelentős lerövidülése a mutáns fehérjék szerkezeti stabilitásának megváltozását és fokozott proteaszómális degradációját valószínűsíti. Az Ncb5or esetleges proteaszómális degradációjának vizsgálatához két proteaszómagátlót választottunk. Elsőként e gátlószerek (laktaciszтин, illetve MG132) HEK293T sejteken alkalmazható legalacsonyabb, hatásos koncentrációját határoztuk meg. Transzfektálatlan sejteket kezeltünk egyre növekvő koncentrációjú proteaszómagátlóval (2, 5 10 és 20 μM), majd 24 óra elteltével immunoblottal detektáltuk a kezelés hatékonyságát.



25. ábra. A laktaciszтин és az MG132 proteaszómagátlók legkisebb, hatékony koncentrációjának megállapítása HEK293T sejteken. HEK293T sejteket 24 órát át kezeltünk laktaciszтин vagy MG132 proteaszómagátlókkal 2, 5, 10 és 20 μM végkoncentrációban. A fehérje mintákból egyenlő mennyiségeket (50 μg) 12%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattunk, majd PVDF membránra blottoltunk. A Western blot analízist az ubikvitin elleni specifikus ellenanyaggal végeztük. A képek három független kísérlet egy-egy tipikus eredményét mutatják.

A proteaszómagátlók hatékonyságát ubikvitinspecifikus ellenanyag segítségével ellenőriztük. Ez az ellenanyag minden ubikvitinnel a sejt által megjelölt fehérjét felismer, vagyis azokat a fehérjéket jelöli a membránon, amelyeket a sejt a

proteaszómába irányított, de a proteaszóma a gátlószerek miatt lebontani nem tudott. Ennek megfelelően az ubikvitin elleni antitesttel végzett immunobloton nem csak diszkrét csíkokat, hanem a változatos méretű fehérjék miatt ún. „kenődést” láthatunk. Ahol ennek intenzitása jelentősen növekedett a kezeletlen kísérleti ponthoz képest, ott a proteaszómagátló már kifejtette hatását. Eredményeink alapján laktaciszтин esetében az 5 μM , míg az MG132 esetében pedig a 2 μM -os végkoncentrációt választottuk a további kísérletek kivitelezéséhez (25. ábra).



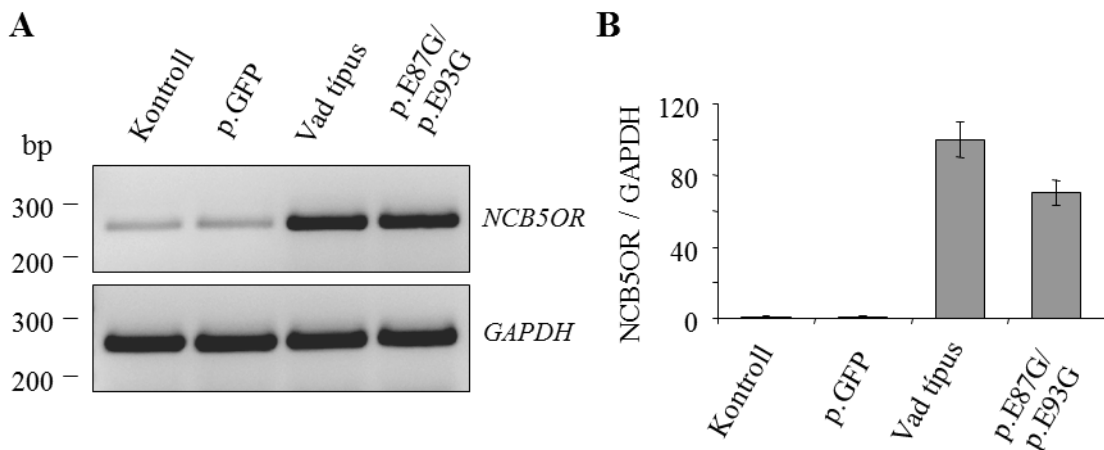
26. ábra. Proteaszómagátlók hatása a p.E87G és a p.E93G Ncb5or-variánsok fehérjeszintjére. A vad típusú fehérjét és a mutáns variánsokat transzfeccióval fejeztük ki HEK293T sejtekben. A transzfecciót követően (12 óra elteltével) kezeltük a sejteket 2 μM MG132 (A) és 5 μM laktaciszтин (B) proteaszómagátlókkal 24 órán keresztül. A Western blot analízist (50 μg fehérje) az Ncb5or és β -aktin elleni specifikus ellenanyagokkal végeztük. A jelölődés intenzitásának denzitometriás kiértékelését ImageQuant 5.2 program segítségével végeztük. Az oszlopdiaagramok (3 független kísérletből származó eredmények) a β -aktinra normalizált és a vad típusúhoz viszonyított relatív denzitás értékeket mutatják.

A vad típusú fehérjét és az Ncb5or egyes allélváltozatait kifejező konstrukciókat transzienten transzfeccióztunk HEK293T sejtekbe, majd ezt követően a sejteket az MG132 (26./A ábra) és laktaciszтин (26./B ábra) proteaszómainhibitorokkal kezeltük. A 26. ábrán bemutatott eredményeken jól látszik, hogy mindkét proteaszómagátló teljesen megszüntette a vad típusú és mutáns fehérjék mennyiségében mutatkozó

különbségeket. E kísérleteink egyértelműen bizonyítják tehát, hogy az észlelt jelenség a p.E87G és a p.E93G variánsok destabilizálódásának és felgyorsult proteasomális degradációjának következménye.

4.2.8. A két vizsgált mutáció együttes hatásának elemzése

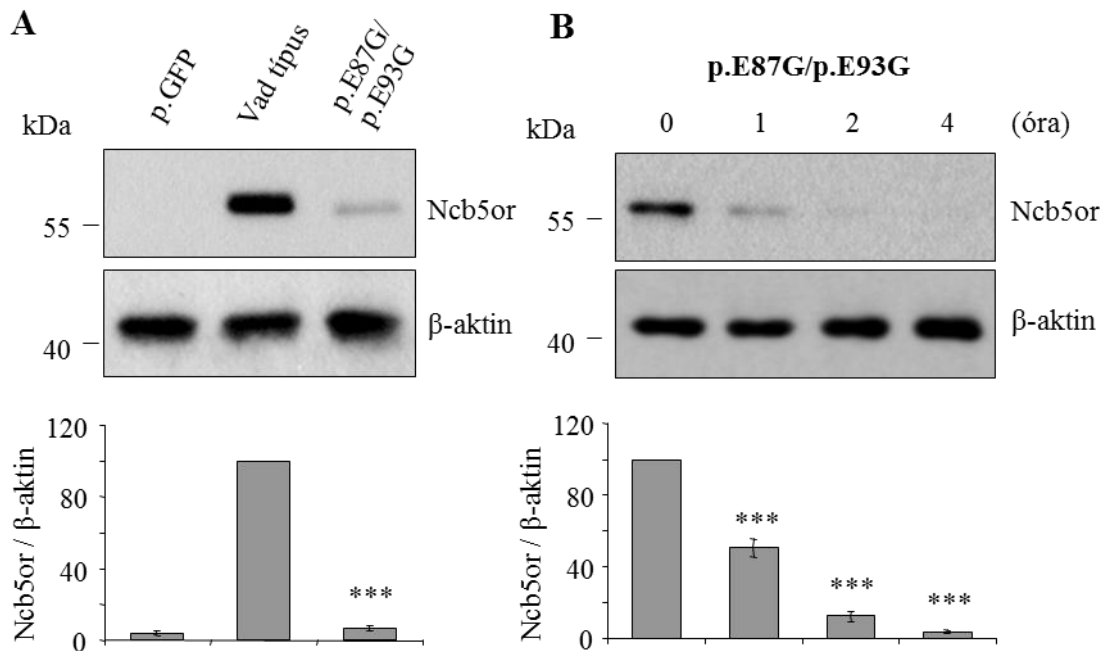
A harmadik exonban előforduló két, Glu-Gly cserét eredményező mutáció (p.E87G, p.E93G) együttes, esetlegesen additív hatásának vizsgálatát a mesterségesen létrehozott kettős Ncb5or-mutáns (p.E87G_p.E93G) részletes karakterizálásával végeztük. Irányított mutagenézissel létrehoztuk a mindkét mutációt tartalmazó plazmid konstrukciót, amely tehát olyan Ncb5or fehérjét kódol, amelyikben a 87-es és 93-as pozícióban egyaránt glicin helyettesíti a glutamátot, majd a fehérjeszintek alakulását az e konstrukcióval transzfektált sejtekben vizsgáltuk.



27. ábra. A p.E87G_p.E93G kettős mutáns mRNS-szintű expressziója. A vad típust és a kettős mutánst kifejező plazmid konstrukciókat tranziensen transzfektáltuk HEK293T sejtekbe, majd 36 óra elteltével végeztük az RNS izolálást. **A:** A p.E87G_p.E93G mRNS expressziójának vizsgálata RT-PCR-rel. Az izolált RNS-mintákból cDNS-t készítettünk, amely a PCR során templátként szolgált. Az Ncb5or termék mérete 267 bp, a kontroll génként alkalmazott GAPDH termék 261 bp méretű. A PCR-termékeket 2%-os agaróz gélen futtattuk és etídium-bromiddal tettük láthatóvá. **B:** A p.E87G_p.E93G mRNS-expressziójának vizsgálata qPCR-rel. A specifikus Taqman próbákkal végzett qPCR során kapott, majd GAPDH belső kontroll gén expressziójával normalizált relatív expressziós értékeket tüntettük fel. A képek három független kísérlet egy-egy tipikus eredményét mutatják.

Elsőként a vad típusú és a dupla mutációt hordozó NCB5OR mRNS expressziós szintjeit hasonlítottuk össze. Sem az RT-PCR segítségével végzett szemi-quantitatív kiértékelés során (27./A ábra), sem a qPCR segítségével meghatározott relatív mRNS-

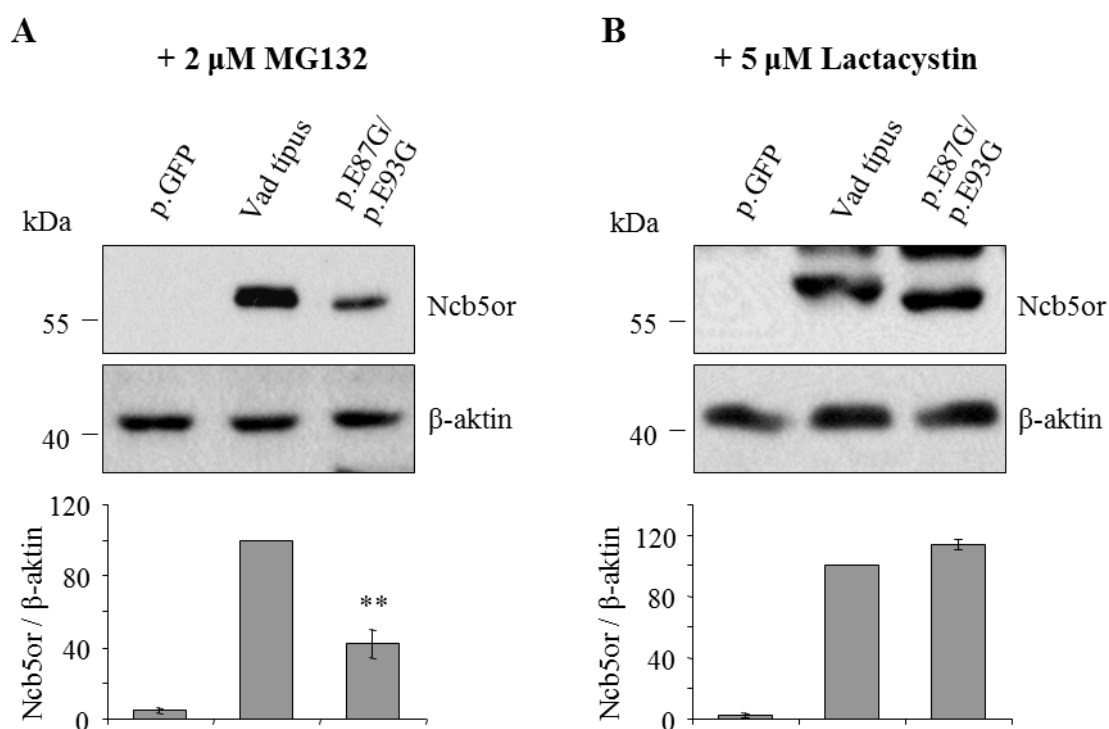
szintekben (27./B ábra) nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést, vagyis alig volt kimutatható különbség a vad típus és a kettős mutáns NCB5OR mRNS-expressziójában. Ezen eredmény is megerősíti, hogy az általunk vizsgált mutációk translációs-
poszttranszlációs szinten, és nem az mRNS mennyiségének csökkentése révén hatnak. A két külön-külön vizsgált mutáció hatásához hasonlóan, az egy fehérjében reprezentált dupla aminosavcsere is jelentős változást idéz elő a fehérje intracelluláris szintjében. A p.E87G_p.E93G kettős mutáns fehérjeszintje olyan alacsony volt, hogy a kísérletsorozatunkban alkalmazott módon Western blottal szinte alig volt kimutatható; és a jelintenzitások összehasonlításával a kettős mutáns Ncb5or fehérje mennyiségét mindössze a vad típusú 7%-ának találtuk (28./A ábra). A transláció cikloheximiddel előidézett gátlása után a fehérjeszintek időbeli változásának követésekor arra is fény derült, hogy a kettős mutáns fehérje mennyisége még az egyszeres mutációt tartalmazó variánsokénál is gyorsabban csökken, vagyis intracelluláris féléletideje még azokénál is jobban lerövidült (28./B ábra).



28. ábra. A p.E87G_p.E93G kettős mutáns fehérje intracelluláris degradációja.

A vad típust és a kettős mutánst HEK293T sejtekben fejeztük ki. **A:** A p.E87G_p.E93G variáns fehérje szintjének vizsgálata. 36 órás poszttranszfekciós idő leteltével a fehérjeszinteket Western blot segítségével hasonlítottuk össze. **B:** A p.E87G_p.E93G variáns fehérje szintjeinek vizsgálata cikloheximidkezelés után. 12 órával a transzfekciót követően a sejteket cikloheximiddel (50 μ g/ml) kezeltük, majd az 1, 2 és 4 óra elteltével begyűjtött mintákat szintén Western blot-tal elemeztük, amihez Ncb5or és β -aktin elleni specifikus ellenanyagokat használtunk. A jelölődés intenzitásának denzitometriás kiértékelését ImageQuant 5.2 program segítségével végeztük. Az oszlopdiagramok (3 független kísérletről származó eredmények) a β -aktinra normalizált és a vad típusához (23. A ábra), valamint a „0” időponthoz viszonyított relatív denzitációs értékeket mutatják. *** P<0,001.

Abból, hogy a két aminosavcserét együtt tartalmazó fehérje degradációja még az egyszeres mutációkat tartalmazóknál is intenzívebb volt, arra következtethetünk, hogy a két mutáció hatása egymást erősíti. Végül a kettős mutáns szintjét is megvizsgáltuk proteaszómagátló kezelésnek alávetett sejtekben. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a megváltozott fehérjeszerkezetű Ncb5or intracelluláris degradációja ilyen körülmények között is eltér-e a vad típusétól, illetve az egyszeres mutáns variánsokétól.



29. ábra. A proteaszómagátlók hatása a p.E87G_p.E93G kettős mutáns csökkent fehérjeszintjére. A vad típusú fehérjét és a kettős mutáns variánst transzfeccióval fejeztük ki HEK293T sejtekben. A transzfecciót követően (12 óra elteltével) kezeltük a sejteket 2 μM MG132 (A) és 5 μM laktaciszttin (B) proteaszómagátlókkal 24 órán keresztül. A Western blot analízist (50 μg fehérje) az Ncb5or és β-aktin elleni specifikus ellenanyagokkal végeztük. A jelölődés intenzitásának denzitometriás kiértékelését ImageQuant 5.2 program segítségével végeztük. Az oszlopdiaagramok (3 független kísérletből származó eredmények) a β-aktinra normalizált és a vad típusához viszonyított relatív denzitás értékeket mutatják. ** P<0,01

Mind az MG132-vel, mind a laktaciszttinnel végzett kezelés jelentősen megnövelte az Ncb5or fehérje sejtizátumban detektálható mennyiségét (29. ábra). Míg a laktaciszttin teljes mértékben megakadályozta a kettős mutáns proteaszómális degradációját (29./B ábra), addig az MG132 az alkalmazott koncentráció mellett csak részlegesen védte ki a fehérje fokozott degradációját (29./A ábra).

5. Megbeszélés

Az ER az intracelluláris homeosztázisban kiemelkedő jelentőségű, valódi metaboli-
 kus kompartmentként a külső és belső környezet változásaira érzékenyen reagálva
 hatékonyan modulálja a sejt egészségének működését. Membránja fehérjében gazdag, foly-
 tonos lipid-kettősréteg hálózat, amely vázat biztosít a hidrofób molekulák (koleszterin,
 foszfolipidek, trigliceridek és xenobiotikumok) enzimatis reakciói számára, és egyú-
 tal elválasztja a lumen speciális mikrokörnyezetét a citoplazmától [7]. Az ER-membrán
 szelektív permeabilitásának köszönhetően a citoplazmától karakterisztikusan különböző
 belső milió alakul ki, amelyet redox rendszereinek eltérő státusza és kapcsolatai, vala-
 mint több nagyságrenddel nagyobb kalciumkoncentráció jellemez. Az ER sejten belüli
 nutriensszenzorként is működik, és e funkciójában redox rendszerei kiemelt szerephez
 jutnak. A lumenben zajló enzimatis folyamatok számára elengedhetetlen a
 kompartment tiol-oxidáló környezete és piridin-dinukleotid-készletének redukált állapo-
 ta, amely redox viszonyokat az organellum saját enzimaktivitásai tartják fenn [2, 125].
 A magas [NADPH]:[NADP⁺] arányt a H6PD és a G6PT együttműködése biztosítja.
 A képződő NADPH-t a kortizoltermelő 11βHSD1 használja fel a glukokortikoid cél-
 szervekben [126]. A G6PT-H6PD-11βHSD1 triád működését, a piridin-dinukleotid
 készlet redukáltsági állapotát, és így a lokális kortizolhatást is befolyásolja a sejt táp-
 anyag-ellátottsága [7].

Munkacsoportunk az ER transzportfolyamatait és luminális redox rendszereit ta-
 nulmányozva számos új megfigyeléssel járult hozzá a tiol-diszulfid redox rendszer
 elektrontranszferének, valamint a G6PT-H6PD-11βHSD1 triád fiziológiás és patológiás
 szerepének megismeréséhez [3, 33, 34]. A hosszan fennálló tápanyag-túlkínálat, vagyis
 a túltáplált sejt a megnövekvő G6P és F6P mennyiségén keresztül a luminális NADPH-
 szint emelésével a kortizol fokozott prepreceptorális aktiválódásához vezet, ami közre-
 játszik a metabolikus szindróma és diabétesz kialakulásában [56]. Az elhízással
 összefüggő anyagcsere-betegségekben szintén fontos szerepet játszik a telített zsírsavak
 (lipo)toxicitása.

A *de novo* zsírsav-bioszintézis során létrejövő palmitinsav (C16:0) számos nem
 esszenciális zsírsav közös endogén prekursoraként szolgál. A citoplazmában KoA-hoz
 kapcsolódó palmitát kétszénatomos egységekkel hosszabbodhat (elongáció) és/vagy

különböző pozíciókban kettős kötéseket kaphat (deszaturáció). A táplálékból származó exogén esszenciális és nem esszenciális zsírsavak szintén KoA-hoz kötődve ugyanezen intracelluláris modifikációk eredményeként járulnak hozzá a komplex lipidek szintéziséhez szükséges kiegyensúlyozott zsíracil-KoA-kínálathoz.

A zsíracil-KoA-elongáz és -deszaturáz enzimszerek az ER membránjában helyezkednek el, és az általuk katalizált reakciók nem igénylik az acil-KoA intermedie-
rek ER-lumenbe való bejuttatását. A humán és állati sejtekben a zsíracil-KoA-
deszaturázok, a szintén az ER membránjában helyet foglaló citokróm P450
monooxygenázokhoz hasonlóan, egy elektrontranszfer-lánc terminális tagját alkotják
[127]. A NAD(P)H-től származó elektronokat a nem hem-vasat tartalmazó SCD enzim
számára a citokróm b5-reduktáz flavoprotein és a citokróm b5 hemoprotein közvetíti.
E két monomer dehidrogenáz enzim az organelum membránjának integráns fehérjéi
[128]. Polipeptid láncuk N-terminális része, azaz a b5-reduktáz FAD-tartalmú [129] és
a b5 hemet tartalmazó [130] katalitikus doménje, a lipid kettős réteg citoszolikus olda-
lán helyezkedik el, és a citoszolikus NAD(P)H készletet használva biztosít redukáló erőt
az acil-KoA-deszaturáció számára [14, 131].

A nemrégiben felfedezett Ncb5or flavohem reduktáz különösen azért keltette fel
érdeklődésünket, mert egy eddig ismeretlen, szolubilis mikroszomális oxidoreduktáz
létezése az ER lumen redox homeosztázisának lehetséges új kapcsolatait is felveti.
Ráadásul az Ncb5or szerkezete és a KO egér fenotípusa azt sugallja, hogy az enzim az
elektronok alternatív forrásával járul hozzá a deszaturációt végző SCD1 működéséhez.
Az Ncb5or citokróm b5-szerű és citokróm b5-reduktáz-szerű doménjei képesek a
NAD(P)H elektronjait mesterséges szubsztrátoknak átadni [99]. Habár fiziológias
szubsztrátja(i) még nem ismert(ek), és tényleges biológiai funkciója is felderítésre vár,
az enzim doménszerkezete alapján feltételezhető, hogy az Ncb5or részt vesz a zsírsav-
deszaturációhoz kapcsolódó elektrontranszferben. Az Ncb5or és az SCD1 feltételezett
funkcionális kapcsolatát az Ncb5or knock-out állatmodelleken megfigyelt fenotípusos
jegyek és jelenségek, úgymint a fehér zsírszövet állományának progresszív atrófiája és a
 $\Delta 9$ telítetlen/telített zsírsavak arányának jelentős csökkenése is alátámasztják [109].
Az Ncb5or-hiányos egerek hasnyálmirigy β -sejtjei fokozottan érzékenyek a telített
zsírsavak által kiváltott toxicitásra, amely szintén összefüggésbe hozható a deszaturáció
elégtelenségével. A fehérje fiziológias és patológias szerepére egyaránt rávilágít, hogy

hiányában a β -sejtek diszfunkciója és progresszív pusztulása az egerek 4-6 hetes korára inzulinhiányos diabétesz kialakulását eredményezi.

Az Ncb5or-t ER-ben lokalizálódó oxidoreduktázként emlegeti az irodalom. Membránkötő régió és horgonyzó motívum hiányában ugyanakkor a fehérje szolubilis, tehát ER-beli elhelyezkedése csak luminális topológiával értelmezhető. Ez azonban az ismertetett luminális redox homeosztázis értelmében számos fontos kérdést vet fel. Az enzim sejten belüli elhelyezkedésével kapcsolatban viszont némileg ellentmondásos adatokat közöltek. Elsőként az újonnan azonosított fehérje citoszolikus, perinukleáris lokalizációját jellemezték konfokális mikroszkópián alapulva [98]. Öt évvel később ezt a megállapítást a fehérje ER-ben való elhelyezkedésének közlése váltotta fel egér máj és HepG2 sejtek frakcionálása, valamint exogén Ncb5or-t termelő COS-7 sejteken végzett fluoreszcens immuncitokémia alapján [103].

Az, hogy az újonnan azonosított flavohem reduktáz az ER membránjának külső, citoplazma felőli vagy belső, luminális oldalán képes a zsírsav-deszaturáció számára az elektronok alternatív forrását biztosítani, nem csupán egyszerű topológiai kérdésfeltevés. Az Ncb5or citoplazmai elhelyezkedése esetén az enzim ugyanazzal a redox rendszerrel van kapcsolatban, amely a b5R és b5 enzimek közvetítésével amúgy is táplálja a zsírsav-deszaturációt, míg egy luminális enzim az organelum elzárt NADPH-készletére támaszkodva lenne képes a deszaturáció működését támogatni. Az ER membránja nem átjárható a NAD(P)^+ és NAD(P)H számára, így a lumen redox ciklusa nagymértékben független a citoszól redox állapotától [2]. Az ER-lumen $\text{NADP}^+:\text{NADPH}$ redox státusza a prereceptorális glukokortikoid-produkció meghatározója, amely a H6PD és $11\beta\text{HSD1}$ által katalizált reakciók eredőjeként alakul ki [126]. Amennyiben az Ncb5or képes a zsírsav-deszaturáció számára hozzáférhetővé tenni a luminális NADPH-t, ezzel közvetlen kapcsolatot teremtené a célsejtekben a celluláris lipidmetabolizmus és a prereceptorális hormonaktiválás között, ami a sejtorganellum nutriensszenzor funkciójának új mechanizmusát is jelentené. Ebben az esetben a $11\beta\text{HSD1}$ és az Ncb5or enzimek kompetálnának a H6PD által termelt NADPH készletért.

Mielőtt a vázolt összekötő funkció esetleges következményeinek vizsgálatát megkezdtük volna, egyértelműen tisztázni akartuk az Ncb5or sejten belüli elhelyezkedésének kérdését. A humán Ncb5or fehérje aminosavszekvenciájának

többféle algoritmus alapján elvégzett *in silico* analízise sem szignálpeptid motívumot, sem ER retenciós szignált nem derített fel a polipeptid láncban. A mikroszomális fehérjék általában két „targeting” szignált tartalmaznak: egy N-terminális vagy belső szignálpeptidet [132] és egy C-terminális ER retenciós szignál szekvenciát [133]. Ugyanakkor a polipeptid lánc ER retenciós szignáljának hiánya önmagában nem zárja ki az organelum lumenében való elhelyezkedést. Példaként említhető az ER retenciós szignál nélküli mikroszomális β -glukuronidáz, amely a HTEL ER retenciós szekvenciával rendelkező egazin [134] fehérjéhez asszociáltan helyezkedik el az organelum lumenében [135]. A lokalizáció kísérletes vizsgálatára többféle módszert is alkalmaztunk. Fluoreszcens mikroszkóppal meghatároztuk a mesterségesen létrehozott Ncb5or-EGFP fluoreszcens fúziós fehérje sejtben belüli elhelyezkedését. Immuncitokémiai analízist is végeztünk, amely során az endogén Ncb5or fehérje jelenlétét detektáltuk, miközben a sejtmagot és az ER-t is jelöltük. Emellett HEK293T, illetve HepG2 sejtekből differenciál-centrifugálással előállított frakciókban az egyes kompartmentek markerfehérjéit, illetve az Ncb5or fehérjét immunoblottal detektáltuk. Végezetül patkány májból izolált szubcelluláris frakciók vizsgálatával is ellenőriztük a sejtvonalak esetében kapott lokalizációt. A kísérleti eredményeink egybehangzóan azt mutatták, hogy az Ncb5or citoplazmatikus lokalizációjú fehérje, mivel a sejtfrakciók közül kizárólag a citoszolikus frakcióban volt kimutatható, illetve a fluoreszcens vizsgálatok során mind az endogén, mind az EGFP fúziós fehérje a sejtek citoplazmájában volt detektálható, és nem mutatott kolokalizációt az ER jelölésével.

A citoplazmai lokalizáció alapján kizárható, hogy az enzim közvetlenül az ER lumenális piridin-dinukleotid-készletét használja. Ezzel egybeesik azon kísérletünk eredménye is, melyben patkány máj mikroszóma preparátumot sztearil-KoA jelenlétében inkubáltunk, és folyamatos fluoreszcens detektálással ellenőriztük az intravezikuláris NAD(P)H-szint esetleges változását. Ahogy azt e kísérleti rendszerben többször kimutattuk, kortizon vagy metirapon hozzáadása a NAD(P)H jelentős oxidációját okozta, és ez G6P-tal nagyrészt ellensúlyozható. Az SCD1 szubsztrátja, a sztearil-KoA ismételt hozzáadásakor sem befolyásolta a lumenális piridin-dinukleotid redox státuszt.

Elvethető tehát az a hipotézisünk, hogy a zsírsav-deszaturáció a redukáló erő elterelésével befolyásolná a lokális kortizoltermelést, vagy hogy az ER különböző

táplálkozási tényezők hatására megváltozó luminális redox státusza közvetlen hatással lenne a telítetlen zsírsavak szintézisére. Az általunk kapott eredmények ugyanakkor nem mondanak teljesen ellent a korábban ER lokalizációt leíró közleménynek [103], hiszen továbbra sem zárható ki annak lehetősége, hogy bizonyos metabolikus körülmények között az Ncb5or direkt fizikai kapcsolatba kerüljön az SCD1-gyel, és átmenetileg lazán asszociálódjon az ER külső membránjához. A módszertani különbségek (pl. a szubcelluláris frakciók eltérő elválasztási módja, különböző markerfehérjék detektálása) nem magyarázzák kellőképpen a korábbi, jól kivitelezett és megfelelően dokumentált vizsgálat [103] és a jelen munka ellentétes következtetéseit. Sokkal valószínűbb, hogy a tenyésztett sejtek, illetve májszövet vizsgálata eltérő metabolikus állapotokban történt. További vizsgálatot igényel annak kiderítése, hogy a szabad, citoplazmai Ncb5or milyen hatásokra és milyen mechanizmusok révén transzlokálódhat az ER-membránban elhelyezkedő partneréhez.

Eredményeink fényében biztosnak látszik, hogy az enzim a citoszól felől biztosítja a NAD(P)H forrást, vagyis a klasszikus b5R és b5 enzimekkel közös redox rendszert közvetíti a zsírsav-deszaturáció számára. Izgalmas kérdésként vetődik fel tehát, hogy a két elektrontranszfer útvonal hogyan működik együtt, illetve kompetál egymással, és mi adja az alternatív utak létjogosultságát. Valószínűsíthető, hogy az Ncb5or fokozott SCD1 aktivitás esetén kapcsolódik be a megnövekvő elektronigény kielégítésébe, ezzel hozzájárulva a deszaturációs kapacitás átmeneti erősítéséhez. Lehetséges, hogy a szabályozás során nem a klasszikus elektrontranszfer egyes elemeinek indukciója következik be, hanem az Ncb5or mint kiegészítő elektronszállító lép működésbe. Érdeemes megvizsgálni azt a lehetőséget is, hogy az Ncb5or nem – vagy nem csak – a deszaturációs elektrontranszferben vesz részt. Az ER-membránban elhelyezkedő és a biotranszformáció I. fázisának legtöbb reakcióját katalizáló citokróm P450 izoenzimeket (CYP) általában magas indukálhatóság jellemzi, így aktivitásukat a kapcsolódó elektrontranszfer-lánc teljesítménye limitálhatja. A működésükhöz szükséges elektronokat a NADPH-CYP-oxidoreduktáz (POR) enzim közvetítésével kapják, de bizonyos izoenzimek az SCD1-et is ellátó b5-től is vehetnek át elektront [136, 137]. Az SCD1 és CYP enzimek tehát egyaránt képesek a NAD(P)H-ról származó elektronokat az ER-membrán b5R és b5 fehérjéi közvetítésével fogadni. Elképzelhető

tehát, hogy az Ncb5or a xeno- és endobiotikumok metabolizmusában meghatározó egyes CYP enzimekkel (is) kölcsönhatásba, illetve funkcionális kapcsolatba léphet.

Számos megfigyelés támasztja alá, hogy az ER-stressz kialakulása jelentős szerepet játszik a pankreász β -sejtek palmitát által indukált lipotoxicitásában [138-140], amely súlyosboda (lipo)apoptózist [141] is kiválthat. Palmitátkezelés hatására az ER-stressz és az UPR korábban és súlyosabb mértékben jelentkezik az Ncb5or-deficiens hepatocitákban, mint a vad típusú sejtek esetén [112]. Az Ncb5or-hiányos β -sejtek fokozott zsírsavérzékenysége is közrejátszik a β -sejtfunkciók romlásában és a β -sejttömeg jelentős csökkenésében, azáltal az Ncb5or-génkiütött egerek inzulinhiányos diabétesznek kialakulásában is [107, 109, 110]. A knock-out állatmodell fenotípusa alapján felmerül, hogy olyan mutációk, amelyek az Ncb5or fehérje funkcióképtelen vagy csökkent aktivitású változatait eredményezik, humán diabéteszben is kóroki jelentőséggel bírhatnak.

Az *NCB5OR*-mutációk és a diabétesz kapcsolatáról nagyon kevés adat áll rendelkezésre. Egy humán genetikai analízisben minor korrelációt mutattak ki az *NCB5OR* gén polimorfizmusa és a 2-es típusú diabétesz között. A vizsgált variánsok közül csupán egy esetében írtak le szignifikáns asszociációt 2-es típusú diabéteszrel eset-kontroll analízis során [114]. A vizsgálatban két kivétellel intronikus variánsok szerepeltek, melyek tehát nem járulnak hozzá jelentős mértékben a betegség patogeneziséhez, azonban további mutációk, különösen az exonban helyet foglalók vizsgálata értékes összefüggésekkel szolgálhat. Érdekes, hogy az *NCB5OR* génben bekövetkezett mutációk gyakoriságát szignifikánsan emelkedettnek találták humán emlődagantok genetikai analízise során [108]. Vagyis a nem autoimmun diabétesz fenotípusokban és a tumorbiológiában egyaránt további asszociációs és funkcionális vizsgálatokra volna szükség az *NCB5OR*-mutációk lehetséges szerepének tisztázásához. Az Ncb5or-rel kapcsolatos kutatásunk másik fő célkitűzése éppen olyan exonikus, aminosavcserét okozó mutációk sejtrendszerben történő vizsgálata volt, amelyek esetleg funkcióvesztést eredményezve a fehérjében, diabéteszrel is összefügghetnek.

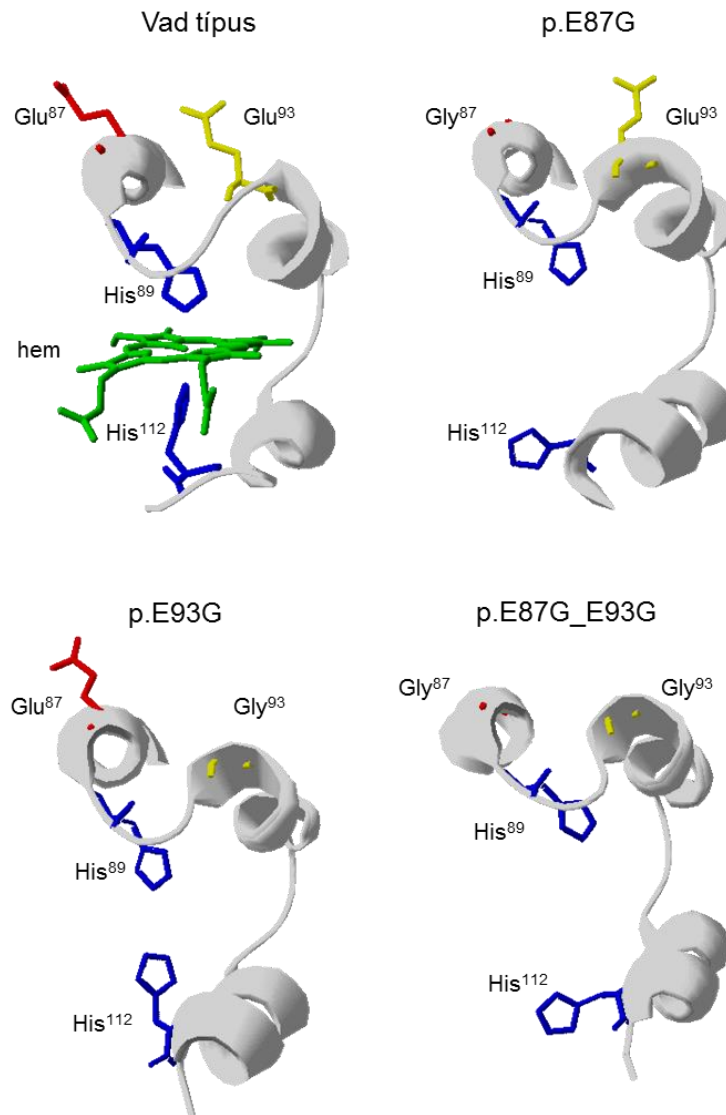
A vizsgálat megkezdésekor az NCBI SNP és 1000 Genom adatbázisok segítségével öt természetes *NCB5OR*-mutációt tudtunk kijelölni, amelyek célkitűzésünknek megfeleltek. A kiválasztott, mutáns változatokat *in vitro* mutagenézissel hoztuk létre, majd a vad típusú és mutáns variánsokat tranziens

transzfeccióval fejeztük ki HEK293 és HepG2 humán sejteken. A harmadik exonban előforduló, 87-es és 93-as pozícióban Glu-Gly aminosavcserét eredményező mutációk esetén a fehérjeszintek lényeges csökkenését tapasztaltuk. A p.E87G és p.E93G variánsok Glu-Glu epitóp „tag”-gel ellátott változatait is elkészítettük. A fehérjeszint-csökkenés mértékét az epitóp címkére specifikus ellenanyaggal ellenőriztük, mert ennek használatával egyrészt elkülönült az endogén és a termeltetett fehérje, másrészt elkerülhető volt a mutáns variánsok esetleg eltérő immunreaktivitásából adódó hiba. Előállítottuk a két aminosavcserét együtt tartalmazó fehérjét is, és további fehérjeszint-csökkenést észleltünk, vagyis a két mutáció egymással szinergisztikus hatást mutatott. Proteaszómagátlókkal az észlelt változások szinte teljesen kivédhetőek voltak, ami a mutánsok gyorsult degradációjára utal. A p.E87G variáns esetében a fehérje féléletidejét is meghatároztuk, és azt találtuk, hogy az drasztikusan, 14,2 órától 1,5 órára csökkent.

A Glu⁸⁷ és Glu⁹³ az *NCB5OR* gén harmadik exonjában kódolt aminosavak, melyek a fehérje b5-szerű doménjében helyezkednek el, közel a hemkötő zsebhez. Az *Ncb5or*-ben a két, kötésben részt vevő hisztidin (His⁸⁹ és His¹¹²) imidazol gyűrűi – egyedülállóan – közel ortogonális síkban helyezkednek el. A hemkötő His¹¹² oldallánc különleges térállása a hem körüli, Glu⁸⁷ és Glu⁹³-ot is tartalmazó két hélix-hurok-hélix motívum karakterisztikus konformációja által alakul ki. A Glu⁹³ aminosav emlősökben erősen konzervált, ami igaz a Glu⁸⁷-re is azzal a kiegészítéssel, hogy ez néhány gerinces esetében Asp-tal szubsztituált [99]. Feltételezhető tehát, hogy ezek hozzájárulnak a polipeptid konformációjának stabilitásához a hemkötő motívum közelében. A b5-szerű domén szerkezetének ismeretében I-TASSER fehérjeszerkezet-jósló program segítségével ezért elemeztük, hogy milyen mértékű változás következhet be a mutánsok hemkötő hisztidinjeinek térállásában. Az *in silico* modellezés a b5-szerű domén hemkötő zsebének markáns módusulásait mutatta a fehérjeszint-csökkenéssel járó *Ncb5or*-mutációk esetén, és a fehérjeszint-csökkenés korrelált a szerkezeti torzulás mértékével. A hemkötő His¹¹² számított elmozdulása sokkal kifejezettebb a p.E87G, mint a p.E93G variánsnál, és a dupla mutáció a b5 domén szerkezeti torzulásra is szinergisztikus hatást gyakorol (30. ábra).

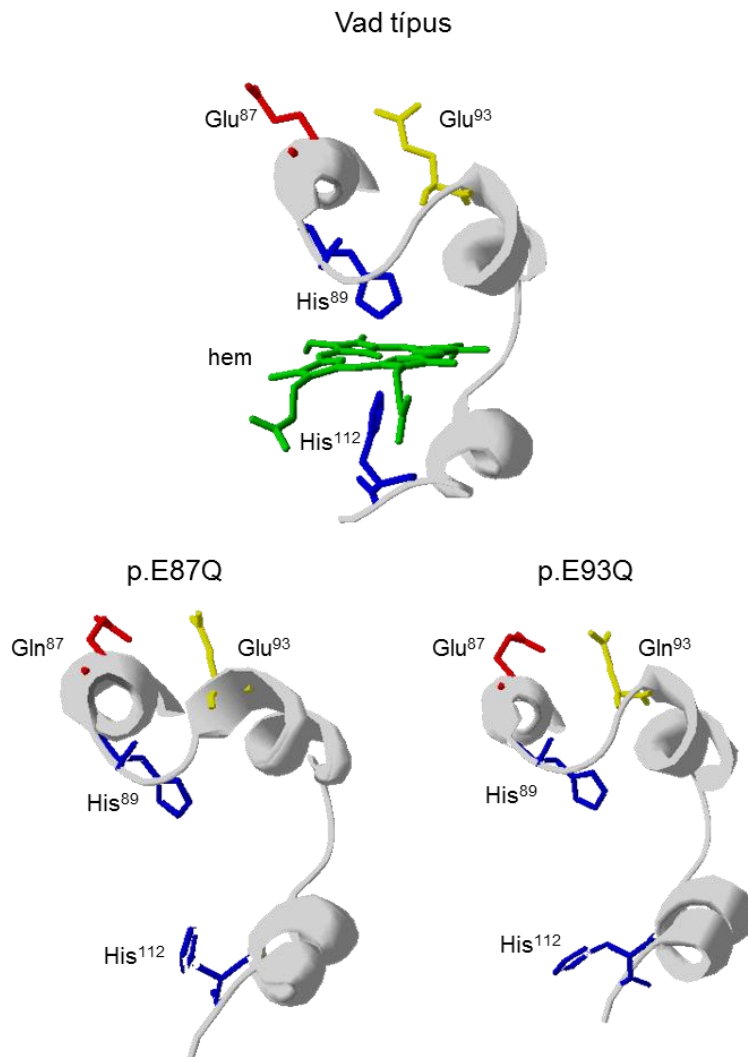
A hemoproteinek stabil konformációs állapotának elérésében általában nagy szerepe van a hem kötésének [142]. A c típusú citokrómok például nem képesek megfelelően tekeredni a prosztetikus csoport hiányában, és így az apoenzim lebontásra

kerül [143]. A patkány citokróm b5 fehérje esetében vizsgáltak olyan mutációkat, amelyek a hem affinitását csökkentették, és ezáltal a holoenzim jelentős destabilizációját eredményezték [144]. A hemkötés sérülése tehát magyarázatul szolgálhat a két mutáns Ncb5or fehérje destabilizálódására és fokozott proteaszómális lebontására.



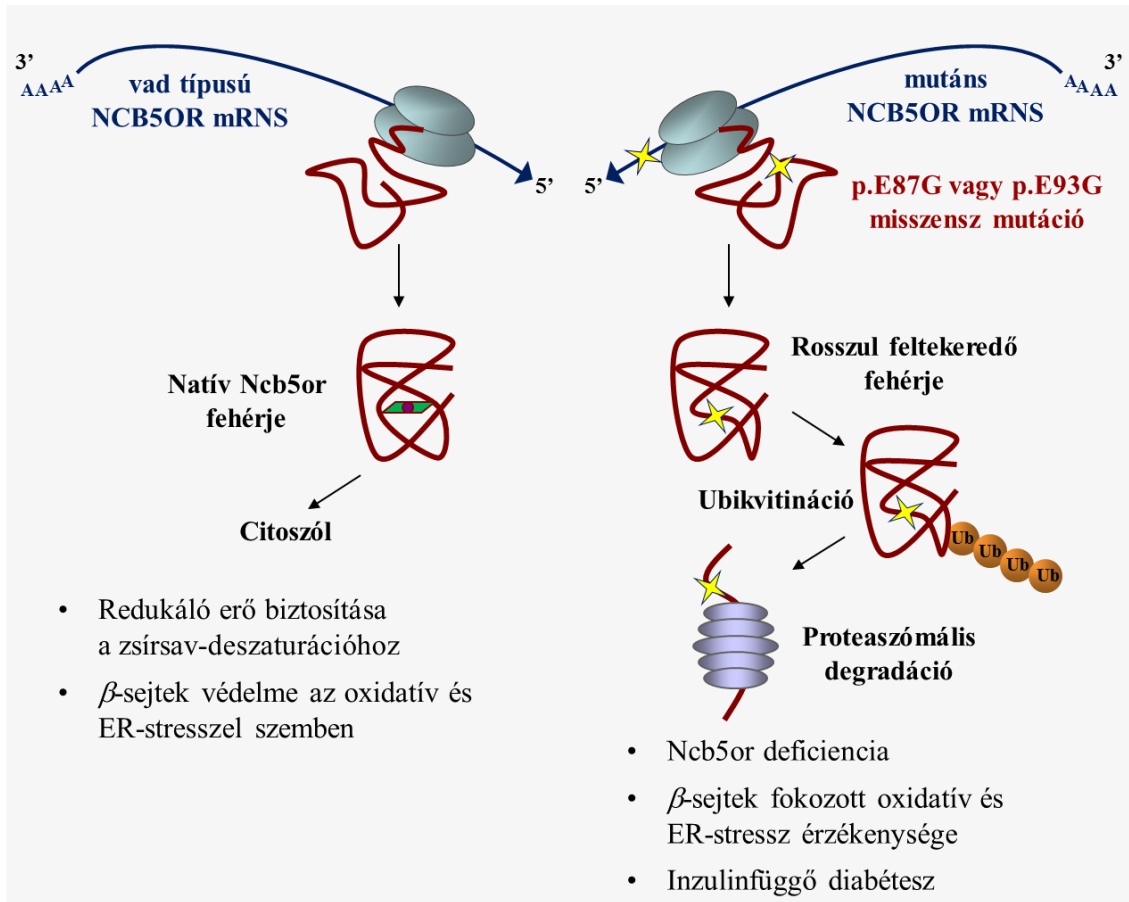
30. ábra. A p.E87G és p.E93G természetes aminosavcserék valószínűsíthető hatása az Ncb5or fehérje b5 doménjének 3D szerkezetére. A vad típusú Ncb5or fehérje b5 doménjének kristályszerkezetét a PDB adatbázisból (3LF5-ös fájl) értük el. A vizsgált mutációk 3D fehérjeszerkezetben bekövetkező változásait I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) program segítségével prediktáltuk. A képeket DeepView/Swiss-Pdb Viewer version 4.0.2 (www.expasy.org/spdbv/) program segítségével jelenítettük meg.

Tovább vizsgálva az aminosavcserék térszerkezetre gyakorolt hatását kiderült az is, hogy a 87-es és 93-as pozícióban lévő konzervált glutamát poláros természete mellett az aminosav negatív töltése is fontos szerepet játszik a fehérje konformációjának stabilizálásában. Amikor ugyanis valamelyik glutamát helyett glutamint kódoló mesterséges génvariánsokat hoztunk létre (p.E87Q és p.E93Q mutánsok), amelyekben az oldallánc mérete és hidrofil jellege megmaradt, de töltése elveszett, ugyancsak szignifikáns, nagyjából 50%-os fehérjeszint-változást észleltünk a vad típushoz képest. Ezzel összhangban a töltés elvesztésének hatására a hemkötő zseb szerkezetének torzulása is valószínűsíthető a számítógépes predikció szerint (31. ábra). Igaz azonban, hogy a megfelelő Glu-Gly cserékhez képest ötször (p.E87G), illetve két és félszer (p.E93G) nagyobb mennyiségben fejeződtek ki az E-Q mutánsok. Elmondható tehát, hogy a fehérje stabilitása szempontjából nagyobb jelentősége van a 87-es és 93-as pozíciókban lévő oldallánc hidrofil jellegének, mint negatív töltésének.



31. ábra. A p.E87Q és p.E93Q mesterséges aminosavcserék valószínűsíthető hatása az Ncb5or fehérje b5 doménjének 3D szerkezetére. A vad típusú Ncb5or fehérje b5 doménjének kristályszerkezetét a PDB adatbázisból (3LF5-ös fájl) értük el. A vizsgált mutációk 3D fehérjeszerkezetben bekövetkező változásait I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) program segítségével prediktáltuk. A képeket DeepView/Swiss-Pdb Viewer version 4.0.2 (www.expasy.org/spdbv/) program segítségével jelenítettük meg.

Az Ncb5or misszensz mutációinak részletes vizsgálatából megállapítható, hogy a fehérje 87-es és 93-as pozícióiban elhelyezkedő glutamát aminosavaknak jelentős szerepe van a natív térszerkezet stabilitásában. A természetesen előforduló p.E87G és a p.E93G, valamint a mesterségesen előidézett p.E87Q és p.E93Q mutációk által okozott konformációváltozás a b5-szerű doménben feltehetőleg csökkenti a hem kötődését, és ezáltal egyben fokozza a fehérje proteaszómális lebomlását.



32. ábra. Az Ncb5or fehérje valószínűsített funkciója és a féléletidejét rövidítő misszensz mutációk feltételezett *in vivo* következményei (összefoglaló ábra).

A hemkötő hisztidinek közelében elhelyezkedő konzervált aminosavak töltésének megváltozása és oldalláncuk elvesztése együttesen eredményezi a fehérje intracelluláris szintjének jelentős csökkenését. Vizsgálataink az első *in vitro* bizonyítékkal szolgálnak a humán Ncb5or természetesen előforduló mutációinak fehérjeszint-csökkenést eredményező hatásáról. Az Ncb5or fehérje csökkent expressziója – a knock-out állatmodell alapján – a humán diabétesz kialakulásában is szerepet játszhat; ennek bizonyítása azonban további kutatást igényel. Ugyanakkor a vad típusú fehérjéről az is bebizonyosodott, hogy valószínűsített funkciójának ellátásához, a zsírsav-deszaturációban való részvételekor (és a pankréász β -sejtek lipotoxicitás elleni védelméhez) a citoplazmában található redox rendszerre támaszkodik (32. ábra). Feltételezhető, hogy ilyenkor átmenetileg hozzákapszolódik az ER-membrán citoszolikus felszínéhez, ami a lokalizációra vonatkozó ellentmondásos eredmények magyarázatául is szolgálhatna.

6. Következtetések

Munkánk során egyrészt a humán Ncb5or fehérje szubcelluláris lokalizációját kívántuk tisztázni, másrészt megvizsgáltuk a humán *NCB5OR* gén ismert, exonikus misszensz mutációit abból a szempontból, hogy okoznak-e olyan fehérjeszint-csökkenést, ami esetleg kapcsolatba hozható a diabétesz kialakulásával. Eredményeink alapján az alábbi következtetésekre jutottunk:

1. Az Ncb5or fehérje nem tartalmaz olyan ismert célba juttató “targeting” szignálokat, amelyek az enzimet az ER-be irányítanák, illetve az ER-ben tartanák. A fehérje – akár endogén, akár exogén termelődésű – különböző vizsgálati módszerekkel a citoszólban volt kimutatható, és nem mutatott kolokalizációt az ER markerfehérjével. Az Ncb5or tehát citoplazmatikus enzim, amely nem áll szoros és tartós kapcsolatban az ER-rel.
2. A máj mikroszómához adott sztearoil-KoA nem befolyásolta az elektronforrásként rendelkezésre álló intravezikuláris NAD(P)H mennyiségét, ami az Ncb5or kimutatott lokalizációjával összhangban azt mutatja, hogy az ER citoplazmai felszínén működő SCD enzim aktivitása nincs közvetlen összefüggésben a luminális piridin-dinukleotidok redox rendszerével. Az Ncb5or tehát nem létesít funkcionális összeköttetést a zsírsav-deszaturáció és a prereceptorális kortizolaktiválás között.
3. A humán *NCB5OR* p.E87G és p.E93G aminosavcserét okozó természetes misszensz mutációi a fehérje mennyiségének jelentős csökkenését eredményezik a vizsgált humán sejtvonalakban. A knock-out egér fenotípusának ismeretében ez felveti a két humán mutáció diabétesz kialakulásában betöltött szerepének lehetőségét.
4. A humán Ncb5or p.E87G és p.E93G aminosavcseréi markánsan és szinergisztikusan rövidítik a mutáns fehérjevariánsok intracelluláris féléletidejét. Mindkét mutáció fehérjeszint-redukáló effektusa hatékonyan kivédhető proteaszómagátlókkal. A két vizsgált mutáció tehát azáltal csökkenti az Ncb5or

enzim mennyiségét, hogy gyorsítja a fehérje proteaszomális lebontását, és ez valószínűleg a polipeptid destabilizálásának következménye.

5. A természetes p.E87G és p.E93G, valamint mesterséges p.E87Q és p.E93Q mutációk vizsgálata azt mutatta, hogy a két evolúciósan konzervált glutamát egység negatív töltésének, illetve hidrophil oldalláncának megléte egyaránt szükséges az Ncb5or stabilitásához, vagyis hosszú féléletidejének fenntartásához. Korrelációt találtunk a fehérje b5-szerű doménjében számított térszerkezeti változás és a fehérjeszint-csökkenés mértéke között. Az Ncb5or 87-es és 93-as glutamát oldalláncait érintő misszensz mutációk fehérjedestabilizáló hatásában tehát szerepet játszhat a b5-szerű domén hemkötő régiójának torzulása.

Az új oxidoreduktázzal kapcsolatban tett megfigyeléseink választ adnak a célkitűzések során feltett kérdéseinkre, ugyanakkor újabbakat is felvetnek. További kutatásnak kell tisztáznia, miért van szükség a zsírsav-deszaturációhoz kapcsolódó elektrontranszfer alternatív útvonalára, ha az ugyanazt a celluláris NAD(P)H-készletet használja, mint a már meglévő komponensek. Vizsgálni kell, milyen hatások váltják ki, illetve fokozzák az Ncb5or részvételét a deszaturációban, valamint, hogy milyen egyéb redox folyamatokban közreműködhet. Érdeemes továbbá annak is utána járni, hogy egyes mutációk, hogyan befolyásolják a fehérje különleges hemkötő régiójának szerkezetét, és hogy a prosztetikus csoport iránti affinitás esetleges változása mekkora szerepet játszik a polipeptidlánc gyorsult degradációjában.

7. Összefoglalás

A nemrégiben azonosított Ncb5or fúziós fehérje a mikroszomális citokróm b5-reduktáz flavoproteinnel és a citokróm b5 hemoproteinnel homológ doméneket tartalmaz, amely alapján valószínűsíthető, hogy részt vesz a zsírsav-deszaturációhoz kapcsolódó elektrontranszferben. E feltételezést megerősíti az Ncb5or-hiányos egerekben észlelt lipoatrófia és a lipotoxicitás iránti fokozott érzékenység, ami a pankreász β -sejtek progresszív pusztulása miatt inzulinhiányos diabéteszt eredményez. Az Ncb5or-t azonosítói elsőként citoszolikus, majd később ER-beli fehérjeként határozták meg. Utóbbi változat felveti azt a lehetőséget, hogy a szolubilis enzim összekapcsolja az ER-lumenében zajló prereceptorális kortizoltermelést a membránban zajló deszaturációval, ami biológiai és orvosi szempontból egyaránt igen nagy jelentőséggel bírna. Célul tűztük ki az enzim ellentmondásos szubcelluláris lokalizációjának (ER vagy citoszól) tisztázását, és ezáltal a lokális hormonaktiválódás és zsírsav-anyagsere funkcionális kapcsolatának vizsgálati lehetőségét. Mivel az enzim hiánya a humán diabétesz kialakulásában is szerepet játszhat, megvizsgáltuk, hogy az Ncb5or természetes misszensz mutációi hogyan befolyásolják a fehérje expresszióját. A lokalizáció vizsgálatát HEK293T és HepG2 sejtek, valamint patkány májszövet szubcelluláris frakcióinak elválasztását követő immunoblot analízissel, az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje fluoreszcens, illetve az endogén fehérje immunfluoreszcens detektálásával végeztük. Az Ncb5or mutáns változatokat *in vitro* mutagenézissel hoztuk létre, majd a vad típusú és mutáns variánsok tranziens transzfekcióját követően az mRNS- és fehérjeszinteket qPCR, illetve Western blot alkalmazásával tanulmányoztuk.

Eredményeink egybehangzóan az Ncb5or citoplazmatikus lokalizációját mutatták, így kizárható, hogy az enzim közvetlenül az ER luminális piridin-dinukleotidjait használja. Azonosítottunk a humán fehérjében két Glu-Gly-cserét (p.E87G, p.E93G) okozó természetes mutációt, amelyek az Ncb5or szintjét jelentősen csökkentik a sejtben. Kimutattuk, hogy a jelenség magyarázata a destabilizálódott fehérje felgyorsult proteasomális lebontása, illetve ennek következtében megrövidült féléletideje. A 3D szerkezet predikciója valószínűsíti, hogy e két aminosavcsere jelentős változást okoz az enzim b5-szerű doménjének hemköti régiójában. Eredményeink felvetik a vizsgált mutációk és diabétesz közti összefüggés lehetőségét.

8. Summary

The recently identified fusion protein, Ncb5or contains two redox domains which are homologous to cytochrome b5 reductase flavoprotein and cytochrome b5 hemoprotein. This structure strongly suggests the role of the enzyme in fatty acid desaturation, which is further supported by both lipoatrophy and sensitization to lipotoxicity observed in Ncb5or knock-out mice. This phenotype results in insulin-deficient diabetes due to the progressive loss of β -cells. Ncb5or was first identified as a cytosolic and subsequently as a microsomal protein. The putative ER localization of the protein raises the possibility that the soluble enzyme links the prereceptorial cortisol production in the lumen with desaturation in the membrane, which would be of great biological and medical significance. Therefore, we aimed to elucidate the subcellular localization of this soluble protein, and thus the possible functional linkage between local hormone activation and fatty acid metabolism. Since Ncb5or deficiency might have a role in the development of human diabetes, the present work also aimed to study the effect of natural exonic missense mutations on the expression of human Ncb5or. The location of endogenously expressed Ncb5or was assessed in human cell lines, as well as rat liver tissue by immunoblot analysis after separating subcellular fractions by differential centrifugation. The EGFP-Ncb5or fusion protein was detected by fluorescent microscopy and the endogenous protein was also visualized by using immunocytochemistry. Missense mutations were generated by *in vitro* mutagenesis, and after transient transfection of wild type and mutant variants, mRNA and protein levels were studied using qPCR and Western blot. Our results clearly confirm that Ncb5or is localized in the cytoplasm in cultured cells and in liver *in vivo*. Therefore, the utilization of ER luminal pyridine dinucleotides by this enzyme can be ruled out. We identified two natural mutations caused by Glu-Gly replacements (p.E87G, p.E93G) in the human enzyme leading to a remarkable decrease in Ncb5or protein level. This phenomenon was due to enhanced proteasomal degradation and consequently shortened half-life of these destabilized variants. The predicted 3D structure of the protein suggested that these amino acid replacements caused significant conformational alterations in the hem binding region of the b5-like domain. Our findings suggest a possible relationship between the studied mutations and human diabetes.

9. Irodalomjegyzék

1. Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. (2002) Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*, 3(10):944-950.
2. Csala M, Banhegyi G, Benedetti A. (2006) Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment. *FEBS Lett*, 580(9):2160-2165.
3. Csala M, Margittai E, Banhegyi G. (2010) Redox control of endoplasmic reticulum function. *Antioxid Redox Signal*, 13(1):77-108.
4. Meldolesi J, Pozzan T. (1998) The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci*, 23(1):10-14.
5. Csala M, Kereszturi E, Mandl J, Banhegyi G. (2012) The endoplasmic reticulum as the extracellular space inside the cell: role in protein folding and glycosylation. *Antioxid Redox Signal*, 16(10):1100-1108.
6. 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.
7. 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.
8. Tu BP, Weissman JS. (2004) Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol*, 164(3):341-346.
9. Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF. (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, 257(5076):1496-1502.
10. Piccirella S, Czegle I, Lizak B, Margittai E, Senesi S, Papp E, Csala M, Fulceri R, Csermely P, Mandl J, Benedetti A, Banhegyi G. (2006) Uncoupled redox systems in the lumen of the endoplasmic reticulum. Pyridine nucleotides stay reduced in an oxidative environment. *J Biol Chem*, 281(8):4671-4677.
11. Black SD. (1992) Membrane topology of the mammalian P450 cytochromes. *FASEB J*, 6(2):680-685.

12. Paton CM, Ntambi JM. (2009) Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(1):E28-37.
13. Pudney CR, Khara B, Johannissen LO, Scrutton NS. (2011) Coupled motions direct electrons along human microsomal P450 Chains. *PLoS Biol*, 9(12):e1001222.
14. Oshino N, Imai Y, Sato R. (1971) A function of cytochrome b5 in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. *J Biochem*, 69(1):155-167.
15. Pollak N, Dolle C, Ziegler M. (2007) The power to reduce: pyridine nucleotides-small molecules with a multitude of functions. *Biochem J*, 402(2):205-218.
16. 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.
17. Ozols J. (1995) Luminal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem*, 270(5):2305-2312.
18. Tie JK, Stafford DW. (2016) Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *J Thromb Haemost*, 14(2):236-247.
19. Stewart PM, Krozowski ZS. (1999) 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm*, 57:249-324.
20. Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM. (2004) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev*, 25(5):831-866.
21. Marcolongo P, Piccirella S, Senesi S, Wunderlich L, Gerin I, Mandl J, Fulceri R, Banhegyi G, Benedetti A. (2007) The glucose-6-phosphate transporter-hexose-6-phosphate dehydrogenase-11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 system of the adipose tissue. *Endocrinology*, 148(5):2487-2495.
22. Hughes KA, Manolopoulos KN, Iqbal J, Cruden NL, Stimson RH, Reynolds RM, Newby DE, Andrew R, Karpe F, Walker BR. (2012) Recycling between

- cortisol and cortisone in human splanchnic, subcutaneous adipose, and skeletal muscle tissues in vivo. *Diabetes*, 61(6):1357-1364.
23. Margittai E, Banhegyi G. (2008) Isocitrate dehydrogenase: A NADPH-generating enzyme in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys*, 471(2):184-190.
 24. Marcolongo P, Senesi S, Giunti R, Csala M, Fulceri R, Banhegyi G, Benedetti A. (2011) Expression of hexose-6-phosphate dehydrogenase in rat tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 126(3-5):57-64.
 25. Senesi S, Csala M, Marcolongo P, Fulceri R, Mandl J, Banhegyi G, Benedetti A. (2010) Hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum. *Biol Chem*, 391(1):1-8.
 26. Czegle I, Csala M, Mandl J, Benedetti A, Karadi I, Banhegyi G. (2012) G6PT-H6PDH-11betaHSD1 triad in the liver and its implication in the pathomechanism of the metabolic syndrome. *World J Hepatol*, 4(4):129-138.
 27. Gerin I, Van Schaftingen E. (2002) Evidence for glucose-6-phosphate transport in rat liver microsomes. *FEBS Lett*, 517(1-3):257-260.
 28. Szelenyi P, Revesz K, Konta L, Tutto A, Mandl J, Kereszturi E, Csala M. (2013) Inhibition of microsomal cortisol production by (-)-epigallocatechin-3-gallate through a redox shift in the endoplasmic reticulum--a potential new target for treating obesity-related diseases. *Biofactors*, 39(5):534-541.
 29. Atanasov AG, Nashev LG, Gelman L, Legeza B, Sack R, Portmann R, Odermatt A. (2008) Direct protein-protein interaction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum lumen. *Biochim Biophys Acta*, 1783(8):1536-1543.
 30. Banhegyi G, Benedetti A, Fulceri R, Senesi S. (2004) Cooperativity between 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 279(26):27017-27021.
 31. Draper N, Walker EA, Bujalska IJ, Tomlinson JW, Chalder SM, Arlt W, Lavery GG, Bedendo O, Ray DW, Laing I, Malunowicz E, White PC, Hewison M,

- Mason PJ, Connell JM, Shackleton CH, Stewart PM. (2003) Mutations in the genes encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nat Genet*, 34(4):434-439.
32. Kardon T, Senesi S, Marcolongo P, Legeza B, Banhegyi G, Mandl J, Fulceri R, Benedetti A. (2008) Maintenance of luminal NADPH in the endoplasmic reticulum promotes the survival of human neutrophil granulocytes. *FEBS Lett*, 582(13):1809-1815.
 33. Kereszturi E, Kalman FS, Kardon T, Csala M, Banhegyi G. (2010) Decreased prereceptorial glucocorticoid activating capacity in starvation due to an oxidative shift of pyridine nucleotides in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett*, 584(22):4703-4708.
 34. Banhegyi G, Csala M, Benedetti A. (2009) Hexose-6-phosphate dehydrogenase: linking endocrinology and metabolism in the endoplasmic reticulum. *J Mol Endocrinol*, 42(4):283-289.
 35. Guillou H, Zadavec D, Martin PG, Jacobsson A. (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res*, 49(2):186-199.
 36. Miyazaki M, Ntambi JM. (2003) Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 68(2):113-121.
 37. Enoch HG, Catala A, Strittmatter P. (1976) Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem*, 251(16):5095-5103.
 38. Hodson L, Fielding BA. (2013) Stearoyl-CoA desaturase: rogue or innocent bystander? *Prog Lipid Res*, 52(1):15-42.
 39. Castro LF, Wilson JM, Goncalves O, Galante-Oliveira S, Rocha E, Cunha I. (2011) The evolutionary history of the stearoyl-CoA desaturase gene family in vertebrates. *BMC Evol Biol*, 11:132.
 40. Flowers MT, Ntambi JM. (2008) Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 19(3):248-256.

41. Wang J, Yu L, Schmidt RE, Su C, Huang X, Gould K, Cao G. (2005) Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun*, 332(3):735-742.
42. Ntambi JM, Miyazaki M. (2004) Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res*, 43(2):91-104.
43. Cho HP, Nakamura MT, Clarke SD. (1999) Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase. *J Biol Chem*, 274(1):471-477.
44. Leonard AE, Kelder B, Bobik EG, Chuang LT, Parker-Barnes JM, Thurmond JM, Kroeger PE, Kopchick JJ, Huang YS, Mukerji P. (2000) cDNA cloning and characterization of human Delta5-desaturase involved in the biosynthesis of arachidonic acid. *Biochem J*, 347 Pt 3:719-724.
45. Strittmatter P, Spatz L, Corcoran D, Rogers MJ, Setlow B, Redline R. (1974) Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(11):4565-4569.
46. Ntambi JM. (1995) The regulation of stearyl-CoA desaturase (SCD). *Prog Lipid Res*, 34(2):139-150.
47. Hummasti S, Hotamisligil GS. (2010) Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res*, 107(5):579-591.
48. Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. (2012) Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med*, 18(1):59-68.
49. 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.
50. Walter P, Ron D. (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059):1081-1086.
51. Zheng Z, Zhang C, Zhang K. (2010) Role of unfolded protein response in lipogenesis. *World J Hepatol*, 2(6):203-207.

52. Dufey E, Sepulveda D, Rojas-Rivera D, Hetz C. (2014) Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307(7):C582-594.
53. Hotamisligil GS. (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, 140(6):900-917.
54. Iurlaro R, Munoz-Pinedo C. (2016) Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J*, 283(14):2640-2652.
55. 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.
56. Senesi S, Legeza B, Balazs Z, Csala M, Marcolongo P, Kereszturi E, Szelenyi P, Egger C, Fulceri R, Mandl J, Giunti R, Odermatt A, Banhegyi G, Benedetti A. (2010) Contribution of fructose-6-phosphate to glucocorticoid activation in the endoplasmic reticulum: possible implication in the metabolic syndrome. *Endocrinology*, 151(10):4830-4839.
57. Pereira CD, Azevedo I, Monteiro R, Martins MJ. (2012) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: relevance of its modulation in the pathophysiology of obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*, 14(10):869-881.
58. Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, Seckl JR, Mullins JJ. (2004) Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(18):7088-7093.
59. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. (2001) A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*, 294(5549):2166-2170.
60. Mazziotti G, Gazzaruso C, Giustina A. (2011) Diabetes in Cushing syndrome: basic and clinical aspects. *Trends Endocrinol Metab*, 22(12):499-506.
61. Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmoll D, Jamieson P, Best R, Brown R, Edwards CR, Seckl JR, Mullins JJ. (1997) 11beta-

- hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26):14924-14929.
62. Harris HJ, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR, Holmes MC. (2001) Intracellular regeneration of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-HSD)-1 plays a key role in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: analysis of 11beta-HSD-1-deficient mice. *Endocrinology*, 142(1):114-120.
 63. Lavery GG, Walker EA, Draper N, Jeyasuria P, Marcos J, Shackleton CH, Parker KL, White PC, Stewart PM. (2006) Hexose-6-phosphate dehydrogenase knock-out mice lack 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-mediated glucocorticoid generation. *J Biol Chem*, 281(10):6546-6551.
 64. Lavery GG, Hauton D, Hewitt KN, Brice SM, Sherlock M, Walker EA, Stewart PM. (2007) Hypoglycemia with enhanced hepatic glycogen synthesis in recombinant mice lacking hexose-6-phosphate dehydrogenase. *Endocrinology*, 148(12):6100-6106.
 65. Alberts P, Nilsson C, Selen G, Engblom LO, Edling NH, Norling S, Klingstrom G, Larsson C, Forsgren M, Ashkzari M, Nilsson CE, Fiedler M, Bergqvist E, Ohman B, Bjorkstrand E, Abrahmsen LB. (2003) Selective inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves hepatic insulin sensitivity in hyperglycemic mice strains. *Endocrinology*, 144(11):4755-4762.
 66. 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.
 67. Boden G. (2011) Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 18(2):139-143.
 68. Kazantzis M, Stahl A. (2012) Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1821(5):852-857.
 69. Yuzefovych L, Wilson G, Rachek L. (2010) Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6

- skeletal muscle cells: role of oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299(6):E1096-1105.
70. Barazzoni R, Zanetti M, Gortan Cappellari G, Semolic A, Boschelle M, Codarin E, Pirulli A, Cattin L, Guarnieri G. (2012) Fatty acids acutely enhance insulin-induced oxidative stress and cause insulin resistance by increasing mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation and nuclear factor-kappaB inhibitor (IkappaB)-nuclear factor-kappaB (NFkappaB) activation in rat muscle, in the absence of mitochondrial dysfunction. *Diabetologia*, 55(3):773-782.
 71. Banhegyi G, Csala M, Mandl J, Burchell A, Burchell B, Marcolongo P, Fulceri R, Benedetti A. (1996) Fatty acyl-CoA esters and the permeability of rat liver microsomal vesicles. *Biochem J*, 320 (Pt 1):343-344.
 72. Xu S, Nam SM, Kim JH, Das R, Choi SK, Nguyen TT, Quan X, Choi SJ, Chung CH, Lee EY, Lee IK, Wiederkehr A, Wollheim CB, Cha SK, Park KS. (2015) Palmitate induces ER calcium depletion and apoptosis in mouse podocytes subsequent to mitochondrial oxidative stress. *Cell Death Dis*, 6:e1976.
 73. Li H, Yu X. (2013) Emerging role of JNK in insulin resistance. *Curr Diabetes Rev*, 9(5):422-428.
 74. Zhou L, Cai X, Han X, Ji L. (2014) P38 plays an important role in glucolipotoxicity-induced apoptosis in INS-1 cells. *J Diabetes Res*, 2014:834528.
 75. Sieber J, Lindenmeyer MT, Kampe K, Campbell KN, Cohen CD, Hopfer H, Mundel P, Jehle AW. (2010) Regulation of podocyte survival and endoplasmic reticulum stress by fatty acids. *Am J Physiol Renal Physiol*, 299(4):F821-829.
 76. Nemcova-Furstova V, James RF, Kovar J. (2011) Inhibitory effect of unsaturated fatty acids on saturated fatty acid-induced apoptosis in human pancreatic beta-cells: activation of caspases and ER stress induction. *Cell Physiol Biochem*, 27(5):525-538.
 77. Bosma M, Dapito DH, Drosatos-Tampakaki Z, Huiping-Son N, Huang LS, Kersten S, Drosatos K, Goldberg IJ. (2014) Sequestration of fatty acids in

- triglycerides prevents endoplasmic reticulum stress in an in vitro model of cardiomyocyte lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta*, 1841(12):1648-1655.
78. 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.
 79. Diakogiannaki E, Welters HJ, Morgan NG. (2008) Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids. *J Endocrinol*, 197(3):553-563.
 80. Zhang Y, Dong L, Yang X, Shi H, Zhang L. (2011) alpha-Linolenic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of stearic acid lipotoxicity on primary rat hepatocytes. *Lipids Health Dis*, 10:81.
 81. Yamashita A, Hayashi Y, Nemoto-Sasaki Y, Ito M, Oka S, Tanikawa T, Waku K, Sugiura T. (2014) Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog Lipid Res*, 53:18-81.
 82. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, Schaffer JE. (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(6):3077-3082.
 83. Cheon HG, Cho YS. (2014) Protection of palmitic acid-mediated lipotoxicity by arachidonic acid via channeling of palmitic acid into triglycerides in C2C12. *J Biomed Sci*, 21:13.
 84. Cho YS, Kim CH, Kim KY, Cheon HG. (2012) Protective effects of arachidonic acid against palmitic acid-mediated lipotoxicity in HIT-T15 cells. *Mol Cell Biochem*, 364(1-2):19-28.
 85. Mantzaris MD, Tsianos EV, Galaris D. (2011) Interruption of triacylglycerol synthesis in the endoplasmic reticulum is the initiating event for saturated fatty acid-induced lipotoxicity in liver cells. *FEBS J*, 278(3):519-530.
 86. 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.

87. Iwai T, Kume S, Chin-Kanasaki M, Kuwagata S, Araki H, Takeda N, Sugaya T, Uzu T, Maegawa H, Araki SI. (2016) Stearoyl-CoA Desaturase-1 Protects Cells against Lipotoxicity-Mediated Apoptosis in Proximal Tubular Cells. *Int J Mol Sci*, 17(11).
88. Peter A, Weigert C, Staiger H, Machicao F, Schick F, Machann J, Stefan N, Thamer C, Haring HU, Schleicher E. (2009) Individual stearyl-coa desaturase 1 expression modulates endoplasmic reticulum stress and inflammation in human myotubes and is associated with skeletal muscle lipid storage and insulin sensitivity in vivo. *Diabetes*, 58(8):1757-1765.
89. Thorn K, Hovsepian M, Bergsten P. (2010) Reduced levels of SCD1 accentuate palmitate-induced stress in insulin-producing beta-cells. *Lipids Health Dis*, 9:108.
90. Janikiewicz J, Hanzelka K, Dziewulska A, Kozinski K, Dobrzyn P, Bernas T, Dobrzyn A. (2015) Inhibition of SCD1 impairs palmitate-derived autophagy at the step of autophagosome-lysosome fusion in pancreatic beta-cells. *J Lipid Res*, 56(10):1901-1911.
91. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD. (2002) Loss of stearyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(17):11482-11486.
92. Miyazaki M, Flowers MT, Sampath H, Chu K, Otzelberger C, Liu X, Ntambi JM. (2007) Hepatic stearyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metab*, 6(6):484-496.
93. Cai D, Fan J, Ma D, Wu Y, Lu Y. (2014) [SCD1 over-expression inhibits palmitic acid-induced apoptosis of rat BRL hepatocytes]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 22(1):48-52.
94. Li ZZ, Berk M, McIntyre TM, Feldstein AE. (2009) Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearyl-CoA desaturase. *J Biol Chem*, 284(9):5637-5644.

95. Cnop M, Ladriere L, Igoillo-Esteve M, Moura RF, Cunha DA. (2010) Causes and cures for endoplasmic reticulum stress in lipotoxic beta-cell dysfunction. *Diabetes Obes Metab*, 12 Suppl 2:76-82.
96. 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.
97. Green CD, Olson LK. (2011) Modulation of palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in pancreatic beta-cells by stearoyl-CoA desaturase and Elovl6. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 300(4):E640-649.
98. Zhu H, Qiu H, Yoon HW, Huang S, Bunn HF. (1999) Identification of a cytochrome b-type NAD(P)H oxidoreductase ubiquitously expressed in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26):14742-14747.
99. Deng B, Parthasarathy S, Wang W, Gibney BR, Battaile KP, Lovell S, Benson DR, Zhu H. (2010) Study of the individual cytochrome b5 and cytochrome b5 reductase domains of Ncb5or reveals a unique heme pocket and a possible role of the CS domain. *J Biol Chem*, 285(39):30181-30191.
100. Curry BJ, Roman SD, Wallace CA, Scott R, Miriami E, Aitken RJ. (2004) Identification and characterization of a novel splice variant of mouse and rat cytochrome b5/cytochrome b5 reductase. *Genomics*, 83(3):425-438.
101. Larade K, Jiang ZG, Dejam A, Zhu H, Bunn HF. (2007) The reductase NCB5OR is responsive to the redox status in beta-cells and is not involved in the ER stress response. *Biochem J*, 404(3):467-476.
102. Larade K, Bunn HF. (2006) Promoter characterization and transcriptional regulation of Ncb5or, a novel reductase necessary for pancreatic beta-cell maintenance. *Biochim Biophys Acta*, 1759(5):257-262.
103. Zhu H, Larade K, Jackson TA, Xie J, Ladoux A, Acker H, Berchner-Pfannschmidt U, Fandrey J, Cross AR, Lukat-Rodgers GS, Rodgers KR, Bunn HF. (2004) NCB5OR is a novel soluble NAD(P)H reductase localized in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 279(29):30316-30325.

104. Garcia-Ranea JA, Mirey G, Camonis J, Valencia A. (2002) p23 and HSP20/alpha-crystallin proteins define a conserved sequence domain present in other eukaryotic protein families. *FEBS Lett*, 529(2-3):162-167.
105. Goren MA, Fox BG. (2008) Wheat germ cell-free translation, purification, and assembly of a functional human stearoyl-CoA desaturase complex. *Protein Expr Purif*, 62(2):171-178.
106. Finn RD, McLaughlin LA, Hughes C, Song C, Henderson CJ, Roland Wolf C. (2011) Cytochrome b5 null mouse: a new model for studying inherited skin disorders and the role of unsaturated fatty acids in normal homeostasis. *Transgenic Res*, 20(3):491-502.
107. Xie J, Zhu H, Larade K, Ladoux A, Seguritan A, Chu M, Ito S, Bronson RT, Leiter EH, Zhang CY, Rosen ED, Bunn HF. (2004) Absence of a reductase, NCB5OR, causes insulin-deficient diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(29):10750-10755.
108. Xu M, Wang W, Frontera JR, Neely MC, Lu J, Aires D, Hsu FF, Turk J, Swerdlow RH, Carlson SE, Zhu H. (2011) Ncb5or deficiency increases fatty acid catabolism and oxidative stress. *J Biol Chem*, 286(13):11141-11154.
109. Larade K, Jiang Z, Zhang Y, Wang W, Bonner-Weir S, Zhu H, Bunn HF. (2008) Loss of Ncb5or results in impaired fatty acid desaturation, lipoatrophy, and diabetes. *J Biol Chem*, 283(43):29285-29291.
110. Wang W, Guo Y, Xu M, Huang HH, Novikova L, Larade K, Jiang ZG, Thayer TC, Frontera JR, Aires D, Ding H, Turk J, Mathews CE, Bunn HF, Stehno-Bittel L, Zhu H. (2011) Development of diabetes in lean Ncb5or-null mice is associated with manifestations of endoplasmic reticulum and oxidative stress in beta cells. *Biochim Biophys Acta*, 1812(11):1532-1541.
111. Guo Y, Xu M, Deng B, Frontera JR, Kover KL, Aires D, Ding H, Carlson SE, Turk J, Wang W, Zhu H. (2012) Beta-Cell Injury in Ncb5or-null Mice is Exacerbated by Consumption of a High-Fat Diet. *Eur J Lipid Sci Technol*, 114(3):233-243.

112. Zhang Y, Larade K, Jiang ZG, Ito S, Wang W, Zhu H, Bunn HF. (2010) The flavoheme reductase Ncb5or protects cells against endoplasmic reticulum stress-induced lipotoxicity. *J Lipid Res*, 51(1):53-62.
113. Miyazaki M, Kim YC, Gray-Keller MP, Attie AD, Ntambi JM. (2000) The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem*, 275(39):30132-30138.
114. Andersen G, Wegner L, Rose CS, Xie J, Zhu H, Larade K, Johansen A, Ek J, Lauenborg J, Drievholm T, Borch-Johnsen K, Damm P, Hansen T, Bunn HF, Pedersen O. (2004) Variation in NCB5OR: studies of relationships to type 2 diabetes, maturity-onset diabetes of the young, and gestational diabetes mellitus. *Diabetes*, 53(11):2992-2997.
115. Bonnefond A, Philippe J, Durand E, Dechaume A, Huyvaert M, Montagne L, Marre M, Balkau B, Fajardy I, Vambergue A, Vatin V, Delplanque J, Le Guilcher D, De Graeve F, Lecoœur C, Sand O, Vaxillaire M, Froguel P. (2012) Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified KCNJ11 as the thirteenth MODY gene. *PLoS One*, 7(6):e37423.
116. Frayling TM, Lindgren CM, Chevre JC, Menzel S, Wishart M, Benmezroua Y, Brown A, Evans JC, Rao PS, Dina C, Lecoœur C, Kanninen T, Almgren P, Bulman MP, Wang Y, Mills J, Wright-Pascoe R, Mahtani MM, Prisco F, Costa A, Cognet I, Hansen T, Pedersen O, Ellard S, Tuomi T, Groop LC, Froguel P, Hattersley AT, Vaxillaire M. (2003) A genome-wide scan in families with maturity-onset diabetes of the young: evidence for further genetic heterogeneity. *Diabetes*, 52(3):872-881.
117. Silander K, Scott LJ, Valle TT, Mohlke KL, Stringham HM, Wiles KR, Duren WL, Doheny KF, Pugh EW, Chines P, Narisu N, White PP, Fingerlin TE, Jackson AU, Li C, Ghosh S, Magnuson VL, Colby K, Erdos MR, Hill JE, Hollstein P, Humphreys KM, Kasad RA, Lambert J, Lazaridis KN, Lin G, Morales-Mena A, Patzkowski K, Pfahl C, Porter R, Rha D, Segal L, Suh YD, Tovar J, Unni A, Welch C, Douglas JA, Epstein MP, Hauser ER, Hagopian W, Buchanan TA, Watanabe RM, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke

- M. (2004) A large set of Finnish affected sibling pair families with type 2 diabetes suggests susceptibility loci on chromosomes 6, 11, and 14. *Diabetes*, 53(3):821-829.
118. Pierleoni A, Martelli PL, Fariselli P, Casadio R. (2006) BaCelLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics*, 22(14):e408-416.
119. Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK. (2006) Prediction of protein subcellular localization. *Proteins*, 64(3):643-651.
120. Pierleoni A, Martelli PL, Fariselli P, Casadio R. (2007) eSLDB: eukaryotic subcellular localization database. *Nucleic Acids Res*, 35(Database issue):D208-212.
121. Chou KC, Shen HB. (2010) A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: Euk-mPLoc 2.0. *PLoS One*, 5(4):e9931.
122. Hawkins J, Boden M. (2006) Detecting and sorting targeting peptides with neural networks and support vector machines. *J Bioinform Comput Biol*, 4(1):1-18.
123. Briesemeister S, Rahnenfuhrer J, Kohlbacher O. (2010) YLoc--an interpretable web server for predicting subcellular localization. *Nucleic Acids Res*, 38(Web Server issue):W497-502.
124. Harper LV, Hilton AC, Jones AF. (2003) RT-PCR for the pseudogene-free amplification of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (gapd). *Mol Cell Probes*, 17(5):261-265.
125. Banhegyi G, Margittai E, Szarka A, Mandl J, Csala M. (2012) Crosstalk and barriers between the electron carriers of the endoplasmic reticulum. *Antioxid Redox Signal*, 16(8):772-780.
126. Czegle I, Piccirella S, Senesi S, Csala M, Mandl J, Banhegyi G, Fulceri R, Benedetti A. (2006) Cooperativity between 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase is based on a common pyridine nucleotide pool in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Endocrinol*, 248(1-2):24-25.

127. Jansson I, Schenkman JB. (1977) Studies on three microsomal electron transfer enzyme systems. Specificity of electron flow pathways. *Arch Biochem Biophys*, 178(1):89-107.
128. Borgese N, D'Arrigo A, De Silvestris M, Pietrini G. (1993) NADH-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 isoforms as models for the study of post-translational targeting to the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett*, 325(1-2):70-75.
129. Mihara K, Sato R, Sakakibara R, Wada H. (1978) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b5 reductase: location of the hydrophobic, membrane-binding region at the carboxyl-terminal end and the masked amino terminus. *Biochemistry*, 17(14):2839-2834.
130. Kuroda R, Kinoshita J, Honsho M, Mitoma J, Ito A. (1996) In situ topology of cytochrome b5 in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biochem*, 120(4):828-833.
131. Spatz L, Strittmatter P. (1973) A form of reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b 5 reductase containing both the catalytic site and an additional hydrophobic membrane-binding segment. *J Biol Chem*, 248(3):793-799.
132. Nothwehr SF, Gordon JI. (1990) Targeting of proteins into the eukaryotic secretory pathway: signal peptide structure/function relationships. *Bioessays*, 12(10):479-484.
133. Pelham HR. (1990) The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*, 15(12):483-486.
134. Brown J, Novak EK, Takeuchi K, Moore K, Medda S, Swank RT. (1987) Lumenal location of the microsomal beta-glucuronidase-egagyn complex. *J Cell Biol*, 105(4):1571-1578.
135. Zhen L, Baumann H, Novak EK, Swank RT. (1993) The signal for retention of the egagyn-glucuronidase complex within the endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys*, 304(2):402-414.

136. Iyanagi T, Xia C, Kim JJ. (2012) NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase: prototypic member of the diflavin reductase family. *Arch Biochem Biophys*, 528(1):72-89.
137. Im SC, Waskell L. (2011) The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5). *Arch Biochem Biophys*, 507(1):144-153.
138. Cunha DA, Hekerman P, Ladriere L, Bazzarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, Moore F, Rasschaert J, Cardozo AK, Bellomo E, Overbergh L, Mathieu C, Lupi R, Hai T, Herchuelz A, Marchetti P, Rutter GA, Eizirik DL, Cnop M. (2008) Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci*, 121(Pt 14):2308-2318.
139. Chang-Chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E. (2008) Beta-cell failure as a complication of diabetes. *Rev Endocr Metab Disord*, 9(4):329-343.
140. Biden TJ, Boslem E, Chu KY, Sue N. (2014) Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, beta cell failure, and type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab*, 25(8):389-398.
141. Sramek J, Nemcova-Furstova V, Kovar J. (2016) Kinase Signaling in Apoptosis Induced by Saturated Fatty Acids in Pancreatic beta-Cells. *Int J Mol Sci*, 17(9).
142. Li T, Bonkovsky HL, Guo JT. (2011) Structural analysis of heme proteins: implications for design and prediction. *BMC Struct Biol*, 11:13.
143. Stevens JM, Uchida T, Daltrop O, Ferguson SJ. (2005) Covalent cofactor attachment to proteins: cytochrome c biogenesis. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 4):792-795.
144. Mukhopadhyay K, Lecomte JT. (2004) A relationship between heme binding and protein stability in cytochrome b5. *Biochemistry*, 43(38):12227-12236.

10. Saját publikációk jegyzéke

A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk jegyzéke:

1. Kalman FS, Lizak B, Nagy SK, Meszaros T, **Zambo V**, Mandl J, Csala M, Kereszturi E. (2013) Natural mutations lead to enhanced proteasomal degradation of human Ncb5or, a novel flavoheme reductase. *Biochimie*, 95(7):1403-1410. IF: 3,123
2. **Zambo V**, Toth M, Schlachter K, Szelenyi P, Sarnyai F, Lotz G, Csala M, Kereszturi E. (2016) Cytosolic localization of NADH cytochrome b(5) oxidoreductase (Ncb5or). *FEBS Lett*, 590(5):661-671. IF: 3,623

A dolgozat témájától független publikációk jegyzéke:

1. **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.
2. Polgar N, Csongei V, Szabo M, **Zambo V**, Melegh BI, Sumegi K, Nagy G, Tulassay Z, Melegh B. (2012) Investigation of JAK2, STAT3 and CCR6 polymorphisms and their gene-gene interactions in inflammatory bowel disease. *Int J Immunogenet*, 39(3):247-252. IF: 1,355

11. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Dr. Kereszturi Évának és Dr. Csala Miklósnak, hogy bizalmat szavaztak nekem és csatlakozhattam a munkacsoporthoz és irányításuk alatt elkezdhettem PhD munkámat. Köszönöm szakmai irány- és példamutatásukat, valamint, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk, mindig rendelkezésre álltak, értékes tanácsaikkal mindvégig segítették munkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Mandl József és Dr. Bánhegyi Gábor professzor uraknak, intézetünk korábbi és jelenlegi igazgatójának, akik lehetővé tették, hogy munkámat az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetben végezzem.

A II. sz. Patológiai Intézetből Dr. Lotz Gábornak külön köszönöm az immuncitokémia módszerének megismertetését és a mikroszkópos felvételek elkészítését. Köszönöm továbbá Dr. Lizák Beátának a fehérje féléletidő meghatározásban, és Dr. Szelényi Péternek a NAD(P)H fluorimetriás mérésében nyújtott segítségét.

Korábbi TDK hallgatóinknak, Kálmán Fanni Sárának és Tóth Mónikának is szeretném megköszönni a kísérletekben végzett munkájukat.

Köszönöm az Intézet valamennyi dolgozójának a támogató, valamint jóhangulatú légkört és azt, hogy bármiben fordulhattam hozzájuk bizalommal.

Valamint nem tudom eléggé kifejezni köszönetemet és hálámat Szüleimnek, hogy egyetemi és doktori tanulmányaimban mindvégig támogattak, töretlenül biztattak, odaadásuk példaértékű számomra. Köszönet illeti tágabb családomat, barátaimat egyaránt, akik szintén mindenben mellettem álltak.