

TRANSZLÁCIÓS FEHÉRJE-MÓDOSULÁSOK CUKORBETEGSÉGBEN

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

DR. MOHÁS-CSEH JUDIT



**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
II. sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum**

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Wittmann István

Témavezető: Prof. Dr. Wittmann István

Pécs, 2023

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

2. ÖSSZEFOGLALÁS

3. BEVEZETÉS

3.1. A diabétesz mellitusz (DM) etiológiája, patogenezise és klasszifikációja

3.2. Az inzulin

3.3. Az inzulin-szekréció

3.4. Az inzulin hatásai

3.5. Az inzulinreceptor és jelátviteli útjai

3.6. Az IRS

3.7. Inzulin-rezisztencia

3.7.1. Akut inzulin-rezisztencia

3.7.2. Krónikus inzulin-rezisztencia

3.8. A diabétesz mellitusz szövődményeinek biokémiája és molekuláris mechanizmusai

3.9. Az oxidatív stressz

3.10. Az oxidatív stressz DM-ben

3.11. Az oxidált fenilalanin-származékok

4. CÉLKITŰZÉSEK

Az oxidált fenilalanin-származékok inzulin-rezisztenciában játszott szerepének bizonyítása

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Sejtvonalak

5.2. Glükózfelvétel vizsgálata izotópos módszerrel

5.3. Western-blot-analízis

5.4. HPLC-analízis

5.5. Statisztikai analízis

6. EREDMÉNYEK

6.1. Az o- és m-Tyr gátolja az inzulin-indukálta glükóz felvételt

6.2. Az o- és m-Tyr deoxy-D-glükóz 2-[1 2-3H(N)] felvételre gyakorolt gátló hatása, időfüggő módon valósul meg

6.3. Az o- és m-Tyr deoxy-D-glükóz 2-[1 2-3H(N)] felvételre gyakorolt gátló hatása, koncentráció-függő módon valósul meg

6.4. A zsírsejtek mind az o- mind az m-Tyr-t képesek percek alatt felvenni és azokat sejtfehérjéikbe beépíteni

6.5. Mind az o-, mind az m-Tyr beépülhet a 3T3-L1-sejtek intracelluláris fehérjéibe

6.6. Mind az o-, mind az m-Tyr beépülhet a HEK-sejtek intracelluláris fehérjéibe

6.7. Mind az o-, mind az m-Tyr beépülhet a makrofágok intracelluláris fehérjéibe

- 6.8. Az inzulinreceptor-szubsztrát-1 (IRS-1) aktiváló (Tyr612) foszforilációja megváltozik o-, m-Tyr-t vagy 25 mmol/l glükózt tartalmazó médiumon nőtt 3T3-L1-sejtekben
- 6.9. Az Akt (Ser 473) foszforilációja inzulinkezelés hatására, normál- és magas glükóz-koncentráció esetén valamint p-, o- vagy m-Tyr tartalmazó médiumon tenyésztett 3T3-L1-adipocitákban.
- 6.10. Az inzulinreceptor-szubsztrát-1 (IRS-1) aktiváló (Tyr612) foszforilációja megváltozik o-, m-Tyr vagy 25 mmol/l glükózt tartalmazó médiumon nőtt HEK-sejtekben
- 6.11. Az Akt (Ser 473) foszforilációja inzulinkezelés hatására, normál- és magas glükóz-koncentráció esetén valamint p-, o- vagy m-Tyr-t tartalmazó médiumon tenyésztett HEK-sejtekben
- 6.12. Az inzulinreceptor-szubsztrát-1 (IRS-1) aktiváló (Tyr612) foszforilációja megváltozik o-, m-Tyr-t vagy 25 mmol/l glükózt tartalmazó médiumon nőtt makrofágokban
- 6.13. Az Akt (Ser 473) foszforilációja inzulinkezelés hatására, normál- és magas glükóz-koncentráció esetén valamint p-, o- vagy m-Tyr-t tartalmazó médiumon tenyésztett makrofágokban

7. MEGBESZÉLÉS

7.1. Az oxidatív stresszt inzulin-rezisztenciához vezet

7.2. Biomarkerek az oxidatív stresszben

7.3. A tirozin-izomerek, mint biológiailag aktív molekulák

7.4. Az inzulin jelátvitelének károsodása a kóros tirozin-izomerek által mediált

8. KÖVETKEZTETÉSEK

9. A DOLGOZAT TÉZISEI

10. A DISSZERTÁCIÓHOZ CSATLAKOZÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

11. PUBLIKÁCIÓS LISTA

11.1. A disszertációhoz nem csatlakozó tudományos közlemények

11.2. Absztraktok

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

13. IRODALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

AGE advanced glycation end product

ATP adenosine triphosphate

BMI Body mass index

cAMP cyclic AMP

CAP catabolite activator protein

Cb1 Cannabiod receptor 1

C3G Cyanidin-3-glucoside

CKD chronis kidney disease

CrkII adaptor proto-oncogene

DAG diacil glicerol

DM Diabétesz mellitusz

DNP Diabéteszes nefropátia

ERK extracellular signal regulated kinase

ESR elektron spin rezonancia

FoxO forkhead box-containing protein, O alcsalád

FFA Free fatty acid

Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase GFAT

GIP Gastric inhibitory polypeptid

GLP-1 Glucagon-like peptid-1

GLUT glucose transporter

Grb2 growth factor receptor-bound protein

GSK-3 glycogen synthase kinase 3

GlcNac N-acetil-glükózamin

HOMA homeostasis model assessment

HPLC high performance liquid chromatography

IGF-1 és 2 Insulin-like growth factor 1 és 2

IR inzulin-rezisztencia

IRS inzulinreceptor-szubsztrát

IRRR orphan insulin receptor-related receptor

MAPK mitogen activated protein kinase

Mek mitogen-activated protein kinase kinase

mTOR mammalian target of rapamycin

m-Tyr meta-tirozin

NADPH nicotinamide adenin dinucleotid phosphate

NO nitrogen-monoxide

O-GlcNac O-kötött N-acetil glükózamin

OGT O-GlcNac transzferáz

o-Tyr orto tirozin

PAI-1 plasminogen activator inhibitor-1

Phe fenilalanin

PDK1 Phosphoinositide-dependent kinase-1

PEPCK Phosphoenolpyruvate carboxykinase

PI3K phoshatidylinositol 3-kinase

PKA protein kináz A

PKB protein kináz B

PKC protein kináz C

p38 MAPK p38 mitogén aktiválta protein kináz

p70S6K 70-kDa ribosomal protein S6 kinase

p-Tyr para-tirozin

RAAS renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

RAS Rat sarcoma virus

ROS reaktív oxigén származékok

Ser szerin

Shc Src homology and containing protein

SOS Son of Sevenless

STAT signal transducer and activator of transcription

TCGAP TC10/cdc42 GTPase activating protein

TGF- β transforming growth factor- β

Thr treonin

TKR Tirozin-kináz receptor

TNF- α : tumor nekrosis faktor α

Tyr tirozin

T1DM type 1 diabetes mellitus

T2DM type 2 diabetes mellitus

UDPGlcNAc: UDP- β -N-acetilglükózamin

VLDL very low density lipoprotein

2. ÖSSZEFOGLALÁS

Előzmények: A diabétesz mellitusz (DM) népbetegség. A földön élő diabéteszesek száma évről évre növekszik, az utóbbi időben már a fejlődő országokban is. Ismert, hogy DM-ben megnő a gyulladáshoz vezető citokinek mennyisége, melynek hatására fokozódik az oxidatív stressz. Ennek hátterében többek között a zsírszövet, mint komplex hormontermelő szerv áll. A megnövekedett oxidatív stressz inzulin-rezisztenciához vezet, ezzel tovább súlyosbítva a DM-ben sérült metabolikus egyensúlyt. Ismert az is, hogy a fenilalaninból (Phe) enzimátikus úton para-tirozin (p-Tyr) képződik, de a Phe átalakulása p-Tyr-ná kisebb mértékben ugyan, de nem enzimátikus úton is végbemehet. Oxidatív stressz mellett, hidroxil szabad gyökök jelenlétében a fiziológiás p-Tyr mellett orto-tirozin (o-Tyr) és meta-tirozin (m-Tyr) is képződik. Munkánk során ezen módosult Phe származékok fehérjékbe történő beépülését, a glükózfelvételre és az inzulin-jelátvitelre, nevezetesen az inzulin-receptor-szubsztrát-1 (IRS-1) és az Akt foszforilációjára gyakorolt hatását vizsgáltuk.

Célkitűzések: Célul tűztük ki az o- és m-Tyr inzulin-rezisztenciában betöltött szerepének vizsgálatát.

Módszerek 3T3-L1-adipociták inzulin-indukálta glükózfelvételét vizsgáltuk deoxi-D-glükóz izotóp segítségével, módosított tirozinokat tartalmazó médiumon való tenyésztést követően. Vizsgáltuk a módosított tirozinok hatásának idő- és koncentrációfüggését továbbá a hatás p-Tyr-nal való felfüggesztésének lehetőségét. Három sejtvonalon (3T3-L1-adipocitákon, HEK-293 epiteliális sejteken és BALB/C monociták makrofág sejtvonalon) vizsgáltuk a módosított tirozinok sejtekbe való felvételét, valamint a sejtfehérjékbe való beépülését fluorescens nagyteljesítményű folyadék-kromatográfiás (HPLC) módszerrel, a felvett módosított tirozinok mennyiségét Phe-re vagy p-Tyr-ra korrigáltuk. A kezelés inzulin-jelátvitelre gyakorolt hatásának vizsgálata során az inzulin jelátvitelében alapvető szerepet betöltő Akt és IRS-1 fehérjék foszforilációját vizsgáltuk Western-blot módszer segítségével, ugyanezen három sejtvonalon.

Eredmények: Az o- és m-Tyr-t tartalmazó tenyésztést követően szignifikánsan csökkent a 3T3-L1-adipociták bazális és inzulin hatására bekövetkező deoxi-D-glükóz felvétele ($p < 0,05$), hasonlóan a magas glükózon nőtt sejtekhez. A hatás, már egynapos o- és m-Tyr-os kezelést követően kialakult és a kezelési idő hosszának növelésével

változatlan maradt. A módosított tirozinokat tartalmazó médiumhoz adott p-Tyr kompetícióba lépve az o- és m-Tyr-nal, képes volt a hatás felfüggesztésére, o-Tyr esetén háromszoros, m-Tyr esetén négyszeres p-Tyr hozzáadását követően. HPLC-vel végzett vizsgálataink igazolták, hogy a módosított tirozinokat a 3T3-L1-adipociták, a HEK-sejtek és a makrofágok is inzulintól független módon felveszik, és azokat sejtfehérjéikbe beépítik. Az o- és m-Tyr-on nőtt sejtekben nem következik be 400 nmol/l inzulin hatására sem az IRS-1, sem pedig az Akt aktiváló foszforilációjának szignifikáns növekedése, hasonlóan a 25 mmol/l glükóztartalmú médiumon nőtt sejtekhez, míg normális 5 mmol/l glükóztartalmú médiumon növesztett sejteken a foszforiláció növekedése szignifikáns, mindkét jelátviteli fehérje esetében. Ezeket a változásokat, az általunk vizsgált mindhárom sejtvonalban kimutattuk.

Megbeszélés Az o- és m-Tyr hatására a zsírsejtek fehérjében olyan konformáció-változások történhetnek, melyek megváltoztatják a sejtek jelátvitelét, különösen akkor, ha ezek a módosult Tyr-ok a kritikus, jelátviteli utak szempontjából alapvetően fontos Tyr oldalláncok helyére kapcsolódnak be. A p-tyr hozzáadásával ezek a hatások kivédhetők.

Background: Diabetes mellitus is a very frequent disease, the number of diabetic patients is increasing in the world, even in the developing countries. The level of oxidative stress is increased in diabetes, caused by the increased production of inflammatory cytokines by the adipose-tissue which functions like a hormone-producing organ. Increased oxidative stress leads to insulin resistance, causing a further deterioration of the metabolic balance, which is already disturbed in diabetes. It is well known, that para-tyrosine (p-Tyr) can be formed from phenylalanine (Phe) enzymatically, but in increased oxidative stress, non-enzymatic p-Tyr formation is also plausible in less quantity. Oxidative stress also leads to the increased level of hydroxyl free radical, which can result also in the formation of the non-physiological tyrosine isomers: meta- (m-Tyr) and orthotyrosine (o-Tyr). We investigated the role of non-physiological tyrosine-isomers in insulin-induced glucose uptake and in insulin-signaling.

Aims: Investigation the role of o- and m-Tyr in the development of insulin resistance.

Methods: We examined the insulin-induced glucose uptake of 3T3-L1 adipocytes with isotope labelled glucose, after grown on media containing p,- o- or m-Tyr. We examined the time- and concentration dependency of the effect of abnormal tyrosine isoforms. We examined the uptake of different Tyr-isoforms into 3T3-L1 adipocytes and examined the amount of protein-bound tyrosine-isomers in two further cell-lines (HEK 293 epithelial cells, BALB/C macrophages), using high performance liquid chromatography (HPLC). We corrected the measured amount of tyrosine to Phe or to p-Tyr. We examined the changes of insulin-induced phosphorylation of two, central proteins in insulin-signaling, namely: IRS-1 and Akt and, after growing the cells on different tyrosine-containing media. We performed these investigations in all of the three above-mentioned cell-lines.

Results: Insulin induced deoxy-D-glucose uptake significantly ($p < 0.05$) decreased in 3T3-L1 adipocytes, grown on m- or o-Tyr containing media, similarly to cells grown on high (25 mmol/l) glucose containing media. This effect could already be detected after one day of treatment and was unchanged by increasing the length of the treatment. Adding increasing amount of p-Tyr to the media, could prevent this effect of o- and m-Tyr, by adding threefold amount of p-Tyr to the o-Tyr and fourfold amount of p-Tyr to the m-Tyr cells. Our HPLC examinations proved that 3T3-L1 adipocytes take up p-, o-, and m-Tyr insulin-independently, and we showed in all the three cell-lines: adipocytes, HEK-cells and macrophages-, that the tyrosines are incorporated in cellular proteins. In cells, grown

on o- or m-Tyr, no increase of insulin induced (400 nmol/l) phosphorylation of IRS-1 or Akt could be detected, similarly to cells grown on 25 mmol/l glucose containing media. While in cells, grown on 5 mmol/l glucose and p-Tyr, a significant increase of phosphorylation was detectable in Akt as well as IRS-1. These changes could be detected in all three cell-lines.

Conclusions Growing cells on o- and m-Tyr containing media may result in changes of the structure of cellular proteins which can change the signal-transduction of cells, especially if these amino-acids are incorporated into loci of the peptide-chain, that play a key role in phosphorylation, such as the Tyr residues. Adding p-Tyr to the media can prevent these effects.

3. BEVEZETÉS

3.1. A diabétesz mellitusz (DM) etiológiája, patogenezeise és klasszifikációja

2013-ban 382 millióra becsülték a Földön élő, diabétesz mellituszban szenvedők számát, mely 2035-re, egyes becslések szerint 592 millióra fog emelkedni [1]. A megelőző évtizedekben a nyugati világ betegsége volt, de manapság a fejlődő országokban is megfigyelhető a prevalencia növekedése, még hozzá aggasztóan gyors ütemben [2]. Az 1-es (T1DM) és 2-es (T2DM) típusú DM eddig ismert 1:20-hoz aránya is változni látszik annak következtében, hogy egyre magasabb a 2-es típusú DM előfordulása a gyermekek körében [3].

T2DM során számtalan metabolikus eltérés figyelhető meg, melyek egy része a csökkent inzulin-szekréció, más része az inzulinra adott csökkent válasz, esetleg egyszerre mindkettő következménye [4]. A T1DM egy immun-patomechanizmusú betegség, mely során a β -sejtek felszínén megjelenő fehérje immunválaszt indít a β -sejtek ellen, mely teljes β -sejt pusztuláshoz és abszolút inzulinhiányhoz vezet [3].

A T2DM-esek teszik ki az össz-diabéteszes populáció legalább 90%-át és ez a szám drámaian növekszik, köszönhetően a változó életmódbeli szokásoknak és megnövekedett body mass indexnek (BMI) [5]. A T2DM-ben megfigyelhető emelkedett mortalitás hátterében többek között az inzulin-rezisztencia áll. Ebben az állapotban, az inzulin biológiai hatása károsodott, melynek következtében az inzulinszint patológiás mértékben megnövekszik és létrejön a metabolikus szindróma, mely magába foglal számos kardiovaszkuláris rizikófaktort, úgymint: hiperglikémia, centrális obezitás, diszlipidémia, hipertónia és protrombotikus állapot [6]. Legtöbb esetben a perifériás inzulin-rezisztencia, vagyis a máj-, zsír- és izomszövetben kialakult károsodott inzulinválasz, már jóval a hiperglikémia kialakulása előtt létrejön [7]. A vázizomban létrejött inzulin-rezisztencia csökkent glükózfelvételhez vezet. A májban az inzulin-rezisztencia következtében az inzulin nem képes a hepatikus glükoneogenezis és glikogenolízis gátlására így növekszik a májból való glükózkirányítás. A zsírszövetben az inzulin antilipolitikus hatására is rezisztencia alakul ki, ezáltal fokozódik a lipolízis és a szabad zsírsavak (free fatty acids-FFA) kiáramlása a keringésbe. Az FFA krónikusan

megnövekedett szintje a pankreász β -sejtjeinek pusztulásához vezethet (lipotoxicitás) [7]. A perifériás inzulin-rezisztenciát kompenzáló β -sejtek tömege nő, több inzulint szekretálnak, mely hiperinzulinémiához vezet. Azonban egy ponton túl a β -sejtek nem tudnak tovább kompenzálni, így a plazma glükóz szintje növekedni kezd. A megnövekedett glükózsztint tovább károsíthatja a β -sejteket (glükotoxicitás), melynek következtében a β -sejtek progresszív pusztulása figyelhető meg, és kialakul a definitív hiperglikémia [7]. Bár a β -sejtek rendkívül érzékenyek a vércukorszint változásaira, ez nem zárja ki azt, hogy a szigetsejtek a hiperglikémiára adott reakcióik más és más stádiumában legyenek, így a deszenzitizáció, kimerülés és apoptózis vagy egyes szerzők szerint nekrozis [8] egyidejűleg forduljon elő. Ennek megfelelően a vércukorszint normalizálását követően (inzulin-terápia kezdetekor) egyes sejtek működése helyreállhat és visszanyerhetik inzulin-szekrécións képességüket [9].

A DM legújabb, 2019-es klasszifikációja szerint további külön kategóriát képez egy meglehetősen heterogén „különböző, specifikus diabétesz típusok” nevű csoport, melynek tagjai pl.: genetikai hátterű β -sejt diszfunkció [(pl.: maturity onset diabetes of the young (MODY)], az inzulin hatásának genetikai defektusai, az exokrin pankreász megbetegedései, endokrinopátiák, gyógyszer vagy kémiai ágens indukálta cukorbetegség, infekciók, az immun-mediálta diabétesz ritka formái, genetikai szindrómák, melyek néha diabéteszhez asszociálódnak.

Végül teljesen külön csoportba soroljuk a gesztációs diabéteszt és a más csoportokba nem sorolható DM-t [4].

3.2. Az inzulin

A 19. század elején Von Mering és Minkowski DM kialakulását idézte elő kutyákban a pankreász eltávolításával. 1916-ban Schafer gondolt először arra, hogy létezik egy-egy pankreász sejtje által termelt- antidiabetikus hormon, melyet „inzulin”-nak nevezett el. Barron 1920-ban igazolta, hogy a „ductus pancreaticus” leköttése és az exokrin pankreász elpusztítása csupán abban az esetben vezet DM-hez, ha az 1869-ben, Langerhans-szigeteknek elnevezett részt is kiirtotta a pankreászban. Ezt követően az 1920-as években Banting, Best, Collip és MacCleod munkásságának köszönhetően sikerült egy anyagot

kivonni a pankreászból, mely képes volt diabéteszes állatokban a vércukorszintet csökkenteni [10]. 1923-ban már kezelni tudtak DM-ben szenvedő betegeket a pankreász kivonatóval [11].

Az inzulin hormon egy két aminosavláncból álló [A és B lánc), 6000 Da nagyságú, heterodimer szerkezetű anabolikus fehérje. Az A-láncot (21 aminosav) a B-lánccal (30 aminosav) két diszulfid híd kapcsolja össze, mely cisztein oldalláncok kapcsolódásával jön létre, továbbá található egy diszulfid híd az A-láncon belül is. Az 1960-as években derült fény arra, hogy az inzulin bioszintézise, majd szekréciója során egy 9000 Da nagyságú fehérje, ún. proinzulin formájában létezik, melyben az A és B láncot egy közbülső C-lánc –ún. C-peptid- kapcsolja össze. A C-peptid nagysága a gerinces fajokon belül változó (30-35 aminosav), két végén dibázikus (Arg-Arg, Lys-Arg) aminosavpárok határolják. Ezeket a dibázikus aminosavakat hasítja le egy tripszinszerű fehérje és teszi szabaddá az aktív inzulin hormont valamint egy maradék, dibázikus végek nélküli C-peptidet [12, 13, 14, 15].

Ezt követően derült fény arra, hogy létezik egy további, az előzőnél nagyobb inzulin prekursor a preproinzulin [16], mely egy 12000 Da nagyságú, egy-láncú polipeptid, mely a proinzulin részből és egy 24 további aminosavból álló szignál-peptid alegységből áll, mely alegység jellemző a szekrécióra kerülő fehérjékre. Ez a szignál-peptid rész az endoplazmatikus retikulumba való belépéskor hasad le [11]. Az újonnan szintetizált inzulin és preinzulin hajlamos Zn^{+} ionokkal kristályosodni és hexamereket alkotni.

3.3. Az inzulin-szekréció

A β -sejtek felszínén nem található membránhoz kötött glükózreceptor, ellenben a sejtek felszínén konstitutívan expresszálódik a glükóz transzporter-2 (GLUT-2) (az egyetlen glükóztranszporter a β -sejteken; megtalálható továbbá a májban, kisebb mennyiségben a vesében és a bél felszívó hámjában), rajta keresztül a glükóz facilitált diffúzióval lép a sejtbe [17]. A GLUT-4-el ellentétben (mely a zsír- és izomsejteken található nagy mennyiségben) a GLUT-2 inzulin-independens és nagy glükózbeáramlást tesz lehetővé a sejtbe. A glükózt a sejtben a sebesség-meghatározó glükokináz enzim foszforilálja, melyet a β -sejt fontos glükózszenzoraként tartunk számon [18]. Ezt

követően a glükózból piruvát keletkezik, majd a citrát-körben acetyl-koenzim-A. Végül a terminális oxidációban Aden oil-trifoszfát (ATP) képződik. A folyamatok során keletkezett nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH), malonyl-koenzim-A és glutamát, inzulin-szekréción szignálként működhetnek [19, 20].

A magas glükózsztint a β -sejtekben inzulin-biosztintézist indukál, és egyben az inzulin-szekréción legfőbb regulátora is. A magas glükóz-koncentráción a ciklikus adenozil65 monofoszfát (cAMP) szztint növekedését indukálja, mely a protein-kináz A (PKA) aktivációnjával számos fehérje foszforilációnját idézi elő. Ennek hatására indul el az inzulin mRNA transzkripciónja és transzlációnja [21, 22]. Ezt követi a szekretoros granulumok kálcium-dependens exocitózisa, mely glükóz hatására és bazális állapotban is történhet. Más hormonok és kémiai anyagok is fontos szerepet töltenek be az inzulin-szekréción szabályozásában, úgymint a glukagon, melyet a pankreasz szigetec α -sejtjei termelnek, a „glucagon-like peptid-1” (GLP-1), kolekisztokinin, gastric inhibitory peptid, melyek mind a β -sejték felszínén lévő specifikus receptoraikhoz kötődve fejtik ki hatásukat. A katekolaminok (adrenalin, noradrenalin), melyek a β -sejték felszínén lévő adrenerg receptorokhoz kötődnek, az inzulin-szekréciónt gátolják [23].

Az egyes aminosavak önmagukban, fiziológias koncentrációnban inzulin-szekréción kiváltására képesek, bizonyos kombinációnjuk esetén pl.: a glutamin és leucin együttese, ez a hatás még kifejezettebb [24]. Éhezéskor az izomfehérjék katabolizmusa során az aminosavak metabolizálódnak a szükséges energia fedezésére. Szabad aminosavak, úgymint az alanin és a glutamin potens glukagon szekretagógok. Ez a vércukorszttint emelkedéséhez vezet, mely végsősoron inzulinválaszt indukál. A táplálékkal bevitt aminosavak az inkretin tengelyen hatva is képesek inzulin válasz kiváltására. A „gastric inhibitory polypeptid” (GIP) és a „glucagon-like peptid-1” (GLP-1) két, a gasztrointesztinális traktusból szekretálóó inkretin, melyek a bélrendszerbe jutó glükóz és aminosavak hatására a vérbe jutnak és inzulin-szekréciónt váltanak ki [25, 26, 27].

Ezen kívül a szabad zsírsavak és bizonyos hormonok (ösztrogén, melatonin, növekedési hormon, leptin) szttintén hatással vannak az inzulin szekréciónjára [17].

3.4. Az inzulin hatásai

Az inzulin alapvető szerepet tölt be az energia-homeosztázis fenntartásában. A táplálkozás kapcsán létrejövő akut inzulinszint-növekedés a vérben számos hatást idéz elő (1. táblázat) az inzulin célszöveiben: (1) a zsír- és izomszövetbe a GLUT-4-en keresztül glükóz áramlik (2) a májban és izmokban glikolízis és glikogén szintézis indul (3) a májban és zsírszövetben beindul a lipogenezis (4) a májban és az izmokban fehérjeszintézis kezdődik. Ezzel egy időben az inzulin gátolja a glikogénolízist, a lipolízist és a fehérjelebontást ugyanúgy, ahogy a glükoneogenezist és ketogenezist a májban [28]. Az inzulin autokrin hatásokkal is bír, melyek során elősegíti a β -sejtek növekedését, továbbá saját szintézisére és szekréciójára is hatással van [29]. Perifériás hatásain túl az inzulin úgy is befolyásolja az energia egyensúlyt és a metabolizmust, hogy centrális hatásokkal is bír, úgymint a táplálékfelvétel közvetlen szabályozása [30].

Inzulin	
Serkent	Gátol
glükóz felvétel	
glikogén szintézis	glükoneogenezis
lipogenezis	lipolízis
fehérje szintézis	apoptózis
DNS szintézis	autofágia
aminosav felvétel	
Na^+ - K^+ pumpa	

1. táblázat. Az inzulin intracelluláris hatásainak rövid összefoglalása [31, 32]

3.5. Az inzulinreceptor és jelátviteli útjai (1. ábra)

Az inzulinreceptor a tirozin-kináz receptorok (TKR) családjába tartozik, melyek közös jellemzője, hogy szerepet töltenek be a sejtosztódásban, túlélésben, differenciációban, migrációban és metabolizmusban [31]. A receptorcsalád tagjai egy transzmembrán polipeptid láncsal bírnak, mely egyszer halad át a sejtmembránon. A

receptor intracelluláris része egy tirozin-kináz domént tartalmaz, mely a ligand hiányában inaktív. Amikor a ligand az extracelluláris részhez kapcsolódik, a TKR aktív dimerré alakul [31]. Az inzulinreceptor alcsaládba tartozik az (1) inzulin receptor (2) „insulin like growth factor 1” (IGF-1) receptor (mely az IGF-1-et és 2-öt köti) és (3) az „orphan insulin receptor-related receptor” (IRRR). Az aktivációt követően a dimerizált receptorkináz doménjei transzfoszforiláció során aktiválódnak, melynek következtében a receptor bizonyos intracelluláris egységei is foszforilálódnak. Ezek az alegységek ezáltal alkalmassá válnak további SH2 doménnel rendelkező jelátviteli molekulák kötésére, melyek szintén vagy foszforilálódnak vagy konformáció-változás által válnak aktívvá és indítják el az intracelluláris, jelátviteli kaszkádot [31].

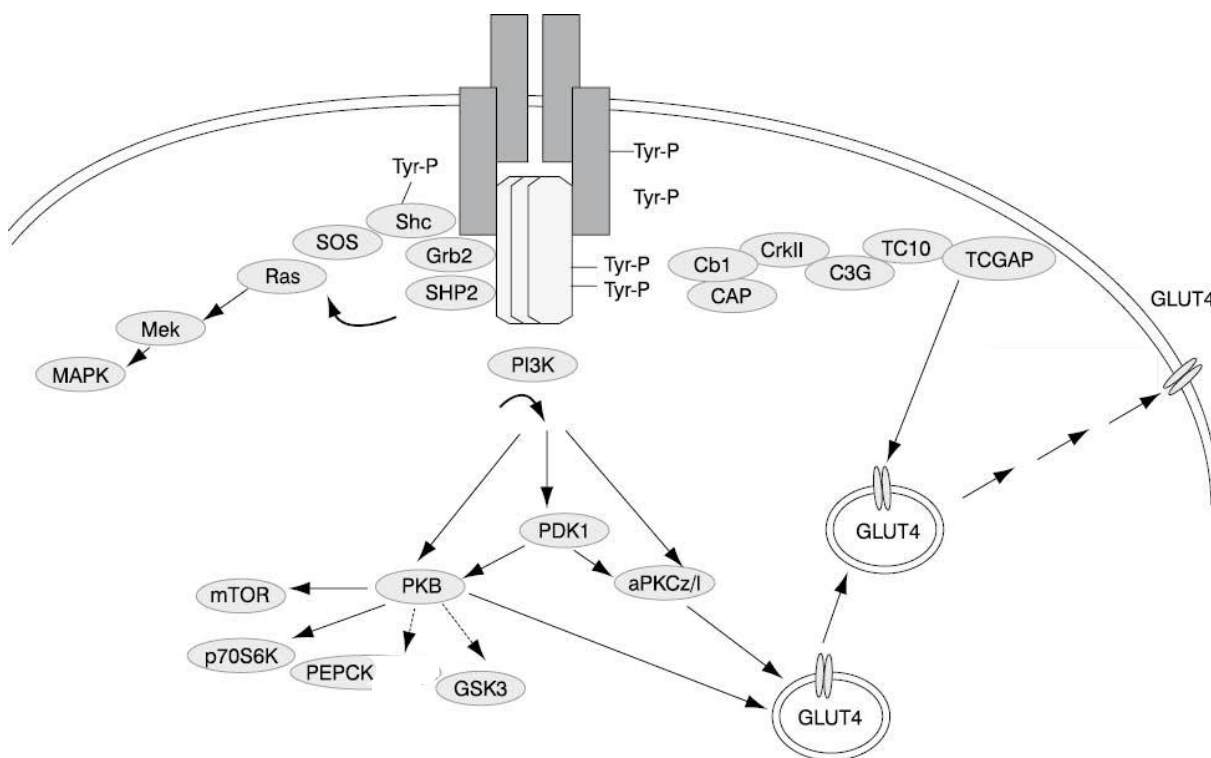
Első lépésként az inzulinreceptor a juxtamembrán domén alegység Tyr 960-hoz kötődik, mely egy hatalmas dokkoló fehérjékből, ezidáig 13 azonosított tagból álló család [33] [Inzulinreceptor-szubsztrát 1-13 (IRS 1-13)], majd foszforilálja azokat, továbbá az Shc (Src homology 2 domain containing) fehérje foszforilációja is megtörténik. Az inzulin legfőbb hatásait úgy tűnik, hogy az inzulinreceptor és az IRS-1, 2 valamint Shc interakciója közvetíti [34]. Az inzulinreceptortól két főbb jelátviteli útvonal indul, nevezetesen a phoshatidylinositol 3-kinase (PI3K, ez egy lipid kináz)/Akt (más néven protein kináz B vagyis PKB) útvonal [35] és a Raf/Ras/MEK/MAPK („mitogen activated protein kinase” más néven ERK vagy „extracellular signal regulated kinase”) útvonal [36]. A PI3K útvonal felelős az inzulin legtöbb metabolikus hatásáért és az IRS-hez kapcsolódik kizárólag, míg a MAPK útvonal az Shc és az IRS felől is aktiválódik és felelős a génexpresszió szabályozásáért és a PI3K útvonallal karöltve felelős a mitogenezis szabályozásáért és a differenciációért [37].

Az AKT/PKB fehérje négy alapvető szubsztráttal bír: (1) „mammalian target of rapamycin” (mTOR), mely a fehérjeszintézis szabályozásában játszik fontos szerepet (2) „glycogen synthase kinase 3” (GSK3), egy szerin/treonin kináz, mely a glikogénszintézis regulációjáért felelős és akkor kerül gátlás alá, amikor az AKT/PKB foszforilálja és a (3) „forkhead box-containing protein” O-alcsládjának transzkripciós faktorai (FoxO). A FoxO családból különösen fontos szerepet tölt be a FoxO1, mely a glükoneogenezis és az adipogenezis bizonyos génjeinek szabályozásáért felel, továbbá a ciklin G2 génjének szabályozásáért, mely egy nagyon fontos –sejtciklust megállító- fehérje, amit az inzulin gátol. Ez az útvonal inzulin hiányában aktív és fontos szerepet tölt be az inzulin-indukálta

mitogenezis közvetítésében. Az Akt 4. fontos szubsztrátja az (4) „AKT substrate of 160 kDa” (AS160), mely a glükóz transzportban játszik szerepet [35].

A GLUT-4 (glucose transporter-4), a GLUT család 13 izoformájának azon tagja, mely legnagyobb részben a zsírszövet, a váz- és szívizom sejtjein található. Felelős a posztprandiális hiperglikémia megelőzéséért azáltal, hogy a glükóz, az izom- és zsírsejtekbe jut, amikor inzulin (vagy testmozgás) hatására a GLUT-4 intracelluláris vezikulumjaiból kikerül a sejtmembránba [38, 39]. A GLUT-4 ATP-independens módon, facilitált diffúzió útján katalizálja a hexóztanszportot a sejtmembránon át. A GLUT-4 szabályozásának, ezáltal a glükóz, adipocitákba való jutásának legfontosabb jelátviteli útvonala a PI3K/PDK1/AKT2 útvonal [39].

A GLUT-4 membránba áramlását számos receptorális és poszt-receptorális szignál állítja le. Mind az inzulinreceptor, mind az IRS fehérjék ligand-indukálta negatív reguláció alatt állnak, protein-foszfatazok és gátló szerin foszforiláció által.



1. ábra. Az inzulin jelátvittele. Balról jobbra haladva: MAPK: mitogen activated protein kinase, Mek: mitogen-activated protein kinase kinase, Ras: Rat sarcoma virus, SOS: Son

of Sevenless, Shc: Src homology and containing protein, Grb2: growth factor receptor-bound protein, SHP2, PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase, Cb1 Cannaboid receptor 1, CAP catabolite activator protein, CrkII: adaptor proto-oncogene, C3G: Cyanidin-3-glucoside, TC10: TCGAP TC10/cdc42 GTPase activating protein, GLUT4: glucose transporter-4, mTOR: mammalian target of rapamycin, p70S6K 70-kDa ribosomal protein S6 kinase, Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PKB: protein kinase B, GSK-3 glycogen synthase kinase 3, PDK1 Phosphoinositide-dependent kinase-1, aPKC ζ /l. [40]

3.6. Az IRS

Az IRS fehérjecsald tagjai nem csak az inzulin [41], hanem számos más molekula jelátviteli folyamatainak fontos résztvevői [42]. Ilyen, a már korábban említett IGF-1, különböző hormonok pl.: a prolaktin [43] és a növekedési hormon [44], a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor [45] az integrin receptor család [46] és különböző citokinek. A különböző receptorok aktiválódása során N-terminális részükkel a receptor foszfortirozin alegységéhez kötődnek és számos jelátviteli komplex szervezésében vesznek részt [41]. Receptorhoz kötődésük során C-terminálisukon foszforilálódnak. A kialakult foszfo-tirozin alegységek indítják el a szerteágazó jelátviteli utak hálóját.

Az IRS fehérjéket eredetileg, mint az inzulinreceptor szubsztrátjait azonosították és legfőképpen a metabolikus jelátvitelben való szerepüket vizsgálták [41]. Annak ellenére, hogy az IRS fehérjék egymás homológjai, mégis egyre több adat gyűlik össze annak bizonyítására, hogy a család egyes fehérjéi különböző szerepekkel bírnak. Az IRS-1-null egerek picinek születnek és egész életükben törpenövésűek maradnak. Ezekben az egerekben bár nem alakul ki DM, mert a pankreász β -sejtek száma megtartott náluk, de inzulin-rezisztensekké válnak [47]. Ezzel szemben az IRS-2-null egerek normális súllyal, de agyi fejlődési rendellenességekkel születnek és korán DM alakul ki náluk, perifériás inzulin-rezisztencia és β -sejt diszfunkció következtében [42, 48, 49]. Az IRS-3-null egerek fenotípusukat tekintve normálisak [50] (bár nem zárható ki, hogy olyan rendellenességekkel bírnak melyek manifesztációját az egerek élethossza nem teszi lehetővé), az IRS-4-null egerek enyhe reprodukciós zavarban és enyhe fokú inzulin-rezisztenciában szenvednek [51].

Bár az IRS molekulának egyelőre tizenhárom különböző formája ismert, ebből a leggyakrabban vizsgált és ezidáig a legkritikusabb funkciókkal bíró két fő típusa az IRS-1 és az IRS-2. Mindkét fehérje nagy mennyiségben expresszálódik normál humán hepatocitákban, expressziója diabéteszesekben csökken [52]. Valóban, hepatocitákban az IRS csökkent expressziója vagy csökkent Tyr-foszforilációja az inzulin-rezisztencia és a 2-es típusú DM jelei [53]. Taniguchi és munkacsoportja egér májsejtekben kimutatta, hogy az IRS-1 és IRS-2 komplementer módon működnek a jelátvitelben, a PI3K útvonal és a FoxO1 útvonal fenntartásában egymást kiegészítve vesznek részt. Az IRS-1 vagy IRS-2 önmagában való kiütése nem okozott diabéteszes fenotípust egerekben, míg a kettő együttes kiütése különböző metabolikus eltérésekhez -úgy mint hiperglikémia, hiperinzulinémia, inzulin-rezisztencia - vezetett [54].

3.7. Inzulin-rezisztencia

Egy egészséges ember inzulinigénye 0,5-0,6 E/testsúlykilogramm. Az e fölötti dózisok esetén inzulin-rezisztenciáról beszélünk. A sejtmembránon ülő inzulin-receptorok száma és a környező inzulin-koncentráció között fennálló, krónikus expozíció során megfigyelhető fordított arányosságot először 1974-ben írta le Gavin és munkacsoportja, in vitro, humán limfocita sejt kultúrán [55]. A hiperinzulinémia továbbá csökkentette az IRS1 és IRS2 expresszióját mind sejt kultúrán, mind egér szöveti sejtekben, mely a fokozott lebontás és csökkent szintézis együttesének volt köszönhető [54].

Definíció szerint az inzulin-rezisztencia inzulinhatásra bekövetkező, a normálisnál alacsonyabb válaszkészség, mely az euglikémiás állapot elérésének érdekében, kompenzatorikus hiperinzulinémiához vezet [56]. Fő jellemzői a glukoneogenezis gátlásának elmaradása, az izomsejtek csökkent glükózfelvétele, valamint a lipolízis gátlásának elmaradása zsírszövetben. Az inzulin-rezisztencia klinikai tünetei a viszcerális obezitás, acanthosis nigricans, akne, hirsutizmus, steatosis hepatis [40]. Az inzulin-rezisztencia mérésének aranystandardja a hiperinzulinémiás, euglikémiás clamp, mely során egy állandó sebességű inzulininfúzió mellett a vércukorszintet bazális szinten tartjuk glükózinfúzió segítségével, mely által a szövetek glükóz-felvételéről kapunk

információt [57]. Alternatívája az éhomi inzulinszint mérése vagy a „homeostasis model assessment” (HOMA) éhomi inzulin- és glükózsintekből való számolása [58].

Az inzulin-rezisztencia etiológiájában szerepet játszó tényezők a genetikai faktorok -bizonyos szindrómák esetén- és a környezeti faktorok, nevezetesen a táplálkozási szokások, a csökkent fizikai aktivitás, életkor, dohányzás és bizonyos gyógyszerek használata (tiazid diuretikumok, β -adrenerg antagonisták, glükokortikoidok). Mégis mindezen faktorok közül a legfontosabb és leggyakoribb tényező az elhízás. Az abdominális zsírszövet a szabad zsírsavak (FFA) és bizonyos hormonok (adipokinek) raktára, melyek felelősek az inzulin-rezisztencia kialakulásáért [40].

Az inzulin-rezisztencia kialakulásának hátterében számos mechanizmus húzódik meg, melyek közül rendkívül széleskörűen vizsgált molekula a tumor-nekrózis-factor α (TNF- α). A zsírszövetből nagy mennyiségben jut TNF- α a keringésbe, így elhízásban a zsírszöveti raktárak növekedésével a TNF- α szint is növekszik, ugyanakkor parakrin mechanizmussal, a lipolízis serkentése révén fokozza a zsírszövetből felszabaduló FFA mennyiségét [59]. A májban az FFA a glükoneogenezis és a very low density lipoprotein (VLDL) szintézis szubsztrátjai, növelve ezáltal a vércukor- és VLDL szinteket. Az izmokban a FFA hatására fokozódik a β -oxidáció, ezáltal csökken a glükózfelvétel és mivel az izomszövet képezi a szervezet legfőbb glükóz felhasználóját (80-90%) ezáltal a csökkent glükózfelvétel nagymértékben hozzájárul a hiperglikémia kialakulásához [40]. Szintén szerepe van a megtartott inzulin-szenzitivitásban a leptinnek és adiponektinnek, melyek a zsírszövet által termelt- hormonok. Hiányukban (pl.: lipodisztrófiában) insulin-rezisztencia alakul ki.

Az inzulinreceptor génjében számos mutációt leírtak, melyek a receptor elégtelen működéséhez, ezáltal inzulin-rezisztenciához vezetnek. Az IRS-1 fokozott szerin-treonin foszforilációja fokozott proteozómális lebontáshoz vezet, melyet leírtak TNF- α kezelést követően [60]. Széles körben vizsgálják a JNK molekula inzulin-rezisztenciában betöltött szerepét, melyet alapvetően négy pontban lehet összefoglalni: (1) az IRS1 és 2 direkt gátló foszforilálása, (2) gyulladás generálása a zsírszövetben (3) a TSH-tiroxin tengely gátlása (4) a PPAR α -FGF21 tengely gátlása [61].

3.7.1. Akut inzulin-rezisztencia

A tumor nekrozis faktor-alfa (TNF α) vagy dexametazon által előidézett akut inzulin-rezisztencia enyhíthető antioxidánsok, pl.: N-acetilcisztein, mangánáz (III) tetrakis (4-benzoicacid) porphirin (MnTBAP) hozzáadásával vagy antioxidáns enzimek, így a kataláz vagy szuperoxid dizmutáz indukciójával [62]. Ezen eredmények rámutatnak az oxidatív stressz és az akut inzulin-rezisztencia kialakulásának szoros összefüggésére.

3.7.2. Krónikus inzulin-rezisztencia

A klinikai gyakorlatban megfigyelhető, hogy a krónikus antioxidáns kezelés (pl.: alfa-liponsav kezelés diabéteszes neuropátia esetén) képes a krónikus inzulin-rezisztencia mérséklésére [63]. Mitöbb, az úgynevezett „áttöréses” terápia alkalmazása során megfigyelhető, hogy a glikémia 2-4 hetes normalizálása által csökkenő glükotoxicitás, az inzulin-rezisztencia több hónapra, akár évre való csökkenéséhez vezethet [64, 65]. Mivel a klinikai inzulin-rezisztencia reverzibilis jelenség, hátterében feltételezhetően nem DNS károsodás, sokkal inkább fehérjeszintű eltérések állhatnak. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a közismerten fokozott inzulin-rezisztenciát és oxidatív stresszt okozó glikációs végtermékekben (AGE) szegény diéta, az inzulin-rezisztencia csökkenéséhez vezet obesez egyéneknél [66].

3.8. A diabétesz mellitusz szövőményeiének biokémiája és molekuláris mechanizmusai

A DM minden formája hiperglikémiával jár és diabétesz-specifikus mikrovaszkuláris szövődmények kialakulásához vezet a retinában, a glomerulusokban és a perifériás idegekben, melyek hátterében hasonló patofiziológiai faktorok bújnak meg. A DM korai stádiumában az intracelluláris hiperglikémia megnöveli a vaszkuláris permeabilitást, melynek hátterében a vazodilatátorok (pl.: nitrogén-monoxid NO) csökkent- és a vazokonstriktorok fokozott (pl.: angiotenzin II, endothelin-1) működése és a permeabilitást fokozó molekulák pl.: vaszkuláris endotheliális növekedési factor (VEGF) jelenléte áll [67]. Mindezek együttese vezet az oedema, ischaemia és hipoxia-indukálta neovaszkularizáció kialakulásához a retinában; proteinuria, mezangiális mátrix expansió

és glomeruloszklerózis kialakulásához a vesében és multifokális axonális degenerációhoz a perifériás idegekben. DM-ben az Akt jelátviteli út szelektív inzulin-rezisztenciája áll fenn, így a PI3K útvonal csökkent működése kevesebb NO termeléshez vezet, míg a MEK-MAPK útvonal fokozott működése növeli a plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) szintjét és a vaszkuláris simaizomsejtek proliferációját [67].

Négy alapvető úton vezet a hiperglikémia a mikro- és makrovaszkuláris szövődmények kialakulásához:

1. A fokozott poliol-útvonal

Fiziológiás körülmények között a glükóznak jelentéktelen mennyisége metabolizálódik ezen az útvonalon, hiperglikémiában azonban fokozódik a szorbitol képződése, következményes NADPH szint csökkenéssel. A szorbitol ozmotikus stresszt jelent a sejt számára, mely csökkenti a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -áz működését. A szorbitol oxidációja növeli a NADH:NAD^+ arányt a citoszólban, gátolva ezzel a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz enzimet és növeli a trióz-foszfát mennyiségét, melynek következtében nő a metilglioxál (advanced glycation endproduct-AGE prekursor) és a diacilglicerol (DAG) szintje, mely a protein-kináz C-t aktiválja (PKC) [68].

2. AGE-k fokozott képződése

Az AGE-k képződhetnek a glükóz intracelluláris autooxidációja révén, mely során glioxállá és metilglioxállá alakul. Ezek a reaktív intracelluláris dikarbonil vegyületek reagálnak a fehérjék amino csoportjaival, Schiff-bázis, Amadori-végtermék, végül pedig AGE képződik, melynek következtében számos mátrixfehérje funkcióját megváltoztatják [69]. Ez végül az erek csökkent elaszticitásához és megnövekedett permeabilitásához vezet. A sejtfelszínen lévő AGE-receptorokhoz kötődve megváltoztatják a makrofágok és mezangium sejtek citokin-termelését, az endoteliális sejteken a prokoaguláns és proinflammatorikus molekulák expressziója kerül előtérbe [70].

3. A PKC aktivációja

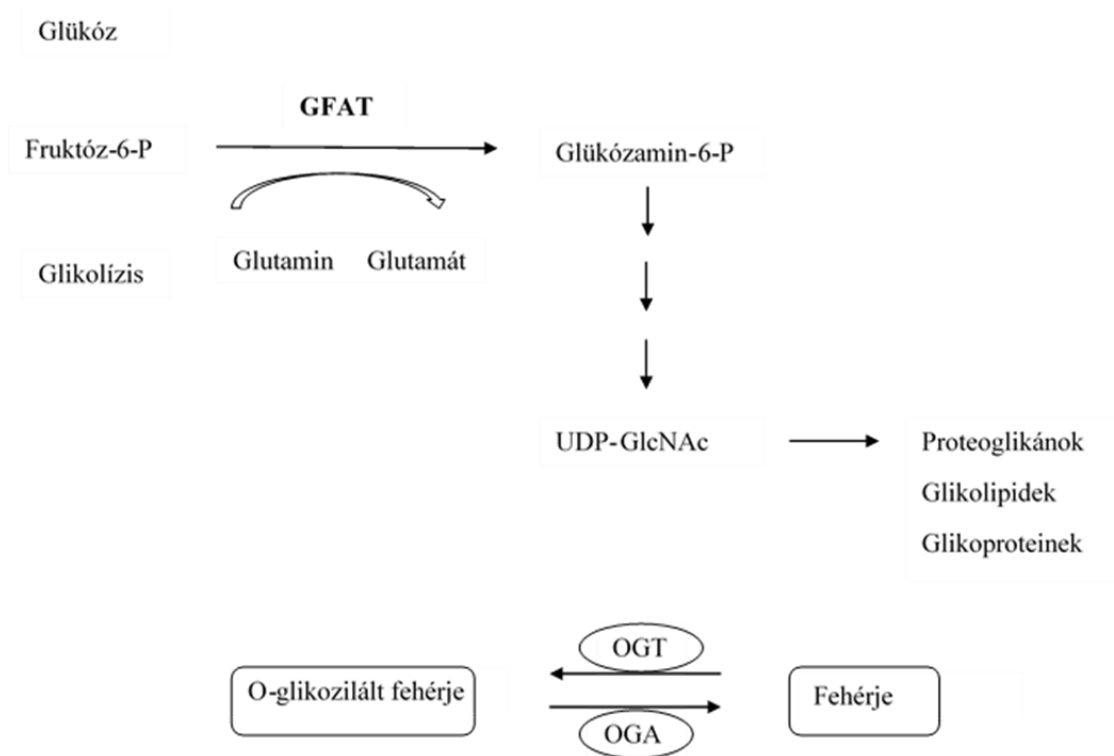
A PKC fehérjecsald 11 izoformája közül 9-et a másodlagos messenger diacil-glicerol (DAG) aktivál, melynek szintje hiperglikémiában nő. A PKC aktivációja különböző utakon a NO szint csökkenéséhez vezet [67], továbbá növeli az erek permeabilitását a VEGF expresszió növelése által [71]. Koya és mtsai kimutatták, hogy a PKC növeli a

mikrovaszkuláris mátrix protein akkumulációt a transforming growth factor- β (TGF- β), fibronektin és IV-es típusú kollagén expressziójának növelése által diabéteszes patkányok glomerulusaiban [72].

4. A hexozamin-útvonal fokozása által [67]

A hexózamin-bioszintézis útvonalon (HBP) (2. ábra) a sejt által felvett glükóz 2-5%-a halad át, mely UDP- β -N-acetilglükózaminná (UDPGlcNAc) alakul [73]. Az UDPGlcNAc az O-GlcNAc transzferáz (OGT) szubsztrátját képezi, mely enzim az O-glikoziláció nevű poszttranszlációs folyamat során N-acetyl-glükózamin alegységeket kapcsol nukleáris és citoplazmatikus fehérjék szerin és treonin oldalláncaihoz. A fehérjemódosulat neve „O-linked beta-N-acetylglucosamine” vagy O-GlcNAc [73]. DM-ben fokozódik az O-GlcNAc képződése azáltal, hogy a sejtbe áramló glükóz mennyisége nő, ennek következtében pedig nő a HBP-n átáramló glükózfluxus is.

Jó néhány vizsgálat kimutatta, hogy a HBP fokozódása extracelluláris mátrix proliferációhoz vezet [73], mely a korai diabéteszes nefropátia (DNP) egyik legkorábbi kritériumát képviseli. A folyamatot a TGF- β [74] és PAI-1 [75] mediálják. Az O-GlcNAc szintjének tartós növekedését összefüggésbe hozták már különböző betegségek kialakulásával, úgymint neurodegeneratív betegségek, daganatos megbetegedések és a DM [73]. Egyre több azoknak a kutatásoknak a száma, melyek az O-GlcNAc meghatározó szerepét bizonyítják a diabéteszes szövődmények, így a DNP kialakulásában. Például Masson és munkatársai mezangiumsejt kultúrán bebizonyították, hogy az O-GlcNAc szint növekedése sejthipertrófiához vezet [76], mely a DNP egy ismert jellemzője. Nerlich és munkatársai kimutatták, hogy a glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT), mely enzim szabályozza a glükóz belépését a HBP-be, jelen van a humán vesesejtekben és expressziója diabéteszes egyéneknél fokozott [77].



2. ábra. A hexózamin anyagcsere útvonal GFAT: *Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase*, *UDP-GlcNAc*: *UDP-β-N-acetylglucosamine*, *OGT*: *O-GlcNAc transzferáz*, *OGA*: *O-GlcNAcase*

3.9. Az oxidatív stressz

Oxidatív stressznek nevezzük azt az állapotot, amikor a prooxidánsok és antioxidánsok aránya a prooxidánsok felé tolódik. Ilyenkor a szervezetben a szabad gyökök vagy nem gyök természetű, reaktív molekulák képződése túlsúlyba kerül az antioxidáns folyamatokkal szemben. A szabad gyökök párosítatlan spinű elektronnal rendelkező molekulák, melyek nagy potenciállal lépnek reakcióba fehérjékkel, lipidekkel, nukleinsavakkal. Két nagyobb csoportjuk az oxigén eredetű szabad gyökök pl.: szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) és a hidroxil szabad gyök ($\cdot OH$)- valamint a nitrogén-eredetű szabad gyökök pl.: a nitrogén-monoxid szabad gyök ($\cdot NO$ -) [78]. Vannak olyan molekulák, melyek nem rendelkeznek párosítatlan elektronnal, mégis rendkívül reakcióképesek, ilyen pl: a hidrogén-peroxid (H_2O_2) és a peroxinitrit ($ONOO^-$).

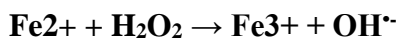
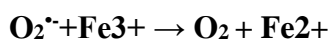
Az egészséges szervezet aerob folyamataiban állandóan keletkeznek szabad gyökök. Az érrendszerbe kerülő $O_2^{\cdot-}$ gyök legnagyobb hányadát a nikotinamid adenin dinukleotid

(foszfát) NAD(P)H oxidáz és mitokondrium eredetű szuperoxid gyök adja [79], mely a mitokondriális légzési láncban keletkezik. A szuperoxid gyök vizes közegben a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim révén H_2O_2 -á, majd a kataláz és a peroxidáz reakció során vízzé alakul [80]. A H_2O_2 fém ionok jelenlétében hidroxilgyökké alakul:



A fenti egyenletet leírói nyomán Haber-Weiss reakciónak hívjuk [81].

A vas katalizálta reakció vagy Fenton reakció során szuperoxid anion helyett vasion (Fe^{2+}) az elektron donor [82].



Az egészséges szervezetben antioxidáns rendszerek hivatottak az oxidatív stressz káros hatásainak kivédésére pl.: A-, E-, és C-vitamin, húgysav, albumin, bilirubin, glutation és a flavonoidok.

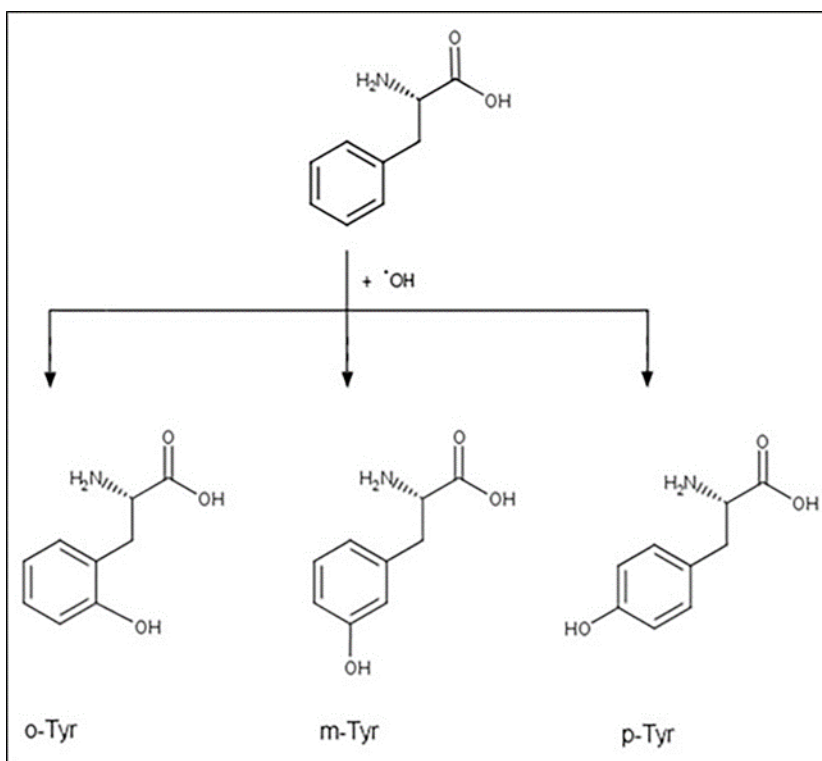
3.10. Az oxidatív stressz DM-ben

Ismert, hogy DM-ben fokozódik az oxidatív stressz, mely β -sejt diszfunkcióhoz és perifériás inzulin-rezisztenciához vezet. A β -sejt diszfunkció hátterében a nem-enzimikus glikáció, a mitokondriális légzési lánc és a membránhoz kötött NADPH oxidáz működése áll. Míg akut hiperglikémia a β -sejtekben fokozza az inzulin gén expresszióját, addig elhúzódó magas glükóz-koncentráció csökkenti mind az inzulin bioszintézisét, mind szekrécióját, mely folyamatot glükotoxícitásnak hívunk. Hiperglikémiában a β -sejtekbe az inzulin-független GLUT-2-n át beáramló glükóz miatt intracelluláris hiperglikémia alakul ki, mely a glükóz lebontásában szerepet játszó légzési lánc fokozott aktivációjához vezet. A folyamat fokozott NADPH felhasználással jár, mely a glutation redukciójához elengedhetetlen. Ezt tovább rontja a következményes ROS produkció illetve az, hogy a β -sejtek különösen vulnérábilisak a ROS-al szemben, mivel viszonylag alacsony a kataláz és glutation-peroxidáz expressziójuk [83]. A JNK útvonal aktiválódása az IRS-1 és -2 gátló foszforilációja révén rontja az inzulin jelátvitelét [84].

Mindezen folyamatok együttese vezet az inzulin csökkent gén-expressziójához, csökkent szekréciójához és a β -sejtek apoptózishoz [85].

A DM-ben kialakuló perifériás inzulin-rezisztencia hátterében is számos vizsgálat igazolta a ROS szerepét. Houstis és munkacsoportja 3T3-L1-adipociták TNF- α kezelése során inzulin-rezisztenciát idézett elő, mely kimosással vagy pioglitazon adásával reverzibilis volt [62]. Rudich és munkacsoportja igazolta, hogy ROS hatására csökkent a GLUT-4 transzlokációja 3T3-L1-adipocitákban azáltal, hogy a ROS az IRS-1 és a PI3K redistribúciójában okozott zavart [86]. A JNK útvonal vizsgálata azt igazolta, hogy nem csupán a β -sejt diszfunkcióban, hanem a perifériás inzulin-rezisztencia kialakulásában is szerepet tölt be [84]. Diabéteszes egyéneknél az antioxidáns N-acetilcisztein, taurin [87] és α -liponsav [88] akut és krónikus adagolása is csökkentette a hiperglikémia-indukálta inzulin-rezisztencia kialakulását alátámasztva ezzel a ROS szerepét a folyamat kialakulásában.

3.11. Az oxidált fenilalanin-származékok (3. ábra)



3. ábra. Oxidált fenilalanin-származékok keletkezése. *OH szabad gyök hatására nem csak a fiziológiás para-tirozin (p-Tyr), hanem a patológiás meta-Tyr (m-Tyr) és orto-tirozin (o-Tyr) is keletkeznek [89]*

Az oxidatív stressz során képződő ROS-ok, nagyon reaktív molekulák, nagyon könnyen reagálnak lipidekkel, fehérjékkel, aminosavakkal és nukleinsavakkal, mely során ezen molekulák károsodását okozzák. A folyamat során kialakult stabil makromolekuláris végtermékek alkalmasak lehetnek arra, hogy az oxidatív stressz markerei legyenek.

A tirozin (Tyr) egy nem-esszenciális aminosav, mely a fenilalanin-hidroxiláz enzim által katalizált reakcióban keletkezhet a szervezetben, az esszenciális fenilalaninból (Phe). Az enzimatis reakció végterméke a para-tirozin (p-tyr), melyben a benzol gyűrűn a hidroxil csoport para helyzetű [90]. Az OH szabad gyök képes a fenilalanin benzolgyűrűjével reakcióba lépni, jelenlétében, nem enzimatis úton, a fenilalanin para-tirozin mellett meta- (m-tyr) és orto-tirozinná (o-Tyr) is alakulhat. Az

ilyen módon keletkező p-, m- és orto-tirozin mennyisége elenyésző az enzimatis útton képződő p-Tyr-éhoz képest, továbbá nem ismert emberben olyan folyamat, mely során a fenilalaninból enzimatis útton m- vagy o-tirozin keletkezne. Így a m- és o-Tyr izomerek a hidroxil szabad gyök, egyben az oxidatív stressz markereinek tekinthetők [91].

A Tyr izomerek szerepét széles körben vizsgálták mind akut, mind krónikus oxidatív stresszel járó állapotokban. Ogihara és munkatársai ischaemiás encefalopátiában szenvedő újszülöttek cerebroszpinális folyadékában szignifikánsan magasabb o- és m-Tyr szintet mértek a kontroll csoporthoz képest [92]. Dandona és munkatársai egészséges önkéntesek szérumban mérve az m- és o-Tyr szinteket 48 óra éhezést követően, a két molekula szintjének csökkenését tapasztalták parallel a szimultán mért ROS produkció csökkenésével, mely eredmény arra mutat, hogy gyulladásban a leukociták által termelt ROS szintje nagymértékben befolyásolja a szérumban m- és o-Tyr szintjét [93]. Ezen eredményekkel összhangban, szeptikus betegek szérumban mért m- és vizeletében mért m- és o-Tyr szintje parallel változik a gyulladós paraméterekkel (CRP és PCT) [94]. Az intenzív ellátást igénylő betegekben jelen levő fokozott oxidatív stressz mellett, a szintén ezen betegcsoportban megfigyelt hiperglikémia tovább fokozza az oxidatív stressz mértékét, ezáltal a m- és o-Tyr szintjét, melyek feltehetően az inzulin jelátvitelének megzavarásán keresztül is tovább rontják az inzulin-rezisztenciát [95].

Az oxidált fenilalanin-származékok krónikus, gyulladással járó állapotokban betöltött szerepét több vizsgálat bizonyítja. Szijártó és munkatársai megfigyelték a vaszkuláris inzulin-rezisztencia fokozódását a perifériáról a centrum felé haladva az artériás rendszerben, mely az érfal parallel o-Tyr szint növekedésével járt [96]. Továbbá patkányok o-Tyr-nal való etetése vaszkuláris inzulin-rezisztenciához vezet és az érfal o-Tyr szintjének növekedése kíséri [97]. Kun és munkatársai krónikus vesebetegségben szenvedő egyének szérumait vizsgálva összefüggést találtak a plazma o-Tyr és o-Tyr/p-Tyr szintje és az EPO rezisztencia mértéke között [98]. A háttérben potenciálisan meghúzóó okok egyike az eritroid prekursorok fokozott o- és m-tyr felvétele, melyet Mikolás és mtsai támasztott alá, amikor m- és o-Tyr szupplementációban részesült eritroblasztok esetén 50%-al alacsonyabb proliferációt mértek a kontrollhoz képest [99]. A Tyr izomerek vaszkuláris hormon-rezisztencia kialakulásában betöltött szerepét vizsgálta Sélley és munkatársai. Magas koleszterin-tartalmú diétán tartott patkányokat hasonlítottak össze normál diétán lévő állatokkal, ahol az első csoportot később

kettéosztva az állatok egy része p-Tyr-t kapott. Eredményeik alapján a koleszterinnel etetett csoportban alacsonyabb inzulinválasz váltható ki, mely p-Tyr segítségével részben normalizálódik, továbbá a koleszterinnel etetett csoportban az érfal m-Tyr tartalma szignifikánsan magasabb volt a kontrollokéhoz képest és p-Tyr adásával részben normalizálható volt [100].

Mindezeken túl, több tanulmány eredménye felveti azt a lehetőséget, hogy az m- és o-tyr önmagában is képes bizonyos eltérések kiváltására. Ruggiero és mtsai szerint a m- és o-tyr csökkent tumornövekedést okoz a STAT-5 és az ERK foszforilációjának befolyásolása révén [101]. Mikolás és munkatársai vizsgálataikban kimutatták, hogy a módosult tirozinok a sejtfehérjékbe beépülve változtatják meg az EPO jelátviteli folyamatait [102] és ezáltal vezetnek csökkent sejt-proliferációhoz.

4. CÉLKITŰZÉSEK

- Célul tűztük ki annak bizonyítását, hogy az oxidált fenilalanin-származékok idő- és koncentrációfüggő módon csökkentik az inzulin-indukálta glükózfelvételt 3T3-L1-sejtekben.
- Bizonyítani kívántuk, hogy a sejtek, nevezetesen a 3T3-L1-adopiciták, HEK-sejtek és makrofágok a megváltozott fenilalanin-származékokat felveszik és intracelluláris fehérjéikbe beépítik.
- Célunk volt az ennek háttérében álló jelátviteli útvonalak tisztázása 3T3-L1- és HEK-sejtekben valamint makrofágokban.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Sejtvonalak

3T3-L1 egér fibroblasztokat (American Type Culture Collection, Manassas, VA, US) 75 cm²-es flaskákon növesztettük, a kísérletek előtti 12. napon pedig 60 mm-es petricsészékre szélesztettük (10⁵ db sejt/petricsésze). A sejtek az 1-3. napig indító médiumban szaporodtak [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 10% bovine serum albumine (BSA), 100 U/ml penicillin és 0.1 mg/ml streptomycin], majd a 3. napon differenciálás következett, hogy a fibroblasztok adipocitákká alakuljanak [(250 nM dexametazon, 0,17 nM inzulin, 0,5 nM izobutilmetilxantin, 10 % főtális borjú szérum (FBS)]. Az 5-11. napig a sejteket 10% FBS-t és 1,5 µg/ml inzulint tartalmazó médiumban tenyésztettük, másnaponta médiumcsere történt. A kísérleteket 12 órás szérummegvonást követően végeztük, ekkor a sejtek 85-90%-a zsírsejt fenotípusúvá differenciálódott (lekerékített sejtek, habos, lipiddús citoplazmával). Kísérlettől függően a médiumok glükóztartalma 5 és 25 mM volt, a gyárilag 397 µM paratirozin mellé szintén további 397 µM p-, o- vagy m-Tyr-t adtunk. A tirozinkezelések időfüggésének vizsgálatokor a petricsészékre 0, 1, 2, 3, 4, 5 vagy 12 napig kerültek a módosított tirozin-származékok, míg a koncentráció-függés vizsgálatokor 397 µM o-, vagy m-Tyr mellett növekvő koncentrációjú p-Tyr jelenlétében (397 µM, 794 µM, 1177 µM és 1574 µM) inkubáltuk a sejteket. A sejteket 200 vagy 400 nmol/l koncentrációjú inzulinnal kezeltük 5 percig. Kezelést követően mosás, lízisz és -70 °C-ra fagyasztás következett.

HEK-293 immortalizált epiteliális sejteket (ATCC (Manassas, Va, US) és J774A.1 egér BALB/C monocita-makrofág sejteket (91051511-1VL, Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország) 10% FBS, inzulin-szelén-transzferrin, 100U/ml penicillin és 0,1 mg/mL streptomycin tartalmú DMEM-en tenyésztettük. Kísérlettől függően a médiumok glükóztartalma 5 és 25 mM volt, a gyárilag 397 µM p-Tyr mellé szintén további 397 µM p-, o- vagy m-Tyr-t adtunk. Kezelés előtt a sejteket egy éjszakán át szérummentes médiumban inkubáltuk, majd a 400 nmol/l-es, 5 perces inzulinkezelést követően mosás és lízisz következett, mely után a mintákat -70 °C-ra lefagyasztottuk.

5.2. Glükózfelvétel vizsgálata izotópos módszerrel

A glükózfelvétel vizsgálatához a sejteket 30 percig glükózmentes médiumban inkubáltuk, 12 órás faktormegvonást követően. Minden petricsészére 1,98 ml DMEM, és 2 µl mennyiségű, 1 mCi/ml aktivitású (3.7x10⁴Bq/ml) deoxi-D-glükóz 2-[1-²-³H(N)] került (Izotóp Intézet, Magyarország). A kezelés során a sejteket 20 µl mennyiségű, különböző koncentrációjú inzulinnal (0, 2, 20, 200, 400 nM) kezeltük. A glükózfelvételt a megelőző vizsgálatunk során leghatékonyabbnak ítélt 100 perces inkubáció után vizsgáltuk. Az inkubációs idő leteltével a petricsészéket jégre helyeztük, a médiumot leszívtuk, majd foszfát pufferes mosást követően a sejteket lekapartuk és 15 percig lizáltuk (70 µl) Trisz-Triton extrakciós lízis során (1 mmol/l TriszHCl, pH 7,4; 1,15 térf% Triton X-100, 500 mmol/l EDTA, 200 mmol/l EGTA, 100 mmol/l dithiothreitol, 100 mmol és 0,5%-os PMSF, leupeptin, aprotinin, valamint gyári foszfatáz inhibitor koktél 1 és 2). Erőteljes vortexelés és újabb 5 perces lízis után 30 µl mintát szűrőpapírra csöppentettünk és szintillációs koktélba helyeztünk, majd a mintákat szcintillációs számlálóba tettük (5 min/minta) (Beckman LS 5000). A minták fehérjetartalmát Bio-Rad kit segítségével (Hercules, California, CA, USA), spektrofotometriás méréssel (Hitachi U1100) határoztuk meg. A glükózfelvételt az 5 perces mérés aktivitásának és a minta fehérje-koncentrációjának hányadosával fejeztük ki (percenkénti beütés [Counts per minute (CPM)]/µg).

5.3. Western-blot analízis

Kísérleteinkhez –amennyiben külön fel nem tüntetjük- a Sigma-Aldrich (St. Louis Mo, USA) reagenseit használtuk. Az inzulinkezelést követően a petricsészéket jégre helyeztük, mostuk, majd 30 percig Trisz-Triton extrakciós pufferben lizáltuk (80 µl/minta). A lizátumokat egy éjszakára -70 °C-ra hűtöttük, ezt követően 4 °C-on centrifugáltuk (10 perc, 14000 g). A felülúszó fehérje-koncentrációját „Bio Rad protein assay kit” segítségével, módosított Bradford módszerrel határoztuk meg, standarként BSA-t használtunk (Bio-Rad Benchmark Plus). Ezt követően a mintákat Laemli-pufferben [100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4,0% nátrium dodecil szulfát (SDS), 20% glicerol, 200 mM DTT és 0,2% brómfenolkék] oldottuk, a fehérjéket (80-120 µg /minta) poliakrilamid-gélen (10%-os gél az Akt és p-Akt esetén; 7,5% -os gél az IRS-1 és p-IRS-1 esetén) elektroforézis során szétválasztottuk. A gélekről a fehérjéket polivinilidene

difluoride membránra (Millipore, Billerica, MA, USA) transzferáltuk 8,3 pH-jú pufferben (38 mM glicin, 48 mM Tris-base, and 20% metanol). A membránokat 0,1 % Tweent és 5% BSA-t tartalmazó trisz-NaCl oldatban blokkoltuk, majd 4 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitesteket tartalmazó oldatban [1:1000 anti-foszfo-(Ser473)-Akt (Cell Signaling Technology, Beverly, USA) és 1:2500 anti-foszfo-(Tyr612)-IRS-1]. Mosást követően a membránokat az elsődleges antitesthez illesztett peroxidáz-konjugált poliklonális másodlagos antitesttel inkubáltuk (anti-nyúl, IgG, 1:2000 (Cell Signaling Technology, Beverly, USA) szobahőmérsékleten, egy órán át. A total PKB/Akt (Cell Signaling Technology, Beverly USA) és total IRS fehérje jelöléséhez a membránokról eltávolítottuk az antitesteket “stripping” puffer segítségével (1,5% glicin, 0,1% SDS, 1% Tween-20, pH: 2.2) 2x10 perces mosás során. A membránokat szobahőn egy órán át inkubáltuk az elsődleges, majd egy órán át a másodlagos antitestekkel. Mosást követően felerősített kemilumineszcencia (ECL) (Super-Signal West Pico, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) segítségével a blotokat láthatóvá tettük, a bendekezelést számítógépes módszerrel (Scion Image for Windows Software) integrált optikai denzitás mérésével végeztük. A fehérje-foszforilációt minden esetben a teljes fehérje-mennyiségre korigáltuk és a kontrollokhoz viszonyítottuk.

5.4. HPLC-analízis

A minták előkészítése az alapján történt, hogy milyen típusú tirozin mennyiségét szándékoztunk meghatározni. Módszereinket, kisebb változtatásokkal, munkacsoportunk korábbi publikációira alapoztuk.

A teljes, fehérjéhez kötött tirozin mennyiség meghatározásához, minden egyes mintához 200 µl desztillált vizet adtunk, majd a mintákat egy éjszakán át -70 °C-on tartottuk, a sejtlízis elérésének céljából. Miután a mintákat felolvasztottuk és 4000 rpm fordulaton, 10 percig centrifugáltuk, a szupernatáns 200 µl-éhez további 200 µl 60 %-os triklórecetsavat adtunk, melyet 30 perces inkubáció követett jégen, annak céljából, hogy precipitáljuk a fehérjéket. Ezt újabb 10 perces centrifugálás követte 4000 rpm fordulatszám mellett, az üledéket 1%-os triklórecetsavban reszuszpendáltuk majd a szuszpenzióhoz 4 µl 400 mM-os desferroxamint és 40 µl 500 mM-os butyl-hidroxi-toluolt adtunk, hogy megakadályozzuk a hidrolízis során lehetséges szabad gyökök képződését.

Ezután az elegyhez 200 µl 6N-os sósavat adtunk majd éjszakán át tartó hidrolízis következett 120 °C-on. A hidrolizátumot 0,2 µm pórusnagyságú filteren szűrtük át (Millipore Co., Billerica, MA, USA), majd a filtrátumból 20 µl-t a Shimadzu Class LC-10 ADVP HPLC rendszer oszlopára fecskendeztünk (Shimadzu USA Manufacturing Inc., Canby, OR, USA), Rheodyne kézi injector segítségével.

A teljes, intracelluláris nem fehérjéhez kötött Tyr mennyiség méréséhez, az egy éjszakán át tartó, -70 °C-os fagyasztást megelőzően a mintákhoz 200 µl desztillált vizet adtunk, mely elősegítette a sejtlízist. A felolvasztott mintákat 15 percig, 15000 rpm fordulatszámom centrifugáltuk, majd a felülúszó 200 µl-éhez, 200 µl 60%-os triklórecetsavat adtunk. Harminc percig jégen inkubáltuk a mintákat, majd újabb 15 perces centrifugálás következett, 15000 rpm fordulatszámom. A felülúszót a fenti módon átszűrtük, ötszörösére hígítottuk és a filtrátum 40 µl-éhez 160 µl desztillált vizet adtunk, melyet végül a HPLC oszlopra injektáltunk.

A p-, o- és m-Tyr mennyiségét autofluorszcenciájuk alapján mértük meg a mintákban, így festésre vagy tisztításra nem volt szükség. A mérést, RF-10 AXL fluorszcens detektorral (Shimadzu USA Manufacturing Inc., Canby, OR, USA) felszerelt Shimadzu Class 10 HPLC készülékkel végeztük. A mobil fázist 1%-os ecetsav és 1%-os Na-acetát vizes oldata képezte, az elválasztás LiChroCHART 250-4, oszlopon (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany) reverz fázisú készülékkel történt. Meghatároztuk a mintában lévő p-, o- és m-tirozin ($\lambda_{EX}= 275$ nm; $\lambda_{EM}= 305$ nm) és Phe ($\lambda_{EX}= 258$ nm; $\lambda_{EM}= 288$ nm) mennyiségét. Az aminosavak koncentrációjának pontos meghatározásához külső standarddal kalibráltunk és meghatároztuk a görbe alatti területet [Area Under the Curve (AUC)]. Az aminosavak koncentrációját a *totál-tirozin-koncentrációra* korrigáltuk.

5.5. Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez az SPSS Statistics 27-t és a GraphPad Prism 8-as szoftverjét használtuk (IBM Company, IL, USA). A kísérleteket n=5-10 darabszámom ismételtük minden kísérlet esetén. Az adatok eloszlásának normalitását Kolmogorov-Smirnov teszt segítségével állapítottuk meg. A normális eloszlású eredményeket

parametrikus tesztekkel, míg a nem-normális eloszlású adatokat nem-parametrikus tesztekkel analizáltuk. Többszörös összehasonlítás során, normális eloszlású adatok esetén, varianciaanalízis (ANOVA) történt, míg nem-normális eloszlású adatok esetén Kruskal-Wallis tesztet használtunk, szignifikáns eredmény esetén a páronkénti összehasonlítás Mann-Whitney U teszttel történt. A normális eloszlású eredmények páronkénti összehasonlítása független mintás t-próbával történt. Abban az esetben, ha a kontroll-minta értéket vettük 100%-nak és a változást ehhez hasonlítottuk, egymintás t-próbát használtunk.

6. EREDMÉNYEK

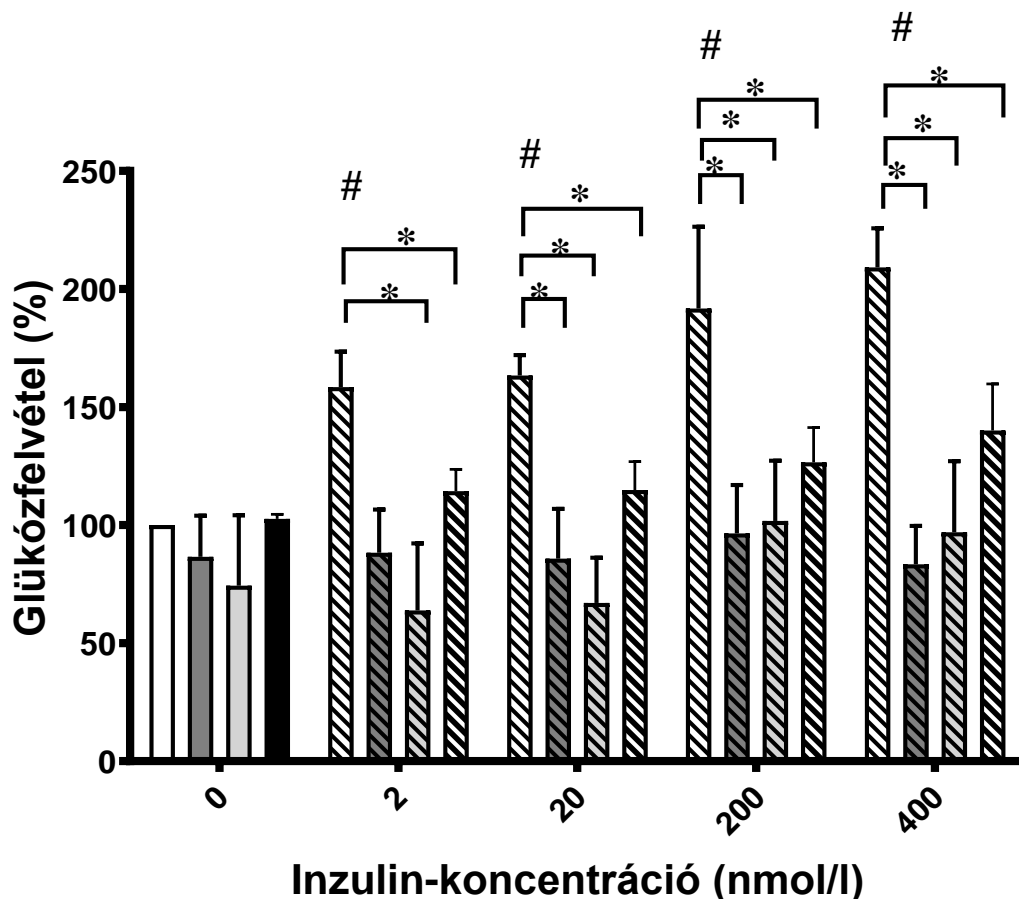
6.1. Az orto- (o-Tyr) és meta-tirozin (m-Tyr) gátolja az inzulin-indukálta glükózfelvételt

Az 5 mmol/l glükózt és p-Tyr-t tartalmazó médiumban tenyésztett 3T3-L1-adipociták inzulin-indukálta deoxy-D-glükóz 2-[1 2-3H(N)] felvétele minden alkalmazott inzulin-koncentráció (2, 20, 200, 400 nmol/l) esetén szignifikánsan magasabb volt a kontrollhoz (kezeletlen, paratirozin, 5 mmol/l glükóz) képest (ábra, fehér oszlop, # $p < 0,05$), és az inzulin-koncentráció növelésével növekedett. A legmagasabb értéket, több, mint 200%-os növekedést, a 400 nmol/l inzulin használata mellett mértünk. A 25 mmol/l glükózt és p-Tyr-t tartalmazó médiumban tenyésztett sejtek inzulin-rezisztenssé váltak, deoxy-D-glükóz 2-[1 2-3H(N)] felvételük egyetlen alkalmazott inzulin-koncentráció mellett sem volt szignifikáns a saját (paratirozin, 25 mmol/l glükóz) kontrollhoz képest (fekete oszlop), ugyanakkor minden alkalmazott inzulin-koncentráció esetén szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az adott kezelésben az 5 mmol/l-en tenyésztett sejtekhez képest (* $p < 0,05$).

Amennyiben az 5 mmol/l glükózt tartalmazó médiumba 0,39 mmol/l koncentrációjú m-Tyr-t oldottunk, a gyárilag meglévő 0,39 mmol/l p-Tyr mellé, a sejtek inzulin-rezisztenssé váltak, nem tapasztaltunk szignifikáns glükózfelvételt egyetlen alkalmazott inzulin-koncentráció esetén sem a saját kontrollhoz képest (sötétszürke oszlop), ugyanakkor szignifikánsan alacsonyabb volt a glükózfelvétel az adott kísérleten belüli, para-tirozinon tenyésztett sejtekhez képest a 20, 200 és 400 nmol/l-es kezelés esetén (* $p < 0,05$).

Hasonló eredményt kaptunk akkor is, amikor a 0,39 mmol/l-es, gyári p-Tyr-koncentráció mellé további 0,39 mmol/l o-Tyr-t oldottunk, úgy azt tapasztaltuk, hogy a sejtek a magas glükózon való tenyésztéshez hasonlóan inzulin-rezisztenssé váltak és egyetlen alkalmazott inzulin-koncentráció mellett sem volt szignifikáns a deoxy-D-glükóz 2-[1 2-3H(N)] felvétel, a saját kontrollhoz képest (világosszürke oszlop), azonban minden kezelés esetén szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a glükózfelvétel az adott

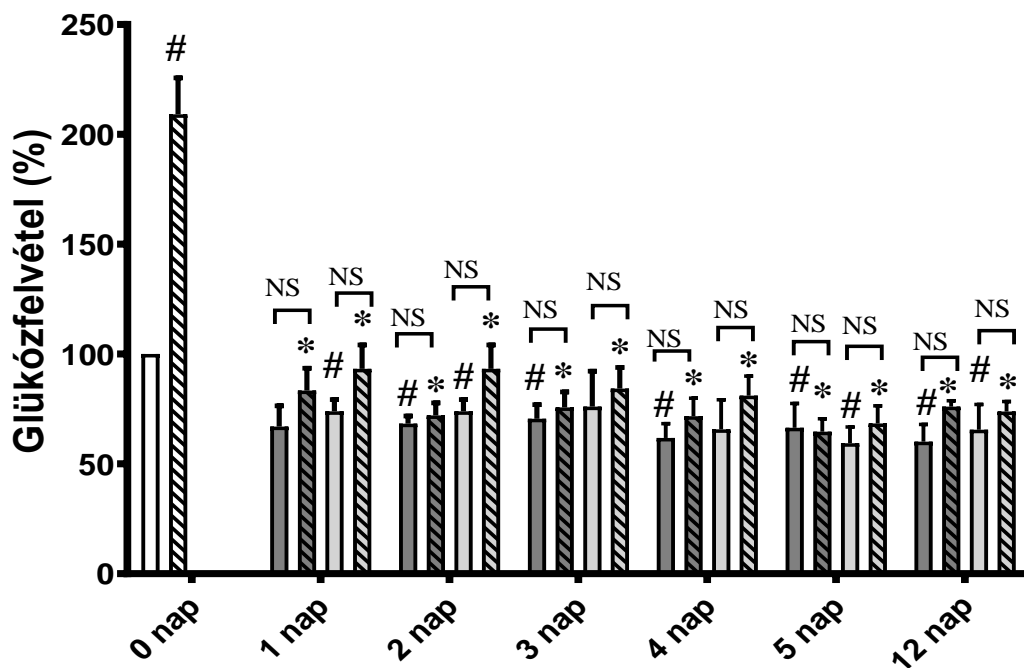
kezelésen belül az 5 mmol/l, csak p-Tyr-on nőtt sejtek glükózfelvételéhez képest (* $p < 0,05$). (4. ábra)



4. ábra. A magas glükózsztint, az orto- és a metatirozin hatása a 3T3-L1-adipociták inzulin indukálta deoxy-D-glükóz 2-[1 2-3H(N)] felvételére. A sejtek glükózfelvételét megvizsgáltuk para-tirozin jelenlétében, 5 mmol/l glükózt tartalmazó médiumban (fehér oszlop), para-tirozin jelenlétében, 5 mmol/l glükózon meta-tirozin jelenlétében (sötétszürke oszlop), 5 mmol/l glükózon orto-tirozin jelenlétében (világosszürke oszlop) és 25 mmol/l glükózt tartalmazó médiumban (fekete oszlop). A sejteket emelkedő koncentrációjú inzulinnal kezeltük (0, 2, 20, 200, 400 nmol/l). 100%-nak az 5 mmol/l-en, para-tirozin jelenlétében, inzulinkezelés nélküli, bazális glükózfelvételt tekintettük. (# $p < 0,05$ vs kontroll para tirozin). Az eredményeket átlag \pm SEM-ben tüntettük fel, $n=5-10$ különálló mérést követően [89].

6.2. Az o- és m-Tyr deoxy-D-glükóz 2-[1 2-3H(N)] felvételre gyakorolt gátló hatása, időfüggő módon valósul meg

A 3T3-L1-adipocitákat különböző ideig (1, 2, 3, 4, 5, 12 nap) tenyésztettük 0,39 mmol/l hozzáadott o-, vagy m-Tyr-t tartalmazó médiumon. Míg a p-Tyr-on nőtt sejtek deoxy-D-glükóz 2-[1 2-3H(N)] felvétele 400 nmol/l inzulinkezelés hatására több, mint 200%-os volt a kontrollhoz képest, addig sem az o-, sem a m-Tyr-on tenyésztett sejtek esetén nem tapasztaltunk szignifikáns inzulin-indukálta glükózfelvétel-emelkedést a saját, o- és m-Tyr-on nőtt kontrollokhöz képest, már egy napos kezelést követően sem. Az o- és m-Tyr-on nőtt sejtek bazális glükózfelvétele szignifikánsan alacsonyabb volt a para-Tyr-on nőtt sejtekhez képest minden esetben, kivétel az 1 napos m-, valamint a 3 és 4 napos o-Tyr-on való tenyésztést követően. Az o- és m-Tyr-on nőtt sejtek esetén minden esetben szignifikánsan alacsonyabb inzulin-indukálta glükózfelvételt tapasztaltunk, mint a p-Tyr-on tenyésztett sejtek esetén (* $p < 0,05$ vs. para inzulin). (5. ábra)



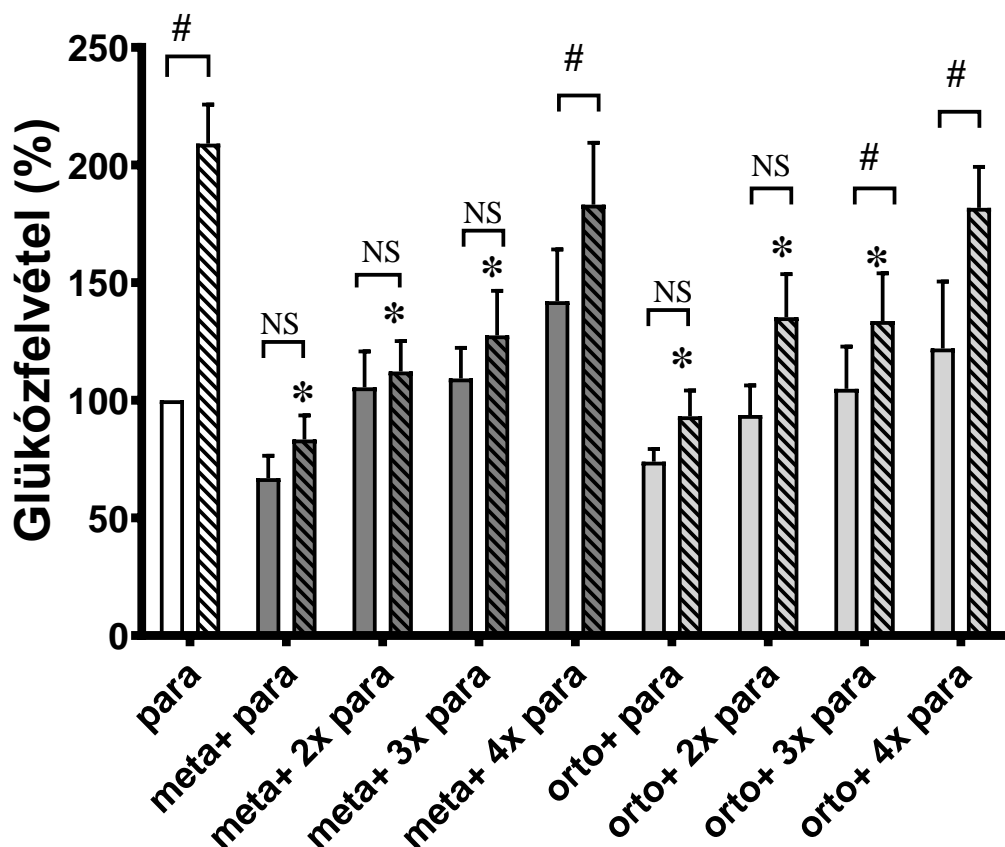
5. ábra. A 3T3-L1-sejtek deoxy-D-glükóz 2-[1 2-3H(N)] felvételének vizsgálata 1, 2, 3, 4, 5, 6 és 12 napos orto-, (o-Tyr) vagy metatirozint (m-Tyr) tartalmazó médiumban való tenyésztést követően, inzulinnal (400 nmol/l) vagy anélkül. A paratirozinon (p-Tyr), 5 mmol/l glükózt tartalmazó médiumban nőtt sejtek bazális glükózfelvétele tekintettük 100%-nak. Az eredményeket átlag \pm SEM-ben tüntettük fel, $n=5-8$ különálló mérést követően. # $p < 0,05$ vs para kontroll (egyminás t-próba);

**p < 0,05 vs. para-tirozin+inzulin (független mintás t-próba), NS: nem szignifikáns. Az oszlopok a p-Tyr-on (fehér oszlop), m-Tyr-on (sötétszürke oszlop) és o-Tyr-on (világos szürke oszlop) nőtt kontroll (sima oszlop) és inzulin-kezelt (sávós oszlopok) sejteket mutatják [89].*

6.3. Az o- és m-Tyr deoxy-D-glükóz 2-[1 2-3H(N)] felvételre gyakorolt gátló hatása, koncentráció-függő módon valósul meg

Az 5 mmol/l glükózt tartalmazó médiumban nőtt 3T3-L1-adipociták glükózfelvétele több, mint 200%, 400 nmol/l inzulin hatására, az inzulinkezelés nélküli glükóz-felvételhez képest. A gyári médium 0,39 mmol/l p-Tyr-t tartalmaz. Megvizsgáltuk az inzulin-indukálta glükózfelvételt olyan sejtekben, ahol a médiumba 0,39 mmol/l o- vagy 0,39 mmol/l m-Tyr-t oldottunk, a már benne lévő 0,39 mmol/l p-Tyr mellé. Eredményeink szerint az o-Tyr-on nőtt sejtek esetén a bazális (# p<0,05 vs para kontroll) és az inzulin-indukálta glükózfelvétel (*p<0,05 vs para inzulin) is szignifikánsan alacsonyabb, a csak p-Tyr-on nőtt sejtekhez képest, továbbá nem nő szignifikánsan a glükózfelvétel 400 nmol/l inzulin hatására ezekben a sejtekben. A 0,39 mmol/l m-Tyr-on nőtt sejtek esetén csak az inzulin-indukálta glükózfelvétel különbözött szignifikánsan (*p<0,05 vs para inzulin) a csak p-Tyr-t tartalmazó médiumon nőtt sejtek inzulin-indukálta glükózfelvéletétől, továbbá nem nőtt szignifikánsan a glükózfelvétel 400 nmol/l inzulin hatására ezekben a sejtekben sem. Ezt követően elkezdtünk egyszeres- (0,78 mmol/l), kétszeres- (1,17 mmol/l), és háromszoros- (1,56 mmol/l) mennyiségű p-Tyr-t adni a gyárilag jelenlévő p- és az általunk beoldott o- vagy m-Tyr mellé. Az o-Tyr-on nőtt sejtek esetén 0,78 mmol/l p-Tyr tartalom a médiumban megszüntette a bazális glükózfelvételben mutatkozó szignifikáns különbséget a csak p-Tyr-on nőtt sejtekhez képest; 1,17 mmol/l p-Tyr tartalom esetén visszatért az inzulinhatás, tehát szignifikánsan nőtt ezekben a sejtekben a glükózfelvétel 400 nmol/l inzulin hatására az inzulin nélküli kontrollokhoz képest; 1,56 mmol/l p-Tyr tartalom esetén pedig megszűnt a szignifikáns különbség az inzulin-indukálta glükózfelvételben a csak p-Tyr-on nőtt sejtek inzulin-indukálta glükózfelvéletéhez képest. A m-Tyr-on nőtt sejtek esetén 1,56 mmol/l p-Tyr tartalom kellett ahhoz, hogy visszatérjen az inzulinhatás, tehát szignifikáns különbség mutakozzon az inzulin-indukálta glükózfelvételben az inzulin nélküli glükózfelvételhez képest, továbbá az 1,56 mmol/l p-Tyr tartalom mellett nem volt már szignifikáns

különbség az inzulin-indukálta glükózfelvételben a csak p-Tyr-on nőtt sejtekhez képest. (6. ábra)

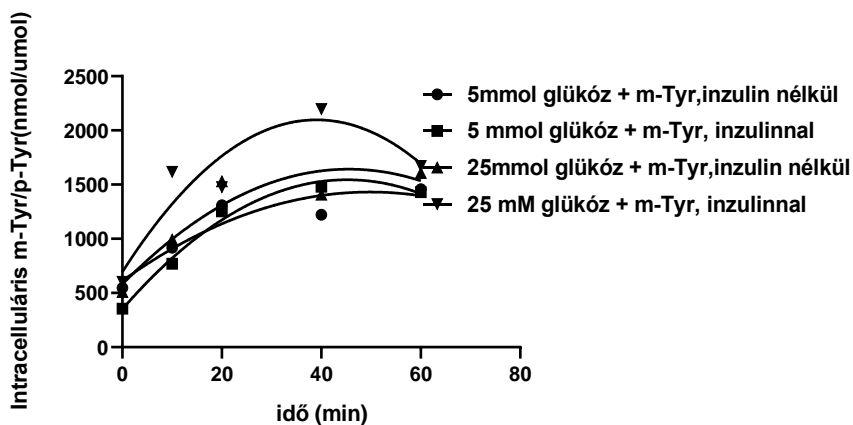
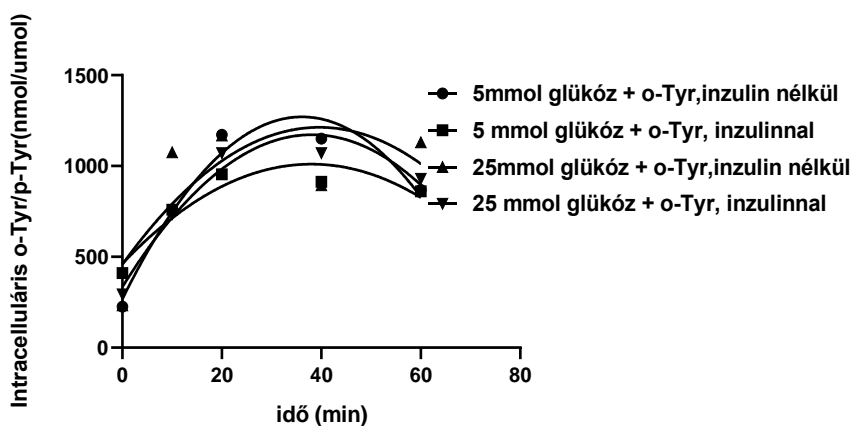
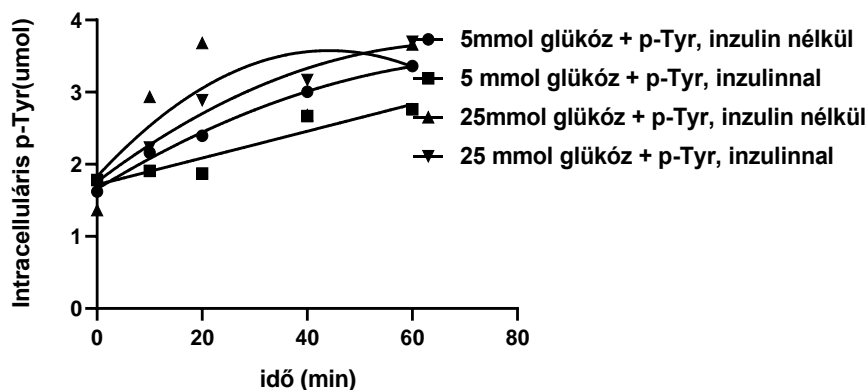


6. ábra. A 3T3-L1-sejtek deoxy-D-glükóz 2-[1 2-3H(N)] felvételének vizsgálata a médium meta- (m-Tyr) (sötétszürke) és ortotirozin (o-Tyr) (világosszürke oszlopok) tartalmának függvényében, 400nmol/l inzulinnal (sávozott oszlopok) vagy anélkül (sima oszlopok), 5 mmol/l glükózt tartalmazó médiumban. A 0,39 mmol/l (gyári) paratirozin (p-Tyr) tartalmú médiumon nőtt sejtek bazális glükózfelvételét tekintettük 100%-nak. Az eredményeket átlag \pm SEM-ben tüntettük fel, $n=10$ különálló mérést követően, * $p < 0,05$ vs p-Tyr + inzulin (független mintás t-próba), # $p < 0,05$ vs identikus kontroll (egymintás t-próba és független mintás t-próba), NS: nem-szignifikáns. [89]

6.4. A zsírsejtek mind az o- mind a m-Tyr-t képesek percek alatt felvenni és azokat sejtfehérjéikbe beépíteni.

Az oxidatív stressz által megváltoztatott aminosavak úgy károsíthatják az inzulinjelátvitelt, hogy a sejtek a transzláció során azokat fehérjéikbe beépítik. Ehhez értelemszerűen ezen aminosavak celluláris felvétele szükséges. Emiatt megvizsgáltuk azt,

hogy az abnormális aminosavakat képesek-e a zsírsejtek felvenni. Ennek érdekében megmértük a sejtek intracelluláris, fehérjéhez nem kötött p-Tyr tartalmát, továbbá megmértük az o-Tyr/p-Tyr és m-Tyr/p-Tyr arányokat. Eredményeink szerint a sejtek az aminosavakat felveszik, mely folyamat független a médium glükóz-koncentrációjától (5 vagy 25 mmol/l) és inzulin-tartalmától egyaránt (7. ábra).

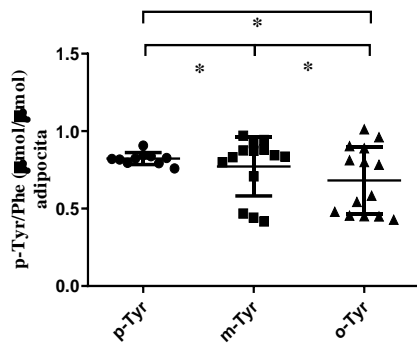


7. ábra. 3T3-L1-adipociták fehérjéhez nem-kötött, citoszólikus intracelluláris para- (p-Tyr) (felső panel), meta- (m-Tyr) (középső panel) és ototirozin (o-Tyr) (alsó panel) tartalmának mérése HPLC-módszerrel, különböző tirozinokkal történt időfüggő inkubálást követően inzulinkezelés nélkül 5 és 25 mmol/l glükóz-koncentrációjú médiumban; valamint inzulinkezelés (400 nmol/l) után 5 és 25 mmol/l glükóz-koncentrációjú médiumban. A sejtek p-Tyr tartalmát abszolút koncentrációban, míg o- és m-Tyr tartalmát a p-Tyr arányában tüntettük fel. Az eredmények között nem volt szignifikáns összefüggés (ANOVA) [89].

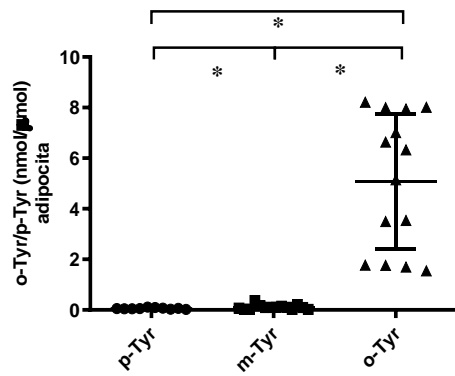
6.5. Mind az o-, mind az m-Tyr beépülhet a 3T3-L1-sejtek intracelluláris fehérjéibe

Megvizsgáltuk, hogy az o- és m-tyr beépül-e a sejtfehérjékbe. Tizenkét napos p-, o-, vagy m-Tyr-on való tenyésztést követően megmértük az intracelluláris, fehérjéhez kötött tirozinok mennyiségét 3T3-L1-adipocitákban. Az o-, és az m-Tyr-on nőtt sejtekben csökkent a p-Tyr/Phe arány (A-panel), míg a fehérjéhez kötött o-Tyr/p-Tyr és m-Tyr/p-Tyr szignifikánsan nőtt annak megfelelően, hogy a médium m- vagy o-Tyr-t tartalmazott (B- és C-panel) (8. ábra).

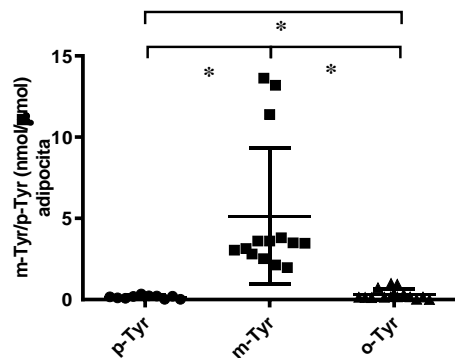
A



B



C



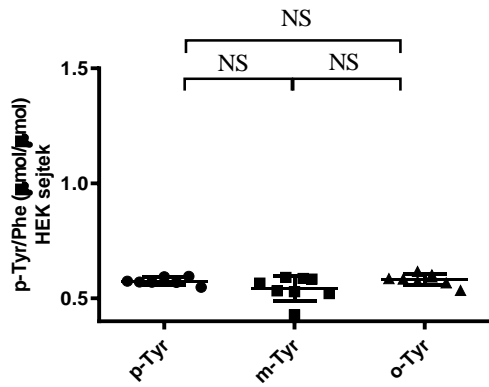
8. ábra. Para- (p-Tyr), orto- (o-Tyr) vagy metatirozin (m-Tyr) tartalmú médiumon nőtt 3T3-L1-sejtek lizátumának fehérjéhez kötött tirozinizomer vizsgálata HPLC-vel. * $p < 0,05$, NS: nem szignifikáns (Kruskal-Wallis tesztet követően normális eloszlású adatok esetén Mann-Whitney U teszt használatával). Az eredményeket átlag \pm SEM-ben tüntettük fel $n=5-10$ különálló mérést követően. A p-Tyr mennyiségét p-Tyr/Phe arányként ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$) (A-panel), míg az o- és m-Tyr mennyiségét (B és C panel) a p-

Tyr-al alkotott arányukban mutatjuk (ld.: o-Tyr/p-Tyr and m-Tyr/p-Tyr) és nmol/ μ mol-ben fejeztük ki [89].

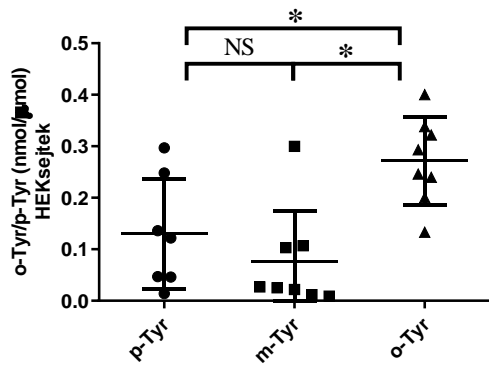
6.6. Mind az o-, mind az m-Tyr beépülhet a HEK-sejtek intracelluláris fehérjéibe

Fenti vizsgálatunkat HEK sejtvonalon is elvégeztük és azt találtuk, hogy o- és m-Tyr tartalmú médiumokon tenyésztett sejtek fehérjékhez kötött p-Tyr/Phe tartalma nem tér el szignifikánsan a p-Tyr-on tenyésztett sejtektől, (A-panel), míg az o-Tyr/pTyr arány az o-Tyr-on nőtt sejtekben volt szignifikánsan a legtöbb (B-panel), az mTyr/pTyr arány pedig a m-Tyr-on (C-panel) nőtt sejtekben bizonyult szignifikánsab magasabbnak a másik kettőhöz képest (9. ábra).

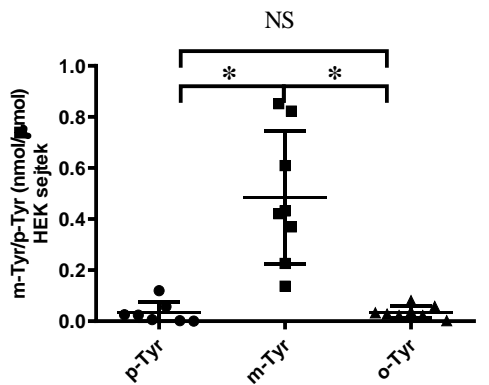
A



B



C

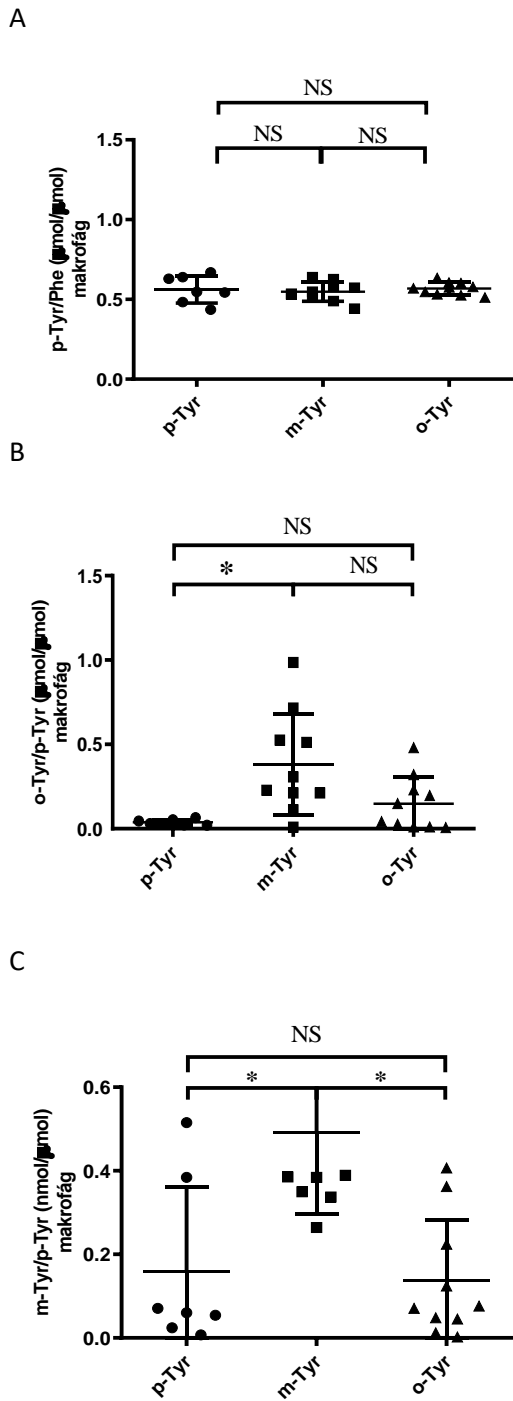


9. ábra. Para- (p-Tyr), orto- (o-Tyr) vagy metatirozin (m-Tyr) tartalmú médiumon nőtt HEK-sejtek lizátumának fehérjéhez kötött tirozinizomer vizsgálata HPLC-vel. * $p < 0,05$, NS: nem szignifikáns (Kruskal-Wallis tesztet követően normális eloszlású adatok esetén Mann-Whitney U teszt használatával). Az eredményeket átlag \pm SEM-ben tüntettük fel $n=5-10$ különálló mérést követően. A p-Tyr mennyiségét p-Tyr/Phe arányként ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$) (A-panel), míg az o- és m-tyr mennyiségét (B és C panel) a p-tyr-

al alkotott arányukban mutatjuk (ld.: o-Tyr/p-Tyr and m-Tyr/p-Tyr) és nmol/μmol-ben fejezzük ki [89].

6.7. Mind az o-, mind az m-Tyr beépülhet a makrofágok intracelluláris fehérjéibe

Vizsgálatunkat makrofágokon végezve azt találtuk, hogy míg a lizátumok p-Tyr/Phe tartalma nem tér el szignifikánsan a p-, o- és m-Tyr-on nőtt sejtekben (A-panel), a m-Tyr /p-Tyr arány a meta-Tyr-on nőtt sejtekben volt szignifikánsan több a másik két kezeléshez képest (B-panel). Érdekes módon az o-Tyr/p-Tyr arány nem az o-Tyr-on, hanem a m-Tyr-on nőtt sejtekben bizonyult a legnagyobbnak, tehát ezekben a sejtekben a m-Tyr kezelés az o-Tyr/p-Tyr emelkedéshez vezetett (C-panel) (10. ábra)

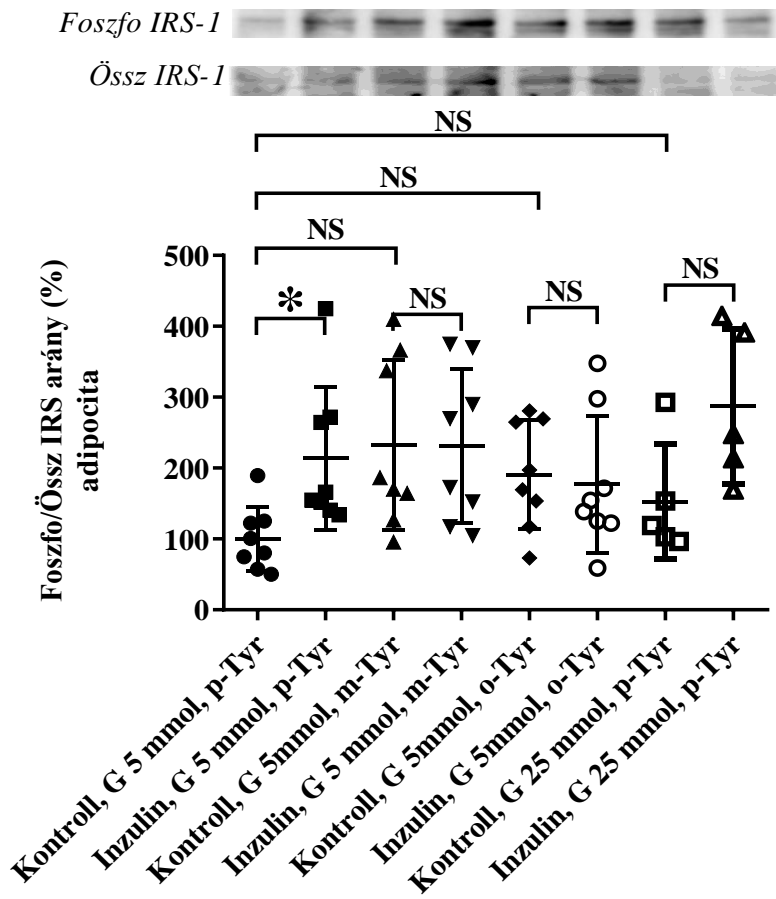


10. ábra. Para- (p-Tyr), orto- (o-Tyr) vagy metatirozin (m-Tyr) tartalmú médiumon nőtt makrofágok lizátumának fehérjéhez kötött tirozinizomer vizsgálata HPLC-vel. * $p < 0,05$, NS: nem szignifikáns (Kruskal-Wallis tesztet követően normális eloszlású adatok esetén Mann-Whitney U teszt használatával). Az eredményeket átlag \pm SEM-ben tüntettük fel $n = 5-10$ különálló mérést követően. A p-Tyr mennyiségét p-Tyr/Phe arányként ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$) (A-panel), míg az o- és m-tyr mennyiségét (B és C panel) a p-tyr-nal alkotott arányukban mutatjuk (ld.: o-Tyr/p-Tyr and m-Tyr/p-Tyr) és nmol/ μmol -ben fejezzük ki [89].

6.8. Az inzulinreceptor-szubsztrát-1 (IRS-1) aktiváló (Tyr612)

foszforilációja megváltozik o-, m-Tyr-t vagy 25 mmol/l glükózt tartalmazó médiumon nőtt 3T3-L1-sejtekben.

Az 5 mmol/l glükóz koncentrációjú, p-Tyr-on tenyésztett 3T3-L1-adipocitákban az IRS-1 inzulin-indukálta foszforilációja, több, mint 300%-a az inzulin nélküli, bazális foszforilációnak, mely statisztikailag szignifikánsnak bizonyul (* $p < 0,05$). Az m-Tyr-on nőtt sejtekben az IRS-1 foszforilációja nem nő szignifikánsan 400 nmol/l inzulinnal való kezelés hatására, tehát nincs inzulinhatás. Az o-Tyr-on nőtt sejtek esetén az IRS-1 foszforilációja szintén nem nő 400 nmol/l inzulin hatására (11. ábra).



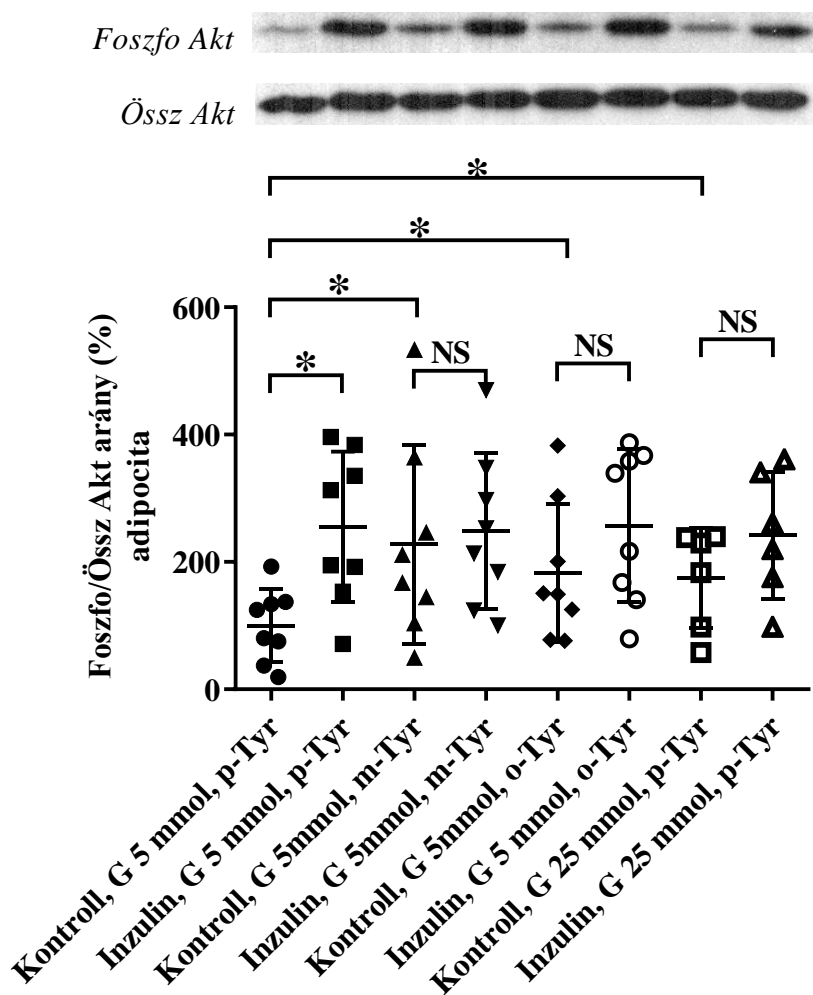
11. ábra. Az IRS-1 inzulin-indukálta (5 perc, 400 nmol/l inzulin) aktiváló foszforilációjának (Tyr612) vizsgálata 3T3-L1-adipocitákban, 5 és 25 mmol/l glükóz-koncentrációjú para-, meta- és ortotirozint tartalmazó médiumban való tenyésztés után. Az eredményeket átlag \pm SEM-ben tüntettük fel $n=4-8$ különböző mérés esetén. * $p < 0,05$ vs para kontroll (Nem-normális eloszlású adatoknál Kruskal-Wallis

tesztet követően, szignifikancia esetén páronkénti összehasonlításhoz Mann-Whitney U teszt; normális eloszlás esetén független t-próba használatával) [89].

6.9. Az Akt (Ser 473) foszforilációja inzulinkezelés hatására, normál- és magas glükóz-koncentráció esetén valamint p-, o- vagy m-Tyr-t tartalmazó médiumon tenyésztett 3T3-L1-adipocitákban.

Normál, 5 mmol/l glükóz-koncentrációjú médiumon nőtt sejtekben az Akt (Ser-473) foszforilációja szignifikánsan nőtt 400 mmol/l inzulinkezelés hatására ($p < 0,05$). A növekedés hozzávetőlegesen négyszeres volt.

Sem o- sem m-Tyr-on nőtt sejtek esetén, sem pedig 25 mmol/l glükóztartalmú médiumon nőtt sejtek esetén nem váltott ki az inzulinkezelés szignifikáns Akt (Ser-473) foszforiláció növekedést, ugyanakkor mindhárom esetben a bazális, inzulinkezelés nélküli Akt (Ser-473) foszforiláció, szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll, p-Tyr-on nőtt sejtek esetén (12. Ábra)

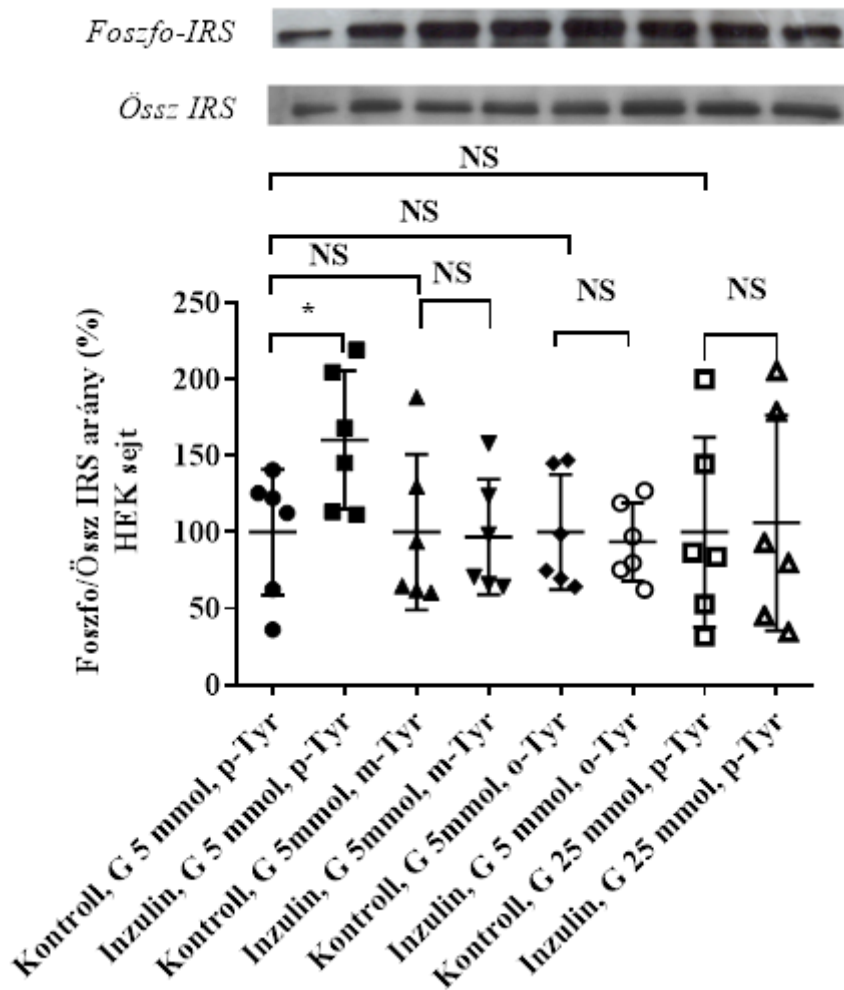


12. ábra. Akt inzulin-indukálta (5 perc, 400 nmol/l inzulin) (Ser473) foszforilációjának vizsgálata 3T3-L1-sejteken Western-blot módszerrel. 5 és 25 mmol/l glükóz-koncentrációjú para-, meta- és ortotirozint tartalmazó médiumban való tenyésztés után. Az eredményeket átlag \pm SEM-ben tüntettük fel $n=4-8$ különböző mérés esetén. * $p < 0.05$ vs para kontroll (Nem-normális eloszlású adatoknál Kruskal-Wallis tesztet követően, szignifikancia esetén páronkénti összehasonlításhoz Mann-Whitney U teszt; normális eloszlás esetén független t -próba használatával) [89].

6.10. Az inzulinreceptor-szubsztrát-1 (IRS-1) aktiváló (Tyr612) foszforilációja megváltozik o-, m-Tyr-t vagy 25 mmol/l glükózt tartalmazó médiumon nőtt HEK-sejtekben

Az 5 mmol/l glükóz koncentrációjú, p-Tyr-on tenyésztett HEK-sejtekben az IRS-1 inzulin-indukálta aktiváló (Tyr612) foszforilációja, több, mint 200%-a az inzulin

nélküli, bazális foszforilációnak, mely statisztikailag szignifikánsnak bizonyul (* $p < 0,05$). Az m-Tyr-on nőtt sejtekben az IRS-1 aktiváló (Tyr612) foszforilációja nem nő szignifikánsan 400 nmol/l inzulinnal való kezelés hatására, tehát nincs inzulinhatás. Az o-Tyr-on nőtt sejtek esetén az IRS-1 aktiváló (Tyr612) foszforilációja szintén nem nő 400 nmol/l inzulin hatására (13. ábra)

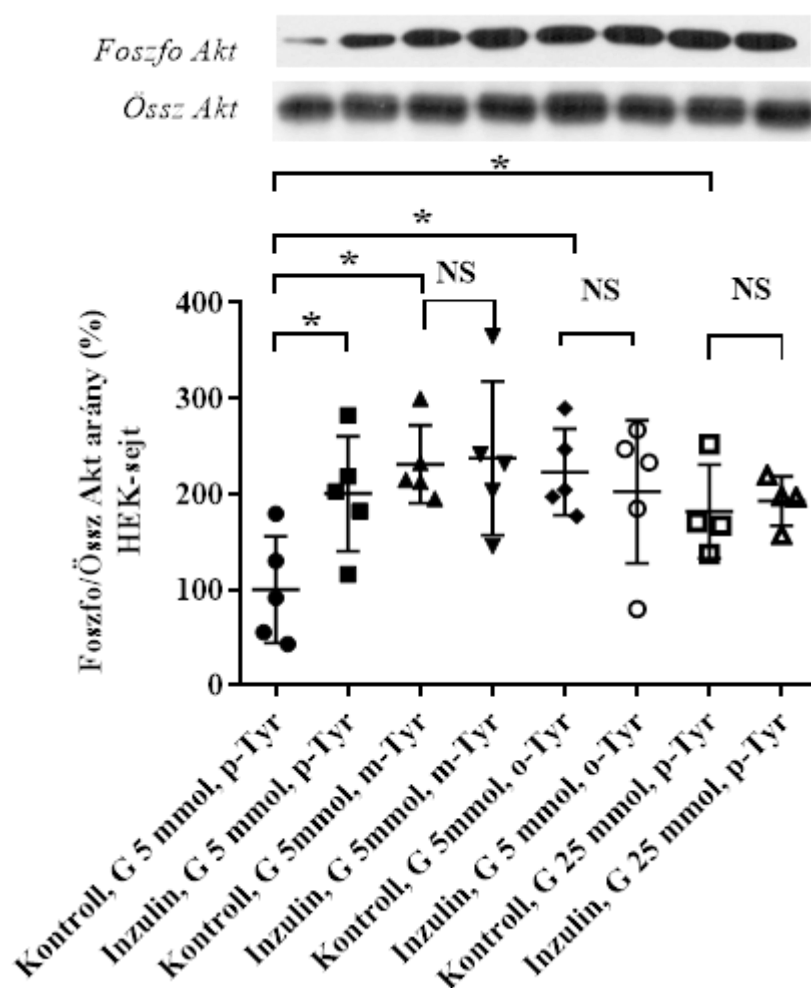


13. ábra. Az IRS-1 inzulin-indukálta (5 perc, 400 nmol/l inzulin) aktiváló foszforilációjának (Tyr612) vizsgálata HEK-sejtekben, 5 és 25 mmol/l glükóz-koncentrációjú para-, meta- és ortotirozint tartalmazó médiumban való tenyésztés után. Az eredményeket átlag \pm SEM-ben tüntettük fel $n=4-8$ különböző mérés esetén. * $p < 0,05$ vs para kontroll (Nem-normális eloszlású adatoknál Kruskal-Wallis tesztet követően, szignifikancia esetén páronkénti összehasonlításhoz Mann-Whitney U teszt; normális eloszlás esetén független t-próba használatával) [89]

6.11. Az Akt (Ser 473) foszforilációja inzulinkezelés hatására, normál- és magas glükóz-koncentráció esetén valamint p-, o- vagy m-Tyr-t tartalmazó médiumon tenyésztett HEK-sejtekben.

Fiziológiás, 5 mmol/l glükóz-koncentrációjú médiumon nőtt sejtekben az Akt (Ser-473) foszforilációja szignifikánsan nőtt 400 nmol/l inzulinkezelés hatására ($p < 0,05$). A növekedés hozzávetőlegesen kétszeres volt.

Sem o- sem m-Tyr-on nőtt sejtek esetén, sem pedig 25 mmol/l glükóztartalmú médiumon nőtt sejtek esetén nem váltott ki az inzulinkezelés szignifikáns Akt (Ser-473) foszforiláció növekedést, ugyanakkor mindhárom esetben a bazális, inzulinkezelés nélküli Akt-(Ser-473) foszforiláció, szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll, p-Tyr-on nőtt sejtek esetén (14. ábra).

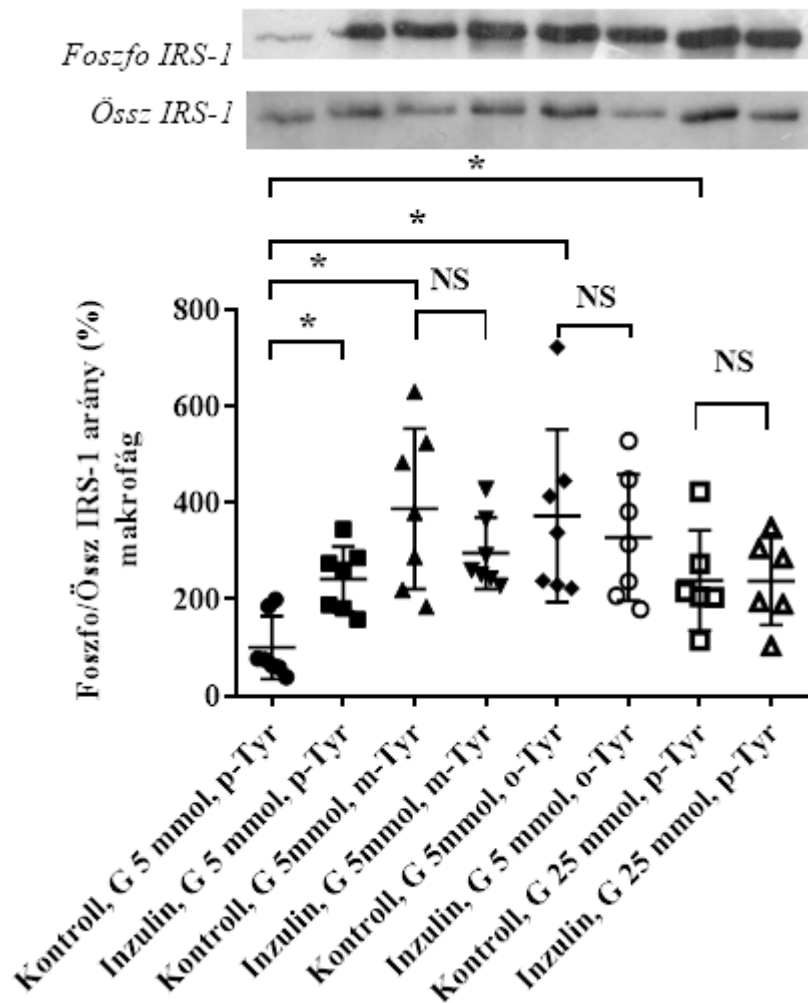


14. ábra. Akt inzulin-indukálta (5 perc, 400 nmol/l inzulin) (Ser473) foszforilációjának vizsgálata HEK-sejteken Western-blot módszerrel. 5 és 25 mmol/l glükóz-koncentrációjú *para*-, *meta*- és *ortotirozint* tartalmazó médiumban való tenyésztés után. Az eredményeket átlag \pm SEM-ben tüntettük fel $n=4-8$ különböző mérés esetén. * $p < 0.05$ vs *para* kontroll (Nem-normális eloszlású adatoknál Kruskal-Wallis tesztet követően, szignifikancia esetén páronkénti összehasonlításához Mann-Whitney U teszt; normális eloszlás esetén független t -próba használatával) [89].

6.12. Az inzulinreceptor-szubsztrát-1 (IRS-1) aktiváló (Tyr612) foszforilációja megváltozik o-, m-Tyr-t vagy 25 mmol/l glükózt tartalmazó médiumon nőtt makrofágokban.

Az 5 mmol/l glükóz koncentrációjú, p-Tyr-on tenyésztett makrofágokban az IRS-1 inzulin-indukálta aktiváló (Tyr612) foszforilációja, több, mint kétszerese a bazális foszforilációnak, mely statisztikailag szignifikánsnak bizonyul (* $p < 0,05$). Az m- és o-

Tyr-on valamint 25 mmol/l koncentrációjú glükózt tartalmazó médiumon nőtt sejtekben az IRS-1 aktiváló (Tyr612) foszforilációja nem nő szignifikánsan 400 nmol/l inzulinnal való kezelés hatására, tehát nincs inzulinhatás. Minhárom esetben az IRS-1 bazális, inzulinkezelés nélküli (Tyr612) foszforilációja szignifikánsan magasabb, mint a p-Tyr-on, 5 mmol/l glükózon nőtt sejtek bazális (Tyr612) foszforilációja (15. ábra)

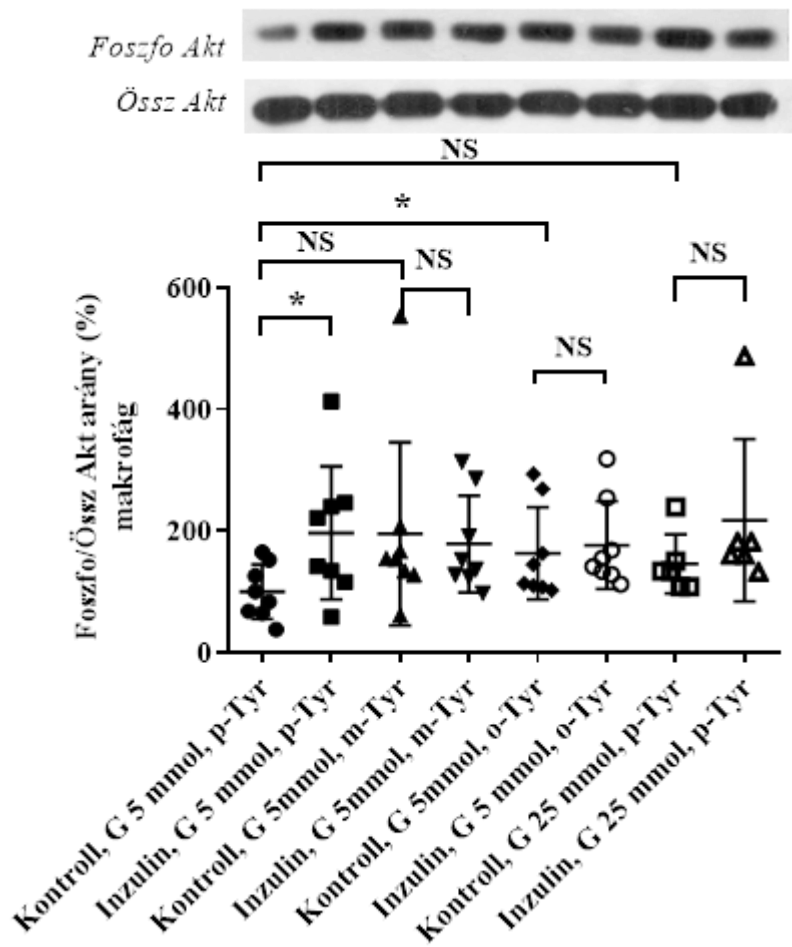


15. ábra. Az IRS-1 inzulin-indukálta (5 perc, 400 nmol/l inzulin) aktiváló foszforilációjának (Tyr612) vizsgálata makrofágokban, 5 és 25 mmol/l glükózkoncentrációjú para-, meta- és orto-Tyr-t tartalmazó médiumban való tenyésztés után. Az eredményeket átlag \pm SEM-ben tüntettük fel $n=4-8$ különböző mérés esetén. * $p < 0.05$ vs para kontroll (Nem-normális eloszlású adatoknál Kruskal-Wallis tesztet követően, szignifikancia esetén páronkénti összehasonlításhoz Mann-Whitney U teszt; normális eloszlás esetén független t-próba használatával) [89].

6.13. Az Akt (Ser 473) foszforilációja inzulinkezelés hatására, normál- és magas glükóz-koncentráció esetén valamint para-, orto- vagy metatirozint tartalmazó médiumon tenyésztett makrofágokban.

Fiziológiás, 5 mmol/l glükóz-koncentrációjú médiumon nőtt makrofágokban az Akt (Ser-473) foszforilációja szignifikánsan nőtt 400 nmol/l inzulinkezelés hatására ($p < 0,05$). A növekedés körülbelül kétszeres volt.

Sem o- sem m-Tyr-on nőtt sejtek esetén, sem pedig 25 mmol/l glükóztartalmú médiumon nőtt sejtek esetén nem váltott ki az inzulinkezelés szignifikáns Akt (Ser-473) foszforiláció növekedést, ugyanakkor az o-Tyr-on növesztett makrofágok esetén a bazális, inzulinkezelés nélküli Akt-(Ser-473) foszforiláció, szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll, p-Tyr-on nőtt sejtek esetén (16. Ábra).



16. ábra. Akt inzulín-indukálta (5 perc, 400 nmol/l inzulín) (Ser473) foszforilációjának vizsgálata makrofágokon Western-blot módszerrel. 5 és 25 mmol/l glükóz-koncentrációjú para-, meta- és orto-tirozint tartalmazó médiumban való tenyésztés után. Az eredményeket átlag \pm SEM-ben tüntettük fel $n=4-8$ különböző mérés esetén. * $p < 0.05$ vs para kontroll (Nem-normális eloszlású adatoknál Kruskal-Wallis tesztet követően, szignifikancia esetén páronkénti összehasonlításhoz Mann-Whitney U teszt; normális eloszlás esetén független t -próba használatával) [89]

7. MEGBESZÉLÉS

Munkánk során elsőként mutattuk ki, hogy az oxidatív stressz során képződött abnormális aminosavak, az o- és m-Tyr, képesek a zsírsejtek glükózfelvételét meggátolni. Kimutattuk azt is, hogy az o- és m-Tyr tartalmú médiumban nőtt sejtek inzulin-jelátvitele megváltozhat. Ezt a jelenséget három különböző sejtvonalon mutattuk be, továbbá ugyanezekben a sejtvonalakon megfigyeltük, hogy az o- és m-Tyr-t a sejtek képesek felvenni és azokat sejtfehérjéikbe beépíteni.

7.1. Az oxidatív stressz inzulin-rezisztenciához vezet

Az irodalomban széles körben vizsgált jelenség az oxidatív stressz és az inzulin-rezisztencia összefüggése. Park és munkatársai nem diabéteszes, felnőtt populációt vizsgálva pozitív összefüggést találtak az oxidatív stressz marker LDL és az inzulin-rezisztencia ($HOMA_{IR}$) között. [103]. Egy másik munkájukban keresztmetszeti és longitudinális vizsgálatban elemezték a C-reaktív protein és a $HOMA_{IR}$ összefüggését, ahol magasabb CRP értékekhez inzulin-rezisztencia asszociálódott, továbbá az emelkedett CRP előre jelezte a későbbi inzulin-rezisztencia kialakulását [104].

Sejtkultúrák és állatmodellekben végzett vizsgálatok több ízben igazolták az oxidatív stressz inzulin-jelátvitelre gyakorolt hatását. Habibi és munkacsoportja a renin fokozott expressziója miatt inzulin-rezisztens patkányokon vizsgálta az inzulin-jelátvitel kulcsfontosságú fehérjéit, az IRS-1 és 2-t valamint az Akt-t és azt találták, hogy az inzulin-rezisztens állatokban, fokozott NADPH oxidáz aktivitás és ROS produkció mellett szignifikánsan csökkent az IRS-1, 2 és Akt expressziója [105]. 3T3-L1-sejtekben 2 órás, 25 μM -os H_2O_2 expozíció hatására csökkent az inzulin-stimulálta IRS-1 aktivitás és 90%-os csökkenést mutatott a PKB Ser 473-as foszforilációja [106]. Oxidatív stressz hatására, emlős vázizomsejtekben a szerin-kináz p38 mitogén aktiválta protein kináz (p38 MAPK) stimulálódik, mely az inzulin-jelátvitel megváltozásához, és következményes glükóztranszport csökkenéshez vezet [107].

Az oxidatív stressz hatására aktiválódó gyulladási folyamatok több úton vezetnek az inzulin-rezisztencia kialakulásához. Az aktiválódó gyulladási sejtek és az általuk termelt gyulladási citokinek termelődése révén [108], az adipocitokin termelődés szabályozásának felborulása révén [109, 62] valamint stressz-kinázok (pl.: JNK,

IKKbeta) aktiválódása révén, melyek az IRS-1 és IRS-2 szerin/treonin (Ser/Thr) oldalláncainak foszforilálása által az inzulin-jelátvitelt károsítják [84].

Ugyanakkor az összefüggés fordítottan is fennáll. A hiperinzulinémiával karöltve jelentkező hiperglikémia fokozott oxidatív stresszt hoz létre. Hiperglikémia során a glikolízisbe megnövekedett mennyiségű glükóz kerül. A fokozott glükóz degradáció fokozott piruvát, acetyl-koenzim-A és NADH képződéshez vezet [110]. Az elektronokat a mitokondriális légzési láncba transzportáló NADH megnövekedett mennyisége elektron-túlterhelést ró a légzési láncra [111, 112]. Különösen igaz ez a hepatociták és a pankreasz β -sejtjei esetén, ahol a glükokináz működését közvetlenül szabályozza a sejtbe belépő glükóz mennyisége [112]. A képződött NADH a mitokondriumba lépve NAD^+ -dá oxidálódik, azonban a mitokondriális légzési lánc működésének velejárója, hogy megnövekedett mennyiségű NAD^+ képzése, emelkedett szuperoxid képződéssel is jár [113, 114]. Ezt tovább rontja DM-ben a fokozott polyol útvonal aktiválódása miatti NADH/ NAD^+ hányados növekedése más néven az ún.: pszeudohipoxia, tovább növelve a szuperoxid termelődését [114].

A két folyamat tehát circulus vitiosus alkotva egymást erősíti. Az inzulin-rezisztencia DM nélkül, normál testsúly mellett is növeli az össz-mortalitást [115]. Ebből arra következtethetünk, hogy az inzulin-rezisztencia már másodlagos, kísérőjelenség. Véleményünk szerint- az inzulin-rezisztencia során megfigyelt kórélettani változások nem csupán a háttérben meghúzódó oxidatív stressz következményeként jönnek létre, hanem a kóros aminosavak fehérjékbe történő beépülése által, melyek eltérő szerkezetük révén vezetnek a jelátviteli folyamatok megváltozásához.

7.2. Biomarkerek az oxidatív stresszben

A reaktív oxigén- (ROS) és nitrogén származékok az aerob anyagcsere és immunvédekezés szükséges velejárói. Az élő szervezetek olyan mechanizmusokat fejlesztettek ki, melyek az oxidatív károsodással szemben védelmet jelentenek és fenntartják a sejtek redox-egyensúlyát [116].

Régóta ismert, hogy számos betegség kialakulása valamint az öregedési folyamatok nagymértékben függenek az oxidatív stressztől [117], emiatt az oxidatív stressz szintjének

mérése régóta a kutatások célját képezi. A gold-standard elektron spin rezonancia (ESR) használatát limitálja, hogy mivel a hidroxil-szabad gyökök extrém gyorsan reagálnak más molekulákkal, nem tudnak olyan mennyiségben felhalmozódni, hogy elérjék az ESR kimutathatósági határát [118]. A prooxidáns-antioxidáns egyensúly felborulása minden makromolekulát károsíthat, nevezetesen a lipideket (foszfolipideket) fehérjéket, szénhidrátokat, és a nukleinsavakat is. A lipidek kettős kötéseik miatt különösen esendők a ROS-al szemben [119]. A lipidperoxidáció két -széles körben vizsgált- markere az izoprosztánok és a malondi-aldehid. Az izoprosztánok arachidonsavból keletkeznek, a ciklooxygenáz enzimtől függetlenül. Szöveti-, vér- és vizelet szintjük gáz- és folyadékromatográfiával kombinált tömegspektrometriás módszerrel és ELISA-val jól mérhető [120]. A malondi-aldehid, a többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációja során keletkezik, szintje meghatározható plazmából kalorimetriás módszerrel és ELISA-val [120].

A Tyr, az oxidatív stressz egyik legreaktívabb célmolekulája és számos, klinikailag releváns, módosult aminosav-biomarker képződésében szerepet játszik [116]. A Tyr nitrációja során keletkező 3-nitrotirozin nagyon széles körben vizsgált modifikált aminosav, mely számos betegségben biomarkernek bizonyult, úgymint asztma, cisztás fibrózis [121], kardiovaszkuláris megbetegedések [122], DM [123]. A 3-nitrotirozin látszólag egészséges egyénekben is kimutatható mennyiségben megtalálható [124].

Az oxidatív módon módosult fehérjék in vivo, szelektív biomarkere a 3-3'-Ditirozin (Di-Tyr), mely két Tyr gyök kapcsolódásával jön létre [116]. Mivel a 3-3' kötés hidrolízisre rezisztens, ezért a fehérjékből való kiszabadulás után kimutatható mennyiségben exkretálódik a vizeletbe [124]. Egy másik fontos oxidált-Tyr biomarker a 3,4-dihydroxytyrosine (L-DOPA), mely szabad gyökök általi oxidációval és/vagy a katekolamin bioszintézis során keletkezik enzimatis átalakulás során [91].

Ismert tény, hogy a szuperoxid H_2O_2 jelenlétében hidroxil szabad gyökké alakul át [81]. A hidroxil szabad gyökök közreműködése révén, valamint ionizáló sugárzást követően a fehérjék Phe oldalláncaiból, nem enzimatis úton afiziológiás szerkezetű o- és m-tyr keletkezhetnek [125]. Így az o- és m-Tyr izomerek a hidroxil szabad gyök, egyben az oxidatív stressz markereinek tekinthetők [95] és autofluoreszcenciájuknak

alapján, megfelelő minta előkészítést követően, a módosult mennyiségük közvetlenül mérhető fluoreszcens detektor segítségével [126].

Legelőször, az élelmiszeripar kezdte használni az o- és m-Tyr-t, mint oxidatív stressz markert. Ahogy az élelmiszerek besugárzása, az eltarthatóság érdekében egyre jobban elterjedt, felmerült a kétség, hogy vajon ez nem vezet-e az élelmiszerek károsodásához, a szabad gyökök felhalmozódása révén. Következésképpen az o- és m-Tyr szintjét kezdték mérni és kimutatták jelenlétüket besugárzást követően, csirkehúsban [127].

Számos, ismertén magasabb oxidatív stresszel járó állapotban igazolták, hogy szintjük emelkedik. Fu és munkacsoportja nukleáris szürkehályogban emelkedett o- és m-tyr-t mért [128], Molnár és mtsai nem-diabéteszes és diabéteszes betegek kataraktás lencséit összehasonlítva mindkét csoportban növekedett mennyiségben találtak o- és m-tyr-t, a katarakta etiológiájától függetlenül [91]. Ismert, hogy a plazma p-Tyr szintje alacsonyabb krónikus veseelégtelen betegekben, mint egészséges kontrollokban. Ugyanakkor a krónikus vesebetegségben szignifikánsan magasabb a vizelet o-Tyr szintje, mint egészséges személyekben. Diabéteszes valamint diabéteszes vesebetegekben betegekben a vizelet o-Tyr szintje még magasabbnak adódik [90]. Ezen eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy DM-ben az o-Tyr aktívan exkretálódik és/vagy in loco képződik a vesében. Ez az o-Tyr exkréció javítható azáltal, ha 2-es típusú DM-ben szenvedő betegeket rezveratrollal szupplementálunk. A vizelet o-Tyr szintjének csökkenését a HOMA_{IR} értékének csökkenése és a trombociták Akt foszforilációjának növekedése kíséri [129].

Ledo és mtsai koraszülöttek vizeletében mértek szignifikánsan magasabb o-Tyr/Phe arányt érett újszülöttekhez képest [130], Shu és mtsai Fabry kóros egerek aortájából izolált endothel sejtekben találtak szignifikánsan magasabb o-Tyr szintet, a vad típusú egerekhez képest [131]. Mély hipotermiás kerigésleállást követően, malacok striátumában növekszik az o-Tyr szint mely feltehetően a sejtenegiaraktár lemerülésének tulajdonítható [132]. Kísérleteinkben a DM-ben kialakult afiziológiás miliót a médiumhoz való o- és m-Tyr adásával modelleztük.

Molekulamodelllezési vizsgálatok szerint a hidroxil szabad gyök egyforma valószínűséggel támadja meg a tirozin benzol gyűrűjének bármely pontját, tehát nincs olyan pont a gyűrűn, mely energetilag kedvezőbb feltételekkel járna, így termodinamikai,

kinetikai és konformációs szempontból a nem enzimatis p-, m- vagy o-Tyr képződés egyenlő valószínűséggel és arányban következhet be [133]. Mindazonáltal azonban számos más vizsgálat is történt, mely nem teljesen ezt igazolta. Besugárzást követően például egyes szerzők szerint az o-Tyr:p-Tyr:m-Tyr arány: 1:0,6:1 [134], mások szerint 1:0,6:0,28 [135]. A Tyr arányok mennyisége az oxidáló ágensektől is függhet valószínűleg. Fém-katalizátor segítségével oxidált humán plazmában például nagyobb mennyiségben képződik szabad m-Tyr, mint o-Tyr [136].

Kísérleteink során a médiumokhoz egyenlő arányban adtuk az o- és a m-Tyr-t is. Izotópjelölt glükózfelvételt vizsgáló kísérletünkben, a koncentráció-függés vizsgálata során azonban azt találtuk, hogy a két Tyr glükózfelvételt csökkentő hatását nem egyenlő mennyiségű p-Tyr küszöböli ki, annak ellenére, hogy korábban a médiumokhoz egyenlő mennyiségben adtunk o-, vagy m-Tyr-t. Ennek hátterében nem kizárható, hogy a sejtkelések alatt, a sejteket ért oxidatív stressz során nem egyenlő mértékben képződött (a külsőleg hozzáadott m- és o-Tyr-on felül) a két izoforma és ez vezetett végül ahhoz a jelenséghez, hogy o-Tyr esetén már 3x-os mennyiségű p-Tyr mellett, m-Tyr esetén azonban csak 4x-es mennyiségű p-Tyr hozzáadása mellett tért vissza az inzulin hatására bekövetkező glükózfelvétel növekedés.

7.3. A tirozin-izomerek, mint biológiailag aktív molekulák

Ahogy azt korábban említettük kísérleteink nélkülöztek bármilyen nyilvánvaló oxidáló ágens. Ennek fényében felmerül a lehetőség, hogy az o- és m-tyr, nem pusztán a a hidroxilgyök által indukált károsodás markerei, hanem önálló biológiai aktivitással rendelkező molekulák.

Bertin és munkacsoportja csenkeszfélék gyökérszónájából izolált egy molekulát, mely természetes herbicidként funkcionálva megakadályozta más fajok gyökérszónájának növekedését. A citotoxikus molekuláról kiderült, hogy m-tyr. A teljes gyökérszónájának savas hidrolízise arra mutatott, hogy a m-tyr-t a növény fehérjéibe beépítette. A m-tyr gyökérszónájának növekedést gátló hatását több aminosav ellensúlyozta, köztük leghatékonyabban a fenilalanin [137].

Azt, hogy a m-tyr a fehérjékbe beépül, méghozzá a transláció során, többen megerősítették [138, 139]. Gurer-Orhan és munkatársai kínai-hörcsög ovárium sejteket vizsgáltak és kimutatták, hogy a m-tyr a sejtfehérjékbe beépül, továbbá citotoxikus [138]. A beépülés feltétele az, hogy a fenilalanin-tRNS szintetáz tévesen a károsodott Tyr izomereket is képes legyen kötni [140]. Ez a téves kapcsolódás a legújabb kutatások szerint, mintegy 20%-ban történik meg m-Tyr esetén, tehát a fenilalanin-tRNS szintetáz 20%-ban m-Tyr-t köt, fenilalanin helyett [139]. Míg normál esetben a t-RNS aminosav kötését követően egy poszt-transzfer javítás következik, mely deacetilációs folyamat során lekapcsolja a t-RNS szintetázhoz tévesen kapcsolódott aminosavat, minimálisra csökkentve ezzel a helytelenül kapcsolódott aminosavak beépülését a peptid-láncba, addig ez a deacetilációs folyamat a m-Tyr-t kötött t-RNS esetén nagyon alacsony hatékonysággal történik meg. Ennek eredményeképpen felhalmozódik a sejtekben a m-Tyr-t kötött t-RNS szintetáz és így fordulhat elő végül az, hogy bár a t-RNS szintetáz csak 20%-ban köt m-Tyr-t, a végeredmény mégis a m-Tyr fehérjékbe való beépülése [139].

A fenti eredményekhez hasonlóan, munkánk során mi is azt találtuk, hogy mind az o-, mind a m-tyr-t az adipociták felveszik méghozzá az inzulin-kezeléstől független módon, ezt követően pedig a módosult aminosavakat a celluláris fehérjékbe beépítik.

A m-tyr és -kisebb mértékben- az o-tyr biológiai hatékonyságát bizonyította Ruggiero és munkacsoportja, akik négy különböző rágszáló tumormodellt vizsgálva megfigyelték, hogy a primer tumor kialakulása után egy -az immunrendszerrel független- ágens gátolja a metasztázis képződést. Az izolált molekula a m- és o-tyr volt, melyek közül a m-tyr volt potensebb metasztázis inhibitor [101, 141]. Eredményeik szerint a hatás a MAPK és STAT3 jelátviteli utak gátlásán, ezáltal a sejtciklus szabályozásán keresztül valósul meg [141].

Már korábbi vizsgálatok is összefüggésbe hozták az o- és m-Tyr-t bizonyos hormon-rezisztenciák kialakulásával. Kimutatták, hogy krónikus vesebetegségben (CKD) szenvedő egyéneknél összefüggés lehet a plazma o-Tyr/p-Tyr hányadosa és az eritropoetin-rezisztencia között [142]. Egy további tanulmányban eritroblasztokat 3 napig tenyésztettek o- és m-Tyr-nal dúsított médiumban. Már a 2. naptól kezdve megfigyelték az eritroblasztok csökkent proliferációját, ezzel párhuzamosan kimutatták az o- és m-Tyr sejtfehérjékbe való beépülésének szignifikáns növekedését [102]. Megfigyelték továbbá

a fiziológias p-Tyr és az abnormális o- és m-Tyr izomerek között fennálló kompetíciót, mivel a p-Tyr, tenyésztő médiumban való koncentrációjának növelésével sikerült visszaállítani az eritroblasztok normális proliferációs potenciálját, még akkor is, ha a médiumban jelen voltak a módosult Tyr izomerek is a p-Tyr mellett. A folyamat hátterében a STAT5 és ERK1/2 jelátviteli utak károsodását találták [102].

Munkánk során, az adipociták csökkent glükózfelvételét már a tenyésztés 1. napjától kezdve észleltük, mind o-, mind m-Tyr-t tartalmazó médiumon. Ezek a megfigyelések, egy gyors hatásról árulkodnak és arra utalnak, hogy az o-, és m-Tyr direkt hatásáról van szó és nem kizárólag az oxidatív stressz károsító hatásáról, hisz a kísérletek során, a módosult tirozin-izomereken túl nem alkalmaztunk bármilyen oxidatív ágenszt. A glükózfelvétel, már egy napos o- vagy m-Tyr-t tartalmazó médiumon való tenyésztést követően szignifikánsan csökkent és ez a szignifikancia a hosszabb időtartamú tenyésztési idők alatt változatlanul fennállt. Ebből arra következtethetünk, hogy a kóros Tyr izomerek már egy nap alatt is képesek a fiziológias p-Tyr helyére beépülni, ezáltal pedig a jelátvitelt megváltoztatni. Ezt a - fiziológias vs abnormális Tyr izomerek között fennálló- kompetíciót, melyet Mikolás és munkatársai eritroblasztokon kimutattak, mi adipociták esetén is detektáltuk, amennyiben növelve a médium p-Tyr koncentrációját, o-Tyr esetén négyszeres mennyiségű hozzáadott p-Tyr mellett, m-Tyr esetén ötszörös mennyiségű hozzáadott p-Tyr mellett visszatért a normális glükózfelvétel. Ezzel bebizonyítottuk, hogy a károsodott tirozin-izomerek beépülése koncentráció-függő módon valósul meg.

A fehérjék o-Tyr tartalma és ennek a fiziológias működésre gyakorolt hatása közötti összefüggést vizsgálták Szijártó és munkatársai, akik izolált egér artériák inzulinra adott vazorelaxációját elemezve azt találták, hogy a vaszkuláris inzulin-rezisztencia fokozódásával parallel nőtt az érszégmensek o-Tyr tartalma [96]. Egy további munkájuk során patkányok négy hetes orális o-Tyr szupplementációját követően vizsgálták az erek inzulin által kiváltott relaxációját és bebizonyították, hogy az orális o-Tyr szupplementáció fokozza az erek o-Tyr tartalmát a vehikulummal szupplementált kontrollokhoz képest, tehát az o-Tyr az érfehérjékbe beépül, mennyiségének növekedésével párhuzamosan fokozódik a vaszkuláris inzulin-rezisztencia [97]. Ugyanebben a kísérletsorozatban vizsgálták az o-Tyr endothel sejtekbe való beépülését is. A sejteket o-Tyr-nal dúsított médiumon tenyésztették nyolc napon át. Az o-Tyr-os

tenyésztést követően a sejtfehérjékben szignifikánsan nőtt az o-Tyr mennyisége, ugyanakkor a sejtekben az endoteliális nitrogén monoxid szintáz enzim alacsonyabb foszfrilációt mutatott a kontroll sejtekhez képest, tehát az o-Tyr beépülése valamilyen módon képes volt a jelátviteli folyamatok megváltoztatására [97].

Sélley és munkatársai a magas zsírtartalmú diéta, vaszkuláris-rezisztenciára gyakorolt hatásait vizsgálták patkányokban. A koleszterinnel etetett állatokban a metabolikus eltérések mellett vaszkuláris inzulin- és liraglutid-rezisztencia alakult ki, melyet az érfali m-Tyr növekedése kísért. A koleszterin ezen ártalmas hatásait az állatok p-Tyr szupplementációja kiküszöbölte, sugallva a fiziológias és kóros tirozin-izomerek kompetícióját [100].

Az inzulin-érzékenység csökkenése és az oxidált Phe származékok szintje között mutattak ki összefüggést Kun és mtsai. Munkájuk során szeptikus betegek vizeletében mért m-Tyr koncentráció és m-Tyr/p-Tyr arány összefüggést mutatott a napi inzulin-szükséglettel és az ún. glükóz-inzulin termékkel (melyet a napi inzulinigényből és napi átlagos vércukorszintből számoltak) korábban nem cukorbeteg egyéneknél [143].

Ezen eredményekkel összhangban, munkánk során azt találtuk, hogy a orto- és metatirozin-izomereket tartalmazó médiumon nőtt adipocitákban károsodik az inzulin-indukálta glükózfelvétel, hasonlóan a magas glükóztartalmú médiumon nőtt sejtekhez, tehát a sejtekben inzulin-rezisztencia alakul ki.

A glükózfelvétel károsodását találta Tatsumi és munkacsoportja is ugyanezen a sejtvonalon. Ők a H₂O₂ glükózfelvételre gyakorolt hatását vizsgálták és azt találták, hogy míg hasonlóan a mi kísérleteinkhez, 25mmol/l glükózon nőtt sejtek inzulin-indukálta glükózfelvétele 150%-ig nő, addig H₂O₂ mellett szintén csökkent már a bazális glükózfelvétel és mindössze 30%-ig nőtt inzulin mellett [144]. Shibata és munkatársai a ROS képződést fokozó paraquat inzulin-indukálta glükózfelvélet csökkentő hatását találták, melyet az antioxidáns α -liponsav kiküszöbölt [145]. Mitsuhashi és munkacsoportja a tesztoszteron hatását vizsgálta adipociták glükózfelvéletére, kimutatták, hogy a tesztoszteron képes androgen receptortól független mehanizmus útján javítani a glükózfelvéletet [146].

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a zsírsejtek glükózfelvétel csökkenésének háttérében az o- és m-tyr közvetlen hatása áll.

A szövetek és szekrétumok o- és m-Tyr tartalmát az irodalomban, néhány kivételtől eltekintve, nem abszolút értékben, hanem a p-Tyr vagy a fenilalanin arányában szokták megadni [147, 148, 94, 149]. Munkacsoportunk egy korábbi vizsgálatában egészséges személyek plazma p-Tyr koncentrációját átlagosan 55,96 $\mu\text{mol/l}$ -nek, o-Tyr koncentrációját 0,022 $\mu\text{mol/l}$ -nek mérte. Ugyanez DM-ben szenvedőknél 46,11 $\mu\text{mol/l}$ -nek adódott p-Tyr és 0,023 $\mu\text{mol/l}$ -nek o-Tyr esetén. Dandona és munkatársai fogyas során mérték az o- és m-Tyr plazmaszinteket és mind o-, mind m-Tyr esetén 20-40 nmol/l-es tartományban változtak a módosult Tyr izomerek plazmaszintjei [149].

Az általunk használt mindhárom típusú (alacsony- és magas glükóztartalmú valamint glükózmentes) médium gyárilag 398 $\mu\text{mol/l}$ p-Tyr-t tartalmazott így a kiindulási tirozin-koncentráción nem tudtunk változtatni. Ez a tirozinmennyiség többszöröse az általunk korábban, plazmában mért tirozin-koncentrációnak. Az azonban, hogy a plazma tirozin-koncentrációk milyen relációban állnak az extravazális- valamint az egyes szövetek és sejttípusok intracelluláris tirozin-koncentrációival, egyelőre nem ismert. Márpedig az általunk is vizsgált jelátviteli folyamatok az intracelluláris térben zajlanak. Kísérleteink során a módosult tirozin-izomerek p-Tyr-nal ekvivalens mennyiségét oldottuk a médiumba, mellyel már az első naptól kiindulva csökkenteni tudtuk a glükózfelvételt, szignifikáns mértékben.

Krasuska és munkatársai a m-Tyr hatását vizsgálták a gyökérnövekedésre és 50-250 $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációban használták a m-Tyr-t [150]. Bertin és munkacsoportja szintén a m-Tyr gyökérnövekedésre gyakorolt hatását vizsgálva 0,25 $\mu\text{mol/l}$ -től 320 $\mu\text{mol/l}$ -ig emelte a m-Tyr koncentrációját [137]. Ruggiero és mtsai konkomittáns tumorrezisztenciával foglalkozó vizsgálataiban m-Tyr esetén 24 $\mu\text{mol/l}$, míg o-Tyr esetén 258 $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációkat használt a tumornövekedés gátlására [141]. Rodgers, aki oxidált aminosavak fehérjékbe való beépülését és a proteolízisre gyakorolt hatását vizsgálta sejt kultúrán, munkája során 1 és 2 mmol/l-es koncentrációban használta a m-Tyr-t [151].

Kompetíciós vizsgálataink esetén a módosult 398 $\mu\text{mol/l}$ o-, vagy m-Tyr mellé adtunk további p-Tyr-t (398 $\mu\text{mol/l}$, 796 $\mu\text{mol/l}$, 1194 $\mu\text{mol/l}$, 1592 $\mu\text{mol/l}$) annak

mennyiségét fokozatosan növelve, ezáltal nem a tirozinok abszolút mennyiségének befolyásolására, hanem inkább azok egymáshoz való arányának változtatására törekedtünk.

Ruggiero az o- és m-Tyr tumornövekedést gátló hatását fenilalaninnal, glutaminsavval, aszparaginsavval fel tudta függeszteni, míg a hisztidin csak a m-Tyr tumornövekedést gátló hatását függesztette fel, p-Tyr-al azonban egyik kóros izomer hatását sem tudta ellensúlyozni [141]. Ezzel szemben munkánk során mi azt tapasztaltuk, hogy o-Tyr esetén négyszeres mennyiségű hozzáadott p-Tyr mellett, m-Tyr esetén ötszörös mennyiségű hozzáadott p-Tyr mellett vissza tudtuk állítani a zsírsejtek normális glükózfelvételét, tehát a p-Tyr kompetícióba lépett az oxidált izomerekkel.

7.4. Az inzulin jelátvitelének károsodása a kóros tirozin-izomerek által mediált

Az inzulin jelátvitelében oxidatív stressz hatására bekövetkező változásokat többen vizsgálták már. Hotamisligil és munkacsoportja mutatta ki, hogy TNF- α -al kezelt rágszáló sejtkultúrában az IRS-1 gátló Ser-foszforilációja fokozódott, mely következményes inzulin-rezisztenciát okozott [152]. Vinayagamoorthi és mtsai a magas zsírtartalmú diéta hatását vizsgálták patkányokban és az IRS-1 csökkent Tyr-foszforilációját találták, miközben a gátló Ser-foszforiláció fokozódott. Továbbá sejtkultúrában vizsgálták a H₂O₂ kezelés hatását mind az aktiváló Tyr-, mind a gátló Ser-foszforilációra és ebben az esetben is a Tyr-foszforiláció csökkenését és a Ser-foszforiláció növekedését detektálták. Antioxidáns kezelés mindkét hatást kivédte [153]. Diamond-Stanic és munkacsoportja kimutatta, hogy kismértékű oxidatív stressz szignifikáns mértékben rontotta az inzulin-indukálta glükóztranszportot, melyhez több molekuláris szinten megfigyelhető változás együttese vezetett. Hidrogén-peroxid jelenlétében, inzulin mellett csökkent az IRS-1 fehérje expressziója, csökkent az inzulin-jelátvitelben fontos szerepet betöltő Akt Ser473-as foszforilációja, továbbá átmenetileg fokozódott a p38 MAPK foszforilációja [154].

Munkánk során három különböző sejtvonal esetén is azt figyeltük meg, hogy a tenyésztőmédiák o- és m-Tyr-nal való szupplementációja inzulin-rezisztenciához vezet, a magas glükóztartalmú milióhoz hasonlóan. Az o- és m-Tyr-t tartalmazó

médiumon nőtt sejtek IRS foszforilációja inzulin jelenléte nélkül is nőtt, azonban ezt a növekedést inzulin nem volt képes tovább fokozni, tehát a tulajdonképpeni inzulinhatás ezekben a sejtekben elmaradt, míg kontroll sejtekben az inzulin szignifikánsan növelte az IRS-1 foszforilációját, minden sejtvonal esetén.

A foszforiláció az Akt esetén is hasonlóan változott. A kontroll sejtekben, mindhárom sejtvonal esetén, az Akt foszforilációja inzulin jelenléte nélkül is, az o- és m-Tyr-on történt tenyésztés hatására nőtt, számos esetben a növekedés szignifikáns mértékű volt, a kontroll sejtekhez képest. Míg az inzulin, kontroll sejtekben, tehát p-Tyr és 5 mmol glükóz-koncentráció mellett, szignifikáns mértékben stimulálta az Akt Ser473-as foszforilációját, addig o- és m-Tyr jelenlétében ez a hatás elmaradt, hasonlóan a magas glükóz-koncentráció mellett nőtt sejtekhez.

Kísérleteink során csak az IRS-1 fehérje foszforilációját vizsgáltuk, az IRS-2-t nem, és ismert, hogy az Akt foszforilációjára mindkét molekula hatással lehet [52]. Bár az IRS-1 és IRS-2 molekulák nagymértékben hasonlóak egymáshoz és mindkettő a PI3K-Akt jelátviteli útvonalon keresztül fejt ki hatását, mégis vannak az inzulin-jelátvitelben betöltött szerepükben különbségek [39]. KO (knock out) egerek vizsgálata nyilvánvalóvá teszi a fenti kijelentést. Kubota és munkatársai szerint a májspecifikus IRS-1 KO egerekben, az inzulin-rezisztencia csak táplálkozás után alakul ki, míg éhezés alatt nem, ugyanakkor IRS-2 KO egerekben éhezés alatt alakult ki az inzulin-rezisztencia [154]. Ezen vizsgálatok szerint az inzulin-jelátvitel szabályozása az IRS-1 és IRS-2 által képes adaptálódni különböző fiziológiai állapotokhoz.

Az inzulin jelátvitelében számos szignáltranszdukciós útvonal részt vesz, az egyes útvonalak közötti interakció pedig óriási szerepet tölthet be az egész jelátviteli háló szabályozásában [52]. Az inzulin, IRS által mediált jelátviteli útjain belül, az IRS-PI3K-Akt út az IRS1-IRS2 által mediált jelátviteli útvonalak számára egy közös tengelyt képez, annak ellenére, hogy a különböző IRS molekulák különböző célmolekulák expresszióját szabályozzák. Ebből arra következtethetünk, hogy a közös PI3K-Akt tengely részt vesz mind az IRS-1 mind az IRS-2 egymástól különböző funkcióinak kivitelezésében [156]. Hanke és munkatársai 2007-es munkájukban feltérképezték az IRS-1 és IRS-2 molekulák fosztorirozinon keresztüli teljes kapcsolódási hálóját (interactome). Eredményeik azt mutatták, hogy a két molekula kiterjedt funkcionális redundanciáját nagyszámú közös

interakció racionalizálja, mégis számos, a jelátvitelben és a metabolizmusban résztvevő fehérje másképpen lép interakcióba az IRS-1 és másképpen az IRS-2 molekulákkal, magyarázatot szolgáltatva a két molekula eltérő fiziológiai szerepére.[157]

Fontos megemlítenünk azt is, hogy bár az IRS-1 molekulán számos Tyr foszforilációs lókuszt ismertünk meg, mi csak az egyiket vizsgáltuk. Bebizonyítottuk, hogy az o- és m-Tyr beépül a sejtfehérjékbe így az IRS-1-be vagy az Akt-ba is. A sejtfehérjékbe történő beépítése potenciálisan megváltoztathatja a fehérjék szerkezetét olyan módon, hogy az antitestek általi immunológiai felismerésük károsodhat, különösképpen a foszforilált Tyr oldalláncok esetén.

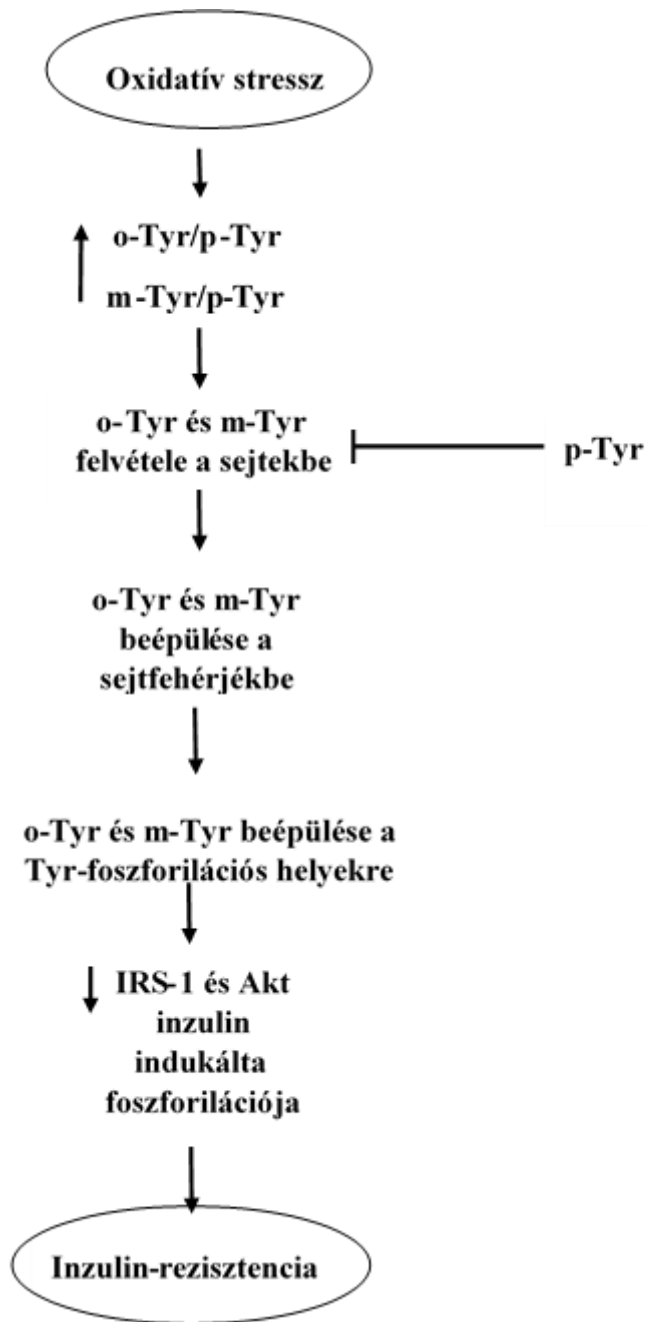
Azt sem felejtethetjük el, hogy az inzulin jelátvitelében további jelátviteli utak és szignáltranszdukciós fehérjék is részt vesznek (JNK, Erk 1/2), melyek más pontokon és jelátviteli szinteken hatnak az inzulin jelátvitelére [158, 84] és nem kizárható, hogy ezekben a fehérjékben is bekövetkeztek különböző változások a sejt kultúrák medium o- és m-Tyr tartalma miatt. Továbbá ismert az a tény miszerint az inzulin jelátvitelének konstans stimulációja megváltoztatja az IRS-1 és Akt foszforilációjának kinetikáját és mértékét, mely a két molekula foszforilációjában kialakuló látszólagos diskrepanciához vezethet [159]. Mindazonáltal az Akt foszforilációs vizsgálatok teljesen szinkronban állnak a glükózfelvevő vizsgáló kísérleteink eredményeivel és arra mutatnak, hogy az o- és m-Tyr kezelés mindkét szinten az inzulin-rezisztencia kialakulásához vezet.

Összességében, munkánk során összefüggést mutattunk ki az o- és m-Tyr fehérjékbe való beépülése és az inzulin-jelátvitelre gyakorolt hatása között. Sajnálatos módon, a mai napig nem áll rendelkezésre olyan, a kereskedelemben elérhető antitest, mely specifikusan kötődne az o- és m-Tyr-hoz, vagy az o- és m-Tyr-t tartalmazó fehérjékhez, emiatt nem mutatható ki direkt módon a jelátviteli fehérjékben -így az IRS-1-ban, vagy Akt-ban való megjelenésük. Ugyanígy, mivel nem elérhető izotóp-jelölt o- és m-Tyr, nem lehetséges ezen aminosavak direkt kimutatása. Munkánk további limitációját okozza az a tény is, hogy a 3T3-L1-sejtek nem valódi zsírszövetek, csak zsírszövetké differenciált fibroblasztok, melyek nagyon hasonlóak a zsírszövetekhez, az irodalomban azonban a zsírszövetek és az inzulin-jelátvitel vizsgálatára szolgáló, széleskörben elfogadott sejtmodellt jelentenek.

Mindezen limitációk ellenére vizsgálatainak nagymértékben arra utalnak, hogy az o- és m-Tyr képes beépülni a zsírsejtek fehérjéibe. Majd a beépülést követően megzavarják az inzulin-jelátvitelét és gátolják az inzulin-stimulálta glükóz felvételt, tehát metabolikus inzulin-rezisztencia kialakulásához vezetnek, pontosan úgy, ahogy az kialakul hiperglikémiás körülmények között.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

3T3-L1-adipocitákon történt vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy módosított fenilalanin-származékokat –nevezetesen o- és m-Tyrt– tartalmazó médiumban nőtt sejtekben szignifikánsan csökken az inzulin-indukálta glükózfelvétel, következtetésképpen a sejtek inzulin-rezisztenssé válnak. Ennek háttérében feltételeztük, hogy az o- és m-Tyr-t a sejtek felveszik és fehérjékbe beépítik, mely hipotézisünket bebizonyítottuk, továbbá láttuk azt is, hogy mindezek a transzportfolyamatok inzulintól függetlenül zajlanak le a sejtekben. A kóros tirozinok fehérjékbe való beépülése, még pontosabban a jelátviteli fehérjék kritikus, tirozin-foszforilációs pontjaira való beépülése az inzulin-rezisztencia egy új, lehetséges magyarázata lehet (17. ábra). Ezt eredményeink is alátámasztották, miszerint megváltozott fehérje-foszforilációt észleltünk az inzulin-jelátvitelben szerepet játszó Akt és IRS-1 fehérjék esetén, melyet három sejtvonalon is bebizonyítottuk. Az o- és m-Tyr-hatás időfüggésének vizsgálati eredményeiből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az inzulin-rezisztencia már az egy napos kezelés esetén kialakul és az egész tenyésztési idő alatt megmarad. Ez a hatás o-Tyr esetén háromszoros, m-Tyr esetén négyszeres mennyiségű p-Tyr-al kiküszöbölhető volt, melyből arra következtethetünk, hogy a p-Tyr kompetícióban áll a m-, és o-Tyr-al. Ez a tény a jövőben klinikai jelentőséggel bírhat, amennyiben a p-Tyr szupplementáció hatékony lehet az inzulin-rezisztencia kezelésében. Ez utóbbi feltételezésünk egy szabadalom alapját is képezi [170].



17. ábra. Az inzulin-rezisztencia mechanizmusa. A módosított tirozin-izomerek fehérjékbe való beépülése olyan jelátvitelben történő változásokat idéz elő melynek hatására csökken a sejtek inzulin-indukálta glükózfelvétele. A sejtek inzulin-rezisztenssé válnak.

9. A DOLGOZAT TÉZISEI

9.1. A módosult fenilalanin-származékok inzulin-rezisztenciában betöltött szerepe (1. vizsgálat)

- Az o- és m-Tyr-t a sejtek felveszik
- Az o- és m-Tyr-t a sejtek beépítik fehérjéikbe
- Az o- és m-Tyr hatására csökken a 3T3-L1-adipociták inzulin-függő glükózfelvétele
- Az o- és m-Tyr glükózfelvételre gyakorolt hatását a p-Tyr képes kiküszöbölni
- Az o- és m-Tyr hatására csökken a 3T3-L1-adipocitákban, HEK-sejtekben és makrofágokban az Akt inzulin hatására történő aktiváló foszforilációja
- Az o- és m-Tyr hatására 3T3-L1-adipocitákban, HEK-sejtekben és makrofágokban az IRS-1 bazális foszforilációja nő, de inzulin hatására nem következik be a foszforiláció szignifikáns fokozódása, tehát az inzulinhatás elmarad

10. A DISSZERTÁCIÓHOZ CSATLAKOZÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Judit Mohás-Cseh, Gergő Attila Molnár, Marianna Pap, Boglárka Laczy, Tibor Vas, Melinda Kertész, Krisztina Németh, Csaba Hetényi, Orsolya Csikós, Gábor K. Tóth, Attila Reményi and István Wittmann. Incorporation of Oxidized Phenylalanine Derivatives into Insulin Signaling Relevant Proteins May Link Oxidative Stress to Signaling Conditions Underlying Chronic Insulin Resistance

BIOMEDICINES 2022 Apr 22;10(5):975. IF: 4,757

Összesített impakt faktor: 4,757

11. PUBLIKÁCIÓS LISTA

11.1. A disszertációhoz nem csatlakozó tudományos közlemények

1. Degrell P, Cseh J, Mohás M, Molnár GA, Pajor L, Chatham JC, Fülöp N, Wittmann I. Evidence of O-linked N-acetylglucosamine in diabetic nephropathy. Degrell P és Cseh J ekvivalens első szerzők. *LIFE SCIENCES*. 2009 Mar 27;84(13-14):389-93. IF : 2,56
2. Szijarto IA, Molnar GA, Mikolas E, Fisi V, **Cseh J**, Laczy B, Kovacs T, Boddi K, Takatsy A, Gollasch M, Koller A, Wittmann I Elevated Vascular Level of ortho-Tyrosine Contributes to the Impairment of Insulin-Induced Arterial Relaxation *HORMONE AND METABOLIC RESEARCH* 46:(11) pp. 749-752. (2014) IF: 2,121
3. Mikolás E, **Cseh J**, Pap M, Szijártó I A, Balogh A, Laczy B, Bekő V, Fisi V, Mérei A, Molnár G A, Szeberényi J, Wittmann I Effects of erythropoietin on glucose metabolism. *HORMONE AND METABOLIC RESEARCH* 44:(4) pp. 279-285. (2012) IF: 2,145
4. Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, **Cseh J**, Mikolás E, Szijártó IA, Halmai R, Mészáros GL, Sümegi B, Winkler G, Wittmann I Rezveratrol hatása 2-es típusú diabeteses betegek anyagcseréjére. *MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM* 65:(2) pp. 75-81. (2012)
5. Brasnyó P., Molnár G.A., Mohás M., Laczy B., **Cseh J.**, Mikolás E., Szijártó I.A., Mérei Á., Halmai R., Mészáros L.G., Sümegi B., Wittmann I.: Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *BRITISH JOURNAL OF NUTRITION* 106(3): 383-389 (2011), IF: 3,072
6. Nagy G, Gaszner B, Lányi E, Markó L, Fehér E, **Cseh J**, Kőszegi T, Betlehem J, Sulyok E, Cziráki A, Wittmann I. Selective association of endogenous ouabain with subclinical organ damage in treated hypertensive patients. *JOURNAL OF HUMAN HYPERTENSION* 25(2):122-129 (2011), IF: 2,176

7. Mohás M, Kisfali P, Baricza E, Mérei A, Maász A, **Cseh J**, Mikolás E, Szijártó IA, Melegh B, Wittmann I. A polymorphism within the fructosamine-3-kinase gene is associated with HbA1c Levels and the onset of type 2 diabetes mellitus. *EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES* **118**(3):209-212 (2011), IF: 1,596

8. Brasnyó P., Molnár G.A., Mohás M., Laczy B., **Cseh J.**, Mikolás E., Szijártó I.A., Mérei Á., Halmai R., Mészáros L.G., Sümegi B., Wittmann I.: Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *BRITISH JOURNAL OF NUTRITION* **106**(3): 383-389 (2011), IF: 3,072

9. Marosvolgyi T, Horvath G, Dittrich A, **Cseh J**, Lelovics Zs, Szabo E, Decsi T, Figler M. Fatty acid composition of plasma lipid classes in chronic alcoholic pancreatitis. *PANCREATOLOGY* **10**(5):580-585 (2010), IF: 2,128

10. Mohás M, Kisfali P, Jaromi L, Maász A, Fehér E, Csongei V, Polgár N, Safrany E, **Cseh J**, Sümegi K, Hetyesy K, Wittmann I, Melegh B GCKR gene functional variants in type 2 diabetes and metabolic syndrome: do the rare variants associate with increased carotid intima-media thickness? *CARDIOVASCULAR DIABETOLOGY* **9**:(1) Paper 79. 7 p. (2010) IF: 2,72

11. Nagy Gábor, Gaszner Balázs, Lányi Éva, Markó Lajos, Fehér Eszter, **Cseh Judit**, Kőszegi Tamás, Betlehem József, Sulyok Endre, Cziráki Attila, Wittmann István Az endogén ouabain összefügg a hypertóniás betegek kardiovaszkuláris állapotával *MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM* **6**:(63. évf.) pp. 435-442. (2010)

12. Wagner L, Laczy B, **Cseh J**, Tamaskó M, Mazák I, Markó L, Molnár G A, Wagner Z, Mohás M, Fekete A, Wittmann I Cigarettafüst okozta elváltozások az endothelsejtekben. *HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA* **14**:(3) pp. 153-158. (2010)

13. Laczy B., **Cseh J.**, Mohás M., Markó L., Tamaskó M., Kőszegi T., Molnár G. A., Wagner Z., Wagner L., Wittmann I.: Effects of pentoxifylline and pentosan polysulphate combination therapy on diabetic neuropathy in type 2 diabetes mellitus. *ACTA DIABETOLOGICA* **46**(2): 105-111 (2009), IF: 1,549

14. Szigeti N, Markó L, Molnár GA, Fábíán G, **Cseh J**, Mohás M, Figler M, Király A, Kőszegi T, Wittmann I. Microalbuminuria in inflammatory bowel diseases using immunoturbidimetry and high-performance liquid chromatography. *ACTA GASTRO-ENTEROLOGICA BELGICA* 72(4):394-401 (2009), IF: 1,01

15. Szigeti N, Molnár G A, Markó L, Fábíán Gy, **Cseh J**, Mérei Á, Szijártó I, Wittmann I Microalbuminuria colorectalis carcinomában. *MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM* 6: pp. 460-465. (2009)

16. Szigeti N, Molnár G A, Markó L, Fábíán Gy, **Cseh J**, Mérei Á, Szijártó I, Wittmann I Microalbuminuria colorectalis carcinomában. *MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM* 6: pp. 460-465. (2009)

17. Szigeti Nóra, Markó Lajos, Molnár Gergő Attila, Fábíán György, **Cseh Judit**, Figler Mária, Király Ágnes, Kőszegi Tamás, Wittmann István Microalbuminuria krónikus gyulladáshoz társuló bélbetegségekben. Az immunoturbidimetriás és a nagy felbontású folyadék-kromatográfiás módszer összehasonlítása Crohn-betegekben és colitis ulcerosában szenvedőkben. *MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM* 62:(1) pp. 26-33. (2009)

18. Mohás M., Szigeti N., Markó L., Molnár GA., **Cseh J.**, Laczy B., Tamaskó M., Balla J., Kappelmayer J., Wagner L., Wagner Z., Csiky B., Nagy J., Wittmann I.: Serum total LDH activity and LDH-2 isozyme in nephrotic syndrome. *KIDNEY AND BLOOD PRESSURE RESEARCH* 31(1):47-54 (2008), IF: 1,268

19. Degrell P., Wagner Z., Szijártó I. A., Wagner L., Markó L., Mohás M., **Cseh J.**, Wittmann I.: Morphology of glomerular Hematuria Is Reproduced in vitro by Carbonyl Stress. *NEPHRON EXPERIMENTAL NEPHROLOGY* 18:110(1):e25-e30 (2008), IF: 1,596

20. Markó L, **Cseh J**, Kőszegi T, Szabó Z, Molnár GA, Mohás M, Szigeti N, Wittmann I. Storage at -80 degrees C decreases the concentration of HPLC-detected urinary albumin: possible mechanisms and implications. I. *JOURNAL OF NEPHROLOGY* 22(3):397-402 (2008), IF: 1,252

21. Wagner L., Bekő V., Wagner Z., **Cseh J.**, Boros AG., Wittmann I.: A renalis anaemia jelentősége diabetes mellitusban. *DIABETOLOGIA HUNGARICA* 16:(1) pp. 51-59. (2008)

22. Csiky B., Markó L., Mohás M., **Cseh J.**, Mikolás E., Szijártó I., Wittmann I.: A losartan pleiotrop hatásai. **LAM 18**(10): 663-666. (2008). Vas T., Markó L., Mohás M., **Cseh J.**, Mikolás E., Szijártó I., Wittmann I.: Cardiovascularis rizikócsökkenés vesebetegekben. **GRÁNUM 11**(4): 17-22. (2008)
23. Figler M, **Cseh J.**, Bodrogi P. Az étrendi flavonoidok és hatásaik **MEDICUS ANONYMUS 5-6.** 9-14. (2008)
24. Figler M, Major A, **Cseh J.** Flavonoidtartalmú étrend-kiegészítő fogyasztásának szubjektív hatása az egészségmutatókra. **ÚJ DIÉTA 3-4** 20-22. (2008)
25. Wagner L., Laczy B., Tamaskó M., Mazák I., Markó L., Molnár G. A., Wagner Z., Mohás M., **Cseh J.**, Fekete A., Wittmann I.: Cigarette smoke-induced alterations in endothelial nitric oxid synthase phosphorylation: role of protein kinase C. **ENDOTHELIUM 14**(4):245-255 (2007), IF: 1,740
26. Figler M, Gasztonyi B, **Cseh J.**, Horváth G, Kisbenedek AG, Bokor Sz, Decsi T.: Association on n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids in plasma lipid classes with inflammatory bowel diseases. **BRITISH JOURNAL OF NUTRITION 97**(6):1154-61 (2007), IF: 2,339
27. Wittmann I., Wagner L., Markó L., Tamaskó M., Laczy B., Mohás M., **Cseh J.**, Melegh B.: A hereditær haemochromatosis jelentősége a diabeteszes betegek gondozásában. **ORVOSI HETILAP 148**(3):111-115. (2007)
28. Wagner Z., Wagner L., Tamaskó M., Markó L., Mohás M., **Cseh J.**, Wittmann I.: A renin-angiotenzin-rendszer patogenetikai szerepe az érkárosodás kialakulásában. **HÁZIORVOS TOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE 12**(1): 47-51. (2007)
29. Laczy B., Markó L., Tamaskó M., **Cseh J.**, Kőszegi T., Wagner L., Wagner Z., Molnár G. A., Mohás M., Wittmann I.: A pentoxifyllin és pentosan polysulphat kombinációs kezelés hatása a diabeteszes neuropathiára 2-es típusú diabetes mellitusban. **DIABETOLOGIA HUNGARICA 15**(1): 21-29. (2007)
30. Vágási K., Késői I., Kovács t., Molnár B., Degrell P., Wittmann I., **Cseh J.**, Nagy J.: Növényi kivonat okozta akut veseelégtelenség. **ORVOSI HETILAP 148**(9): 421-424. (2007)

31. Mohás M., Markó L., Molnár G. A., **Cseh J.**, Laczy B., Tamaskó M., Balla J., Kappelmayer J., Wagner L., Wagner Z., Csiky B., Nagy J., Wittmann I.: A szérumban LDH-aktivitás és a vese-LDH izoenzim jelentősége nephrosis szindrómában. *MAGYAR BELORVOSI ARCHÍVUM* 62: 47-52. (2007)
32. Bekő V., Mazák I., Markó L., **Cseh J.**, Wagner L., Wittmann I.: A dihidralazin eritropoézisre kifejtett hatásának vizsgálata egy azotaemiás beteg kórtörténetében. *HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA* 11(2): 91-94. (2007)
33. Wittmann I., Laczy B., Mikolás E., Markó L., Mohás M., **Cseh J.**, Wagner L.: A dohányzás inzulin-rezisztenciát okoz és növeli a 2-es típusú diabetes mellitus, illetve a metabolikus szindróma kialakulásának kockázatát. *DIABETOLOGIA HUNGARICA* 15(4):305-311. (2007)
34. Wittmann I., Markó L., Molnár G. A., Tamaskó M., Laczy B., Mohás M., **Cseh J.**, Wagner Z., Wagner L.: Az endotheldyszfunkció gyógyszeres kezelése. *GRANUM* 9(4):7-10. (2006)
35. Wittmann I., Molnár G. A., Tamaskó M., Laczy B., Markó L., Mohás M., **Cseh J.**, Wagner Z., Wagner L.: A protein kináz C- β szelektív gátlásának jelentősége a diabeteszes microvasculáris szövődmények kezelésében. *DIABETOLOGIA HUNGARICA* 14(Suppl 4):13-18. (felkért összefoglaló) (2006)

Összesített impaktfaktor: 32,274

11.2. Absztraktok

1. Brasnyó P, Molnár G A, Mérei Á, **Cseh J**, Mikolás E, Halmai R, Mészáros G L, Sümegi B, Wittmann I Rezveratrol hatása 2-es típusú diabeteses betegekben. Új eredményeink
DIABETOLOGIA HUNGARICA 18:(S1) pp. 63-64. (2010)
2. Brasnyó P, Molnár GA, Mohas M, Marko L, Laczy B, **Cseh J**, Mikolas E, Szijarto IA, Merai A, Halmai R, Meszaros LG, Sumegi B, Wittmann I Effect of resveratrol on insulin sensitivity, oxidative stress and Akt pathway in humans
DIABETOLOGIA : CLINICAL AND EXPERIMENTAL DIABETES AND METABOLISM 53: p. 755. (2010) IF: 6,973
3. Mikolás E Zs, Fisi V, **Cseh J**, Papp M, Szijártó I A, Molnár G A, Bekő V, Wittmann I Az eritropoietin szénhidrát-anyagcserére gyakorolt hatásai
DIABETOLOGIA HUNGARICA 18:(S1) pp. 166-168. (2010)
4. Mikolás EZ, Fisi V, **Cseh J**, Pap M, Szijártó IA, Molnár GA, Bekő V, Wittmann I Effects of Erythropoietin on Glucose Metabolism
KIDNEY & BLOOD PRESSURE RESEARCH 35:(6) pp. 425-426. (2010) IF: 1,500
5. Szijártó I A, Mérei Á, Fisi V, Fésüs G, **Cseh J**, Mikolás E Zs, Molnár G A, Wittmann I Az oxidatív stressz befolyásolhatja az inzulin vazoaktív hatását?
DIABETOLOGIA HUNGARICA 18:(S1) pp. 205-206. (2010)
6. Szijarto IA, Merai A, Fisi V, Fesus G, **Cseh J**, Mikolas EZ, Molnar GA, Wittmann I Does Oxidative Stress Affect the Vasoactive Effect of Insulin?
KIDNEY AND BLOOD PRESSURE RESEARCH 35:(6) p. 42. (2010) IF: 1,5
7. Mikolas EZ, Fisi V, **Cseh J**, Pap M, Szijarto IA, Molnar GA, Beko V, Wittmann I Effects of Erythropoietin on Glucose Metabolism
KIDNEY AND BLOOD PRESSURE RESEARCH 35:(6) pp. 425-426. (2010) IF: 1,5
8. Szigeti N, Molnár G, Markó L, Fábrián G, **Cseh J**, Wittmann I Microalbuminuria in colorectal cancer

9. Vági Zs., Major A., **Cseh J.**, Lelovics Zs., Jeges S., Figler M.: Subjective effects of flavonoid-containing nutritional supplements on health indicators. In: Szalay F. (Ed.): Program and Abstracts of 51st Annual Meeting of the Hungarian **SOCIETY OF GASTROENTEROLOGY, NEWSLETTER 138**. Budapest: Hungarian Society of Gastroenterology (MGT), (2009)

10. Mohás M, Kisfali P, Mérei Á, Baricza E, Duga B, Maász A, **Cseh J**, Mikolás E, Szijarto IA, Melegh B, Wittmann I. A polymorphism within the fructosamine-3-kinase gene associates with HbA1c and the onset of type 2 diabetes. **EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 17** Suppl. 2. 380-81. (2009)

11. Fulop N, **Cseh J**, Degrell P, Pajor L, Chatham JC, Wittmann I O-glycosylation is increased in diabetic nephropathy, both in the tubuli and in the glomeruli **ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 96**:(1) p. 76. (2009)

12. Fulop N, **Cseh J**, Degrell P, Pajor L, Chatham JC, Wittmann I Changes in O-linked N-acetylglucosamine is associated with diabetic nephropathy in the human kidney **DIABETOLOGIA 51**:(Suppl. 1) p. S488. (2008)

13. **Cseh J.**, Degrell P., Fülöp N., Markó L., Mohás M., Pajor L., John C. Chatham, Wittmann I.: Diabéteszes nefropátiában emelkedik az O-glikoziláció mennyisége a tubulusokban és a glomerulusokban. **HYPERTONIA ÉS NEPHROLÓGIA 12** (S5):241 (2008)

14. Szigeti N., Markó L., Molnár G.A., **Cseh J.**, Mohás M., Mikolás E., Kőszegi T., Fábíán Gy., Figler M., Király Á., Wittmann I.: Microalbuminuria vizsgálata nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) és immunturbidimetriac (IT) módszerrel gyulladásoos bélbetegségeekben. **HYPERTONIA ÉS NEPHROLÓGIA 12** (S5):238 (2008)

15. Markó L., **Cseh J.**, Kőszegi T., Szabó Z., Molnár G.A., Mohás M., Szigeti N., Szijártó I., Wittmann I.: A HPLC-vel mérhető vizelet albumin mennyisége a -80°C-os tárolás során jelentősen csökken. Lehetséges mechanizmusok és következmények. **HYPERTONIA ÉS NEPHROLÓGIA 12**(S5):222 (2008)

16. **Judit Cseh**, Péter Degrell, Norbert Fülöp, László Pajor, John C Chatham, and István Wittmann O-Glycosylation is Increased in the Tubuli and Glomeruli of Patients with Diabetic Nephropathy.
FASEB J. 22:1b160 IF: 7,049 (2008)
17. L. Wagner, B. Laczy, M. Tamaskó, I. Mazák, L. Markó, G. Molnár, Z. Wagner, M. Mohás, **J. Cseh**, A. Fekete, I. Wittmann: The effect of cigarette smoke on the phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinase C.
NEPHROLOGY DIALYSIS AND TRANSPLANTATION 22 (S6): vi243-244 (2007)
18. **Cseh J.**, Brasnyó P., Mohás M., Laczy B., Tamaskó M., Molnár G. A., Wagner Z.: Transz-rezveratrol in vivo hatásainak vizsgálata 2-es típusú diabetes mellitusos betegekben. Előzetes eredmények.
FOLIA HEPATOLOGICA 11 (S3): 12-13 (2007)
19. M. Figler, G.C. Talián, J. Bene, **J. Cseh**, I. Battyáni, Sz.D. Fejös, K.B. Müller, B. Melegh : Carnitine Profile in Pancreatic Enzyme Supplemented Patients with Chronic Pancreatitis.
PANCREATOLOGY 7:269 (2007)
20. Wagner L, Laczy B., Boros A. G., Tamaskó M., Mikolás E., Szijártó I. A., Markó L., Mohás M., **Cseh J.**, Fekete A., Wittmann I.: Kivédhető-e a dohányzás nitrogén monoxid-termelést csökkentő hatása?
FOLIA HEPATOLOGICA 11 (S3):40-41 (2007)
21. Laczy B., Tamaskó M., Wagner Z., Wagner L., Kőszegi T., Molnár G. A., Markó L., Mohás M., **Cseh J.**, Nagy J., Wittmann I.: A pentoxyfillin és a pentozán-poliszulfát kombinációs kezelés előnyösen befolyásolja a diabeteses nephropathiát és az albuminuriát.
MAGYAR BELORVOSI ARCHÍVUM SUPPLEMENTUM (S2): 104. (2006)
22. Markó L., Molnár G. A., Wagner Z., Wagner L., Matus Z., Kőszegi T., Laczy B., Tamaskó M., Mohás M., **Cseh J.**, Nagy J., Wittmann I.: Vizelet fehérje glikoxidációs termékek meghatározása diabeteses betegekben.
MAGYAR BELORVOSI ARCHÍVUM SUPPLEMENTUM (S2): 111. (2006)

23. Markó L., Molnár G. A., Wagner Z., Wagner L., Matus Z., Kőszegi T., Laczy B., Tamaskó M., Mohás M., **Cseh J.**, Nagy J., Wittmann I.: Determination of protein glycoxidation-products in the urine of diabetic patients.
ACTA PHYSIOLOGIA HUNGARICA:93 (2-3):210. (2006)
24. Markó L., Wagner Z., **Cseh J.**, Kőszegi T., Matus Z., Wittmann I.: HPLC és nephelometria (NM) összehasonlítása a mikroalbuminuria diagnózisában.
HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 10 (S5):107 (2006)
25. Tamaskó M., Kalmár NK, **Cseh J.**, Póto L, Boros AG, Wittmann I. A vese esetleges szerepe a vércukorszint-oszcilláció szabályozásában.
HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA:106. (2006)
26. **Cseh J.**, B. Müller K., G. Kisbenedek A., Rab R., Horváth G., Figler M.: Effect of different diets (Herbal and Body-control) on body composition and metabolic parameters in obese patients
WORLD CONGRESS OF GASTROENTEROLOGY Montreal, Canada p187. (2005)
27. Laczy B., Tamaskó M., Molnár G. A., **Cseh J.**, Kőszegi T., Markó L., Wagner Z., Wagner L., Nagy J., Wittmann I.: Elővizsgálat arról, hogy a pentoxifyllin kezelés hogyan befolyásolja a diabeteses neuropathiát és az albuminuriát.
HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 9 (S4): 83. (2005)

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Wittmann István Professor Úrnak támogatásáért, útmutatásáért. Azért, hogy lelkesítő szavaival és iránymutatásával átsegített a kudarckok okozta nehézségeken.

Köszönöm Pap Marianna tanárnő szakmai és baráti támogatását, ötleteit, a kísérleteim körüli szervezőmunkáját.

Köszönöm kollégáim, elsősorban Dr. Mikolás Esztella Zsóka, Szijártó István András, Dr. Mohás Márton, Dr. Markó Lajos segítségét, akik munkájukkal hozzájárultak eredményeimhez.

Köszönettel tartozom azért az asszisztensi háttérért, mely lehetőséget teremtett a zavartalan munkavégzéshez és nagymértékben hozzájárult eredményeim létrejöttéhez, Lendvai Anikónak, Bertusz Józsefnének, Sámikné Varga Ilonának, Szalma Krisztinának és Póta Saroltának.

Szeretném megköszönni a II-es Számú Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum professzori titkárságán dolgozó hölgyek –Bodor Enikő, Horváth Claudia és Horváth Viktória-munkáját, továbbá klinikánk összes dolgozójának segítségét, akik munkában támogatást nyújtottak.

Végezetül köszönöm családom és barátaim türelmét, hogy bíztak bennem és minden körülményt biztosítottak annak érdekében, hogy munkámat zavartalanul végezhessem.

13. IRODALOMJEGYZÉK

1. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes research and clinical practice*. 103(2):137-49. 2014.
2. Dunstan D, W Zimmet PZ, Welborn TA, De Courten MP, Cameron AJ, Sicree RA, Dwyer T, Colagiuri S, Jolley D, Knuiman M, Atkins R., Shaw JE. The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Diabetes Care*, vol. 25, no. 5, pp. 829–34. May 2002
3. Robertson RP, Harmon JS. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: a case of double jeopardy for the pancreatic islet β cell. *Free Radical Biology and Medicine*, Elsevier. 2006.
4. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus American Diabetes Association *Diabetes Care* 37 (Supplement 1): S81-S90. 2014.
5. Laakso M.J *Intern Med*. 249:225. 2001.
6. Grundy SM. A constellation of complications: the metabolic syndrome. *Clin. Cornerstone* 7:36-45. 2005.
7. Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 104:517-29.2001.
8. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2:S97-107. 2005.
9. Cernea S, Dobreanu M. Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications. *Biochem. Medica*, pp. 266–280, 2013.
10. Banting FG, Best CH. The internal secretion of the pancreas. *J. Lab. Clin. Med.* 7. 1922.
11. Michael W, Donald FS MD, Louis HP MD PhD. *Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships* 2014.
12. Steiner DF. Evidence for a precursor in the biosynthesis of insulin. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 30:60-68. 1967.
13. Adams MJ, Blundell TL, Dodson EJ, Dodson GG, Vijayan M., Baker EN, Hardine MM, Hodgkin DC, Rimer B, Sheet S. Structure of rhombohedral 2 zinc insulin crystals. *Nature* 224:491-495. 1969.
14. Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, Hodgkin DC, Mercola DA, Vijayan M. Atomic positions in rhombohedral 2-zinc insulin crystals. *Nature* 231:506-511. 1971.
15. Brange J, Ribel U, Hansen JF, Dodson G, Hansen MT, Havelund S, Melberg SG, Norris F, Norris K, Snel L. Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications. *Nature* 333:679-682. 1988.
16. Chan SJ, Keim P, Steiner DF. Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73:1964-1968. 1976.

17. Zhuo F, Elizabeth RG, Dongmin L. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Department of Human Nutrition, Foods and Exercise, College of Agriculture and Life Sciences, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia 24061 *Curr Diabetes Rev*; 9(1): 25–53. January 1 2013.
18. Suckale J, Solimena M. Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Front Biosci.* 13:7156–71. 2008.
19. Chang TW, Goldberg AL. The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle. *J Biol Chem*; 253(10):3685–93. 1978.
20. Maechler P, Wollheim CB. Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature.* 402(6762):685–9. 1999.
21. Prentki, M, and Matschinsky FM. Ca²⁺, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev* 67:1185-1248. 1987.
22. Nielsen DA, Welsh M., Casadaban MJ, Steiner DF. Control of insulin gene expression in pancreatic β -cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. I. Effects of glucose and cyclic AMP on the transcription of insulin mRNA. *J. Biol. Chem.* 260:13585-13589. 1985.
23. Hughes SJ, and Ashcroft SHJ. In *Nutrient regulation of insulin secretion*. P.R. Flatt, editor. Colchester, England: Portland Press. 271-289. 1992.
24. Dixon G, Nolan J, McClenaghan N, Flatt PR, Newsholme P. A comparative study of amino acid consumption by rat islet cells and the clonal beta-cell line BRIN-BD11 - the functional significance of L-alanine. *J Endocrinol.* 179(3):447–54. 2003.
25. Tang CM, Larsen PJ, Thulesen J, Nielsen JR, Vrang N. Glucagon-like peptide 2, a neurotransmitter with a newly discovered role in the regulation of food ingestion. *Ugeskr Laeger*; 163(3):287–91. 2001.
26. MacDonald PE, El-Kholy W, Riedel MJ, Salapatek AM, Light PE, Wheeler MB. The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes.* 51 (Suppl 3):S434–42. 2002.
27. MacDonald PE, Salapatek AM, Wheeler MB. Glucagon-like peptide-1 receptor activation antagonizes voltage-dependent repolarizing K(+) currents in beta-cells: a possible glucose dependent insulinotropic mechanism. *Diabetes*; 51 (Suppl 3):S443–7. 2002.
28. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 85–96. 2006.
29. Beith JL, Alejandro EU, Johnson JD. Insulin stimulates primary beta-cell proliferation via Raf-1 kinase. *Endocrinology* 149 2251–2260 2008.
30. Templeman NM, Skovsø S, Page MM, Lim GE, Johnson JD. A causal role for hyperinsulinemia in obesity. *J Endocrinol. Review* 232(3):R173-R183. Mar. 2017.

31. De Meyts P, MD PhD, F.A.C.E The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network Visiting Professor, de Duve Institute, B-1200 Brussels, Belgium; De Meyts R&D Consulting, B-1950 Kraainem, Belgium; Global Research External Affairs, Novo Nordisk A/S, DK-2760 Måløv, Denmark Endotext 2016.
32. White MF. Mechanisms of insulin action. In J.S. Skyler (ed.). Atlas of Diabetes: Fourth Edition. DOI 10.1007/978-1-4614-1028-7_2@Springer Science+Business Media. LLC 2012.
33. Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt P Jr, Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*;2015:181643. 2015.
34. White MF. Insulin signaling in health and disease. *Science* 302:1710-1711, 2003.
35. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655-1657, 2002.
36. Avruch J. MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta* 1773:1150-1160, 2007.
37. De Meyts P. The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors. *Trends Biochem Sci* 33:376-384, 2008.
38. Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signaling pathways. *Diabetologia* 45:1475-1483, 2002.
39. Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab* 5:237-252, 2007.
40. Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. Review. *Clin Chim Acta*;375(1-2):20-35 Jan. 2007.
41. White, MF IRS. proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:E413–E422. 2002.
42. Ma Z, Gibson SL, Byrne MA, Zhang J, White MF, Shaw LM. Suppression of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) promotes mammary tumor metastasis. *Mol Cell Biol.*;26(24):9338-51. Dec 2006.
43. Yamauchi T, Y Kaburagi, K Ueki, Y.Tsuji, GR Stark, IM Kerr, T Tsushima, Y Akanuma, I Komuro, K Tobe, Y Yazaki, T Kadowaki. Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1, -2, and -3, their association with p85 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and concomitantly PI3-kinase activation via JAK2 kinase. *J. Biol. Chem.* 273:15719–15726. 1998.
44. Liang L, T Zhou, J Jiang, JH Pierce, TA Gustafson, SJ Frank. Insulin receptor substrate-1 enhances growth hormone-induced proliferation. *Endocrinology* 140:1972–1983. 1999.
45. Senthil D, G Ghosh, Choudhury BK Bhandari, BS Kasinath. The type 2 vascular endothelial growth factor receptor recruits insulin receptor substrate-1 in its signalling pathway. *Biochem. J.* 368:49–56. 2002.
46. Vuori K, E Ruoslahti. Association of insulin-receptorsubstrate-1 with integrins. *Science* 266:1576–1578. 1994.

47. Araki, E, MA Lipes, ME Patti, JC Bruning, B Haag III, RS Johnson, and CR Kahn. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372:186–190. 1994.
48. Schubert M, D. P Brazil, DJ Burks, JA Kushner, J Ye, CL Flint, J. Farhang-Fallah, P Dikkes, X M Warot, C Rio, G Corfas, M F White. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J. Neurosci.* 23:7084–7092. 2003.
49. Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat. Genet.* 23:32–40. 1999.
50. Liu SC, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* 274:18093–18099. 1999.
51. Fantin VR., Wang Q, Lienhard GE, SR Keller. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278:E127–E133. 2000.
52. Huang C, Wu M, Du J, Liu D, Chan C. Systematic modeling for the insulin signaling network mediated by IRS(1) and IRS(2). *J Theor Biol.* 21;355:40-52. Aug 2014.
53. Zick Y. Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance. *Biochem Soc Trans.* Nov;32(Pt 5):812-6. 2004.
54. Taniguchi CM, Ueki K, Kahn R. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J Clin Invest.* 115(3):718-27. Erratum in: *J Clin Invest.* 115(5):1388. Mar 2005.
55. Gavin JR 3rd, Roth J, Neville DM Jr, de Meyts P, Buell DN. Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: direct demonstration in cellculture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71(1):84-8. Jan. 1974.
56. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 22;365(9468):1415-28. Apr 16. 2005.
57. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237:E214-32. 1979.
58. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*;28:412-9. 1985.
59. Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev*;14:447-55. 2003.
60. Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia*; 47:170-84. 2004.
61. Solinas G, Becattini B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. Review. *Mol Metab*;6(2):174-184. Dec 2016.

62. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*;440(7086):944-8. Apr 13 2006.
63. Akbari M, Ostadmohammadi V, Lankarani KB, Tabrizi R, Kolehdoos F, Khatibi SR, Asemi Z. The effects of alpha-lipoic acid supplementation on glucose control and lipid profiles among patients with metabolic diseases: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Metabolism* 2018, 87, 56–69.
64. Garvey WT, Olefsky JM, Griffin J, Hamman RF, Kolterman OG. The effect of insulin treatment on insulin secretion and insulin action in type, I.I.; diabetes mellitus. *Diabetes* 1985, 34, 222–234.
65. Weng J, Li Y, Xu W, Shi L, Zhang Q, Zhu D, Hu Y, Zhou Z, Yan X, Tian H et al. Effect of intensive insulin therapy on beta-cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: A multicentre randomised parallel-group trial. *Lancet* 2008, 371, 1753–176
66. Vlassara H, Cai W, Tripp E, Pyzik R, Yee K, Goldberg L, Tansman L, Chen X, Mani V, Fayad ZA et al. Oral AGE restriction ameliorates insulin resistance in obese individuals with the metabolic syndrome: A randomised controlled trial. *Diabetologia* 2016, 59, 2181–2192.
67. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 13;414(6865):813-20. Dec 2001.
68. Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, van den Enden M, Kilo C, Tilton RG. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Review.Diabetes.*;42(6):801-13. Jun 1993.
69. Thornalley PJ. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J*. Jul 1;269(1):1-11. 1990.
70. Haitoglou CS, Tsilibary EC, Brownlee M, Charonis AS. Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glycosylated laminin/type IV collagen. *J Biol Chem*. 25;267(18):12404-7. Jun 1992.
71. Williams B, Gallacher B, Patel H, Orme C. Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes*. 46(9):1497-503. Sep 1997.
72. Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest.*: 100(1):115-26. Jul 1997.
73. Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 290 (1), E1–E8, 2006.
74. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the

- hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *Journal of Clinical Investigation* 101 (1), 160–169, 1998.
75. James LR, Fantus IG, Goldberg H, Ly H, Scholey JW. Overexpression of GFAT activates PAII promoter in mesangial cells. *American Journal of Physiology and Renal Physiology* 279 (4), F718–727, 2000.
 76. Masson E, Wiernsperger N, Lagarde M, E Bawab S. Glucosamine induces cell-cycle arrest and hypertrophy of mesangial cells: implication of gangliosides. *Biochemical Journal* 388 (Pt 2), 537–544, 2005.
 77. Nerlich AG, Sauer U, Kolm-Litty V, Wagner E, Koch M, Schleicher ED. Expression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in human tissues: evidence for high variability and distinct regulation in diabetes. *Diabetes* 47 (2), 170–178, 1998.
 78. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Review.Br Med Bull.*;49(3):481-93. Jul 1993.
 79. Harrison DG, Cai H. Endothelial control of vasomotion and nitric oxide production. *Review.Cardiol Clin.*;21(3):289-302. Aug 2003.
 80. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutases: you've come a long way, baby. *Antioxid Redox Signal.*;20(10):1548-9. doi: 10.1089/ars.2013.5547. Apr 2014.
 81. Haber F, Weiss J. The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 147, no. 861, pp. 332–351, Nov. 1934.
 82. Fenton H. J. H. LXXIII. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.*, vol. 65, p. 899, 1894
 83. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, vol. 46, no. 11, pp. 1733–1742, 1997.
 84. Solinas G, Karin M. JNK1 and IKK: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J.* 24, 2596–2611 2010.
 85. Hideaki K, Naoto K, Munehide M, Taka-aki Matsuoka. Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of Type 2 Diabetes and Atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2010:453892. 2010.
 86. Rudich A, Tlrosh R, Potashnik R, Hemi HK, Bashan N, Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, vol. 47, no. 10, pp. 1562–1569, 1998.
 87. Haber TKT, Lam Z, Yu et al. N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. *American Journal of Physiology*, vol. 285, no. 4, pp. E744–E753, 2003.
 88. Jacob S, Ruus P, Hermann R et al. Oral administration of rac- α -lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 27, no. 3-4, pp. 309–314, 1999.

89. Mohás-Cseh J, Molnár GA, Pap M, Laczy B, Vas T, Kertész M, Németh K, Hetényi C, Csikós O, Tóth GK, Reményi A, Wittmann I. Incorporation of Oxidized Phenylalanine Derivatives into Insulin Signaling Relevant Proteins May Link Oxidative Stress to Signaling Conditions Underlying Chronic Insulin Resistance. *Biomedicines*. Apr 22;10(5):975. 2022.
90. Molnár GA, Wagner Z, Markó L, Kó Szegi T, Mohás M, Kocsis B, Matus Z, Wagner L, Tamaskó M, Mazák I, Laczy B, Nagy J, Wittmann I. Urinary ortho-tyrosine excretion in diabetes mellitus and renal failure: evidence for hydroxyl radical production. *Kidney Int.*;68(5):2281-7. Nov 2005.
91. Molnár GA, Nemes V, Biró Z, Ludány A, Wagner Z, Wittmann I. Accumulation of the hydroxyl free radical markers meta-, ortho-tyrosine and DOPA in cataractous lenses is accompanied by a lower protein and phenylalanine content of the water-soluble phase. *Free Radic Res.* 39(12):1359-66. Dec 2005.
92. Ogihara T, Hirano K, Ogihara H, Misaki K, Hiroi M, Morinobu T, Kim HS, Ogawa S, Ban R, Hasegawa M, Tamai H. Non-protein-bound transition metals and hydroxyl radical generation in cerebrospinal fluid of newborn infants with hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatr. Res.* 53(4), 594-599. 2003.
93. Dandona P, Mohanty P, Hamouda W, Ghanim H, Aljada A, Garg R, Kumar V. Inhibitory effect of a two day fast on reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes and plasma ortho-tyrosine and meta-tyrosine concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86(6), 2899-2902. 2001.
94. Szélig L, Kun S, Woth G, Molnár GA, Zrínyi Z, Kátai E, Lantos J, Wittmann I, Bogár L, Miseta A, Csontos Cs. Time courses of changes of para-, meta-, and ortho-tyrosine in septic patients: A pilot study. *Redox Rep.*, 2015.
95. Molnár GA, Kun S, Sélley E, Kertész M, Szélig L, Csontos C, Böddi K, Bogár L, Miseta A, Wittmann I. Role of Tyrosine Isomers in Acute and Chronic Diseases Leading to Oxidative Stress - A Review. *Curr Med Chem.* 2016;23(7):667-85.
96. Szijártó IA, Molnár GA, Mikolás E, Fisi V, Laczy B, Gollasch M, Koller A, Wittmann I. Increase in insulin-induced relaxation of consecutive arterial segments toward the periphery: Role of vascular oxidative state. *Free Radic. Res.* , 48(7), 749-757. 2014
97. Szijártó I.A, Molnár GA, Mikolás E, Fisi V, Cseh J, Laczy B, Kovács T, Böddi K, Takátsy A, Gollasch M, Koller A, Wittmann I. Elevated vascular level of ortho-tyrosine contributes to the impairment of insulin induced arterial relaxation. *Horm. Metab. Res.* , 46(11), 749-752. 2014.
98. Kun S, Mikolás E, Molnár GA, Sélley E, Laczy B, Csiky B, Kovács T, Wittmann I. Association of plasma ortho-tyrosine/para-tyrosine ratio with responsiveness of erythropoiesis-stimulating agent in dialyzed patients. *Redox Rep.* , 19(5), 190-198. 2014.
99. Mikolás E, Kun S, Laczy B, Molnár GA, Sélley E, Kőszegi T, Wittmann I. Incorporation of ortho- and metatyrosine into cellular proteins leads to

- erythropoietinresistance in an erythroid cell line. *Kidney Blood Press. Res*, 38(2-3), 217-225. 2013.
100. Sélley E, Kun S, Kürthy M, Kovács T, Wittmann I, Molnár GA. Paratyrosine supplementation improves insulin- and liraglutide-induced vasorelaxation in cholesterolfed rats. *Protein Pept. Lett.*, 22(8), 736-742. 2015.
 101. Ruggiero RA, Bruzzo J, Chiarella P, di Gianni P, Isturiz MA, Linskens S, Speziale N, Meiss RP, Bustuoabad OD, Pasqualini CD. Tyrosine isomers mediate the classical phenomenon of concomitant tumor resistance. *Cancer Res*; 71: 7113-7124 2011.
 102. Mikolás E, Kun Sz, Laczy B, Molnár GA, Sélley E, Kőszegi T, Wittmann I. Incorporation of Ortho- and MetaTyrosine Into Cellular Proteins Leads to Erythropoietin-Resistance in an Erythroid Cell Line. *Kidney Blood Press Res*;38(2-3):217-25. 2013.
 103. Park K, Gross M, Lee DH, Holvoet P, Himes JH, Shikany JM, Jacobs DR Jr. Oxidative stress and insulin resistance: the coronary artery risk development in young adults study. *Diabetes Care*. 32(7):1302-7. Jul; 2009.
 104. Park K, Steffes M, Lee DH, Himes JH, Jacobs DR Jr. Association of inflammation with worsening HOMA-insulin resistance. *Diabetologia*. 52(11):2337-44. Nov 2009.
 105. Habibi J, Whaley-Connell A, Hayden MR, DeMarco VG, Schneider R, Sowers SD, Karuparthi P, Ferrario CM, Sowers JR.. Renin inhibition attenuates insulin resistance, oxidative stress, and pancreatic remodeling in the transgenic Ren2 rat. *Endocrinology*. 149(11):5643-53. 2008
 106. Tirosch A, Potashnik R, Bashan N, Rudich A. Oxidative Stress Disrupts Insulin-induced Cellular Redistribution of Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphatidylinositol 3-Kinase in 3T3-L1 Adipocytes. *J Biol Chem*. 9;274(15):10595-602. Apr 1999.
 107. Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative Stress and the Etiology of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes *Free Radic Biol Med*. 51(5): 993–999. Sep 1 2011.
 108. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes* 2015, 6, 456–480.
 109. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*; 114: 1752-1761. 2004.
 110. Liang-Jun Yan. Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. *J Diabetes Res*; 2014: 137919. 2014.
 111. Rebolledo OR, Actis Dato SM Postprandial hyperglycemia and hyperlipidemia-generated glycoxidative stress: its contribution to the pathogenesis of diabetes complications. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 9(4):191-208. Jul-Aug 2005.

112. Reyes A, Cárdenas ML. All hexokinase isoenzymes coexist in rat hepatocytes. *Biochem J.* 221(2):303-9. Jul 15 1984.
113. Hirst J Mitochondrial complex I. *Annu Rev Biochem*;82:551-75. 2013
114. Kim JA, Wei Y, Sowers JR. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res.* 102(4):401-14. Feb 29 2008.
115. Ausk KJ, Boyko EJ, Ioannou GN. Insulin Resistance Predicts Mortality in Nondiabetic Individuals in the U.S. *Diabetes Care.* 33(6): 1179–1185. Jun 2010.
116. Ptolemy AS, Lee R, Britz-McKibbin P. Strategies for comprehensive analysis of amino acid biomarkers of oxidative stress. *Amino Acids* 33: 3–18 2007.
117. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 15;272(33):20313-6. Aug 1997.
118. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142:231–255.
119. Porter NA, Caldwell SE, Mills K.A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30 277–290. 1995.
120. Ho E, Galougahi KK, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol.* 1(1): 483–491. 2013.
121. Celio S, Troxler H, Durka SS, Chladek J, Wildhaber JH, Sennhauser FH, Heizmann CW, Moeller A. Free3-nitrotyrosine in exhaled breath condensates of children fails as a marker for oxidative stress in stable cystic fibrosis and asthma. *Nitric Oxide* 15: 226–232 2006.
122. Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan M-L, Fu X, Goormastic M, Pearce GL, Gokce N, Keaney JF Jr, Penn MS, Sprecher DL, Vita JA, Hanzen SL Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *J Am Med Assoc* 289: 1675–1680. 2003.
123. Wang XL, Rainwater DL, Leone A, Mahaney MC. Effects of diabetes on plasma nitrotyrosine levels. *Diabetes Med* 21: 577–580. 2004.
124. Dalle-Donne I, Scaioni A, Guistarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Proteins as biomarkers of oxidative= nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* 24: 55–99. 2005.
125. Sitte: Oxidative damage to proteins, in: *Ageing at the molecular level*, Zglinicki Ed., Springer Dordrecht; p. 27-47. 2003.
126. Ishimitsu S, Fujimoto S, Ohara A. High-performance liquid chromatographic determination of m-tyrosine and o-tyrosine in rat urine. *J. Chromatogr.* 489(2):377-383. 1989.
127. Karam LR, Simic MG. Detecting irradiated foods: use of hydroxyl radical biomarkers. *Anal Chem.* 1988;60:1117A–1119A

128. Fu S, Dean R, Southan M, Truscott R. The hydroxyl radical in lens nuclear cataractogenesis. *J Biol Chem.* Oct 30;273(44):28603-9. 1998.
129. Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Mérei A, Halmai R, Mészáros LG, Sümegi B, Wittmann I. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br. J. Nutr.*, 106(3):383-389. 2011.
130. Ledo A, Arduini A, Asensi MA, Sastre J, Escrig R, Brugada M, Aguar M, Saenz P, Vento M. Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *Am J Clin Nutr.*;89(1):210-5. Jan 2009.
131. Shu L, Park JL, Byun J, Pennathur S, Kollmeyer J, Shayman JA. Decreased nitric oxide bioavailability in a mouse model of Fabry disease. *J Am Soc Nephrol.* Sep;20(9):1975-85. 2009.
132. Schultz S, Creed J, Schears G, Zaitseva T, Greeley W, Wilson DF, Pastuszko A. Comparison of low-flow cardiopulmonary bypass and circulatory arrest on brain oxygen and metabolism. *Ann Thorac Surg.*;77(6):2138-43. Jun 2004.
133. Mujika JI, Uranga J, Matxain JM. Computational study on the attack of .OH radicals on aromatic amino acids. *Chemistry.* 2013;19:6862–6873.
134. Simic MG, Gajewski E, Dizdaroglu M. Kinetics and mechanisms of hydroxyl radical-induced crosslinks between phenylalanine peptides. *Radiat Phys Chem.* 1985;24:465–473
135. Solar S. Reaction of OH with phenylalanine in neutral aqueous solution. *Radiat Phys Chem.* 1985;26:103–108
136. Blount BC, Duncan MW. Trace quantification of the oxidative damage products, meta and ortho-tyrosine, in biological samples by gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry. *Anal Biochem.* 1997;244:270–276.
137. Bertin C, Weston LA, Huang T, G Jander, T Owens, J Meinwald, and FC Schroeder, “Grass roots chemistry: meta-tyrosine, an herbicidal nonprotein amino acid.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 43, pp. 16964–9, Oct. 2007.
138. Gurer-Orhan H, Ercal N, Mare S, Pennathur S, Orhan H, Heinecke JW .Misincorporation of free m-tyrosine into cellular proteins: a potential cytotoxic mechanism for oxidized amino acids. *Biochem J.* 15;395(2):277-84. Apr 2006.
139. Klipcan L, Moor N, Kessler N, Safro MG. Eukaryotic cytosolic and mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetases catalyze the charging of tRNA with the meta-tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(27):11045-8. Jul 7 2009.
140. Popp O, Larraillet V, Kettenberger H, Gorr IH, Hilger M, Lipsmeier F, Zeck A, Beaucamp N. Molecular polygamy: The promiscuity of l-phenylalanyl-tRNA-synthetase triggers misincorporation of meta- and ortho-tyrosine in monoclonal antibodies expressed by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 2015;112:1187–1199

141. Ruggiero RA, Bruzzo J, Chiarella P, Bustuoabad OD, Meiss RP, Pasqualini CD. Concomitant tumor resistance: the role of tyrosine isomers in the mechanisms of metastases control. *Cancer Res* 72: 1043-1050. 2012.
142. Kun S, Mikolás E, Molnár GA, Sélley E, Laczy B, Csiky B, Kovács T, Wittmann I. Association of plasma ortho-tyrosine/para-tyrosine ratio with responsiveness of erythropoiesis-stimulating agent in dialyzed patients. *Redox Rep.* 19(5):190-8. Sep 2014.
143. Kun S, Molnár GA, Sélley E, Szélig L, Bogár L, Csontos C, Miseta A, Wittmann I. Insulin therapy of nondiabetic septic patients is predicted by para-tyrosine/phenylalanine ratio and by hydroxyl radical-derived products of phenylalanine. *Oxid. Med. Cell. Longev.* Article ID 839748. 2015.
144. Tatsumi F, Kaneto H, Hashiramoto M, Tawaramoto K, Obata A, Kimura T, Shimoda M, Hamamoto S, Kanda-Kimura Y, Kamei S, Mune T, Matsuda M, Kaku K. Anti-hypertensive azelnidipine preserves insulin signaling and glucose uptake against oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. *Endocr J*;62(8):741-7. 2015.
145. Shibata M, Hakuno F, Yamanaka D, Okajima H, Fukushima T, Hasegawa T, Ogata T, Toyoshima Y, Chida K, Kimura K, Sakoda H, Takenaka A, Asano T, Takahashi S Paraquat-induced oxidative stress represses phosphatidylinositol 3-kinase activities leading to impaired glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2;285(27):20915-25. Jul 2010.
146. Mitsunashi K, Senmaru T, Fukuda T, Yamazaki M, Shinomiya K, Ueno M, Kinoshita S, Kitawaki J, Katsuyama M, Tsujikawa M, Obayashi H, Nakamura N, Fukui M. Testosterone stimulates glucose uptake and GLUT4 translocation through LKB1/AMPK signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrine.*;51(1):174-84. Jan 2016.
147. Marvin LF, Delatour T, Tavazzi I, Fay LB, Cupp C, Guy PA. Quantification of o,o'-dityrosine, o-nitrotyrosine, and o-tyrosine in cat urine samples by LC/ electrospray ionization-MS/MS using isotope dilution. *Anal Chem*;75(2):261-7. Jan 15 2003.
148. Torres-Cuevas I, Kuligowski J, Cárcel M, Cháfer-Pericás C, Asensi M, Solberg R, Cubells E, Nuñez A, Saugstad OD, Vento M, Escobar J. Protein-bound tyrosine oxidation, nitration and chlorination by-products assessed by ultraperformance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 24;913:104-10. Mar 2016.
149. Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, Aljada A, Browne R, Hamouda W, Prabhala A, Afzal A, Garg. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 86, no. 1, pp. 355–62, Jan. 2001.
150. Krasuska U, Andrzejczak O, Staszek P, Borucki W, Gniazdowska A. meta-Tyrosine induces modification of reactive nitrogen species level, protein

- nitration and nitrosogluthathione reductase in tomato roots. *Nitric Oxide.*;68:56-67. Aug 1. 2017
151. Rodgers KJ, Wang H, Fu S, Dean RT. Biosynthetic incorporation of oxidized amino acids into proteins and their cellular proteolysis. *Free Radic Biol Med.* 15;32(8):766-75. Apr 2002.
 152. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science.*;271(5249):665-8. Feb 2 1996.
 153. Vinayagamoorthi R, Bobby Z, Sridhar MG. Antioxidants preserve redox balance and inhibit c-Jun-N-terminal kinase pathway while improving insulin signaling in fat-fed rats: evidence for the role of oxidative stress on IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance. *J Endocrinol.* 197(2):287-96. May 2008.
 154. Diamond-Stanic MK, Marchionne EM, Teachey MK, Durazo DE, Kim JS, Henriksen EJ. Critical role of the transient activation of p38 MAPK in the etiology of skeletal muscle insulin resistance induced by low-level in vitro oxidant stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 405(3):439-44. Feb 18 2011.
 155. Kubota N, Kubota T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Mineyama T, Ogata H, Tokuyama K, Ohsugi M, Sasako T, Moroi M, Sugi K, Kakuta S, Iwakura Y, Noda T, Ohnishi S, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Kadowaki T. Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell Metab.*;8(1):49-64. Jul 2008.
 156. Fritsche L, Weigert C, Häring HU, Lehmann R. How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver--implications for health and disease. *Review Curr Med Chem.*;15(13):1316-29. 2008.
 157. Hanke S, Mann M.. The phosphotyrosine interactome of the insulin receptor family and its substrates IRS-1 and IRS-2. *Mol Cell Proteomics.* 8(3):519-34. Mar 2009.
 158. Wu M, Yang X, Chan C A Dynamic Analysis of IRS-PKR Signaling in Liver Cells: A Discrete Modeling Approach. *PLoS ONE* 4(12): e8040. 2009.
 159. Matveyenko AV, Liuwantara D, Gurlo T, Kirakossian D, Dalla Man C, Cobelli C, White MF, Copps KD, Volpi E, Fujita S, Butler PC. Pulsatile portal vein insulin delivery enhances hepatic insulin action and signaling. *Diabetes.* 61(9):2269-79. Sep 2012.
 160. Wittmann I, Molnar GA, Mohás-Cseh J, Szijártó IA. Treatment and prevention of diseases related to oxidative stress, *Lajstromszám: US 20140128472 A1, Közzététel éve: 2014*



Article

Incorporation of Oxidized Phenylalanine Derivatives into Insulin Signaling Relevant Proteins May Link Oxidative Stress to Signaling Conditions Underlying Chronic Insulin Resistance

Judit Mohás-Cseh ¹, Gergő Attila Molnár ¹ , Marianna Pap ^{2,3}, Boglárka Laczy ¹, Tibor Vas ¹, Melinda Kertész ¹, Krisztina Németh ⁴ , Csaba Hetényi ⁵ , Orsolya Csikós ⁶, Gábor K. Tóth ⁶, Attila Reményi ⁴ and István Wittmann ^{1,*}

¹ 2nd Department of Medicine and Nephrology-Diabetes Center, University of Pécs Medical School, 7624 Pécs, Hungary; mohas-cseh.judit@pte.hu (J.M.-C.); molnar.gergo@pte.hu (G.A.M.); laczy.boglarka@pte.hu (B.L.); vas.tibor2@pte.hu (T.V.); meli871106@gmail.com (M.K.)

² Department of Medical Biology and Central Electron Microscopic Laboratory, University of Pécs Medical School, 7643 Pécs, Hungary; pap.marianna@pte.hu

³ Signal Transduction Research Group, Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

⁴ Institute of Organic Chemistry, Research Centre for Natural Sciences, 1117 Budapest, Hungary; nemeth.krisztina@ttk.hu (K.N.); remenyi.attila@ttk.mta.hu (A.R.)

⁵ Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs Medical School, 7643 Pécs, Hungary; hetenyi.csaba@pte.hu

⁶ Department of Medical Chemistry, Albert Szent-Györgyi Medical School, University of Szeged, 6725 Szeged, Hungary; csikos.orsolya@icloud.com (O.C.); toth.gabor@med.u-szeged.hu (G.K.T.)

* Correspondence: wittmann.istvan@pte.hu; Tel.: +36-72-536-050; Fax: +36-72-536-051



Citation: Mohás-Cseh, J.; Molnár, G.A.; Pap, M.; Laczy, B.; Vas, T.; Kertész, M.; Németh, K.; Hetényi, C.; Csikós, O.; Tóth, G.K.; et al. Incorporation of Oxidized Phenylalanine Derivatives into Insulin Signaling Relevant Proteins May Link Oxidative Stress to Signaling Conditions Underlying Chronic Insulin Resistance. *Biomedicines* **2022**, *10*, 975. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10050975>

Academic Editor: Maria Grau

Received: 22 March 2022

Accepted: 20 April 2022

Published: 22 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: A link between oxidative stress and insulin resistance has been suggested. Hydroxyl free radicals are known to be able to convert phenylalanine (Phe) into the non-physiological tyrosine isoforms ortho- and meta-tyrosine (o-Tyr, m-Tyr). The aim of our study was to examine the role of o-Tyr and m-Tyr in the development of insulin resistance. We found that insulin-induced uptake of glucose was blunted in cultures of 3T3-L1 grown on media containing o- or m-Tyr. We show that these modified amino acids are incorporated into cellular proteins. We focused on insulin receptor substrate 1 (IRS-1), which plays a role in insulin signaling. The activating phosphorylation of IRS-1 was increased by insulin, the effect of which was abolished in cells grown in m-Tyr or o-Tyr media. We found that phosphorylation of m- or o-Tyr containing IRS-1 segments by insulin receptor (IR) kinase was greatly reduced, PTP-1B phosphatase was incapable of dephosphorylating phosphorylated m- or o-Tyr IRS-1 peptides, and the SH2 domains of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) bound the o-Tyr IRS-1 peptides with greatly reduced affinity. According to our data, m- or o-Tyr incorporation into IRS-1 modifies its protein–protein interactions with regulating enzymes and effectors, thus IRS-1 eventually loses its capacity to play its role in insulin signaling, leading to insulin resistance.

Keywords: insulin resistance; oxidative stress; hydroxyl free radical; ortho-tyrosine; meta-tyrosine; IRS-1; phosphorylation; dephosphorylation

1. Introduction

1.1. Pathogenesis of Insulin Resistance

The pathogenesis of type 2 diabetes is complex [1,2], but one of the hallmarks of the development of type 2 diabetes—at least in obese patients with type 2 diabetes—is peripheral chronic insulin resistance, with a reduced uptake of glucose into adipose tissue [3]. The triggering factor for insulin resistance is oxidative stress due to systemic subclinical inflammation and hormonal interactions which all induce oxidative stress by the activation of nicotinamide nucleotide (NAD(P)H) oxidase enzyme [4]. In obesity, overfeeding may lead to glycototoxicity and lipotoxicity. This is especially the case for the

liver, as non-alcoholic fatty liver disease is a frequent companion to obesity. The affected tissues may face serious damage, and with time, exhaustion of the mitochondria. The strong beta-oxidation and uncoupling of the production of adenosine triphosphate (ATP) and terminal oxidation may lead to a higher rate of the formation of reactive oxygen species (ROS), contributing to the development of insulin resistance [5].

1.2. Acute Insulin Resistance

Acute insulin resistance induced by tumor necrosis factor alpha (TNF α) or dexamethasone could be ameliorated by the antioxidants N-acetylcysteine, manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP), or by induction of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase or catalase [6]. These data suggest a strong connection between oxidative stress and the development of acute insulin resistance.

1.3. Chronic Insulin Resistance

In clinical settings, chronic antioxidant therapy of patients (e.g., in the case of diabetic neuropathy using alpha-lipoic acid) is able to improve chronic insulin resistance [7]. Moreover, using the so-called “breakthrough” therapy, a 2–4 week decrease in glucotoxicity is able to normalize glycemia by decreasing insulin resistance for months or years [8,9]. Because clinical insulin resistance can be reverted, it is not an alteration of the DNA, but rather some type of protein abnormality; this can be hypothesized given the background of this oxidative stress-induced clinical condition.

This theory is further augmented by the observation that a low advanced glycation end products (AGE) diet, which is associated with a state of increased oxidative stress and subclinical inflammation, ameliorated insulin resistance in obese people with the metabolic syndrome [10].

Oxidative stress may develop in type 2 diabetes mellitus because of the activation of the polyol pathway leading to a depletion in the glutathione pool, non-enzymatic glycation, and interaction of the resulting AGEs with their receptors (receptor for AGE, RAGE), which in turn may augment the same pro-oxidant NAD(P)H oxidase (NOX) via protein kinase C signaling and the hexosamine pathway. Moreover, superoxide overproduction in the mitochondria due to hyperglycemia may activate all of these pathways, resulting in a vicious cycle [11] (Figure 1).

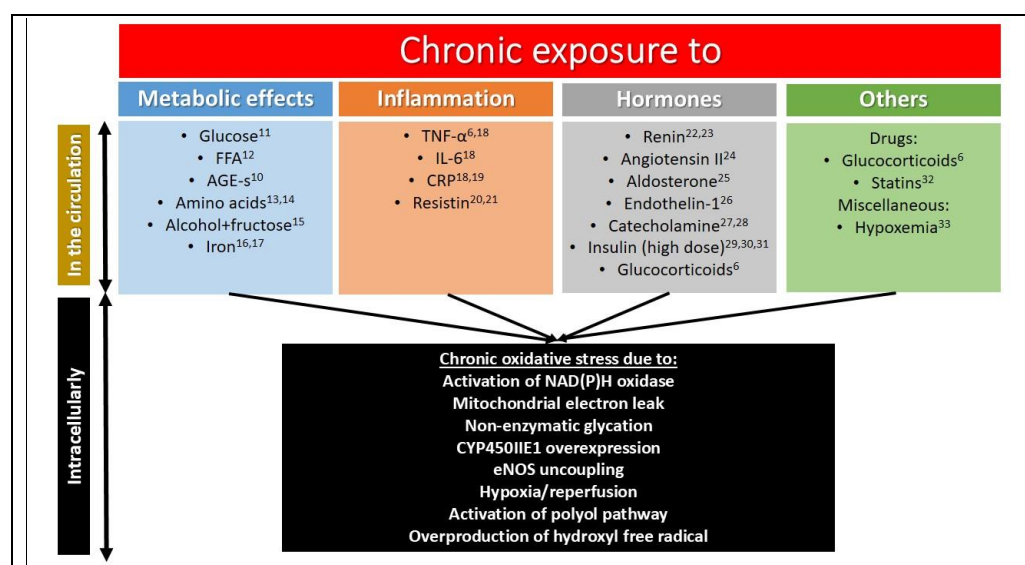


Figure 1. Chronic exposure leading to oxidative stress and insulin resistance [6,10–33]. Those factors are listed which cause oxidative stress and insulin resistance at the same time in a chronic setting. The arrows indicate a causal relationship between alterations in the circulation leading to intracellular abnormalities.

1.4. Tyrosine Isomers and Hydroxyl Free Radical

Reactive oxygen species (ROS) that arise from oxidative stress processes are highly reactive and may attack macromolecules, such as lipids, nucleic acids, proteins, and amino acids [34]. Stable products of ROS-derived macromolecular damage may be used as markers of oxidative stress.

Phenylalanine (Phe) is an essential amino acid that is further used for the production of para-tyrosine, dihydroxy-phenylalanine (DOPA), catecholamines, melanine, and thyroid hormones [35]. Beyond these important enzymatic reactions, Phe, due to the vulnerability of its aromatic ring, may also be a subject of non-enzymatic oxidation processes, i.e., the attack of ROS [36]. The isomers of the physiological para-tyrosine (p-Tyr), namely meta- and ortho-tyrosine (m-Tyr and o-Tyr), are formed this way [36] (Figure 2).

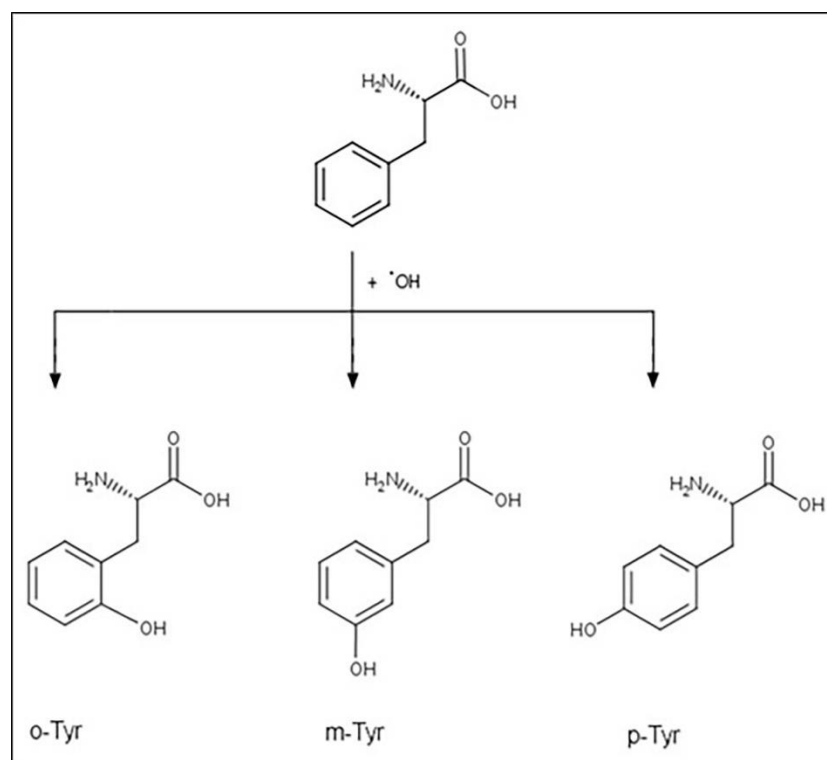


Figure 2. Hydroxyl free radical induced production of tyrosine isomers.

1.5. Non-Physiological Tyrosine Isomers as Markers

Elevated levels of m- and/or o-Tyr have been described in the vascular wall of cynomolgus monkeys [37] as well as in cataract lenses [38]. In previous studies by our group, the non-physiological Tyr isomers (m- and o-Tyr) have been shown to be oxidative stress markers in patients with type 2 diabetes with or without chronic kidney disease [39] in patients with end-stage renal disease or patients with severe sepsis. We have also shown that type 2 diabetic patients treated with resveratrol showed a decrease in urinary excretion of o-Tyr, and a concomitant improvement in insulin resistance [40]. These data suggest that m- and o-Tyr may be used as markers of oxidative stress.

1.6. Non-Physiological Tyrosine Isomers as “Makers”

Furthermore, m- and o-Tyr may have a role beyond being markers ROS attack. Namely, m-Tyr has been shown to act as a natural herbicide and inhibit the growth of plants [41]. Additionally, m-Tyr seems to be involved in the inhibition of concomitant tumor growth [42]. These data suggest that m-Tyr is more than just a marker, but it also plays a pathogenetic role under some circumstances. For example, we have described that patients on renal replacement therapy show a connection between plasma levels of o-Tyr and erythropoietin

(EPO) resistance. In a further set of experiments, m- and o-Tyr inhibited the EPO-dependent proliferation of erythroblasts, in a time- and dose-dependent manner [43].

With all of the above-mentioned data taken into account, we hypothesized that m- and o-Tyr—on the basis of their potential role in EPO-resistance—are able to induce chronic insulin resistance in fat cells, HEK cells, podocytes, and macrophages, and that intracellular signaling of insulin may be disrupted this way.

Thus, proof-of-concept experiments were designed to address this question. Our results suggest that oxidative stress-induced o- and m-Tyr could incorporate into cellular proteins, interfere with insulin signaling, inhibit glucose uptake, and thus induce chronic insulin resistance.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

Early passages of mouse embryo fibroblast (3T3-L1) (ATCC, Manassas, VA, US) were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Sigma Aldrich, Budapest, Hungary, CAT number: D6046; Invitrogen, Waltham, MA, USA, CAT number: 41966-029) supplemented with 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin (Gibco, Budapest, Hungary, CAT number: 15070-063) and 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, CAT number: 16170-078), supplemented with 398 nM p-, m-, or o-Tyr (equimolar to the original p-Tyr content of the medium) purchased from Sigma (CAT number: para-Tyr: T8566, m-Tyr: T3629, o-Tyr: 93851). Media contained 25 or 5 mmol/L glucose (experiment dependent) pyruvate and L-glutamine. Cells were grown at 37 °C and 5% CO₂. Adipocyte differentiation was achieved by DMEM supplemented with 10% FBS (Gibco, Csertex, Budapest, Hungary, CAT number: 10106-169) (FBS) and a 0.17 nmol/L insulin (Sigma Aldrich, Budapest, Hungary, CAT number: I 9278), 0.5 nmol/L isobutylmethylxanthine (Sigma Aldrich, Budapest, Hungary, CAT number: I 5879), and 250 nmol/L dexamethasone (Sigma Aldrich, Budapest, Hungary, CAT number: 861871) containing cocktail. From day 4 onward, cultures were maintained in DMEM containing 1.5 µg/mL insulin and 10% FBS with a medium change every other day until experimental treatments were started. After 90% of the cell population reached the adipocyte phenotype, prior to all treatments, cells were incubated overnight in serum-deprived medium. Experimental treatment was performed in serum-deprived medium containing 200 or 400 nmol/L insulin, for 5 min.

The conditionally immortalized human podocyte cell line (provided by Moin Saleem, University of Bristol, UK) was cultured in RPMI1640 medium (R8756, Sigma Aldrich, Budapest, Hungary) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (16170-078, Gibco, Budapest, Hungary), insulin-transferrin-selenium supplement (41400-045, Gibco), 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin (P4333, Sigma), and 112.5 nM (equimolar to the original p-Tyr content of the medium) para-, meta-, or ortho-Tyr. The cells were grown at 33 °C 5% CO₂, and when they reached 40–60% confluency they were transferred to 37 °C to differentiate. Following the thermoswitching, cells were kept on RPMI1640 medium containing 2% FBS, antibiotics, and different tyrosines. Before every treatment, cells were incubated in serum-deprived medium overnight.

HEK-293 immortalized cell line (ATCC, Manassas, VA, USA) of epithelial morphology and the J774A.1 mouse BALB/C monocyte-macrophage cell lines (91051511-1VL, Sigma Aldrich, Budapest, Hungary) were cultured in Petri dishes with a medium composed of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma Aldrich, Budapest, Hungary, CAT number: D6046, Invitrogen, CAT number: 41966-029), with a 10% heat-inactivated FBS supplementation (16170-078, Gibco), insulin-transferrin-selenium supplement (41400-045, Gibco, Budapest, Hungary), 100 U/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin (P4333, Sigma) and 398 nM para (5 and 25 mmol/L), meta-, or ortho-Tyr (T8566, T3629, 93851, Sigma). Before treatment, cells were incubated in serum-deprived medium overnight as well. After the treatment, cells were washed twice with saline (4 °C) and then exposed to 80 µL lysis buffer/plate, containing 1 mol/L Trisbase, pH 7.4, 1.15% Triton X, 0.2 mol/L EGTA, pH 7, 0.5 mol/L EDTA, pH 8, 5 mg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF),

0.1 mol/L dithiothreitol (DTT), 0.1 mol/L Na_3VO_4 , 5 mg/mL aprotinin, 5 mg/mL leupeptin, and phosphatase inhibitor cocktails 1 and 2 (Sigma Aldrich, Budapest, Hungary, CAT number: P5726 and P2850). Cells were scraped off mechanically and then were frozen at -70°C .

2.2. Isotope Glucose Uptake

Initially, cells were kept in glucose-free DMEM (Gibco, Csertex, Budapest, Hungary) for 30 min and then were treated with 2, 20, 200, or 400 nmol/L insulin for 100 min. Concurrently, 1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ deoxy-D-glucose 2-[1 2- $^3\text{H}(\text{N})$] (3.7×10^4 Bq/mL) (Izotóp Intézet, Budapest, Hungary) was added to the plates for 100 min. After scraping the cells into the medium, they were centrifuged for 5 min at 1000 rpm. We dissolved the sediment in 70 μL of lysis buffer, then glucose uptake was determined by scintillation counting by measuring 30 μL of the sample, using a Beckman LS 5000 TD counter, in counts per minute (CPM), for five minutes each, with average activity was used as the outcome. Following freezing overnight at -70°C , protein concentration was measured with a Hitachi spectrophotometer. Results were normalized for protein content [44].

2.3. HPLC Analysis

The type of tyrosine aimed to be measured determined the sample preparation. Methods were based on earlier publications with minor modifications [39].

To measure the total intracellular non-protein-bound tyrosine concentration, prior to the freezing of samples overnight at -70°C to achieve cell lysis, 200 μL distilled water was added to each. After melting up, samples were centrifuged for 15 min at 15,000 rpm. A total of 200 μL of the supernatant was mixed with 200 μL of 60% trichloroacetic acid. After 30 min incubation on ice, samples were centrifuged again at 15,000 rpm for 15 min. Then, the supernatant was filtered and was diluted 5-fold and then 160 μL distilled water was added to 40 μL of filtrate, followed by the injection of the mixture onto the HPLC column.

The total protein-bound cellular tyrosine content was measured by adding 200 μL of distilled water to the samples, followed by freezing overnight at -70°C to achieve cell lysis. After melting and centrifugation for 10 min at 4000 rpm, 200 μL supernatant was mixed with 200 μL 60% trichloroacetic followed by incubation on ice for 30 min to precipitate proteins. After the second centrifugation for 10 min at 4000 rpm, the sediment was resuspended in 1% trichloroacetic acid and 4 μL of 400 mmol/L desferrioxamine. A total of 40 μL of 500 mmol/L butylated hydroxytoluene was added to the samples to avoid possible free radical formation during hydrolysis. Then, 200 μL of 6 N hydrochloric acid was added in order to hydrolyze the proteins at 120°C overnight. The hydrolysate was then filtered through a 0.2 μm filter (Millipore Co., Billerica, MA, USA) and 20 μL of the filtrate was injected onto the HPLC column of a Shimadzu Class LC-10 ADVP HPLC system (Shimadzu USA Manufacturing Inc., Canby, OR, USA) using a Rheodyne manual injector.

The amounts of p-, o-, m-Tyr and Phe in the samples were determined by measuring their autofluorescence. Thus, no derivatization or staining was needed. Samples were measured on a Shimadzu Class 10 HPLC system equipped with an RF-10 AXL fluorescent detector (Shimadzu USA Manufacturing Inc., Canby, OR, USA). The mobile phase consisted of 1% sodium acetate and 1% acetic acid dissolved in water. The separation took place on a LiChroCHART 250-4 column (Merck KGaA, Darmstadt 64271, Germany) in an isocratic run. Wavelengths of 275 nm for excitation and 305 nm for emission were used to assess p-, o- and m-Tyr, while Phe was detected at 258 nm excitation and 288 nm emission wavelengths. Determination of the area under the curve (AUC) plus external standard calibration was used to calculate the precise concentrations of the amino acids.

2.4. Western Blot Analysis

The samples of lysates were vortexed and centrifuged (10 min, 13,000 rpm, at 4°C). Protein content of the samples was determined by the Lowry method using bovine serum albumin as a standard. Samples were solubilized in 100 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 4.0%

sodium dodecyl sulphate (SDS), 20% glycerol, 200 mmol/L DTT, and 0.2% bromophenol blue containing buffer. Samples (80 to 120 µg protein) were electrophoretically resolved on 7.5% polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes (Amersham-Biotech, AP Hungary, Budapest, Hungary). Membranes were stained with Ponceau dye to ensure successful transfer. The non-specific antibody binding sites were blocked in 5% BSA in TBS-T solution at room temperature for one hour. Membranes were incubated in the primary antibodies anti-phospho-(Ser473)-Akt (Cell Signaling Technology, #7074, Beverly, CA, USA), to detect p-Akt in a final dilution of 1:2000, or anti-phospho-(Tyr612)-IRS-1 (1:2000 I2658 Sigma, Budapest Hungary) and they were used overnight at 4 °C. Membranes were washed three times for 5 min with TBS-T and incubated with HRP-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (#7074, Cell Signaling) diluted in the blocking solution (1:4000) for one hour at room temperature. Membranes were washed three times for 5 min with TBS-T.

To re-probe Western blots with alternative primary antibodies, the stripping of membranes took place as follows: they were washed in 0.1% TBS-T for 10 min, the membranes were merged in stripping buffer containing 0.1% SDS, 1.5% glycine, and 1% Tween-20 at pH 2.2, twice for 10 min, then were washed in PBS twice for 5 min, and then in TBS-T 0.1% twice for 5 min. The membranes were blocked in 5% BSA in TBS-T solution at room temperature for one hour and then incubated with the following antibodies: total PKB/Akt in 1:1000 final dilution (#9272, Cell Signaling Technology, Beverly, MA USA) and total IRS-1 in 1:1000 final dilution (I7153 Sigma) overnight at 4 °C. The membranes were washed three times for 5 min with TBS-T and incubated with HRP-conjugated secondary antibody (#7074 Cell Signaling Technology, Beverly, MA USA) diluted in the blocking solution (1:2000) for one hour at room temperature. Membranes were washed three times for 5 min with TBS-T. Afterwards, membranes were incubated in enhanced chemiluminescence HRP substrate (ECL; Pierce Biotech, Bio-Rad, Budapest, Hungary) according to the manufacturer's instructions. Computerized densitometry (integrated optical density) of the specific bands was analyzed using Scion Image for Windows software. Protein signals were corrected for total Akt or total IRS-1 protein levels and adjusted to controls.

2.5. Protein Expression

The cDNA segment encoding the human PTP1B catalytic domain (1–299 aa) was PCR amplified from a HEK293T cDNA pool and inserted into the pBH4 vector with BamHI and NotI restriction sites. This construct is only missing the C-terminal flexible region and the membrane binding segment of PTP1B. The protein was expressed with an N-terminal hexa-histidine tag. Recombinant active PTP1B was expressed in the Escherichia coli BL21 (DE3) bacterial strain. Briefly, cells were grown in an ampicillin-containing LB medium at 37 °C to OD = 0.6 and then cooled down to 18 °C and induced by the addition of 0.05 mM isopropyl-beta-D-thiogalactoside (IPTG). After an overnight expression at 18 °C, the pellet was harvested and washed with phosphate buffered saline (PBS). Following freezing at –80 °C, cells were lysed in an appropriate buffer (300 mM NaCl, 50 mM phosphate, 10 mM imidazole, 2 mM beta-mercapto-ethanol, 0.1% IGEPAL with pH = 8.0, and 0.5 mM benzamidine with 0.5 mM PMSF protease inhibitors added) with the help of sonification. The lysate was centrifuged at 20,000 rpm for 30 min and the supernatant (~30 mL) was mixed with 1 mL Ni-NTA resin slurry (50%). After 45 min incubation at 4 °C, the mixture was transferred to gravity columns and washed with 10–10 mL of imidazole (40 mM imidazole, 300 mM NaCl, 50 mM phosphate, pH = 8.0 with 2 mM beta-mercapto-ethanol) and high salt (1000 mM NaCl, 20 mM imidazole, 20 mM TRIS, pH = 8.0 with 2 mM beta-mercapto-ethanol) containing wash buffers, each. PTP1B was eluted by applying 5 mL elution buffer (400 mM imidazole, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM TRIS, pH = 8.0, with 0.1% IGEPAL). The eluted protein was supplemented with tricarboxy-ethyl-phosphine (TCEP) reducing agent at 2 mM concentration.

The Ni-NTA purified PTP1B protein was further purified by anion exchange chromatography. After an overnight dialysis against 1 L buffer with low salt (5 mM NaCl, 10%

glycerol, 20 mM TRIS, pH = 8.0 with 1 mM dithiothreitol reducing agent), it was loaded on a resource Q anion exchange column and subjected to a gradient from 5 mM to 1 M NaCl. The protein practically eluted in a single peak, which was then pooled, supplemented with a reducing agent (TCEP), and frozen on liquid nitrogen. Final protein samples checked by SDS-PAGE were found to have a purity over 95%.

The N- and C-terminal SH2 domains (regions 321–433 and 614–724, respectively) of the PI3K regulatory subunit were subcloned into a bacterial expression vector by PCR and then similarly expressed and purified as described above.

Enzymatically active IR kinase (989–1382, fused to GST and produced in SF9 cells) was ordered from SinoBiological (catalog number 11081-H20B1). The stock solution was aliquoted and frozen separately to preserve activity. Prior to comparative measurements, the activity of recombinant IR kinase was tested on internal control peptides and found to be suitable for kinase assays.

2.6. Peptide Synthesis

Peptides conferring to one of the YxxM motif regions (626-GRKGS GDYMPMSPKV-639) of human IRS-1 were chemically synthesized. The Y abbreviation denotes normal, ortho, and meta tyrosine. The solid-phase peptide syntheses were performed using a Liberty Microwave Peptide Synthesiser (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) applying the Fmoc/tBu strategy. The resin used was PL-Rink-Amide MBHA. The Fmoc group was removed by 4.5 equiv. piperazine/HOBt·H₂O in DMF. The coupling steps were performed with 4 equiv. of Fmoc amino acids in DMF, 4.5 equiv. of HOBt/HBTU in DMF and 10 equiv. DIPEA in NMP, using a microwave power of 25 W for 2 × 300 s. All couplings were performed at standard double coupling conditions at a maximum temperature of 75 °C, except for the following amino acids: 2-Fmoc-amino-3-(3-hydroxyphenyl)-propanoic acid, 2-Fmoc-amino-3-(2-hydroxyphenyl)-propanoic acid, and 2-Fmoc-amino-3-(4-hydroxyphenyl)-propanoic acid (Fmoc-tyrosine), which were double coupled using a 25 min coupling followed by a 5 min period at 25 W. The phenolic hydroxyls were unprotected. Cleavage of the peptides from the solid support was carried out using a TFA containing cocktail with TFA 90%, water 5%, TIS 2.5%, and DTT 2.5%. Conditions: 10 mL cocktail, 3.5 h reaction time, RT. The resulted crude peptides were filtered, and the filtrates were lyophilized. The peptides were analyzed on an Agilent 1200/Waters SQD RP-HPLC/MS instrument, applying Phenomenex Proteo 4 μm C18 90 Å column (4.6 × 250 mm) at 1 mL/min flow using a linear gradient of 5% to 85% B over 25 min. The solvent system used was A (0.1% TFA in H₂O) and B (0.1% TFA in MeCN). The crude peptides were purified on a semipreparative RP-HPLC Shimadzu instrument applying a Phenomenex Luna 10 μm C18 100 Å 10 × 250 mm column.

For the synthesis of the phosphorylated derivatives, first, the C-terminal octapeptides were prepared in a manner similar to the previous ones. After the incorporation of the tyrosine moiety, the phosphorylation was made on-line, so the elongation of the peptide chains was stopped. The phosphorylation of the hydroxyl unprotected tyrosines were carried out on solid-phase using 10 equiv. di-tert-butylN,N-diethylphosphoramidite, 20 equiv. 1H-tetrazole, THF, followed by oxidation using 14% tert-butyl hydroperoxide/water. After the formation of the appropriately protected phosphotyrosine-containing peptides, the elongation of the peptide chains was continued and the remaining 7 amino acids were incorporated as described previously. Cleavage from the solid support and the processing of the crude peptide was performed using the above-mentioned methodology.

The two methionines in the sequence during the oxidation of the phosphite to phosphate were converted to methionine sulfoxide. Therefore, an additional step was necessary to transform the sulfoxides back to thioether. The reduction of the sulfoxides was performed in the solution phase using 20 equivalents of NH₄I in TFA/H₂O (1:1 v/v%) at 0 °C. It was particularly fast, with 100% conversion to the desired peptides after 30 min. The resulting phosphopeptides were purified as mentioned above. The HPLC characterization is in Table 1.

Table 1. HPLC characterization of the peptides.

Peptide	t _R (min)
GRKGSDF(4-hydroxy)MPMSPKV	t _R = 9.96
GRKGSDF(3-hydroxy)MPMSPKV	t _R = 9.19
GRKGSDF(2-hydroxy)MPMSPKV	t _R = 12.08
GRKGSDF(4-PO ₄ H ₂)MPMSPKV	t _R = 9.06
GRKGSDF(3-PO ₄ H ₂)MPMSPKV	t _R = 8.24
GRKGSDF(2-PO ₄ H ₂)MPMSPKV	t _R = 8.59

Gradient 20–35 % (B) in 15 min, flow 1.0 mL/min.

Mass spectrometry: calculated Mw 1608.89, measured Mw 1608.6 (nonphosphorylated peptides); calculated Mw 1688.89, measured Mw 1689.0 (phosphorylated peptides).

2.7. Phosphorylation and Dephosphorylation Assays—Capillary Electrophoresis

The kinase assay mixture contained 200 µM peptide (GRKGSDFYMPMSPKV) and 875 nM IR kinase in kinase buffer (20 mM potassium phosphate (monobasic), 15 mM sodium phosphate (dibasic), 103 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5% glycerol, 0.05% Igepal; pH 7.5). The reaction was initialized by addition of 1 mM ATP. The phosphatase reaction mixture contained 80 µM peptide (GRKGSDF(pY)MPMSPKV) in buffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 2 mM DTT; pH 7.4). The reaction was initialized by addition of 25 nM PTP1B enzyme. Equal aliquots of the kinase or the phosphatase reaction mixture were subjected to capillary electrophoresis analysis at the indicated time points after the start the reaction.

Background electrolyte (BGE) components phosphoric acid and triethylamine were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and from Merck GmbH (Darmstadt, Germany), respectively. Capillary electrophoresis was performed with an Agilent Capillary Electrophoresis 3DCE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) applying DB-WAX coated capillary having a 33.5 cm total and 25 cm effective length with 50 µm I.D. (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). On-line absorption at 200 nm was monitored by DAD UV-Vis detector. The capillary was thermostated at 25 °C. Before measurements, the capillary was rinsed subsequently with distilled water for 15 min and between measurements with BGE (100 mM trimethylamine-phosphate buffer; pH 2.5) for 3 min. Samples were injected by 5 × 10³ Pa pressure for 6 s. Runs were performed in the positive-polarity mode with 20 kV.

2.8. Protein-Peptide Binding Assays

For in vitro fluorescence polarization (FP)-based affinity measurements, a peptide containing the phosphorylated tyrosine residue 632 of human IRS1 was labelled by lys-carboxyfluorescein at its C-terminal end (GRKGSDF(pY)MPMSPKS(K-FITC)). Synthesis of the labelled peptide was done by GenScript Inc. For competitive FP measurements, unlabeled peptides with either natural (para-phospho-Tyr) or unnatural (ortho-phospho-Tyr and meta-phospho-Tyr) phosphorylated amino acids (core sequence GRKGSDF(pY)MPMSPKV in all three cases) were used. Direct titration with the labelled peptide was done by generating a dilution series of the protein (N-terminal and C-terminal SH2 domains of PI3K regulatory subunit 1), with a constant (100 nM) peptide concentration in a standard buffer (100 mM NaCl, 20 mM TRIS pH = 8.0, 0.05% Brij-35 detergent). Competitive titrations were done by keeping the concentration of the protein-labelled peptide mixture constant (150 nM and 1500 nM C-terminal and N-terminal domain, respectively, with 100 nM labelled peptide) and varying the concentration of the unlabeled competitor peptide instead. Measurements were done in a Cytation C3 (BioTek Instruments) plate reader in black 384-well plates, using three parallels for all points. The resulting curves were fitted with OriginPro 7 (Origin Labs Inc., Wellesley, MA, USA).

2.9. Immunofluorescence

In a 6-well plate, 104 cells were cultured on glass coverslips washed with alcohol and dried under UV light. The podocyte cells were grown in RPMI1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS at 33 °C, 5% CO₂. When they reached 60% confluence, the medium was changed to RPMI1640 medium containing 2% FBS and 112.05 nM of the different tyrosine isoforms, then the plates were transferred to 37 °C, 5% CO₂ to allow the cells to differentiate. The different tyrosine isoforms were added to the maintenance medium. The cells were serum deprived overnight, then incubated with 400 nmol/l insulin for 10 min. After removal of the medium, the coverslips were washed twice with PBS. The cells were fixed at room temperature in 2% paraformaldehyde and 4% sucrose for 8 min, then permeabilized using 0.3% Trion X-100 in 1xPBS for 20 min and blocked in 2.5% BSA for 45 min [45]. The primary antibody was diluted in 1xPBS, and the cells were incubated in it for 60 min in humid conditions. The antibodies we used were mouse anti-WT1 antibody (H-1) (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), chicken anti-vimentin antibody (1:100, Abcam), rabbit anti-glucose transporter GLUT4 antibody (1:100, Abcam, Cambridge, UK), mouse Insulin Receptor Substrate-1 antibody (1:100, Invitrogen, Waltham, MA, USA), and rabbit anti-phospho-Insulin Receptor Substrate-1 (pTyr612) antibody (1:10, Sigma). Coverslips were washed in PBS three times for 5 min in PBS and incubated in the fluorophore-conjugated secondary antibodies anti-goat, anti-chicken, secondary antibody Alexa fluor 647, anti-rabbit Alexa fluor 350, and anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:10, Invitrogen) for 60 min. Samples were then washed in PBS three times for 5 min and mounted in Vectashield (Vector Laboratories). Images were taken with a Nikon Eclipse Ti2 microscope.

2.10. Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using the SPSS Statistics 27 (IBM Company, Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism vs 8 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) packages. Experiments were carried out in replications up to $n = 5$ – 10 for certain experiments. The data obtained were checked for normality of distribution using the Kolmogorov–Smirnov test. Data with normal distribution were analyzed using parametric tests, while non-parametric tests were used for non-normally distributed data. For multiple comparisons, analysis of variance (ANOVA) with post-hoc analysis was performed for normally distributed data. For non-normally distributed data, the Kruskal–Wallis test, and, upon significance, pairwise comparison with the Mann–Whitney U tests were carried out. Pairwise comparisons of normally distributed data were carried out using independent samples *t*-tests. If the control was set to 100% and different experimental setting were compared to that (e.g., Figures 3–5), a one-sample *t*-test was used.

3. Results

3.1. Ortho- and Meta-Tyrosine Inhibit Insulin-Induced Glucose Uptake

We first tested the glucose uptake of differentiated 3T3-L1 cells in the absence and presence of o-Tyr and m-Tyr in culture media containing normal or high concentrations of glucose. In cells grown on p-Tyr containing cell culture media, increasing concentrations of insulin led to a marked increase in glucose uptake in 5 mmol/L glucose, but not in 25 mmol/L glucose. Similarly to the high glucose environment, in cells grown in media supplemented with o- and m-Tyr increasing concentrations of insulin failed to induce the glucose uptake under normal (5 mmol/L) glucose concentrations (Figure 3).

The inhibitory effect of o- and m-Tyr was also tested for zero time-dependence (Figure 4). While in cells grown on p-Tyr insulin led to an approximately two-fold increase in glucose uptake, cells grown in media supplemented with o- and m-Tyr insulin showed no significant effect, and even non-stimulated (basal) glucose uptake was lower than that of the p-Tyr control. Importantly, cells grown on o- and m-Tyr displayed similar deficiency in response to insulin under low and high glucose conditions alike, after one day or up to as long as twelve days (Figure 4).

The inhibitory effect of o-, and m-Tyr on the glucose uptake was ameliorated by increasing concentrations of p-Tyr (Figure 5).

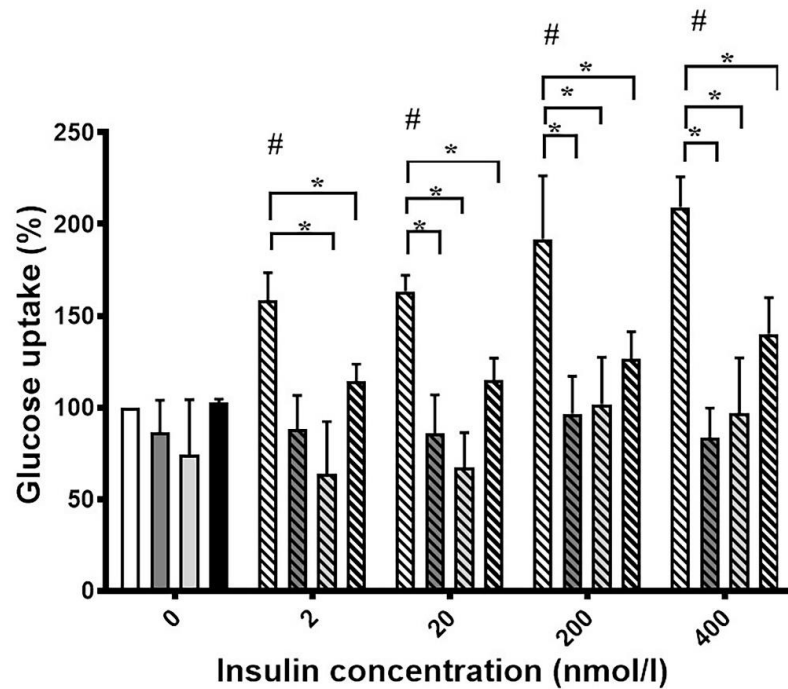


Figure 3. Insulin-dependent uptake of deoxy-D-glucose 2-[1 2-3H(N)] into differentiated 3T3-L1 adipocytes was assessed in media containing (i) para-tyrosine with 5 mmol/L glucose content (white column and first striated column in each block), (ii) meta-tyrosine with 5 mmol/L glucose (dark grey column and second striated column in each block), (iii) ortho-tyrosine with 5 mmol/L glucose (light grey column and third striated column in each block), and (iv) para-tyrosine with 25 mmol/L glucose content (black column and fourth striated column in each block). Cells were treated with 2, 20, 200, and 400 nmol/L insulin as shown (#, $p < 0.05$ vs. control para-tyrosine using one-sample *t*-test, *, $p < 0.05$ vs. 5 mmol/L glucose para-tyrosine using independent samples *t*-tests). Glucose uptake of untreated cells grown on para-tyrosine and 5 mmol/L glucose containing medium was set to 100%. Results are shown as a mean \pm SEM for $n = 5$ –10 individual measurements.

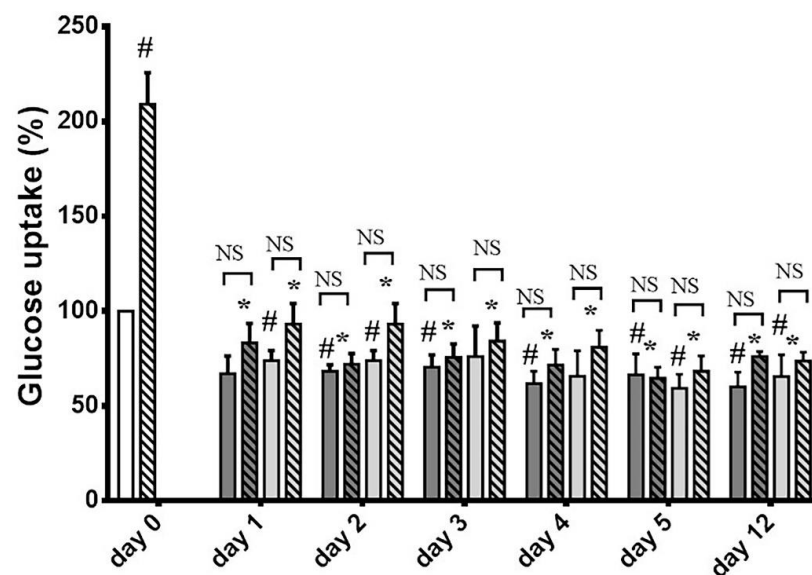


Figure 4. Insulin-dependent uptake of deoxy-D-glucose 2-[1 2-3H(N)] into 3T3-L1 adipocytes after cells were grown in media containing para-tyrosine meta-tyrosine or ortho-tyrosine for 1, 2, 3, 4, 5,

or 12 days, with or without insulin treatment (200 nmol/L). The glucose uptake of untreated adipocytes grown on 5 mmol/L glucose medium containing para-tyrosine was set to 100%. Results are shown as a mean \pm SEM for $n = 5$ –8 individual measurements. #, $p < 0.05$ vs. para-tyrosine control (one-sample t -test); *, $p < 0.05$ vs. para-tyrosine + insulin (independent samples t -test), NS: non-significant. Bars indicate para-tyrosine (white column), meta-tyrosine (dark grey columns), ortho-tyrosine (light grey columns), control (simple columns), and insulin-treated (striated columns).

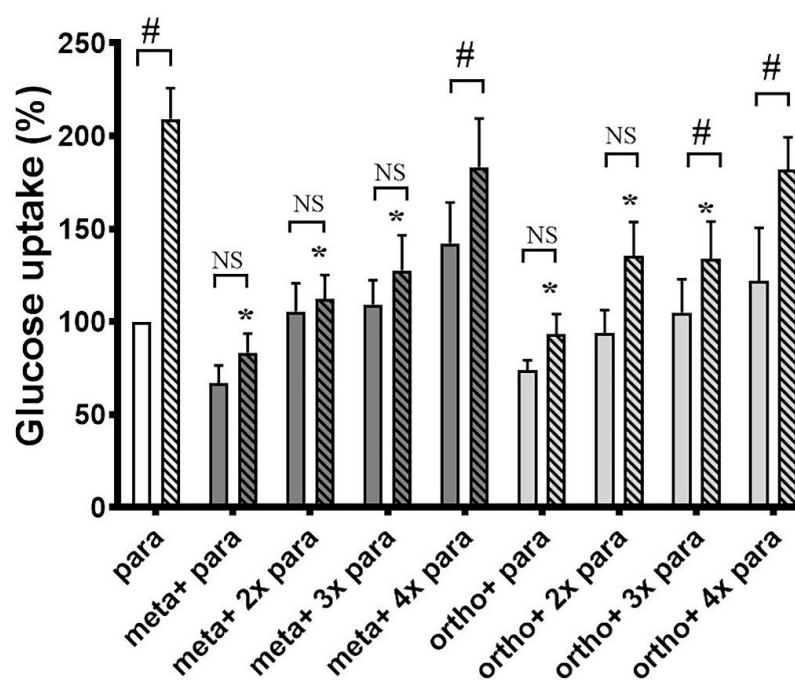


Figure 5. para-Tyr reverses the inhibitory effects of o- and m-Tyr. Examination of deoxy-D-glucose 2-[1 2-3H(N)] uptake of 3T3-L1 adipocytes depending on the ortho- and meta-tyrosine content of the medium in the absence of insulin (non-striated bars) or in the presence of 400 nmol/L insulin (corresponding striated bars). The basal glucose uptake of the cells, grown on the original 0.39 mmol/L para-tyrosine containing medium was considered to be 100%. Results are shown as mean \pm SEM after $n = 10$ individual measurements. *, $p < 0.05$ vs. para-tyrosine + insulin (independent samples t -test), #, $p < 0.05$ vs. identical control (one sample t -test or independent samples t -test accordingly), NS: non-significant.

3.1.1. Both o- and m-Tyr Can Be Taken Up by Fat Cells within Several Minutes and Are Incorporated into Cellular Proteins

Abnormal amino acids may alter insulin signaling by incorporation into proteins, which requires the cellular uptake of these amino acids. Therefore, we tested if the abnormal amino acids could be taken up by the cells. For that reason, non-protein-bound intracellular p-Tyr content, as well as the o-Tyr/p-Tyr and m-Tyr/p-Tyr ratios were measured. We found a continuous uptake of amino acids which was independent of glucose concentration (5 or 25 mmol/L) and the presence of insulin in the medium (Figure 6).

In a long-term experiment, we tested whether o- and m-Tyr are incorporated into cellular proteins. In cells grown on o-Tyr or m-Tyr, the p-Tyr/Phe ratio showed either a decrease or remained unchanged (Figure 7A,D,G,J), while protein-bound o-Tyr/p-Tyr and m-Tyr/p-Tyr increased (Figure 7B,C,E,F,H,I,K,L).

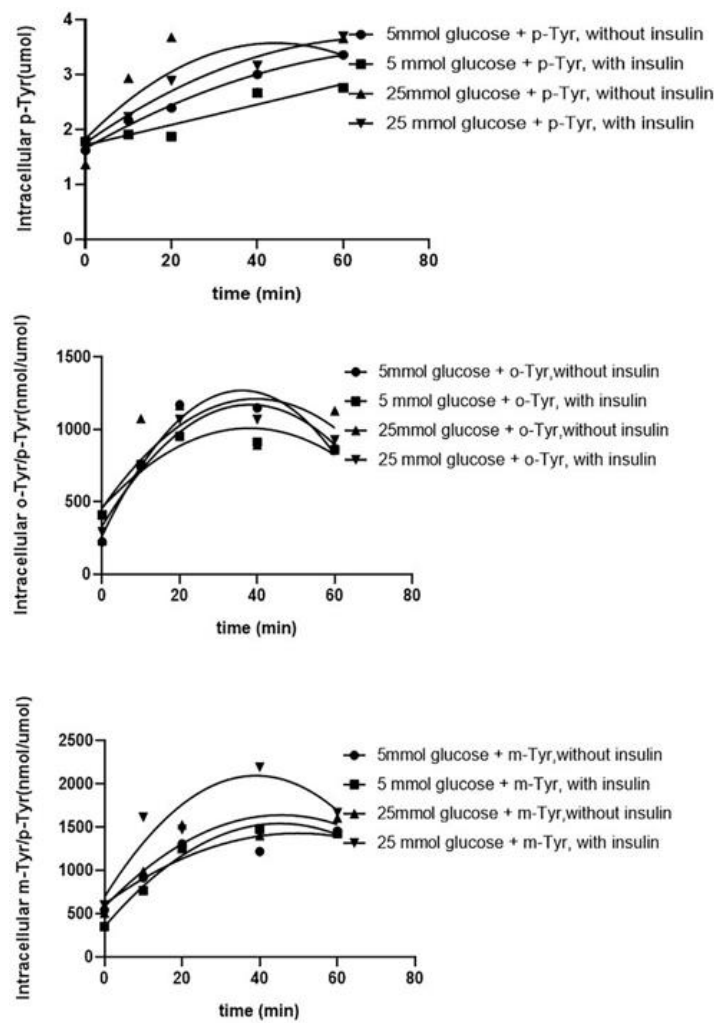


Figure 6. HPLC measurement of non-protein-bound, cytosolic, intracellular para- (upper panel), meta- (middle panel), and ortho-tyrosine (lower panel) content of 3T3-L1 adipocytes after time-dependent incubation with different tyrosines, without insulin, and after grown either in 5 mmol/L glucose containing medium or in 25 mmol/L glucose containing medium, or with insulin treatment (400 nmol/L), either in 5 mmol/L glucose containing medium or in 25 mmol/L glucose containing medium. Note that p-Tyr is shown as an absolute concentration, while o- and m-Tyr are depicted as their ratios to p-Tyr. There was no significant difference between the measurements (ANOVA).

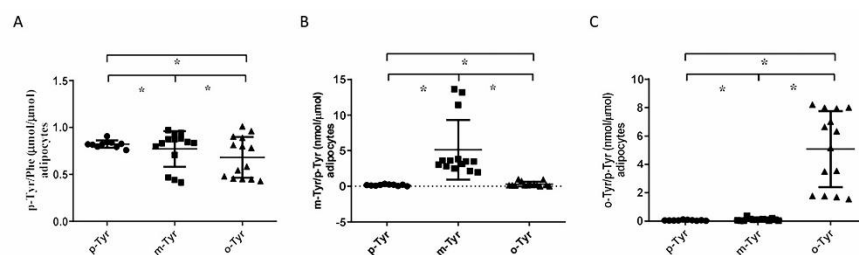


Figure 7. Cont.

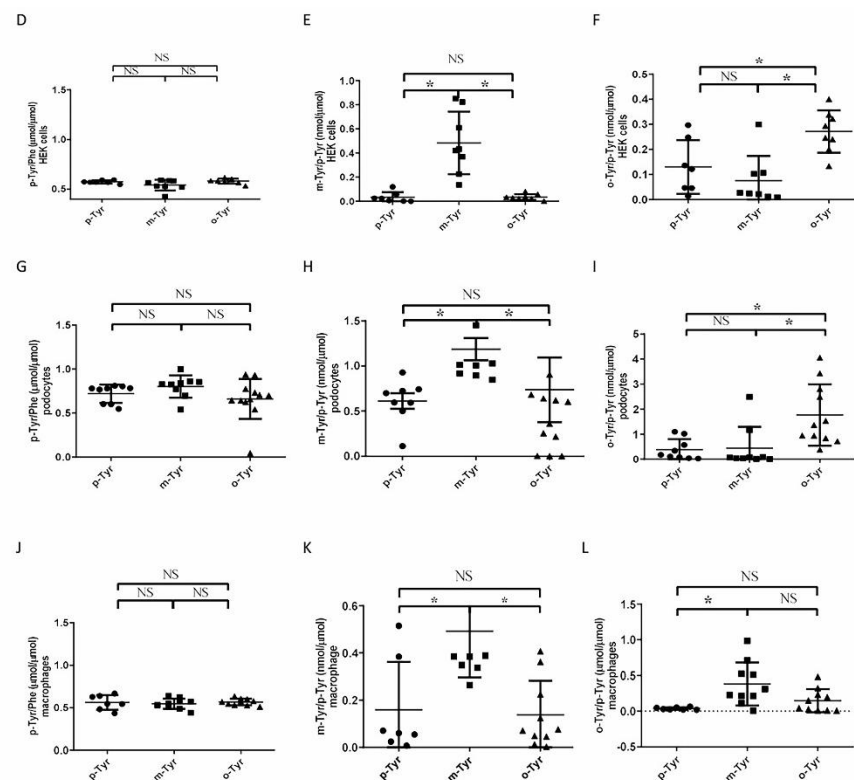


Figure 7. p-, m-, and o-Tyr content of the total proteins of cells grown in different Tyr media. HPLC measurement of protein-bound different tyrosine isomer content in cell lysates, grown in media containing para-, ortho-, or meta-tyrosine. * $p < 0.05$, NS: non-significant (using Kruskal–Wallis test for multiple comparisons and subsequently Mann–Whitney U test for pairwise comparison, as data were non-normally distributed). Results are mean \pm SEM for $n = 5$ – 10 individual measurements. Note that the amount of p-Tyr is shown as p-Tyr/Phe ratio and is expressed in $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ units (panel A,D,G,J), while o- and m-Tyr are depicted as their ratio to p-Tyr (i.e., o-Tyr/p-Tyr and m-Tyr/p-Tyr, respectively) and the units are $\text{nmol}/\mu\text{mol}$ (m-Tyr, panel B,E,H,K; o-Tyr, panel C,F,I,L).

3.1.2. Phosphorylation of IRS-1 in Cells Grown on o- or m-Tyr

In order to elucidate the mechanism underlying the inhibitory effect of o- and m-Tyr on insulin-induced glucose uptake, the phosphorylation levels of the insulin-receptor substrate-1 (IRS-1) and Akt (protein kinase B) steps of insulin signaling responsible for glucose uptake were studied. We found that in p-Tyr containing media, insulin treatment led to an approximately two-fold increase in the activating phosphorylation of IRS-1 and Akt. Interestingly, in cells grown on o- and m-Tyr containing media, the basal levels of IRS-1 and Akt phosphorylation were either unchanged or higher, which, however, could not be further raised by insulin treatment (Figure 8).

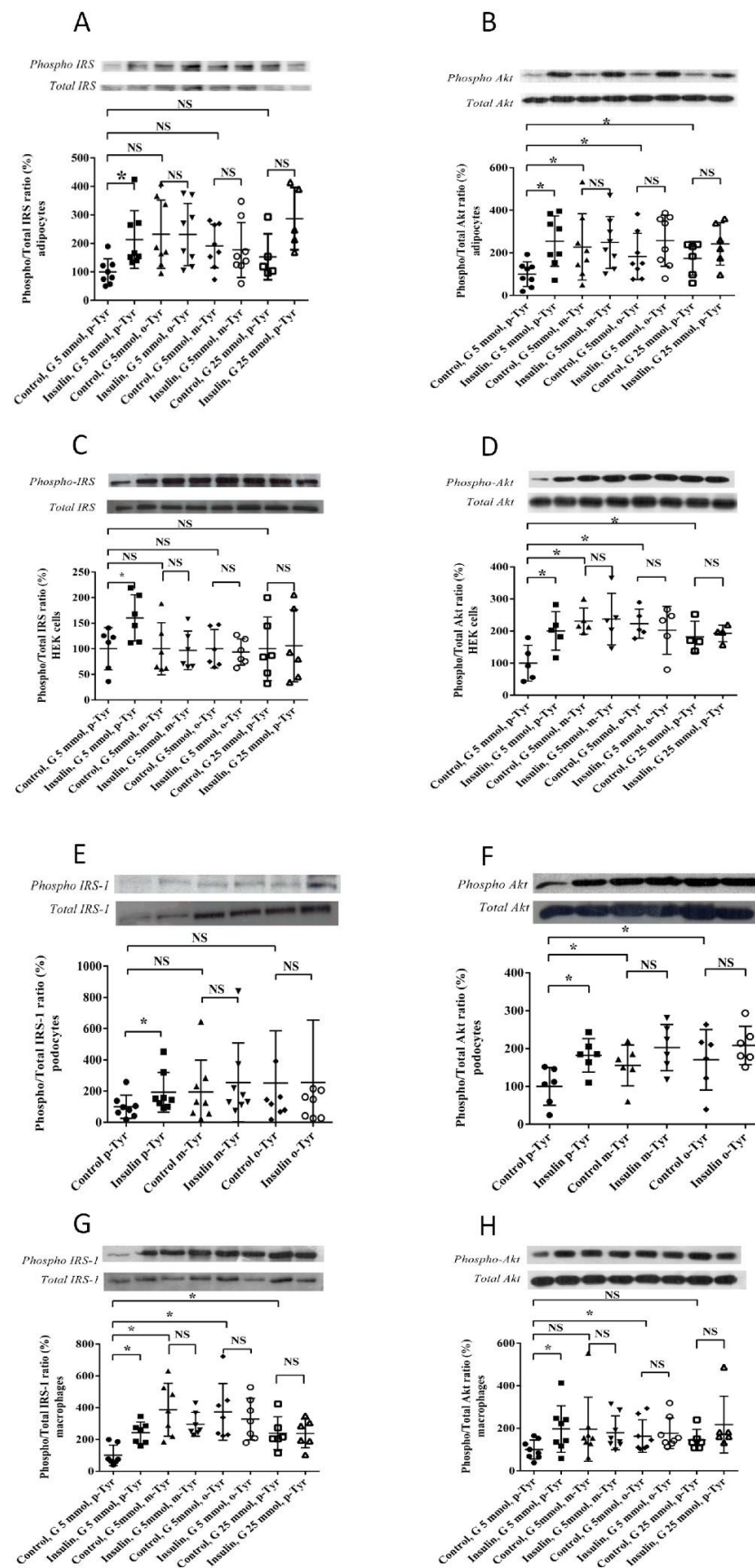


Figure 8. Western blot analysis of activating phosphorylation of IRS-1 (Tyr612, panel A,C,E,G) and Akt (Ser473, panel B,D,F,H) in the four cell lines (adipocytes, panel A,B; HEK cells panel C,D; podocytes,

E,F; macrophages, panel G,H). Insulin-induced phosphorylation of IRS-1 (insulin receptor substrate-1) at the tyrosine of the first YXXM motif (Tyr612) in cells grown in media containing para-, meta-, or ortho-tyrosine with and without insulin treatment (400 nmol/L). Results are mean \pm SEM for n= 4–8 individual measurements. * $p < 0.05$ (for non-normally distributed data, a Kruskal–Wallis test and, upon significance, pairwise comparisons with Mann–Whitney U test were carried out. Pairwise comparisons of normally distributed data were carried out using independent samples *t*-tests).

3.2. Biochemical Characterization of IRS Peptides Containing Different Forms of Tyrosine

Insulin receptor (IR) kinase phosphorylates multiple tyrosine residues in IRS-1 and its phosphorylation plays a central role in mediating signals towards downstream targets [46]. IRS-1 binds to activated IR kinase by its phospho-tyrosine binding (PTB) domain, and its plekstrin homology (PH) domain is instrumental to its cell membrane binding. In addition, this adapter protein contains a long, disordered C-terminal tail containing six YXXM motifs phosphorylated by the IR kinase, and thus provides a versatile contact for tyrosine phosphorylation dependent recognition of multiple regulator and effector proteins involved in the insulin pathway (Figure 9A). In addition to being the major substrate sites for the IR kinase, phosphorylated YXXM motifs are dephosphorylated by protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) [47]. Furthermore, phosphoinositide 3-kinase (PI3K) is recruited to the IR kinase signaling complex at the cell membrane via the Src homology 2 (SH2) domains of its p85 regulatory subunit [48].

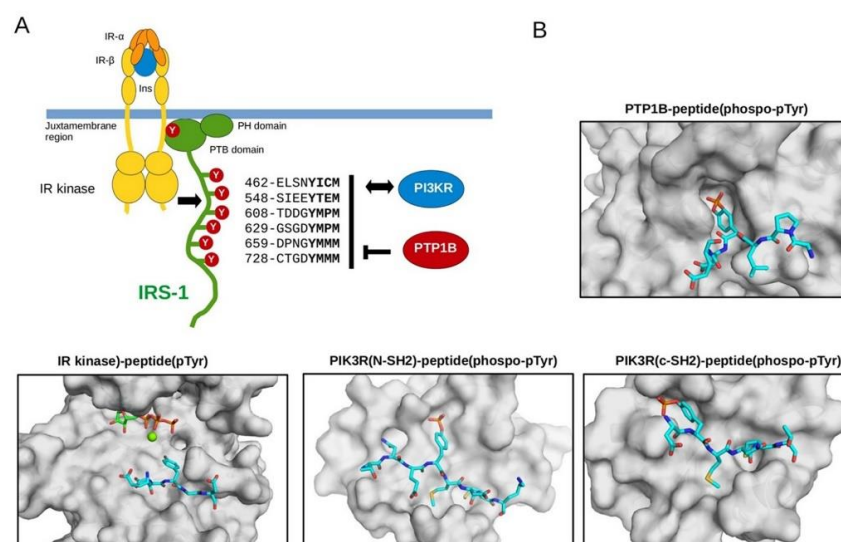


Figure 9. The role of IRS YXXM motifs in insulin mediated signaling. (A) Schematic of IR kinase mediated signaling: IR kinase, IRS-1 (PTB, PH domains and C-tail with YXXM motif positions and sequences indicated), PTP1B and PI3K regulatory subunits with SH2 domains. IRS-1 contains six YxxM motifs that play a central role in downstream signaling from the insulin receptor. The insulin receptor (IR)—comprised of two subunits—is dimerized upon binding to insulin (Ins). This activates the IR kinase which then creates a recruitment site in its juxtamembrane region for the PTB domain of IRS-1 by tyrosine phosphorylation. The PH domain helps recruiting IRS-1 to the cell membrane. (B) Crystallographic models of p-Tyr containing peptides binding to the deep substrate binding pocket of PTP1B, to the shallow substrate binding pocket of the IR kinase, and to the N-terminal SH2 domain of PI3K regulatory subunit (from left to right). IRS-1 partners are shown in surface representation, while substrate or ligand peptides from various proteins are shown with sticks. Structural figures were made by using the following protein–peptide PDB structures: 4zrt, PTP1B–Nephrin substrate phospho-peptide [49]; 3bu5, IR kinase IRS2–KRLB region peptide [50]; 2iuh, PI3KR-(N)SH2–c-Kit phospho-peptide [51]; 5aul, PI3KR-(C)SH2–CDC28 phospho-peptide [52].

In order to address the putative roles of o- and m-tyrosine incorporated into IRS-1, we studied the phosphorylation and the dephosphorylation of IRS-1 YxxM motif containing peptides by IR kinase and PTB1B, respectively. Peptides, corresponding to a fifteen amino acid long YXXM motif containing IRS1 (region 626–639) fragment, were chemically synthesized with unphosphorylated or phosphorylated p-, o- or m-tyrosines. The phosphorylation state of these peptides was examined by capillary electrophoresis in an in vitro kinetic experiment. In this assay, the electrophoretic mobility of peptides changed according to the tyrosine phosphorylation state. We found that neither o- nor m-tyrosine containing peptides are substrates for the IR kinase, while the enzyme efficiently phosphorylated the p-Tyr containing “natural” peptide (Figure 10A). Similarly, apart from the p-Tyr peptide, none of the modified Tyr containing peptides could be dephosphorylated by PTP1B (Figure 10B).

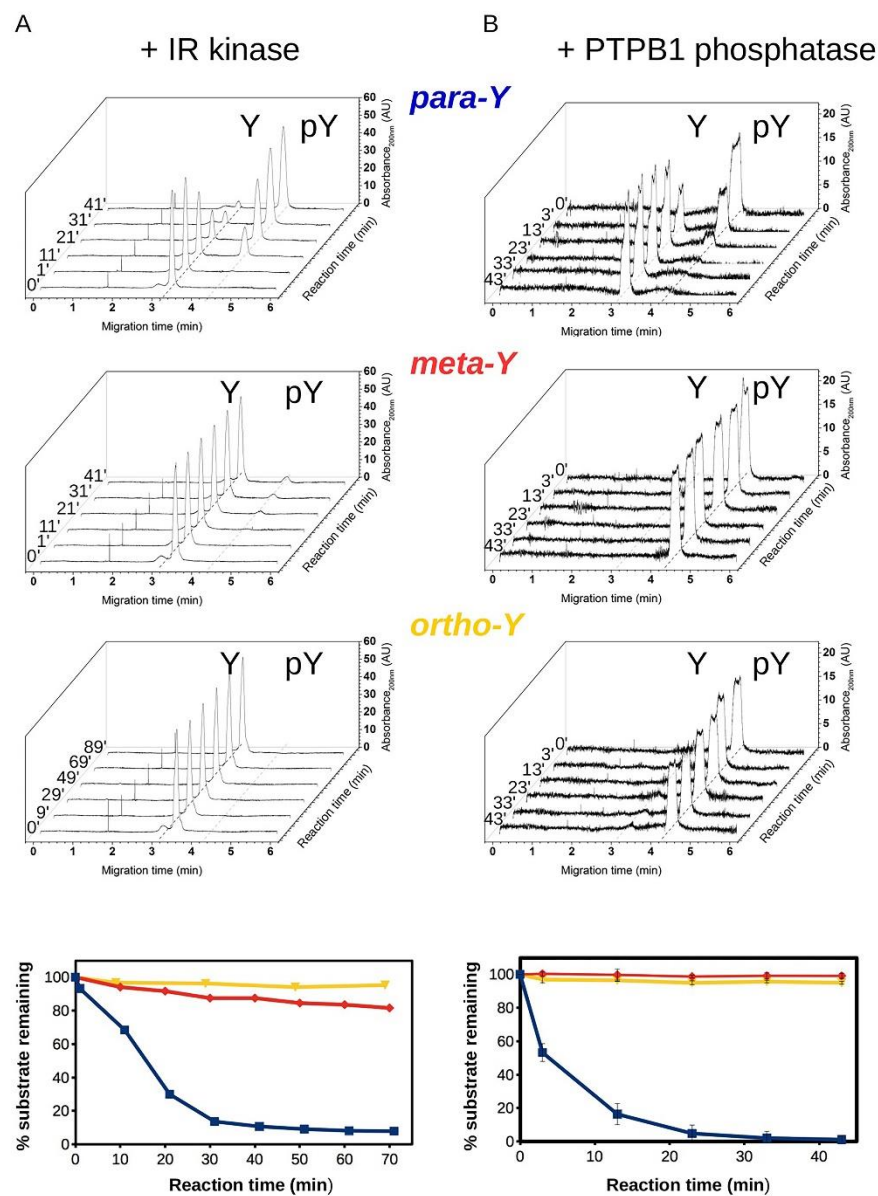


Figure 10. Phosphorylation and dephosphorylation of p-, m-, and o-Tyr containing IRS-1 peptides. (A) Results of in vitro kinase assays using recombinant IR kinase. Phosphorylation of IRS1 YXXM

motif containing peptides with para-, meta-, and ortho-tyrosines was analyzed by capillary electrophoresis. After starting the reactions, sample aliquots were injected to the capillary at the indicated time points. Characteristic migration times for the unphosphorylated peptide are indicated by a dashed line (~3.2 min). Notice the appearance of a slower migrating peak (at ~4.2 min) corresponding to the phosphorylated peptide in the case of the peptide with para-tyrosine. **(B)** Results of PTP1B dephosphorylation assays. Experiments were performed similarly to kinase reactions, but the substrate peptides were previously phosphorylated. Characteristic migration times for the phosphorylated peptide are indicated by a dashed line (~4.2 min). Notice the appearance of a faster migrating peak (at ~3.2 min) corresponding to the dephosphorylated peptide in the case of the peptide with para-tyrosine.

In order to study the role of o- and m-Tyr amino acid incorporation regarding other IRS-1 partner proteins relaying insulin signals, the binding capacity of para-, ortho-, and meta-tyrosine containing IRS-1 peptides to PI3K SH2 domains were also investigated (the regulatory subunit contains an N- and C-terminal SH2 domain). Using an in vitro protein-peptide binding assay, we found that o- and m-Tyr containing peptides had greatly reduced binding affinity to these SH2 domains (Figure 11). These in vitro protein-peptide binding and enzyme activity results can be structurally explained by observing the crystal structures of known protein-peptide complexes containing natural, p-Tyr, or phospho-p-Tyr possessing peptides: the topology of the binding surface on the interacting protein is only compatible with p-Tyr or phospho-p-Tyr for IR kinase or PTB1B and SH2 domains of PI3K, respectively (Figure 9B).

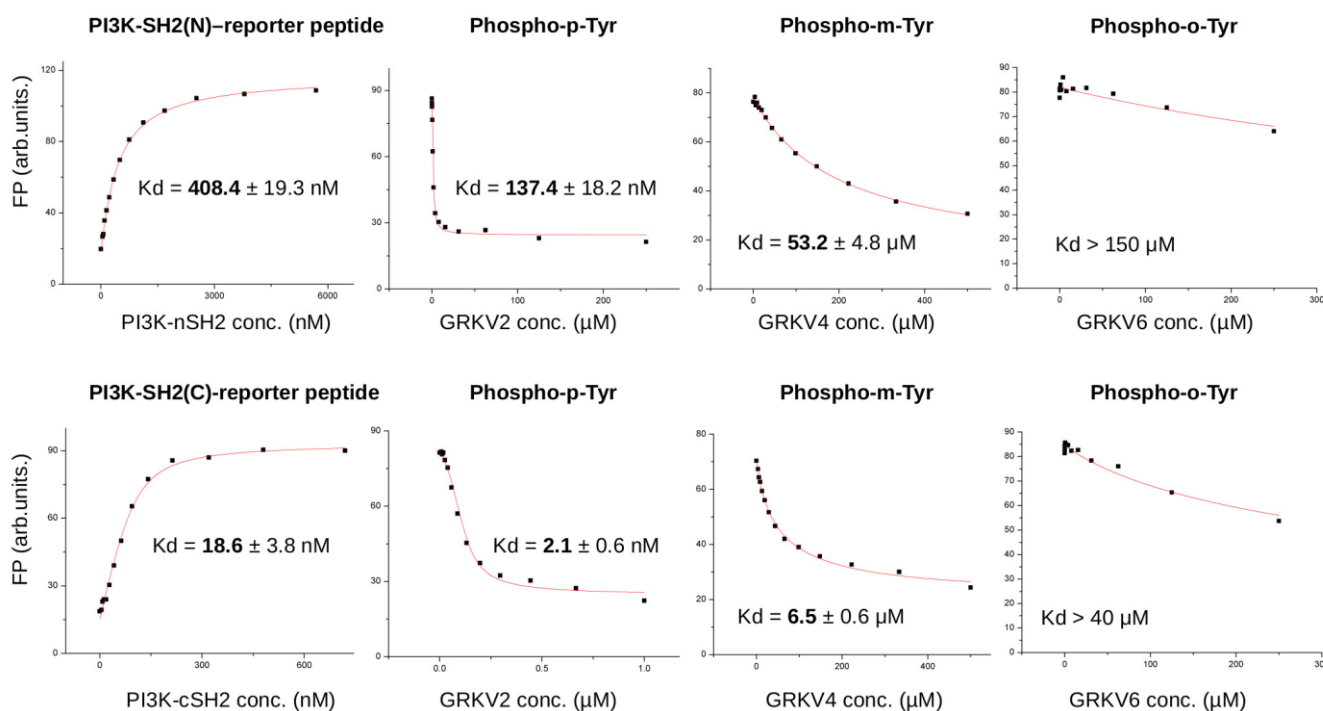


Figure 11. Binding of m- and o-Tyr IRS1 peptides to the SH2 domains of PI3K regulatory subunit. The error in the K_d values show the uncertainty of the numerical fit to the direct (**top**) and competitive (**bottom**) binding curves plotted as the mean of three technical replicates. For the GRKV6 peptide, the binding was so weak that its binding affinity could only be estimated. Please also take note that the binding affinity of the para-Tyr peptide is nanomolar (nM), while for the meta- and ortho-Tyr peptides this value is micromolar (μ M), making statistical comparison unnecessary.

The panels below show that para-tyrosine containing peptides are efficiently phosphorylated and dephosphorylated by IR kinase and PTP1B, respectively, while meta- and ortho-tyrosine peptides are very poor substrates of these enzymes.

Results of the fluorescence polarization (FP)-based binding assays. To the left, the panels show the direct titration of the fluorescently labelled para-tyrosine containing phosphorylated IRS-1 peptide with the isolated N-terminal and C-terminal SH2 domains of the PI3K regulatory subunit (top and bottom, respectively). The next three panels on the right show the competitive binding curves with increasing amounts of phospho-para- (GRKV2), phospho-meta- (GRKV4), and phospho-ortho-Tyr (GRKV6) containing peptides. Notice that both modified phospho-tyrosine containing peptides (GRKV4 and 6) have greatly reduced binding affinity to the SH2 domains compared to the phospho-para-Tyr containing peptide (GRKV2). Note the change from nanomolar to micromolar binding affinity.

3.3. Microscopical Analysis

Visualization of insulin signaling is shown in Figures 12 and 13. IRS-1 phosphorylation leads to membrane translocation of this signaling protein, which is clearly demonstrated by Figure 12 in p-Tyr containing medium, but this translocation is absent in the presence of m- and o-Tyr. Moreover, the intensity of p-IRS-1 is also lower in the case of m- and o-Tyr. The same membrane translocation on insulin treatment is also characteristic of GLUT-4, which is responsible for insulin dependent glucose transport. Figure 13 shows this characteristic localization of GLUT-4 positivity in the presence of p-Tyr, which is absent in samples treated with m- and o-Tyr.

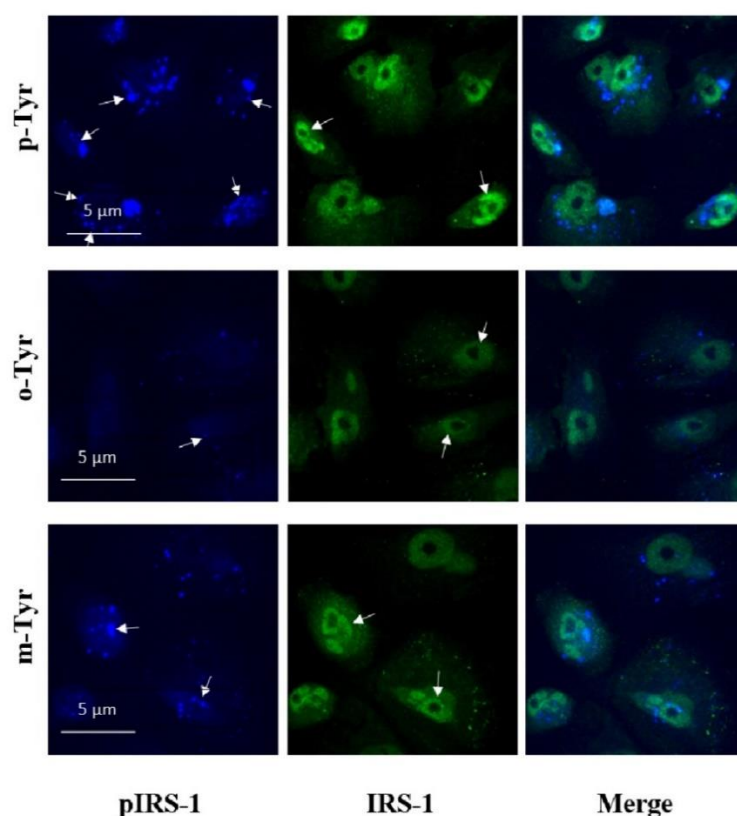


Figure 12. Immunofluorescence staining of insulin-treated podocytes for p-IRS-1 (blue) and total IRS-1 (green). p-IRS-1 (indicated by the white arrows) is located in the membrane when cells cultured in the presence of p-Tyr, which is not characteristic in cell treated with o- and m-Tyr. Moreover, p-IRS-1 is more intense in cells cultured in medium containing p-Tyr and the signal almost disappears in cells treated with o-Tyr. Total IRS-1 localization is mainly perinuclear.

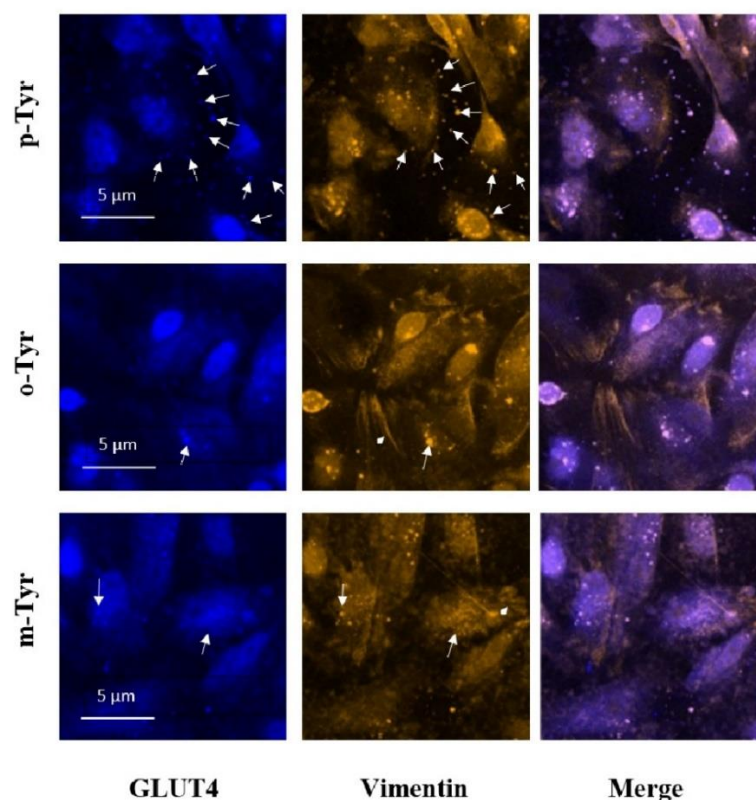


Figure 13. Immunofluorescence staining of insulin-treated podocytes for GLUT4 (blue) and vimentin (yellow). In p-Tyr-treated cells, GLUT4 aggregates are transported to the membrane. This localization is slightly visible in cells treated with m-Tyr, but it is not characteristic in o-Tyr treated cells, which shows rather a perinuclear localization. Typical localization of GLUT4 and vimentin is highlighted by the white arrows. Vimentin shows a colocalization with GLUT4. The arrowhead indicates the thicker vimentin filaments appearing in cells treated with m- and o-Tyr.

4. Discussion

In this study, we report for the first time, that the abnormal amino acids, o- and m-Tyr inhibit glucose uptake of fat cells. Furthermore, we provide evidence that insulin signaling may be altered in cells grown on media containing o- or m-Tyr. We also observed that o- and m-Tyr can be taken up by the cells and incorporates into cellular proteins.

It is suggested that there is a causal connection between oxidative stress and insulin resistance, e.g., oxidized LDL, as well as isoprostanes correlated with insulin resistance as measured by the homeostasis model assessment index (HOMAIR) [53]. On the other hand, oxidative stress has been shown to activate serine protein kinases that would interfere with insulin signaling [23]. Oxidative stress is believed to lead to the activation of inflammatory processes that could further contribute to the development of insulin resistance through inflammatory cells [4] or via activation of stress-kinases (e.g., JNK), which could lead to the serine/threonine (Ser/Thr) phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 and in this way impair insulin signaling [54].

The abnormal amino acids o- and m-Tyr are results of the attack of hydroxyl radicals on Phe molecules or the Phe residues of proteins [55]. o- and m-Tyr are regarded as specific, stable markers of hydroxyl radicals [56], and have been detected in increasing amounts in cataract lenses [38], in urine of preterm infants [57], in Fabry's disease [58], and in cardiopulmonary bypass [59], among others. The abnormal tyrosine isomers offer the advantage of fluorescent detection without derivatization upon their autofluorescence [60].

Our data suggest that while in cells grown on p-Tyr containing culture medium, insulin is able to induce glucose uptake to approximately two-fold; in cells grown on media enriched with glucose, o-, or m-Tyr, glucose uptake is similarly blunted. The effects can

already be observed after a single day, and last at for least up to 12 days. These observations prompt for a direct role of o- and m-Tyr, and not the role of oxidative stress itself, as in this setting o- and m-Tyr were applied in the absence of an obvious oxidative stress.

Our present data suggest that supplementation of four different cell lines with o- or m-Tyr leads to insulin resistance in the cells, similarly to a high glucose environment. In the o- and m-Tyr grown cells, insulin failed to increase IRS-1 phosphorylation.

While insulin was able to stimulate Akt phosphorylation in p-Tyr grown cells in normal glucose media, in the presence of o- and m-Tyr, insulin was unable to exert any effect, similar to the high glucose environment.

From the insulin receptor substrate proteins, only IRS-1, but not IRS-2, was studied, and both would have an impact on Akt phosphorylation [61,62]. Furthermore, only one phosphorylation site of IRS-1 was investigated, although numerous Tyr phosphorylation sites exist [63]. Furthermore, incorporation of o- or m-Tyr into cellular proteins such as IRS-1 might alter immunologic recognition by antibodies, especially directed against phosphorylated tyrosine residues.

Moreover, other protein kinases, e.g., stress kinases (e.g., JNK) may influence insulin signaling at different levels [54,62], and hypothetically, these kinases could also be altered by the addition of o- or m-Tyr to the culture media.

Additionally, constant stimulation of insulin signaling has been shown to alter kinetics and extent of phosphorylation of IRS-1 and Akt and cause seeming disparities between them [64]. Nevertheless, the results of Akt phosphorylation and glucose uptake match each other well, indicating the development of insulin resistance at both levels upon o- or m-Tyr supplementation.

Biochemical characterization of a YXXM motif containing IRS1 peptide demonstrated that the position of the phosphorylatable hydroxyl group greatly affects its binding capacity to several IRS1 interactors (IR, PTP1B and PI3K-SH2). These interactors have binding grooves with distinct binding surface topographies varying from shallow (IR) to deep (PTP1B), but o- and m-Tyr were deleterious for binding in each case. This indicates that incorporation of these phenylalanine oxidization by-products into signaling proteins will greatly perturb network output and behavior because of the fundamentally altered protein-protein binding capacity of their components.

Altogether, we present a rather indirect connection between the incorporation of o- and m-Tyr into proteins and their effect on insulin signaling. Unfortunately, to date, there are no commercially available antibodies raised against o- and m-Tyr or o- and m-Tyr containing proteins. Moreover, the lack of isotope-labelled o- or m-Tyr precluded providing a more direct link. For the same reason, the incorporation of o- or m-Tyr into specific proteins, such as the insulin receptor IRS-1 or other signaling molecules, cannot be demonstrated. Furthermore, 3T3-L1 cells are not real fat cells, but fat cell-like cells; however, they provide a widely accepted model to study insulin signaling in fatty tissue.

In spite of these shortcomings, our study does suggest that o- and m-Tyr would be able to incorporate into cellular proteins in fat cells. Moreover, our results are consistent with a model in which these incorporated amino acids interfere with insulin signaling and inhibit insulin-stimulated glucose uptake, i.e., they induce metabolic insulin resistance in the cells, just like under hyperglycemic circumstances (Figure 14).

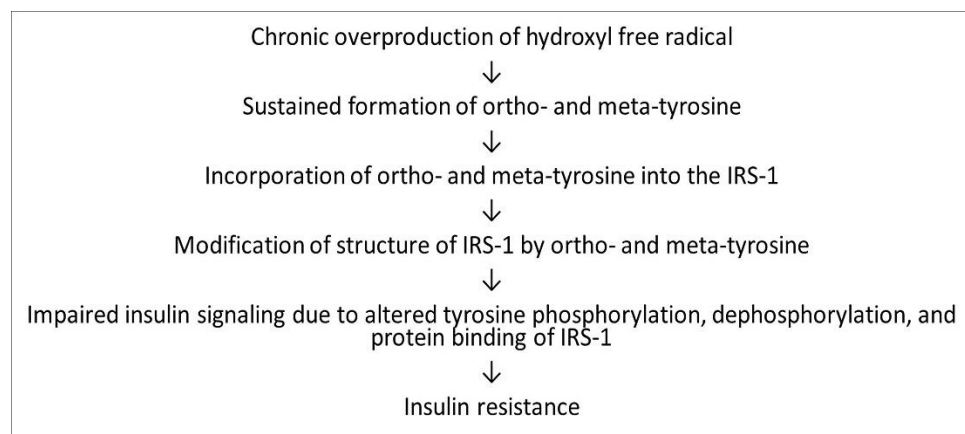


Figure 14. Suggested role of o- and m-Tyr in the development of insulin resistance.

These results are in line with our previous observations regarding vascular insulin resistance [65], vascular liraglutide resistance [66], and EPO resistance [43], and suggest a potentially more universal role of o- and m-Tyr in the development of hormone resistances in conditions with high oxidative stress.

Author Contributions: Conceptualization: I.W., methodology: M.P., B.L., T.V., K.N. and O.C.; software: M.K. and G.A.M.; validation: I.W., G.K.T., A.R. and C.H.; formal analysis: J.M.-C., M.K., K.N. and O.C.; investigation: J.M.-C., M.K., M.P., K.N. and O.C.; resources: I.W.; data curation: J.M.-C., G.K.T., A.R. and I.W.; writing—original draft preparation: J.M.-C., G.A.M., G.K.T., A.R. and I.W.; writing—review and editing: G.K.T., A.R. and I.W.; visualization: J.M.-C., T.V. and M.K.; supervision: B.L., G.K.T., A.R. and I.W.; project administration: J.M.-C.; funding acquisition: I.W., A.R. and G.K.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the National Research Development and Innovation Office (NK-FIH) grant (KKP 126963 awarded to AR) and VEKOP-2.3.3-15-2016-00011 and TKP2021-EGA-32 (GKT).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank József Andor for revision of language and style, András Perczel for his scientific suggestions, Enikő Bodor for technical assistance, and András Zeke for his help in protein production and purification.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. De Fronzo, R.A. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* **2009**, *58*, 773–795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Schwartz, S.S.; Epstein, S.; Corkey, B.E.; Grant, S.F.A.; Gavin, J.R.; Aguilar, R.B. The time is right for a new classification system for diabetes: Rationale and implications of the beta-cell-centric classification schema. *Diabetes Care* **2016**, *39*, 179–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Khan, A.H.; Pessin, J.E. Insulin regulation of glucose uptake: A complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* **2002**, *45*, 1475–1483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Tangvarasittichai, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes* **2015**, *6*, 456–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Galiero, R.; Caturano, A.; Vetrano, E.; Cesaro, A.; Rinaldi, L.; Salvatore, T.; Marfella, R.; Sardu, C.; Moscarella, E.; Gragnano, F.; et al. Pathophysiological mechanisms and clinical evidence of relationship between Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and cardiovascular disease. *Rev. Cardiovasc. Med.* **2021**, *22*, 755–768. [[CrossRef](#)]

6. Houstis, N.; Rosen, E.D.; Lander, E.S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* **2006**, *440*, 944–948. [[CrossRef](#)]
7. Akbari, M.; Ostadmohammadi, V.; Lankarani, K.B.; Tabrizi, R.; Kolahdooz, F.; Khatibi, S.R.; Asemi, Z. The effects of alpha-lipoic acid supplementation on glucose control and lipid profiles among patients with metabolic diseases: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Metabolism* **2018**, *87*, 56–69. [[CrossRef](#)]
8. Garvey, W.T.; Olefsky, J.M.; Griffin, J.; Hamman, R.F.; Kolterman, O.G. The effect of insulin treatment on insulin secretion and insulin action in type, I.I.; diabetes mellitus. *Diabetes* **1985**, *34*, 222–234. [[CrossRef](#)]
9. Weng, J.; Li, Y.; Xu, W.; Shi, L.; Zhang, Q.; Zhu, D.; Hu, Y.; Zhou, Z.; Yan, X.; Tian, H.; et al. Effect of intensive insulin therapy on beta-cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: A multicentre randomised parallel-group trial. *Lancet* **2008**, *371*, 1753–1760. [[CrossRef](#)]
10. Vlassara, H.; Cai, W.; Tripp, E.; Pyzik, R.; Yee, K.; Goldberg, L.; Tansman, L.; Chen, X.; Mani, V.; Fayad, Z.A.; et al. Oral AGE restriction ameliorates insulin resistance in obese individuals with the metabolic syndrome: A randomised controlled trial. *Diabetologia* **2016**, *59*, 2181–2192. [[CrossRef](#)]
11. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **2001**, *414*, 813–820. [[CrossRef](#)]
12. Pereira, S.; Park, E.; Mori, Y.; Haber, C.A.; Han, P.; Uchida, T.; Stavar, L.; Oprescu, A.I.; Koulajian, K.; Iovic, A.; et al. FFA-induced hepatic insulin resistance in vivo is mediated by, P.K.;Cδ, NADPH oxidase, and oxidative stress. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2014**, *307*, E34–E46. [[CrossRef](#)]
13. Li, H.; Lee, J.; He, C.; Zou, M.-H.; Xie, Z. Suppression of the mTORC1/STAT3/Notch1 pathway by activated, A.M.;PK prevents hepatic insulin resistance induced by excess amino acids. *Am. J. Physiol. Metab.* **2014**, *306*, E197–E209. [[CrossRef](#)]
14. Gu, C.; Shi, Y.; Le, G. Effect of dietary protein level and origin on the redox status in the digestive tract of mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 464–475. [[CrossRef](#)]
15. Alwahsh, S.M.; Xu, M.; Schultze, F.C.; Wilting, J.; Mihm, S.; Raddatz, D.; Ramadori, G. Combination of alcohol and fructose exacerbates metabolic imbalance in terms of hepatic damage, dyslipidemia, and insulin resistance in rats. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104220. [[CrossRef](#)]
16. Wlazlo, N.; van Greevenbroek, M.M.; Ferreira, I.; Jansen, E.H.; Feskens, E.J.; van der Kallen, C.J.; Schalkwijk, C.G.; Bravenboer, B.; Stehouwer, C.D. Iron metabolism is associated with adipocyte insulin resistance and plasma adiponectin: The Cohort on Diabetes and Atherosclerosis Maastricht (CODAM) study. *Diabetes Care* **2013**, *36*, 309–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Messner, D.J.; Rhieu, B.H.; Kowdley, K.V. Iron Overload Causes Oxidative Stress and Impaired Insulin Signaling in AML-12 Hepatocytes. *Am. J. Dig. Dis.* **2013**, *58*, 1899–1908. [[CrossRef](#)]
18. Bastard, J.P.; Maachi, M.; Lagathu, C.; Kim, M.J.; Caron, M.; Vidal, H.; Capeau, J.; Feve, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* **2006**, *17*, 4–12.
19. Qamirani, E.; Ren, Y.; Kuo, L.; Hein, T.W. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent, N.O.-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and, N.A.;D(P)H oxidase. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*, 995–1001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Piya, M.K.; McTernan, P.G.; Kumar, S. Adipokine inflammation and insulin resistance: The role of glucose, lipids and endotoxin. *J. Endocrinol.* **2013**, *216*, T1–T15. [[CrossRef](#)]
21. Raghuraman, G.; Zuniga, M.C.; Yuan, H.; Zhou, W. PKCε mediates resistin-induced, N.A.;DPH oxidase activation and inflammation leading to smooth muscle cell dysfunction and intimal hyperplasia. *Atherosclerosis* **2016**, *253*, 29–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Peng, H.; Li, W.; Seth, D.M.; Nair, A.R.; Francis, J.; Feng, Y. (Pro)renin receptor mediates both angiotensin, I.I.-dependent and -independent oxidative stress in neuronal cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58339. [[CrossRef](#)]
23. Habibi, J.; Whaley-Connell, A.; Hayden, M.R.; DeMarco, V.; Schneider, R.; Sowers, S.D.; Karuparthi, P.; Ferrario, C.M.; Sowers, J.R. Renin inhibition attenuates insulin resistance, oxidative stress, and pancreatic remodeling in the transgenic Ren2 rat. *Endocrinology* **2008**, *149*, 5643–5653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Henriksen, E.J.; Diamond-Stanic, M.K.; Marchionne, E.M. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 993–999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Whaley-Connell, A.; Sowers, J.R. Oxidative stress in the cardiorenal metabolic syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* **2012**, *14*, 360–365. [[CrossRef](#)]
26. Ishibashi, K.I.; Imamura, T.; Sharma, P.M.; Huang, J.; Ugi, S.; Olefsky, J.M. Chronic endothelin-1 treatment leads to heterologous desensitization of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J. Clin. Investig.* **2001**, *107*, 1193–1202. [[CrossRef](#)]
27. Häring, H.; Kirsch, D.; Obermaier, B.; Ermel, B.; Machicao, F. Decreased tyrosine kinase activity of insulin receptor isolated from rat adipocytes rendered insulin-resistant by catecholamine treatment in vitro. *Biochem. J.* **1986**, *234*, 59–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Bleeke, T.; Zhang, H.; Madamanchi, N.; Patterson, C.; Faber, J.E. Catecholamine-induced vascular wall growth is dependent on generation of reactive oxygen species. *Circ. Res.* **2004**, *94*, 37–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Chen, G.; Raman, P.; Bhonagiri, P.; Strawbridge, A.B.; Pattar, G.R.; Elmendorf, J.S. Protective Effect of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate against Cortical Filamentous Actin Loss and Insulin Resistance Induced by Sustained Exposure of 3T3-L1 Adipocytes to Insulin. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 39705–39709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Catalano, K.J.; Maddux, B.A.; Szary, J.; Youngren, J.F.; Goldfine, I.D.; Schaufele, F. Insulin resistance induced by hyperinsulinemia coincides with a persistent alteration at the insulin receptor tyrosine kinase domain. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

31. Goldstein, B.J.; Mahadev, K.; Wu, X.; Zhu, L.; Motoshima, H. Role of Insulin-Induced Reactive Oxygen Species in the Insulin Signaling Pathway. *Antioxidants Redox Signal.* **2005**, *7*, 1021–1031. [[CrossRef](#)]
32. Kain, V.; Kapadia, B.; Misra, P.; Saxena, U. Simvastatin may induce insulin resistance through a novel fatty acid mediated cholesterol independent mechanism. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, srep13823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Olea, E.; Agapito, M.T.; Gallego-Martin, T.; Rocher, A.; Gomez-Niño, A.; Obeso, A.; Gonzalez, C.; Yubero, S. Intermittent hypoxia and diet-induced obesity: Effects on oxidative status, sympathetic tone, plasma glucose and insulin levels, and arterial pressure. *J. Appl. Physiol.* **2014**, *117*, 706–719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Thannickal, V.J.; Fanburg, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **2000**, *279*, L1005–L1028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lerner, A.B. On the metabolism of phenylalanine and tyrosine. *J. Biol. Chem.* **1949**, *181*, 281–294. [[CrossRef](#)]
36. Molnár, G.A.; Kun, S.; Sélley, E.; Kertész, M.; Szélig, L.; Csontos, C.; Böddi, K.; Bogár, L.; Miseta, A. Role of tyrosine isomers in acute and chronic diseases leading to oxidative stress—A Review. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 667–685. [[CrossRef](#)]
37. Pennathur, S.; Wagner, J.D.; Leeuwenburgh, C.; Litwak, K.N.; Heinecke, J.W. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. *J. Clin. Investig.* **2001**, *107*, 853–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Fu, S.; Dean, R.T.; Southan, M.; Truscott, R. The hydroxyl radical in lens nuclear cataractogenesis. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 28603–28609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Molnár, G.A.; Wagner, Z.; Markó, L.; Kőszegi, T.; Mohás, M.; Kocsis, B.; Matus, Z.; Wagner, L.; Tamaskó, M.; Mazák, I.; et al. Urinary ortho-tyrosine excretion in diabetes mellitus and renal failure: Evidence for hydroxyl radical production. *Kidney Int.* **2005**, *68*, 2281–2287. [[CrossRef](#)]
40. Brasnyó, P.; Molnar, G.A.; Mohás, M.; Markó, L.; Laczy, B.; Cseh, J.; Mikolás, E.; Szijártó, I.A.; Mérei, A.; Halmai, R.; et al. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br. J. Nutr.* **2011**, *106*, 383–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Duke, S.O. The emergence of grass root chemical ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16729–16730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ruggiero, R.A.; Bruzzo, J.; Chiarella, P.; Di Gianni, P.; Isturiz, M.A.; Linskens, S.; Speziale, N.; Meiss, R.P.; Bustuoabad, O.D.; Pasqualini, C.D. Tyrosine isomers mediate the classical phenomenon of concomitant tumor resistance. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 7113–7124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Mikolás, E.; Kun, S.; Laczy, B.; Molnár, G.A.; Sélley, E.; Wittmann, I.; Koszegi, T. Incorporation of ortho- and meta-tyrosine into cellular proteins leads to erythropoietin-resistance in an erythroid cell line. *Kidney Blood Press. Res.* **2013**, *38*, 217–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kaddai, V.; Gonzalez, T.; Keslair, F.; Grémeaux, T.; Bonnafous, S.; Gugenheim, J.; Tran, A.; Gual, P.; Le Marchand-Brustel, Y.; Cormont, M. Rab4b is a small, G.T.;Pase involved in the control of the glucose transporter, G.L.;UT4 localization in adipocyte. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Schiwiek, D.; Endlich, N.; Holzman, L.; Holthöfer, H.; Kriz, W.; Endlich, K. Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. *Kidney Int.* **2004**, *66*, 91–101. [[CrossRef](#)]
46. Shoelson, S.E.; Chatterjee, S.; Chaudhuri, M.; White, M.F. YMXM motifs of, I.R.;S-1 define substrate specificity of the insulin receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 2027–2031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Goldstein, B.J.; Bittner-Kowalczyk, A.; White, M.F.; Harbeck, M. Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4283–4289. [[CrossRef](#)]
48. Sánchez-Margalet, V.; Goldfine, I.D.; Truitt, K.; Imboden, J.; Sung, C.K. Role of p85 subunit of phosphatidylinositol-3-kinase as an adaptor molecule linking the insulin receptor to insulin receptor substrate 1. *Mol. Endocrinol.* **1995**, *9*, 435–442. [[CrossRef](#)]
49. Selner, N.G.; Luechapanichkul, R.; Chen, X.; Neel, B.G.; Zhang, Z.Y.; Knapp, S.; Bell, C.E.; Pei, D. Diverse levels of sequence selectivity and catalytic efficiency of protein-tyrosine phosphatases. *Biochemistry* **2014**, *53*, 397–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Wu, J.; Tseng, Y.D.; Xu, C.F.; Neubert, T.A.; White, M.F.; Hubbard, S.R. Structural and biochemical characterization of the, K.R.;LB region in insulin receptor substrate-2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 251–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Nolte, R.T.; Eck, M.J.; Schlessinger, J.; Shoelson, S.E.; Harrison, S.C. Crystal structure of the, P.I.; 3-kinase p85 amino-terminal, S.H.;2 domain and its phosphopeptide complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1996**, *3*, 364–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Inaba, S.; Numoto, N.; Ogawa, S.; Morii, H.; Ikura, T.; Abe, R.; Ito, N.; Oda, M. Crystal Structures and Thermodynamic Analysis Reveal Distinct Mechanisms of CD28 Phosphopeptide Binding to the Src Homology 2 (SH2) Domains of Three Adaptor Proteins. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 1052–1060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Park, K.; Gross, M.; Lee, D.H.; Holvoet, P.; Himes, J.H.; Shikany, J.M.; Jacobs, D.R. Oxidative stress and insulin resistance: The coronary artery risk development in young adults study. *Diabetes Care* **2009**, *32*, 1302–1307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Solinas, G.; Karin, M. JNK1 and IKK β : Molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J.* **2010**, *24*, 2596–2611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Sitte, N. Oxidative damage to proteins. In *Ageing at the Molecular Level*; von Thomas, Z., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2003; pp. 27–45.
56. Torres-Cuevas, I.; Kuligowski, J.; Escobar, J.; Vento, M. Determination of biomarkers of protein oxidation in tissue and plasma. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *75* (Suppl. S1), S51. [[CrossRef](#)]

57. Ledo, A.; Arduini, A.; A Asensi, M.; Sastre, J.; Escrig, R.; Brugada, M.; Aguar, M.; Saenz, P.; Vento, M. Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *89*, 210–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Shu, L.; Park, J.L.; Byun, J.; Pennathur, S.; Kollmeyer, J.; Shayman, J.A. Decreased Nitric Oxide Bioavailability in a Mouse Model of Fabry Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20*, 1975–1985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Schultz, S.; Creed, J.; Schears, G.; Zaitseva, T.; Greeley, W.; Wilson, D.F.; Pastuszko, A. Comparison of low-flow cardiopulmonary bypass and circulatory arrest on brain oxygen and metabolism. *Ann. Thorac. Surg.* **2004**, *77*, 2138–2143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Ishimitsu, S.; Fujimoto, S.; Ohara, A. High-performance liquid chromatographic determination of m-tyrosine and o-tyrosine in rat urine. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1989**, *489*, 377–383. [[CrossRef](#)]
61. Huang, C.; Wu, M.; Du, J.; Liu, D.; Chan, C. Systematic modeling for the insulin signaling network mediated by IRS1 and IRS2. *J. Theor. Biol.* **2014**, *355*, 40–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Wu, M.; Yang, X.; Chan, C. A Dynamic Analysis of IRS-PKR Signaling in Liver Cells: A Discrete Modeling Approach. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e8040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Hubbard, S.R. The insulin receptor: Both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Matveyenko, A.V.; Liuwantara, D.; Gurlo, T.; Kirakossian, D.; Man, C.D.; Cobelli, C.; White, M.F.; Copps, K.D.; Volpi, E.; Fujita, S.; et al. Pulsatile Portal Vein Insulin Delivery Enhances Hepatic Insulin Action and Signaling. *Diabetes* **2012**, *61*, 2269–2279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Szijártó, I.A.; Molnár, G.A.; Mikolás, E.; Fisi, V.; Cseh, J.; Laczy, B.; Kovács, T.; Böddi, K.; Takátsy, A.; Gollasch, M.; et al. Elevated Vascular Level of ortho-Tyrosine Contributes to the Impairment of Insulin-Induced Arterial Relaxation. *Horm. Metab. Res.* **2014**, *46*, 749–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Selley, E.; Kun, S.; Kürthy, M.; Kovacs, T.; Wittmann, I.; Molnar, G. Para-Tyrosine Supplementation Improves Insulin- and Liraglutide- Induced Vasorelaxation in Cholesterol-Fed Rats. *Protein Pept. Lett.* **2015**, *22*, 736–742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]