

The evolving beta cell phenotype

Doktori tézisek

Dr. Jermendy Ágnes

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Madácsy László egyetemi tanár,
az orvostudományok doktora

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szabó András egyetemi tanár,
az orvostudományok doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Gerő László egyetemi tanár,
az orvostudományok doktora
Dr. Halmos Tamás egyetemi tanár,
az orvostudományok doktora
Dr. Dérfalvi Beáta egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2014

Bevezetés

A diabetes mellitus, vagyis cukorbetegség lényege az inzulintermelő béta-sejtek elégtelen működése, melynek hátterében autoimmun destrukció áll 1-es típusú diabetes esetében, vagy pedig a hosszasan fennálló glukotoxicitás és a társuló perifériás inzulin rezisztencia együttes hatása 2-es típusú diabetesben. A diabetes bármely formája súlyos, szisztémás betegség, melynek kezelése nagy terhet ró az egyénre és az egészségügyi ellátó rendszerre is. Napjaink egyik legjelentősebb népegészségügyi problémáját az elhízás és az ehhez társuló 2-es típusú diabetes gyakoriságának növekedése jelenti. A cukorbetegség élethosszig tartó kezelést igényel, emellett késői szövődmények kialakulásával is számolni kell. Jól ismert microvascularis szövődmények a retinopathia, nephropathia, valamint a neuropathia kialakulása, melyek gyakran az életminőség romlásával járnak. Macrovascularis szövődmények, mint a korai és súlyos arteriosclerosis kialakulása szintén összefüggésbe hozható a rossz szénhidrát anyagcserével, más metabolikus faktorok meghatározó szerepe mellett. A glukóz homeostasis normalizálása a szövődmények kialakulását megelőzheti vagy késleltetheti. Ma már gyógyszerek széles spektruma vált elérhetővé a cukorbetegség számára, azonban kuratív terápia továbbra sem ismert. Érthető módon a béta-sejtek élettani változásai, a differenciálódási és érési folyamatok, valamint a diabetes kialakulásakor a béta-sejtekben lezajló kórélettani változások a kutatások előterében állnak.

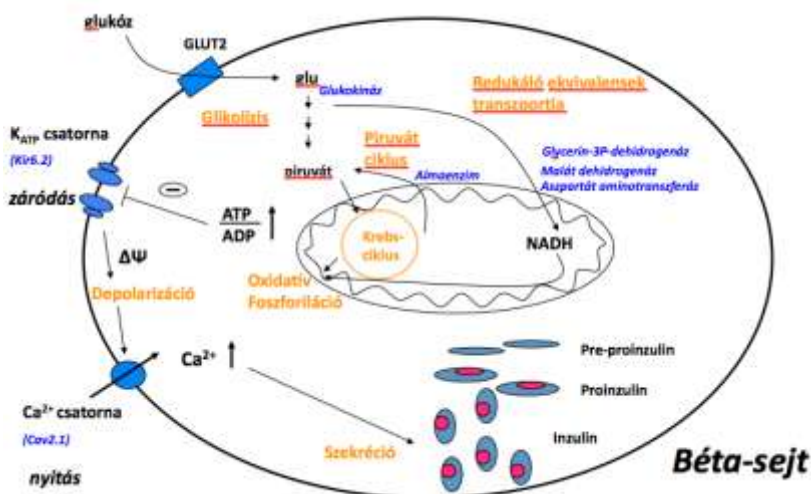
A pancreas, és az endocrin funkciójú Langerhans-szigetek fejlődésének karakterizálása, valamint a béta-sejtek embrionális kialakulását szabályozó transzkripciós faktorok megismerése a diabetes sejt-alapú terápiájának kulcsa lehet. Az 1970-es évektől történtek próbálkozások béta-sejt funkció pótlására, mely jelenleg teljes pancreas transzplantációval, vagy szigetsejt transzplantációval valósítható meg. Az élethosszig tartó immunszuppresszió szükségessége, az elégtelen számú donor, és a sebészeti beavatkozással járó esetleges szövődmények miatt a transzplantáció

jelenleg nem terjedt el széles körben. A kutatások így béta-sejtek pótlásának alternatív módozatai felé fordultak. Elsősorban az *in vitro* módszerekkel, őssejtekből, transzkripciós faktorok bejuttatásával differenciáltatott béta-sejtek létrehozása jelenthet megoldást a távoli jövőben a diabetes terápiájára. A béta-sejt differenciálódás folyamatának *in vitro* reprodukciójához állatkísérletek, főként egereken végzett tanulmányok szolgáltak. A béta-sejttömeg kialakulásának négy jól elkülönülő fázisa ismert egereknél. Az embrionális élet első 13 napja során, a fejlődő bélcsatorna endodermális sejteiből tasakszerűen kiboltosuló dorsalis és ventralis pancreas telepben először kevés endocrin sejt jelenik meg, melyek glukagon és inzulin pozitívak egyszerre. A második szakaszban, az embrionális élet 13-18. napja között, a Ngn3 transzkripciós faktor (neurogenin 3) expressziójának hatására a tubularis (ductalis) progenitor sejtekből jelentős béta-sejt neogenesis indul, ezzel párhuzamosan az exocrin funkciójú acinaris sejtek differenciálódása is felgyorsul. Ebben az időszakban a Pdx1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) és a NeuroD1 (neurogenic differentiation 1) transzkripciós faktorok expressziója jellemzi a béta-sejteket. A harmadik szakaszban, mely közvetlenül a születés előtti időszaktól a postnatalis élet első néhány hetéig tart, szignifikáns béta-sejt proliferáció figyelhető meg. Hasonló béta-sejt expanszió újszülötteknél is leírt jelenség. A béta-sejtek érése is erre az időszakra tehető, melynek lényege a regulált, glukóz-stimulusra adott inzulinszekréciós válasz megjelenése. A MafA transzkripciós faktor (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A) ekkortól jelenik meg specifikusan a béta-sejtekben. A béta-sejtek életének negyedik szakasza felnőttkorra tehető, melynek során metabolikus igénynek megfelelően történik a béta-sejt expanszió. Ez a fázis nem jól karakterizált, a folyamatot irányító szignálok és a béta-sejtek eredete nem jól ismert. Legújabb kutatási eredmények szerint, egerekben a béta-sejt proliferáció osztódással valósul meg, míg emberi pancreasban a ductalis sejtekből történő neogenesis és a meglévő béta-sejtek osztódása egyforma jelentőséggel bír.

A béta-sejt élete során a transzkripciós faktorok szabályozó szerepe kettős: az endocrin differenciáció folyamatának meghatározása, majd az érett béta-sejt fenotípus fenntartása a feladatuk. Regulált megjelenésük rendkívül fontos, ugyanis specifikus transzkripciós faktorok genetikai kiütése állatmodellekben szinte kivétel nélkül diabeteses fenotípust hozott létre. Ezen béta-sejt transzkripciós faktorok mutációi emberben ritka diabetes altípust, a MODY különböző variációit idézik elő (maturity onset diabetes in young, családi halmozódású, monogénes öröklődésű 2-es típusú diabeteshez hasonlító kórkép). Patológias körülmények között, például krónikus glukotoxicitás esetén a béta-sejtek diszfunkciója jelentkezik, melyet elégtelen inzulin elválasztás jellemez. Ennek hátterében korábbi tanulmányok számos béta-sejt metabolizmusban fontos szerepet játszó gén alacsonyabb expresszióját, valamint a MafA transzkripciós faktor csökkentett szintjét írták le. Mindezek alapján a diabetes pathomechanizmusának feltárásában transzkripciós faktorok tanulmányozása kiemelt szereppel bír, és reálisnak tűnik az a feltételezés, hogy béta-sejt specifikus transzkripciós faktorok expresszióját befolyásoló molekulák diabetes elleni gyógyszerfejlesztések alapjai lehetnek.

A béta-sejtek glukóz-stimulusra inzulinszekréciós válasszal reagálnak, és fiziológias körülmények között a vércukorszintet normális tartományban tartják. Az érett béta-sejtekben az inzulin gén átíródását a Pdx1, NeuroD1 és MafA transzkripciós faktorok együttesen szabályozzák. Az inzulinszekréciós válasz egy igen gyors és precízen szabályozott folyamat, melynek előfeltétele a béta-sejtekben specializált metabolikus utak működése (1. ábra). A vércukorszint emelkedésével a béta-sejtekbe jutó glukóz a glikolízis és a Krebs-ciklus során lebomlik, ATP-képződéshez vezet, mely az ATP-szenzitív K-csatornák záródását idézi elő, depolarizáció jön létre, majd a Ca-csatornák nyitásával, a preformált inzulingranulumok szekréciója következik be. A glukóz-stimulált inzulinszekréció finom szabályozását a béta-sejtben számos metabolikus út más sejtektől eltérő expressziója biztosítja. A

laktátprodukción hiánya biztosítja, hogy a glukóz lebontása során képződő piruvát mind ATP-képzésre fordítódik. A mitokondriális membránon keresztül zajlik a glikolízis során képződött redukáló ekvivalensek transzportja, ezen transzporterek és enzimek működése bizonyítottan nagy szerepet játszik a glukóz-stimulált inzulinszekréció folyamatában. A piruvátkarboxiláz magas expressziós szintje az anaplerotikus folyamatok jelentőségét bizonyítja béta-sejtekben.



1. ábra: A glukóz-stimulált inzulinszekréció molekuláris mechanizmusa. A folyamat részletes ismertetése a szövegben található. Rövidítések: glu: glukóz, GLUT2: glukóz transzporter, $\Delta\Psi$: membrán depolarizáció.

A béta-sejtek metabolikus folyamatai érett, egészséges sejtekben tehát jól karakterizáltak, azonban az éretlen, glukózra nem reagáló, neonatális béta-sejtek metabolizmusa kevésbé ismert. Hasonló módon hiányosak ismereteink a diabeteses béta-sejtek metabolizmusának szabályozásáról. Látszólag az éretlen, neonatális béta-sejtek, valamint a diabeteses béta-sejtek nagyon eltérőek, azonban fenotípusuk megegyező: glukóz-stimulusra nem reagálnak megfelelő inzulinszekrécióval. Kutatómunkám során a béta-sejt fenotípusának

(éretlen – érett – diabeteses) változásaival, és az ennek háttérében álló metabolikus gének és transzkripciós faktorok expressziójának alakulásával foglalkoztam.

Célkitűzések

PhD dolgozatom átfogó célja a változó béta-sejt fenotípus molekuláris karakterizálása. A béta-sejteket jellemezni kívánom az éretlen neonatalis sejttypustól, az érett glukóz-stimulusra inzulinszekrécióval reagáló sejteken át, a glukotoxicitás által sújtott, diszfunkcionális béta-sejtekig.

1. Cél: A neonatalis béta-sejtek fenotípusának karakterizálása; az éretlen, glukóz-stimulusra elégtelen inzulinszekréció háttérében álló mechanizmusok feltárása

A béta-sejt értelenség háttérében komplex mechanizmust feltételezve microarray módszert használtunk, hogy a lézeres mikrodisszekcióval izolált neonatalis (1 napos) és felnőtt (6 hetes) patkány béta-sejtek génexpressziós mintázatát összehasonlítsuk. Az eltérő expressziójának talált géneket később kvantitatív, valós-idejű PCR módszerrel, és immunohisztokémiai festéssel is megerősítettük. Ezt követően leírtuk az expressziós mintázat alakulását a postnatalis élet első hetei során, amikor a béta-sejtek érése zajlik.

2. Cél: MafA és/vagy Pdx1 transzkripciós faktorok szerepének karakterizálása a neonatalis, éretlen béta-sejtek érésében, a glukóz-stimulált inzulinszekréció kialakulásában.

A MafA és a Pdx1 transzkripciós faktorokon kívül számos béta-sejt metabolizmus szempontjából fontos gén expressziójának alakulását tanulmányoztuk a postnatalis élet első 4 hete során patkányokban. Hipotézisünk szerint a MafA és a Pdx1 expressziójának növelésével a glukóz-stimulált inzulinszekréció kialakulása elősegíthető/felgyorsítható.

3. Cél: MafA transzkripció faktor szerepének meghatározása a felnőtt, érett béta-sejtekben.

Feltevésünk szerint direkt összefüggés van a MafA expressziós szint és az érett béta-sejtek funkciója között. Célunk volt az inzulinon kívül további MafA transzkripció faktor által szabályozott gének leírása.

4. Cél: MafA transzkripció faktor szerepének meghatározása a diszfunkcionális béta-sejtekben.

Irodalmi adatokból ismert, hogy a MafA szintje alacsonyabb a glukotoxicitásnak kitett, glukózza nem vagy gyengén reagáló, diszfunkcionális béta-sejtekben. Megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy diabeteses modellben MafA expresszió növelésével visszaállítható-e a glukóz-stimulált inzulinszekréció.

Módszerek

1. Állatkísérletek

Vizsgálataimhoz felnőtt hím és nőstény Sprague-Dawley patkányokat, valamint a neonatalis béta-sejt tanulmányokhoz vemhes nőstények utódait használtam, melyeket az ellést követő 1. naptól kezdve vizsgáltam. Diabeteses állatmodellként Goto-Kakizaki patkányokat, valamint kontrollként nemben és korban illesztett Wistar-Kyoto patkányokat használtam. Valamennyi állatot a Taconic Farms (Germantown, NY) cég tenyésztette. A kísérleti protokollt a Joslin Diabetes Center intézeti etikai bizottsága jóváhagyta. Az állatokat Nembutallal történő általános érzéstelenítést követően műtöttük. Immunohisztokémiai vizsgálatokhoz a frissen kimetszett pancreast paraformaldehidben fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. A lézeres mikrodisszekcióhoz TissueTek OCT mediumban történő fixálást alkalmaztunk. A Langerhans-szigetek izolálásához Gotoh és munkatársai által 1987-ben publikált kollagenáz emésztésen és grádiens szeparáláson alapuló módszert alkalmaztunk.

2. Lézeres mikrodisszekció

Fagyasztott pancreas metszetekből a Langerhans-szigetek béta-sejt gazdag centralis régióit izoláltuk PixCell II LCM mikroszkóppal (Arcturus, Mountain View, CA). A lézersugár segítségével mintánként 10-20 szeletből, szeletenként 2-5 szigetből vágtuk ki a béta-sejteket, melyekből RNS izoláltunk, majd amplifikáltunk a microarray elvégzéséhez.

3. Microarray hibridizáció

Négy felnőtt és négy neonatalis patkányból származó, lézeres mikrodisszekcióval izolált, RNS-ből készült biotinilált cDNS mintát hibridizáltattunk Affymetrix GeneChip Rat Genome U34A chiphez (Affymetrix, Sanata Clara, CA). A chip analízishez DNA-Chip Analyzer szoftvert használtunk (Harvard School of Public Health, Boston, MA). Alsó konfidencia határértékek, és a p-értékek alapján elemeztük az eltérően expresszálódó géneket neonatalis és felnőtt patkányokban. A gének funkcionális csoportosításához a DAVID programot használtuk.

4. Adenovírus infekciók

Transzkripciós faktorok béta-sejtekben történő irányított expressziójához rekombináns adenovírusokat hoztunk létre az AdEasy rendszer segítségével (Stratagene, La Jolla, CA). A következő vírusokat használtam vizsgálataim során: AdMafA, mely a teljes humán MafA kódoló szekvenciát tartalmazza; AdDN-MafA, mely egy domináns-negatív MafA mutáns fehérjét kódol, az N-terminális transzkripciót aktiváló domén hiányával; AdNeuroD1, mely a hörcsög NeuroD1 kódoló szekvenciát tartalmazza; valamint AdGFP, mely a GFP zöld fluoreszcens proteint kódoló szekvenciát tartalmazza, és kontrollként szolgált a kísérletek során. Az AdPdx1 vírust Dr. Melton kutatócsoportjától kaptuk. A vírusokat Ad293 sejtekben amplifikáltam, és Vivapure AdenoPACK 100 kittel izoláltam (Sartorius, Gottingen), majd plak formációs képesség alapján határoztam meg a vírustitereteket. A béta-sejtek fertőzéséhez a

patkányból izolált szigeteket először egyedülálló sejtekké diszpergáltam tripszines emésztéssel, hogy egyenletes fertőzést biztosítsak, majd egy éjszakán át tartó vírusinfekciót követően reaggregáltattam a sejteket.

5. RNS izolálás és reverz transzkripció

Izolált Langerhans-szigetektől és diszpergált, majd reaggregált, vírusinfektált szigetsejtekből RNS-t az RNeasy Plus Mini Kit segítségével izoláltam (Qiagen, Germantown, MD). Ezt követően a cDNS előállításához Superscript II reverz transzkriptázt használtam (Invitrogen, Carlsbad, CA).

6. Kvantitatív valós idejű polimeráz lánreakció (qPCR)

A qPCR kísérletek során a SYBR Green detektálási módszert használtam, ABI7300 Real-time PCR gépet alkalmazva (Applied Biosystems, Foster City, CA). A reakcióhoz szükséges primereket Primer Express programmal terveztem. Komparatív C_T (küszöbciklus) metódust alkalmaztam a relatív génexpresszió számítására, normalizáláshoz riboszomális géneket (S25, L32) használtam.

7. *In vitro* inzulinszekréció

Adenovírus infekciót követően reaggregáltatott szigetsejtek inzulinszekréció kapacitását vizsgáltam. Az aggregátumokat kezdetben alacsony (2,8mM), majd magas (16,7mM) glukóz koncentrációjú Krebs-Ringer bikarbonát oldatban inkubáltam, és a felülúszóba szekretált inzulin mennyiségét mértem ELISA módszerrel (Insulin Rat EIA kit, Alpcó, Salem, NH).

8. *In vivo* inzulinszekréció: intra-peritonealis glukóz tolerancia teszt (IPGTT)

Az IPGTT tesztet megelőzően a patkányok egy éjszakát éheztek, majd intraperitonealisan 10%-os glukóz oldatot injektáltam 2 g/kg dózisban. A farokvénából sorozatos vércukorérték meghatározásokat

végeztem 2 órán keresztül fél óránként, OneTouch Ultra vércukormérőt használva (LifeScan, Milpitas, CA).

9. Western Blot

Fehérje mennyiségi meghatározásokhoz Western Blot analízist használtam. AdMafA és AdDN-MafA infekciót követően, a szonikációval destruált szigetsejt aggregátumokból, merkaptotanol jelenlétében, hővel kicsapott fehérjekoncentrátumot SDS-PAGE elektroforézissel futattam meg, majd PVDF membránra transzferáltam, és MafA (Nishimura és mtsai által fejlesztett antitest) ill. HSV antitesttel (Abcam, Cambridge, MA) detektáltam (a DN-MafA-val fertőzött sejtekben a víruskonstrukcióban jelenlévő HSV jelölés is expresszáldott). Másodlagos antitestként tormaperoxidázzal konjugált antitestet használtam, majd kemilumineszcencia alapján detektáltam a fehérjemennyiséget (SuperSignal West Dura reagens, Thermo Fisher, Waltham, MA).

10. Immunohisztokémia

Paraffinba ágyazott pancreas metszeteket általános immunohisztokémiai protokollt követve festettem meg piruvát-kináz és glicerín-3-foszfát-dehidrogenáz ellenes antitesttel (US Biological, Swampscott, MA és Dr. M. MacDonald által fejlesztett antitestek). Második lépésként biotin-streptavidin reakción alapuló amplifikációt alkalmaztam, majd a fehérjemennyiséget a piruvát-kináz esetében peroxidáz enzimreakción alapuló módszerrel, a glicerín-3-foszfát-dehidrogenáz esetében pedig fluoreszcens módszerrel detektáltam. További kísérletek során anti-inzulin ill. nem béta-sejt hormon ellenes koktél antitesteket használtam, a Goto-Kakizaki és Wistar patkány Langerhans-szigetek béta-sejt mennyiségének meghatározására. A szövettani metszetekről felvételeket Olympus BH2 és Zeiss 710 LSM mikroszkópokkal készítettem.

11. Statisztikai elemzés

Két csoport összehasonlításához Student-féle t próbát alkalmaztam, több csoport összehasonlítására ANOVA tesztet használtam, Tukey-

féle post hoc teszttel kiegészítve. Szignifikancia szintet 0.050-nek határoztam meg.

Eredmények

A neonatális és az érett béta-sejtek génexpressziós mintázata eltérő, számos, az inzulinszekrécióban szerepet játszó metabolikus enzim szintje alacsonyabb neonatális korban.

Kutatásaim első fázisában az éretlen, neonatális béta-sejtek génexpressziós mintázatát tanulmányoztam. Korábban az irodalomban több közlemény foglalkozott a neonatális béta-sejtekben egy-egy alacsonyabban expresszáldó génnel, azonban hipotézisünk szerint a glukóz-stimulusra adott elégtelen inzulinszekréciós válasz hátterében egy komplexebb génexpressziós mintázat áll. Microarray módszerrel összehasonlítottam a neonatális, éretlen és a felnőtt, érett béta-sejtek génexpressziós profilját patkányból izolált Langerhans-szigeteken. Eredményeim szerint számos béta-sejtre karakterisztikus enzim (piruvátkarboxiláz, GLP1-receptor, mitokondriális membránon keresztüli redukáló ekvivalens transzportban szerepet játszó enzimek, pl. malátdehidrogenáz, glicerin-3-dehidrogenáz, almaenzim) mRNS-e szignifikánsan alacsonyabban expresszáldik neonatális korban, mely magyarázatul szolgálhat az elégtelen glukóz-stimulált inzulinszekrécióra ebben az életkorban. Az eredményeket valós idejű PCR módszerrel megerősítettem, majd immunohisztokémiai festéssel fehérjeszinten is bizonyítottam az eltérő expressziót néhány metabolikus enzim esetében (piruvát-kináz, glicerin-3P-dehidrogenáz). A patkány béta-sejtek érését követve az élet első 4 hetében a vizsgált fehérjék expressziós szintje fokozatosan emelkedik, a glukóz-stimulált inzulinszekréció megjelenésével párhuzamban.

Transzkripciós faktorok szintjeinek változása a neonatális időszakban. A MafA indukciós szerepe az inzulinszekréció kialakulásában.

A génextpressziós mintázat összehangolt változása a neonatalis időszakban egy vagy akár több regulátor-fehérje működését feltételezi. Az ismert béta-sejt specifikus, inzulingént szabályozó transzkripciós faktorok közül tanulmányoztam a Pdx1, NeuroD1 ill. a MafA mRNS szintek alakulását, valamint összehasonlítottam ezeket a vizsgált metabolikus enzimek és az inzulin expressziós mintázatával a patkányok első 4 élethete során. A Pdx1, a NeuroD1 és a MafA glukóz által szabályozott transzkripciós faktorok, a Pdx1 a korai, a NeuroD1 a késői endokrin differenciációban játszik szerepet, míg a MafA hipotézisünk szerint a béta-sejtek érésének, valamint az inzulinszintézis és -szekréció folyamatának regulátora. A vizsgált gének közül a MafA expressziós mintázata hasonlított legjobban a metabolikus enzimekére, mely tehát életkorral fokozatosan növekvő tendenciát mutatott. Ezt követően a MafA fehérje szinteket Western blot analízissel vizsgáltam, és igazoltam, hogy a postnatalis 1. napon igen alacsony szinten detektálható MafA fehérje szintje a 10. életnapra jelentősen emelkedik, de még mindig nem éri el a felnőttkorban mérhető szinteket. Kísérleteim második szakaszának eredményei szerint, a 2. életnapos patkány szigetsejtekben az exogén módon, adenovírus infekció segítségével bejuttatott MafA kifejeződése fontos metabolikus enzimek indukciójához vezet. Mindemellett a MafA bejuttatásával a glukóz-stimulált inzulinszekréciós válasz szignifikánsan növekedik a kontroll neonatális sejtekben mértékhez képest. Ezzel szemben az exogén módon bejuttatott, magas szinten expresszált Pdx1 nincs hatással az inzulinszekréció alakulására. Mindezek alapján bizonyítottnak tűnik, hogy a béta-sejtérés MafA-expresszióval meggyorsítható.

MafA transzkripciós faktor regulációs szerepe felnőtt, érett béta-sejtekben.

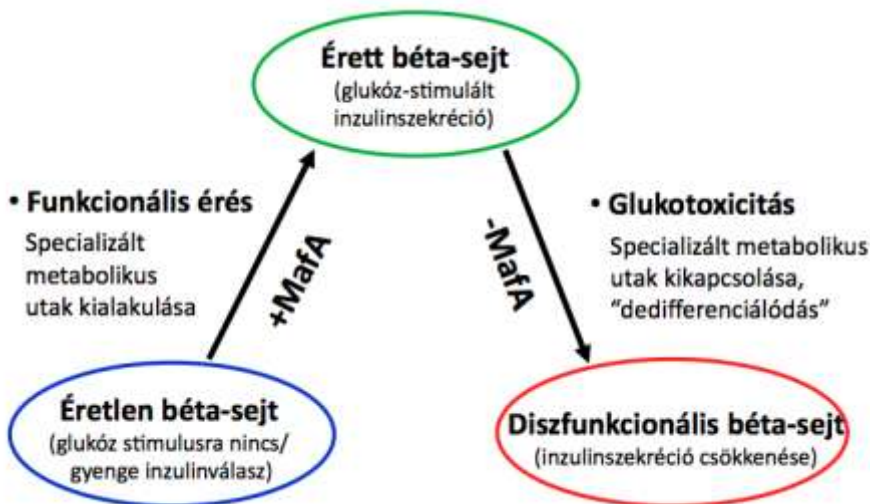
Kísérleteim harmadik szakaszában a MafA regulációs szerepének megismerését tűztem ki célul, ill. arra kerestem választ, hogy mi történik, ha az érett béta-sejtekben meggátoljuk a MafA működését. A MafA-funkciót szelektíven kikapcsoltam egy "domináns negatív" MafA konstrukcióval (DN-MafA), mely egy MafA mutáns fehérjét

kódol, az N-terminális transzkripciót aktiváló domén hiányával. A DN-MafA a sejtekben jutva az endogén MafA-hoz kapcsolódik, és meggátolja annak transzkripciós aktivitását. A DN-MafA-t ezúttal is adenovírus segítségével juttattam be a patkány pancreasból izolált primer béta-sejtekbe. A DN-MafA-val történő infekciót követően az endogén MafA mRNS- és fehérjeszint közel 10%-ra csökkent a kontroll béta-sejtekhez képest, mely a MafA autoregulációs folyamataira utal. Az alacsony MafA-szint számos metabolikus enzim, béta-sejt specifikus gén és egyéb transzkripciós faktor expressziójának változását eredményezte. A génexpressziós változásokat 72 órán át követtem, melynek során többek között a glukokináz, a GLUT2 glukóztranszporter, az inzulin, a PCSK enzim, a GLP1- receptor és a Kir6.2 káliumcsatorna, valamint a redukáló ekvivalens transzportban résztvevő enzimek mRNS szintje szignifikánsan csökkent. Az érett béta-sejtben gyakorlatilag hiányzó laktátdehidrogenáz enzim mRNS-szintje viszont szignifikánsan megemelkedett a DN-MafA infekciót követően. Funkcionális vizsgálatok szerint már a DN-MafA infekciót követő 36. órában csökken a glukóz-stimulált inzulinszekréción válasz, mely időpont egybe esik a béta-sejtfunkció szempontjából fontos gének expressziójának csökkenésével. Eredményeim szerint a béta-sejtek a MafA kikapcsolásával egy éretlenebb állapotba jutnak, mintegy dedifferenciálódnak, a neonatális, értelen sejtekhez hasonló fenotípust vesznek fel.

MafA transzkripciós faktor bejuttatásával a diszfunkcionális, diabeteses béta-sejtek glukóz-stimulált inzulinszekréciónja növelhető.

Az irodalomból ismert, hogy a krónikus hyperglykaemia, mint a diabetesre jellemző patológiás állapot is a fentiekhez hasonló átalakulást, dedifferenciálódást eredményez béta-sejtekben. A diabeteses béta-sejtek glukóz-stimulált inzulinszekréciónja károsodott. Egy nemrégiben megjelent közlemény szerint, állatkísérletes modellen a hyperglykaemia hatására a MafA expressziós szintje is csökken a béta-sejtekben. Mindezek alapján kísérleteim negyedik

részében arra kerestem választ, hogy diabeteses patkányokból izolált, alulműködő béta-sejteken a MafA-expresszió növelésével javítható-e a glukóz-stimulált inzulinszekréció. A vizsgálatokhoz a Goto-Kakizaki patkánytörzset használtam, mely a spontán kialakuló 2-es típusú diabetes állatmodellje. Az adenovírus infekció segítségével bejuttatott MafA az inzulinszekréciós választ várakozásainknak megfelelően 48-72 órán belül javította.



2. ábra: Béta-sejt fenotípus változása. Éretlen béta-sejtekből a MafA-expresszió fokozódásával a glukóz-stimulált inzulinszekréció megjelenik. Glukotoxicitás hatására a MafA-expresszió csökken, ezzel párhuzamosan az érett béta-sejtek specializáltsága megszűnik, mely az inzulinszekréció elégtelenségét okozza.

Következtetések

Eredményeimet összefoglalva megállapítható, hogy az alacsony MafA-szint számos fontos béta-sejt génexpressziójának csökkenésével és a glukóz-stimulált inzulinszekréció gátlásával jár. Ez az állapot jellemzi a neonatális, éretlen, valamint a diabeteses, dedifferenciálódott béta-sejteket (2. ábra). A MafA-funkció helyreállításával az inzulinszekréciós válasz javul. A MafA transzkripciós faktor tehát az inzulingén szabályozásán túl számos

fontos béta-sejt génexpresszióját határozza meg direkt vagy indirekt módon, ezért a MafA jelenléte elengedhetetlen az érett béta-sejtek működéséhez, a fiziológias glukóz-stimulált inzulinszekréciónak.

A MafA transzkripciós faktor potenciálisan gyógyszerfejlesztések célpontja lehet, ugyanis egy MafA-expressziót vagy fehérjestabilitást fokozó hatóanyag a 2-es típusú diabetesben szenvedő betegekben a béta-sejt dedifferenciációt megelőzheti, és javíthatja az inzulinszekréciónak kapacitást.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezésben felhasznált nemzetközi közlemények

Jermendy Á, Toschi E, Aye T, Koh A, Aguayo-Mazzucato C, Sharma A, Weir GC, Sgroi D, Bonner-Weir. Neonatal beta cells lack the specialized metabolic phenotype of mature beta cells. *Diabetologia* 2011; 54:594-604.

IF: 6,814

Aguayo-Mazzucato C, Koh A, El Khattabi I, Li WC, Toschi E, **Jermendy Á**, Juhl K, Mao K, Weir GC, Sharma A, Bonner-Weir S. Mafa expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells. *Diabetologia*. 2011; 54:583-93.

IF: 6,814

További közlemények

Molvarec A, **Jermendy Á**, Kovács M, Prohászka Z, Rigó J Jr. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and preeclampsia: lack of association in a Caucasian population. *Hypertens Res* 2008; 31: 859-64.

IF: 3,146

Molvarec A, **Jermendy Á**, Nagy B, Kovács M, Várkonyi T, Hupuczi P, Prohászka Z, Rigó J Jr. Association between tumor necrosis factor (TNF)-alpha G-308A gene polymorphism and preeclampsia complicated by severe fetal growth restriction. Clin Chim Acta 2008; 392: 52-7.

IF: 2,960

Jermendy A, Körner A, Kovács M, Kaszás E, Balázsovics J, Szócs A, Madácsy L, Cseh K. A Toll-like receptor polymorfizmusainak hatása a tumornekrózis faktor- α és szolúbilis receptorainak szintjére elhízott gyermekekben és serdülőkben. Diabetologia Hungarica 2009; 3: 241-248.

Lukács K, Szatmári I, **Jermendy Á**, Krikovszky D, Körner A, Pánczél P, Madacsy L, Hermann R: A PTPN22 gén C1858T és az inzulin gén régió -23HphI polimorfizmusának összefüggése az 1-es típusú diabetezzel magyar populációban. Gyermekgyógyászat 2009; 60: 42-47.

Jermendy Á, Szatmári I, Laine AP, Lukács K, Horváth KH, Körner A, Madácsy L, Veijola R, Simell O, Knip M, Ilonen J, Hermann R. The interferon-induced helicase IFIH1 Ala946Thr polymorphism is associated with type 1 diabetes in both the high-incidence Finnish and the medium-incidence Hungarian populations. Diabetologia 2010; 53: 98-102.

IF: 6,973

Jermendy Á, Körner, Kovács M, Kaszás E, Balázsovics J, Szócs A, Madácsy L, Cseh K. Association between toll-like receptor polymorphisms and serum levels of tumor necrosis factor- α and its soluble receptors in obese children. Med Sci Monit 2010; 16: 180-185.

IF: 1,699

Jermendy Á, Körner A, Kovács M, Madácsy L, Cseh K. PPAR- γ 2

Pro12Ala polymorphism is associated with post-challenge abnormalities of glucose homeostasis in children and adolescents with obesity. *J Pediatr Endocr Met* 2011; 24: 55–59.

IF: 0,875

Jermendy Á, Körner A, Kovács M, Cseh K, Madácsy L: A PPAR- γ Pro12Ala polimorfizmus összefüggése a glükóz-homeosztázissal elhízott gyermekek és serdülők körében. *Gyermekgyógyászat* 2012; 4: 147-151.

Cavelti-Weder C, Shtessel M, Reuss JE, **Jermendy Á**, Yamada T, Caballero F, Bonner-Weir S, Weir GC. Pancreatic duct ligation after almost complete β -cell loss: exocrine regeneration but no evidence of β -cell regeneration. *Endocrinology* 2013; 154: 4493-4502.

IF: 4,717