GYULLADÁS ÉS OXIDATÍV STRESSZ HATÁSA JELÁTVITELI FOLYAMATOKRA ÉS MEMBRÁNRENDSZEREK STABILITÁSÁRA

Ph.D. értekezés

KÁLMÁN NIKOLETTA

INTERDISZCIPLINÁRIS ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
MOLEKULÁRIS ÉS CELLULÁRIS BIOKÉMIA PROGRAM

DOKTORI ISKOLA ÉS PROGRAMVEZETŐ: **PROF. DR. SÜMEGI BALÁZS**

TÉMAVEZETŐK: **DR. VERES BALÁZS, PROF. DR. PESTI MIKLÓS**

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Pécs, 2017.

I. TARTALOMJEGYZÉK

I. TARTALOMJEGYZÉK 1

II. BEVEZETÉS 4

III. RÖVIDÍTÉSEK 5

IV. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 6

1. A szepszis 6

1.1. A szepszist kiváltó kórokozók 6

1.2. A szepszis kritériumai és fokozatai 7

1.3. A szepszis epidemiológiája és mortalitása 9

1.4. A szepszis patogenezise 10

1.5. A lipopoliszacharid és a gyulladásos jelátvitel 12

1.6. A szepszis diagnózisa 25

1.7. A szepszis kezelése 27

2. Az oxidatív stressz 29

2.1. A reaktív oxigén intermedierek (ROI) kialakulása 30

2.2. A reaktív oxigén intermedierek fiziologiás jelentősége 31

2.3. A reaktív oxigén intermedierek (ROI) károsító hatásai és a védekező enzimrendszer 33

2.4. A reaktív nitrogén intermedierek (RNI) fiziológiás és károsító hatásai 36

2.5. Lipid eredetű gyökök és a lipidperoxidáció 38

3. Endogén antioxidáns védelemi rendszer 43

4. Exogén antioxidáns védelem – a táplálkozásból származó vegyületek 45

4.1. Polifenolok és a rezveratrol 45

V. CÉLKITŰZÉSEK 51

1. Rezveratrol hatásának vizsgálata gyulladásos modellen 51

2. A lipidperoxidációt okozó *t*-BuOOH hatása a hasadóélesztő sejtmembránjára 52

VI. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 53

1. Felhasznált vegyszerek, enzimek és antitestek 53

2. Módszerek 53

2.1. Sejtkultúrák és kísérleti körülmények 53

2.2. Fehérjeszintű vizsgálatok 54

2.3. Génexpressziós vizsgálatok 57

2.4. Élesztőtörzsek és tenyésztési feltételeik 61

2.5. Élesztőtörzsek túlélési jellemzői kezelést követően 64

2.6. Membránvizsgálatok élesztőn 66

2.7. Statisztikai analízis 71

VII. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK 72

1. Rezveratrol hatása gyulladásos modellen 72

1.1. A rezveratrol gátolja az LPS hatására indukálódó *traf6* gén expresszióját .. 72

1.2. A rezveratrol gátolja az LPS hatására indukálódó TRAF6 fehérje kifejeződését 74

1.3. A rezveratrol gátolja az LPS által indukált TRAF6 ubikvitinációt 74

1.4. A rezveratrol gátolja az LPS által aktivált MAP kináz útvonalakat és az Akt aktivációját 76

1.5. A TRAF6 szerepének megvitatása a rezveratrol anti-inflammatorikus hatásában 80

2. A lipidperoxidációt okozó *t*-BuOOH hatása eukarióta sejtmembránra 82

2.1. A *t*-BuOOH-rezisztens *S. pombe* törzs jellemzése 82

2.2. *t*-BuOOH adaptáció vizsgálata és túlélésük időfüggése *hyd*$^{+}$ és *hyd1-190 S. pombe* törzseknél 84

2.3. A *t*-BuOOH-rezisztens törzs glicerin felvétele csökkent 85

2.4. A *t*-BuOOH-rezisztens törzs plazmamembránja emelkedett fázistranzíciós hőmérséklettel rendelkezik 86

2.5. A *t*-BuOOH hatása a zsírsav-összetételre és szterin tartalomra *hyd*$^{+}$ és *hyd1-190* törzsekben 88

2.6. A *t*-BuOOH eukarióta sejtmembránra kifejtett hatásának megvitatása egy *t*-BuOOH-rezisztens és annak szülői *S. pombe* törzse esetében..... 94

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS 97

IX. MELLÉKLETEK 99

1. Felhasznált vegyszerek, enzimek és antitestek 99

2. Oldatok 99

3. Mikroorganizmusok 102

4. Táptalajok, tápoldatok 102

X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 104

XI. IRODALOMJEGYZÉK 105

XII. PUBLIKÁCIÓS LISTA 119

II. BEVEZETÉS

A közelmúlt kutatásai sok szempontból bizonyították azokat az évezredes megfigyeléseket, hogy a táplálkozásnak szerepe van számos betegség megelőzésében. Napjainkban előtérbe került az étrendi antioxidánsok, köztük a polifenolok preventív szerepe az olyan szabad gyökös károsodásokat okozó állapotokban is, mint például a népbetegségnek számító kardio- és cerebrovaszkuláris megbetegedések, vagy a kiterjedt gyulladással járó, ún. szeptikus sokkos esetek. A kutatások rámutattak, hogy ezek egészségre gyakorolt jótékony hatása nem feltétlen az antioxidáns hatásnak, hanem más, molekuláris szintű mechanizmusoknak is köszönhető. Ezen agyagok egészségre gyakorolt hatását tudományos vizsgálatokkal kell igazolni, törekedni kell a pontos hatásmechanizmusok feltárására. Kutatásaink célja a sokat tanulmányozott és sokszor vitatott szerepű polifenol, a rezveratrol, TRAF6 jelátvitelben betöltött hatásmechanizmusának tisztázása volt, *in vitro* gyulladásos makrofág modellen. Természetesen ezen tápanyagkomponensek élettani hatásait, kémiai és biokémiai tulajdonságait összefüggéseiben, *in vivo* is szükséges tanulmányozni, hogy a betegségmegelőzésben, egészségmegőrzésben való szerepük tisztázott legyen.

Másrészről, a szabad gyököknek fontos szerepük van a kórokozókkal szembeni védekezésben, például a fagocita sejtek a NADPH-oxidáz és mieloperoxidáz enzimeik által termelt oxigén gyököket a patogének elpusztítására használják. Ilyen fertőzést okozó mikroorganizmusok lehetnek prokarióta baktériumok, eukarióta egysejtű kórokozók, vagy bármi, amit a szervezet idegenként ismer fel. Sajnos a felszabaduló szabad gyökök a szervezet saját sejtjeit is károsíthatják, nem válogatnak, így pl. az élő sejteket kívülről határoló, lipidekben és fehérjékben gazdag plazmamembrán is rendkívül érzékeny az oxidatív stressz által okozott károsodásokra. Az evolúció során a patogének is kifejlesztettek számos védekező mechanizmust a túlélés érdekében, de élettani sajátosságaik miatt is könnyen adaptálódnak számos helyzethez, így céljaink között szerepelt, hogy egy lipidperoxidációra rezisztens eukarióta modellszervezet plazmamembránját, és az oxidatív stresszel kapcsolatos életfolyamatait, adaptációs képességét, lipidperoxidációt okozó stresszor jelenlétében és hiányában tanulmányozzuk.

III. RÖVIDÍTÉSEK

Akt	protein kináz B (PKB)
AP-1	*activator protein 1* transzkripciós faktor
CD14	*cluster of differentiation 14* receptor
DAMP	*damage-associated molecular pattern*
EPR	elektron-paramágneses rezonancia spektroszkópia
ERK	*extracellular signal–regulated kinase*
GAPDH	*glycerinaldehide-3-phosphate dehydrogenase*
IFN-β	*interferon beta*
IκBα	*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*
IKK	*IκB kinase*
IRAK	*interleukin-1 receptor-associated kinase*
IRF	*interferon regulatory factors* transzkripciós faktor
JNK	*c-Jun N-terminal kinase*
LBP	*lipopolysaccharide binding protein*, LPS-kötő fehérje
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
MIC	*minimal inhibitory concentration*
MODS	*multiple organ dysfunction syndrome*, „többszervi diszfunkciós szindróma”
MyD88	*myeloid differentiation primary response gene 88*
NEMO	*NF-kappa-B essential modulator*, IKKγ (IKK regulátoros alegysége)
NFκB	*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* transzkr. faktor
OD	optikai denzitás
p38	mitogén aktivált protein kináz (MAPK) csoport
PAMP	*pathogen-associated molecular patterns*, patogén-asszociált molekuláris mintázat
PRR	*pattern-recognition receptor*, PAMP felismerő receptor
RCI	*reactive chlorine intermedier*, reaktív klór intermedier
RIP	*receptor interacting protein*
RNS/RNI	*reactive nitrogen species/intermedier*
ROS/ROI	*reactive oxygen species/intermedier*
RSS/RSI	*reactive sulphur species/intermedier*
SAPK	*stress–activated protein kinase*, stressz-aktivált protein kináz
SARM	*sterile α and HEAT-Armadillo motifs-containing protein*
SIRS	*systemic Inflammatory Response Syndrome*
TAB	TAK1-kötő fehérje 2 és 3
TAK-1	TGF-β-aktivált kináz 1
TGF	*transforming growth factor beta*
***t*-BuOOH**	*terc*-butil hidroperoxid
TIR	Toll/IL-1 receptor
TIRAP/MAL	*TIR domain-containing adaptor protein, MyD88-adapter-like*
TLR4	Toll-like receptor 4
TRAF	TNF-receptor–asszociált faktor
TRAM	*TRIF-related adaptor molecule*
TRIF	*TIR domain-containing adaptor including IFN-β*
FFA	*free fatty acid*, szabad zsírsav
PLFA	*polar lipid fatty acid*, poláris lipidek zsírsavai
TAGFA	*triacylglycerol fatty acid*, triacilglicerolok zsírsavai
TFA	*total fatty acid, összes zsírsav*

IV. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A szepszis

A szepszis (*szépszisz (gör.)* = rothadás, felbomlás, üszkösödés) vagy köznapi nevén a vérmérgezés, a szervezet egészét érintő kontrollálatlan gyulladásos válaszreakció. Kialakulásának alapvető feltétele egy fertőzés, melynek bármelyik fajtája szeptikus állapotot idézhet elő, leggyakoribb primer oka elsősorban mégis a légzőrendszer, a hasüreg vagy a véráram infekciója (1). Hogy kialakul-e a szepszis, az függ a patogén virulenciájától, a fertőzés súlyosságától, és a beteg rezisztenciájától, szervezetének válaszkészségétől, az esetlegesen már fennálló egyéb betegségektől, és az ezek kezeléseként alkalmazott gyógyszerektől (1). Az infekció generalizálttá válásában fontos szerepet játszik a szervezet ellenálló képességén kívül az is, hogy milyen gyorsan és mennyire eredményesen tudják az orvosok megszüntetni a szervezetet ért súlyos behatást (pl. politraumatizáció, nagyfokú vérvesztés) (2).

1.1. A szepszist kiváltó kórokozók

A betegséget kiváltó mikroorganizmusok egy hányada a normál emberi/állati flóra része (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, bizonyos *Candida* fajok, stb.) (3). Immunszupresszív állapotokban (beteg, idős vagy nagyon fiatal egyéneknél), vagy ha számuk valamilyen hatásra abnormálisan megnövekedik, és valamilyen módon, pl. a véráramba, a hasüregbe, vagy máshova kerülnek, opportunista kórokozóként viselkednek, és szepszist idézhetnek elő (3,4). Egy USA-ban készült felmérés szerint a kórokozók mintegy 90 %-ban baktériumok, a Gram-negatív szepszis és Gram-pozitív szepszis aránya kb. 42 ill. 34 %, ezen felül együttes előfordulásuk valószínűsége kb. 14 % (3,5). Felmérések szerint a Gram-negatív eredetű fertőzések legtöbbjét, kb. 29 %-át az *Enterobacteriaceae* család tagjai okozzák. Az *Escherichia coli* az infekciók kb. 13 %-áért, míg a *Klebsiella pneumoniae* és a *Pseudomonas aeruginosa* a fertőzések kb. 8-8 %-áért tehetők felelőssé, de előfordulnak *Proteus* fajok okozta fertőzések is (3,5). A Gram-

pozitív baktériumok okozta szepszis fele általában valamilyen *Staphylococcus* faj eredetű, ezen belül is a *Staphylococcus aureus* okozta fertőzések aránya kb. 12 %, a koaguláz-negatív *Staphylococcus* fajok okozta infekciók száma 7 % körüli, míg az *Enterococcus*-ok és *Pneumococcus*-ok okozta fertőzések száma 8 ill. 4 % körül mozog (3,4,6). Anaerob mikroorganizmusok az esetek mindössze 2 %-ában mutathatók ki, mint pl. a Gram-negatív *Bacteroides fragilis* (3). A fennmaradó kb. 10 %-ban gombák (az esetek kb. 5 %-ában elsősorban valamilyen *Candida* faj) (7) vagy egyéb kórokozók (vírusok, protozoonok, stb.) a szepszis kiváltó okai (3,4). A tüdő infekciók nagy részéért főleg a következő fajok felelősek: *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Legionella* fajok, *Chlamydia pneumoniae* (3,8). A seb és lágyrész fertőzések leggyakoribb okozói a *Streptococcus pyogenes* (3,9), a *Staphylococcus aureus*, bizonyos *Clostridium* fajok, a *Pseudomonas aeruginosa*, bizonyos anaerob fajok és a koaguláz-negatív *Staphylococcus* fajok, míg a húgyúti fertőzésekért főleg az *Escherichia coli*, a *Klebsiella*, az *Enterobacter*, *a Proteus* és az *Enterococcus* fajok lehetnek felelősek (3). A központi idegrendszer infekcióját főleg a *Streptococcus pneumoniae*, a *Neisseria meningitidis*, a *Listeria monocytogenes*, az *Escherichia coli*, a *Haemophilus influenzae*, a *Pseudomonas aeruginosa*, illetve *Klebsiella* és *Staphylococcus* fajok okozhatják (3). Ezek a fertőzések az egyes betegekben nagyon eltérő tüneteket produkálhatnak (3).

1.2. **A szepszis kritériumai és fokozatai**

Az először 1991-ben, majd 2001-ben, és legutóbb 2016-ban tartott Sepsis-1,2,3 konszenzus konferenciák (10–12) alapján érvényben lévő szepszis definíció a következő:
A szisztémás gyulladásos válaszreakció vagy SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*): különböző, infekciós vagy nem infekciós eredetű inzultusokra (pl. trauma, égés, pancreatitis) adott egész testre kiterjedő, infekciós válasz.
A szepszis bizonyítottan, vagy nagy valószínűséggel primer fertőzés(ek)hez vagy másodlagos, kórházi infekció(k)hoz (légúti, húgyúti, savós hártyákat érintő, lágyszöveti, idegrendszeri vagy véráramfertőzések, trauma, égés, pancreatitis, stb.) társuló, akutan

bekövetkező, szisztémás gyulladásos válaszreakció (SIRS vagyis *Systemic Inflammatory Response Syndrome*).

Ez a gyulladásos válaszokban bekövetkező csökkent kontrollt, vagyis egy eltúlzott, generalizált immunválaszt jelent, mely a következő tünetek közül – a 2016-os konferencia szerint – SIRS esetén több mint egyet kell, hogy tartalmazzon:

- 36°C-nál alacsonyabb vagy 38°C-nál magasabb testhőmérséklet
- *tachycardia* (90/percnél nagyobb szívfrekvencia)
- *tachypnoe* (20/percnél magasabb légzési frekvencia) vagy 32 Hgmm-nél alacsonyabb parciális artériás széndioxid nyomás ($PaCO_2$ <32 Hgmm)
- *leukocytopenia* vagy *leukocytosis* (a fehérvérsejtszám kevesebb, mint 4×10^3 vagy több mint $1{,}2\times10^4$ sejt/µl) vagy 10%-nál magasabb az éretlen leukociták száma

Az úgynevezett „súlyos szepszis" állapotába kerül a beteg, ha a szepszis előrehaladásával szervi diszfunkciók, hipoperfúziós abnormalitások vagy a gyulladásos válaszreakció miatt hipotenzió alakul ki. A keringési zavar tüneteként felléphet laktátacidózis, oliguria, és különböző formájú tudatzavar (12).

Szeptikus sokknak nevezzük, ha súlyos szepszishez vagy SIRS-hez, folyadékpótlás ellenére társul keringési elégtelenség. A szeptikus sokk további jellemzője az úgynevezett „többszervi diszfunkciós szindróma" (MODS vagyis *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*), ami kettő vagy több szerv akutan kialakuló, súlyos működési zavara, ahol a homeosztázis csak intenzív terápiás beavatkozásokkal biztosítható. A testszerte felszabaduló citokinek hatására szisztémásan kialakuló ödéma lép fel, a keringő vérmennyiség és a vér fehérjetartalma csökken, intravaszkuláris véralvadás és számos más szerv működési zavara lép fel (2,13,14).

A SIRS, a szepszis, a súlyos szepszis és a szeptikus sokk nem önálló betegségek, hanem egy kórfolyamat közbülső állapotai lehetnek (bár nem szükségszerűen progrediálnak tovább az egyes állapotok), amelyek végül többszervi elégtelenséghez és gyakran halálhoz vezethetnek (2,14,15).

1.3. **A szepszis epidemiológiája és mortalitása**

A „súlyos szepszis” és a szeptikus sokk világszerte a legnagyobb népegészségügyi probléma, a kórházi intenzív osztályos kezelések legnagyobb halálozási arányú betegsége, évente több mint 18 millió embert érint, a tizedik vezető halálozási ok (16,17). Emiatt a legnagyobb orvosi, sőt gazdasági kihívást és feladatot okozza, hiszen jelentős költségekkel is jár a páciensek kezelése (18). Fontos az alapbetegség folyamatos kontrollja és kezelése, diagnosztikus vizsgálatok és műtétek végzése, monitorozás, szervpótló kezelések, gyógyszerezés, stb. A kórházakban kezelt idős és immunszupresszált betegek számának évről évre történő növekedése miatt, az egyre hatékonyabb széles-spektrumú antibiotikumok és a fejlődő invazív technológiák ellenére is, évente a szepszises esetek számának 1-1,5 %-os emelkedésével kell számolni (17).
Statisztikai adatok szerint a „súlyos szepszis” mortalitása világszerte, a terápiás kezelések ellenére, 7-14 nap elteltével már 30-50 % közötti, míg a szeptikus sokk mortalitása akár 1-2 napon belül több mint 50 % (11,17). A szeptikus esetek csak Európában évente 135 000 életet követelnek, míg az USA-ban 750 000 súlyos szeptikus esetből 225 000 a halálos kimenetelű (30 %), ami így meghaladja az akut koronária-betegségek okozta mortalitást (11,17). Magyarországon az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Országos Intézet adatai alapján (15) 2001-ben 1700 esetben jelentettek szepszist, ebből 658 eset tartozott a „súlyos szepszis” vagy szeptikus sokk kategóriájába (39 %). 5 hazai, nagy forgalmú intenzív osztály 3 éves adatait elemezve (19), az osztályok mindegyikében a „súlyos szepszis” és a szeptikus sokk együttes mortalitása 70-100 % között változott. A 2005-ös év adatai szerint a hazai intenzív osztályokon a SIRS előfordulása 11000 eset/év, halálozási aránya 10-20%. A szepszis előfordulása 9600 eset/év, ennek a formának a halálozási aránya 30-40%. Súlyos szepszis 9000 esetben fordult elő, mortalitási aránya 40-50% volt. A 6500 szeptikus sokkban szenvedő páciens 50-60%-a halt bele a betegségbe 2005-ben (19). Bogár szerint pontos statisztikai adatok sem állnak rendelkezésre (2001-ben csak 1700 esetet jelentettek, 2005-ben már ennek sokszorosát), de szerinte a magas mortalitási ráta ezen adatok alapján is nyilvánvaló (19).

1.4. **A szepszis patogenezise**

Magasabbrendű szervezetekben, ha egy kórokozó a fizikai-kémiai védelmi vonalon, vagyis a bőrt, bél-, húgy-, ivarszerveket és légutakat borító epitélsejtek szoros kapcsolatán (*tight junction*) és a belső szervek sav- és enzimtartalmán (mukociliáris rendszer, pepszin, lizozim, stb.) átjut, akkor először a natív vagy veleszületett immunrendszer lép működésbe. Ekkor olyan folyamatok indulnak el, melyek rövid időn belül a káros anyag eliminálásához vezetnek, méghozzá azonos vagy nagyon hasonló módon, a különböző kórokozókra való specificitás nélkül, ugyanis a natív immunrendszer a különböző kórokozók azonos részleteit ismeri fel (13,20–22). Ezek az azonos részletek általában mikrobiális eredetű ligandumok, melyeket patogén-asszociált molekuláris mintázatoknak (*pathogen-associated molecular patterns*, vagyis PAMP) nevezünk. A PAMP-ok nélkülözhetetlenek a mikroorganizmusok életében, viszont a magasabbrendű szervezetekben nem fordulnak elő (13). Fontos, hogy a natív immunrendszer elemei meg tudják különböztetni a saját struktúrákat a patogénekéitől. A felismeréshez szükségesek az úgynevezett mintázatfelismerő receptorok vagyis a PRR-ek (*pattern-recognition receptor*) (13,22). Ezeket a receptorokat főleg az epitélsejtek, a makrofágok, a dendritikus sejtek és a granulociták fejezik ki. Ide tartoznak az alábbi receptorcsaládok: Toll-szerű receptorok (*Toll like receptor* – TLR), a C-típusú lektinek, a Scavanger receptorok (SR), a NOD-szerű receptorok (*Nucleotide-binding oligomerization domain*) (13,22). A veleszületett immunrendszer felismerő molekulái közé tartoznak ezek mellett még például a defenzinek, a C-reaktív protein, a mannózkötő lektin, a felületaktív proteinek, a lipopoliszacharid-kötő protein (LBP), a szolubilis CD14, az N-formil metionil receptorok és a komplement-receptorok is (13,20–22). A mikrobiális PAMP-ok a nekik megfelelő PRR-ekhez kötődnek, és intracelluláris szabályozó molekulák (pl. citokinek és kemokinek) szintéziséhez és szekréciójához vezetnek, melyek beindítják a veleszületett és az adaptív immunrendszert is (13,20,22). A veleszületett immunitásban és a gyulladási folyamatokban szerepet játszó citokinek közé azokat soroljuk, amelyek a kórokozó szervezetbe jutását követően azonnal felszabadulnak, elsődlegesen a mononukleáris fagocitákból, a T-sejtekből, a granulocitákból, a hízósejtekből, a fibroblasztokból és az

endotélsejtekből (13). Ide sorolhatjuk az interferonokat, a tumor nekrózis faktorokat (TNFα/β), interleukin-1-et (IL-1), az interleukin-6-ot (IL-6) és az interleukin-12-t (IL-12) (13). Ezeknek a citokineknek meghatározó szerepük van egyrészt a fertőzést követő gyulladási reakciók kialakulásában, másrészt a különböző antigén-prezentáló sejtekre gyakorolt hatásuk révén az antigén-specifikus limfociták aktiválódásának és differenciálódásának szabályozásában (13).

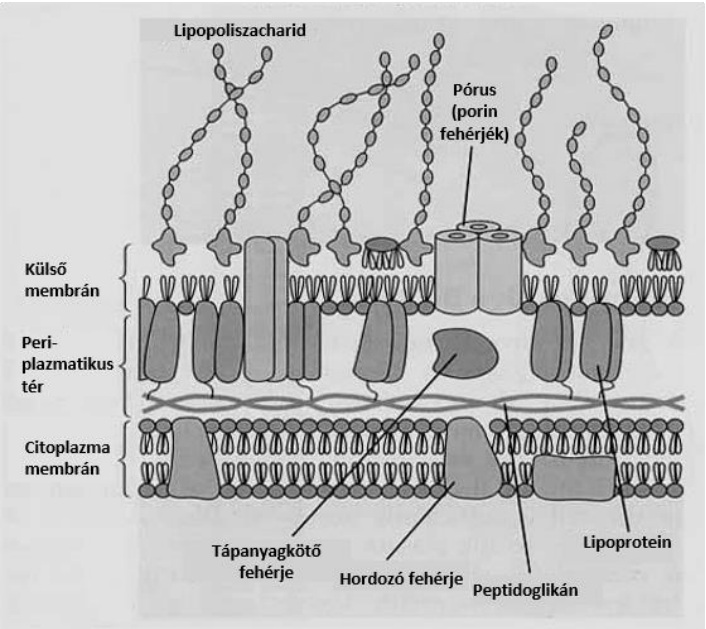
A gyulladásos folyamatok kaszkádja bakteriális fertőzést követően a következőképpen alakul: a PAMP (pl. lipopoliszacharid) a makrofágokat, neutrofileket, monocitákat és az erek endotél sejtjeit is aktiválja, melyek a citokin és kemokintermelést fokozzák. Az endotélen nő az adhéziós molekulák expressziója, beleértve a neutrofilek adhézióját is, melyek reaktív oxigén intermediereket termelnek, ezáltal a környező szövetek és erek károsodásához vezetnek (13). A komplement rendszer aktiválódásának hatására (baktérium – membrán komplex kialakulása) az endotoxin plazmaszintje tovább emelkedik, mindezek különböző citokinek kaszkádszerű termelését indítják el. Az infekciót követő körülbelül 1 óra elteltével TNFα, két órával IL-1β, 3-4 órával később az IL-6 maximuma figyelhető meg (13), lecsengési idejük néhány óra. Ezek hatására lokális, majd szisztémás gyulladás lép fel. A TNFα és az IL-1 lokálisan aktiválja az ér-endotélt, utóbbi a limfocitákat, előbbi az érfalak átjárhatóságát növeli, ezáltal fokozza a sejt- és nyirokbeáramlást. Végül az IL-1 a hipotalamuszon keresztül pirogén hatást (lázat) kelt, és fokozza az IL-6 termelést is, melynek hatására a májban megindul az akut-fázis fehérjék termelése (pl. C-reaktív protein, fibrinogén, angiotenzin, plazminogén, szérum-amiloid A és P, albumin, transzferrin stb.) (13,20). A hatás lehet pozitív vagy negatív (egyes fehérjék mennyisége nő, másoké csökken). Ezek a fehérjék számos fontos szerepet betöltenek, pl. az opszonizációban, a véralvadásban és a komplement-rendszer aktiválásában. A véralvadási rendszer aktivációja magas fibrinogénszintet eredményez, ami koagulopátiához vezet, ezáltal szöveti hipoxiát okoz. A makrofágokban megnő az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) enzim szintje, ez növeli a cGMP szintet, ami vazodilatációhoz, végül hipotenzióhoz vezet. Ezek a többszervi károsodások és a hipotenzió végül akár halált is okozhatnak (1,13).

1.5. **A lipopoliszacharid és a gyulladásos jelátvitel**

Kísérleteink egy részében egy fakultatív anaerob Gram-negatív baktréiumból, az *Escherichia coli*-ból származó lipopoliszacharid endotoxint (LPS; O127:B8, Sigma-Aldrich) használtuk (23). Ez az *E. coli* mellett számos más Gram-negatív baktérium sejtfalában is megtalálható (pl. *Shigella* és *Salmonella* fajokban is), általánosan elfogadott, és széles körben alkalmazott immunogén ágens szeptikus sokkos modellekben.

1.5.1. Az LPS a Gram-negatív baktérium sejtfalának alkotórésze

A Gram-negatív baktériumokat a külvilág felől sejtburok határolja. Ezen keresztül egyrészt transzportfolyamatok zajlanak, másrészt meghatározó szerepe van a baktériumsejt és a gazdasejtek kapcsolódásában, az immunológiai folyamatok inicializálásában (24,25). A sejtburok rétegei: a citoplazmamembrán, egy peptidoglikán réteg, a külső membrán, és a kettő közötti periplazmatikus tér (**1. ábra**). A lipopoliszacharid a baktérium külső membránjának alkotórésze (25,26).



1. ábra: A Gram-negatív baktérium sejtfala. (Forrás: (27) alapján).

A peptidoglikán réteg N-acetil-glukózaminból és N-acetil-muraminsavból álló poliszacharid láncokból, és azokat összekötő peptidekből épül fel. Gram-negatív baktériumokban vékonyabb ez a réteg, mint a Gram-pozitívakban, benne a keresztkötések száma is alacsonyabb, így stabil, de rugalmas vázat ad. Többféle antibiotikumcsoport (penicillinek, cefalosporinok) támadáspontja ez a réteg (24,25,28).

A periplazmatikus tér a citoplazma membrán és a külső membrán között helyezkedik el. Szabad és kötött állapotú lipoproteineket és ionokat tartalmaz. A lipopoliszacharid szintézisben is szerepe van (25,29,30).

A külső membrán aszimmetrikus lipid kettősrétegének kialakításában a lipopoliszacharidok, foszfolipidek és fehérjék vesznek részt (25,26). A membrán belső oldalán foszfolipidek, míg a külső felén lipopoliszacharidok vannak. A peptidoglikán réteghez lipoproteinekkel kapcsolódik. A membrán stabilitásáért a Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok a felelősek. A külső membrán belső része hidrofób, és nagy molekulákat nem enged át, ugyanakkor a tápanyagok könnyedén átdiffundálnak rajta, így egyes antibiotikumok (lincomycin, clindamycin) számára is átjárhatatlan. Hidrofil külső felszíne ellenállóvá teszi a baktériumot az emésztőnedvekkel, fagocitózissal, komplement rendszerrel szemben. A lipopoliszacharid jelenléte alapvetően meghatározza a membrán tulajdonságait, nem ismert olyan Gram-negatív baktérium, mely LPS hiányában szaporodóképes lenne (24,26–30).

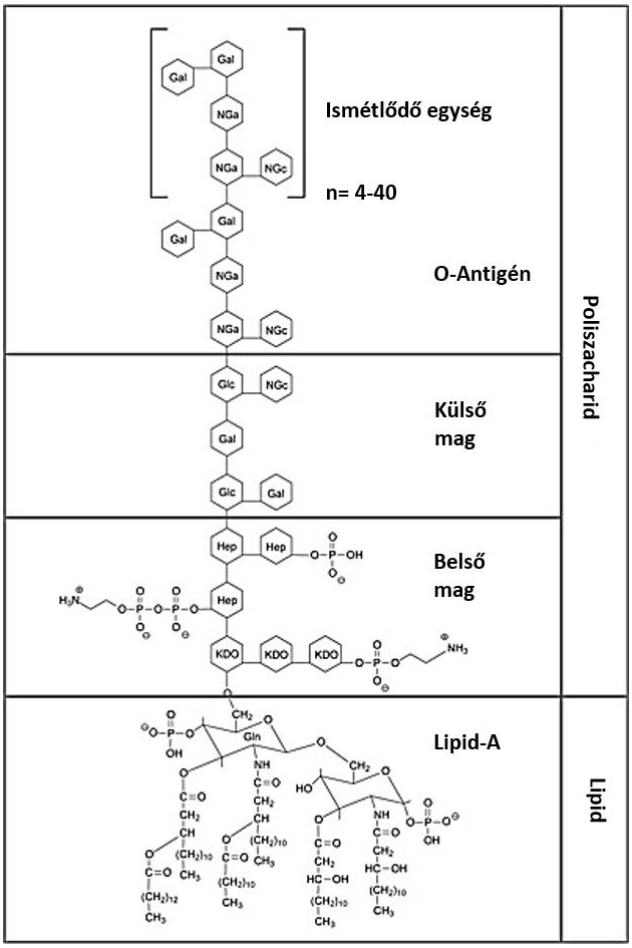
1.5.2. Az LPS szerkezete

Az LPS tulajdonságai alapján három fő szerkezeti részből áll: O-specifikus oldallánc (O-antigén), az oligoszacharid mag (core) és a lipid-A (**2. ábra**). Az egyes részek kovalens kötéssel kapcsolódnak egymáshoz (23,25).

O-specifikus oldallánc: Ez a molekula a bakteriális sejtburok külvilág felé eső része, amely ismétlődő egységekből álló polimer. Az alegységek 2-8 különböző, néha azonos cukormolekulából, glikozid kötéssel jönnek létre. A polimerizáltság foka igen változó (n = 20-40), nagy heterogenitás észlelhető, ez az oldallánc az endotoxin legváltozékonyabb része (31). Előfordulhat, hogy az O-oldallánc génje(i) deletálódnak, így mérete redukálódik, vagy egyáltalán nem szintetizálódik (32). Az ilyen lipopoliszacharidot

hordozó baktériumokat R-mutánsnak (*rough*/rücskös) formának nevezik, míg a vad törzs sima telepeit S-formának (*smooth*/sima). Az R-forma telepek elveszíthetik megbetegítő képességüket (32,33).

Oligoszacharid mag (core): A core régió belső és külső magra különíthető. Nem mutat nagy változékonyságot, ellentétben az O-oldallánccal, így kevésbé erőteljes antigén hatással bír, de R-mutánsok esetén ez is beindíthatja az ellenanyag termelést. A külső mag hexózokból áll: D-glükóz, D-galaktóz, N-acetil D-glükózamin. A belső mag heptózt és 2-keto-3-deoxioktonsavat (KDO) tartalmaz. Minden endotoxin tartalmaz KDO-t vagy egy hasonló molekulát, szintézisének gátlása a Gram-negatív baktérium pusztulásához vezet (23–34).



2. ábra: A bakteriális LPS általános szerkezete. (Forrás: (23) alapján) Rövidítések: KDO: 2-keto-3-deoxioktonsav; Hep: heptulóz; NGa: galaktózamin; NGc: glükózamin; Gal: galaktóz; Glc: glükóz.

Lipid-A: Ez az LPS legkevésbé variábilis része, ez mutatja a legkisebb változatosságot a különböző baktériumtörzsek között, és ez felel a szervezeten belüli toxicitásért, mivel kapcsolatba lép a gazdaszervezet immunrendszerével (25,29,31). Főként cukorból (glükózamin), foszfátcsoportból és hosszú szénláncú zsírsavakból áll. A molekula vázát két D-glükózamin képezi, melyek β-1,6 kötésben kapcsolódnak egymáshoz. Ez különleges helyzet, mert eddig az endotoxin Lipid-A-ján kívül ilyen helyzetű kapcsolódást nem találtak. Erre a vázra, amid és észter kötéssel 6-7 db hosszú szénláncú zsírsavlánc kötődik, melyek lehetnek β-hidroxi-mirisztinsav, laurinsav, mirisztinsav, palmitinsav (23–26,28,31,33,34). A zsírsavak biztosítják a lipopoliszacharid hidrofobicitását és lipofil jellegét, mely lehetővé teszi a membrán lipid kettős rétegébe való beágyazódását. Így a Lipid-A-t tekintik a lipopoliszacharid endotoxikus tulajdonságáért felelős molekularésznek (23–34). Azonban a teljes értékű biológiai hatás kifejeződéséhez szükség van a teljes lipopoliszacharid molekulára, ugyanis a térszerkezet kialakulása elősegíti az endotoxin kölcsönhatását a szervezet sejtjeivel (35).

1.5.3. A TLR4 jelátvitel

A TLR4 elsődleges funkciója, hogy felismerje a patogén eredetű exogén molekulákat (PAMP), legfőképpen a Gram-negatív bakteriális eredetűeket (pl. LPS), melyek a véráramba kerülve elsősorban a makrofágok aktivációját eredményezik. A jelenlegi kutatások szerint a TLR4 részt vesz a sérült szövetekből és nekrotikus sejtekből származó endogén eredetű molekulák (DAMP vagyis *damage-associated molecular pattern mulecules*) felismerésében is, melyek szintén egy erős proinflammatorikus válasz aktivációját indukálják (34,36).

A TLR4 receptor a Toll-szerű receptorok családjába tartozik. (Magát a Toll fehérjét először *Drosophila* muslincában fedezték fel, mint a dorso-ventrális tengely kialakulásáért felelős esszenciális fehérjét, illetve mint a veleszületett immunrendszer egy korai formáját (37,38).) A TLR4 aktivációja több jelátviteli utat indít meg. Emlős sejtekben LPS-hatásra számos interakció történik, például az LPS-kötő fehérje (LBP =

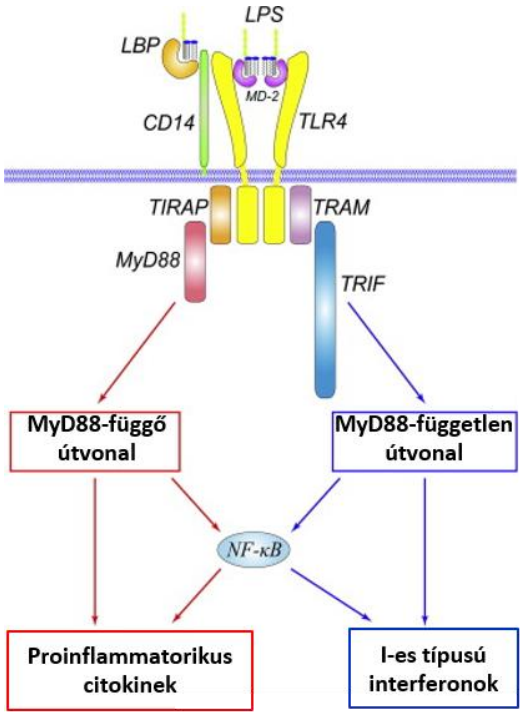
lipid bindig protein), a CD14, az MD2 és a TLR4 között (38). Az LBP egy szolubilis akut-fázis protein, mely közvetlenül köti az LPS-t (LPS/LBP), és elősegíti a CD14 fehérjével történő kapcsolat kialakulását (LPS/LBP/CD14). A CD14 fehérje egy glikozil-foszfatidil-inozitol segítségével a membránba horgonyzott protein (mCD14), de szolubilis formája is létezik (sCD14). Makrofágokban és monocitákban az mCD14, míg endotél sejtekben az sCD14 jellemző (34,38). Endotél sejtekben a TLR4 a plazmamembrán és a Golgi között cirkulál (34). Makrofágokban és monocitákban az LPS/LBP/CD14 komplexben a CD14 feladata, hogy elősegítse a komplex kapcsolódását a TLR4/MD2 receptor-komplexhez, és szabályozza az LPS felismerését (20,34,38). Az MD2 egy szolubilis fehérje, mely extracellulárisan, nem kovalensen kötődik a TLR4-hez, és annak hiányában is közvetlenül képes kapcsolódni az LPS-hez (38) (**3. ábra**). Az LPS felismerése során a TLR4 receptor homodimerizálódik, és intracelluláris TIR doménjének segítségével képes toborozni a *downstream* targeteket (38). A TLR-ek citoplazmatikus része nagyon hasonlít az interleukin-1 receptor család intracelluláláris részéhez, ezért Toll/IL-1 receptor (TIR) doménnek nevezzük (21,34). A TIR domén esszenciális a jelátvitel szempontjából, mert akár egy pontmutáció jelenléte is ebben a doménben teljes funkcióvesztéshez vezet, hiányában nem alakul ki az LPS-válasz (38,39). 5 db TIR-domén tartalmú adaptor protein van:

- a MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*)
- a TIRAP/MAL (*TIR domain-containing adaptor protein, MyD88-adapter-like*)
- a TRIF (*TIR domain-containing adaptor including IFN-β*)
- a TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*)
- a SARM (*sterile α and HEAT-Armadillo motifs-containing protein*)

A különböző Toll-like receptorok más-más kombinációban használják az adaptor proteineket, hogy elindítsák a *downstream* jelátvitelt (38). Ezen adaptor proteinek szerepének a tisztázásában fontos feladat jutott az adott adaptorra génkiütött egerekkel készült tanulmányoknak (38). MyD88-hiányos egerek rezisztensnek bizonyultak az LPS-indukálta szeptikus sokkra, a vad típusú egerekhez képest elhanyagolható mértékben

voltak képesek az NF-κB transzkripciós faktor aktiválására, de emellett az I-es típusú interferonok és génjeik indukálhatók voltak (38,40). A TIRAP-hiányos egerek fenotípusában hasonlóan viselkedtek, mint az MyD88-deficiens egerek (38,41). A TIRAP szintén a sejtmembránhoz horgonyzott adaptor protein, feladata, hogy elősegítse a MyD88 és TLR4 citoplazmatikus TIR doménjei közötti kapcsolatot, és elindítsa a MyD88-függő jelátviteli útvonalat (20,34,38). Számos tanulmány rámutat, hogy a mirisztoilációval a membránhoz kapcsolódó TRAM, és az ehhez kapcsolódó TRIF szabályozza a MyD88-független jelátvitelt (38). A SARM szerepe még nem teljesen tisztázott, de Carty és munkatársai rámutattak HEK293 sejtvonalon végzett kísérletikben a TRIF-mediált jelátvitelben betölött negatív regulátor szerepére (38,42).

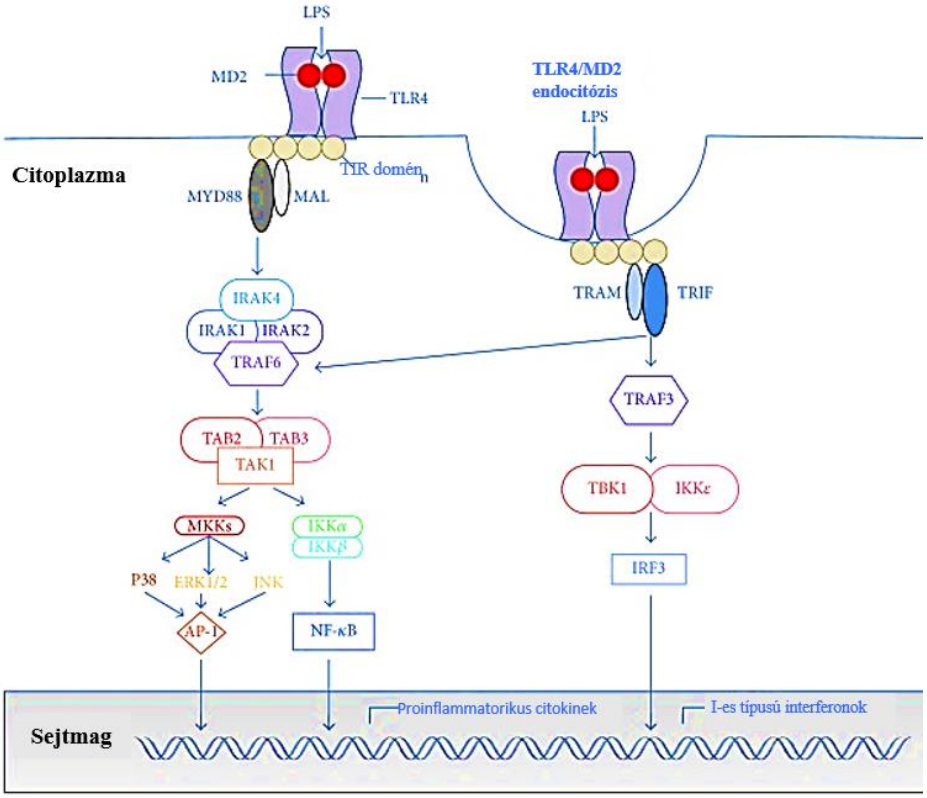
Összességében, a jelenlegi ismeretek szerint, az LPS által kiváltott TLR4 jelátvitel két fő útra különíthető: a korai, vagyis a MyD88-függő, és a késői, vagyis MyD88-független (TRIF-függő) útvonalakra (**3. ábra**) (20,34,38).



3. ábra: Az LPS/TLR4 jelátvitel makrofágokban és monocitákban Lu és munkatársai szerint. (Forrás: (38) alapján)

1.5.4. A MyD88-függő jelátvitel, a "korai" út

A TIR domén mellett a MyD88 tartalmaz egy úgynevezett halál domént (DD vagyis *death domain*) is, mely képes más DD-tartalmú molekulákat aktiválni (20,34,38). LPS hatásra a MyD88 DD-je aktiválja a szintén DD-t tartalmazó IL-1 receptor asszociált kináz 4-et (IRAK-4). Az IRAK-4 az IRAK család tagja, tartalmaz egy DD-t és egy kináz domént (KD) is (20,34,38). Mindez a plazmamembránhoz kötött módon történik. A MyD88 kapcsolódik végül az IRAK4, IRAK1 és IRAK2 IL-1R-kapcsolt kinázokhoz. Ezeknek az aktivált proteineknek a hiperfoszforilációját okozza, melyek így képesek a TNF-receptor asszociált faktor 6 (TRAF6) molekulához csatlakozni (**4. ábra**) (20,22,34,36,38,43).



4. ábra: A MyD88-függő és -független jelátviteli utak Molteni és munkatársai szerint. Rövidítések a szövegben. (Forrás: (36) alapján)

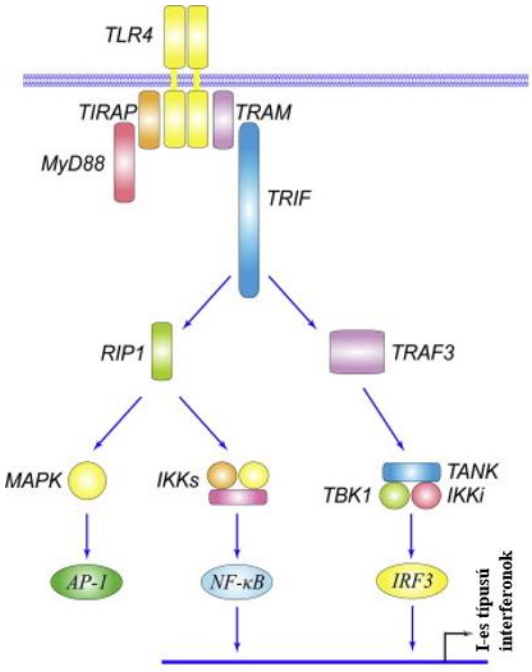
Konformációváltozás következtében az IRAK1/2/4/TRAF6 komplex leválik a receptorról, és kölcsönhatásba lép a TGF-β-aktivált kináz 1-el (TAK1) és a TAK1-kötő fehérje 2 és 3-mal (TAB2/3), mely így a TAK1 és TAB2/3 foszforilációját eredményezi (44). Végül az egész komplex a citoplazmába helyeződik, ahol az aktivált TAK-1 egyrészt aktiválja az IKK-t (IκB kináz, IKKα/β/γ) (45). Az aktív IKK foszforilálja az IκB-t (*inhibitor of kappa B*), melynek hatására az degradálódik, így az NF-κB transzkripciós faktor felszabadul a gátlás alól, és a sejtmagba jutva (NLS – nukleáris lokalizációs szignál) proinflammatorikus gének transzkripcióját okozza és fokozza. Másrészről a TAK1 fehérje, mint MAPKKK (=MAP3K vagy MEKK7, mitogén aktivált protein kináz kináz kináz), foszforlilálja a MAPKK-okat, melyek a továbbiakban a MAPK-okat (ERK1/2, JNK és a p38) foszforilálják. Ezen MAP kináz kaszkád aktiválódás többek között az AP-1 transzkripciós faktor aktivációját is eredményezi (**4. ábra**) (20,22,34,36,38,43).

A MyD88-függő útvonal egyik legfontosabb kulcsszereplője (20,46) az evolúciósan konzervált TRAF család 7 tagjának egyike, a TRAF6 (44,45,47,48), melynek aktivációja a család legtöbb tagjához hasonlóan a MAP kinázok és az NF-κB aktivációjához vezet. A család tagjai C-terminális régiójukban erősen konzervált TRAF doménnel rendelkeznek, mely segítségével képesek érintkezni a TNF receptor család tagjaival (TRAF vagyis TNF-receptor asszociált faktor) (20,46). Az N-terminális részük kevésbé konzervált, a TRAF6 4 cinkujj motívumot és RING domént is tartalmaz (20,46). A TRAF6 RING doménje katalizálja a TRAF6 auto-ubikvitinációját az Ubc13/Uev1A ubikvitin konjugáló dimer enzimkomplex segítségével (20,45,46). Az ubikvitin monomerek egymáshoz kapcsolódása *Lys*-63-on keresztül történik, ami a *Lys*-48-kapcsolt (K48) ubikvitinációtól eltérően nem proteoszomális degradációt, hanem aktivációt eredményez (20,45). A poliubikvitináció 3 enzim részvételével zajlik, egy ubikvitin aktiváló enzim (E1), egy ubikvitin konjugáló enzim (E2, ami jelen esetben az Ubc13/Uev1A enzimkomplex) és egy ubikvitin ligáz enzim (E3, ami jelen esetben a TRAF6). A poliubikvitinált TRAF6-ot felismeri a TAB2 és a TAB3, ezek kötődése vezet a TAK1 aktiválódásához, ami foszforilálja az IKKβ-t (**4. ábra**). A következő lépésben az IκB foszforilációja megindítja annak K48-poliubikvitin-mediált proteoszomális

degradációját, miáltal az NF-κB felszabadul a gátlás alól. A TRAF6 önmagán kívül más enzimek, például az IRAK1 és az IKK komplex regulátoros alegysége (IKKγ vagy NEMO) poliubikvitinációjáért is felelős. A TRAF6 biológiai funkciói közé tartozik többek között az ubikvitin láncok szintézise, az autoubikvitináció, az NF-κB-aktiváció, az oszteoklaszt differenciáció indukció és a IKK aktiválás (44,45,47–49).

1.5.5. A MyD88-független jelátvitel, a "késői" út

A MyD88-független jelátviteli út aktiválódása során a TLR4/MD2 komplex létrejöttét követően a komplex endocitózisa történik (**4. ábra**), melyben a CD14-nek kulcsszerepe van (36,50,51). Az endoszomához kapcsolódó TRIF egy fontos TIR-domén tartalmú adaptor protein, mely a MyD88-független jelátviteli utat szabályozza. Kulcsfontosságú szerepet tölt be az IRF3 transzkripciós faktor szabályozása mellett az NF-κB transzkripciós faktornak az ún. "késői fázisú" aktivációjában, és a MAP kinázok aktivációjában is (20,34,38).

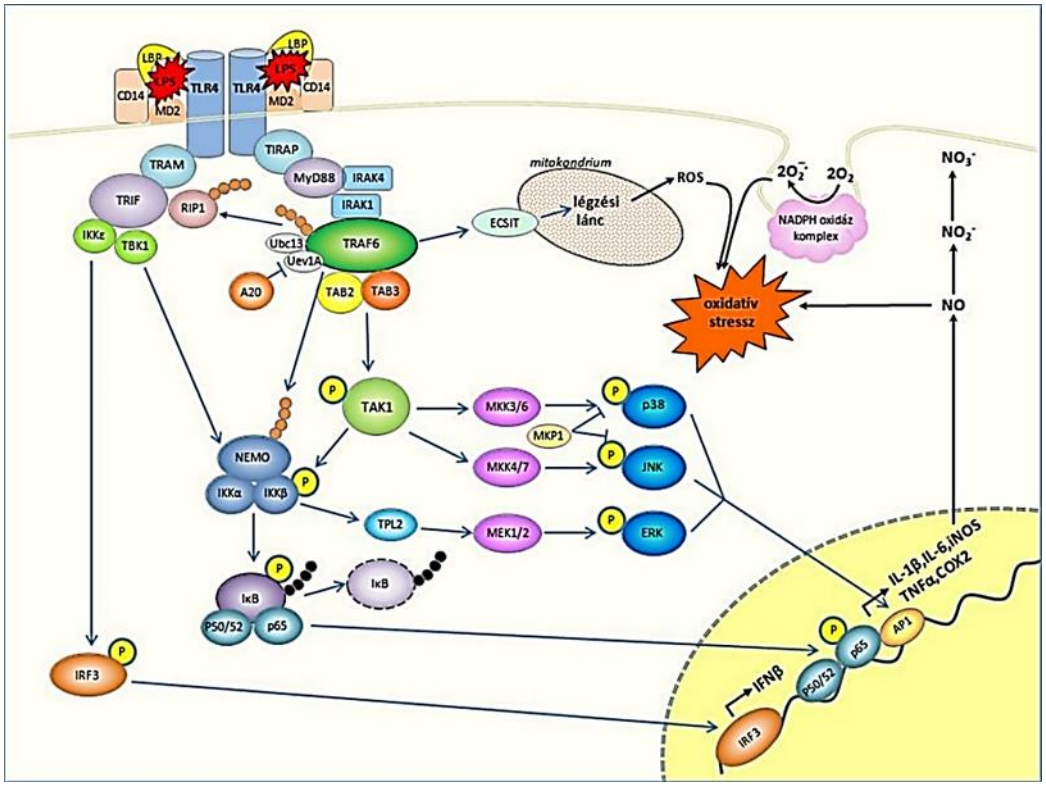


5. ábra: A MyD88-független jelátviteli út Lu és munkatársai szerint. (Forrás: (38) alapján)

A keletkezett endoszóma a TRIF-en és a TRAM-on, illetve a TRAF3 (*TNF receptor-associated factor 3*) aktiválásán keresztül indukálja az IRF3 (*IFN regulatory factor 3*) transzkripciós faktor dimerizációját, majd nukleáris transzlokációját, a TBK1 (*Tank-binding kinase 1*) és az IKKε-on (*Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon* vagy *Inducible I kappa-B kinase* (IKKi)) keresztül (**4.,5. és 6. ábra**). Az IRF3 transzkripciós faktor az I-es típusú interferonok termelését segíti (36). A TRIF C-terminális régiója tartalmaz egy RHIM-et (*Rip homotypic interaction motif*), ami szabályozza az interakciót a szerin/treonin kináz RIP1-el (*Receptor interacting protein-1*). A RIP1 szintén fontos eleme a TNFα által közvetített "késői fázisú" NF-κB jelátvitelnek, mechanizmusa egyelőre ismeretlen (52). Egy tanulmány szerint a RIP1 hiánya az NF-κB jelátvitel hibájához vezet (38), és a $RIP1^{-/-}$/$MyD88^{-/-}$ kettős génkiütött egér embionális fibroblaszt sejtvonalak esetén sérül az NF-κB aktiváció, azonban a RIP1 nem felelős az LPS indukálta IRF3 aktivációért (**5. és 6. ábra**) (38,53).

1.5.6. A MyD88–függő és –független jelátviteli utak közötti kapcsolat

Fertőzés (többek között LPS) hatására is, a szervezetben összetett, egymással sok helyen kölcsönható, kapcsolódó jelátviteli utak indulnak meg, így nem meglepő, hogy a MyD88-függő és a TRIF-függő útvonalak között is sikerült kimutatni ún. *cross-talk*-ot. Korábbi kutatások a TRIF N-terminális doménjén TRAF6-kötő helyet találtak, a két fehérje közötti interakciót leírták (20,52,53), így bizonyított, hogy a TRAF6 szükséges mind a korai, mind a késői NF-κB aktivációhoz (52). A *Lys*-63-on poliubikvitinálódó RIP1-nek szintén szerepet tulajdonítanak a két útvonal közötti kapcsolatban (45,53,54) (**4. és 6. ábra**).



6. ábra: A TLR4 jelátviteli utak összefoglaló ábrája Antus szerint. Rövidítések a szövegben. (Forrás: (55))

1.5.7. A MAP kinázok szerepe

<u>A mitogén-aktivált-protein kináz (MAPK) transzdukciós kaszkád</u>

A MAPK kaszkád egy evolúciósan ősi szerin/treonin specifikus protein kináz jelátviteli út. Fontos szerepe van a fertőzések elleni harcban, evolúciósan konzervált jellegénél fogva az élesztőgombákban és az emlős sejtekben is hasonló módon megy végbe, elemei foszforilációval és defoszforilációval szabályozódnak (56). Számos más jelátviteli úttal kombinálódva foszforilálni tudnak számos proteint (transzkripciós faktorokat, citoszkeletális fehérjéket, kinázokat és más enzimeket, ezáltal befolyásolhatják a génexpressziót, metabolizmust, sejtosztódást és –morfológiát, illetve a sejtek túlélését) (**6.ábra**). A MAPK útvonalak számos patologiás folyamatban is érintettek, mint például a rák, vagy egyéb betegségek (21,56).

A MAPK családba több, funkcionálisan különböző kináz-alcsalád tartozik. Az ERK-alcsaládba tartozó molekulák mitogén- és differenciálódási jeleket közvetítenek, míg a további két csoportba sorolható kinázok a stressz és a gyulladási citokinek által kiváltott válaszban vesznek részt (13). Idesoroljuk a stressz-aktivált proteinkinázokat (*Stress Activated Protein Kinases* (SAPK)) és a Jun-terminális kinázokat (*Jun N-terminal kinase* (JNK)), valamint a p38 MAPK-t, amely a magas ozmolaritás és a reaktív oxigéngyökök által kiváltott stresszválaszt közvetíti. Az ERK, a SAPK/JNK és a p38 MAPK-útvonal más-más „*upstream*" kinázokat foglalnak magukba, és más transzkripciós faktorokat aktiválnak. Az egyes útvonalak között együttműködés áll(hat) fenn. Az aktivált MAP-kinázok dimerizálódva kölcsönhatásba kerülnek a magba való transzlokációt elősegítő fehérjékkel. A sejtmagban *Ser-Pro* és *Thr-Pro* motívumokkal rendelkező szubsztrátokat foszforilálnak, és korai aktivációs géneket aktiválnak, mint a *c-fos*, *c-jun* és *c-myc* (13). Minden MAPK útvonal tartalmaz egy 3-szintű kináz kaszkádot, mely áll egy MAP kináz kináz kinázból (MAPKKK, MAP3K, MEKK, MKKK), egy MAP kináz kinázból (MAPKK, MAP2K, MEK, MKK) és egy MAP kinázból (MAPK). 4 fő MAPK kaszkád csoportot különíthetünk el emlős sejtekben, az ERK1/2-t, a p38-at, a JNK/SAPK és az ERK5 (*Big MAP Kinase* (BMK)) kaszkádot. Ezek a MAPK kaszkádok tehát kettős foszforilációval aktiválódnak egy jellemző tripeptid-motívumnál, ami a különböző útvonalaknál más és más: ERK: *Thr-Glu-Tyr*; p38: *Thr-Gly-Tyr*; JNK: *Thr-Pro-Tyr*. A MAP kinázok többek között aktiválják a következő transzkripciós faktorokat: ELK-1, ATF-2 (*activation transcription factor-2*), CREB (*cAMP responsive element-binding protein*) és az AP-1 (57,58).

1.5.8. Az NF-κB és AP-1 transzkripciós faktorok

Az NF-κB transzkripciós faktor egy *Drosophilá*któl emberig megtalálható, konzervatív, heterodimer fehérje (50 és 65 kDa), mely kötődni képes közel 200 gén *enhancer* régiójához. Többek között a gyulladásos citokinek (TNF-α, IL-1β, IL-6 és IL-12) transzkripcióját segíti, az apoptotikus folyamatokban szerepet játszó fehérjékét gátolja, így a sejtek túléléséért nagymértékben felelős (57–59). Befolyásolja a prosztaglandin, iNOS, COX2 fehérjék génjeit is, emellett fontos szerepe van a proliferációban. Számos

rákos elfajulásban konstitutivan aktív (melanómákban, többféle, hormonfüggetlen emlőrák típusban, prosztatarákban, hólyagrákban), gátlása jó célpontnak tűnik a daganatellenes terápiában (60). Normál, nem osztódó sejtekben nem aktív, mert a citoplazmában található inhibitor fehérje, az IκB kapcsolódik hozzá, mely lefedi a nukleáris lokalizációs szignált, így nem kerülhet be a magba. Aktivációja citokinek, növekedési faktorok, bakteriális termékek, oxidatív stressz, stb. hatására történhet.

Az AP-1 (aktivátor protein) dimer transzkripciós faktorok csoportja szintén szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban a veleszületett immunrendszer részeként. Csoportjába többek között homo- (pl. c-Jun) és heterodimer (pl. c-Jun/c-Fos) komplexek tartoznak, melyek transzkripciós faktorként működnek, transzkripció és direkt foszforiláció által szabályozódnak. (61,62) Dimerizáció után a célgének promóter illetve *enhancer* régiójához kötődnek (TPA és CRE régiók).

1.5.9. Akt jelátviteli út

A proto-onkogén, 3 izoformával rendelkező, szerin/treonin kináz Akt (másnéven protein kináz B = PKB) fehérje jelátvitele néhány éve a tudomány fókuszába került, mert fő szerepet tulajdonítanak neki több, különböző sejtfunkció szabályozásában, úgymint a metabolizmus, növekedés, proliferáció, vaszkularizáció, túlélés, transzkripció és proteinszintézis. Az Akt-jelátvitel foszfoinozitid-3-kináz (PI3K) segítségével fokozza a foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát (PIP3) képződést tirozin kinázok, integrinek, B- és T-sejt receptorok, citokin- és G-fehérje kapcsolt receptorok és más hatásokra (63,64). A PIP3 membránhoz vonzza a PDK1 kinázt (*phosphoinositide-dependent kinase 1*), egy, a jel továbbításában fontos molekulát, így az foszforilálni tudja az Akt-t a *Thr308*-as pozícióban. A teljes aktiváláshoz szükség van a *Ser473*-as foszforilációjára is, melyet számos fehérje katalizálhat, többek között az mTORC2 (*mechanistic target of rapamycin complex-2*), a PDK2, ILK (*integrin-linked kinase*) vagy a DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*). A foszforilációkkal aktivált Akt számos fehérjét befolyásol, úgymint eNOS, FOXO, BAD, p21, p27, miáltal hatással van a fent említett folyamatokra, úgymint túlélés, proliferáció, angiogenezis, migráció, sejtnövekedés. A bakteriális LPS is képes

aktiválni a PI3K/Akt jelátvitelt monocitákban és makrofágokban (65,66), így az NF-κB jelátvitelben is szerepet játszik, foszforilálja többek között az IKKα-t.

Az Akt PI3K-tól független, alternatív jelátviteli szabályozó mechanizmusok is ismertek, például Yang és munkatársai kimutatták (67), hogy növekedési faktor stimuláció következtében az Akt kináz végigmegy egy *Lys63* típusú ubikvitináción, ami nagyon fontos az Akt membrán lokalizációja és foszforilációja szempontjából. Az ERK (extracellular signal-regulated kinase) a tirozin kináz receptorok felől érkező aktiváló jeleket az mTOR komplex gátlásának feloldásán keresztül közvetíti, ezáltal elősegítve az Akt *Ser473*-as foszforilációját (68,69).

A jelút negatív regulációja több ponton is megvalósul, pl. a PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) a PIP3 defoszforilációját végzi PIP2-vé, ezáltal visszafogva az aktiválási kaszkádot (58,70). Az oxidatív stressz inaktiválja a PTEN-t és az inaktiváció megnövekedett PIP3 szinthez vezet, mely végül az Akt útvonalat is aktiválja (70).

1.6. **A szepszis diagnózisa**

A szepszis korai diagnózia rendkívül fontos, de nehéz feladat, mert a mikrobiológiai eredmények a mintavételt követően csak több napos késéssel érkeznek, és az is előfordulhat, hogy az eredmény fals negatív (15). Emellett a szepszis első biokémiai jelei sem különíthetőek el könnyen minden esetben a nem fertőzés okozta betegségek tüneteitől, esetleg nehezen is felismerhetőek. Az utóbbi években sokan kutatták a szepszis legkorábbi (a beteg felvételét vagy állapotrosszabbodását követő néhány órán belüli), specifikusan megjelenő markereit, mediátorait. A legtöbb kutatási eredmény szerint elsősorban a citokinek, kemokinek (TNFα, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) és receptoraik szintje emelkedik meg (71–73), viszont ezek legtöbbje szívelégtelenség, égési sérülések vagy trauma esetén is emelkedett értékeket mutatnak, tehát diagnosztikailag nem tekinthetőek specifikusnak. Az akut fázis reakció a szervezet fertőzésre vagy traumára (pl. égés) adott gyors, védekező válasza, mely során a májsejtek által termelt fehérjék mennyisége a plazmában hirtelen megnövekszik. Az akut fázis válaszban és a szeptikus folyamatok kialakulásában is a TNFα, az IL-1 és az IL-6 a legfontosabbak, melyek fő forrása a

makrofág sejt. Az általuk okozott hatások is átfedőek, de az akut-fázis fehérjék szintézisében és a szeptikus tünetek előidézésében más-más mértékben vesznek részt (13). A későbbiekben más faktorok is aktiválódnak, illetve ezek is számos más faktort aktiválnak. Charalampos Pierracos és Jean-Louis Vincent *Sepsis biomarkers* (74) című munkájukban 178 korábban leírt biomarker hatékonyságát és diagnosztizálásban való használhatóságát elemezték. Megállapították, hogy a klinikumban legáltalánosabban használt biomarkerek a C-reaktív protein és a prokalcitonin, de sokan vizsgálták a különböző citokinek és kemokinek (tumor nekrózis faktorok, interleukinek, HMGB-1 stb.), sejt markerek (CD14, CD163, stb.), különböző receptorok (TNFR, citokin és kemokin receptorok, Toll like receptorok, Fas-receptor, stb.), koagulációs (antitrombin, fibrin, protein C és S, stb.) és egyéb biomarkerek (E/L/P-szelektinek, VCAM-1, substance-P, lipopoliszacharid-kötő protein, laktát, stb.) szintjének változásait is. Ezek közül többet is specifikus markerként írtak le. Szintén Pierracos és Vincent (74) tanulmánya szerint érdemes több biomarker kombinációját használni a diagnózishoz, de számos marker inkább a szepszis kimeneteléről, súlyosbodási esélyéről ad prognózist.

Az utóbbi évek kutatásainak eredményeképpen előtérbe került a nem-kódoló genom, azon belül is a mikro RNS-ek (miRNS) szerepe. Számos kutatás rámutatott, hogy fontos biológiai szabályozó szerepük van a teljes vagy részleges mRNS gátlásban, ezáltal a fehérje expresszióra. A miRNS-ek kb. 22 nukleotid hosszúságú kis RNS-ek, megtalálhatók a szérumban vagy a plazmában is. Jónéhány betegségben, köztük a szepszisben is, bizonyos miRNS-ek expressziós szintjének változása jellegzetes, így biomarkerként használhatók (75). Wang és munkatársai tanulmányukban (75) 166 szepszises betegben a miR-223-at, a miR-499-5p-t, a miR-122-t és a miR-193b-t vizsgálták, hogy a szepszis biomarkerének tekinthetők-e. Ezek közül a miR223 és a miR499-5p alkalmasnak bizonyult a szepszis és a szeptikus sokk elkülönítésére is. Chatterjee és munkatársai már 2011-ben rámuttatak a miR-146a miRNS szerepére *Mycobacterium tuberculosis* fertőzést követően (76). A miR-146a negatív *"feedback"* regulátora a TLR jelátvitelben az *irak-1* és *traf6* géneknek, ezáltal az NF-κB transzkripciós faktor aktiválódásának, ami ezáltal csökkent IL-6, IL-1b és TNFα expresszióhoz vezet (77,78).

Mivel a szepszis egy komplex szindróma, számos szerv és szövet károsodását okozhatja, ezért általában több marker vizsgálatára van szükség a diagnózishoz. A klinikumban elterjedt biomarkerek a C-reaktív protein, mely egy, a májban termelődő akut-fázis fehérje, a gyulladásos stimulust követően 4-6 órával, citokin hatásra kezd emelkedni a szintje, maximumát 36-50 óra elteltével éri el (15,79–81). A prokalcitonin egy 13 kDa molekulatömegű glikoprotein, a kalcitonin hormon prekurzora, a pajzsmirigy C-sejtjeiben termelődik, normál szintje a szérumban alacsony, de bakteriális infekció esetén növekszik. Az infekciót követő 3-4. órában kezd növekedni a szintje, és 6-24 óra múlva éri el a maximumát (79–81). Kevéssé érzékeny biomarker a CD64, mely a neutrofil granulociták egy konstitutívan expresszált sejtfelszíni receptora. Infekció hatására jelentősen nő az expressziója, a bakteriális opszonizációban és a fagocitózisban fontos. Lipopoliszacharid-kötő fehérjével (LBP) együtt mérve a szepszis és a SIRS elkülönítésére is alkalmas lehet (81). Biomarkerként használják még a MARCO (*Macrophage Receptor with Collagenous Structure*) fehérjét, mely a makrofágok lépben és nyirokcsomókban megjelenő alpopulációjában jelenik meg, baktériumok sejtfalkomponenseit köti meg (13). Az MSR (*macrophage scavenger receptor*), II-es típusú trimer membránreceptor, bakteriális (LPS) és virális (dsRNS) komponenseket, oxidált LDL-t (ateroszklerotikus folyamatok) és kórosan glikolizált anyagcsere-termékeket (cukorbetegség) ismer fel (13).

1.7. **A szepszis kezelése**

Az Egészségügyi Minisztérium szakmai irányelve: *A súlyos szepszis és a szeptikus sokk kezelése* című iránymutatásában (11) részletes instrukciókat ad a kezelésekre, és azok megbízhatóságára vonatkozóan. Az irányelv kimondja, hogy “a súlyos szepszis és a szeptikus sokk hatékony kezelésének elengedhetetlen része a korai diagnózis, illetve a veszélyeztetett betegek azonosítása. Ennek érdekében szükséges a súlyos infekciók gyors mikrobiológiai diagnosztizálása, és a releváns biokémiai és hematológiai vizsgálatok eredményeinek ismerete. A súlyos szepszis és a szeptikus sokk állapotában lévő betegek nagy része tartós gépi lélegeztetést és/vagy akut veseelégtelenség miatt hemodialízisterápiát igényel.” (11)

A kiadvány szerint a szeptikus góc sebészi kezelése mellett ajánlott az akár kombinált antibiotikum-terápia, viszont az endotoxin-ellenes monoklonális antitestek adása, a interleukinok antagonizálása, az arachidonsav-anyagcsere módosítása (COX-gátlás ibuprofennel) nem ajánlott. Kortikoszteroidok alkalmazása csak elhúzódó esetekben ajánlott, oxigén-szabadgyök csapdák közül az N-acetilcisztein (NAC) és a szelén nem ajánlott, a xantin-származékok hatása még nem bizonyított. Az interferon-γ, a G-CSF és a foszfolipáz A2 (PLA2) kezelés hasznossága sem bizonyított. Növekedési hormonok adása nem ajánlott. Kutatásra érdemes, de bizonyításig nem ajánlott a hemofiltráció és a plazmaferezis alkalmazása. Poliklonális immunterápia csak szigorú körülmények között (felnőtteknél, szeptikus sokk esetekben) ajánlott. Az oxigénterápia hasznossága bizonyított, de nem minden típusa ajánlott, illetve egyedileg elbírálandó. Fontos emellett a keringési elégtelenségek kezelése pl. krisztalloid- vagy kolloidterápiával. Míg a vértranszfúzió hatása nem bizonyított, a gyógyszeres keringéstámogatás (vazopresszin, noradrenalin, dopamin) és a perctérfogat növelése (dobutamin) szükséges. A vesekárosodás kezelésére hemodialízis lehet szükséges. A szeptikus sokk patogenezisében fontos szerepe van a koagulációs rendszer aktiválódásának, és a kórfolyamat előrehaladtával az alvadási zavar kiemelkedő szerepet játszik a különböző szervi diszfunkciók kialakulásában és a mortalitás fokozódásában, így a szubkután heparin és az aktivált protein C kezelés lényegesen csökkenti az ún. 28. napi mortalitás esélyét. Az ajánlás szerint "nincs specifikus terápia a gasztrointesztinális rendszer és a máj működészavarának kivédésére, így alapvető fontosságú a hemodinamikai és oxigenizációs egyensúly fenntartása, splanchnikus vazokonstrikciót okozó gyógyszerek adásának kerülése, stressz ulkusz profilaxis és a minél korábbi (par)enterális táplálás bevezetése" (11). A kialakuló anyagcserezavar kezelése szintén fontos, a szepszis okozta inzulin-rezisztencia (ami gyakran a szepszis első tünete) miatt szükséges egy intenzifikált inzulinterápia. Szükséges lehet zsírsavak bevitele, de módszere még kérdéses, míg aminosavak közül a glutamin ajánlott, a vitaminoknak és nyomelemeknek a hasznossága nem bizonyított (11).

2. Az oxidatív stressz

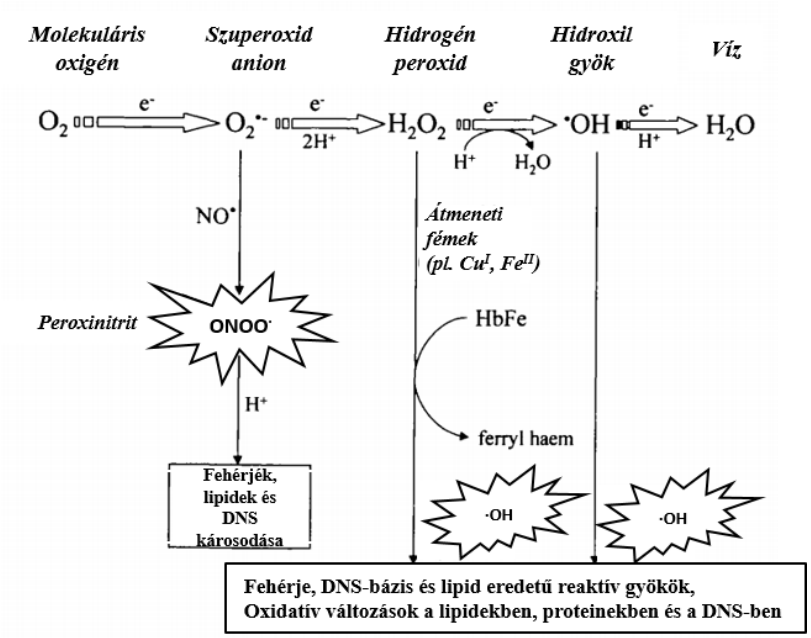
Az oxigén a fotoszintézis melléktermékeként jelent meg kb. 2,5 milliárd évvel ezelőtt. Az első fotoszintetizáló élőlények a cianobaktériumok lehettek, és az általuk termelt oxigén feldúsulása a környezetben – az addigi redukáló jellegű légkör helyett – fokozatosan oxidatív légkört eredményezhetett. A légkörben ennek következtében megnövekedett molekuláris oxigén szint szelekciós nyomásként nehezedett a mikroorganizmusokra (82,83), így előidézte az oxigén hasznosításának kialakulását. Az aerob élőlényekben kifejlődtek olyan enzimek, melyek képesek az oxigén redukciójára (**7. ábra**). A belélegzett molekuláris oxigén a mitokondriumban található légzési láncban terminális elektron akceptorként van jelen, melynek vízzé redukálásához 4 elektron és hidrogén ionok szükségesek (melyeket a lebontó folyamatok során képződő redukált koenzimek biztosítanak). Az oxidáció közben felszabaduló energiával a szintén a mitokondriumban található ATP-szintáz komplex az életfolyamatokhoz szükséges ATP molekulákat állítja elő (oxidatív foszforiláció). Ha az oxigén redukciója valamiért nem teljes, akkor reaktív oxigén intermedierek (ROI vagy *reactive oxygen species* = ROS) képződnek, ez az aerob organizmusok életfolyamatainak természetes velejárója. Ezek az ún. ROS-ok kémiailag többnyire igen reaktívak, de élettartalmuk általában rövid (82,83). A reaktív oxigén intermedierek minden makromolekulát, de főleg a lipideket, fehérjéket és a DNS-t károsíthatják (**7. ábra**), ezáltal szerepet játszanak különböző betegségek, mint pl. rák (ahol növelik a *c-fos, c-jun* és *c-myc* protoonkogének expresszióját) (83) és különböző neurodegeneratív rendellenességek kialakulásában, de az öregedés folyamatában is (82). Az oxidatív légkör kialakulásával párhuzamosan, az oxigén káros formáival szemben védekező mechanizmusoknak kellett kialakulniuk (83,84). A ROS-ok létrejöttét és káros hatásait az antioxidáns védelmi rendszerek próbálják kiküszöbölni. Oxidatív stresszről akkor beszélhetünk, ha felborul az egyensúly a védelmi rendszer és a ROS keletkezése között, ami a szabadgyökök feldúsulásához vezet. Ezt több dolog is előidézheti, pl. az antioxidáns enzimeket kódoló gének mutációja, gyulladásos folyamatok vagy a ROS túlzott mértékű megjelenése, a ROS-t generáló anyagok túlzott jelenléte vagy a légzés nagyarányú fokozódása miatt (82).

Szabad gyökök kialakulhatnak endogén módon, a szervezetben, a légzési lánc működése vagy gyulladás következtében, a mieloperoxidáz, a xantin oxidoreduktáz, a NADPH oxidáz, a lipoxigenáz, a cikloxigenáz, a prosztaglandin szintáz enzimek és mikroszomális oxidáció (ER) következtében. Emellett exogén forrásból (kémiai és fizikai eredetű stressz) is eredhetnek: környezeti hatások, mint pl. az ózon, levegőszennyezés, cigaretta füst, hő, sugárzás (UV, *X-ray,* γ), nyomás, redoxpotenciál változás, ozmotikus viszonyok megváltozása, tápanyagok és a víz hiánya, toxikus anyagok, xenobiotikumok, peszticidek és egyéb antifungális szerek jelenlétéből adódóan (85).
Összességében a szabad gyökök származhatnak az alábbiakban leírt módon az oxigéntől (ROI vagy *reactive oxygen species* = ROS), emellett a nitrogéntől (RNI vagy *reactive nitrogen species* = RNS), a kéntől (RSI vagy *reactive sulphur species* = RSS) és a klórtól (RCI vagy *reactive chlorine species* = RCS) is, de a biológiában és az orvostudományban a ROI és az RNI a két legjelentősebb prooxidánsnak tekinthető csoport (85). A ROI és az RNI gyakran együtt felelősek az oxidatív stressz kialakulásáért, a reaktív gyökök túltermelődéséért, így a sejtben lévő antioxidáns védekező molekulák depléciójáért.

2.1. **A reaktív oxigén intermedierek (ROI) kialakulása**

Az O_2 molekula spin elrendeződésnek alapállapotban nincs nagy reaktivitása. Az oxidatív reakciókban az oxigén vagy aktiválódik fotodinamikai folyamatok során, így egy instabil elektronpárral rendelkező ún. reaktív szinglet oxigént eredményez ($^1O_2$), vagy végigmegy négy egy–elektronos redukciós folyamaton (pl. légzési lánc), melynek során reaktív oxigén gyökök alakulnak ki (**7. ábra**). A redukciós sor alkalmával először egy szuperoxid anion gyök jön létre ($O_2^{-\bullet}$), amely tovább redukálódik egy újabb elektron felvételével peroxid ionná (O_2^{2-}). Ezalatt az oxigén-oxigén közötti kovalens kötés erőssége csökken. Az alapállapotú O_2 esetében a két atomot két kovalens kötés tartja össze, ami az $O_2^{-\bullet}$-nél másfélre és a O_2^{2-}-nál pedig egy kovalens kötésre csökken (82). A peroxid ionból további redukció során hidroxil gyök ($^{\bullet}OH$) és víz keletkezik, végül a hidroxil gyök az utolsó redukciós lépésben újabb vízzé redukálódik. Az oxigén toxicitása tehát a belőle könnyen képződő szabad gyököktől (minden olyan kémiai anyag, amelynek külső

elektronorbitálján egy párosítatlan elektron van, a protonok számától függetlenül), illetve az erős oxidáló hatású hidrogén-peroxidtól ered.

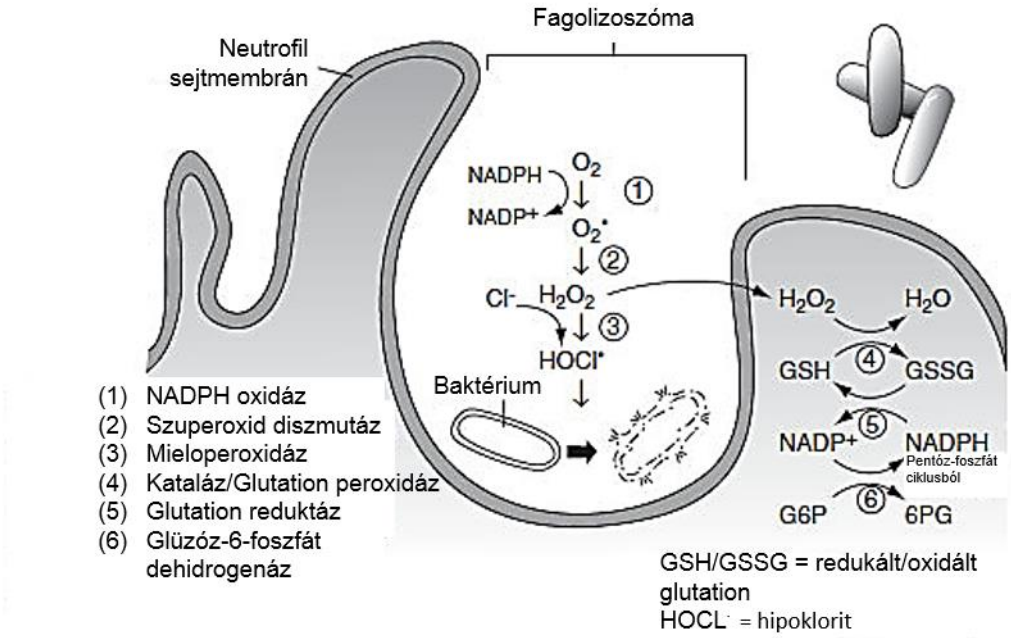


7. ábra. Az oxigén molekula négyelektronos redukciója vízzé, és a folyamat során létrejöhető reaktív oxigéngyökök hatásának következményei Gutteridge és Mitchell ábrázolásában. (Forrás: (86) alapján)

2.2. **A reaktív oxigén intermedierek fiziologiás jelentősége**

Szabályozó mediátorokként fontos szerepük van a jelátviteli folyamatokban, hiszen számos ROS-szabályozott folyamat védi a sejteket az oxidatív stressztől és állítja vissza a redox egyensúlyt azáltal, hogy befolyásolnak fiziológiai folyamatokat, mivel képesek a transzkripciós faktorok vagy más kulcsenzimek aktivitásáért felelős redox-szenzitív doméneket modifikálni. A HIF-1α szabályozása által szerepük van hipoxia esetén, sőt, a HIF-1α számos metabolikus enzim szabályozásáért is felel (pl. laktát dehidrogenáz A, piruvát dehidrogenáz kináz 1), és az elektrontranszport lánc bizonyos citokróm komponenseinek expresszióját is regulálhatja (85). A mitokondriális ROS-nak szerepe van az inflammoszóma aktivációjában, és fontos szignálmolekulák gyulladásos

folyamatokban. A számos védekező funkcióért felelős NOD-szerű receptorok aktivációjáért is felelősek, ezáltal a proinflammációs citokinek, mint pl. az IL-1β termelődéséért. A nitrogén monoxidnak fiziológiás szerepe van az értónus szabályozásában a szolubilis guanilát cikláz aktiválásán keresztül. Apoptózis során a citokróm c és más proapoptotikus fehérjék kiáramlásáért is felelősek lehetnek a reaktív oxigén intermedierek (85). Fontos szerepük van a kórokozókkal szembeni védekezésben is (**8. ábra**). A fagocita sejtek a membránhoz kötött NADPH-oxidáz komplex segítségével az O_2 egy–elektronos redukcióját hajtják végre. Ezt használják fel számos baktérium elpusztítására: a baktérium kapcsolatba kerül a fagocita sejtmembránjával, ami körbeveszi azt, és a NADPH-oxidáz által létrehozott szuperoxid ($O_2^{-\bullet}$) H_2O_2-dá átalakulva átjut a kórokozóba és károsítja (elpusztítja) azokat (87). Ilyenkor az immunrendszer polimorfonukleáris leukocitái (fagociták, monociták, makrofágok) a kórokozókkal szemben fokozott $O_2^{\bullet-}$ termeléssel védekeznek a NADPH-oxidáz és mieloperoxidáz enzimek segítségével (84,87).



8. ábra: A fagociták hatásmechanizmusa, "*respiratory burst*" Hassan (88) **szerint.** A fagocita mebránjával érintkező baktérium indukálja az ott található NADPH-oxidázt és olyan proteinek transzlokációját a citoszolban, amelyek a fagocita vakuolum kialakításáért felelősek. A vakuolumba bekerült baktériumot a fagocita által termelt reaktív oxigén gyökök károsítják. (Forrás: (88))

Azon személyeknél, akiknél hiányzik egy genetikai sérülés miatt a fagocitákban a NADPH-oxidáz funkciója, létrejöhet a bőr, a tüdő, a máj és a csontok krónikus fertőzése, amely gyakran idő előtti halálhoz vezethet (83).

2.3. A reaktív oxigén intermedierek (ROI) károsító hatásai és a védekező enzimrendszer

A **szuperoxid gyök** ($O_2^{\bullet -}$) legnagyobb mennyiségben a mitokondriumban, a terminális oxidáció során termelődik, de keletkezhet az endoplazmatikus retikulumban, a kevert funkciójú monooxidázok (flavin dehidrogenázok, xantin oxidáz, stb.) működése során, a kloroplasztiszokban, különböző vegyületek (auto)oxidációjakor, illetve az ún. „*respiratory burst*" során (87). A szuperoxid gyöknek ($O_2^{\bullet -}$) egy párosítatlan elektronja van, az oxigénnél reaktívabb, de mivel viszonylag stabil, akkumulálódhat a sejtekben, és képződésének helyétől távolabbra is diffundálhat. Oxidálni tud átmeneti fémkomplexeket, organikus szubsztrátokat, kapcsolódni képes fémekhez és más reaktívabb oxigén intermedierré is alakulhat. A fehérjék Fe-S klasztereit teszi tönkre a Fe(III) redukálásával. A felszabaduló vas további károsodásokat okozhat. Oxidálódva hidrogén-peroxiddá alakulhat. A $O^{-\bullet}_2$ oxidálja a fenolokat, katekolamint, tokoferolt, a különböző tiolokat (82,84). A szuperoxid vizes közegben gyorsan átalakul molekuláris oxigénné és hiperoxid-anionná: $H^+ + 2O^{\bullet -}_2 \longrightarrow HO^-_2 + O_2$. Savas közegben, mint amilyen a fagocita-vakuólum vagy a sejtmembránok mikrokörnyezete, a szuperoxid protonálódik (82). Protonált formájával, a perhidroxigyökkel ($HO^{\bullet}_2$) sav-bázis egyensúlyt alkot: $H^+ + O^{\bullet -}_2 \longleftrightarrow HO^{\bullet}_2$. A $HO^{\bullet}_2$ oxidáló hatása erősebb, mint a $O^{\bullet -}_2$ –é, és annál jóval citotoxikusabb hatású, lipofil lévén, könnyebben behatol a lipidmembrán kettősrétegbe, lipidperoxidációt okozva (89). A szuperoxiddal a tiolok is könnyen oxidálódnak az S–H kötések OH kötésnél savasabb jellege miatt (R –SH $\longrightarrow$ R -S$^-$ $\longrightarrow$ R -S$^{\bullet}$ $\longrightarrow$ R –S–S– R).

Az ER membránja citokróm-P_{450} komplexet tartalmaz, ami egyrészt monooxigenáz funkciót lát el, másrészt xenobiotikumokat, karcinogén ágenseket, peszticideket és a sejt saját zsírsavait és szteroidjait hidroxilálja. Továbbá több, biológiailag fontos molekula

oxidációja során is keletkezik $O_2^{-\bullet}$ (pl. glicerin-aldehid, $FMNH_2$, $FADH_2$, tiol-vegyületek, stb.) (83).

A fent leírtak alapján minden élő rendszer termel szuperoxid gyököt, mely nem enzimatikus (ld. később) vagy enzimatikus úton, szuperoxid diszmutáz (SOD) katalizálta folyamatban, redukálódik tovább hidrogén-peroxiddá ($2O^{-\bullet}_2 + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$). A SOD-ok metalloproteinek, több típusuk van a benne lévő fémion szerint: réz-cink szuperoxid diszmutáz (CuZnSOD), mangán tartalmú (MnSOD) és vas tartalmú (FeSOD) szuperoxid diszmutázok. A prokariótákban és az eukarióta mitokondriumokban (és csak a főemlősök citoszoljában), valamint a növényi kloroplasztiszok mátrixában, membránjában glioxiszómákban csak MnSOD van, míg a citoplazmában, a lizoszómák mátrixában, és a növényi peroxiszómákban csak CuZnSOD (84). Ezekben az ionok pozitív töltést kölcsönöznek az aktív helynek, így a szuperoxid gyök és az aktív hely között elektrosztatikai kötés alakul ki, és miközben a szuperoxid gyököt redukálják hidrogén peroxiddá, a fémionok különböző redox-állapotokon haladnak végig, ami állandó, kis mennyiségű H_2O_2 termelését jelenti a sejtben. A FeSOD a MnSOD rokona, főleg a prokariótákban található, de előfordul protozoákban és néhány növényben is (84).

A **hidrogén-peroxid** (H_2O_2) az élő szervezetben számos módon keletkezhet, pl. xantin oxidáz, glükóz oxidáz vagy szuperoxid diszmutáz enzim működése következtében. A H_2O_2 a legkevésbé reakcióképes terméke számos oxidáz reakciónak, ez a hidrogén-peroxid fő endogén forrása. Továbbá számos flavin tartalmú oxidáz (pl. a növényi peroxiszómákban megtalálható glikolát-oxidáz), vagy az eukarióták peroxiszómájában az aminosavak deaminációját végző aminosav-oxidázok is részt vesznek a H_2O_2 termelésében. Számos enzim közvetlenül is termel H_2O_2-ot, mint pl. a monoamin oxidáz, vagy a galaktóz oxidáz, de a mitokondrium, a mikroszómák és a fagocitáló sejtek is termelik. A H_2O_2-nak párosítatlan elektronjai nincsenek, viszonylag stabil, így akkumulálódhat a sejtekben, és képződésének helyétől távolabbra is diffundálhat (82,83). A $O_2^{-\bullet}$ gyökkel szemben képes átjutni a biológiai membránokon, és a bejutási helyétől elvándorolva is kifejtheti káros hatásait. Közvetlenük enzimeket, pl. glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenázt (GAPDH) (90), oxo-savakat (piruvát, glioxalát) és más biológiailag fontos vegyületeket (pl. telítetlen zsírsavak, tiolok) oxidálhat, a fehérjék *Cys* és *Met*

oldalláncait is károsítja. Fémkatalizált reakciója Fe^{2+}-ionnal a rendkívül reakcióképes $^{\bullet}OH$ (hidroxilgyök) képződéséhez vezet (82,86,91).

A H_2O_2 semlegesítésére a hem tartalmú kataláz (CAT) enzimek, és különböző peroxidázok szolgálnak. A kataláz enzim tetramer szerkezetű hem enzim, minden alegysége tartalmaz egy vas tartalmú hem csoportot, az aktív helyhez kötve. A benne lévő vas oxidációs állapotának megváltoztatásával a H_2O_2-ot bontja H_2O-ra és O_2-re ($2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O$). A sejten belül megtalálhatók kisebb mennyiségben a kloroplasztiszokban, mitokondriumban, endoplazmatikus retikulumban. Fő lokalizációjuk azonban a peroxiszómákban van, ahol a zsírsavak β-oxidációjában részt vevő enzimek (glikolát-oxidáz, urát-oxidáz, flavoprotein-dehidrogenázok) által termelt H_2O_2-ot bontják el (92).

A peroxidázok a katalázokkal egyetemben a H_2O_2 semlegesítéséért felelősek, a plazmamembránban és a mitokondrium belső membránjában lokalizálódnak. A legjelentősebb peroxidáz a glutation-peroxidáz (GPx), mely szelént tartalmaz (az élesztők az emlősök glutation-peroxidázaival szemben szelenociszteint nem tartalmaznak), képesek a hidrogénperoxid és a szerves peroxidok mellett a nem vízoldékony, foszfolipid peroxidokat is elbontani, így igen nagy szerepük van a membránkárosodások megakadályozásában. A GPx kis H_2O_2 koncentráció esetén a fő védekező rendszer, de a H_2O_2 toxikus, nagy koncentrációi esetén a kataláz is működésbe lép (83). A H_2O_2 és alkil-hidroperoxidok redukálásában a tioredoxin-peroxidáz is részt vesz, tioredoxint felhasználva, az oxidálódott tioredoxinok visszaredukálását a tioredoxin reduktáz végzi NADPH felhasználásával (93).

A legfontosabb **hidroxilgyök** ($^{\bullet}OH$) termelők azok a vas tartalmú, kis méretű, „*transit pool*” molekulák, melyek nagy tömegű molekulákkal (ATP, GTP, szerves savak, vagy membrán lipidek) képeznek kelátokat vagy komplexeket (83). A hidroxilgyök létrejöhet vizes közegben a Haber-Weiss reakció alapján ill. pl. vas jelenlétében a Fenton-típusú folyamat során:

$$O^{-\bullet}_2 + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^- + {}^{\bullet}OH \qquad \textbf{1.}$$

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2 \qquad \textbf{2.}$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^-$$

$$O_2^{-\bullet} + H_2O_2 \longrightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + O_2$$

Ha három elektron lép be az O_2 molekulába, akkor a kötésrend leesik, már nem elegendő a két O atom egybetartásához. Ilyenkor O_2^- (H_2O) és $O^{-\bullet}$ ($OH^{\bullet}$) keletkezik. A hidroxil szabadgyök a legreaktívabb szabadgyök. Azonnal elreagál a környezetében lévő szerves vegyületekkel, így csak a képződésének helyén okoz károkat, a sejtekben nem akkumulálódik (82,89,91). A lipidek láncreakciószerű peroxidálódását okozza, a telítetlen zsírsavláncokat támadja, lánctörést okoz. A reakciók során képződő aldehidek és dialdehidek szintén toxikusak, a DNS és RNS károsodását okozhatják (a cukor részen lánctörést okozhatnak, de a bázisokat is módosíthatják). A hidroxil szabadgyök fehérjék aggregációját és/vagy fragmentációját okozza, elsősorban az α-C-atomot oxidálja, ami később keresztkötések kialakulásához vezet, szintén lánctörést okozhatnak. Hidroxilezi a *Phe*-t, *Tyr*-t és *Arg*-t, keresztkötéseket alakít ki a *Tyr*-ok, *Hys*-ek és *Lys*-ek között. A hidroxilgyök a sejt minden molekulájával képes reagálni: cukrokkal, aminosavakkal, foszfolipidekkel és más szerves savakkal is (82,89,91).

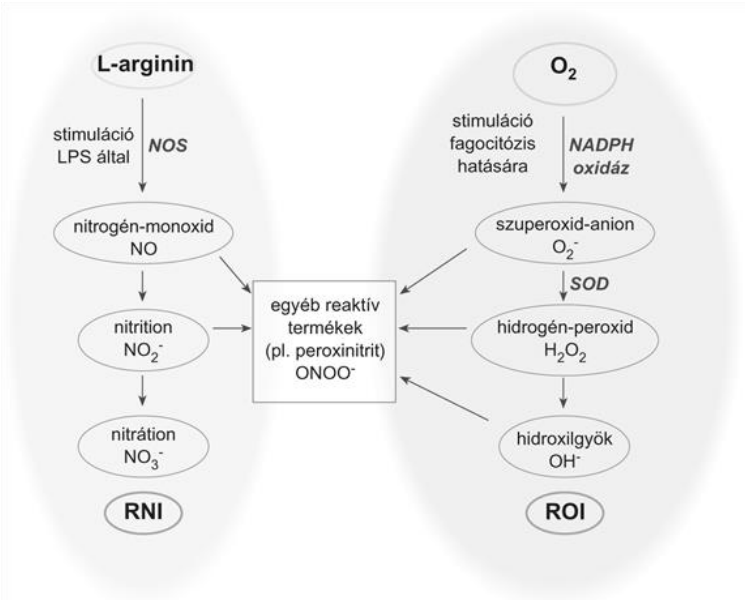
2.4. **A reaktív nitrogén intermedierek (RNI) fiziológiás és károsító hatásai**

A reaktív nitrogén intermedierek közé tartozik a nitrogén monoxid gyök ($NO^{\cdot}$), a nitrozónium kation ($^{\cdot}NO_2$), a nitroxil anion (NO^-), nitrogén oxid gyök ($NO_2^{\cdot}$) és a peroxinitrit ($ONOO^-$).

A $NO^{\cdot}$ gyök a prekurzora más reaktív nitrogén intermediereknek, és magasabbrendű szervezetekben L-argininből keletkezik nitrogén oxid szintáz (NOS) hatására. A NOS enzimeknek 3 formájuk van: neuronális, endoteliális és indukálható (n/e/iNOS). Előbbi

kettő konstitutívan expresszálódik, míg az iNOS patogénekre (pl. LPS) adott válaszként transzkripcionálisan regulált (85) (**9. ábra**).

A **nitrogén-monoxid** gáz az emlős szervezetben fontos szabályozó szerepet tölt be. Alapvető eleme neurológiai, fiziológiai és immunológiai folyamatoknak: celluláris jelátviteli molekula és ingerületátvivő anyag, amely részt vesz számos fiziológiai és patológiás folyamatban. A NO egyik fontos sejten belüli feladata, hogy reverzibilisen, poszttranszlációsan módosíthatja a proteineket, a tiol és cisztein csoportok S-nitrozilációja által. Emellett a guanil-cikláz aktivitásának befolyásolása révén a cGMP szint emelkedéséért felelős. Fontos szerepe van az apoptózisban, a keringésszabályozásban, illetve idegrendszeri neurotranszmitterként a szinaptikus plaszticitás, a kognitív funkciók, a memória és számos neuroendokrin szabályozási folyamatában.



9. ábra: Az erősen antimikrobiális hatású reaktív oxigén- és nitrogéngyökök keletkezése a fagocitasejtek aktivációja során. (Ábra forrása: (13))

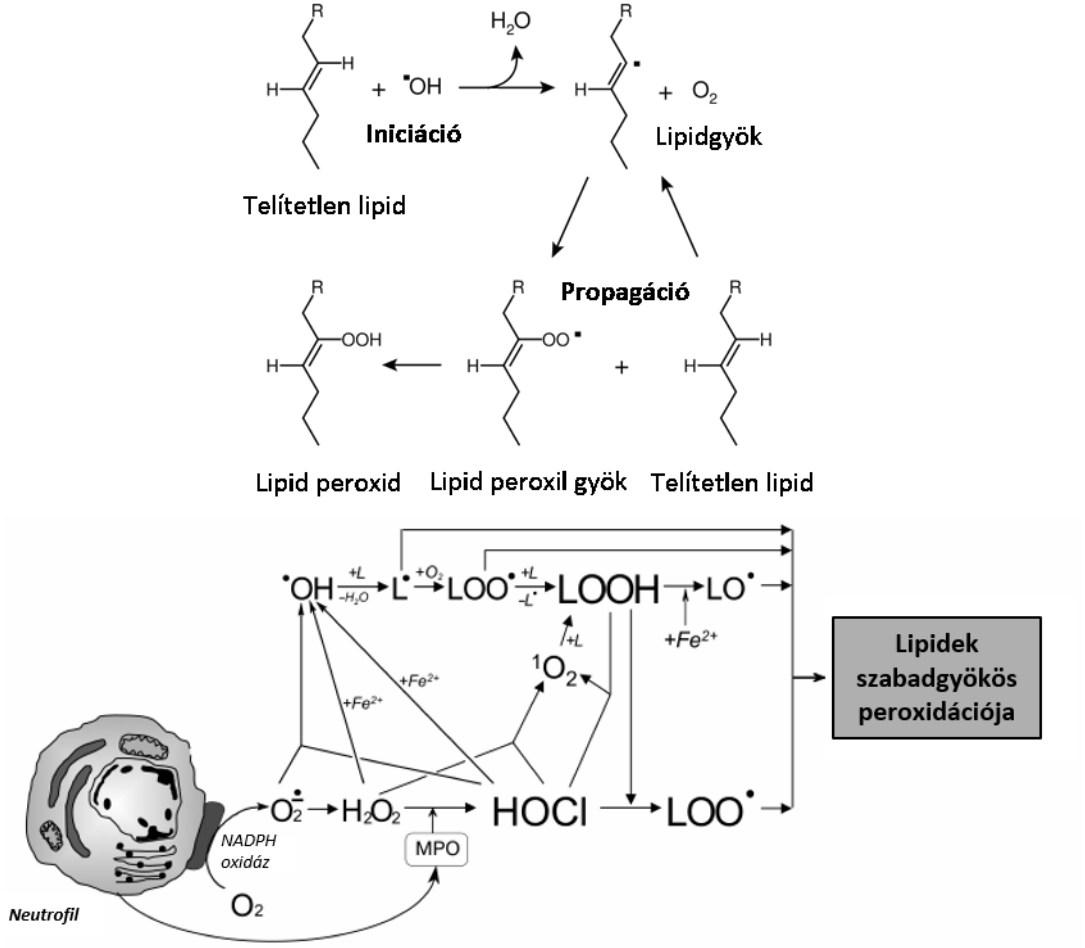
Az immunrendszer gyulladásért felelős sejtjei, a makrofágok és neutrofilek, nitrogén-monoxidot termelnek, melyek RNI-ké alakulva antimikrobiális és tumorellenes hatást fejtenek ki a gazdaszervezet védelme érdekében, de sajnos emellett a szervezetre is a ROS-hez hasonló súlyos károsító hatásuk lehet (94).

A vérben a nitrogén-monoxid az oxidált hemoglobin hemcsoportjához kötődve nitráttá alakul, míg a SOD enzimek felelősek a szuperoxid gyökök eliminálásáért, aminek sajnos a nitrogén-monoxidhoz való affinitása nagyobb, mint magához az enzimhez, így ha a nitrogén-monoxid és a szuperoxid gyök egymás közelében keletkeznek, akkor azonnal a rendkívül reakcióképes, erős oxidatív hatású **peroxinitrit**té egyesülnek, ami a membránok anioncsatornáin átjutva a sejtek között is diffundálhat, így sokféle, súlyos, kiterjedt károsodást okozhat. Gyulladásos viszonyok között (**9. ábra**) a nitrogén-monoxid és a szuperoxid helyi képződése is akár ezerszeresre fokozódhat, és így a peroxinitrit szintje akár egymilliószorosára is, ami igen káros a környező szövetekre, többek között súlyos szívizom és agyi károsodásokat okozhat (94).

2.5. **Lipid eredetű gyökök és a lipidperoxidáció**

Az oxigén és nitrogén eredetű szabadgyökök tevékenysége következtében kialakuló egyéb reaktív gyökök (**10. ábra**), pl. szerves hidroperoxidok (LOOH), lipid-peroxil gyökök ($LOO^{\bullet}$), a lipidek (további) peroxidációjában játszanak fontos szerepet. A szervezetbe kerülő, vagy ott képződő szabadgyökök először többnyire a lipideket alkotó zsírsavmolekulákat támadják meg, mert a bennük levő kettős kötések nagyon érzékenyek az oxidációra (83,91,93–95).

A perhidroxil gyök ($HO_2^{\bullet}$) a $O_2^{-\bullet}$, és a $^{\bullet}HO$ protonálódásával keletkezik. A hidrogén atom telítetlen zsírsavaktól származik (LH), amelyekből deprotonálódással lipid-alkil gyökök ($L^{\bullet}$) keletkeznek. A $L^{\bullet}$ –öt molekuláris oxigén oxidálja és $LOO^{\bullet}$ keletkezik, ami újabb LH-val reagálva LOOH-t és $L^{\bullet}$-t eredményez, és a reakció kezdődik előlről (89,96). Ez a gyökös láncreakció, ami a lipidex oxidatív degradációjával jár, a lipidperoxidáció. A láncreakciók sajátosságaiból következően már néhány szabadgyök is rendkívüli károsodásokat idézhet elő. Az iniciációs folyamatot, vagyis a lipidperoxidáció első lépését valamilyen külső vagy belső hatás indítja meg. A második lépcső, a propagáció, az előbbinél sokkal intenzívebb folyamat, ugyanis a szabadgyökök a telítetlen zsírsavak kettős kötéseivel lépnek reakcióba, s ennek eredményeként újabb szabadgyökök keletkeznek (**10. ábra**).

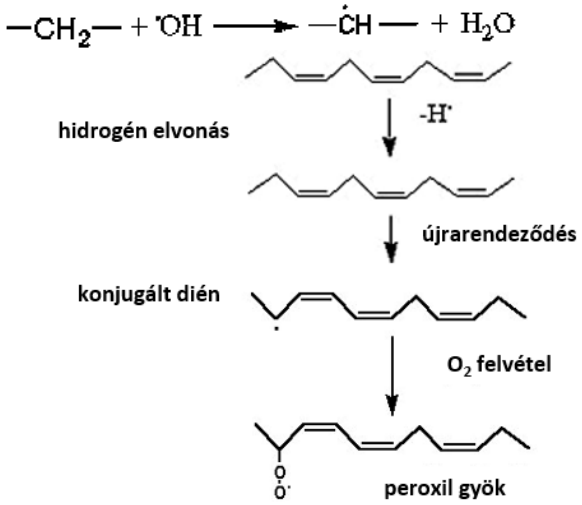


10. ábra: A lipidperoxidáció folyamata Vickers (97) **és Panasenko** (96) **ábrázolásában.** (Források: (96,97))

A folyamat a terminációval, vagyis nem gyök jellegű termékek (például aldehidek) képződésével zárul. A folyamat során szabadgyökök „lopnak" elektronokat a sejthártya lipidjeitől, sejtkárosodást eredményezve, mely folytatódik a szabadgyökök láncreakciós mechanizmusával. Ez leggyakrabban a többszörösen telítetlen zsírsavakat érinti, mert ezek számos dupla kötést tartalmaznak (95). A lipidperoxidáció 3 fő lépésből áll: iniciáció, propagáció, termináció.

1. Iniciáció – kezdeti szakasz

Az iniciáció az a lépés, ahol a zsírsavakból a szabad gyökök képződnek. Egy peroxid-mentes lipid-rendszerben a peroxidáció kezdetét a ROS-ok támadása okozhatja, melyek képesek egy hidrogén atomot leválasztani a metilén-csoportról, ezek a hidrogének nagyon magas mobilitásúak. Ez a támadás könnyen generál szabad gyököt a többszörösen telítetlen zsírsavakból. A zsírsavakban a kettős kötések jelenléte gyengíti a C–H kötéseket. Az élő sejtekben az iniciátor elsősorban a hidroxilgyök (˙HO), mely a hidrogénatommal reagálva vizet és zsírsav gyököt generál (95).

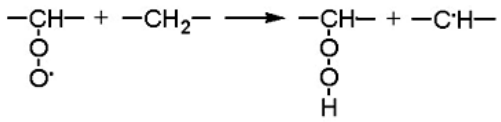


11. ábra: Molekuláris átrendeződéssel konjugált diének keletkeznek, melyek aerob feltételek mellett képesek az oxigénnel reakcióba lépve létrehozni peroxil gyököt (ROO˙). (Forrás: (95))

2. Propagáció – kiterjedés szakasza, láncreakció

A zsírsavgyökök nem nagyon stabil molekulák, így azonnal elreagálnak a molekuláris oxigénnel, miáltal peroxil-zsírsav gyökök keletkeznek. Ez sem stabil gyök, így reakcióba lép más szabad zsírsavakkal, különböző zsírsav gyököket létrehozva, hidrogén-peroxidot vagy ciklikus-peroxidot, ha elreagál önmagával. Ez a ciklus addig folytatódik ugyanígy, míg új zsírsav van jelen. A peroxil gyök képes H-t elvonni más lipid molekuláktól (szomszédos zsírsavtól), különösen olyan fémek jelenlétében, mint pl. a réz vagy vas, így

egy autokatalitikus láncreakcióhoz vezet. A peroxil-gyök H-nel reakcióba lépve adja a lipid-hidroperoxidot. Ez a reakció jellemzi a propagációs fázist leginkább (95):



3. Termináció – befejezés

Mikor egy gyök reagál, mindig egy újább gyököt produkál, ez az oka annak, hogy a folyamatot láncreakciónak hívjuk. A reakció leállításának egyetlen módja, hogy miközben két gyök reagál egymással, létrehoznak egy nem-gyök fajtát. Ez az, ami történik, mikor a gyökök koncentrációja elég magas ahhoz, hogy eléggé megnövekedjék a valószínűsége annak, hogy két gyök valóban egymásba ütközik. De az élő szervezetek kifejlesztettek különböző molekulákat, hogy elkapják a szabad gyököket, gátolják ezeket a peroxidációs folyamatokat, és megvédjék a sejtmembránt és más sejtalkotókat (83,91,93–95).

2.5.1. A lipidperoxidáció termékei, hatásai

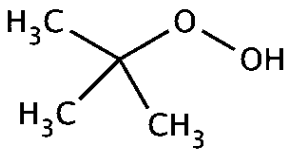
A lipidperoxidáció során keletkezett peroxil és alkoxil gyökök, aldehidek (malondialdehid = MDA, 4-hidroxinonenal = HNE) és más termékek súlyosan károsítják a fehérjéket (82). A membránok, és a bennük lévő fehérjék szintén károsodhatnak a lipidperoxidáció alatt. A feszültségfüggő K^+-csatornák esszenciális szerepet játszanak az idegszövetek és a szív elektromos aktivitásában, károsodásuk szívritmuszavarhoz és a neuronok halálához vezethet. A mitokondriumban a mátrix enzimeit és az elektron-transzport lánc tagjait is károsíthatja, és az ubikinont is tönkreteszi (83,91,93–95). Általában a lipidperoxidációs folyamat csökkenti a membránfluiditást, megkönnyíti a foszfolipidek kicserélődését a membrán két rétege között, növeli a ’lyukak’ számát a sejthártya kettősrétegében, így károsíthatja a specifikus membráncsatornákat (pl. Ca^{2+}-csatornát), és inaktiválhatja a membránhoz kötött enzimeket (95). A membránproteinek keresztkötései csökkentik a laterális és rotációs mobilitást. Néhány baktériumban a DNS a sejtmembrán közelében helyezkedik el, vagy ahhoz kapcsolódik, így az a peroxidáció során károsodhat. A mitokondriális DNS, mely hisztonokkal nem védett, könnyen

módosulhat a peroxidációs termékektől. Károsodik a riboszomális endoplazmatikus retikulum is, ezáltal csökkenti a sejt azon képességét, hogy szintetizáljon és exportáljon proteineket (83,91,93–95).

Nem csak a membránok, lipoproteinek és zsívsavak azok a kettős kötéssel rendelkező molekulák, melyek a peroxidáció során károsodhatnak. Például a karotenoidok és a retinal prekurzora, az A vitamin, szintén peroxidálódhatnak. Számos klinikailag használt antifungális antibiotikum tartalmaz konjugált kettős kötéseket, melyek könnyen oxidálódnak, és ez az antifungális hatás csökkenését eredményezi, számos baktérium rezisztens bizonyos antibiotikumokra, mert a bakteriális NOS enzim NO-termelése hatástalanná teszi az antibiotikumot (82,98).

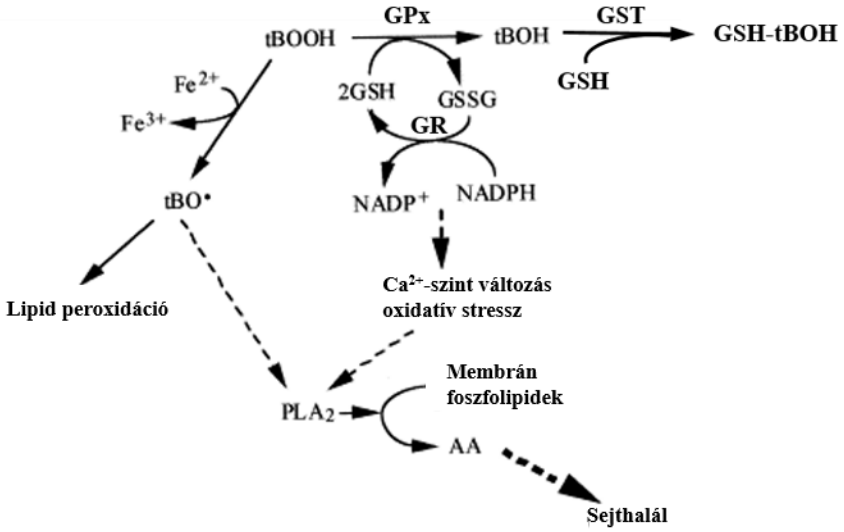
2.5.2. A tert-butyl-hydroperoxide (t-BuOOH)

A *tert-butyl-hydroperoxide* (**12. ábra**) egy, a szakirodalom által elfogadott mesterséges oxidáló ágens, mely elsősorban lipidperoxidációt okoz.



12. ábra: A *tert-butyl hydroperoxide,* $(CH_3)_3COOH = C_4H_{10}O_2$ kémiai képlete. (Forrás: (99))

Élesztővel végzett kísérleteinkhez azért ezt a hidroperoxidot választottuk, mert a szakirodalom szerint (100–103) membránkárosító hatása hasonló a fagociták NADPH oxidáz – mieloperoxidáz rendszeréhez, vagyis végeredményben sokféle szabadgyököt generálnak (ROI, RNI, RCI), és hatékonyan módosítják és oxidálják a lipideket a lipidperoxidáció során. Metabolizmusa az **13. ábrán** látható módon történik, antioxidáns enzimek és molekulák által.



13. ábra: A *tert-butyl hydroperoxide* metabolizmusa és feltételezett hatásai (szaggatott nyilak) **Martín és munkatársai** (104) **nyomán**. tBOOH: *tert-butyl hydroperoxide*, tBOH: *tert-butanol*, tBO•: *tert-butoxy* gyök, AA: arachidonsav, PLA2: foszfolipáz A2, GPx: glutation peroxidáz, GSH/GSSG: redukált/oxidált glutation, GST: glutation-S-transzferáz. (Forrás:(104))

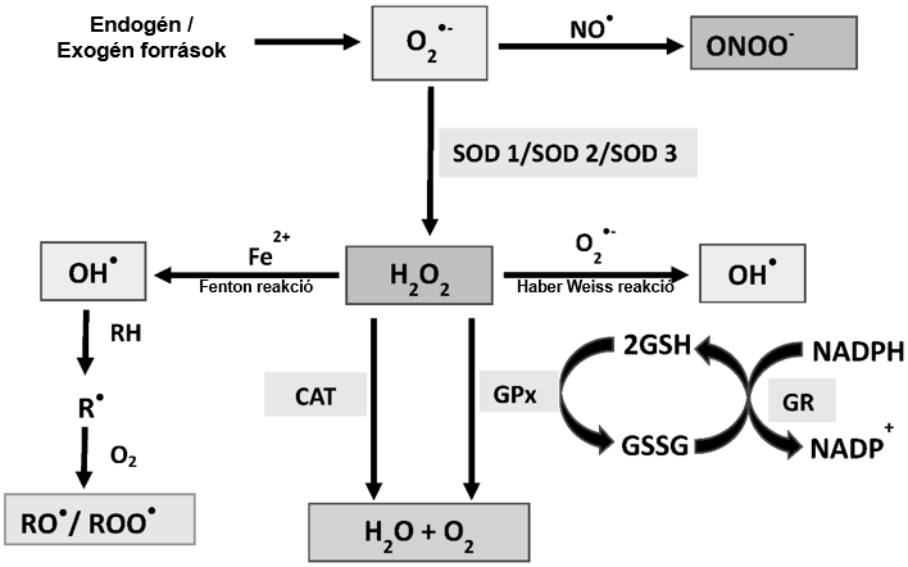
3. Endogén antioxidáns védelemi rendszer

A sejtek enzimatikus és nem-enzimatikus antioxidáns védelmi rendszereket dolgoztak ki a ROS-okkal szemben sejtalkotóik védelme és a redox állapotuk fenntartása érdekében.

Az enzimatikus antioxidáns rendszerben (**14. ábra**) természetesen a korábbiakban említett szuperoxid-diszmutázok (SOD), kataláz (CAT) és glutation peroxidáz (GPx), tioredoxin-rendszer (TRx) enzimei mellett számos más enzim is szerepet játszik.

A nem-enzimatikus antioxidáns védelmi rendszerhez kisméretű víz- vagy zsíroldékony molekulák tartoznak, melyek minimalizálják a lehetséges pro-oxidánsok (pl. vas- és rézionok) hozzáférhetőségét: transferrinek, haptoglobinok, metallotioneinek. Ide tartoznak a biomolekulákat védő hősokk fehérjék és a kis molekulatömegű scavanger molekulák, pl. redukált glutation (GSH), húgysav, ubikinol, valamint az α-tocopherol, az aszkorbinsav, a karotinoidok és polifenolok is (82), amennyiben endogén keletkeznek (pl. növényekben vagy egyes állatokban), de ezek egy része exogén módon, a táplálkozással is a szervezetbe vihető.

A felsoroltak közül a glutation az egyik legjelentősebb, mely egy tripeptid (L-γ-glutamil-L-cisztein glicin = GSH), a prokariótáktól az eukariótákig a legtöbb élő sejtben igen nagy koncentrációban megtalálható (105). A GSH-t oxidálhatják a szabad gyökök közvetlenül, vagy a GPx közreműködésével (**14. ábra**).



14. ábra: Reaktív oxigén és nitrogén gyökök keletkezése és lehetséges sorsai Ajuwon és munkatársai szerint. (Forrás: (85))

Az oxidáció során a GSH ciszteinjének –SH csoportja oxidálódik, és glutation gyök ($GS^{\bullet}$) jön létre. Két ilyen gyök összekapcsolódásával jön létre az oxidált állapotú glutation (GSSG). Az oxidált glutation visszaredukálását a glutation-reduktáz végzi (GR) $NADPH+H^+$ oxidációjával, amit a pentóz-foszfát ciklus során főleg a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz hoz létre. A glutation részt vesz a herbicidek, peszticidek és xenobiotikumok metabolizmusában is. A különböző méreganyagokat a glutation-S-transzferáz (GST) köti a GSH-hoz, ezáltal azok nem tudják káros hatásukat kifejteni. Ezek a konjugátumok vagy távoznak a sejtből, vagy vakuolumba zártan bontódnak le (106). Mivel a GSH koncentráció csökkenése a GSSG növekedésével jár, a glutation redukált és oxidált formáinak aránya fontos jelzés a szevezet redox állapotára vonatkozóan.

4. Exogén antioxidáns védelem – a táplálkozásból származó vegyületek

A gyümölcsök, zöldségek, magvak, fűszerek és teák kiváló forrásai a rostoknak, vitaminoknak és ásványi anyagoknak, de tartalmaznak többek között polifenolokat, terpéneket, alkaloidokat, melyek hozzájárulnak a kiegyensúlyozott táplálkozáshoz, ezáltal az egészség megőrzéséhez. Legismertebb táplálkozás-eredetű antioxidáns molekulák a C, E és A vitaminok, a karotinoidok valamint a növényi eredetű polifenolok. A C vitamin az élőlények nagy részében endogén módon szintetizálódik (kivéve főemlősök, tengeri malac, gyümölcsevő denevérek és sok madárfaj), a szövetekben magas koncentrációban van jelen, a glutation mellett a legjelentősebb antioxidáns (85), de humán szempontból exogénnek tekinthető.

Az E vitaminnal együttműködve védi az LDL molekulákat a peroxil gyökök okozta oxidatív károsodástól (107). Az E vitamin izoformái (és a karotenoidok) a legfontosabb antioxidánsok lipofil környezetben, képesek lipid peroxid csoportokat hidroperoxiddá alakítani, ezáltal terminálni a lipidperoxidációt (85).

4.1. Polifenolok és a rezveratrol

A növényvilágban másodlagos anyagcseretermékekként szintetizálódó fenolos anyagok széles körben elterjedtek, több, mint 8000 típust írtak már le (85). Funkcióik közé tartozik egyrészt a pigmentáció kialakítása, másrészt a védelem, többek között az UV fény, a mikroorganizmusok és egyéb növényi kártevők (pl. gombák, rovarok, csigák) ellen, illetve néhány enzim aktivitásának a szabályozása is (85).

A polifenolok kémiai szerkezetének, szerepének és élettani hatásainak kutatása napjainkban egyre inkább előtérbe kerül, hiszen, holott tápértékük nincs, számos táplálékunkban nagy mennyiségben fordulnak elő (108). Bevitt szintjük magas a C és E vitaminokhoz, és a karotenoidokhoz képest is, akár napi 1 gramm is lehet, táplálkozástól függően (109). Főként a vörösbor és a tea tartalmazhat jelentős mennyiségeket (akár 1 mg/ml-t) (109,110). Nyugat-Európában és Amerikában végzett kutatások szerint, aki napi 1,5-3 dl vörösbort elfogyaszt, 50%-kal csökkenti az esélyét a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának, míg a fehérborról ez ilyen mértékben nem mondható el (111).

A kékszőlő szemeket (*Vitis vinifera*) maggal és héjjal együtt erjesztik, aztán préselik, így a bennük található fenolos anyagok könnyen átoldódnak a borba (112). A kékszőlőkben jóval magasabb a fenolos komponensek mennyisége, mint a fehérszőlőben, amiből következik, hogy a vörösbor összes polifenol tartalma is szignifikánsan magasabb (2000-3000 mg/l), mint a fehérboré (300-400 mg/l) (113,114). Persze ez a különbség nemcsak a szőlőfajták eltérő összetételéből, hanem a különböző borkészítési technológiákból is adódik (112). Az első feltételezések, miszerint az etilalkohol a kedvező hatású komponens, gyorsan megdőltek. Patkányokon végzett kísérletek során vörösboron kívül más alkoholos ital nem gátolta a trombocita aggregációt, emellett a többihez képest kevésbé fokozta az alkohol okozta lipidperoxidációt (115). A bor egyéb összetevőit vizsgálva rájöttek, hogy inkább a fenolos komponensek lehetnek felelősek a kardioprotektív hatásért (113,115). Először itt is a polifenolok erőteljesebb antioxidáns és gyökfogó tulajdonságának tudták be a védőhatást, de a jelentős kedvező, leginkább *in vitro* eredmény ellenére azonban a vörösbor kardioprotektív hatása mégsem tulajdonítható kizárólag a polifenolok antioxidáns hatásának, ezért más irányú vizsgálatok elvégzése is szükségessé vált. A vörösbor számos polifenolt tartalmaz, főképp fenolos savakat, hidroxisztilbéneket és flavonoidokat (116). Mára már számos fenolos anyag élettani hatását tanulmányozták, mégis talán a legtöbb kutatási eredmény a kvercetinről, kurkuminról, és a rezveratrolról született. Utóbbi a vörösbor fenolos komponenseinek tanulmányozását követően, az ún. “francia paradoxon”-nak nevezett jelenség kapcsán kapott nagy visszhangot (111,117), miszerint hasonló táplálkozási és életkörülmények mellett, de vörösbort is rendszeresen fogyasztó térségek lakosainál (franciák) jelentősen alacsonyabb a kardiovaszkuláris megbetegedések száma, mint a vörösbort jellemzően nem fogyasztó más, nyugati népességeknél. Mivel nem elhanyagolható emellett a mediterrán táplálkozás szerepe sem (kevés állati hús és zsír, több halhús, sok zöldséggel, gyümölccsel, emellett olivaolaj és persze a vörösbor fogyasztása), az újabban használt “mediterrán táplálkozás” kifejezés helytállóbb (85,116).

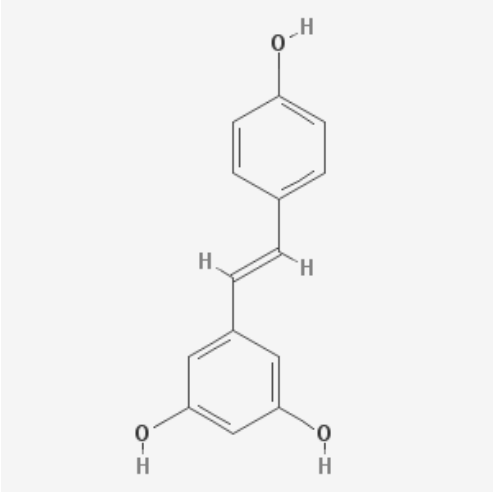
A polifenolok emberi szervezetre gyakorolt hatása nem teljesen ismert, de az évezredes távol-keleti és népi gyógyászati megfigyeléseket mára már számos kutatás eredménye támasztja alá.

Kimutatták a polifenolok, köztük a rezveratrol szervezetre gyakorolt jótékony hatását (116,117), pl. kardiovaszkuláris és diabéteszes megbetegedések esetén, illetve antioxidáns, antikarcinogén, antimikrobiális, immunmoduláns és gyulladáscsökkentő szerepüket, hepatoportektív, asztmaellenes, antiallergén (118), ösztrogén és vaszkuláris rendszert befolyásoló hatásukat (116,117,119,120). Az elmúlt évtizedekben a különböző polifenolok molekuláris hatásairól többek között az alábbiakat sikerült bebizonyítani: gátolják a xantin oxidáz, a foszfolipáz A2, a ciklooxigenáz és lipoxigenáz, az angiotenzin konvertáz és a cAMP foszfodiészteráz enzimeket egyaránt, miáltal felelősek lehetnek a korábban leírt jótékony hatásokért (116,117). Látható, hogy sok molekuláris támadáspontjuk lehetséges, a szerteágazó hatásokért nem kizárólag egy mechanizmus felelős. Számos folyamatba – a specifikus gyógyszereknél kisebb affinitással, de emiatt kevesebb mellékhatással is – tudnak beavatkozni. Hogy mindezt milyen molekuláris mechanizmussal érik el, még nem teljesen tisztázott, de az utóbbi évtizedek kutatásai számos folyamatra fényt derítettek.

Felszívódásuk során a bélben elsősorban endogén fehérjékhez (pl. receptorok, transzporterek és enzimek, intesztinum egyes fehérjéi) és az epitélsejtekhez kapcsolódnak, vagy enzimatikus reakció során aktív metabolitokat képeznek (116), miáltal minden makrotápanyag, köztük saját felszívódásuk hatékonyságát is csökkenthetik. A polifenolok komplexeket alkothatnak fémionokkal, ezáltal csökkentve a vas, réz, stb. abszorbcióját, ugyanakkor az átmeneti fémionok megkötése kedvező is lehet antioxidáns szempontból. Az egyéb komponensek, illetve a vékony- és vastagbél mikroflórája által metabolizált polifenolok végül abszorbeálódnak a vérplazmába ahol azonban már csak nanomoláris koncentrációban mutathatóak ki (116), az orálisan bevitt mennyiség 1-10%-ában. További konjugációjuk történhet még a májban, majd vizelettel ürülnek (120). A polifenolok minden formája gyorsan kiválasztódik a szervezetből, a bevételtől számítva 2-4 óra múlva érik el a vizeletben a maximális szintet.

4.1.1. Rezveratrol

A növényi polifenolokat két nagy csoportra oszthatjuk: flavonoidok és nem-flavonoidok. Utóbbi tartalmazza többek között a sztilbén típusú aromás fitoalexineket, ahová a rezveratrol (cisz- vagy transz-3,4,5-trihidroxisztilbén) is tartozik (**15. ábra**). Természetes fungicid, patogén mikroorganizmusok (pl. szürkepenész = *Botrytis cinerea*) hatására keletkezik a sztilbén-szintetáz enzim segítségével. Bioszintézise a sikiminsav úton vagy fenilalaninból is történhet (117).

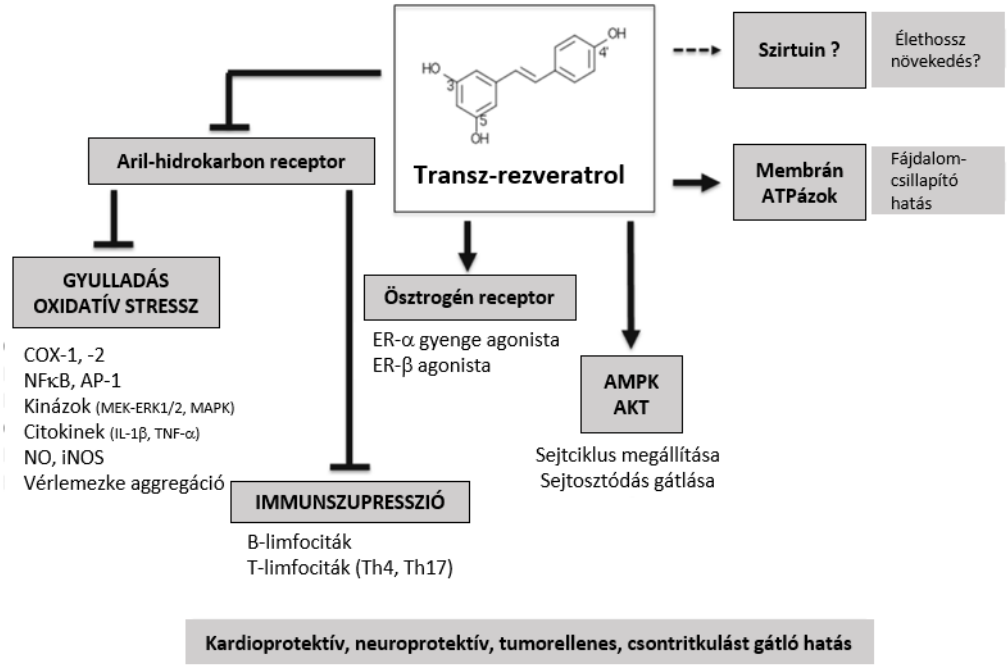


15. ábra: A transz-rezveratrol képlete. (Forrás: (121))

A rezveratrol nagy mennyiségben megtalálható például pirosbogyós gyümölcsök héjában és levelében, földimogyoróban, kakaóban, és persze a szőlőben. Az ebből készült vörösbor összes fenolos komponenseiben 0,1-14,5 mg/l koncentrációban fordul elő a transz-izomer, míg a cisz-izomer előfordulása a borokban ennél általában jóval alacsonyabb, Goldberg és munkatársai szerint ez is a fermentáció alatt az élesztők enzimeinek hatására alakul ki. Fehérborokból rezveratrol gyakorlatilag alig mutatható ki, rosé borokban a koncentrációja a fehér- és vörösborok közé esik (116,117).

Sajnos a polifenolokhoz hasonlóan igen rossz a biológiai felszívódása, emellett erőteljes metabolizmusa (szulfatáció és glükuronidáció) miatt a humán terápiás hasznosítása nehézkés (122). Humán és patkány vizsgálatokban is kimutatták, hogy az orálisan bevitt adag csupán egy százaléka mutatható ki a vérplazmából a transz-rezveratrol gyors

konjugációs képessége miatt (116). Metabolitjai magasabb plazmaszintet mutathatnak, illetve akkumulálódhanak bizonyos szövetekben, sejttípusokban (pl. diabéteszes patkányok kardiomiocitáiban) (123). *In vitro* kutatások kimutatták, hogy mind a szabad rezveratrol, mind mesterséges konjugátumai (szulfatáció) egyaránt hatékonyak lehetnek, de folyamatonként más-más mértékben (124). Mindezen kutatási eredményeket figyelembe véve, kísérleteink során mi a szabad transz-rezveratrolt használtuk az egér leukémiás monocita-makrofág RAW 264.7 (ECACC 91062702) sejtvonalhoz (125).



16. ábra: A transz-rezveratrol lehetséges pleiotrop hatásai, molekuláris targetjei Nguyen és munkatársai (116) **ábrázolásában és feltételezései szerint.** AKT: protein kináz B; AMPK: 5'-adenozin monofoszfát-aktivált protein kináz; AP-1: aktivátor protein 1; COX: ciklooxigenáz; ER: ösztrogén receptor; ERK1/2: extracelluláris szignál-regulált protein kináz 1 és 2; IL-1β: interleukin-1β; MAPK: mitogén-aktivált protein kináz; MEK: mitogén-aktivált protein kináz kináz; NFκB: nukleáris faktor kappa B; Th: T helper; TNF-α: tumor nekrózis faktor-α. (Forrás: (116))

Ezek alapján számos *in vivo* pre-klinikai és klinikai vizsgálat is született. *Bonnefont-Rousselot*, a párizsi Sorbonne egyetem munkatársa, a rezveratrol kardiovaszkuláris hatásait illetően egy kitűnő összefoglaló tanulmányt készített (122), melyben táblázatszerűen összeveti több, mint 25 humán klinikai vizsgálat eredményét, kigyűjtve a rezveratrolnak tulajdonított hatásokat és mellékhatásokat is. Tanulmányában azt állapítja

meg, figyelembe véve a rezveratrol jótékony hatásait magas vérnyomás, elhízás, gyulladás, cukorbetegség és diszlipidémai esetén, hogy a rezveratrol egy jó potenciális farmakológiai megközelítése lehet a metabolikus szindróma kezelésének, mikoris fokozott a kockázata a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásának (**16. ábra**). Viszont megfigyelései szerint nem csak a szegényes biológiai hozzáférhetőség és bevitt adagja a kritikus, hanem a rezveratrollal történő kezelés kezdete és hossza is. Az eddigi tanulmányok többsége szerint a leghatékonyabb módszer rövidebb ideig, de előre adagolni. Ahhoz, hogy megvizsgálják ezeket a pontokat, és a hosszú távú rezveratrol adagolás hatásait, nagyobb mintaszámú, kontrollált humán klinikai kísérlet szükséges (122).

V. CÉLKITŰZÉSEK

1. Rezveratrol hatásának vizsgálata gyulladásos modellen

Az LPS által indukált, TLR4 által közvetített MyD88-független NF-κB aktiválás jelátvitelében már ismert a rezveratrol gátló funkciója a TRAM–TRIF–TBK1 komplexben (52). Ez a gátlás TRIF függő és egyben MyD88 független útvonalon zajlik. Az is ismert, hogy a MyD88 aktivációja elengedhetetlen a TRAF6 aktivációjához, amely az IκB aktivációjához vezet, így azt feltételezték, hogy a TRAF6 útvonal nem vesz részt abban a gátlásban, amit a rezveratrol idéz elő az LPS által indukált NF-κB aktivációban. Másrészről Sato és munkatársai (126) szerint a TRAF6 kapcsolatban áll a TRIF-fel és a TBK-1-gyel, és képesek az NF-κB és az IRF-3 transzkriciós faktor aktiválására a TLR4 aktiválódását követően (**4. ábra**), így felmerül a kérdés, hogy pontosan mi is a TRAF6 szerepe ebben a jelátviteli útban?! Munkánk során a rezveratrolnak a TRAF6 molekulára kifejtett hatásait vizsgáltuk LPS-indukált szeptikus sokk modellben, RAW 264.7 egér makrofág sejteken. Arra kerestük a választ, hogy a rezveratrol funkcionális támadáspontja-e a TRAF6 fehérjének, vagyis:

1. A rezveratrol és LPS kezelésnek van-e hatása a *traf6* gén expressziójára?
2. A rezveratrol és LPS kezelésnek van-e hatása a TRAF6 molekula mennyiségére?
3. A rezveratrol és LPS kezelésnek van-e hatása a TRAF6 molekula aktivációjára?
4. Milyen „*downstream*” jelátviteli változások követik a TRAF6 fehérjénél tapasztalt változásokat rezveratrol jelenlétében és hiányában, szeptikus sokk modellben?
5. Összességében tehát, célunk volt az LPS indukálta jelátviteli utak során a TRAF6 szerepének tisztázása a TLR-közvetített NF-κB aktivációban.

2. A lipidperoxidációt okozó *t*-BuOOH hatása a hasadóélesztő sejtmembránjára

Az antioxidáns mechanizmusok mellett vizsgálatuk az érem másik oldalát, nevezetesen egy külsőleg adott, lipidperoxidációt okozó vegyület, a *t*-BuOOH hatását a plazmamembrán folyamatokra. Modellszervezetként az egysejtű, eukarióta hasadó élesztőt, a *Schizosaccharomyces pombe* egy szülői (hyd^+) és annak egy *t*-BuOOH-rezisztens mutánsát (hyd1-190) használtuk.

Korábbi munkánkban publikáltuk (127), hogy a *S. pombe* hasadóélesztő lipidperoxidációra adott válaszjelenségeinek vizsgálatához random mutagenezissel létrehoztunk egy lipidperoxidációt okozó anyag, jelen esetben *t*-BuOOH-rezisztens mutáns törzset, jellemeztük oxidatív stresszorokkal és nehézfémekkel szembeni tűrőképesség tekintetében, és kimutattuk, hogy a *t*-BuOOH-rezisztencia egy kiegyensúlyozatlan redox-állapottal így az antioxidáns enzimek és molekulák folyamatos regulációjával társul, de ez a kiegyensúlyozatlan redox-állapot a sejtnek még tolerálható, nem jár a növekedés, szaporodás gátlásával.

Ezt követően a *S. pombe* a *t*-BuOOH rezisztens törzset (*hyd1-190*) viszonyítva a szülői törzshöz (hyd+). az alábbí célok kitűzésével vizsgáltuk:

1. Létezik-e adaptáció a külsőleg adott *t*-BuOOH-kezelés hatására?
2. A mutáció(k) és a *t*-BuOOH-kezelés megváltoztatja-e, és milyen mértékben, a törzsek zsírsav- és szterinösszetételét, ill. annak minőségi és mennyiségi viszonyait?
3. A *t*-BuOOH kezelés illetve a rezisztenciáért felelős mutáció milyen hatással van az élesztősejtek membránjának felvételi folyamataira, elsősorban a membránösszetétel változásának lehetséges indikátora, a glicerin tekintetében?
4. A *t*-BuOOH kezelés illetve a rezisztenciáért felelős mutáció milyen hatással van-az élesztősejtek plazmamembránjának fluiditására?

VI. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Felhasznált vegyszerek, enzimek és antitestek

Kísérleteinkhez, ahol azt külön nem jelöltük, a Sigma-Aldrich és Reanal cégektől vásárolt vegyszereket, puffereket, oldatokat használtuk. A többi felhasznált anyagot, antitesteket stb. ld. mellékletben.

2. Módszerek

2.1. Sejtkultúrák és kísérleti körülmények

2.1.1. Sejtkultúrák

A *European Collection of Cell Cultures*-től (ECACC, Salisbury, UK) rendelt **RAW 264.7** (ECACC 91062702) egér makrofág leukémia monocita sejteket (125) hőkezelt fetalis borjú szérummal (10%), penicillinnel (100 U/ml), streptomycinnel (100 μg/ml) és L-glutaminnal (4 mM) kiegészített *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*-ban (DMEM), 5% CO_2 koncentráció mellett, 37°C-os termosztátban tartottuk fenn. 2×10^6 sejtet mértünk 10 ml médiumba, 80%-os konfluenciáig növesztettük, majd 2-3 naponta passzáltuk őket.

2.1.2. Kezelések

A 80%-os konfluenciát mutató RAW 264.7 tenyészeteket foszfát-pufferrel (PBS) történő átmosás után kezeltük LPS-sel (LPS; O127:B8, Sigma-Aldrich) (23) (végkoncentráció: 1 μg/ml) különböző ideig (10, 30, 60 és 120 perc) szérummentes DMEM médiumban. Bizonyos esetekben 30 perces rezveratrol előkezelést alkalmaztunk (végkonc.: 0,05 mM), majd újra átmostuk a sejteket jéghideg PBS-ben, majd 1-1 ml-ben felkapartuk őket a tenyésztőedény aljáról.

2.2. **Fehérjeszintű vizsgálatok**

2.2.1. Fehérjeminta készítése immunprecipitációhoz és immunoblotthoz

A kezelést követően 4 °C-on 5 percig centrifugáltuk (1000×g) a sejteket, majd a pelletet friss, jéghideg lízis pufferben vettük fel. A lízis puffer a HEPES és NaCl mellett a sejtfeltáráskor felszabaduló proteázok gátlása érdekében tartalmaz EDTA-t és EGTA-t, melyek metalloprotein gátlók, PMSF-et, mely a szerin oldallánccal működő enzimek gátlója, a szabad SH-csoportok védelme érdekében DTT-t, mely erős redukáló ágensként önmaga oxidálódik a minta fehérjéi helyett, emellett tartalmaz még Na-vanadátot foszfatáz-gátlóként, és ún. „proteáz-inhibitor koktél”-t is. A lipidmembránok feloldása miatt Tween-20-at, a sűrűség növelése érdekében glicerint is adtunk a pufferhez.

A nagyobb feltárási hatékonyság érdekében a mintákat háromszor 30 másodpercig jégen szonikáltuk. Ezután újra centrifugáltuk az oldatot (17000×g, 10 perc, 25 °C), majd a fehérjéket tartalmazó felülúszót új csövekbe pipettáztuk át.

A fehérjekoncentráció meghatározása Lowry módosított módszere szerint történt, BioRad DC Protein Assay-vel (128,129). A karakterisztikus kék színreakció alapja, hogy a réz lúgos közegben a fehérjék bizonyos aminosavaival reagál, és ezt követően redukálja az ún. Folin-reagenst (nátrium-1,2-naftokinon-4-szulfonát), ennek eredményeként 750 nm-en abszorpciós maximum jön létre. Utóbbi elsősorban a fehérje tirozin és triptofán részével reagál, kisebb mértékben a cisztinnel, ciszteinnel és a hisztidinnel. Ezt követően BSA-ból készített kalibrációs sor segítségével a koncentráció meghatározható.

Azonos fehérje koncentrációkat állítottunk be a lízis puffer segítségével, majd minden mintához egyenlő térfogatú 4× mintapuffert adtunk (4:1). Ezt követően 5 percig forraltuk a mintákat, majd végül a gélbe történő injektálás elősegítése, és a futási front láthatóvá tétele érdekében, 2-2 µl brómfenolkékkel festettük meg őket.

2.2.2. SDS poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) és immunoblott

Gyököket szolgáltató iniciátor és katalizátor (TEMED = tetra-metil-etilén-diamin és APS = ammónium perszulfát) jelenlétében az akrilamid vizes oldatban polimerizációra képes, és lineáris polimer, ún. poliakrilamid keletkezik. Ha iniciáló ágenst (APS) is hozzáadunk,

a láncok között keresztkötések képződnek, és térhálós szerkezetű gél jön létre, melyben a fehérjéket az elektroforézis során vándoroltatjuk.

Ha a fehérjéket SDS (nátrium-dodecil-szulfát) tartalmú gélben futtatjuk, akkor az elválasztás molekulatömeg (méret) szerint megy végbe, mivel az SDS egy erősen anionos detergens, ezért ha a fehérjéket ezzel kezeljük, akkor a köztük lévő kölcsönhatások megszűnnek, az alegységszerkezet felbomlik, denaturálódnak. Az SDS minden fehérjének egy nagy, negatív töltést ad, amivel elfedi a fehérje saját töltését, ezáltal kiteríti őket, belső, hidrofób magjukat is fellazítva. Az SDS – fehérjekomplexek töltés/tömeg aránya így állandó érték lesz, függetlenül a fehérje eredeti fajlagos töltéssűrűségétől. A kötődött SDS mennyisége egyenesen arányos a lánc hosszával, vagyis a fehérjék molekulatömegével.

SDS-PAGE esetén két különböző koncentrációjú gélt alkalmazunk. A szeparáló gél fölé egy ún. „*stacking*" (koncentráló) gélt rétegezünk, melynek akrilamid koncentrációja a szeparáló gélnél annyival alacsonyabb, hogy itt a molekulaszűrő hatás még nem érvényesül. A felső gél zsebeibe injektált fehérjeminta és a futtató puffer anionjai feszültség hatására belépnek a felső gélbe, melyben a glicin elektroforetikus mobilitása alacsony, emiatt a fehérjék egy vékony sávban vándorolnak az alsó, szeparáló gél felszínéig, melyben a mobilitás megnövekedik, így a fehérjék a továbbiakban különböző fajlagos töltésük miatt eltérő sebességgel vándorolhatnak. Ezenkívül a szeparáló gél akrilamid koncentrációját is beállíthajuk, hogy a molekulaszűrő hatás mennyire érvényesüljön, és a gél az elválasztani kívánt fehérjék mérettartományában a lehető legnagyobb mértékben szeparáljon. A futtatás után a fehérjéket a gélben láthatóvá tehetjük olyan festékkel, mely nagy hatékonysággal kötődik a hozzájuk (*Coomassie Brillant Blue*), akár már 0,1 μg fehérje is láthatóvá tehető így.

A fehérjemintákból 20 μg proteint tartalmazó mennyiséget vittünk fel egy 12%-os gél egy-egy zsebébe. A *stacking* gélben 80 Volttal futtattuk, a *separating* gélben 120 Volttal, kb. 1-1,5 órát, majd ezt követően átblottoltunk nitrocellulóz membránra (200 mA, 60 perc). A blottolás során a gélre szorosan ráillesztettük a membránt, majd a gél síkjára merőleges irányban egy újabb elektroforézist hajtunk végre blottoló készülék

segítségével (OWL HEP-1; Thermo Scientific). Feszültség hatására a gélből a fehérjék – töltésüknek megfelelően – a nitrocellulóz membrán felszínére vándorolnak, így a gélben kialakult mintázatot megőrizve rögzíthetjük őket a membránon. A gélt gélfestő oldattal megfestve (majd *destain* oldattal kontrasztosítva) ellenőrizhetjük, hogy mennyi fehérje maradt benne, a membránt pedig *Ponceau*-val festve, mely egy reverzibilis, aspecifikus fehérjefesték, láthatóvá tehetjük a membránra átkerült fehérje csíkokat. Mielőtt egy éjszakára behelyeztük volna a membránokat a gyártó által ajánlott módon elkészített elsődleges antitest oldatába (4°C), a szabad kötőhelyeket szobahőmérsékleten 1 órát blokkoltuk 5%-os, alacsony zsírtartalmú tejpor-oldattal. Ezt követően az első antitestnek megfelelő tormagyökér-peroxidáz-kapcsolt másodlagos antitest – gyártó szerint ajánlottan előállított – oldatában szobahőmérsékleten inkubáltunk 2 órát. Az egyes lépések között 3×5 percig mosogattuk a membránt TBST-ben. Erősített kemilumineszcencia (ECL) (SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate; Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) használatával tettük láthatóvá az elsődleges (és másodlagos) antitesttel specifikusan jelölt fehérje csíkokat, melyet röntgenfilmen detektáltunk, majd a filmek szkennelését követően a mennyiségi meghatározást a National Institutes of Health Image J szoftverével végeztük.

2.2.3. Immunprecipitáció

A fehérjemintákból 2250 µg proteint tartalmazó mennyiséghez hozzáadtuk a korábban 30 µl anti-TRAF6 IgG-vel 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubált (és 150 µl-nyi PBS-sel többször átmosott) mágnesgyöngyöt (*BioMag anti-rabbit IgG magnetic bead*) és 30 µl PBS-t, a gyártó utasításai szerint, majd 1 órán át gyengén rázattuk szobahőmérsékleten. Az inkubációt követően a mintákat kétszer mostuk „A”, kétszer „B” és kétszer „C” mosópufferekkel, egy mágneses mikrocentrifugacső-tartó állvány segítségével. A mosások befejeztével minden mintához 20-20 µl 1× mintapuffert adtunk, majd 5 percig forraltuk a mintákat, ezt követően centrifugáltuk (17000×g, 5 perc) őket, majd egy-egy új csőbe mértük át a felülúszót, mielőtt hozzájuk adtunk 2-2 µl brómfenolkéket. Ezekből a mintákból azonos fehérjemennyiséget tartalmazó térfogatokat vittünk fel egy 10%-os

SDS-PAGE gélre, és az immunoblottnál leírt módon dolgoztunk tovább anti-ubikvitin elsődleges antitesttel 1:1000 hígításban. Az előhívást Immobilon Western előhívó oldatokkal (Millipore) végeztük.

2.3. **Génexpressziós vizsgálatok**

Munkánk során végig igyekeztünk a 2009-ben, a *Clinical Chemistry* című folyóiratban *Bustin* és munkatársai által publikált ún. MIQE (*Minimum Information of Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) útmutatót követni (130).

2.3.1. Totál RNS kivonás és reverz transzkripció

A kezelt tenyészetekből a gyártó utasításai szerint RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) segítségével (mely DNase kezelést is tartalmaz) vagy guanídinium-tiocianát-fenol-kloroform extrakcióval (TRIzol) nyertük ki a totál RNS-t, mennyiségét és tisztaságát IMPLEN Nanophotometer és/vagy Nanodroppal határoztuk meg, a következő képletek alapján (OD=optikai denzitás):

Koncentráció = mért OD_{260nm} × 40 ng/µl × hígítási faktor, mivel 40 ng/µl RNS 260 nm-nél mérhető OD-ja = 1. A tisztaság ellenőrzése az alábbi arányszámok meghatározásával történt: $OD_{260/280} \geq (1,8)$-2,0. Ekkor alacsonynak tekinthető a protein-kontamináció, illetve $OD_{260/230} > 2$ esetén a fenolát és tiocianát „szennyeződés” is elfogadható. A TRIzollal történő izolálás során ezt követően RNase Inhibitor (RiboLock) jelenlétében DNase kezelést végeztünk (RNase-free

DNase I-gyel), majd újra megmértük a totál RNS mennyiségét. A DNase kezelt totál RNS minőségét agaróz gélelektroforézissel és/vagy Bioanalyzer 2100 készülékkel (Agilent) végeztük (RIN – RNA Integrity Number).

Ez alapján minden mintából azonos mennyiségű (1 µg) RNS-t írtunk át cDNS-sé RNase H aktivitással rendelkező *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV) eredetű reverz transzkriptáz enzim (RevertAid) és oligo(dT) primer segítségével 42 °C-on, 60 percig, 20 µl végtérfogatban. A keletkező cDNS mennyisége, vagyis a reverz transzkripció hatékonysága az alábbiak szerint alakul: [cDNS] = [RNS] × efficiencia (131), ahol az

efficiencia (e) a cDNS-sé átírt RNS mennyiséget jelenti, százalékban ill. előbbi alapján 0-1 közé eső arányszámmal kifejezve (ez nem azonos az amplifikációs hatékonysággal (E), lásd lejjebb).

2.3.2. Primerek

Az Invitrogen™-től rendelt primerek tervezéséhez a NCBI referencia szekvencia adatbázisát (*Refseq mRNA*) és *Primer-BLAST* programját használtuk, figyelembe véve az alapvető primer-tervezési szempontokat:

Gén	Hivatkozási szám		Szekvencia (5'-3')	Olvadás-pont	Termék hossza
traf6 (egér)	NM_009424	*Forward*	CGTCCAGAGGACCCAAATTATG	62,9 °C	219 bp
		Reverse	CCCAAAGTTGCCAATCTTCC	61,6 °C	
gapdh (egér)	NM_008084	*Forward*	ATTGTGGAAGGGCTCATGACC	64,0 °C	258 bp
		Reverse	ATACTTGGCAGGTTTCTCCAGG	61,8 °C	

2.3.3. Real-time PCR

A mintánkban jelenlévő mRNS mennyiséggel elméletileg egyenesen arányos cDNS mennyiség meghatározása valós idejű, ún. „*real-time*" PCR-ral történt. A detektáláshoz SYBR Green I nevű fluoreszcens kettősszálú-DNS festéket (IQ SYBR Supermix Kit) és a Bio-Rad *MiniOpticon Real-Time PCR System* és a CFX96 *TouchTM Real-Time PCR Detection System* készülékeit használtuk. Az amplifikációhoz 1 µl cDNS-t használtunk, mindenben a gyártó utasításai szerint jártunk el. Az alábbi, olvadási görbe felvételével kiegészített, három-lépéses PCR protokollt használtuk, az optimális "*annealing*" vagyis primer-kötődési hőmérsékletet a Bio-Rad CFX *Manager Software* "Ta" kalkulátorával határoztuk meg:

1.	95 °C	10 perc	*„Hot Start"* enzim aktiválása
2.	95 °C	15 másodperc	1. lépés – denatuáció
3.	(58) °C	30 másodperc	2. lépés – "*annealing*"
4.	72 °C	30 másodperc	3. lépés – lánchosszabítás
5.	*Plate* leolvasás		
2-5.	40 ciklus		
6.	65-95 °C	1 percig 0,1 °C-onként	Olvadási görbe felvétele

Eredményeink kiértékeléséhez (132) ún. komparatív ΔCt-módszerét használtuk, melynek alapja az a feltételezés, hogy amennyiben 100%-os az amplifikációs hatékonyság (E=1), akkor a kiindulási mennyiségű cDNS megsokszorozódása 2^n ütemben történik, ahol „n" a PCR-ban beállított ciklusszámot jelöli. Mivel a valóságban ez a 100%-os hatásfok nem mindig érvényesül, ezért előzőleg szükséges megvizsgálni, hogy a target és a referencia gén amplifikációs hatásfoka mekkora, fontos, hogy ez az érték 90-105% közé essen.

2.3.4. Amplifikációs hatékonyság meghatározása (Efficiencia)

A reakció optimalizáltságának meghatározására hatékony módszer, ha hígítási sort készítünk a templátból, majd hígításonként felsokszorozzuk a qPCR készülékben, és a kapott adatok alapján készítünk egy standard görbét, melyhez nem feltétlen szükséges, hogy előzőleg ismert legyen a target koncentrációja. A standard görbét úgy készítjük el, hogy vesszük a hígítási faktor logaritmusát, szemben az amplifikáció során kapott Ct-értékekkel, minden egyes hígításnál. A kapott pontokra lineáris regresszióval egyenest fektetünk, majd meghatározzuk a korrelációs együtthatót (R^2). Ez az érték reprezentálja, hogy mennyire jól illeszkednek a kísérleti adataink a regressziós egyenesre. Törekedni kell arra, hogy $R^2 > 0{,}980$ legyen. Az amplifikációs hatékonyság (E) számítása a kapott regressziós egyenes meredeksége alapján, az alábbi képlet szerint történt:
$E = 10^{-1/\text{meredekség}}$. Ideális esetben a PCR termék mennyisége tökéletesen megduplázódik minden egyes ciklus során (exponenciális amplifikáció), vagyis a kópiák száma minden ciklusban 2-szeresre nő. Ez lefordítva azt jelenti, hogy a reakció efficienciája 2. Ha ezt behelyettesítjük a fenti egyenletbe, akkor az alábbit kapjuk: $2 = 10^{-1/\text{meredekség}}$, amiből visszaszámolva a standard görbe ideális meredeksége $^{-}3{,}32$-nek adódik. Mindez százalékokban kifejezve: % efficiencia = (E–1) × 100. Egy ideális reakciót tekintve: E = (2–1) × 100 = 100%. Egy 100%-hoz közelítő (90-105%) amplifikációs efficiencia jó indikátora egy reprodukálható eljárásnak. Optimálisnál alacsonyabb hatékonyságot okozhat, ha nem megfelelő a primer tervezés vagy a reakció feltétek nem optimálisak. Ha 100% feletti értéket kapunk, az utalhat a hígítási sor készítésekor elkövetett pipettázási hibára, vagy egy nemspecifikus termék koamplifikációjára, mint például a primer-dimerek. Összességében, ha a reakció hatékonysága kevesebb, mint 90%, vagy nagyobb,

mint 105%, akkor érdemes módosításokat végrehajtani, mint például újratervezni a primereket (133). A standard görbe felvételéhez legalább 4 lépcsőben 10-szeres hígítási sort készítettünk a templátból (10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}), majd azokat triplikátumokban megfuttattuk a Bio-Rad Real-time PCR System készülékében a korábban leírt kondíciók mellett. A plate-ek összeállításánál mindig triplikátumokkal dolgoztunk, figyelembe vettük, hogy megfelelő kontrollok is legyenek a minták mellett. Alkalmaztunk olyan kontroll kísérletet, mely nem tartalmazott templátot (NTC), és olyat is, amely templátként a reverz transzkripciót megelőző RNS mintát tartalmazta (NRT).

2.3.5. Relatív kvantifikáció; ΔΔCt - módszer

Összehasonlító vizsgálatok elvégzésekor a mintákat normalizálni kell, melyhez szükséges egy olyan gén, melynek expressziója konstitutív, és az általunk alkalmazott kezelés sincs rá befolyással. Ennek mennyisége egyenesen arányos a kiindulási sejtmennyiséggel (131), így ezt tekintjük majd referencia génnek, amihez viszonyítani tudjuk az általunk vizsgálni kívánt „*target*" gén expressziós szintjét. RAW 264.7 makrofág sejteken történő LPS kezelés esetében a *gapdh* gént használtuk referenciának. Az amplifikációs görbéket elemezve mennyiségi információhoz (*quantitative* = qPCR) is jutunk, melynek alapja az úgynevezett áttörési pont vagy ciklusszám (Cp = *crossing point*, vagy Ct = *threshold cycle*) meghatározása. Azt a ciklusszámot tekintjük Ct értéknek, ahol exponenciális növekedésbe kezd a ciklusonként detektált fluoreszcens jel. A Ct értékek meghatározása (ún. *single treshold me*) egy szoftver (Bio-Rad *CFX Manager*) segítségével, matematikailag egzakt módszerrel történt (második derivált maximum módszer). A Ct-érték annál kisebbnek adódik, minél több a mintában a templát, ez az összefüggés a kvantitatív mérések alapja (134).

2.3.6. Olvadáspont analízis

Az olvadáspont (Tm = *melting temperature*) analízis lehetővé teszi a PCR specificitásának ellenőrzését. A reakció során keletkezett kettősszálú DNS fragmentumok olvadási görbéjének meghatározásához a ciklusok végeztével lassan felfűtjük (0,1 °C/perc) a reakcióelegyet 65 °C-ról 95 °C-ra fluoreszcens detektálás mellett, melynek

hatására a kettős DNS szálak disszociálnak egymástól, így a *SYBR Green I* festék leválik, vagyis csökken a leadott fluoreszcens jel mértéke. A kettős DNS szálak olvadási hőmérséklete jellemző, függ a mérettől és a köztük lévő H-hídak számától (G+C tartalom), vagyis a különböző termékek más-más hőmérsékleten disszociálnak. A szoftver ennek az olvadási görbének veszi a hőmérséklet szerinti negatív deriváltját, így az inflexiós pontnál a deriválás után egy csúcs keletkezik, ez a termékre jellemző olvadáspont (-d(RFU)/dT; ahol RFU = relatív fluoreszcencia, T = hőmérséklet).
Kísérleteink során kivétel nélkül, mindig végeztünk olvadáspont analízist, a fentebb leírt paraméterek mellett.

2.4. **Élesztőtörzsek és tenyésztési feltételeik**

2.4.1. A mikroorganizmusok fenntartása és kezelése

Kísérleteinkhez egy eukarióta hasadóélesztő törzset, a *Schizosaccharomyces pombe* uracil auxotróf (*ura4-D18*) heterotallikus szülői törzsét (ATCC 200650) használtuk (jelölése a továbbiakban: hyd^+). A *t*-BuOOH-rezisztens mutáns törzs (jelölése a továbbiakban: *hyd1-190*) létrehozására ebből a szülői törzsből random mutagenezissel Fekete és munkatársai által leírt (100,101) módszer alapján történt. Minden, az alábbiakban ismertetésre kerülő kísérlet során legalább 3-3 párhuzamos mérést, és 3 vagy 4 független kísérletet végeztünk.
Minden kísérletben a kiindulási sejtszám 10^6 sejt/ml volt (optikai denzitás; OD_{595nm}=0,05), majd az előkísérletek során meghatározott 15 óra tenyésztési idejű, közép-logaritmikus fázisú tenyészetekkel dolgoztunk (OD_{595nm}=0,7) tovább. A sejteket minimál SM (*selective minimal*) folyékony médiumban növesztve, 1% glükóz, 0,5% $(NH_4)_2SO_4$, 0,05% KH_2PO_4, 0,01% $MgSO_4$ és 0,1% Wickerhamm-féle multivitamin oldattal, illetve 100 mg/l uracillal (pH 4,5) kiegészítve. A tenyésztést egy 30°C-os inkubátorban végeztük, a lombikokat folyamatosan rázatva (33,3 Hz ≈ 150 rpm). A sejtek gyűjtését és háromszori mosását 0,9%-os NaCl-oldattal, centrifugálással (1000×g, 5 perc) végeztük.

A *S. pombe* törzseket SM táptalaj felületén, ferde tenyészet formájában tartottuk fenn, melyet hetente frissítettük. Hosszútávon ⁻80 °C-on tároltuk őket, a megfelelő, fagyasztásra alkalmas oldatban.

A kezelések az előkísérletek során meghatározott szubinhibitori, vagyis 0,2 mM-os *t*-BuOOH oldattal, 1 órán keresztül történtek. Amennyiben ezektől az értékektől eltértünk, ott a módszer leírásánál külön feltüntettük az alkalmazott körülményeket, kezeléseket.

2.4.2. Az indukált t-BuOOH – rezisztenciájú mutáns törzs létrehozása

Meghatároztuk rázatott tenyészetben a szülői törzs (hyd^+) $MIC_{t\text{-}BuOOH}$ értékét: 4 napos YEA (*yeast extract agar*) ferde táptalajról (5 % élesztőkivonat, 10 % glükóz, 2 % agar) kétkacsnyit 10 ml YEL (*yeast extract liquid*) tápoldatba (5 % élesztőkivonat, 10 % glükóz) átoltottunk és 24 órát inkubáltuk 30 °C-on. 24 órát követően friss YEL tápoldatba oltottunk át, hogy az OD_{595} = 0,05 legyen. A beoltott tápoldatot szétosztottuk 10 ml-ként kémcsövekbe, amelyek meghatározott koncetrációjú *t*-BuOOH oldatot tartalmaztak (K, 0,5, 1, 2, 4 mM). A kémcsöveket 30°C-on rázattuk 200 fordulat/perc fordulatszámon és megadott időközönként OD-t mértünk. A szülői törzs 4 napos tenyészetéből 10 ml YEL tápoldatban 2 kacsnyit 24 órán át növesztettünk, majd azokat 5 x 20 ml friss YEL tápközegbe oltottuk úgy, hogy az OD 595 nm-en 0,05 legyen. A tenyészetekhez lipidperoxid (*t*-BuOOH) oldatot adtunk úgy, hogy a tápközeg lipidperoxid koncentrációja 500 µM-os legyen. A lipidperoxidot tartalmazó tenyészetek sejtjeit egymás után háromszor oltottuk át 500 µM-os lipidperoxid koncentrációjú friss YEL tápközegbe, és a sejtkultúrákat valamennyi esetben 30 ºC-on 24 óráig rázatva inkubáltuk. A harmadik inkubálás után a sejteket 20 ml, 500 µM lipidperoxidot tartalmazó friss YEL tápoldatba oltottuk át úgy, hogy az OD 595 nm-en 0,05 legyen. 10 órás inkubálást követően a tápközeg lipidperoxid tartalmát 1000 µM végkoncentrációra növeltük. 12 óra múlva ezen tenyészet sejtjeit háromszor egymás után átoltottuk friss, 1000 µM lipidperoxid koncentrációjú YEL tápoldatba, és az átoltások között 30°C-on 24-24 óráig inkubáltuk. A továbbiakban a lipidperoxid koncentrációt – az előzőekhez hasonlóan – mindig dupláztuk. A végső koncentráció 4000 µM volt. Az ebből a kultúrából származó sejteket YEA lemezekre szélesztettük (minden tenyészetből 2 csészére) és izoláltunk egy

különálló telepet, így tiszta tenyészeteket hoztunk létre. Minden Petri csészéről 1-1db telepet oltottunk át 1-1 YEA ferde táptalajra 5 napos 30 ºC-on történő növesztés múlva. Majd minden ferdéről YEA táptalajra szélesztettünk és minden szélesztésből 1db telepet átoltottunk SM ferdére. Ezt identifikálás, illetve MIC_{tBOOH} érték meghatározás követte: 5 napos SM ferdén növő tenyészeteket használtunk. Minden ferdéről egy kacsnyit fiziológiás sóoldatba szuszpendáltunk és beállítottuk OD-jüket 0,2-re. Ezekből 25 µl-es cseppeket csepegtettünk SM táptalajra, amely meghatározott koncentrációjú lipid peroxidot tartalmazott (0,5, 2, 4, 8, 10, 15, 20 mM). A legnagyobb MIC-val rendelkező tenyészetet választottuk ki és neveztük el *t*-BuOOH (lipidperoxid) – rezisztens törzsnek.

2.4.3. A törzsek közép logaritmikus fázisban lévõ tenyészeteinek elõállítása

Három napos ferde tenyészetről két inokulumnyi sejttel beoltottunk 10 ml SM tápoldatot. 24 óra múlva sejtszámolást végeztünk, majd beoltottunk 100 ml SM tápoldatot a 24 órás tenyészettel úgy, hogy a tenyészet induló sejtszáma 10^6 sejt ml^{-1} legyen. A szülői törzs és a rezisztens mutáns egyaránt 15 óra múlva érte el a közép logaritmikus fázist. Minden kísérletnél, ha másként nincs jelezve, közép log fázisú tenyészeteket használtunk, hogy a vizsgált törzsek azonos fiziológiai állapotban legyenek.

2.4.4. Generációs idők (szaporodási görbe) meghatározása

Három napos SM ferde tenyészetről egy kacsnyi sejttel beoltottunk 10 ml SM tápoldatot. 24 óra múlva sejtszámolást végeztünk, majd beoltottunk 100 ml friss SM tápoldatot a 24 órás tenyészettel úgy, hogy a tenyészet induló sejtszáma 10^6 sejt ml^{-1} legyen, ill. az OD-ja 0,05 (595 nm-en). Ezután a sejteket 30ºC-on 150 fordulat/perces fordulatszámmal rázattuk, és megadott időközönként sejtszámolást végeztünk Bürker-kamra segítségével, ill. OD-t mértünk 595 nm-en. A generációs idő számítása az alábbi képlet alapján történt:

$$G = \frac{\log (2^{t_2 - t_1})}{\log y/x}$$

$t_1 = t_1$ időpont

$t_2 = t_2$ időpont

$y = t_1$-ben mért sejtszám

$x = t_2$-ben mért sejtszám

2.5. **Élesztőtörzsek túlélési jellemzői kezelést követően**

2.5.1. Minimális gátló koncentrációk meghatározására

Minimális gátló koncentráción azt a legkisebb antimikrobiális szer koncentrációt értjük, mely gátolja a növekedést és a szaporodást. A stresszorokat különböző, ismert koncentrációkban az uracillal kiegészített SM táptalajhoz kevertük, ügyelve arra, hogy egyforma vastagságú legyen az agar. Ráoltáshoz 3 napos SM ferde táptalajon növő tenyészeteket használtunk. A sejttenyészetekből 1-1 kacsnyi sejtet felszuszpendáltunk 4 ml fiziológiás sóoldatban, majd tízszeres hígítást követően Bürker-kamrában sejtszámolást végeztünk, a sejtszámot beállítottuk $4x10^6$ sejt ml^{-1}-re. A sejtszuszpenziókból 25 µl-t (10^5 db sejt) vittünk fel foltoltással az SM táptalajra, ami tartalmazta a kívánt koncentrációnak megfelelően az egyes reagensek oldatait (*t*-BOOH, amfotericin-B). Minden koncentrációnál 3-3 párhuzamos mérést végeztünk, és 4 független kísérletet végeztünk. A sejtproliferációt 5 és 10 nap elteltével értékeltük, 0-5-ig terjedő skálán osztályoztuk.

2.5.2. Szaporodásgátlások meghatározása

A *S. pombe* közép-log fázisú tenyészeteinek előállításához 3 napos ferde tenyészeteket használtunk. A sejteket centrifugáltuk, mostuk, majd SM folyékony tápoldatban vettük fel. A *t*-BOOH különböző koncentrációit adtuk a tenyészetekhez, majd több órán keresztül rázattuk a mintákat. A kultúra induló sejtszáma 10^6 sejt ml^{-1} volt, a sejtkoncentrációt meghatározott időpontokban Bürker-féle hemocitométerrel határoztuk meg.

2.5.3. Sejtpusztítás vizsgálata

A pusztítási görbe felvétele (135) során centrifugáltuk, fiziológiás sóoldatban mostuk, majd újra SM tápoldatban vettük fel a közép-log fázisban lévő tenyészet sejtjeit. Sejtszámolást végeztünk, majd egy 100 ml-es Erlenmayer lombikban 20 ml SM tápoldattal 10^6 sejt ml^{-1} sejtsűrűséget állítottuk be. Ezután hozzáadtuk a stresszort megfelelő koncentrációkban. A kezelést egy órán keresztül végeztük, vízfürdős

rázógépen rázattuk a mintákat, 20-30 percenként mintát vettünk. A mintát 100-szorosára higítottuk SM tápoldatban, majd 3-3 Petri csészébe szélesztettünk 50-50µl-t. Az értékelést öt nap múlva végeztük, a 0 perces sejtszámot vettük 100 %-nak, a 20, 30, 40 és 60 perces minták élő sejtszámát ehhez viszonyítottuk. A pusztítási görbe alapján választottuk ki azt a szuboptimális koncentrációt, amelynél a tenyészet élő sejtszáma egy órás kezelés után 80-90% között volt. Az adaptációs kísérleteknél és a továbbiakban is ezzel a koncentrációval dolgoztunk tovább.

2.5.4. Adaptációs kísérletek

Az adaptációs késérletek (135) során a már kiválasztott szuboptimális koncentrációval, tápoldatban kezeltük először a közép-log fázisban lévő tenyészeteket. A mintát kettéválasztottuk, centrifugáltuk, mostuk, majd ugyanannyi SM tápoldatban vettük fel a sejteket. Hozzáadtuk a hatóanyagot (stresszort) és egy órán keresztül kezeltük a tenyészetet. Ezután centrifugáltuk a mintákat, mostuk, majd Na-Hepes pufferban vettük fel a sejteket. Beállítottuk a sejtszámot 10^6 sejt ml^{-1} -re, hozzáadtuk a reagenst különböző koncentrációkban, és vízfürdős rázógépen rázattuk a mintákat. Ebben az esetben is 20-30 percenként vettünk mintát, melyet 100-szorosára hígítottuk Na-Hepes pufferban, majd 3-3 Petri csészébe szélesztettünk 50-50 µl-t. Öt nap múlva végeztük a kiértékelést, a 0 perces sejtszámot vettük 100 %-nak, a 20, 40 és 60 perces minták élő sejtszámát ehhez viszonyítottuk.

2.5.5. Glicerintartalmú tápoldatban történő szaporodás

A sejteket egy éjszakán keresztül növesztettük 5 ml YEL tápoldatban 30°C-on. Ezt követően beoltottunk 25-25 ml különböző glicerin tartalmú SM tápoldatot úgy, hogy az OD_{595} = 0,075 – 0,08 között legyen. A kontroll glicerin helyett glükózt tartalmazott, viszont a glicerintartalmú tápoldatok nem tartalmaztak glükózt. Optikai denzitást mértünk 10, 24, 36, 48 és 60 óránál (136).

2.6. **Membránvizsgálatok élesztőn**

2.6.1. Protoplasztálás (szferoplasztálás)

Az EPR spektroszkópia mérésekhez használt paramágneses szondák nem képesek bejutni az élesztő sejtfalon keresztül a sejtmembránba, ezért ezeknél a kísérleteknél a sejtfal részleges/teljes emésztése szükséges. A kezelés időtartamától függően előbb részlegesen leemésztett sejtfalú szferoplasztokat, majd sejtfallal nem rendelkező protoplasztokat kaptunk. A közép log fázisú sejteket centrifugáltuk és mostuk kétszer 0,6 M-os KCl oldatban. A protoplaszt és/vagy szferoplaszt képzést 1 %-os liofilizált csigaenzimmel (*Helix pomatia*) végeztük 0,6 M KCl ozmotikus stabilizáló oldatban. A spinjelölést ugyanis a vegetatív sejtek protoplaszt/szferoplaszt membránján végezzük. 1-1,5 órás 30 °C-on történő kezelés és inkubáció után a protoplasztokat kétszer mostuk stabilizáló oldatban és 6×10^8 szferoplaszt/ml-re higítottuk 0,6 M KCl oldatban, Bürker-kamrás sejtszámolás és életképesség ellenőrzést követően (137).

2.6.2. Zsírsavak jelölése

Előkísérletek során kiválasztottuk a megfelelő zsírsavjelölő molekulát (3-, 5-, 7-, 11-SAS), és a továbbiakban azzal dolgozunk. A kontroll minta készítése során 7 µl 5-(4',4-dimethyloxazolidine-*N*-oxyl) sztearin savat, másnéven 5-doxilsztearin savat (5-SAS) (3 mg/ml etanolban oldva) adtunk 500 µl protoplaszt-szuszpenzióhoz, majd ezt a keveréket 30 másodpercig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd 30 másodpercig kémcsőkeverővel összeráztuk. Mindezt egymás után háromszor megismételtük, elősegítve a spin jelölő beépülését a membránba. A protoplaszt szuszpenziót lecentrifugáltuk (1600 g-n 3 percig) majd a pelletet felszuszpendáltuk 300 µl 0,6 M-os KCL oldatban. A szuszpenziót 100 µl térfogatú kapillárisba töltöttük át, újból centrifugáltuk 4 °C-on, majd a felülúszót eltávolítottuk. Minden kapilláris 10^8 protoplasztot tartalmazott, mindegyik kísérletben. Az oldat pH-ját 6,4-re állítottuk be. A méréseket 0-30 °C-os hőmérsékleten végeztük. Abban az esetben, ha a *t*-BuOOH hatását vizsgáltuk a membránra, a stresszor-oldatot hozzáadtuk a közép log fázisú sejtekhez (hogy a végső koncentráció 200 µM legyen), és azzal még egy órán keresztül rázattuk, mielőtt a sejteket gyűjtöttük volna.

2.6.3. A spin jelölt EPR mérés paraméterei

Az EPR spektrumot ESP 300E spektrométerrel (Bruker, Germany) rögzítettük, mely diTC2007 hőmérséklet szabályozóval felszerelt. Az 5-SAS által jelölt zsírsav EPR spektrumát 0-30 °C hőmérséklet tartományban 2 (±0,2) °C-onként vettük fel mind a kontroll, mind a *t*-BuOOH kezelt minták esetében. A mérés során a szokásos EPR beállításokat alkalmaztuk: mikrohullámú erősítés, 5 vagy 10 mW; tér moduláció, 100 kHz; amplitudó, 0.1-0.2 mT; spektrum szélesség, 10 mT. Négy kísérleti sorozatot készítettünk mindkét törzzsel *t*-BOOH jelenlétében és hiányában, a spektrumokat meghatároztuk és átlagoltuk. A rendszer paraméter hibája nem volt nagyobb mint ± 0,09 0-30°C-os hőmérsékleti skálán.

2.6.4. Az EPR mérés kiértékelése

A membrán fizikai tulajdonságainak változásai - mint például a fluiditás, rétegvastagság, felszíni polaritás, membrántöltés vagy görbületi feszültség - befolyásolja a membrán funkcióját (138). Az EPR spektroszkópia egy igen elterjedt módszer membránok vizsgálatára. A mérés során egy paramágneses minta energiaelnyelését detektáljuk a változó mágneses térerősség függvényében. Mivel a biológiai rendszerek általában nem tartalmaznak paramágneses molekulákat, a membránok EPR-es vizsgálatához olyan zsírsav vagy lipid jelölőket alkalmazunk, amelyek egyik szénatomjához egy nitroxid stabilis szabadgyök van kapcsolva. Ezeknek a spinjelölt vegyületeknek membránba való beépítésével az EPR spektroszkópia különösen hatékony módszer az integráns membránproteineket tartalmazó membránok vizsgálatára, mivel érzékenysége optimálisan illeszkedik a biológiai membránokban található lipidek rotációs korrelációs idejével. (139–141). Az EPR spektrumok kiértékeléséhez a laboratóriumban Prof. Belágyi József által kifejlesztett ILPC illesztő programot használtuk. Az értékelés során a spektrum magas- és alacsonyterű szélső értékét vagyis az aktuális mintában a spinjelölő hiperfinom csatolási állandóját (2A'zz) - vettük figyelembe. A csatolási állandó a membránokban lejátszódó változások jellemzésére használt egyik leggyakoribb paraméter. A kiértékelésnél Israelachvili és munkatársai (142) által javasolt módszert

használtuk, melynek segítségével leírható a membránba inkorporálódott paramágneses szonda rotációs dinamikája, és jellemezhető a „fluiditás” (a membránmolekulák mozgása). Biológiai membránok esetén a hőmérsékleti változás hatása általában lineáris. Ha a külső csatolási állandók a hőmérséklet reciprokának függvényében ábrázolt pontjaira nem illeszthető egyetlen egyenes, hanem töréspontot találunk, akkor a membránban valószínűsíthetően fázisváltozás ment végbe (143). Ebben az esetben a két eltérő meredekségű egyenes jobb közelítést eredményez, mint egyetlen egyenes. A számításokat a Johns és Molitoris által leírtak alapján, a PTE ÁOK-on fejlesztett számítógépes program segítségével végeztük el (144). Az illesztett egyenesek metszéspontja adja meg a membrán fázistranzíciós hőmérsékletét.

2.6.5. Totál lipid minta preparálás élesztőből

A lipidek preparálását Milan Čertík professzor (*Slovak University of Technology in Bratislava, Department of Biochemical Technology*) útmutatásai alapján végeztük. Az *S. pombe hyd*$^{+}$ és *hyd1-190* élesztősejteket SML tápközegben (30°C), nagy mennyiségben (3×500 ml) közép-logaritmikus fázisig (OD_{595}=0,7) felszaporítottuk, ahol szükséges volt, ott 0,2 mM t-BuOOH-dal kezeltük a generációs idő duplájáig (8 óra hosszan). Az így kapott késői-logaritmikus fázisú (OD_{595}=1,5) tenyészeteket centrifugálással (50 ml-enként, 4600 rpm/10 perc/4°C) gyűjtöttük, kétszer átmostuk (steril, jéghideg desztillált vízzel), majd felvettük a sejteket nedves tömeg grammonként 20 ml metanol:kloroform keverékben (2:1 v/v), erősen vortexeltük, majd egy órán keresztül szobahőmérsékleten állni hagytuk, de kb. 10 percenként megkevergettük. Ezután újra centrifugáltuk a szuszpenziót (4600 rpm/10 perc), majd a felülúszót használtuk tovább. Ahhoz, hogy víztiszta folyadékot kapjunk, szükséges volt még ennek a további szűrése sima üvegtölcsérben 2-3 rétegű szűrőpapíron keresztül. Az így kapott oldat térfogatánál 1,2-szer több, 0,97%-os KCl oldatot adtunk a víztiszta mintánkhoz, majd mindezt átöntöttük egy kémiai rázólombikba (melynek csapját szilikonzsírral kentük be, semmiképpen nem valami szerves zsírral). Ezt 1 percig nagyon erősen ráztuk, majd vártunk még 10 percet, ezalatt a kloroform lesüllyedt az aljára, és egy centrifugacsőbe tudtuk engedni a kloroform kb. 99%-át. Egy másik centrifugacsőbe még ugyanannyi szuszpenziót

engedtünk, ezután centrifugáltuk a mintákat (4600 rpm/10 perc). Az így kapott centrifugátumról vízszivattyúval leszívtuk a felülúszó nagy részét, és átpipettázzuk a megmaradt alsó fázist egy 100 ml-es lombikba, elkerülve, hogy a felülúszóból egy csepp is a mintába kerüljön. Ezután egy 100 ml-es lombikra helyezett üvegtölcsérbe tettünk két rétegben szűrőpapírt, majd ebbe kb. 2-3 gramm vízmentes Na_2SO_4-ot, és ezen átengedtük az oldatunkat, így téve vízmentessé. Ezt az egész eljárást a lecentrifugált sejttörmelékkel újra megismételtük. Végül a kloroformot elpárologtattunk nitrogéngáz alatt. Mikor az összes kloroform elpárolgott, akkor a lombikba tettünk még 2 ml kloroformot, amivel a lombik faláról lehetőleg az összes lipidet beoldottuk. Az így kapott oldatot 800 µl-enként áttettük kis, előre tárázott viálcsövekbe, ezekről is elpárologtattuk a kloroformot, és egy újabb mérlegelés után kiszámítottuk a sárgás foltként a cső aljára beszárított totál lipid mennyiségeket. Ezzel a módszerrel, 0,8 ml-nyi mennyiségek ugyanazon csövecskébe történő egymást követő bepárolásával, akár egy csőbe is száríthatjuk az összes mintánkat. Végül mindenképpen mérjük meg a cső tömegét, hogy tudjuk, mennyi lipidünk van. Ezt eltárolhatjuk $^{-}$80°C-on akár évekig.

A továbbiakban a különböző lipidmérések miatt a minták beoldása 500 µl kloroform:metanol (1:1 v/v) elegyben történt.

2.6.6. Szterin analízis

Mintánként 20 mg lipidet használtunk fel ezekhez a mérésekhez. A metanol-kloroform elegyet nitrogéngáz alatt elpárologtattuk, majd felvettük a mintát 1 ml 25%-os KOH-ot tartalmazó etanol oldatban. Vortexeltünk, majd 90°C-os vízfürdőbe helyeztük a mintákat 1 órára, miközben negyedóránként vortexeltünk. Az inkubációs idő lejárta után kivettük a vízfürdőből a mintákat és hozzáadtunk 1 ml desztillált vizet. Szobahőmérsékletre hűtöttük, aztán hozzáadtunk 2 ml hexánt, és 1 percig vortexeltük, majd állni hagytuk kb. 5 percig. Ekkor a szterinok a felülúszóban, a hexánban vannak, ezt áttettük egy tárázott üvegcsébe, és nitrogénnel elpárologtattuk a hexánt, és újra mértük a beszáradt szárazanyagot. Ezután mégegyszer megismételjük a 2 ml hexán adásától kezdődően a protokollt. Ezután az üvegcsébe tettünk 200 µl hexán:etil-acetát 1:1 v/v keveréket. Jól lemostuk vele az üvegcse falát, és áttettük egy viálcsőbe. Ezt megismételtük 200 µl, majd

100 µl hexán:etil-acetát szuszpenzióval. Így a szterinunk 500 µl szuszpenzióban oldott. Az 500 µl szuszpenziót újból elpárologtattuk nitrogénnel, majd felvettük a szterinunkat 25 µl kloroformban, és a gázkromatográfiás mérésekhez ebből 1-1 µl mintát használtunk fel. A mérés Agilent Technologies, 6890N, Network GC system, 7683 series Injector, 5975c NL MSD típusú készülékkel történt (145).

2.6.7. Poláros és nempoláros lipidek meghatározása

A meghatározáshoz a mintákat vékonyrétegkromatográfia lapokon (MERCK 1.05553.0001, 25 TLC aluminium sheets, 20 x 20, Silicagel 60) megfuttattuk. E célból két lapot készítettünk, egyet a poláros, egyet pedig a neutrális lipideknek. Automata adagolóval (CAMAG, Automatic Sampler 4) felvittük a mintákat a lapokra. A poláros lipidek futtatása az alábbi oldattal történt: kloroform : aceton : metanol : ecetsav : desztvíz (50:20:10:10:5 v/v), míg a neutrális lipidekhez a következő futtató puffert használtuk: dietil éter : hexán : ecetsav (20:80:1 v/v). A kádba helyezett plate-eket hagytuk futni, míg kb. 1,5 cm volt vissza, ezután kivetük a lemezeket a kádból és hagytuk őket szobahőmérsékleten megszáradni. Ezután leöntöttük a lemezeket felülről lefele csorgatva 5%-os H_2SO_4-et tartalmazó metanol oldattal úgy, hogy az egész lemezt érje. Ezt is hagytuk megszáradni és ezután hőlégfúvóval (Extol, 1-es fokozat 350°C, 2-es fokozat 550°C) melegítettük 1-es fokozaton kb. 50 cm-ről, amíg a csíkok elő nem jöttek (5 perces aktív jód gőzös kezelés is szükséges lehet, mikoris a lipidek sárgán fognak világítani és ceruzával bejelölhetjük a foltokat). A melegítéssel előhívott foltokat tartalmazó vékonyréteg kromatográfiás lapot beszkenneltük és Adobe Photoshop 9.0 programmal a standardokhoz viszonyítva meghatároztuk a foltok erősségét. A különböző lipidek zsírsavösszetételének vizsgálatához egy-egy plate-re két mintát tudtunk felvinni, és minden minta legalább 20 mg lipidet tartalmazott. Miután megfuttattuk a lemezeket, aktív jódot tartalmazó kádba tettük pár másodpercre, majd kivettük és a lipidek területei sárga színűek lettnek. Ezt bejelöltük ceruzával, utána lekapargattuk a lemezről a csíkokat egy mikrocentrifugacsőbe. Ezután elvégeztük a lipidek észterifikációját és megmértük a zsírsavak mennyiségét.

A neutrális lemezen a következő sorrendben helyezkednek el a lipidek, alulról felfelé: poláris lipidek (maradnak a starthelyen), felette a monoacil-glicerinok, majd az ergoszterin, utána a diacil-glicerinok, a lanoszterin, majd a szabad zsírsavak, ezt követően a triacil-glicerinok, és végül legfelül a szkvalén. A lemezekről lekapartuk a vizsgálni kívánt csíkokat és végrehajtottuk rajtuk a fent leírt észterifikációs eljárást, majd mértük a zsírsavak mennyiségét.

2.6.8. Totál zsírsav meghatározás

Egy mikrocentrifuga csőbe a következőket mértük össze: 50 µl minta, 700 µl hexán-kloroform (9:1 v/v; poláros lipidek vizsgálatakor: 8:2), 100 µl transzészterifikációs oldat (30 ml etanol + 20 ml benzén + 1,15 mg fémnátrium + 7,5 mg fenolftalein). Vortexelünk és várunk 20 percet, utána hozzáadunk 200 µl met-HCl-t. Röviden vortexeltünk, majd centrifugáltuk (5000 rpm/4 perc). A centrifugálás után óvatosságból a felülúszónak csak kicsit több, mint felét-kétharmadát, kb. 60-70 %-át vittük át egy új kis üvegcsőbe. Ezután következhet a gázkromatográfiás mérés.

2.7. **Statisztikai analízis**

Minden kísérletet legalább háromszor megismételtünk, az eredményeket átlag és középértékre számolt szórás formában adtuk meg. A csoportok összetett összehasonlításakor ANOVA kiértékelést használtunk. Ha szükséges volt, az egyes vizsgált csoportok közötti statisztikai különbségeket a Bonferroni által módosított kétmintás T-próba segítségével állapítottuk meg. Statisztikailag szignifikánsnak a $p<0,05$ értéket tekintettük.

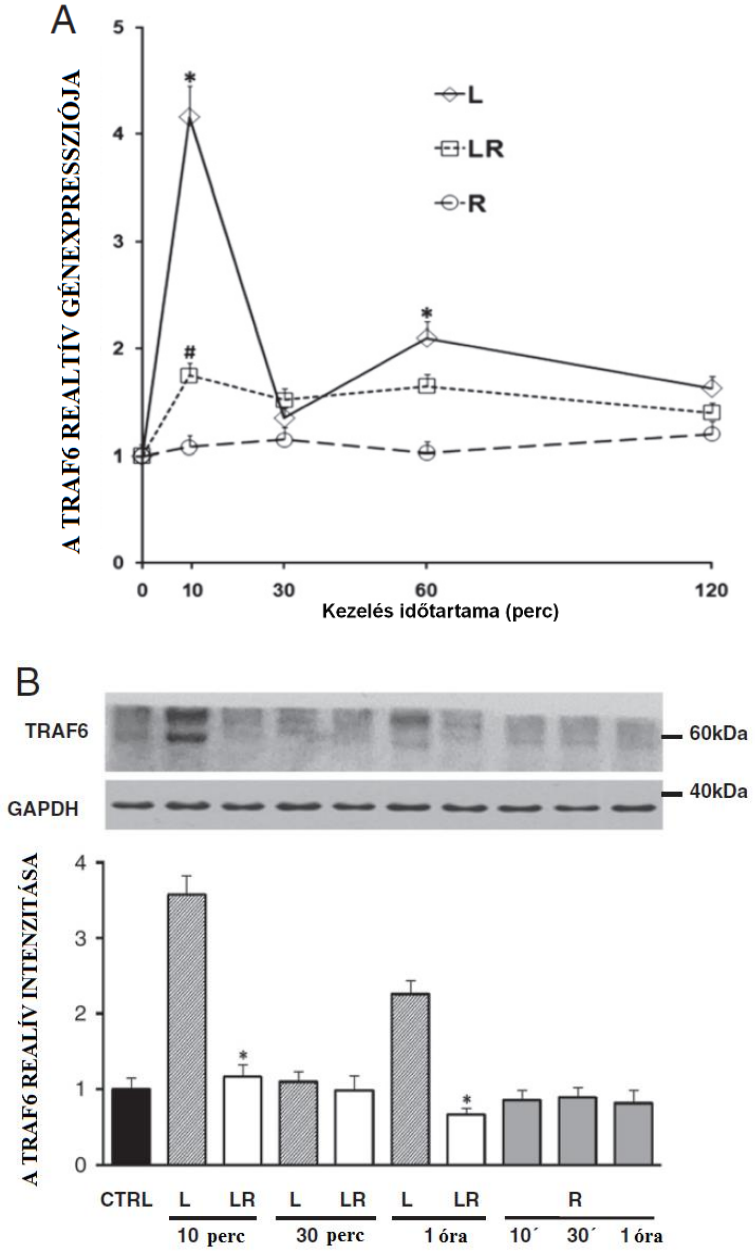
VII. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

1. Rezveratrol hatása gyulladásos modellen

Az LPS indukált, TLR4 – MyD88-független NF-κB aktiválás jelátvitelében már ismert a rezveratrol gátló funkciója a TRAM–TRIF–TBK1 komplexben (52). Ez a gátlás TRIF függő és egyben MyD88 független útvonalon zajlik. Az is ismert, hogy a MyD88 aktivációja elengedhetetlen a TRAF6 aktivációjához, amely az IκB aktivációjához vezet, így a fenti közleményben azt feltételezték, hogy a TRAF6 útvonal nem vesz részt abban a gátlásban, amit a rezveratrol idéz elő az LPS által indukált NF-κB aktivációban. Másrészről Sato és munkatársai (126) szerint a TRAF6 kapcsolatban áll a TRIF-fel és a TBK-1-gyel, és képesek az NF-κB és az IRF-3 transzkriciós faktor aktiválására a TLR4 aktiválódását követően (**4. ábra**).

1.1. A rezveratrol gátolja az LPS hatására indukálódó *traf6* gén expresszióját

A TRAF6 szerepének tisztázására, a TLR-közvetített NF-κB aktivációban meghatároztuk a TRAF6 mRNS és fehérje mennyiségét LPS kezelést követően, különböző időpontokban, rezveratrol jelenlétében és hiányában (**17. ábra**). A **17/A ábrán** a *traf6* gén relatív expressziós változásai láthatók RAW 264.7 egér makrofág sejtvonalon az idő függvényében, *gapdh* génre normalizálva. Látható, hogy 10 perc LPS kezelés után több, mint négyszeresére nőtt a *traf6* mRNS mennyisége, ami 30 perc után majdnem a kiindulási szintre visszaesett. 1 órás LPS kezelés után újabb, kétszeres transzkripcionális növekedés volt megfigyelhető, és még 2 órás LPS kezelés után is enyhe expresszió volt látható. Rezveratrollal történő előkezelés esetén ez az ugráló, bifázisos mintázat megszűnt, gátolta a rezveratrol a *traf6* gén transzkripcióját 10 percnél és 60 percnél is. Önmagában adva a rezveratrol nem befolyásolta a *traf6* génexpressziót. A *traf6* mRNS-nek e kétfázisú expressziós mintázata hasonlít az IκBα foszforilációs és expressziós kifejeződésére amelyet Loniewski és munkatársai (146) közöltek 2007-ben.



17. ábra: Az LPS és a rezveratrol hatása a *traf6* gén, illetve a TRAF6 fehérje expressziójára mRNS (A) és fehérje (B) szinten. RAW 264.7 egér makrofág sejteket 10, 30, 60 és 120 percig 1 μg/ml LPS-sel kezeltük (L), illetve ezt megelőzően 30 perces előkezelést alkalmaztunk 50 μM rezveratrollal (LR) is, vagy csak önmagában rezveratrolt adtunk (R). A génexpressziót *gapdh*-ra normalizáltuk. Az eredmények 3 független kísérlet átlag eredményét mutatják. **(B)** A TRAF6 fehérje kifejeződésének vizsgálata Westen-blot technikával. A RAW 264.7 egér makrofág sejtek kezelése megegyezzik az 17/A ábrában leírtakkal. A fehérje mennyiség normalizására GAPDH elleni antitestet használtunk.

Munkájukban a *traf6* gén kifejeződését siRNS technikával gátolták, miáltal az LPS okozta gyulladásos folyamatok jelentős mértékben visszaszorultak RAW 264.7 makrofágokban, bizonyítva, hogy a TRAF6-nak jelentős szerepe van az LPS által indukált IκBα aktiválásban, hiszen az IκBα foszforilációja és ennek következtében kialakuló lebomlása vezet az NF-κB nukleáris transzlokációjához. Loniewski-ék (146) és a mi eredményeink alapján is feltételezhető, hogy a TRAF6 részt vesz az LPS által indukált NF-κB aktiválásban, szintén bifázisú mintázatot követve, és a TRAF6 hatása mutatkozik az IκBα foszforilációjában és expressziójában. Esetünkben a rezveratrol már transzkripcionális szinten is gátolta az LPS-által kiváltott *traf6* gén kifejeződését LPS adása után mind 10, mind 60 perc elteltével (**17/A ábra**).

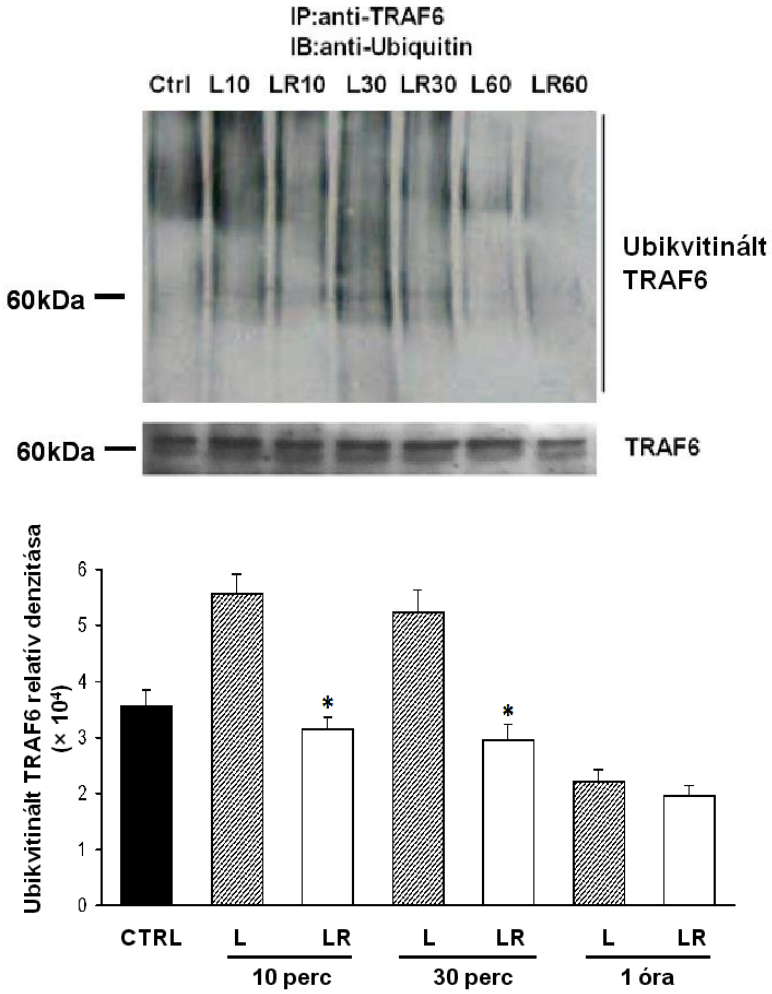
1.2. A rezveratrol gátolja az LPS hatására indukálódó TRAF6 fehérje kifejeződését

A rezveratrol LPS által okozott inflammatorikus folyamatokra gyakorolt gátló hatását tovább vizsgálva azt találtuk, hogy a TRAF6 fehérje mennyisége – Western immunoblottal vizsgálva – követte a *traf6* génről átírt mRNS expressziós mintázatát, tehát az LPS által okozott mRNS mennyiség növekedése megfigyelhető volt fehérje kifejeződés szintjén is, 10 és 60 perces kezelés után egyaránt (**17/B ábra**). Mindezen adatok mellett Sato és Loniewski megfigyelései (126,146) is egyaránt azt a feltételezést támasztják alá, hogy a TRAF6-nak szerepe van LPS által kiváltott gyulládásos folyamatokban, melyet a rezveratol képes csökkenteni.

1.3. A rezveratrol gátolja az LPS által indukált TRAF6 ubikvitinációt

A TRAF6 egy olyan ubikvitin ligáz enzim, mely a K-63-as aminosavon (lizin oldalláncukon keresztül) saját magát és más fehérjéket is képes ubikvitinálással aktiválni. Ebbe a csoportba tartoznak pl. a TAK1-asszociált kötő fehérje (TAB) 2/3 (146,147), de TRAF6 K-63-as ubikvitináció szükséges az IKK aktiválásához is. Annak eldöntésére, hogy a fenti mechanizmus szerepet játszik-e a rezveratrol anti-inflammatorikus

hatásában, megvizsgáltuk a TRAF6 autoubikvitinációját LPS és rezveratrol jelenlétében illetve hiányában.



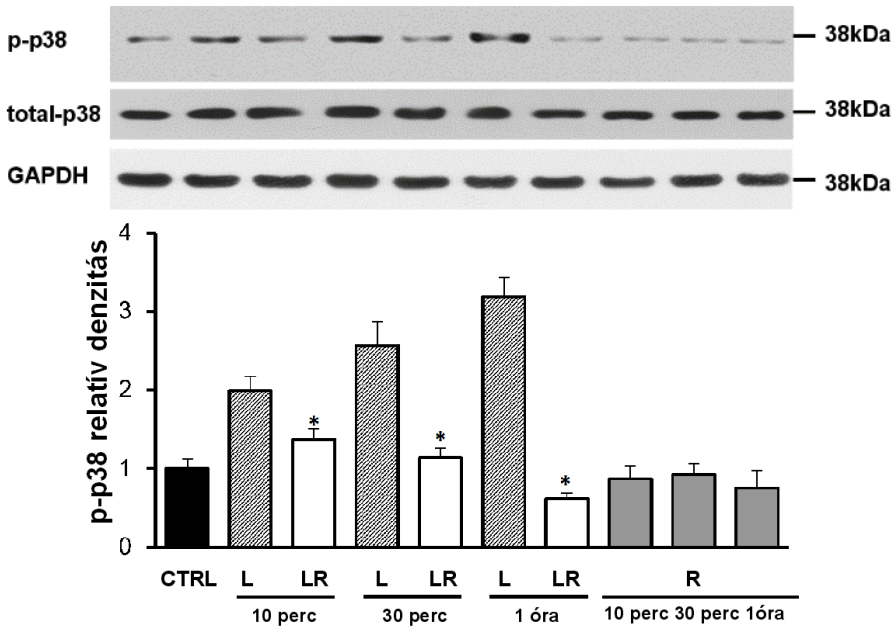
18. ábra: Az LPS-indukált TRAF6 ubikvitinációt gátolja a rezveratrol. RAW 264.7 sejteket 10, 30 vagy 60 percig 1 μg/ml LPS-sel kezeltük (L), vagy ezt megelőzően előkezeltük 30 percig 50 μM rezveratrollal is őket (LR), majd a mintákból immunprecipitációval kivontuk a TRAF6-ot, az ezt követő gélelektroforézis után az átblottolt fehérjéket anti-ubikvitin antitesttel hívtuk elő. **A:** Az ubikvitinált-TRAF6 immunoblottja, ahol kontrollként a „*strippingelt*" membránokat anti-TRAF6 antitesttel is előhívtuk; **B:** az A. ábra denzitogramja, 3 független immunoblott eredményéből, ImageJ szoftverrel készült kvantitatív kiértékelés. A blottok reprezentatívak, a hibazászlók a blottok intenzitás-átlagának szórását mutatják. A szignifikáns eltéréseket *-gal jelöltük ($P<0.001$). IP: immunprecipitáció, IB: immunoblot.

RAW 264.7 sejtek lizátumából TRAF6 ellenes antitesttel immunprecipitácót készítettünk, majd anti-ubikvitin antitesttel immunoblottot végeztünk (**18. ábra**). A **18. ábrán** látható, hogy 10 és 30 perces LPS kezelés hatására a sejtekben megnőtt az ubikvitinált TRAF6 mennyisége, míg 1 óra elteltével már alacsonyabb, mint a kontroll csoportokban. Ezt a növekedést 10 és 30 percnél is megakadályozta a rezveratrolos előkezelés. A TRAF6 ubikvitinációjának és fehérje-kifejeződés mintázatának nem feltétlenül kell, hogy kövessék egymást, mindkét mechanizmus képes indukálni a TRAF6 alatti útvonalakat. Kobayashi és mtsai (148) mutattak rá, hogy a TRAF6 segítségével az IKK aktiváció ubikvitin-függő és ubikvitin-független útvonalon is a végbemehet. Eredményeink azt mutatják, hogy az LPS kezelés nemcsak növeli a TRAF6 mennyiségét, hanem a funkcionális aktivitását, vagyis autoubikvitinálódását is elősegíti, aktiválva ezzel az IKK és NF-κB fehérjéket. A rezveratrol képes csillapítani mindkét mechanizmust, funkcionális gátló szerepet töltve be a TRAF6 aktivációban.

1.4. A rezveratrol gátolja az LPS által aktivált MAP kináz útvonalakat és az Akt aktivációját

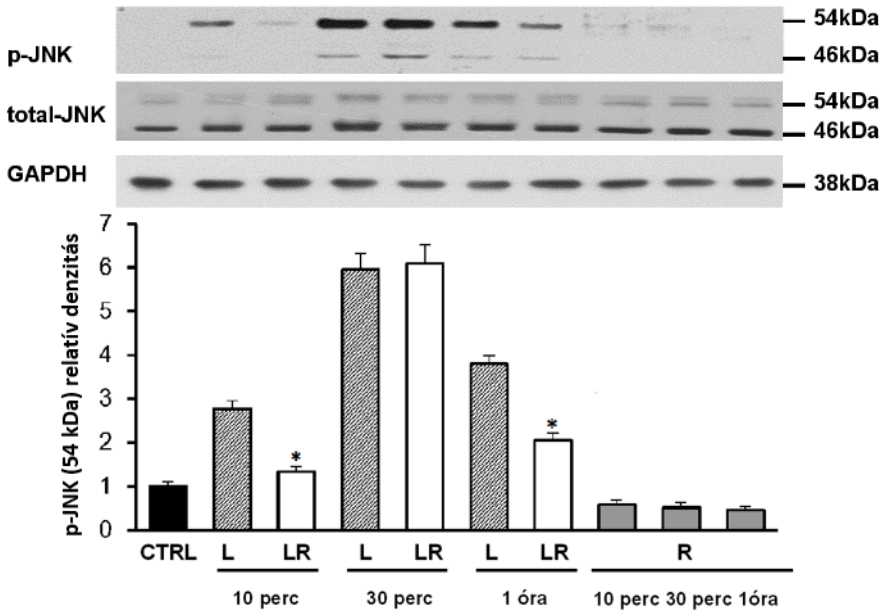
A TRAF6 K-63-as poliubikvitinációja és a TAB2/3-mal alkotott komplex indukálja az IKK-t és egy effektor mitogén aktivált fehérje kinázt, a TAK1-et. A TAK1 és TRAF6 kapcsolata LPS hatására a MAP kinázok aktiválásához vezet. TRAF6$^{-/-}$ génkiütött egér embrionális fibroblasztokban az LPS a TRAF6-on keresztül a p38 és JNK aktivációjához vezet, ellenben az ERK aktiváció elmarad, és ugyanez tapasztalható TRAF6 siRNS elnyomás esetén egér makrofágokban is (146,148). Yang és kutatócsoportja mutattak rá, hogy a TRAF6 doménjei szükségesek a JNK és p38 aktivációhoz, mert a zink-ujj domén delációja meggátolja a TRAF6 JNK és p38 aktiváló képességét (67).

Ezen eredmények azt mutatják, hogy a MAPK-ok expressziós mintázata közvetlenül kapcsolódik a TRAF6 aktivációjának változásához. Megvizsgálva az LPS indukálta TRAF6 expresszió és ubikvitináció funkcionális hatását, kíváncsiak voltunk, hogy a rezveratol hogyan befolyásolja a TRAF6 útvonal MAP kinázainak aktivitását.



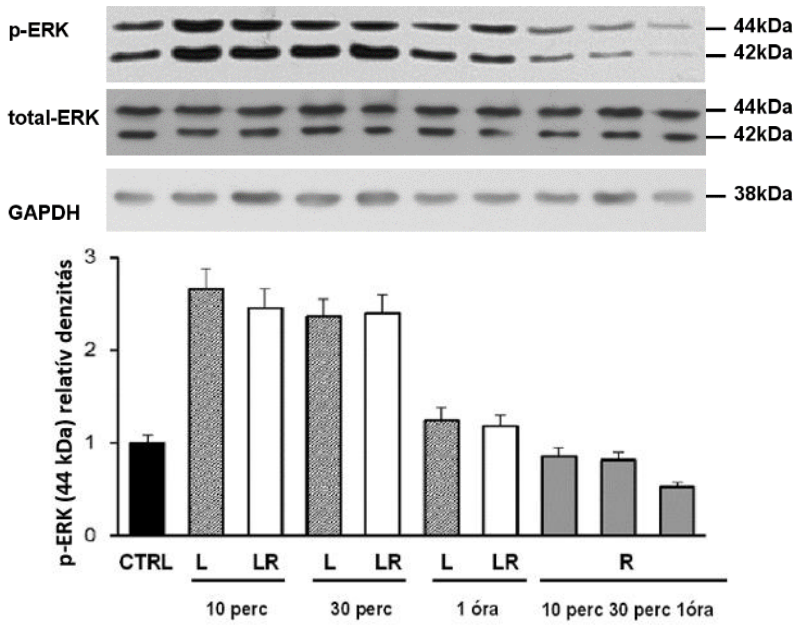
19. ábra: Az LPS-indukálta p38 MAP kináz foszforilációjának (aktiváció) vizsgálata Western blottal. A p38 foszorilációs mintázata különböző időpontokban LPS kezelést követően. RAW 264.7 sejteket 10, 30 vagy 60 percig 1 μg/ml LPS-sel kezeltük (L), vagy ezt megelőzően előkezeltük 30 percig 50 μM rezveratrollal is őket (LR), vagy csak rezveratrollal kezeltük őket (R). A nem-foszforilált fehérje és a GAPDH mennyiségét használtuk kontrollként. A blottok reprezentatívak és az oszlopdiagrammok három független előhívás átlagát mutatják. A hibazászlók a blottok intenzitás-átlagának szórását mutatják. A blottok intenzitásának kvantitatív kiértékelése ImageJ szoftverrel készült. A szignifikáns eltéréseket *-gal jelöltük ($P<0.001$).

LPS kezelést követően immunoblottal vizsgáltuk a MAP kinázok foszforilációját, foszforilált kinázokra specifikus elsődleges antitesteket használva, rezveratrol jelentéte mellett és hiányában. Eredményeink szerint az LPS növelte a p38 aktivációját a kezelés időtartamával egyenes arányban, viszont hatását a rezveratrol fokozatosan egyre jobban csökkentette. (**19. ábra**).



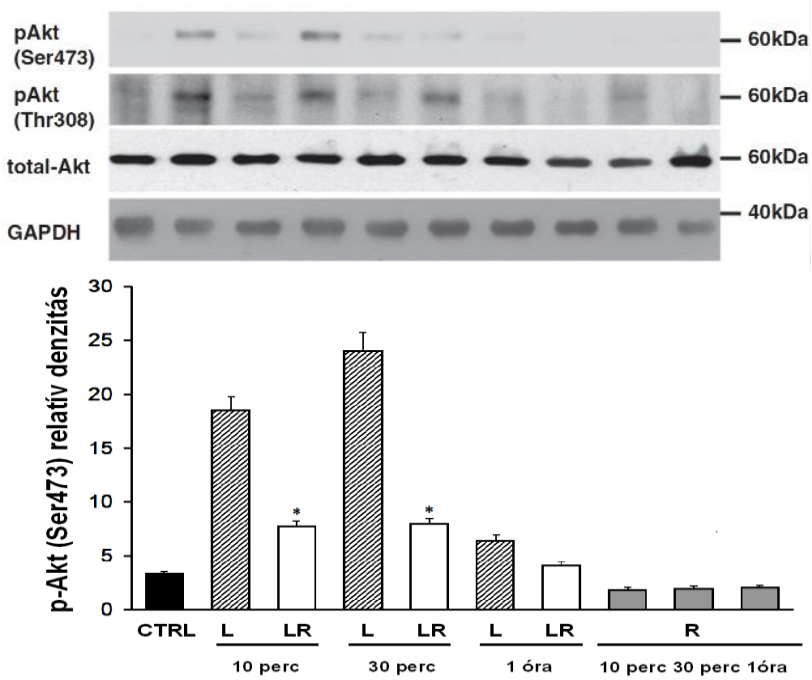
20. ábra: Az LPS-indukálta MAP kináz, a JNK foszforiláció (aktiváció) vizsgálata Western blottal. A SAP/JNK foszorilációs mintázata különböző időpontokban LPS kezelést követően. RAW 264.7 sejteket 10, 30 vagy 60 percig 1 μg/ml LPS-sel kezeltük (L), vagy ezt megelőzően előkezeltük 30 percig 50 μM rezveratrollal is őket (LR), vagy csak rezveratrollal kezeltük őket (R). A nem-foszforilált fehérje és a GAPDH mennyiségét használtuk kontrollként. A blottok reprezentatívak és az oszlopdiagrammok három független előhívás átlagát mutatják. A hibazászlók a blottok intenzitás-átlagának szórását mutatják. A blottok intenzitásának kvantitatív kiértékelése ImageJ szoftverrel készült. A szignifikáns eltéréseket *-gal jelöltük (P<0.001).

A JNK aktivációja szintén emelkedést mutatott LPS hatására az első 30 percben, utána viszont lecsökkent. A rezveratrol csökkentette a JNK foszforilációját, kivéve a 30 perces kezelést (**20. ábra**). A p38 és JNK aktivációtól eltérően, az ERK foszforilációjára a rezveratrol egyik vizsgálati időpontnál sem volt hatással (**21. ábra**). Munkánk is alátámasztja azt a korábbi feltételezést, hogy a rezveratrol a TRAF6 által indított p38 és JNK fehérjék foszforilációját képes gátolni, de az ERK-ét nem (146,148). Ez a tény is azt támasztja alá, hogy a TRAF6-nak funkcionális szerepe van a rezveratrol anti-inflammatorikus hatásában.



21. ábra: Az LPS-indukálta MAP kináz, az ERK foszforiláció (aktiváció) vizsgálata Western blottal. ERK foszorilációs mintázata különböző időpontokban LPS kezelést követően. RAW 264.7 sejteket 10, 30 vagy 60 percig 1 μg/ml LPS-sel kezeltük (L), vagy ezt megelőzően előkezeltük 30 percig 50 μM rezveratrollal is őket (LR), vagy csak rezveratrollal kezeltük őket (R). A nem-foszforilált fehérje és a GAPDH mennyiségét használtuk kontrollként. A blottok reprezentatívak és az oszlopdiagrammok három független előhívás átlagát mutatják. A hibazászlók a blottok intenzitás-átlagának szórását mutatják. A blottok intenzitásának kvantitatív kiértékelése ImageJ szoftverrel készült. A szignifikáns eltéréseket *-gal jelöltük (P<0.001).

Ezen felül Yang és munkatársai (67) kimutatták, hogy a TRAF6 közvetlen szubsztrátja az Akt is. Leírták, hogy a TRAF6 depléciója csökkenti az Akt foszforilációját. Ahhoz, hogy megerősítsük a TRAF6 funkcionális szerepét a mi modellünkben, megvizsgáltuk az Akt foszforilációs mintázatát is. Azt tapasztaltuk, hogy az Akt foszforilációja hasonlóképpen történik, mint a MAP kinázok esetében, amit a rezveratrol gátolni képes (**22. ábra**).



22. ábra: Az LPS-indukálta MAP kináz, az Akt foszforiláció (aktiváció) vizsgálata Western blottal Az Akt (Ser^{473} és Thr^{308}) foszorilációs mintázata különböző időpontokban LPS kezelést követően. RAW 264.7 sejteket 10, 30 vagy 60 percig 1 μg/ml LPS-sel kezeltük (L), vagy ezt megelőzően előkezeltük 30 percig 50 μM rezveratrollal is őket (LR), vagy csak rezveratrollal kezeltük őket (R). A nem-foszforilált fehérje és a GAPDH mennyiségét használtuk kontrollként. A blottok reprezentatívak és az oszlopdiagrammok három független előhívás átlagát mutatják. A hibazászlók a blottok intenzitás-átlagának szórását mutatják. A blottok intenzitásának kvantitatív kiértékelése ImageJ szoftverrel készült. A szignifikáns eltéréseket *-gal jelöltük (P<0.001).

1.5. A TRAF6 szerepének megvitatása a rezveratrol anti-inflammatorikus hatásában

A szakirodalomból jól ismert, hogy a TLR4 receptorról induló TBK1 és RIP1 aktiváció felelős az LPS által kiváltott IκBα lebontásáért és az NF-κB aktiválódásáért, még a MyD88 hiánya esetén is (52). Ezzel ellentétben az LPS és az interferon gamma által kiváltott IκBα degradációt nem gátolta a rezveratrol RAW 264.7 makrofágokban (149). Ez az eredmény azt sugallja, hogy a rezveratrol NF-κB aktivácót gátló hatását nem az IKK aktivácójának gátlásán keresztül fejti ki. Loniewski és mtsai (146) által felállított modell magyarázatot is szolgáltat erre az ellentmondásra. Munkájuk alapján

feltételezhető, hogy az IKK aktivációja makrofágokban két egymástól független útvonalon is megtörténhet: egy TRAF6-szenzitív (MyD88 függő), és egy TRAF6-inszenzitív (MyD88 független és TRIF függő) útvonalon.

Munkánkban, az LPS-jelátvitele során a TRAF6-ot azonosítottuk, mint a rezveratrol funkcionális támadáspontját. Eredményeink szerint a rezveratrol gátolta a *traf6* gén expresszióját, a TRAF6 fehérjék auto-poli-ubikvitiniációját, és a TRAF6 által aktivált MAP kináz (kivéve ERK) és Akt útvonalakat is. Munkánk alátámasztja a Sato és munkatársai (126) által feltételezett kapcsolatot a TRIF és TRAF6 között, illeszkedve azokhoz az eredményekhez, amelyeket Loniewski és Kobayashi (146,148) írtak le korábban, új megvilágításba helyezve a rezveratrol molekuláris szerepét az anti-inflammatorikus folyamatokban.

2. A lipidperoxidációt okozó *t*-BuOOH hatása eukarióta sejtmembránra

2.1. A *t*-BuOOH-rezisztens *S. pombe* törzs jellemzése

A *tert*-butil hidroperoxid-rezisztens *S. pombe* törzsek létrehozása a hyd^+ szülői törzsből random mutagenezissel történt (ld. VI.2.4.2 fejezetben), majd a legnagyobb minimális gátló koncentrációval rendelkező törzset választottuk ki további vizsgálatok céljára, mely a *hyd1-190* elnevezést kapta. Ez a törzs tetrádanalízis vizsgálatok alapján egy egy-génes mutációt hordozhat, mert a 25 teljes tetrád spróraklónjait tesztelve a hasadási arány minden esetben 2T:2N volt. A meiózis során keletkező négy haploid spóra együttesét tetrádnak nevezzük, genetikai analízisét pedig tetrádanalízisnek. A *S. pombe* tetrádjai lineáris tetrádok, a spórák sorrendjét a két meiotikus osztódás eseményei szabják meg. Szabályos meiózis eredménye négy spóra, amiből kettő az egyik szülőtől, kettő másik szülőtől származik.

A *hyd1-190*-es törzs a szülői (hyd^+) típussal összehasonlítva:

(i) négyszeres rezisztenciát mutat *t*-BuOOH oxidatív stresszorral szemben (**1. táblázat**)

(ii) hasonló generációs idővel rendelkezik (4 óra) (**23. ábra**)

(iii) a *t*-BuOOH-rezisztencia legalább 30 passzáláson keresztül öröklődött és stabil maradt a *t*-BuOOH-mentes SM-táptalajon

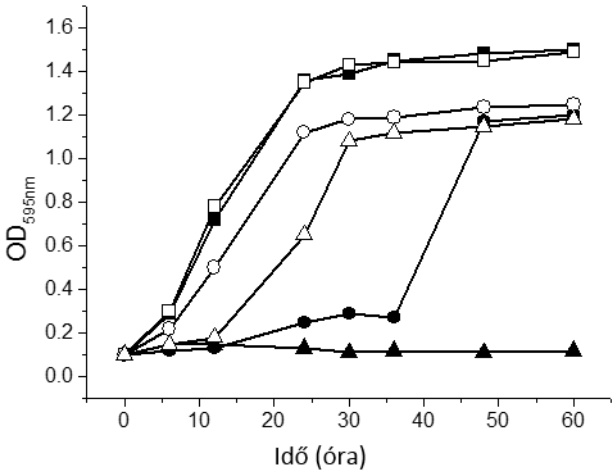
(iv) kétszeres érzékenységet mutat a membránkárosító hatással rendelkező Amfotericin-B antimikotikummal szemben (**1. táblázat**).

A *hyd1-19*0 törzs *t*-BuOOH rezisztencia vizsgálata SM táptalaj felületén történt (**1. táblázat**), míg a növekedésgátlás vizsgálata rázatott kultúrában, a stresszor jelenléte mellett.

		hyd^{+}	*hyd1-190*
t-BuOOH	mM	2.0	8.0
Amfotericin-B	µg/ml	1.0	0.5

1. táblázat: Minimális gátló koncentrációk meghatározása *t*-BuOOH-ra és Amfotericin-B-re a *hyd*$^{+}$ szülői és *tert*-butil hidroperoxid (*t*-BOOH) rezisztens mutánsára, a *hyd1-190*-es a törzsre.

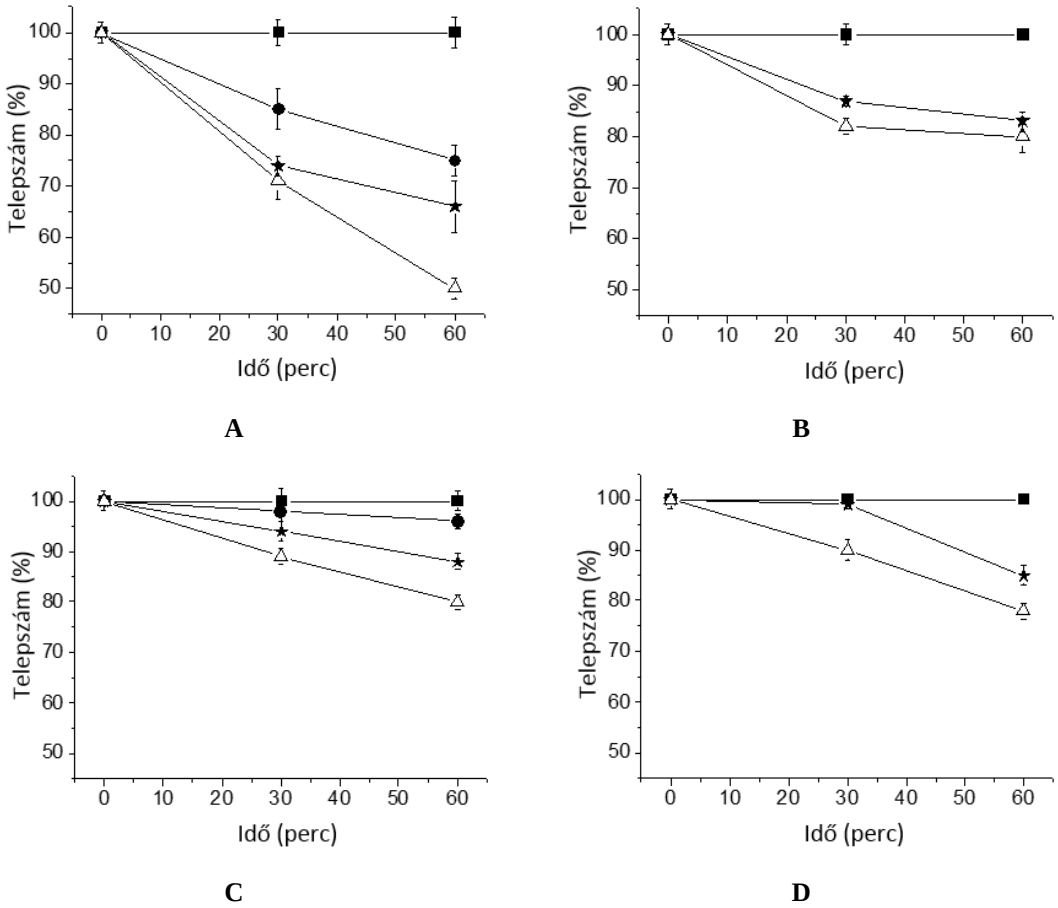
1,0 mM *t*-BuOOH jelenlétében a *hyd1-190*-es törzs 20 %-kal csökkent szaporodást mutatott, mint a kezeletlen kontroll, és 7 órával később érte el az exponenciális fázist, mindeközben a szülői törzs szaporodása teljesen leállt (**23. ábra**). Ezen előzetes eredmények alapján gondoltuk úgy, hogy célszerű lenne megvizsgálni a két törzs plazmamembrán biofizikai paramétereit.



23. ábra: Növekedés gátlás vizsgálat *t*-BuOOH jelenlétében. *S. pombe* szülői törzs: *hyd*$^{+}$ (sötét szimbólumok) és *t*-BuOOH-rezisztens mutáns: *hyd1-190* (világos szimbólumok), *t*-BuOOH koncentrációk: ■/□, kontroll (0 mM); ●/○, 0.5 mM; ▲/Δ, 1.0 mM.

2.2. *t*-BuOOH adaptáció vizsgálata és túlélésük időfüggése *hyd*$^+$ és *hyd1-190 S. pombe* törzseknél

A *hyd*$^+$ szülői törzsnek különböző koncentrációjú *t*-BuOOH-dal történő növekedés gátlása egy adaptációs folyamat lehetőségével járhat (**23. ábra**), így a törzsek adaptációs vizsgálatát is elvégeztünk (**24. ábra**).



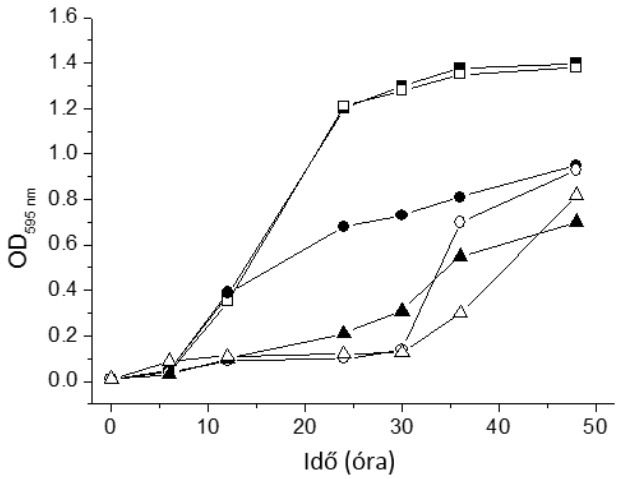
24. ábra: Túlélési arány (A, C) és adaptáció (B, D) vizsgálata *S. pombe hyd*$^+$ (**A, B**) és *hyd1-190* (**C, D**) sejteknél különböző koncentrációjú *t*-BuOOH jelenlétében: ■, kontroll; ●, 0.2 mM; ♦, 1 mM; ▲, 2 mM *t*-BuOOH. Telepek száma a kontroll mintára normalizálva és %-ban megadva, a kezelési idő (perc) függvényében.

A két törzs 60 percig tartó 0,2, 1,0 és 2,0 mM-os *t*-BuOOH kezelést követő túlélési arányát megvizsgálva azt kaptuk, hogy 25, 34 és 50%-kal (*hyd*$^+$) illetve 4, 12 és 20%-kal

(*hyd1-190*) csökkent sejtpopulációk telep-formáló képessége (**24/A és C ábrák**). A sejtek adaptációra való lehetőségeként alkalmazott, 60 percig tartó szubinhibitori (0,2 mM-os) *t*-BuOOH koncentrációval történő előkezelése, majd az ezt követő, szintén 1 órás 1,0 és 2,0 mM-os *t*-BuOOH kezelések a túlélés szignifikáns növekedését eredményezték a hyd^+ törzsnél, ellentétben a *hyd1-190*-es törzzsel (**24/B és D ábrák**).

2.3. A *t*-BuOOH-rezisztens törzs glicerin felvétele csökkent

A zsíroldékony glicerin felvétele élesztőkben passzív diffúzióval vagy aktív transzporttal (Na^+-glicerin kotranszporter, H^+-glicerin szimporter, akvaporinok) történhet (150), és normál körülmények között a hasznosítás sebességmeghatározó lépése a glicerin-kináz aktivitás. Viszont egyes mikroorganizmusokban kimutatták, hogy bizonyos körülmények között, melyek a sejtmembránok megváltozásával járnak, előfordulhat a glicerin-felvétel hatékonyságának zavara, megváltozása (136,151,152).



25. ábra: **Glükóz és különböző glicerin koncentrációjú tápoldatok (SM) hatása a *S. pombe* törzsek növekedésére.** Jelölések: hyd^+ (sötét szimbólumok), *hyd1-190* (világos szimbólumok). glükóz (■,□); 1 M glicerin (●,○); 2 M glicerin (▲,Δ). Reprezentatív ábra.

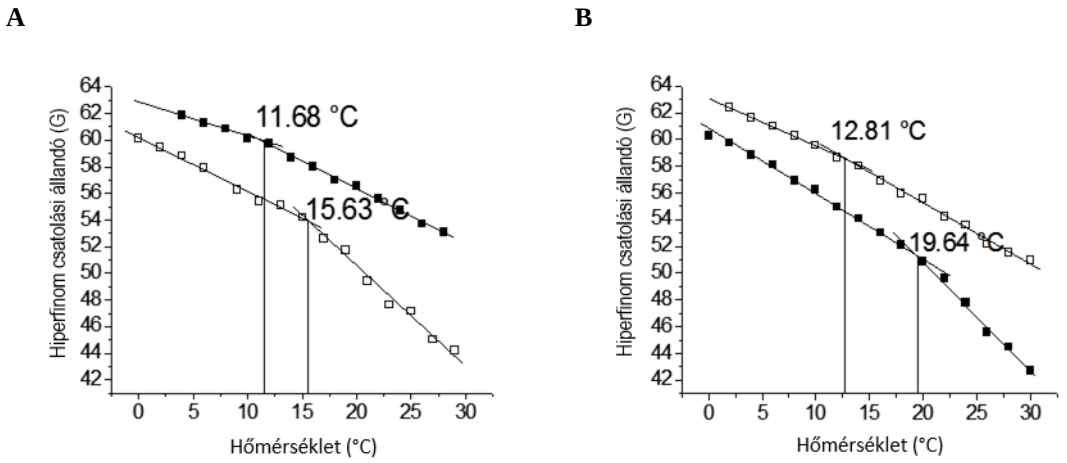
Glicerin asszimilációs vizsgálataink azt mutatták, hogy míg a két törzs között glükóz felhasználás tekintetében nem figyeltünk meg különbséget, addig a *t*-BuOOH-rezisztens

törzs glicerin felvétele csökkent a szülői törzshöz képest, a szülői törzsnél 25 órával többre volt szüksége, hogy belépjen a logaritmikus fázisba 1 M glicerint tartalmazó médiumban tenyésztve, annak ellenére, hogy a 48 órás tenyésztés végére a biomassza mennyiségek megegyeztek (**25. ábra**). Ez önmagában nem bizonyítja, hogy membrán-összetétel változás történt, de jó indikátora lehet.

2.4. A *t*-BuOOH-rezisztens törzs plazmamembránja emelkedett fázistranzíciós hőmérséklettel rendelkezik

A biológiai membránok dinamikus struktúrák, molekulái többféle mozgást végezhetnek, pl. rotációt (saját tengely körüli forgást) vagy a membrán síkjában is el tudnak mozdulni (laterális diffúzió, mely lipidek esetében jóval gyorsabb, mint a membránfehérjéknél). A zsírsav molekulák a membrán egyik rétegéből a másikba történő átfordulását flip-flop mozgásnak nevezzük, és meglehetősen ritka jelenség, emellett a zsírsavak zsírsavláncai is megtörhetnek, elhajolhatnak. Látható, hogy a membrán kvázi folyadékként viselkedik, fluiditást mutat. A membránnak ez a fluiditása elsősorban a lipidösszetételétől és a környezet hőmérsékletétől függ. A sok telített zsírsavláncot tartalmazó foszfolipid molekulák között erős kölcsönhatások alakulnak ki, míg a telítetlen zsírsavláncok a kettős kötés helyén kialakuló elhajlás miatt a szerkezet fellazulását okozzák, miáltal a membrán rendezetlenebb, „folyékonyabb” lesz. Ezzel szemben a merev szteránvázzal rendelkező molekulák (gombák esetében elsősorban az ergoszterin) és a membránfehérjék arányának növekedése merevebbé teszi a membránokat. Az élővilágban általános jelenség, hogy bizonyos élőlények alacsony hőmérsékleten sok telítetlen zsírsavláncot tartalmazó foszfolipidet építenek membránjaikba, ezzel biztosítva a normális működéshez szükséges fluiditást, hiszen a membrán fluiditása számos transzportfolyamat előfeltétele is. A membránok ezen molekuláris átrendeződését más környezeti körülmények, stresszorok is kiválthatják.

A két törzs plazmamembrán fázistranzíciós hőmérsékletét EPR spektroszkópiával határoztuk meg. A kísérletek során vegetatív sejtek helyett ozmotikusan stabilizált (0,6 M KCl) sejtfal-mentes protoplasztokat használtunk. A plamamamembrán ún. 2A'zz értékének meghatározásához használt spin-jelölő az 5-SASL (*5-DOXYL-stearic acid, free radical*) volt, mozgását 0-30°C hőmérséklet tartományban mérve (**26. ábra**).



26. ábra: Fázistranzíciós hőmérséklet meghatározása, reprezentatív ábra. A hőmérséklet (T) függvényében a hiperfinom csatolási állandó (G) alakulása az *S. pombe hyd*$^+$ (**A**) és *t*-BOOH-rezisztens mutánsa, a *hyd1-190* (**B**) tözsek esetében (jelölés: 5-SASL). Szimbólumok: ■ (**A, B**) kontroll; □ (**A, B**) *t*-BuOOH-kezelt (0,2 mM, 1 óra).

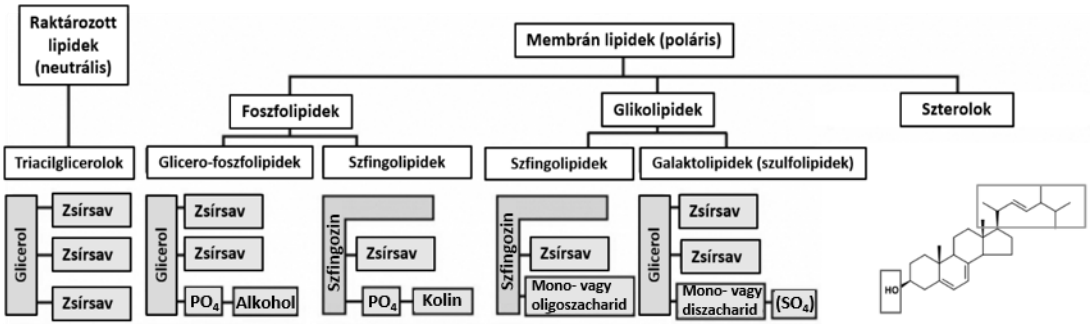
A molekulapróba rotációs és korrelációs idejét a 2A'zz érték (hiperfinom csatolási állandó) segítségével számoltuk. A lipid régió fluiditásának karakterizálása a membránba beéült spin-jelölt zsírsavak bukdácsoló mozgásának köszönhető. Ez a 2A'zz érték nem egyenes arányosan, de függ a hőmérséklettől, így egy jól definiált fázistranzíciós hőmérséklet következtethető. A fázistranzíciós hőmérséklet töréspontja a kezeletlen, vad típusú kontroll *S. pombe* sejtek esetén 11,68°C míg a *hyd1-190* tözs esetében 19,64°C (**26. ábra**) volt. 1 óra 0,2 mM *t*-BuOOH kezelést követően a fázistranzíciós hőmérsékletek az alábbiak szerint alakultak: a *hyd*$^+$ szülői törzs esetén 15,63°C, míg a *hyd1-190* törzs esetén 12,81°C. Ebből következik, hogy alapállapotban a rezisztens törzs membránja rigidebb, hiszen a gél-szol átmenet magasabb hőmérsékleten következik be (11,68°C vs. 19,64°C). Érdekes viszont, hogy alacsony koncentrációjú (0,2 mM), és

relatíve hosszú (1 óra) *t*-BuOOH kezelést követően a szülői törzs membránja rigidebbé vált (11,68°C → 15,63°C), ezzel szemben a *t*-BuOOH-rezisztens törzs membránja jóval "korábban" szol állapotba került (19,64 → 12,81°C), vagyis a kezelés hatására fluiditása jelentősen növekedett. Feltehetően eltérő molekuláris mechanizmusok vezettek a két törzs eltérő stressz-válaszaihoz.

2.5. A *t*-BuOOH hatása a zsírsav-összetételre és szterin tartalomra *hyd*$^+$ és *hyd1-190* törzsekben

A *hyd*$^+$ és *hyd1-190* törzsek késő-log fázisú (23 óra), kezeletlen tenyészeteiből készített lipid-extraktumokat vékonyréteg kromatográfiával szeparáltuk, majd gázkromatográfiával meghatároztuk a szterin és zsírsav komponenseket (**2-7. táblázat**). A szterin összetételben a két törzs egyes komponensei esetében mennyiségi változásokat figyeltünk meg. A *hyd1-190* törzs enyhe (7,8 %) emelkedést mutatott ergoszterin tartalomban, és körülbelül kétszeres növekedést a zimoszterin, fekoszterin, ergoszta-5,7-dienol és episzterin tartalomban, illetve kétszeres csökkenést a szkvalén, lanoszterin és 24-metilén-24,25-dihidrolanoszterin tartalomban (**2. táblázat**, kontroll oszlop).

Hogy megvizsgáljuk a *t*-BuOOH kezelésnek a lipid-összetételben (**27. ábra**) adódó következményeit, középlog fázisú tenyészeteket 8 órán keresztül kezeltünk szubinhibitori koncentrációjú (0,2 mM) *t*-BuOOH-dal a lipid extrakciót megelőzően. Ez a kezelés módosulásokat okozott a legtöbb szterin és zsírsav komponensben (**2-6. táblázat**) mindkét törzsnél.



27. ábra: Lipidek osztályozása. Forrás: Lehninger (5th) 10-7 ábra alapján (153).

Az azonosított zsírsavak száma (**27. ábra**) a teljes zsírsav tartalomban (*total fatty acids* = TFAs) 24, a poláris lipidekben (*polar lipids' fatty acids* = PLFAs) 17, triacilglicerinokban (*triacylglycerols' fatty acids* = TAGFAs) 10, és a szabad zsírsavakban (*free fatty acids* = FFAs) 5 (**3-6.táblázat**). A zsírsavösszetétel és a többszörösen/egyszeresen telítetlen/telített arányuk látható a **7. táblázat**ban. Az itt bemutatott eredmények prezentálják a *S. pombe* eddigi legrészletesebb zsírsavanalízisét. (*S. pombe*-ban a neutrális lipidek a citoszoltól elkülönülve, egyrétegű foszfolipid réteggel körülvett lipid-partikulumokban tárolódnak, a gyors mobilizálhatóság érdekében.)

A fő zsírsavak *S. pombe*-ban a palmitinsav (C16:0; 9,1–12,9 %), a sztearinsav (C18:0; 6,0–15,3 %) és az olajsav (C18:1-9c; 42,0–71.7 %) minden csoportban, kivéve a szabad zsírsavaknál. Szignifikáns különbséget kaptunk a zsírsavak mennyiségében a *hyd1-190* törzsben, összehasonlítva a *hyd*$^{+}$ szülői törzzsel, feltehetően a szterin összetétel módosulásának következményeképpen.

Szterinok	Kontroll		*t*-BuOOH-kezelt	
	hyd^{+}	*hyd1-190*	*hyd*$^{+}$	*hyd1-190*
Szkvalén	1.9	0.4 $^{\#\#\#}$	2.2 *	0.3 $^{++}$
Zimoszterin	0.2	0.5 $^{\#\#\#}$	0.1 ***	0.4 $^{++}$
Ergoszterin	78.1	84.7 $^{\#}$	76.1	82.3
Fekoszterin	0.9	2.5 $^{\#\#\#}$	2.4 ***	3.0 $^{++}$
Ergosta-5,7-dienol	0.2	0.4 $^{\#\#\#}$	0.4 **	0.5 $^{++}$
Episzterin	0.3	0.7 $^{\#\#\#}$	0.7 ***	0.6 $^{++}$
Lanoszterin	4.9	2.8 $^{\#\#}$	6.6 **	3.6 $^{++}$
24-metilén-24,25-dihidrolanoszterin	13.1	6.9 $^{\#\#}$	11.0 **	8.3 $^{++}$
Azonosítatlan	0.4	1.1 $^{\#\#\#}$	0.6 **	0.9 $^{++}$

2. táblázat: Szterin tartalom (%) *S. pombe* szülői törzs *hyd*$^{+}$ és *t*-BuOOH-rezisztens mutánsa, a *hyd1-190* esetében. A közép-log fázisú tenyészeteket 0,2 mM *t*-BuOOH-dal kezeltük 8 órán át. Szignifikancia: $^{\#,*,+}$5-15% különbség; $^{\#\#,**,++}$15-100% különbség; $^{\#\#\#,***,+++}$több, mint 100 % különbség.
Szignifikanciát az alábbiak között kalkuláltunk:
(i) $^{\#}$ *hyd*$^{+}$ és *hyd1-190* törzsek;
(ii) * *t*-BuOOH kezelt és kezeletlen *hyd*$^{+}$,
(iii) $^{+}$ *t*-BuOOH kezelt és kezeletlen *hyd1-190*.

Teljes zsírsav tartalom (TFA)	Kontroll		*t*-BuOOH-kezelt	
	hyd^{+}	*hyd1-190*	*hyd*$^{+}$	*hyd1-190*
8:0	0.2	0.2	0.1 **	0.2
10:0	1.6	1.7 $^{\#}$	1.2 **	2.1 $^{++}$
12:0	1.4	1.4	1.1 **	1.9 $^{++}$
14:0	0.4	0.4	0.4	0.5 $^{++}$
16:0	9.1	9.2	8.3 *	9.0
16:0-OH	1.5	1.1 $^{\#\#}$	2.5 **	2.6 $^{+++}$
16:1-9c	1.7	1.5 $^{\#}$	1.9 *	2.5 $^{++}$
18:0	7.8	7.4 $^{\#}$	6.3 **	8.7 $^{+}$
18:1-9t	ND	ND	0.1	0.1
18:1-11t	0.2	ND	ND	ND
18:1-9c	61.2	65.2 $^{\#}$	66.4 *	63.6
18:1-11c	ND	ND	ND	ND
18:2-9c,12c	5.5	7.6 $^{\#\#}$	3.4 **	1.9 $^{+++}$
18:2-t9,t11	0.2	0.2	0.5 ***	0.4 $^{++}$
18:2-t10,c12	0.2	0.2	ND	ND
18:3-6,9,12c	0.2	ND	ND	ND
20:0	0.2	ND	0.1 **	0.2
20:1-11c	0.2	0.2	0.3 **	0.3 $^{++}$
20:4-8,11,14,17c	ND	ND	ND	0.1
22:0	0.3	0.2 $^{\#\#}$	0.1 ***	0.2
22:1-13c	ND	ND	ND	0.1
22:5-7,10,13,16,19c	0.4	ND	0.6 **	0.8
22:6-4,7,10,13,16,19c	ND	ND	ND	0.1
24:0	0.9	0.7 $^{\#\#}$	1.0 *	1.4 $^{++}$

3. táblázat: A *S. pombe hyd*$^{+}$ és *t*-BuOOH-rezisztens mutánsa a *hyd1-190* összes zsírsav összetétele (TFA) %-ban, kontroll és *t*-BuOOH-kezelést (0,2 mM, 8 óra) követően. (ND – nem detektált; c–*cisz*; t–*transz*. Szignifikancia (ld. 2. táblázat): $^{\#,*,+}$ 5-15 % különbség; $^{\#\#,**,++}$ 15-100 % különbség; $^{\#\#\#,***,+++}$ több, mint 100 % különbség.)

A *t*-BuOOH-rezisztens *hyd1-190* törzs poláris lipidjeinek zsírsav tartalma 4,5 %-os növekedést mutatott a telítetlen/telített arányban, és 2,8 %-os csökkenést a többszörösen telítetlen/telített zsírsavak arányában (**7. táblázat**).

Összefoglalva, a kezeletlen és a kezelt késői-logaritmikus fázisú (23, illetve 15+8=23 óra) tenyészetek lipid extraktumából készített vékonyréteg kromatográfiát követően, a szterin és zsírsav komponenseket gázkromatográfiával határoztuk meg mindkét törzs esetében (**2-6. táblázatok**). A szterin-összetételben már a kezelés nélküli kontroll esetben is mennyiségi változás volt megfigyelhető a *hyd1-190* törzsnél a szülői törzshöz képest. Enyhe mértékben, 7,8%-kal növekedett az ergoszterin tartalma, körülbelül kétszeres növekedés volt megfigyelhető a zimoszterin, fekoszterin, ergosta-5,7-dienol és episzterin tartalomban, kétszeres csökkenés a szkvalén, lanoszterin és 24-metilén-24,25-dihidrolanoszterin tartalomban (**2. táblázat**).

Poláris lipidek zsírsavai (PLFA)	Kontroll		*t*-BuOOH-kezelt	
	hyd^{+}	*hyd1-190*	*hyd*$^{+}$	*hyd1-190*
8:0	ND	0.2	ND	0.1 $^{++}$
10:0	1.7	2.0 $^{\#\#}$	1.1 **	1.4 $^{++}$
11:0	0.5	0.4 $^{\#\#}$	0.4 **	0.2 $^{++}$
12:0	1.6	1.7 $^{\#}$	1.2 **	1.7
14:0	0.5	0.5	0.4 **	0.5
16:0	11.6	11.2	12.6 *	12.8 $^{+}$
16:0-OH	0.4	ND	0.3 **	0.6
16:1-9c	2.2	2.0 $^{\#}$	3.0 **	3.3 $^{++}$
18:0	6.0	5.1 $^{\#\#}$	4.0 **	5.6 $^{+}$
18:1-9t	ND	ND	0.2	0.2
18:1-9c	71.7	72.1	72.8	69.7
18:2-t9,t11	0.6	0.6	0.6	0.4 $^{++}$
20:1-11c	ND	ND	0.3	0.4
20:4-8,11,14,17c	0.3	ND	0.4 **	0.4
22:1-13c	ND	2.2	ND	0.9 $^{+++}$
24:0	0.4	ND	0.3 **	0.4

4. táblázat: A *S. pombe hyd*$^{+}$ és a *t*-BuOOH-rezisztens mutánsának a *hyd1-190* törzs poláris lipid zsírsavösszetétele (%) (PLFA) kontroll körülmények és *t*-BuOOH-kezelés után (0,2 mM, 8 óra). (ND – nem detektált; c–*cisz*; t–*transz*. Szignifikancia (ld. 2. táblázat): $^{\#,*,+}$ 5-15 % különbség; $^{\#\#,**,++}$ 15-100 % különbség; $^{\#\#\#,***,+++}$ több, mint 100 % különbség.)

Triacil-glicerin zsírsav összetétel (TAGFA)	Kontroll		*t*-BuOOH-kezelt	
	hyd^{+}	*hyd1-190*	*hyd*$^{+}$	*hyd1-190*
8:0	0.7	2.2 $^{\#\#\#}$	0.7	4.0 $^{++}$
10:0	3.0	4.4 $^{\#\#}$	2.3 **	5.1 $^{+}$
12:0	1.7	1.3 $^{\#\#}$	1.2 **	ND
14:0	ND	ND	0.5	ND
16:0	5.3	6.4 $^{\#\#}$	4.4 **	7.9 $^{++}$
16:1-9c	1.9	1.2 $^{\#\#}$	1.7 *	ND
18:0	15.3	17.8 $^{\#\#}$	7.0 ***	15.4 $^{++}$
18:1-9c	56.3	54.9	53.2 *	57.5
18:2-t9,t11	ND	ND	0.2	ND
24:0	1.3	ND	0.5 ***	ND

5. táblázat: A *S. pombe hyd*$^{+}$ és a *t*-BuOOH-rezisztens mutánsának a *hyd1-190* törzs triacil-glicerin zsírsavösszetétele (%) (TAGFA) kontroll körülmények és *t*-BuOOH-kezelés után (0,2 mM, 8 óra). (ND – nem detektált; c–*cisz*; t–*transz*. Szignifikancia (ld. 2. táblázat): $^{\#,*,+}$ 5-15 % különbség; $^{\#\#,**,++}$ 15-100 % különbség; $^{\#\#\#,***,+++}$ több, mint 100 % különbség.)

Szabad zsírsavak (FFA)	Kontroll		*t*-BuOOH-kezelt	
	hyd^{+}	*hyd1-190*	*hyd*$^{+}$	*hyd1-190*
8:0	ND	11.6	10.1	4.9 $^{+++}$
16:0	12.9	8.3 $^{\#\#}$	12.7	8.8 $^{+}$
16:1-9c	ND	ND	39.7	31.9
18:1-9c	42.0	34.7 $^{\#\#}$	ND	ND
18:2-9c,12c	ND	ND	ND	8.6

6. táblázat: A *S. pombe hyd*$^{+}$ és a *t*-BuOOH-rezisztens mutánsának a *hyd1-190* törzs szabad-zsírsav összetétele (%) (FFA) kontroll körülmények és *t*-BuOOH-kezelés után (0,2 mM, 8 óra). (ND – nem detektált; c–*cisz*; t–*transz*. Szignifikancia (ld. 2. táblázat): $^{\#,*,+}$ 5-15 % különbség; $^{\#\#,**,++}$ 15-100 % különbség; $^{\#\#\#,***,+++}$ több, mint 100 % különbség.)

		Kontroll		*t*-BuOOH-kezelt	
		hyd^{+}	*hyd1-190*	*hyd*$^{+}$	*hyd1-190*
TFA	telített	22.8	21.5 $^{\#}$	19.4 **	24.5 $^{+}$
	telítetlen	72.9	75.8	76.3	70.9 $^{+}$
	telítetlen /telített	3.2	3.5 $^{\#}$	3.9 **	2.9 $^{++}$
	többszörösen telítetlen /telített	0.3	0.4 $^{\#\#}$	0.2 **	0.1 $^{+++}$
	ismeretlen	1.0	0.8 $^{\#\#}$	0.8 **	0.9 $^{+}$
PLFA	telített	22.4	21.6	20.3 *	23.2 $^{+}$
	telítetlen	76.7	77.6	79.6	75.8
	telítetlen /telített	3.4	3.6 $^{\#}$	3.9 *	3.2 $^{+}$
	többszörösen telítetlen /telített	0.03	0.03	0.05 **	0.04 $^{++}$
	ismeretlen	4.4	2.3 $^{\#\#}$	4.3	4.5 $^{++}$
TAGFA	telített	31.0	34.9 $^{\#}$	22.2 **	33.4
	telítetlen	66.9	65.1	76.9 *	67.4
	telítetlen /telített	2.2	1.9 $^{\#\#}$	3.5 **	2.0 $^{+}$
	többszörösen telítetlen/telít ett	ND	ND	0.01	ND
	ismeretlen	2.4	0.0 $^{\#\#\#}$	0.9 ***	0.0
FFA	telített	26.5	24.1 $^{\#}$	26.2	26.1 $^{+}$
	telítetlen	73.5	75.7	73.8	73.9
	telítetlen /telített	2.8	3.1 $^{\#}$	2.8	2.8 $^{+}$
	többszörösen telítetlen /telített	ND	ND	ND	0.3
	ismeretlen	0.0	0.0	0.0	0.0

7. táblázat: A *S. pombe hyd*$^{+}$ és a *t*-BuOOH-rezisztens mutánsának a *hyd1-190* törzs telítetlen/telített és többszörösen telítetlen/telített zsírsavainak aránya a különböző preparátumokban kontroll körülmények és *t*-BuOOH-kezelés után (0,2 mM, 8 óra). Total lipid zsírsavak (TFA), poláris lipidek zsírsavai (PLFA), triacil-glicerinok zsírsavai (TAGFA) and szabad zsírsavak (FFA).
(ND – nem detektált. Szignifikancia (ld. 2. táblázat): $^{\#,*,+}$ 5-15 % különbség; $^{\#\#,**,++}$ 15-100 % különbség; $^{\#\#\#,***,+++}$ több, mint 100 % különbség.)

A legkifejezettebb változások *t*-BuOOH-kezelés hatására a *hyd*$^+$ szülői törzs szterin összetételében történtek, pl. több mint 100 %-kal nőtt a zimoszterin, fekoszterin, ergoszta-5,7-dienol és az episzterin mennyisége (**2. táblázat**). Ezek a szterin kompozícióban bekövetkezett mennyiségi változások megjelennek a zsírsavak mennyiségi változásában is, különösen a poláris lipid-zsírsavakéban (PLFA).
A *hyd*$^+$ nyolc, míg a *hyd1-190* hat komponensének mennyisége változott szignifikánsan (**2-6. táblázat**). A többszörösen telítetlen és a telített PL-zsírsavak aránya szintén szignifikánsan növekedett mindkét törzsben (**7. táblázat**).

2.6. A *t*-BuOOH eukarióta sejtmembránra kifejtett hatásának megvitatása egy *t*-BuOOH-rezisztens és annak szülői *S. pombe* törzse esetében

A *Candida albicans AF06*-os *t*-BuOOH-toleráns mutánsát Fekete és munkatársai izolálták és karakterizálták (100), és az általunk leírtakhoz hasonlóan, a mutáció náluk sem befolyásolta a növekedési rátát vagy a sejtméretet, viszont a mutánsuk toleranciája nem csak *t*-BuOOH-dal szemben nőtt meg, hanem Amfotericin-B antibiotikummal szemben is, ami azt sejteti, hogy ez egy nem-allélikus mutáció (154), a miénkhez hasonlóan. Inoue és munkatársai leírták (155), hogy a *Saccharomyces cerevisiae* egy transzformánsában egy azonosítatlan oxidatív stressz rezisztencia gén amplifikációja *t*-BuOOH és más lipid-peroxidokra rezisztenciát/keresztrezisztenciát indukált. A már korábban izolált *C. albicans erg-12* törzs egy ergoszterin bioszintézisben mutáns típus, amelyben csak az ergoszterin biszintézis prekurzorainak mennyisége módosult, így a plazmamembrán 6,6 %-kal kevesebb ergoszterint tartalmaz, ami mégis kétszeres Amfotericin-B-rezisztenciát okoz.
A szterinok egyik legfontosabb funkciója a biológiai membránokban, hogy keményítsék a membránstruktúrát a folyadék-kristályos fázisban. A koleszterin mikroviszkozitási indexe foszfolipid keverékekben 12,1, míg ez az érték önálló foszfolipidek és zsírsavak esetén 37°C-os hőmérsékleten 3,4-0,1-ig terjed (156). A szterin komponensek aránya alapvetően meghatározza a membránok fluiditását. Íly módon a szterin komponensek mennyiségi változásának eredményezni kellene a zsírsavak adaptív változását annak

érdekében, hogy a biofizikai paraméterek és a plazmamembrán biológiai funkciója megfelelő maradjon.

Az adatok azt sugallják, hogy a mutáció, amely a *hyd1-190* mutáns kialakulásához vezetett, lehetséges, hogy az ergoszterin bioszintézis vagy reguláció génjeinek egyikét érinti, egy adaptív átalakulást eredményezve a plazmamembrán zsírsavösszetételében (**3-7. táblázat**), tükrözve a megváltozott egyszeresen-többszörösen telítetlen/telített zsírsavak arányának változását. Megfigyeléseink összhangban vannak 7 ergoszterin-mutáns *C. albicans* törzsnél megfigyelt jelenségekkel, ahol a csökkent mennyiségű, vagy hiányzó ergoszterin korrelált egy emelkedett szaturációs szinttel, és a zsírsav láncok hosszúságának csökkenésével (157).

Bár, a mutáns *hyd1-190* sejtek enyhén (7,8 %-kal) túlkompenzálják ergoszterint és a változó mennyiségű szterin intermediereket (**2. táblázat**), mégis a fázis-tranzíciós hőmérséklet töréspontja a kezeletlen kontroll *hyd1-190* sejteknél még mindig 7,96°C-kal magasabb (fluidabb), mint a szülői hyd^+ sejtek esetében. Ezek az eredmények jól egybevágnak a korábban (157) egy *Candida albicans erg-12* ergoszterin-szintézisben mutáns törzsnél találtakkal. Mivel mind az egyszeresen, mind a többszörösen telítetlen zsírsavak alanyai lehetnek a lipidperoxidációnak, több más mellett akár a *hyd1-190* törzs zsírsav-összetételében történő változás is okozhatja, hogy magasabb fenotipikus rezisztenciával rendelkezik a szülői törzshöz képest (**24. ábra, 1. táblázat**). Ezek a jelenségek lehetnek az okai annak, hogy a *hyd1-190*-es törzs plazmamembránja megváltozott, egyetértésben a *C. albicans*-on tett korábbi megfigyelésekkel (136,158). A fenti eredmények alapján azt a következtetést vonnánk le, hogy a plazmamembrán összetételének megváltozása miatt a felvételi ("*uptake*") folyamatok is megváltoztak, hiszen ezek a membrán összetételétől függenek, ennélfogva az asszimilálható szénforrás, a glicerin felvételében látható változások oka is ez lehet (136,152).

Yarrowia lipolytica élesztőben a linolsav-hidroperoxid (a C18:3 peroxidáció egy terméke) kezelés növeli a membrán fluiditását, bár nem határoztak meg a plazmamembrán összetételében változást (159).

Korábbi megfigyeléseinkkel ellentétben a *t*-BuOOH-kezelés nem csak fluidizáló hatást okozhat (*hyd1-190* esetében), hanem rigidizálót is (szülői törzs esetében), feltehetően a

plazmamembrán összetétel megváltozása miatt. A humán eredetű U937 monocita sejtvonal *t*-BuOOH-val történő kezelése a plazmamembrán csökkent fluiditását eredményezte, dózis- és időfüggő módon, egyúttal valószínűsítve, hogy a lipoperoxidatív károsodás lehet a fő oka a monociták károsodásának atheroszklerózisban (a membrán összetételét ebben az esetben nem vizsgálták) (160).

A *hyd1-190* sejteknél megfigyelt adaptációs hiba *t*-BuOOH-dal szemben – ellentétben a hyd^+ szülői törzzsel – nem volt megfigyelhető a *S. pombe chr1-66T* króm-toleráns mutáns esetében sem (161). Ez egy következménye lehet a *hyd1-190* törzs kiegyensúlyozatlan redox állapotának, összevetve a korábban említett *C. albicans t*-BuOOH-toleráns mutánsával, de további kísérletek szükségesek, hogy megerősítsék ezeket a feltételezéseket. Hasonló adaptációs kísérleteket *t*-BuOOH-rezisztens/toleráns *S. cerevisiae*-vel és *C. albicans*-szal nem végeztek.

Összefoglalva, a *hyd1-190* törzsben rezisztenciát okozó mutáció miatt a szterin összetételben történt mennyiségi, és a plazmamembrán zsírsavösszetételében bekövetkező változások, ellentétben a hyd^+ szülői törzzsel, eredményezhették az Amfotericin-B-vel szemben megnövekedett érzékenységet, egy emelkedett fázis-tranzíciós hőmérsékletet, és glicerin-felvétel képességének csökkenését is. A mutáns és a szülői törzs két generációs időn keresztüli szubinhibítori *t*-BuOOH koncentrációval történő kezelése adaptációt indukált a membránösszetételben, mely visszaköszön a plazmamembrán módosult biofizikai paramétereiben (pl. hiperfinom csatolási állandó és fázistranzíciós hőmérsékletek), de fenotípusos adaptáció *t*-BuOOH-dal szemben csak a szülői, hyd^+ törzsnél volt megfigyelhető.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

1. Korábbi irodalmi adatok alapján valószínűsítettük, hogy a rezveratrol ismert NF-κB aktivációt gátló hatását nem az IKK aktivációjának gátlásán keresztül fejti ki, mely aktiváció makrofágokban két egymástól független útvonalon is megtörténhet: egy MyD88-függő és egy TRIF-függő útvonalon. Továbbá feltételeztük, hogy ezen jelátviteli utak között szoros kölcsönhatás állhat fenn, melyek között a kapcsolat a TRAF6 fehérje lehet, mely mindkét útvonalban való részvételével hozzájárulhat az NF-κB aktiválásához, így a rezveratrol potenciális támadáspontja lehet a gyulladásos jelátvitelben. Munkánkban, az LPS-jelátvitele során azonosítottuk a TRAF6-ot, mint a rezveratrol funkcionális támadáspontját, eredményeink szerint a rezveratrol gátolta a *traf6* gén expresszióját, gátolta a TRAF6 fehérjék auto-poli-ubikvitiniációval történő aktiválódását, és a TRAF6 által aktivált MAP kináz (kivéve ERK) és Akt útvonalakat is. Összhangban a korábbi kutatásokkal, alátámasztottuk a TRIF és TRAF6 közötti jelátviteli kapcsolat lehetőségét, ezáltal új megvilágításba helyeztük a rezveratrol lehetséges molekuláris szerepét az anti-inflammatorikus folyamatokban.

2. A *S. pombe* eukarióta hasadóélesztő oxidatív stressz okozta membránkárosodásainak vizsgálata során kimutattuk, hogy a *hyd1-190* törzsben *t*-BuOOH rezisztenciát okozó mutáció miatt bekövetkező, a plazmamembrán szterin- és zsírsavösszetételében történt mennyiségi és minőségi változások eredményezhettek egy Amfotericin-B-vel szemben megnövekedett érzékenységet, egy emelkedett fázis-tranzíciós hőmérsékletet a membrán szol-gél állapotát tekintve, illetve okozhatták a glicerin-felvétel képességének csökkenését is. Vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a két generációs időn keresztüli szubinhibítori *t*-BuOOH koncentrációval történő előkezelés adaptációt indukálhat a membránösszetételben, mely visszaköszön a plazmamembrán módosult biofizikai paramétereiben, de a fenotípusos adaptáció *t*-BuOOH-dal

szemben nem feltétlen jár ezzel együtt, hisz az csak a szülői, *hyd*$^{+}$ törzsnél volt megfigyelhető. Az adatok azt sugallják, hogy a mutáció, amely a *hyd1-190* mutáns kialakulásához vezetett, lehetséges, hogy az ergoszterin bioszintézis vagy reguláció génjeinek egyikét érinthette, egy adaptív átalakulást eredményezve a plazmamembrán zsírsavösszetételében, tükrözve a megváltozott egyszeresen-többszörösen telítetlen/telített zsírsavak arányának változását, de ennek bizonyítására genetikai vizsgálatokra volna szükség. Emellett munkánk tartalmazza a *Schizosaccharomyces pombe* élesztő eddigi legrészletesebb szterin- és zsírsav analízisét.

IX. MELLÉKLETEK

1. Felhasznált vegyszerek, enzimek és antitestek

Anti-Akt antibody	Cell Signaling Technology
Anti-GAPDH	Millipore
Anti-p38 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-p44/42 antibody (ERK)	Cell Signaling Technology
Anti-phospho-Akt antibody	Cell Signaling Technology
Anti-phospho-p38 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-phospho-p44/42 antibody	Cell Signaling Technology
Anti-phospho-SAPK/JNK antibody	Cell Signaling Technology
Anti-SAPK/JNK antibody	R&D Systems
Anti-TRAF6 antitest	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Ubiquitin	Cell Signaling Technology
BioMag anti-rabbit magnetic bead	Polysciences Inc.
BioRad DC Protein Assay	Bio-Rad
DNase I, RNase-free	Fermentas
Dulbecco's modified Eagle's medium	Sigma-Aldrich
Fetal calf serum (FCS)	Gibco
Immobilon Western	Millipore
IQ SYBR Supermix	Bio-Rad
L-Glutamine	Sigma-Aldrich
LPS from *Escherichia coli*	Sigma-Aldrich
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	Fermentas
Oligo$(dT)_{18}$ primer	Fermentas
Pen Strep; Penicillin-Streptomycin, liquid	Gibco
Phosphatase inhibitor cocktail	Sigma-Aldrich
Protease inhibitor cocktail	Sigma-Aldrich
Resveratrol	Sigma-Aldrich
RevertAid Reverse Transcriptase First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas
Secondary horseradish-peroxidase-conjugated anti-mouse antibody	Sigma-Aldrich
Secondary horseradish-peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody	Bio-Rad
SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate	Pierce Chemical
TRIzol	Invitrogen

2. Oldatok

DMEM-tápoldat (500 ml)

DMEM (endotoxin tested)	445 ml
FCS (steril)	50 ml
200 mM L-glutamin (sterilre szűrve)	10 ml
Pen Strep (sterilre szűrve)	5 ml

Lízis puffer (100 ml)

HEPES	1,19 g
NaCl	0,8766 g
glicerin	10 ml
Tween-20	100 µl
EGTA	0,0951 g
EDTA	0,0372 g
Na_3VO_4	0,00183 g
DTT (1,4-Dithiothreitol) (frissen)	0,1542 g
PMSF (fenil-metil-szulfonil-fluorid) (frissen)	1:200
proteáz inhibitor koktél (frissen)	1:200
pH	7,4

4× mintapuffer (10 ml)

Glicerin	4 ml
10%-os SDS-oldat	2 ml
Merkaptoetanol	1 ml
1 M TRIS, pH 8,0	0,2 ml
0,5 M EDTA	45 µl
Desztillált víz	2,755 ml

Akrilamid oldat (100 ml)

Akrilamid	30 g
N,N'-metilén-bisz-akrilamid	0,8 g
Desztillált víz	100 ml-re

Separating gél puffer (300 ml)

TRIS	54,45 g
SDS	0,2 g
Desztillált vízzel	300 ml-re
pH	8,8

Stacking gél puffer (200 ml)

TRIS	12 g
SDS	0,8 g
Desztillált vízzel	200 ml-re
pH	6,8

SDS poliakrilamid alsó gél (2 db; 1 mm-es mini protean)	**10 %**	**12%**
Desztillált víz	5 ml	4,28 ml
Akrilamid oldat	4 ml	4,8 ml
Separating gél puffer	3 ml	3 ml
10%-os $(NH_4)_2S_2O_8$-oldat (APS)	40 µl	44 µl
TEMED	12 µl	13,5 µl
pH	8,8-9,0	8,8-9,0

SDS poliakrilamid felső gél (2 db; 1 mm)

Desztillált víz	5 ml
Akrilamid oldat	4 ml
Stacking gél puffer	3 ml
10%-os $(NH_4)_2S_2O_8$-oldat (APS)	40 µl
TEMED	12 µl
PH	6,5-6,8

Futtató puffer (1000 ml)

Glicin	28,8 g
TRIS	6 g
SDS	1 g
Desztillált víz	1000 ml-re

Semi-dry blottoló puffer (500 ml)

Glicin	7,2 g
TRIS	1,5 g
Metanol	100 ml
Desztillált víz	500 ml-re
pH	8,1-8,3

Gélfestő oldat (70 ml)

Coomassie Brillant Blue festék	0,5 g
Koncentrált ecetsav	10 ml
Izopropanol	30 ml
Desztillált víz	30 ml

DESTAIN (festék eltávolító) oldat (975 ml)

Metanol	165 ml
Koncentrált ecetsav	10 ml
Desztillált víz	800 ml

„A" mosópuffer	**„B" mosópuffer**	**„C" mosópuffer**
20 mM TRIS	20mM TRIS	5mM TRIS
150mM NaCl	150 mM NaCl	pH 7,4
1% TRITON-X 100	pH 7,4	
pH 7,4		

TBS (10X) (1000 ml)
24 g Tris base
88 g NaCl
900 ml desztillált víz
pH 7.6 (12 N HCl-dal)
1000 ml végtérfogatra tölteni

TBST (*Tris-buffered saline* + 0,1% Tween 20) (1000 ml)
100 ml TBS 10x
900 ml desztillált víz
1 ml Tween 20

3. Mikroorganizmusok

Lab. kód	Törzsek	Eredet
190 *hyd*$^{+}$	*Schizosaccharomyces pombe (ura4D18, h*$^{-}$*)*	Genetikai és Molekuláris Biológia Tanszék, Természettudományi Kar, Debreceni Egyetem
361 *hyd1-190*	*Schizosaccharomyces pombe (ura4D18, h*$^{-}$*)*	Növekvő *t*-BuOOH koncentráció jelenlétében szaporodó 190-es törzsből

4. Táptalajok, tápoldatok

A táptalajok a tápoldattal szemben 2% agart is tartalmaznak, pH = 5,5.

Komplett tápoldat (YEL/YEA, *yeast extract liquid/agar*):
3 % glükóz
0.5 % élesztőkivonat
100 µg ml^{-1} uracil
pH: 4,5

Minimál tápoldat (SM, *selective minimal*)
1 % glükóz
0.5 % $(NH_4)_2SO_4$
0.1 % KH_2PO_4
0.05 % Mg_2SO_4 x $7H_2O$
100 µg ml^{-1} uracil
pH: 4,5

Wickerham féle vitaminkeverék
0,2 mg fólsav
0,2 mg biotin
40,0 mg Ca-pantotenát
200,0 mg inozitol
40,0 mg nikotinsav
20,0 mg p-aminobenzoesav
40,0 mg piridoxin.HCl
40,0 mg tiamin.HCl
20,0 mg riboflavin
100 ml desztillált vízben oldva

Spóráztató táptalaj (SPA)
0,1 % KH2PO4
1 % glükóz
1 ml/l vitaminkeverék (Wickerham féle)
2 % agar

Protoplasztáló enzimoldat
2 mg/ml *Trichoderma harsianum* enzim preparátum
0,6 M szorbitolban oldva (Lysing enzyme – Sigma)

Na - Hepes puffer	(1000 ml)
5,5 mM glükóz	1,062 g
10 mM Hepes	1,191 g
150 mM NaCl	4,38 g
1 mM KCl	0,037 g
100 μg/ml	0,1 g
pH: 7,4	

X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A PTE Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében végzett kutatások tekintetében programvezetőmnek, **Prof. Dr. Sümegi Balázs**nak, társtémavezetőmnek, **Veres Balázs**nak (PhD), és a "*Septic Shock Team"* összes tagjának, különösen **Antus Csengé**nek (PhD) és **Jakus Péter**nek (PhD) szeretném megköszönni a munkában nyújtott minden segítséget és támogatást.

A PTE Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Általános és Környezeti Mikrobiológia Tanszékén végzett kísérletek tekintetében mindenképpen szeretném megköszönni **Prof. Dr. Pesti Miklós** társtémavezetőmnek, és szerzőtársamnak, **Gazdag Zoltán**nak (PhD) a munkában nyújtott segítséget, támogatást és iránymutatást.

Külön kiemelve szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Belágyi József**nek (PTE ÁOK, Biofizikai Intézet, EPR mérések), aki nélkülözhetetlen szakmai tanácsaival, önzetlen támogatásával, töretlen jókedvével szintén hozzájárult szakmai fejlődésemhez és a sikeres munkához.

Köszönet illeti a pozsonyi Technológiai Egyetem, Biokémiai Technológiai Intézetéből doc. Ing. **Milan Čertík** (PhD) professzort, akivel kollaborációban végezte Gazdag Zoltán szerzőtársam a szterin- és zsírsav analízishez szükséges gázkromatográfiás méréseket, illetve **Samy Selim**nek (PhD) a tetrádanalízis vizsgálatokért.

Szeretném kifejezni hálámat családomnak, és mindazoknak, akik bármilyen módon segítségemre voltak a dolgozat elkészítésében, ugyanis az ilyen kutatások sohasem egy ember munkáját tükrözik, hanem a szerzőtársakét, sőt asszisztensekét is.

Sokukkal az együtt töltött évek során barátokká lettünk, így köszönök mindent többek között **Horváth Eszter**nek (PhD), **Virág Eszter**nek (PhD), dr. med. **Fónai Fruzsiná**nak, akik nem csak barátságukkal tüntettek ki, hanem sok hasznos szakmai tanáccsal is.

Szeretném megköszönni a segítségét az itt név szerint fel nem sorolt személyeknek is, akik segítségemre voltak az évek során.

A kutatások során az alábbi forrásokat használtuk fel: OTKA: K-73738, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0029 és 34039/ÁOK-KA-OTKA/11-20, illetve: PL-15/2009, VEGA 1/0975/12, APVV-0662-11 és VVCE-0064-07.

XI. IRODALOMJEGYZÉK

1. Rudiger A, Stotz M, Singer M. Cellular processes in sepsis. Swiss Med Wkly. 2008 Nov 1;138(43–44):629–34.

2. Matot I, Sprung CL. Definition of sepsis. Intensive Care Med. 2001;27 Suppl 1:S3-9.

3. [Internet]. [cited 2016 Jul 6]. Available from: http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/bacpath/diseases/blood/septicemia.html

4. Bochud PY, Glauser MP, Calandra T, International Sepsis Forum. Antibiotics in sepsis. Intensive Care Med. 2001;27 Suppl 1:S33-48.

5. Marschall J, Agniel D, Fraser VJ, Doherty J, Warren DK. Gram-negative bacteraemia in non-ICU patients: factors associated with inadequate antibiotic therapy and impact on outcomes. J Antimicrob Chemother. 2008 Jun;61(6):1376–83.

6. Wiggers JB, Xiong W, Daneman N. Sending repeat cultures: is there a role in the management of bacteremic episodes? (SCRIBE study). BMC Infect Dis [Internet]. 2016 Jun 13 [cited 2016 Jul 6];16. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4906775/

7. Colombo AL, Perfect J, DiNubile M, Bartizal K, Motyl M, Hicks P, et al. Global Distribution and Outcomes for Candida. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003 Jul 23;22(8):470–4.

8. El-Solh AA, Sikka P, Ramadan F, Davies J. Etiology of Severe Pneumonia in the Very Elderly. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Mar 1;163(3):645–51.

9. Reglinski M, Sriskandan S. The contribution of group A streptococcal virulence determinants to the pathogenesis of sepsis. Virulence. 2014 Jan 1;5(1):127–36.

10. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016 Feb 23;315(8):801–10.

11. ANESZTSepsis_IE.pdf [Internet]. [cited 2016 Dec 15]. Available from: http://www.kk.pte.hu/docs/protokollok/ANESZTSepsis_IE.pdf

12. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Intensive Care Med. 2003 Apr;29(4):530–8.

13. Immunológia|Digitális Tankönyvtár [Internet]. [cited 2016 Jul 6]. Available from: http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_524_Immunologia/adatok.html

14. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992 Jun;101(6):1644–55.

15. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai irányelve Táplálás az intenzív terápiában. Készítette: Az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Szakmai Kollégium [Internet]. [cited 2016 Jul 6]. Available from: http://docplayer.hu/1909996-Az-egeszsegugyi-miniszterium-szakmai-iranyelve-taplalas-az-intenziv-terapiaban-keszitette-az-aneszteziologiai-es-intenziv-terapias-szakmai-kollegium.html

16. Hunter P. Sepsis under siege: A new understanding of sepsis might lead to the development of therapies to treat septic shock. EMBO Rep. 2006 Jul;7(7):667–9.

17. Ulloa L, Tracey KJ. The “cytokine profile”: a code for sepsis. Trends Mol Med. 2005 Feb;11(2):56–63.

18. Akova M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. Virulence. 2016 Apr 2;7(3):252–66.

19. Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság On-line [Internet]. [cited 2016 Jul 13]. Available from: http://www.infektologia.hu/folyoirat.aspx?web_id=&tmi=0&f=1&an=1075

20. Akira S. Toll-like receptor signaling. J Biol Chem. 2003 Oct 3;278(40):38105–8.

21. Jelátvitel (Orvosi biotechnológia)|Digitális Tankönyvtár [Internet]. [cited 2016 Jul 12]. Available from: http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Jelatvitel_hu_book/index.html

22. Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. J Endocrinol. 2007 Jun;193(3):323–30.

23. Lipopolysaccharides [Internet]. Sigma-Aldrich. [cited 2016 Jul 12]. Available from: http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/lipopolysaccharides.html

24. Medical Microbiology 18th Edition (Jawetz, Melnick, & Adelberg’s Medical Microbiology): Amazon.co.uk: JAWETZ: 9780838584248: Books [Internet].

[cited 2016 Jul 8]. Available from: https://www.amazon.co.uk/Medical-Microbiology-Jawetz-Melnick-Adelbergs/dp/0838584241

25. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. Annu Rev Biochem. 2002;71:635–700.

26. Funahara Y, Nikaido H. Asymmetric localization of lipopolysaccharides on the outer membrane of Salmonella typhimurium. J Bacteriol. 1980 Mar;141(3):1463–5.

27. Medical Microbiology @ DigitalProteus.com [Internet]. [cited 2016 Jul 8]. Available from: http://micro.digitalproteus.com/morphology2.php

28. Polissi A, Sperandeo P. The Lipopolysaccharide Export Pathway in Escherichia coli: Structure, Organization and Regulated Assembly of the Lpt Machinery. Mar Drugs. 2014 Feb 17;12(2):1023–42.

29. Mühlradt PF, Wray V, Lehmann V. A 31P-Nuclear-Magnetic-Resonance Study of the Phosphate Groups in Lipopolysaccharide and Lipid A from Salmonella. Eur J Biochem. 1977 Nov 1;81(1):193–203.

30. Stock JB, Rauch B, Roseman S. Periplasmic space in Salmonella typhimurium and Escherichia coli. J Biol Chem. 1977 Nov 10;252(21):7850–61.

31. Lynn WA. Anti-endotoxin therapeutic options for the treatment of sepsis. J Antimicrob Chemother. 1998 Jan;41 Suppl A:71–80.

32. Mancilla M. Smooth to Rough Dissociation in Brucella: The Missing Link to Virulence. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2016 Jan 5 [cited 2016 Jul 12];5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4700419/

33. Lukáčová M, Barák I, Kazár J. Role of structural variations of polysaccharide antigens in the pathogenicity of Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. 2008 Mar;14(3):200–6.

34. Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. Lab Invest. 2005 Nov 7;86(1):9–22.

35. Steimle A, Autenrieth IB, Frick J-S. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. Int J Med Microbiol [Internet]. [cited 2016 Jul 12]; Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422116300169

36. Molteni M, Gemma S, Rossetti C. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. Mediators Inflamm. 2016;2016:6978936.

37. Anderson KV, Bokla L, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. Cell. 1985 Oct;42(3):791–8.

38. Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine. 2008 May;42(2):145–51.

39. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M-Y, Huffel CV, Du X, et al. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. Science. 1998 Dec 11;282(5396):2085–8.

40. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin. Immunity. 1999 Jul 1;11(1):115–22.

41. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. Nature. 2002 Nov 21;420(6913):324–9.

42. Carty M, Goodbody R, Schröder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. Nat Immunol. 2006 Oct;7(10):1074–81.

43. Chandra R, Federici S, Bishwas T, Németh ZH, Deitch EA, Thomas JA, et al. IRAK1-dependent signaling mediates mortality in polymicrobial sepsis. Inflammation [Internet]. 2013 Dec [cited 2016 Jul 13];36(6). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3823648/

44. Besse A, Lamothe B, Campos AD, Webster WK, Maddineni U, Lin S-C, et al. TAK1-DEPENDENT SIGNALING REQUIRES FUNCTIONAL INTERACTION WITH TAB2/TAB3. J Biol Chem. 2007 Feb 9;282(6):3918–28.

45. Lamothe B, Besse A, Campos AD, Webster WK, Wu H, Darnay BG. SITE-SPECIFIC LYS-63-LINKED TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR-ASSOCIATED FACTOR 6 AUTO-UBIQUITINATION IS A CRITICAL DETERMINANT OF IKK ACTIVATION. J Biol Chem. 2007 Feb 9;282(6):4102–12.

46. Lamothe B, Campos AD, Webster WK, Gopinathan A, Hur L, Darnay BG. The RING Domain and First Zinc Finger of TRAF6 Coordinate Signaling by Interleukin-1, Lipopolysaccharide, and RANKL. J Biol Chem. 2008 Sep 5;283(36):24871–80.

47. Lamothe B, Webster WK, Gopinathan A, Besse A, Campos AD, Darnay BG. TRAF6 Ubiquitin Ligase is Essential for RANKL Signaling and Osteoclast Differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Aug 10;359(4):1044–9.

48. Lin S-C, Chung JY, Lamothe B, Rajashankar K, Lu M, Lo Y-C, et al. Molecular Basis for the Unique De-ubiquitinating Activity of the NF-κB Inhibitor A20. J Mol Biol. 2008 Feb 15;376(2):526–40.

49. TRAF6 TNF receptor associated factor 6 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2016 Jul 28]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7189

50. Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, et al. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like Receptor 4. Cell. 2011 Nov 11;147(4):868–80.

51. Rajaiah R, Perkins DJ, Ireland DDC, Vogel SN. CD14 dependence of TLR4 endocytosis and TRIF signaling displays ligand specificity and is dissociable in endotoxin tolerance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jul 7;112(27):8391–6.

52. Youn HS, Lee JY, Fitzgerald KA, Young HA, Akira S, Hwang DH. Specific Inhibition of MyD88-Independent Signaling Pathways of TLR3 and TLR4 by Resveratrol: Molecular Targets Are TBK1 and RIP1 in TRIF Complex. J Immunol. 2005 Sep 1;175(5):3339–46.

53. Cusson-Hermance N, Khurana S, Lee TH, Fitzgerald KA, Kelliher MA. Rip1 Mediates the Trif-dependent Toll-like Receptor 3- and 4-induced NF-κB Activation but Does Not Contribute to Interferon Regulatory Factor 3 Activation. J Biol Chem. 2005 Nov 4;280(44):36560–6.

54. Wertz IE, Dixit VM. Signaling to NF-κB: Regulation by Ubiquitination. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 Mar 1;2(3):a003350.

55. Antus_Csenge_PhD_dolgozat.pdf [Internet]. [cited 2016 Nov 3]. Available from: http://aok.pte.hu/docs/phd/file/dolgozatok/2016/Antus_Csenge_PhD_dolgozat.pdf

56. Wu GS. Role of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in cancer. Cancer Metastasis Rev. 2007 Dec 1;26(3–4):579–85.

57. Bozinovski S, Jones JE, Vlahos R, Hamilton JA, Anderson GP. Granulocyte/Macrophage-Colony-stimulating Factor (GM-CSF) Regulates Lung Innate Immunity to Lipopolysaccharide through Akt/Erk Activation of NFκB and AP-1 in Vivo. J Biol Chem. 2002 Nov 8;277(45):42808–14.

58. Luyendyk JP, Schabbauer GA, Tencati M, Holscher T, Pawlinski R, Mackman N. Genetic Analysis of the Role of the PI3K-Akt Pathway in Lipopolysaccharide-Induced Cytokine and Tissue Factor Gene Expression in Monocytes/Macrophages. J Immunol Baltim Md 1950. 2008 Mar 15;180(6):4218–26.

59. Keyse SM. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. Curr Opin Cell Biol. 2000 Apr 1;12(2):186–92.

60. Matsumoto H, Shimada J, Nagasaka H, Matsumoto I, Hashimoto K, Sakagami H. Inhibition by Moxa Smoke of NO Production and iNOS Expression in Mouse Macrophage-like Cells Raw 264.7. In Vivo. 2005 Mar 1;19(2):471–4.

61. 1204385a.pdf [Internet]. [cited 2017 Jan 3]. Available from: http://www.nature.com/onc/journal/v20/n19/pdf/1204385a.pdf

62. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer. 1991 Dec 10;1072(2):129–57.

63. Cantley LC. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. Science. 2002 May 31;296(5573):1655–7.

64. Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. J Cell Sci. 2001 Apr 15;114(8):1439–45.

65. Díaz-Guerra MJM, Castrillo A, Martín-Sanz P, Boscá L. Negative Regulation by Phosphatidylinositol 3-Kinase of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Macrophages. J Immunol. 1999 May 15;162(10):6184–90.

66. Guha M, Mackman N. The Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway Limits Lipopolysaccharide Activation of Signaling Pathways and Expression of Inflammatory Mediators in Human Monocytic Cells. J Biol Chem. 2002 Aug 30;277(35):32124–32.

67. Yang W-L, Wang J, Chan C-H, Lee S-W, Campos AD, Lamothe B, et al. The E3 Ligase TRAF6 Regulates Akt Ubiquitination and Activation. Science. 2009 Aug 28;325(5944):1134–8.

68. Wang Y, Zhou C, Huo J, Ni Y, Zhang P, Lu C, et al. TRAF6 is required for the GM-CSF-induced JNK, p38 and Akt activation. Mol Immunol. 2015 Jun;65(2):224–9.

69. Caron E, Ghosh S, Matsuoka Y, Ashton-Beaucage D, Therrien M, Lemieux S, et al. A comprehensive map of the mTOR signaling network. Mol Syst Biol. 2010 Dec 21;6:453.

70. Leslie NR, Bennett D, Lindsay YE, Stewart H, Gray A, Downes CP. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. EMBO J. 2003 Oct 15;22(20):5501–10.

71. Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, et al. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. Ann Surg. 1992 Apr;215(4):356–62.

72. Biron BM, Ayala A, Lomas-Neira JL. Biomarkers for Sepsis: What Is and What Might Be? Biomark Insights. 2015 Sep 15;10(Suppl 4):7–17.

73. Oberhoffer M, Rußwurm S, Bredle D, Chatzinicolaou K, Reinhart K. Discriminative power of inflammatory markers for prediction of tumor necrosis factor-α and interleukin-6 in ICU patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) or sepsis at arbitrary time points. Intensive Care Med. 26(2):S170–4.

74. Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. Crit Care. 2010;14(1):R15.

75. Wang H, Zhang P, Chen W, Feng D, Jia Y, Xie L. Four serum microRNAs identified as diagnostic biomarkers of sepsis. J Trauma Acute Care Surg. 2012 Oct;73(4):850–4.

76. Chatterjee S, Dwivedi VP, Singh Y, Siddiqui I, Sharma P, Van Kaer L, et al. Early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis promotes protective T helper 17 cell responses in a toll-like receptor-2-dependent manner. PLoS Pathog. 2011 Nov;7(11):e1002378.

77. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Aug 15;103(33):12481–6.

78. Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EKL. miR-146a Is Critical for Endotoxin-induced Tolerance. J Biol Chem. 2009 Dec 11;284(50):34590–9.

79. Standage SW, Wong HR. Biomarkers for pediatric sepsis and septic shock. Expert Rev Anti Infect Ther. 2011 Jan;9(1):71–9.

80. Miglietta F, Faneschi ML, Lobreglio G, Palumbo C, Rizzo A, Cucurachi M, et al. Procalcitonin, C-reactive protein and serum lactate dehydrogenase in the diagnosis of bacterial sepsis, SIRS and systemic candidiasis. Infez Med Riv Period Eziologia Epidemiol Diagn Clin E Ter Delle Patol Infett. 2015 Sep;23(3):230–7.

81. Groselj-Grenc M, Ihan A, Pavcnik-Arnol M, Kopitar AN, Gmeiner-Stopar T, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children. Intensive Care Med. 2009 Sep 15;35(11):1950–8.

82. Free Radicals in Biology and Medicine | Barry Halliwell and John Gutteridge | 9780198568698 | Oxford University Press Canada [Internet]. [cited 2017 Jan 6]. Available from: http://www.oupcanada.com/catalog/9780198568698.html

83. Gille G, Sigler K. Oxidative stress and living cells. Folia Microbiol (Praha). 1995;40(2):131–52.

84. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. J Biol Chem. 1989 May 15;264(14):7761–4.

85. Ajuwon OR, Marnewick JL, Davids LM. Rooibos (Aspalathus linearis) and its Major Flavonoids — Potential Against Oxidative Stress-Induced Conditions. 2015 [cited 2017 Jan 10]; Available from: http://www.intechopen.com/books/basic-principles-and-clinical-significance-of-oxidative-stress/rooibos-aspalathus-linearis-and-its-major-flavonoids-potential-against-oxidative-stress-induced-cond

86. Gutteridge JMC, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. Br Med Bull. 1999 Jan 1;55(1):49–75.

87. Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. [Internet]. 1984 [cited 2017 Jan 6]. Available from: http://www.jci.org/articles/view/111249/scanned-page/599

88. What is Respiratory Burst? [Internet]. Medicine Picture. 2015 [cited 2017 Jan 6]. Available from: http://medipicture.com/what-is-respiratory-burst/

89. Aikens J, Dix TA. Hydrodioxyl (Perhydroxyl), Peroxyl, and Hydroxyl Radical-Initiated Lipid Peroxidation of Large Unilamellar Vesicles (Liposomes): Comparative and Mechanistic Studies. Arch Biochem Biophys. 1993 Sep 1;305(2):516–25.

90. Kim JH, Lee S, Park JB, Lee SD, Kim JH, Ha SH, et al. Hydrogen peroxide induces association between glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and phospholipase D2 to facilitate phospholipase D2 activation in PC12 cells. J Neurochem. 2003 Jun 1;85(5):1228–36.

91. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem. 1995 Dec 1;41(12):1819–28.

92. Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Yeast Chichester Engl. 1998 Dec;14(16):1511–27.

93. Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP, Kehrer JP. Thioredoxin and its role in toxicology. Toxicol Sci Off J Soc Toxicol. 2004 Mar;78(1):3–14.

94. Virág L, Szabó E, Gergely P, Szabó C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. Toxicol Lett. 2003 Apr 11;140–141:113–24.

95. Repetto M, Semprine J, Boveris A. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. 2012 [cited 2017 Jan 10]; Available from: http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/lipid-peroxidation-chemical-mechanism-biological-implications-and-analytical-determination

96. Panasenko OM, Gorudko IV, Sokolov AV. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. Biochem Mosc. 2013 Dec;78(13):1466–89.

97. J TV after Young IS, McEneny. Radical chain reaction mechanism of lipid peroxidation. [Internet]. 2007 [cited 2017 Jan 11]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lipid_peroxidation.svg

98. Gusarov I, Shatalin K, Starodubtseva M, Nudler E. Endogenous Nitric Oxide Protects Bacteria Against a Wide Spectrum of Antibiotics. Science. 2009 Sep 11;325(5946):1380–4.

99. tert-Butyl hydroperoxide solution | CAS 75-91-2 [Internet]. [cited 2017 Jan 20]. Available from: https://www.scbt.com/scbt/product/tert-butyl-hydroperoxide-solution-75-91-2

100. Fekete A, Emri T, Gyetvai Á, Gazdag Z, Pesti M, Varga Z, et al. Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a t-butylhydroperoxide-tolerant mutant of Candida albicans. FEMS Yeast Res. 2007 Sep 1;7(6):834–47.

101. Fekete A, Pócsi I, Emri T, Gyetvai A, Gazdag Z, Pesti M, et al. Physiological and morphological characterization of tert -butylhydroperoxide tolerant Candida albicans mutants. J Basic Microbiol. 2008 Dec;48(6):480–7.

102. Savenkova ML, Mueller DM, Heinecke JW. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. J Biol Chem. 1994 Aug 12;269(32):20394–400.

103. Byun J, Mueller DM, Fabjan JS, Heinecke JW. Nitrogen dioxide radical generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system promotes lipid peroxidation of low density lipoprotein. FEBS Lett. 1999 Jul 23;455(3):243–6.

104. Martín C, Martínez R, Navarro R, Ruiz-Sanz JI, Lacort M, Ruiz-Larrea MB. tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals1. Biochem Pharmacol. 2001 Sep 15;62(6):705–12.

105. Grant CM. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. Mol Microbiol. 2001 Feb 1;39(3):533–41.

106. Penninckx MJ. An overview on glutathione in Saccharomyces versus non-conventional yeasts. FEMS Yeast Res. 2002 Aug 1;2(3):295–305.

107. Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Aug;86(16):6377–81.

108. Pinto P, Santos CN. Worldwide (poly)phenol intake: assessment methods and identified gaps. Eur J Nutr. 2017 Jan 19;1–16.

109. Scalbert A, Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. J Nutr. 2000 Aug 1;130(8):2073S–2085S.

110. Pietta P-G. Flavonoids as Antioxidants. J Nat Prod. 2000 Jul 1;63(7):1035–42.

111. Galinski CN, Zwicker JI, Kennedy DR. Revisiting the mechanistic basis of the French Paradox: Red wine inhibits the activity of protein disulfide isomerase in vitro. Thromb Res. 2016 Jan;137:169–73.

112. Bortechnológiai folyamatok és kémiai alapjaik|Digitális Tankönyvtár [Internet]. [cited 2017 Jan 25]. Available from: http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2010-0009_01/Bortechnologiai_folyamatok_es_kemaiai_alapjaik_5_5.html

113. Katalinić V, Milos M, Modun D, Musić I, Boban M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. Food Chem. 2004 Aug;86(4):593–600.

114. Bunea C-I, Pop N, Babeş AC, Matea C, Dulf FV, Bunea A. Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (Vitis vinifera) cultivated in organic and conventional systems. Chem Cent J. 2012 Jul 4;6:66.

115. Ruf J-C, Berger J-L, Renaud S. Platelet Rebound Effect of Alcohol Withdrawal and Wine Drinking in Rats. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995 Jan 1;15(1):140–4.

116. Nguyen C, Savouret J-F, Widerak M, Corvol M-T, Rannou F. Resveratrol, Potential Therapeutic Interest in Joint Disorders: A Critical Narrative Review. Nutrients. 2017 Jan 6;9(1):45.

117. Frémont L. Biological effects of resveratrol. Life Sci. 2000 Jan 14;66(8):663–73.

118. Kim HY. Resveratrol in Asthma: A French Paradox? Allergy Asthma Immunol Res. 2017 Jan 1;9(1):1–2.

119. Rasines-Perea Z, Teissedre P-L. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. Molecules. 2017 Jan 1;22(1):68.

120. Goszcz K, Duthie GG, Stewart D, Leslie SJ, Megson IL. Bioactive polyphenols and cardiovascular disease: chemical antagonists, pharmacological agents or xenobiotics that drive an adaptive response? Br J Pharmacol. 2017 Jan 1;n/a-n/a.

121. Pubchem. resveratrol | C14H12O3 - PubChem [Internet]. [cited 2017 Jan 18]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/resveratrol

122. Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and Cardiovascular Diseases. Nutrients. 2016 May 2;8(5).

123. Bresciani L, Calani L, Bocchi L, Delucchi F, Savi M, Ray S, et al. Bioaccumulation of resveratrol metabolites in myocardial tissue is dose-time dependent and related to cardiac hemodynamics in diabetic rats. Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD. 2014 Apr;24(4):408–15.

124. Hoshino J, Park E-J, Kondratyuk TP, Marler L, Pezzuto JM, van Breemen RB, et al. Selective Synthesis and Biological Evaluation of Sulfate-Conjugated Resveratrol Metabolites. J Med Chem. 2010 Jul 8;53(13):5033–43.

125. detail [Internet]. [cited 2017 Feb 20]. Available from: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=91062702&collection=ecacc_gc

126. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, et al. Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Inducing IFN-β (TRIF) Associates with TNF Receptor-Associated Factor 6 and TANK-Binding Kinase 1, and Activates Two Distinct Transcription Factors, NF-κB and IFN-Regulatory Factor-3, in the Toll-Like Receptor Signaling. J Immunol. 2003 Oct 15;171(8):4304–10.

127. ABiol.65.2014.2.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 25]. Available from: http://akademiai.com/doi/pdf/10.1556/ABiol.65.2014.2.9

128. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J Biol Chem. 1951 Nov 1;193(1):265–75.

129. Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. Anal Biochem. 1979 Dec;100(2):201–20.

130. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin Chem. 2009 Apr 1;55(4):611–22.

131. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. BioTechniques. 1999 Jan;26(1):112–22, 124–5.

132. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods. 2001 Dec 1;25(4):402–8.

133. real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf [Internet]. [cited 2017 Feb 20]. Available from: http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf

134. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnol Nat Publ Co. 1993 Sep;11(9):1026–30.

135. Lee J, Dawes IW, Roe J-H. Adaptive response of Schizosaccharomyces pombe to hydrogen peroxide and menadione. Microbiology. 1995;141(12):3127–32.

136. Pesti M, Novák R. Decreased permeability of glycerol in an ergosterol-less mutant of Candida albicans. Acta Microbiol Hung. 1984;31(2):81–4.

137. Pesti M, Ferenczy L. Protoplast fusion hybrids of Candida albicans sterol mutants differing in nystatin resistance. J Gen Microbiol. 1982 Jan;128(1):123–8.

138. Epand RM. Lipid polymorphism and protein–lipid interactions. Biochim Biophys Acta BBA - Rev Biomembr. 1998 Nov 10;1376(3):353–68.

139. Marsh D. Electron spin resonance: spin labels. Mol Biol Biochem Biophys. 1981;31:51–142.

140. Hubert A, Henderson PJF, Marsh D. Lipid–protein interactions in Escherichia coli membranes over-expressing the sugar–H+ symporter, GalP: EPR of spin-labelled lipids. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. 2003 Apr 1;1611(1–2):243–8.

141. Gróf P, Belágyi J. The effect of anaesthetics on protein conformation in membranes as studied by the spin-labelling technique. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. 1983 Oct 12;734(2):319–28.

142. Israelachvili J, Sjösten J, Eriksson LE, Ehrström M, Gräslund A, Ehrenberg A. Theoretical analysis of the molecular motion of spin labels in membranes. ESR spectra of labeled Bacillus subtilis membranes. Biochim Biophys Acta. 1974 Mar 15;339(2):164–72.

143. Kumamoto J, Raison JK, Lyons JM. Temperature “breaks” in Arrhenius plots: A thermodynamic consequence of a phase change. J Theor Biol. 1971 Apr 1;31(1):47–51.

144. Jones RH, Molitoris BA. A statistical method for determining the breakpoint of two lines. Anal Biochem. 1984 Aug 15;141(1):287–90.

145. Arthington-Skaggs BA, Jradi H, Desai T, Morrison CJ. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of Candida albicans. J Clin Microbiol. 1999 Oct;37(10):3332–7.

146. Loniewski KJ, Patial S, Parameswaran N. Sensitivity of TLR4- and -7-induced NFκB1 p105-TPL2-ERK pathway to TNF-receptor-associated-factor-6 revealed by RNAi in mouse macrophages. Mol Immunol. 2007 Jul;44(15):3715–23.

147. Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea C-K, Hong M, Shaito A, et al. TAB2 and TAB3 Activate the NF-κB Pathway through Binding to Polyubiquitin Chains. Mol Cell. 2004 Aug 27;15(4):535–48.

148. Kobayashi N, Kadono Y, Naito A, Matsumoto K, Yamamoto T, Tanaka S, et al. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. EMBO J. 2001 Mar 15;20(6):1271–80.

149. Murakami A, Gao G, Omura M, Yano M, Ito C, Furukawa H, et al. 1,1-Dimethylallylcoumarins potently supress both lipopolysaccharide- and interferon-γ-induced nitric oxide generation in mouse macrophage RAW 264.7 cells. Bioorg Med Chem Lett. 2000 Jan 3;10(1):59–62.

150. Lages F, Silva-Graça M, Lucas C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. Microbiol Read Engl. 1999 Sep;145 (Pt 9):2577–85.

151. Truniger V, Boos W. Glycerol uptake in Escherichia coli is sensitive to membrane lipid composition. Res Microbiol. 1993 Sep;144(7):565–74.

152. Gancedo C, Gancedo JM, Sols A. Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production. Eur J Biochem. 1968 Jul;5(2):165–72.

153. card-13759075-back.jpg (911×300) [Internet]. [cited 2017 Apr 11]. Available from: http://studydroid.com/imageCards/0d/3s/card-13759075-back.jpg

154. mini.1.karcher.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 24]. Available from: http://www.ableweb.org/volumes/vol-24/mini.1.karcher.pdf

155. Inoue Y, Kobayashi S, Kimura A. Cloning and phenotypic characterization of a gene enhancing resistance against oxidative stress in saccharomyces cerevisiae. J Ferment Bioeng. 1993 Jan 1;75(5):327–31.

156. Shinitzky M, Henkart P. Fluidity of cell membranes--current concepts and trends. Int Rev Cytol. 1979;60:121–47.

157. Pesti M, Horváth L, Vígh L, Farkas T. Lipid content and ESR determination of plasma membrane order parameter in Candida albicans sterol mutants. Acta Microbiol Hung. 1985;32(4):305–13.

158. Candida Albicans - Cellular and Molecular Biology | Rajendra Prasad | Springer [Internet]. [cited 2017 Apr 24]. Available from: http://www.springer.com/us/book/9783642752537

159. Tran Thanh H, Beney L, Simonin H, Nguyen TXS, Gervais P, Belin J-M, et al. Toxicity of fatty acid hydroperoxides towards Yarrowia lipolytica: implication of their membrane fluidizing action. Biochim Biophys Acta. 2007 Sep;1768(9):2256–62.

160. Pang ZJ, Zhou M, Chen Y, Wan J. Macrophage colony-stimulating factor reduces tert-butyl hydroperoxide induced oxidative injury to monocytes/macrophages. Atherosclerosis. 1999 Nov 1;147(1):33–40.

161. Gazdag Z, Pócsi I, Belágyi J, Emri T, Blaskó A, Takács K, et al. Chromate tolerance caused by reduced hydroxyl radical production and decreased glutathione reductase activity in Schizosaccharomyces pombe. J Basic Microbiol. 2003;43(2):96–103.

XII. PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés a következő publikációkon alapul:

1. Kalman N & Jakus PB, Antus C, Radnai B, Tucsek Z, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B. TRAF6 is functional in inhibition of TLR4-mediated NF-κB activation by resveratrol. ***JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY*** 24:(5) pp. 819-823. (2013)
   IF: 4,592 Független idéző közlemények száma: 23

2. Kalman N, Gazdag Z, Čertík M, Belagyi J, Selim S A, Pocsi I, Pesti M. Adaptation to *tert*-butyl hydroperoxide at a plasma membrane level in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* parental strain and its t-BuOOH-resistant mutant. ***JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY*** 54:(3) pp. 215-225. (2014)
   IF: 1,823 Független idéző közlemények száma: 1

További publikációk:

1. Hocsak E, Szabo V, Kalman N, Antus C, Cseh A, Sumegi K, Eros K, Hegedus Z, Gallyas F, Sumegi B, Racz B. PARP inhibition protects mitochondria and reduces ROS production via PARP-1-ATF4-MKP-1-MAPK retrograde pathway. ***FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE*** (Accepted: 16 Apr 2017)
   IF: 5,784 (2015/2016) Független idéző közlemények száma: 0

2. Fonai F, Priber JK, Jakus PB, Kalman N, Antus C, Pollak E, Karsai G, Tretter L, Sumegi B, Veres B. Lack of cyclophilin D protects against the development of acute lung injury in endotoxemia. ***BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA***

ACTA - MOLECULAR BASIS OF DISEASE 1852:(12) pp. 2563-2573. (2015)
IF: 4,882 Független idéző közlemények száma: 2

3. Kalman N & Gazdag Z, Blasko A, Virag E, Belagyi J, Pesti M. Regulation of the unbalanced redox state in a *Schizosaccharomyces pombe* tert-butyl hydroperoxide-resistant mutant. ***ACTA BIOLOGICA HUNGARICA*** 65:(2) pp. 218-226. (2014)
IF: 0,589 Független idéző közlemények száma: 0

4. Bognar E, Sarszegi Z, Szabo A, Debreceni B, Kalman N, Tucsek Z, Sumegi B, Gallyas F. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects in RAW 264.7 Macrophages of Malvidin, a Major Red Wine Polyphenol ***PLOS ONE*** 8:(6) Paper e65355. 11 p. (2013)
IF: 3,534 Független idéző közlemények száma: 24

5. Kalman N & Horvath E, Pesti M, Iwata K, Kunsagi-Mate S. Thermodynamic and kinetic processes during the unfolding of BSA in the presence of the mycotoxin patulin ***ACTA BIOLOGICA HUNGARICA*** 63:(2) pp. 389-398. (2012)
IF: 0,504 Független idéző közlemények száma: 2

6. Gazdag Z, Fujs S, Koszegi B, Kalman N, Papp G, Emri T, Belagyi J, Pocsi I, Raspor P, Pesti M. The abc1-/coq8- respiratory-deficient mutant of Schizosaccharomyces pombe suffers from glutathione underproduction and hyperacumulates Cd2+. ***FOLIA MICROBIOLOGICA*** 56: pp. 353-359. (2011)
IF: 0,677 Független idéző közlemények száma: 5

7. Racz B, Hanto K, Tapodi A, Solti I, Kalman N, Jakus P, Kovacs K, Debreceni B, Gallyas F, Sumegi B. Regulation of MKP-1 expression and MAPK activation by PARP-1 in oxidative stress: A new mechanism for the cytoplasmic effect of PARP-1 activation. ***FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE*** 49:(12) pp. 1978-1988. (2010)
   IF: 5,707 Független idéző közlemények száma: 22

8. Kalman N, Bencsik O, Pesti M, Papp T, Vagvolgyi C. Stress responses of genetically modified Mucor circinelloides strains. ***ANNALS OF FACULTY OF ENGINEERING HUNEDOARA-INTERNATIONAL JOURNAL OF ENGINEERING*** 7:(4) pp. 177-180.(2009)
   IF: 0 Független idéző közlemények száma: 0

9. Nagy L, Kalman N, Nagy G. Periodically interrupted amperometry. A way of improving analytical performance of membrane coated electrodes ***JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL METHODS*** 69:(1-2) pp. 133-141. (2006)
   IF: 1,403 Független idéző közlemények száma: 4

Összesített impakt faktorok száma: 29,495

Hivatkozások száma (MTMT adatbázisból): 112, ebből független: 83

Konferenciaposzterek:

1. Egy tert-butil hidroperoxid toleráns és hidrogén-peroxid érzékeny *Schizosaccharomyces pombe* mutáns vizsgálata. Kálmán N, Tóth DM, Gazdag Z, Selim SA és Pesti M. **Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése,** Keszthely, 2008.
2. Characterization of a tert-butyl hydroperoxide tolerant mutant of Schizosaccharomyces pombe. Kálmán N, Gazdag Z, Pesti M. **CESC, Central European Summer Course**, Szeged, 2008.
3. Sensitivity of genetically modified Mucor circinelloides to various stress responses. Kálmán N, Takács K, Gazdag Z, Bencsik O, Vágvölgyi C, Papp T, Pesti M. **Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése,** Keszthely, 2009.
4. Inhibition of TLR4-TRAF6-NFkB pathway with resveratrol in murine macrophages. Nagy MB, Antus C, Kálmán N, Pribér J, Jakus PB, Fónai F, Tucsek Z, Radnai B, Veres B. **41. Membrán-Transzport Konferencia**, Sümeg, 2011.
5. Mitokondriális permeabilitás tranzíció szerepe az LPS-indukálta gyulladásos folyamatokban. Pribér JK, Nagy MB, Fónai F, Radnai B, Tucsek Z, Kálmán N, Jakus P, Sümegi B, Veres B. **41. Membrán-Transzport Konferencia**, Sümeg, 2011.
6. Regulation of MKP-1 expression and MAPK activation by PARP-1 in oxidative stress: a new mechanism for cytoplasmic effect of PARP-1 activation. Racz B, Hocsak E, Solti I, Kálmán N, Jakus PB, Debreceni B, Gallyas F, Sumegi B. **41. Membrán-Transzport Konferencia**, Sümeg, 2011.
7. Paramágneses rezveratrol analógok anti-inflammatorikus, citotoxikus és anti-proliferatív hatásának vizsgálata. Antus C, Kálai T, Borza E, Fónai F, Kálmán N, Jakus PB, Veres B, Hideg K, Sümegi B, Radnai B. A **Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Szakosztályának III. Konferenciája**, Esztergom, 2012.

8. A ciklofilin D hiányának hatása a lipopoliszacharid indukálta tüdőkárosodásra egérben. Fónai F, Pribér JK, Kálmán N, Jakus PB, Antus C, Radnai B, Sümegi B, Veres B. A **Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Szakosztályának III. Konferenciája**, Esztergom, 2012.
9. A TRAF6 funkcionális gátlása rezveratrollal a TLR4-NFkB útvonalon. Kálmán N, Antus C, Pribér JK, Radnai B, Jakus PB, Tucsek Z, Fónai F, Sümegi B, Veres B. A **Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Szakosztályának III. Konferenciája**, Esztergom, 2012.
10. A PARP-1 extra-nukleáris hatásainak vizsgálata. Rácz B, Szabó V, Hocsák E, Kálmán N, Gallyas F, Sümegi B. A **Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Szakosztályának III. Konferenciája**, Esztergom, 2012.
11. A ciklofilin D szerepe az LPS által indukált gyulladásos folyamatok génexpressziójának változásában. Veres B, Fónai F, Pribér JK, Kálmán N, Jakus PB, Antus C, Sümegi B. **44. Membrán-Transzport Konferencia**, Sümeg, 2014.
12. Cyclophilin D dependent mPT amplifies inflammatory response in septic shock. Veres B, Fónai F, Pribér JK, Kálmán N, Jakus PB, Antus C, Sümegi B. **14th ISANH Congress on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants**, Paris, France, 2014.
13. Absence of cyclophilin D enhances the cholesterol and fat anabolism in mouse liver. Jakus PB, Kálmán N, Fónai F, Antus C, Erős K, Takátsy A, Nagy I, Veres B. **FEBS3+ Meeting, Molecules of Life**, Portoroz, Slovenia, 2015.
14. Crucial role of cyclophilin D in the pathogenesis of LPS-induced acute lung injury liver. Fónai F, Pribér JK, Kálmán N, Jakus PB, Antus C, Radnai B, Sümegi B, Veres B. **FEBS3+ Meeting, Molecules of Life**, Portoroz, Slovenia, 2015.
15. A ciklofilin D hiányának hatása lipidek bioszintézisére és raktározására egerekben. Vranesics A, Kálmán N, Antus C, Jakus P, Takátsy A, Kőszegi B, Berente Z, Veres B. **46. Membrán-Transzport Konferencia**, Sümeg, 2016.