

A prereceptorális kortizoltermelést befolyásoló tényezők

Doktori értekezés

Szelényi Péter

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Csala Miklós egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Szücs Nikolette egyetemi adjunktus, PhD.

Dr. Veres Balázs egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tretter László egyetemi tanár, Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Gróf Pál egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Monostory Katalin tud. főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2014

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----|
| Ábrák jegyzéke | 5 |
| Táblázatok jegyzéke | 6 |
| Rövidítések jegyzéke | 7 |
| 1. Bevezetés | 9 |
| 1.1. Elhízás - metabolikus szindróma - cukorbetegség..... | 9 |
| 1.2. Táplálkozási tényezők..... | 11 |
| 1.2.1. Fruktóz | 12 |
| 1.2.2. Tea..... | 14 |
| 1.2.2.1. Katekinek | 15 |
| 1.3. Kortizolhatás, Cushing-szindróma..... | 16 |
| 1.4. Perifériás kortizolciklus | 17 |
| 1.4.1. 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenázok | 18 |
| 1.5. Az endoplazmás retikulum tápanyagszenzor funkciója..... | 19 |
| 1.6. Prereceptorális kortizoltermelés és metabolikus szindróma | 20 |
| 1.7. A lokális kortizoltermelés mint gyógyszerátadáspont | 21 |
| 2. Célkitűzések | 22 |
| 3. Módszerek | 23 |
| 3.1. Mikroszómapreparálás..... | 23 |
| 3.2. Glukóztermelés | 24 |
| 3.3. Mikroszomális kortizon-kortizol átalakulás | 24 |
| 3.4. H6P-izomeráz aktivitás..... | 24 |

| | |
|---|----|
| 3.5. Mikroszomális fruktóz-6-foszfát-transzport | 25 |
| 3.6. Myc „tag”-gel jelölt H6PD affinitás tisztítása | 25 |
| 3.7. Immunoblot..... | 26 |
| 3.8. Folyadékkromatográfiás vizsgálatok | 26 |
| 3.9. Dehidrogenáz aktivitások fluoreszcens detektálása..... | 27 |
| 3.10. Endogén redukáló/oxidáló kapacitás mérése | 28 |
| 3.11. Lipidperoxidáció mérése..... | 28 |
| 3.12. Statisztikai analízis | 28 |
| 4. Eredmények..... | 29 |
| 4.1. F6P metabolizmusa az endoplazmás retikulumban | 29 |
| 4.1.1. F6P-függő glukóz- és kortizoltermelés máj mikroszómában..... | 29 |
| 4.1.2. F6P-ból kiinduló glukóztermelés máj mikroszómában..... | 30 |
| 4.1.3. F6P-függő NADPH- és 6-fosfo-glukonát-termelés máj- és zsírszövetből izolált mikroszómában | 32 |
| 4.1.4. Mikroszomális hexóz-6-foszfát izomeráz | 34 |
| 4.1.5. F6P-transzport a mikroszomális membránon keresztül | 36 |
| 4.1.6. A mikroszomális hexóz-foszfát-izomeráz vizsgálata HEK-293 sejtekben.... | 39 |
| 4.1.6.1. A F6P nem szubsztátja a H6PD enzimnek | 39 |
| 4.1.6.2. A F6P-G6P izomerizációt nem a H6PD katalizálja | 40 |
| 4.1.6.3. Önálló, mikroszomális hexóz-foszfát-izomeráz aktivitás | 41 |
| 4.1.6.4. pH-érzékenység..... | 42 |
| 4.2. EGCG | 44 |
| 4.2.1. EGCG koncentrációfüggő gátló hatása a mikroszomális kortizoltermelésre | 44 |

| | |
|--|----|
| 4.2.2. EGCG hatása a G6PT-H6PD-11 β HSD1 katalitikus triád fehérjekomponenseire | 45 |
| 4.2.3. A lúminális redox állapot eltolódása EGCG-kezelt mikroszómában | 48 |
| 4.2.4. EGCG hatása a mikroszóma lipidperoxidációjára | 51 |
| 5. Megbeszélés | 52 |
| 5.1. Az endoplazás retikulum szerepe metabolikus betegségekben | 52 |
| 5.2. F6P mint a preredeptoriális glukokortikoid-aktiválódás redukáló forrása..... | 54 |
| 5.3. EGCG hatása a szöveti kortizon-kortizol egyensúlyra | 57 |
| 5.4. Az endoplazmás retikulum piridin-nukleotid redox rendszere mint lehetséges gyógyszertámadáspont..... | 60 |
| 6. Következtetések..... | 62 |
| 7. Összefoglalás | 64 |
| 8. Summary..... | 65 |
| 9. Irodalomjegyzék | 66 |
| 10. Saját közlemények jegyzéke..... | 83 |
| 10.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények | 83 |
| 10.2. A disszertációtól független közlemények | 83 |
| Köszönetnyilvánítás | 84 |

Ábrák jegyzéke

| | |
|---|----|
| 1. ábra <i>A diabétesz becsült elterjedése világszerte 2025-re [2]</i> | 9 |
| 2. ábra <i>Cukorfogyasztás növekedése 1700-1978 az Egyesült Királyságban és 1975-2000 az Egyesült Államokban (kék), összevetve az elhízás gyakoriságával az USA-ban (piros) [7]</i> | 11 |
| 3. ábra <i>A fruktóz lebontása</i> | 13 |
| 4. ábra <i>A G6PT-H6PD-11βHSD1 katalitikus triád működése</i> | 19 |
| 5. ábra <i>G6P-ból (A, C), illetve F6P-ból (B, D) kiinduló NADPH termelés máj- (A, B) és zsírszövet (C, D) eredetű mikroszómában, F1,6BP nélkül (–), illetve annak jelenlétében (+)</i> | 33 |
| 6. ábra <i>F6P-függő 6PG termelés máj- (A), illetve zsírszövetből (B) izolált mikroszómában</i> | 34 |
| 7. ábra <i>F6P-G6P izomerizáció máj- (A), illetve zsírszövetből (B) izolált, permeabilizált mikroszómában F1,6BP nélkül (–), illetve annak jelenlétében (+)</i> | 35 |
| 8. ábra <i>F6P-G6P izomerizáció máj- (A), illetve zsírszövetből (B) izolált, intakt mikroszómában</i> | 36 |
| 9. ábra <i>F6P (A) és G6P (B) transzportja a mikroszomális membránon keresztül máj-, illetve zsírszövetből izolált mikroszóma lumenébe</i> | 37 |
| 10. ábra <i>F6P és G6P transzportjának gátlása</i> | 38 |
| 11. ábra <i>H6PD aktivitása NADP⁺ koenzim, ill. G6P, vagy F6P szubsztrát jelenlétében</i> | 39 |
| 12. ábra <i>Bakteriális G6PD NADH termelése G6P, vagy F6P szubsztrátok mellett, H6PD jelenlétében</i> | 40 |
| 13. ábra <i>PGI immunoblot</i> | 41 |

| | |
|---|----|
| 14. ábra <i>Sejtfrakciók hexóz-foszfát izomeráz aktivitásának gátlása E4P segítségével ..</i> | 42 |
| 15. ábra <i>Sejtfrakciók hexóz-foszfát izomeráz aktivitásának gátlása F1,6BP segítségével</i> | 43 |
| 16. ábra <i>pH-érzékenység.....</i> | 43 |
| 17. ábra <i>EGCG hatása a kortizoltermelésre intakt máj mikroszómában</i> | 44 |
| 18. ábra <i>EGCG hatása a H6PD aktivitására patkány májból izolált mikroszómában ..</i> | 45 |
| 19. ábra <i>EGCG hatása a 11βHSD1 aktivitására (fluoreszcencia)</i> | 46 |
| 20. ábra <i>EGCG hatása a 11βHSD1 aktivitására (HPLC)</i> | 47 |
| 21. ábra <i>EGCG hatása a máj mikroszóma endogén redukáló-oxidáló kapacitására</i> | 48 |
| 22. ábra <i>EGCG hatása a mikroszóma lumenális NADPH-készletére</i> | 50 |
| 23. ábra <i>Metirapon hatása a mikroszóma lumenális NADPH-készletére</i> | 50 |
| 24. ábra <i>EGCG hatása tiobarbiturát reaktív anyagok keletkezésére</i> | 51 |
| 25. ábra <i>A kortizol prerreceptorális aktiválódását befolyásoló tényezők</i> | 56 |
| 26. ábra <i>Az EGCG szerepe a szövetek közti kortizon-kortizol ciklus helyreállításában</i> | 61 |

Táblázatok jegyzéke

| | |
|---|----|
| 1. táblázat <i>Kortizon-kortizol átalakulás intakt mikroszómában</i> | 30 |
| 2. táblázat <i>Intakt, ill. permeabilizált mikroszóma glukóztermelése.....</i> | 31 |

Rövidítések jegyzéke

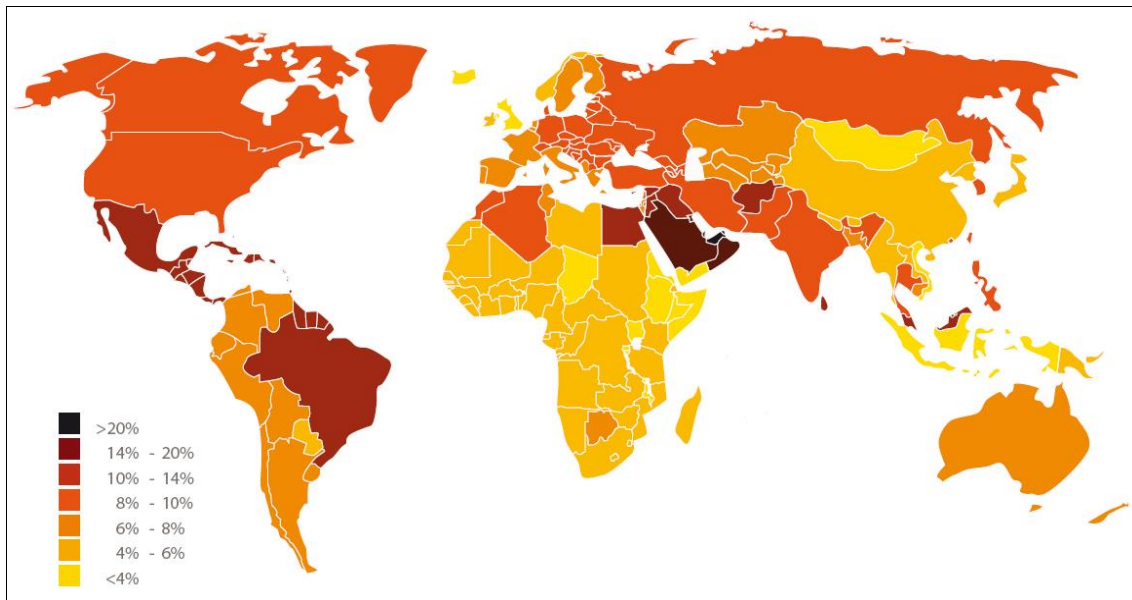
| | |
|-----------------|--|
| 11 β HSD1 | 1-es típusú 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz |
| 11 β HSD2 | 2-es típusú 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz |
| 6PG | 6-foszfo-glukonát |
| 6PGD | 6-foszfo-glukonát dehidrogenáz |
| BMI | testtömegindex (<i>body mass index</i>) |
| DIDS | 4,4-diizocianát-sztilbén-2,2-diszulfonsav (<i>anion-permeabilitás gátlószer</i>) |
| E4P | eritróz-4-foszfát |
| EDTA | etilén-diamin-tetraecetsav |
| EGTA | etilén-glikol-tetraecetsav |
| EGCG | epigallokatekin-3-gallát |
| F1,6BP | fruktóz-1,6-biszfoszfát |
| F6P | fruktóz-6-foszfát |
| G1P | glukóz-1-foszfát |
| G6P | glukóz-6-foszfát |
| G6PD | glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz |
| G6PT | glukóz-6-foszfát-transzporter |
| GLUT | glukóz-transzporter |
| GPT | glukóz-foszfát-transzporter |
| H6PD | hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz |
| HDL | nagy sűrűségű lipoprotein (<i>high-density lipoprotein</i>) |
| HEK-293 | humán embrionális veséből izolált sejtvonal (<i>Human Embryonic Kidney 293</i>) |
| HEPES | 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav |

| | |
|-------------------|--|
| HPLC | nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (<i>high performance liquid chromatography</i>) |
| HRP | torma-peroxidáz enzim (<i>horseradish peroxidase</i>) |
| MOPS | 3-N-morforlin-propánszulfonsav |
| NAD ⁺ | nikotinamid-adenin-dinukleotid (oxidált) |
| NADH | nikotinamid-adenin-dinukleotid (redukált) |
| NADP ⁺ | nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (oxidált) |
| NADPH | nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (redukált) |
| PBS | foszfátpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PEG | polietilén-glikol |
| PGI | foszfo-glukóz-izomeráz |
| PMSF | fenil-metil-szulfonil-fluorid |
| PVDF | polivinilidén-fluorid |
| ROS | reaktív oxigénszármazékok (<i>reactive oxygen species</i>) |
| S3483 | szintetikus klorogénsav-származék (<i>G6PT inhibitor</i>) |
| SDS-PAGE | nátrium-dodecil-szulfát – poliakrilamid gélelektroforézis |
| SEM | középérték közepes hibája (<i>standard error of the mean</i>) |
| TBARS | tiobarbiturát reaktív anyagok (<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>) |
| TBS | tris-pufferelt sóoldat |
| TCA | triklór-ecetsav |
| Tris | trisz(hidroximetil)-aminometán |
| VLDL | nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein (<i>very-low-density lipoprotein</i>) |
| WHO | Egészségügyi Világszervezet (<i>World Health Organization</i>) |

1. Bevezetés

1.1. Elhízás - metabolikus szindróma - cukorbetegség

A cukorbetegség évtizedek óta megfigyelhető, járványszerű terjedése a világ egészségügyi szervezeteinek küzdelme ellenére is tovább folytatódik (1. ábra). A kórkép manapság már nemcsak a fejlett, de a fejlődő országokban is egyre nagyobb problémát jelent: a cukorbetegek száma világszerte 347 millióra tehető. A WHO adatai azt mutatják, hogy a diabetes mellitus 2008-ban világviszonylatban a kilencedik vezető halálok volt; becslések szerint azonban 2030-ra már a hetedik helyen fog szerepelni [1].



1. ábra A diabétesz becsült elterjedése világszerte 2025-re [2]

Az előrejelzést az *International Diabetes Federation* publikálta 2006-ban, egy átfogó tanulmány eredményeinek részeként, melynek során 215 országban gyűjtöttek adatokat a cukorbetegségről. Mivel az adatokból óvatos következtetést vontak le, az ábra a diabétesz terjedésének minimum becslését mutatja.

A betegség két típusát különböztetjük meg. Az 1-es típus, más néven inzulinfüggő, vagy fiatalkori diabétesz az inzulintermelő β -sejtek rendszerint gyors pusztulása révén elégtelen inzulintermelést, vagyis inzulinhiányt eredményez. Kialakulásának oka

ez idáig nem tisztázott, de nagy valószínűséggel autoimmun betegség, mely az elhízással, illetve az ahhoz kapcsolódó kórképekkel biztosan nem áll összefüggésben. A cukorbetegség másik válfaját, a 2-es típusú, vagy nem inzulinfüggő – korábban felnőttkorinak is nevezett – diabéteszt a szervezet nem megfelelő inzulinérzékenysége jellemzi. Manapság ez a típus teszi ki az összes cukorbetegség 90%-át [3], és – mivel az 1-es típusú cukorbetegség száma csak a népesség arányával növekszik, a 2-es típus pedig vészesen terjed – ez az arány egyre nagyobb. A nem inzulinfüggő diabétesz kialakulása évekig-évtizedekig tartó folyamat, amelyben az örökölt hajlamon túl a hibás táplálkozási szokások és a mozgásszegény életmód, illetve az ezek következményeként kialakuló túlsúly, illetve elhízás is jelentős szerepet játszik. Az obezitás és a 2-es típusú diabétesz közötti szoros összefüggést számos megfigyelés bizonyítja [4-6].

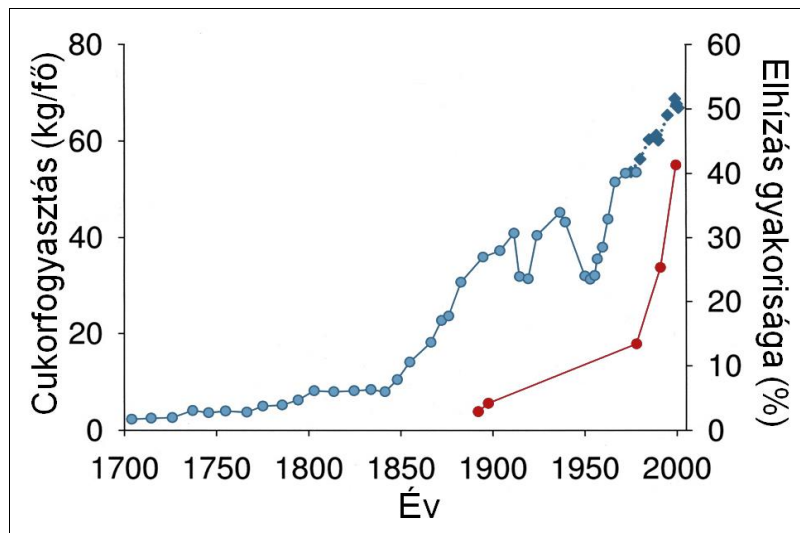
A testtömegindex (angolul: Body Mass Index = BMI) a leginkább alkalmazott nemzetközi arányszám a tápláltsági állapot számszerűsítésére. A testtömegindex kiszámításának képlete: $BMI = \text{testsúly (kg)} / \text{magasság}^2 \text{ (m}^2\text{)}$. Hivatalosan akkor beszélünk túlsúlyról ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$), amikor a szervezetben a zsír felhalmozódása már eléri azt a mértéket, ami az egészséget károsan befolyásolhatja. Ennek súlyosabb formája az elhízás ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$). A WHO szerint világviszonylatban a túlsúly és az elhízás több ember halálával van összefüggésben, mint az alultápláltság, és már nem csak a fejlett, de a fejlődő országok számára is komoly problémát jelent. Egy 2008-ban készült felmérés riasztó adatai alapján a túlsúlyos felnőttek száma meghaladta az 1,4 milliárd főt, ezek közül nagyjából félmilliárd, vagyis a Föld teljes népességének több mint 10%-a volt elhízott. 2011-es adatok szerint a túlsúly már az öt év alatti gyermekek között is meghaladta a 40 millió főt.

A túlsúly és a diabétesz kapcsolata különösen nyilvánvaló a metabolikus szindrómának nevezett tünetegyüttes esetében, amely voltaképpen átmenet az elhízás és a 2-es típusú cukorbetegség között, de manapság már külön kórképnek tekintjük. Akkor beszélünk metabolikus szindrómáról, ha az alábbi öt kockázati tényező közül legalább három egyszerre jelen van: törzskörüli („alma-szerű”) elhízás, magas vérnyomás, magas trigliceridszint, alacsony HDL-szint és inzulinrezisztencia. A metabolikus szindróma számos további betegség (pl. kardiovaszkuláris betegségek) kockázatát növeli, és jellemzően a diabétesz felé progrediál [7]. A kórkép gyors terjedése miatt komoly igény van olyan hatóanyagok tervezésére és alkalmazására, melyek védenek a metabolikus

szindróma kialakulásával szemben. Nehézséget jelent, hogy, bár a rizikófaktorok jól ismertek, a betegség kialakulásának pontos biokémiai mechanizmusai még tisztázásra szorulnak.

1.2. Táplálkozási tényezők

Nyilvánvaló, hogy a fenti metabolikus betegségek kialakulását és súlyosbodását genetikai faktorok, illetve a csökkent fizikai aktivitás mellett elsősorban táplálkozási tényezők befolyásolják. Az ilyen típusú kórképek és a XX. század elejétől egyre elterjedtebb ún. „nyugati étrend” közti korrelációt korán felismerték, és már a század közepén publikálták [8]. Számos korai tanulmány a megváltozott étrend vonatkozásában elsősorban a zsírok fokozott bevitelére koncentrált, és annak tulajdonította az egészségre káros hatásokat. Az 1960-as években azonban felfigyeltek arra, hogy a nyugati étrend szénhidrátban is rendkívül gazdag, és elkezdtek vizsgálni ennek hatásait az elhízással kapcsolatos betegségekre [9]. Egyértelműen bebizonyosodott, hogy a fokozott cukorfogyasztás nagymértékben növeli – többek között – az anyagcsere-betegségek kialakulásának kockázatát (2. ábra) [10, 11], ennek hatásmechanizmusa azonban eltér a magas zsírtartalmú diéta okozta metabolikus zavarokétól [12-14].



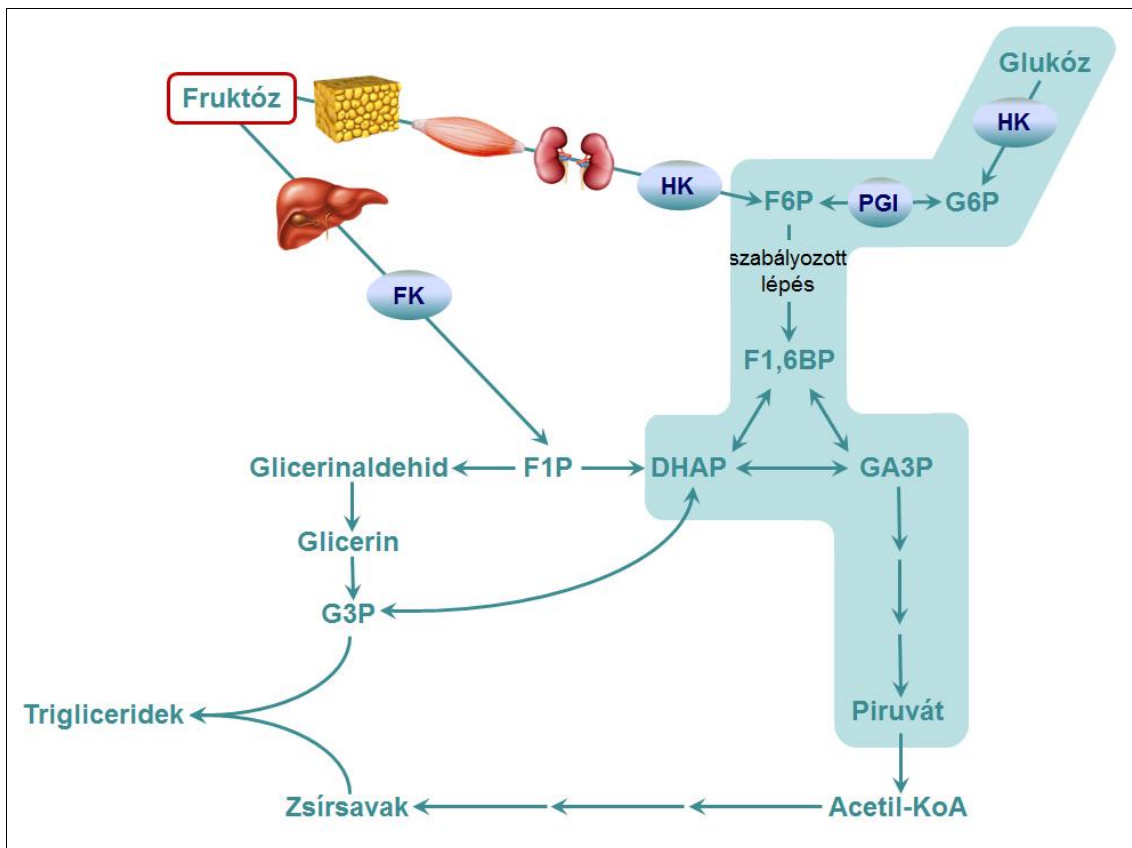
2. ábra Cukorfogyasztás növekedése 1700-1978 az Egyesült Királyságban és 1975-2000 az Egyesült Államokban (kék), összevetve az elhízás gyakoriságával az USA-ban (piros) [7]

Kiderült továbbá az is, hogy nem csak az elfogyasztott szénhidrát mennyisége meghatározó, hanem az azt felépítő monoszacharid alegységek megoszlása is. Megállapították, hogy a metabolikus zavarok kialakulása szempontjából a cukor fruktóztartalma kritikus tényező [15].

1.2.1. Fruktóz

A fruktóz, más néven gyümölcscukor egyszerű, hat szénatomos monoszacharid, mely számos élelmiszerben megtalálható, akár szabad formában, akár egy glukóz molekulával kapcsoltan diszacharidként (szacharóz). Élelmiszeripari felhasználása az utóbbi évtizedekben nagymértékben növekedett, kiváltképp az 1960-as évektől előállított magas fruktóztartalmú kukoricaszirup elterjedésével, melyet számos élelmiszer, különösen üdítőitalok édesítésére használnak [16]. A bélumenből a bélhámsejtekbe való felszívódás a specifikus GLUT5 fehérjén keresztül valósul meg, innen a véráramba jutást pedig a sejtek bazolaterális membránjában elhelyezkedő GLUT2 transzporter teszi lehetővé. A fruktóz transzportja (a glukózával ellentétben) nem ATP-igényes folyamat, illetve a Na^+ felszívódásától is független [16]. Újabb kutatások szerint a glukóz, illetve bizonyos aminosavak elősegítik a fruktóz hatékony felszívódását a bélből, ennek mechanizmusa azonban még nem teljesen tisztázott [17]. A felszívódott fruktóz egy részét a bélsejtek lebontják, az intermedierekből pedig zsírsavakat és glukózt szintetizálnak. A bél *de novo* lipogenetikus és glukoneogenetikus aktivitásának fokozásán keresztül a fruktóz másodlagos hatást is gyakorol a perifériás anyagcsere-folyamatokra [18, 19]. A bélsejtekben nem felhasznált fruktóz a portális keringésbe, ezen keresztül a májba jut. A hepatociták a felszívódott fruktóz jelentős részét GLUT2 transzporterekén keresztül felveszik, majd a fruktokináz enzim segítségével fruktóz-1-foszfáttá alakítják, ami ez után gliceraldehyd-3-foszfát, illetve dihidroxiaceton-foszfát formájában lép be a glikolízisbe. A keringésben megmaradt fruktóz az extrahepatikus szövetekbe (elsősorban a vázizomba és a zsírszövetbe) kerül, ahol a hexokináz alternatív szubsztrátjaként közvetlenül fruktóz-6-foszfáttá alakulva kapcsolódik a glikolízishez. Ez azt jelenti, hogy a fruktóz az általános anyagcsere legfontosabb szöveteiben (máj, izom és zsírszövet) egyaránt hozzájárul a glikolízis kezdeti intermedierei, a glukóz-6-foszfát és a fruktóz-6-

foszfát koncentrációjának emelkedéséhez (3. ábra). Fontos kiemelni, hogy a fruktóz májsejtekre jellemző lebontási útja kikerüli a glikolízis kezdeti lépéseit, így a szabályozott foszfofruktokináz 1 enzimet is. Ilyeténképpen a fruktóz lebontása egyrészt inzulin-tól független, másrészt mentesül a citrát és az ATP visszacsatolások gátlása alól, vagyis a glukóz lebontásával ellentétben szabályozatlan, ráadásul annál gyorsabb folyamat. Fruktóz lebontásakor a glicerín-3-foszfát és az acetil-KoA folyamatos termelődése fokozza a májban a lipogenezist és a VLDL-termelést [20]. (3. ábra)



3. ábra A fruktóz lebontása

A fruktóz lebontása zsír- és izomszövetben, illetve a vesékben a hexokináz, májszövetben a fruktokináz enzim által katalizált lépéssel kezdődik. Az intermedierek minden szövettípusban belépnek a glikolízisbe (kék háttér), amin keresztül végső soron hozzájárulnak többek között a trigliceridek szintéziséhez. Mivel a májban kikerülik a foszfofruktokináz-1 enzimet, lebontásuk szabályozatlanul zajlik, így a belőlük kiinduló szintetikus folyamatok felgyorsulnak.

További különbség a glukózhhoz képest, hogy a hasnyálmirigyben történő inzulintermelést a fruktóz önmagában nem fokozza (csak glukóz jelenlétében, az édes íz receptorok aktiválásán keresztül [21]), vagyis a plazma trigliceridszintjének növekedését fruktózfogyasztást követően nem kíséri az inzulinkoncentráció emelkedése. Nem gátolja továbbá a legfontosabb étvágystimuláló hormon, a ghrelin termelődését, és nem stimulálja az étvágycsökkentő leptin hormon szekrécióját sem, vagyis kevésbé okoz jóllakottság érzetet, így növeli a táplálékbevitelt [22-24]. Korábban a fruktózt viszonylag alacsony glikémiás indexe miatt (a glukóznak mintegy 20%-a) ígéretes édesítőszernek tartották, ezért fogyasztásának hosszabb távú hatásaival is számos, mind humán, mind állatmodelleken végzett tanulmány foglalkozott. Az eredmények – a metabolikus és kardiovaszkuláris állapotot összességében tekintve – túlnyomórészt inkább negatív hatásokra mutattak rá. Bizonyos esetekben megfigyelhető volt ugyan a vércukorszint csökkenése, ám a plazma triglicerid- és koleszterinszintje mindig emelkedett, és a HDL mennyisége egyidejűleg csökkent [16, 25]. Összességében megállapítható, hogy a fokozott fruktózfogyasztás egyfelől hormonális szabályozás révén megnöveli az energiabevitelt, hozzájárulva ezzel az elhízáshoz; másfelől a metabolikus folyamatok sejten belüli szabályozásának felborításával fokozza számos anyagcsere-betegség kialakulásának kockázatát, és elősegíti progresszióját. A fokozott fruktózbevitelnek az elhízás, a metabolikus szindróma és a diabétesz kialakulásában betöltött szerepe jelenleg is intenzív kutatás tárgyát képezi. A háttérben húzódó molekuláris mechanizmusok alaposabb megismerése egészségügyi szempontból is rendkívül fontos.

1.2.2. Tea

A távol-keleti országok lakói az említett táplálkozási és életmódbeli tényezők tekintetében magas rizikójú populációnak tekinthetők: dohányzásban messze megelőzik a nyugati országokat, étrendjük pedig zsírban és szénhidrátban gazdag. Ennek ellenére ezekben az országokban az elhízás, a diabétesz, a kardiovaszkuláris betegségek és egyes daganatos elváltozások gyakorisága egyaránt alacsonyabb a nyugati országokban megfigyelhetőnél. Ezt a jelenséget nevezik „ázsiai paradoxonnak” [26]. A látszólagos ellentmondás feloldására irányuló magyarázatok közül a legelfogadottabb a rendszeres

zöldtea fogyasztásban látja a megoldást: az ázsiai régióban egy főre átlagosan napi 1,2 liter jut, ami messze meghaladja az európai és észak-amerikai teafogyasztást.

A tea az Indiától a távol-keleti országokig őshonos *Camellia sinensis* növény leveléből készül. Közel 4000 különböző bioaktív molekulát tartalmaz, melyek nagyjából egyharmadát polifenolok alkotják [27]. A tealevelek fermentálásának mértéke és módja alapján a tea három fajtáját különböztetjük meg: zöld (nem fermentált), oolong (enyhén fermentált) és fekete, vagy vörös (fermentált). A zöldtea esetében a leveleket betakarítás után azonnal, többször egymás után gőzölik (Japánban), vagy melegítik, pörkölik (Kínában), így inaktiválják a növény polifenol-oxidáz enzimeit, megakadályozva a polifenolok oxidációját, és polimerizálódását. Ennek köszönhető az is, hogy a levelek zöld színűek maradnak.

1.2.2.1. Katekinek

Előállításának köszönhetően a zöldtea flavonoid tartalmának kb. 80%-át katekinek alkotják, szemben a fekete teával, ahol ez mindössze 20-30%. Ezért a táplálkozásban a katekinek legjelentősebb természetes forrása a zöldtea, megelőzve a többi teát, illetve egyéb katekintartalmú élelmiszereket, mint pl. vörösbor, kékszőlő, alma, vagy csokoládé [28-30]. A tea elsősorban négy különböző típusú katekint tartalmaz, ezek az (-)-epikatekin, az (-)-epikatekin-3-gallát, az (-)-epigallokatekin és (-)-epigallokatekin-3-gallát [31]. Közülük az utóbbi (EGCG) a legjelentősebb, mely a szárított tea teljes tömegének mintegy tized részét teszi ki [32]. Ennek a vegyületnek tulajdonítják a teafogyasztás jótékony hatásainak túlnyomó részét. Különböző élettani és biokémiai hatásaival számtalan átfogó tanulmány foglalkozik. Jelentős antioxidáns hatással bír: megköti a szabad gyököket [33], védelmet nyújt az oxidatív DNS-károsodással [34], a lipidperoxidációval [35], valamint ROS-képződéssel [30] szemben. Antiallergén [36], akadályozza az érfalon a plakkok keletkezését [37, 38], gátolja a sejtproliferációt [39], csökkenti a tumoros elváltozások kialakulásának kockázatát [26, 40, 41]. Különböző anyagcsere-betegségekben betöltött jótékony szerepe is igen széles körű irodalommal rendelkezik: temérdek kutatás bizonyítja, hogy az EGCG hatékonyan véd az elhízás, a metabolikus szindróma és a 2-es típusú cukorbetegség ellen [42-47].

Ezek nagyrészt humán, vagy állatmodellen végzett tanulmányok, melyek átfogóan vizsgálják a megfigyelt személyek, vagy egyedek metabolikus állapotát. Következésképpen az EGCG hatását a teljes anyagcserére, vagy bizonyos kórképekre jól ismerjük, a mögötte rejlő molekuláris folyamatok azonban még nagyrészt tisztázatlanok.

1.3. Kortizolhatás, Cushing-szindróma

Emberben a legfontosabb glukokortikoid hormon a kortizol, melyet a mellékvesekéreg szekretál, és plazmaszintje a hipotalamusz-agyalapi mirigy-mellékvese tengely irányítása alatt áll. Napszaktól függő ciklusán kívül számos különböző stresszhatás (sérülés, fertőzés, gyulladás, éhezés stb.) eredményeként a plazma kortizolszintje megemelkedik, segítve az adott stresszhez való alkalmazkodást. Hatása sokrétű: elősegíti az energiaraktárak mobilizálását, véd a sokkhatás ellen, szerepet játszik az immunválaszban stb. A kortizol sok tekintetben – bár nem annyira azonnali, mint inkább adaptív módon – az inzulin antagonistájának tekinthető. Mint az egyik legfontosabb stresszhormon, éhezéskor is termelődik, és többek között serkenti a glukoneogenezis enzimeit, valamint a β -receptorok expresszióját, gátolja az inzulinreceptort, a GLUT4 kihelyeződését stb. [48, 49]. Ha azonban az emelkedett kortizolszint folyamatos, a hormon koncentrációja a vérben tartósan megemelkedik, illetve szintjének ciklikus változása felborul, hatásai kórossá válnak, és kialakulhat az ún. Cushing-szindróma. Ez egy igen súlyos endokrin betegség, melyet – leggyakrabban valamilyen tumoros elváltozás következtében – a mellékvesekéreg túlműködése okoz. A folyamatos és túlzott hormonhatás számos komoly szövődményhez vezet, egyebek mellett kialakul elhízás, magas vérnyomás, magas trigliceridszint, alacsony HDL-szint, illetve inzulinrezisztencia. Ha a betegséget nem kezelik időben, következményként szinte minden esetben 2-es típusú cukorbetegség is kifejlődik [50]. Szembetűnő, hogy a hiperkortizolémia következményeként kialakuló betegség tünetei milyen nagy mértékben fednek át a metabolikus szindrómával [51, 52], ahol azonban nem figyelhető meg emelkedett plazma kortizolszint. Sőt, bizonyos esetekben az elhízott egyének vérében alacsonyabb koncentrációt mértek, mint a sovány testalkatúakéban [53-55].

A Cushing-szindróma és a metabolikus szindróma tüneteinek jelentős hasonlósága tehát azt sugallja, hogy utóbbi betegségben is kulcsszerepe lehet a fokozott kortizolhatásnak. Kérdés, hogy metabolikus szindrómában kialakulhat-e a túlzott hormonhatás a plazma kortizolszintjének emelkedése nélkül is.

1.4. Perifériás kortizolciklus

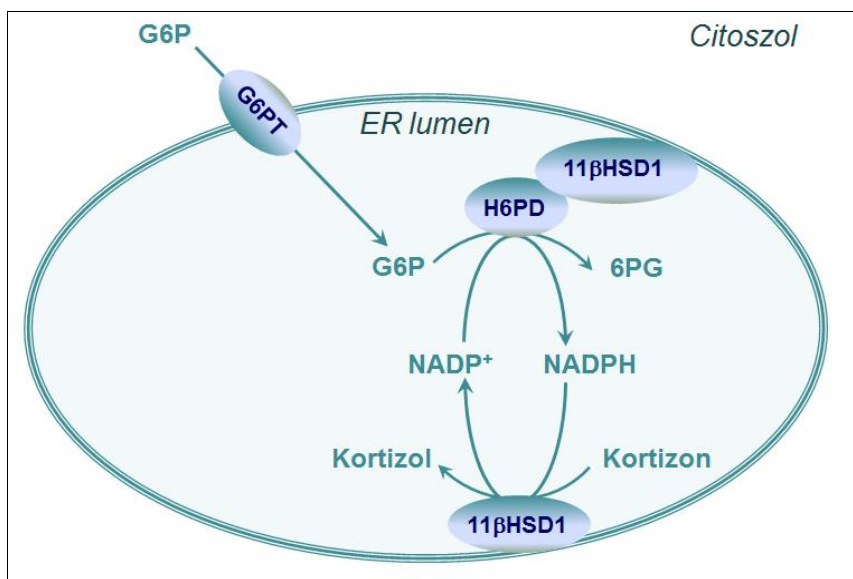
Míg a hagyományos endokrinológia a hormonok mennyiségi változásait elsősorban a plazmában vizsgálta, újabb kutatások rávilágítottak a különböző szövetekben észlelhető hormonkoncentrációk eltéréseire és ennek jelentőségére. Számos olyan hormon ismert, mely keletkezésének helyéről inaktív formában (prohormonként) jut el a célszövetig, ahol valamilyen enzimatis lépés(ek)en keresztül aktiválódik. Előfordul az is, hogy az aktív hormon egyes szövetekben inaktív vegyületté alakul, és így kerül vissza a keringésbe. Ilyen transzformációkon alapul a kortizolnak – a mellékvesekéreg által aktuálisan termelt mennyiségtől független – szövetek közti fluktuációja is. Ezt a hormon inaktiválását, illetve prohormonból (kortizonból) való re-aktiválását végző enzimaktivitások szervek közötti sajátos megoszlása teszi lehetővé. A kortizol kortizonná alakítása elsősorban a vesében és a bőr alatti zsírszövetben történik; az így keletkező kortizon pedig főként a zsigeri zsírszövetben és a májban alakul vissza aktív kortizollá [56]. Az elmúlt évtized során világossá vált, hogy a kortizolhatás jelentős hányada e lokális/prereceptorális aktiválódásnak tulajdonítható [57]. Izotópos jelölés segítségével megállapították, hogy a szöveti kortizol-újratemelésből annyi aktív hormon származik, mint a mellékvesekéreg által újonnan termelt mennyiség 25%-a [58]. Ennek pedig nagyjából egyharmada a májból, kétharmada a zsigeri (hasúri/viszcerális) zsírszövetből származik [59].

1.4.1. 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenázok

A kortizol hormon és a kortizon prohormon egymásba alakítását a perifériás szövetekben a 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzimek katalizálják.

Emlősökben két típusa ismert: a kettes típusú izoenzim (11 β HSD2) elsősorban a vesében, a bélrendszerben és a nyálmirigyekben fejeződik ki. Sejten belüli elhelyezkedését tekintve citoszolikus fehérje, mely NAD⁺ koenzim segítségével oxidálja a kortizolt kortizonná, vagyis a hormon inaktivációját katalizálja. Prereceptorális ligandspecificitást biztosító szerepe a mineralokortikoid-célszövetekben kulcsfontosságú. Itt ugyanis inaktiválni kell a kortizolt, hogy a nem-szelektív mineralokortikoid receptorokhoz kötve ne válthasson ki aldosteronszerű hatásokat [60].

Az egyes típus (11 β HSD1) ezzel szemben a glukokortikoid-célszervekben, azaz a májban, a vázizomzatban, valamint a zsírszövetben van jelen, és általában ellentétes irányú reakciót, vagyis a kortizol prereceptorális termelődését katalizálja (kivéve a bőr alatti zsírszövetben, ahol inaktiválja a hormont) [61]. Intracelluláris lokalizációja és kofaktorigénye is eltér a 2-es típusú izoenzimétől, ugyanis az endoplazmás retikulum membránjához kötve, annak lumenében helyezkedik el, koenzimként pedig – a reakció irányától függően – NADP⁺-t vagy NADPH-t használ [62, 63]. Ez azért fontos, mert az organelum membránja piridin-nukleotidok számára átjárhatatlan, vagyis a reakció katalíziséhez kizárólag az endoplazmás retikulum elkülönült, luminális NADPH-készlete áll rendelkezésre. Az enzim által elhasznált NADPH újratermelődését, vagyis a NADP⁺ visszaredukálását a szintén luminális és a 11 β HSD1-hez fizikailag is kapcsolt hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzim (H6PD) végzi, miközben glukóz-6-foszfát (G6P) 6-foszfoglukonáttá (6PG) való átalakulását katalizálja [64-66]. Szubsztrátja, a G6P egy szelektív transzporter fehérjén, a glukóz-6-foszfát-transzporterén (G6PT) keresztül jut be az endoplazmás retikulum lumenébe [67]. Ahol a H6PD nem redukálja vissza a keletkezett NADP⁺-t NADPH-vá, ott az enzim oxidál, vagyis kortizol-kortizon átalakulást katalizál. Így végső soron a 11 β HSD1 megfelelő funkciójához nem csak maga az enzim jelenléte és épsége szükséges, hanem az említett három fehérjéből álló „katalitikus triád” egészének együttes működése (4. ábra).



4. ábra A G6PT-H6PD-11βHSD1 katalitikus triád működése

A kortizol perifériás aktiválásához az endoplazmás retikulumban mindhárom enzim jelenléte és megfelelő működése, valamint szubsztrátként inaktív kortizon és G6P szükséges. Miután a G6P specifikus transzport segítségével a lumenbe kerül, a H6PD által katalizált reakcióban 6PG-vá alakul. Ez a reakció tartja fenn a kortizon-kortizol átalakuláshoz, vagyis a 11βHSD1 aktivitásához szükséges NADPH-szintet.

1.5. Az endoplazmás retikulum tápanyagszenzor funkciója

A szinte minden eukarióta sejtben megtalálható endoplazmás retikulum a citoplazmától jelentősen eltérő proteommal, metabolommal és redox környezettel rendelkező sejtszervecske. A magmembránnal is összefüggő folytonos membrán határolja, és az ezen keresztüli szabályozott anyagforgalom zömében szelektív transzporterekén keresztül zajlik [68-74]. Az organellum lumenének jellegzetes összetétele szükséges feltétele a benne zajló számos folyamat megfelelő működésének [75]. Az endoplazmás retikulum az intermediér anyagcsere sok útvonalában (pl. glukoneogenesis, koleszterin-, zsírsav-, trigliceridszintézis) szerepet játszik, és helyt ad a glukuronidációnak, valamint a fehérjék poszt-transzlációs módosításának is [76-80]. Bizonyos anyagcsere-intermedierek szintje alapján állandóan észleli a környezet változásait, melyekre az endoplazmás retikulum stressz különböző fokozataival folyamatosan reagál, segítve ezzel a változó

igényekhez való alkalmazkodást [63, 81-84]. A koleszterin, zsírsavak, G6P mennyiségén, valamint a tiol/diszulfid és piridin-nukleotidok redox állapotán keresztül érzékeli a sejt aktuális tápanyag-ellátottságát, aminek függvényében kitüntetett jelpályákat aktiválhat [85]. Munkacsoportunk kimutatta, hogy az endoplazmás retikulum piridin-nukleotidjainak redox státusza érzékenyen reagál a tápanyag-ellátottságra. Jóllakott állapotban a NADPH-szint és egyben az organelum kortizoltermelő kapacitása emelkedik [86]. Feltételezhető, hogy a jelenség hátterében a G6P megemelkedett citoszolikus koncentrációja áll, amely a G6PT közvetítésével az endoplazmás retikulum lumenében is fokozza a H6PD szubsztrátellátottságát, és stimulálhatja a lokális NADPH-termelést. Folyamatos tápanyag-túlkínálat esetén tehát számolni lehet tehát a perifériás kortizolszintézis kóros mértékű fokozódásával is [87].

1.6. Prereceptorális kortizoltermelés és metabolikus szindróma

A 11 β HSD enzimek megoszlása a szervezetben, valamint az 1-es típusú izoforma változó irányú aktivitása, melynek eredménye, hogy a kortizol bizonyos szövetekben aktív, másutt inaktív formában van jelen, lehetővé teszi tehát egy dinamikus kortizol-újrafelhasználódást a szövetek között anélkül, hogy a hormon koncentrációja a szérumban változna. Ez a megfigyelés, illetve a kortizol fentebb részletezett, anyagcsere-t érintő hatásai rávilágítottak a hormon prereceptorális metabolizmusának lehetséges szerepére különböző anyagcsere-betegségek patomechanizmusában [88]. A feltételezést transzgenikus, illetve génkiütött állatmodelleken végzett kísérletek eredményei is alátámasztják: azon egerek, amelyekben kiütötték a 11 β HSD1 [89, 90], vagy a H6PD [91, 92] enzim génjét, sovány testalkatúak lettek, hipoglikémiát, valamint magas glukóztoleranciát mutattak, és ellenállóak voltak 2-es típusú cukorbetegségre vezető étrenddel szemben. Bármelyik enzim hiánya a perifériás kortizoltermelés nagyfokú csökkenését eredményezi, ami eltolja az egész szervezet metabolikus állapotát, stabil ellenálló képességet kialakítva az anyagcsere-betegségekkel szemben. Ugyanakkor a zsírszövetben túltermeltetett 11 β HSD1 lényegében a komplett metabolikus szindróma kifejlődését előidézte [93]. Az enzim májban való szelektív túltermelése pedig a metabolikus szindróma tüneteinek vezetett, bár elhízás nélkül [94]. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a

kortizol prereceptoriális aktiválódásának fokozása – szövetenként eltérő tüneteket okozva – összességében metabolikus szindrómához vezet.

1.7. A lokális kortizoltermelés mint gyógyszerátadáspont

A prereceptoriális kortizoltermelés jelentőségének és metabolikus szindrómában betöltött szerepének felismerése lendületet adott a 11 β HSD-gátlók mint új antidiabetikumok fejlesztésének. [95, 96]. Ilyesfajta hatóanyag tervezése nem egyszerű feladat, mert a kívánt hatás elérésére többszörös szelektivitást kell elérni. Alapvető elvárás a hatóanyaggal szemben, hogy kizárólag az egyes típusú izoenzimet gátolja, mert a kettős típusú gátlásával megakadályoznánk a kortizol inaktiválódását a mineralokortikoid célszövetekben, ezzel az egész szervezet só-víz háztartása felborulna, aminek igen súlyos következményei lennének. A kipróbált, szelektív 11 β HSD1-gátló gyógyszerjelölt molekuláknak ugyan valóban jótékony hatásuk volt, de a várt áttörést nem hozták meg a kórkép kezelésében. Ennek valószínű oka, hogy a 11 β HSD1 kortizoltermelő aktivitása mellett a szubkután zsírszövetben jellemző – és nem elhanyagolható mértékű – kortizol-inaktiváló aktivitása is gátlás alá kerül. A kezelés hatékonyságát minden bizonnyal jelentősen fokozná, ha a 11 β HSD1 szelektív gátlószere az enzim működését csak a kortizoltermelés irányában gátolná, a kortizontermelés irányában pedig legalábbis nem akadályozná, esetleg serkentené [97]. Ez azonban enzimológiai szempontból – tekintve, hogy a biokatalizátorok csupán az adott reakció sebességét képesek befolyásolni, irányát nem – nehezen megvalósítható feladat.

2. Célkitűzések

Kutatásainkkal az említett diabetogén (fruktózfogyasztás) és antidiabetikus (katekinbevitel) táplálkozási tényezők hatásának mechanizmusait kívántuk tanulmányozni. Különösen azt vizsgáltuk, hogy az *in vivo* megfigyelt hatásukban szerepet játszhat-e – legalább részben – az endoplazmás retikulum kortizolmetabolizmusának befolyásolása. Konkrét célunk volt annak tisztázása, hogy a fruktóz-anyagcsere és a glikolízis köztterméke, a fruktóz-6-foszfát (F6P) vajon fokozza-e, illetve a zöldtea katekin EGCG gátolja-e a mikroszomális G6PT-H6PD-11 β HSD1 katalitikus triád kortizoltermelő aktivitását, mely a célsejtekben a glukokortikoid-hatás fontos, prerreceptorális meghatározója.

Kísérleteinkkel az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

- Hogyan befolyásolja a F6P máj mikroszóma kortizoltermelését?
- Hozzá tud-e járulni a F6P a máj és zsír eredetű mikroszóma NADPH-termeléséhez?
- Bejut-e a F6P az endoplazmás retikulum lumenébe?
- A F6P G6P-tá alakulása szükséges-e a feltételezett hatások kialakulásához az endoplazmás retikulumban?
- Hogyan hat az EGCG a mikroszomális kortizoltermelésre?
- Befolyásolja-e az EGCG a G6PT-H6PD-11 β HSD1 katalitikus triád egyes fehérjekomponenseinek aktivitását?
- Befolyásolja-e az EGCG a luminális redox állapotot; és ha igen, hogyan?
- Specifikusnak tekinthetők-e az EGCG feltételezett mikroszomális hatásai vagy csupán egy általános redox effektus részei?

3. Módszerek

3.1. Mikroszómapreparálás

A mikroszóma differenciál-centrifugálással izolált, membrándús sejtfrakció, mely nagyrészt endoplazmás retikulumot tartalmaz. Kísérleteinkhez 180-230 g testtömegű, hím Wistar patkányokat használtunk. Egy éjszakás éheztetés után az állatok máját, illetve vizsцерális zsírszövetét eltávolítottuk, apró darabokra vágtuk, majd jéghideg szacharóz-HEPES pufferoldatban (0,3 M szacharóz / 20 mM HEPES / pH 7,0) Potter-Elvehjem eszköz segítségével egyenletesre homogenizáltuk. Az így kapott homogenátumot azonos pufferben kb. ötszörösére hígítottuk, és alaposan felfuszpendáltuk, majd lecentrifugáltuk (1000 x g / 10 perc / 4°C). A kapott felülúszóból újabb centrifugálással (11 000 x g / 20 perc / 4°C) üleptítettük a mitokondriális frakciót. Az így keletkezett felülúszó ultracentrifugálásával (100 000 g / 60 perc / 4°C) kinyertük belőle a mikroszómát tartalmazó frakciót. A pelletet MOPS-KCl (100 mM KCl / 20 mM NaCl / 1 mM MgCl₂ / 20 mM MOPS / pH 7,2) pufferben reszuszpendáltuk, majd megismételtük a legutóbbi centrifugálási lépést [98]. Végül a pelletet ismét MOPS-KCL pufferben szuszpendáltuk úgy, hogy a fehérjekoncentráció nagyjából 50 mg/ml legyen. Az elkészült mikroszóma-preparátumokat 250 µl-es egységekben fagyasztócsövekbe osztva azonnal fagyasztottuk, és felhasználásig folyékony nitrogénben tároltuk. A minták fehérjekoncentrációját Bio-Rad fehérjemérő próbával határoztuk meg, ismert, pontos koncentrációjú marha szérumalbumin fehérjeoldathoz hasonlítva.

A mikroszómafrakció tisztaságáról az endoplazmás retikulum, illetve más szubcelluláris kompartmentek specifikus marker enzimeinek kimutatásával győződünk meg [99, 100]. A máj mikroszóma membránjának épségét a mannóz-6-foszfátáz latenciájának mérésével ellenőriztük [101], amely minden esetben legalább 95% volt.

Azon kísérletekben, ahol szükséges volt a mikroszóma permeabilizálása, alamethicint vagy deoxikolátot alkalmaztunk. Az alamethicin gomba eredetű, 20 aminosavból álló peptid, mely a membránba illeszkedve pórusokat képez [102]. A deoxikolát kíméletes, biológiai detergens, egy másodlagos epesav sója [103]. Fontos, hogy mindkét

vegyület úgy teszi átjárhatóvá a mikroszomális membránt, hogy közben megtartja annak integritását és a vezikulumok struktúráját.

3.2. Glukóztermelés

Patkány májból izolált mikroszómápreparátumokat 0,5 mg/ml fehérjekoncentrációra hígítottunk, majd mikrocentrifuga csövekbe osztottunk. A mintákat 37°C-os száraz blokkba helyeztük, és 2 mM G6P, vagy F6P jelenlétében inkubáltuk. A reakciót hődenaturációval (100°C, 5 perc) állítottuk le. Az így kicsapott fehérjéket centrifugálással üleptítettük (20 000 g, 10 perc, 4°C), majd meghatároztuk a felülúszó glukóztartalmát. A mérést a Sigma-Aldrich által forgalmazott „Glucose (GO) Assay Kit” segítségével végeztük, a gyártó utasításai alapján.

3.3. Mikroszomális kortizon-kortizol átalakulás

A 11 β HSD1 enzim aktivitását közvetve és közvetlenül is mértük. A kortizon-redukció mértékének meghatározására az intakt patkány máj mikroszómát MOPS-KCl pufferben 0,5 mg/ml fehérjekoncentrációra hígítottunk, majd 5 μ M kortizon, és 50 μ M G6P, vagy F6P jelenlétében inkubáltunk. A kortizol oxidációját hasonló kísérleti körülmények között vizsgáltunk alamethicinnel (0,1 mg/mg fehérje) előkezelt, vagyis permeabilizált mikroszómában, 5 μ M kortizon, és 50 μ M NADP⁺ hozzáadása után. A kísérleteket mikrocentrifuga csövekben végeztük, 150 μ l térfogatban, 37°C-on, 30 percen keresztül. A reakciót minden esetben 150 μ l jéghideg metanol hozzáadásával állítottuk le, ezután a mintákat a HPLC-vel történő kortizon/kortizol mérésig -20°C-on tároltuk.

3.4. H6P-izomeráz aktivitás

Az izomeráz aktivitást közvetett módon vizsgáltuk, bakteriális (*Leuconostoc mesenteroides*) eredetű G6PD enzim segítségével. Mivel az enzim NAD⁺ kofaktort használ, az általa katalizált reakció, a NADP⁺-függő H6PD aktivitásától függetlenül

vizsgálható. Mosott mikroszóma-, illetve citoszolikus frakciókat inkubáltunk MOPS-KCl pufferben, 22°C-on. A G6PD enzim jelenlétében a NADH-szint növekedése egyenesen arányos a sebességhatározó F6P-G6P átalakulással. F6P hozzáadása után tehát az izomerizáció a NADH-keletkezés fluoreszcens detektálásával valós időben nyomonkövethető. A méréseket Cary Eclipse spektrofluoriméter felhasználásával végeztük, 350 nm excitációs és 460 nm emissziós hullámhosszokon. A pH-érzékenység vizsgálatához a reakcióelegy pH értékét HCl, illetve NaOH hozzáadásával változtattuk.

3.5. Mikroszomális fruktóz-6-foszfát-transzport

A mikroszomális F6P-felvételt rapid filtrációs technikával mértük [104]. Röviden: 1 mg/ml fehérjekoncentrációjú mikroszomaszuszpenziót inkubáltunk KCl-MOPS pufferben, 10-1000 μ M F6P, és D-[14 C]F6P (20 μ Ci/ml) jelenlétében (American Radiolabeled Chemicals), 22°C-on. 30 másodperc inkubáció után a mintákat 0,22 μ m pórusméretű cellulóz acetát/nitrát membránon keresztül szűrtük, majd a filtereket 4 ml, 20 mM HEPES pufferrel (pH 7,2) mostuk. A puffer tartalmazott 250 mM szacharózt és 1 mM DIDS-t (az anion-permeabilitás általános gátlószerét), hogy csökkentsük a vezikuláris F6P esetleges kiáramlását a mosási lépés közben [105]. A filterek által fel fogott, mikroszómához asszociált teljes radioaktivitást folyadékszintillációs számlálóval mértük. Az intravezikuláris, és kötődő radioaktivitás szétválasztására az inkubációs elegy tartalmazott 0,1% deoxikolátot. A radioaktivitás deoxikolát-által felszabadított részét tekintettük intravezikulárisnak.

3.6. Myc „tag”-gel jelölt H6PD affinitás tisztítása

A H6PD enzimet a korábban leírt eljárással izoláltuk [106]. Röviden: HEK-293 sejtvonalat, C-terminálison myc-jelölt H6PD konstrukcióval [107], kalcium-foszfát csapadék segítségével transzfektáltunk. A sejteket 48 órával a transzfekció után kétszer mostuk PBS pufferrel (pH 7,4), majd M2 lízispufferben (50 mM Tris (pH 7,4) / 150 mM NaCl / 10% glicerol / 1% Triton X-100 / 0,5 mM EDTA / 0,5 mM EGTA / 50 mM NaF / 40 mM β -glicerofoszfát / 5 mM tetranátrium-pirofoszfát / 0,1 mM nátrium-

vanadát / 10 µg/ml aprotinin / 5 µg/ml leupeptin / 2 mM PMSF) lizáltuk egy órán keresztül, 4°C-on. Ülepítés után a fehérje-tartalmú felülúszót myc elleni antitesttel kötött agaróz gyöngyök (Sigma-Aldrich) segítségével tisztítottuk, a gyártó utasításait követve. A gyöngyökhöz kötődő fehérjéket 100 µg/ml c-myc peptiddel eluáltuk (Sigma-Aldrich), 0,1 M ammónium-hidroxidban, 30 másodpercig, 25°C-on. A coomassie-val festett SDS-PAGE vizsgálat egy, a H6PD-nek megfelelő különálló fehérjesávot mutatott 90 kDa körüli magasságban. Az enzim dehidrogenáz aktivitását fluorimetriás módszerrel is ellenőriztük (lásd: 3.9. fejezet).

3.7. Immunoblot

A citoplazmatikus PGI enzim jelenlétét különböző sejtfrakciókban Western blot módszerrel vizsgáltuk. A HEK-293 sejtekből, illetve patkány májból származó mintákat β-merkaptotetanolt tartalmazó mintapufferben 10 perces, 95°C-on történő inkubálással állítottuk elő. A minták fehérjetartalmát méret szerint, 8%-os redukáló gélben SDS-PAGE segítségével elválasztottuk, majd PVDF membránra transzferáltuk. A membránt egész éjjel tartó, 5% tejport tartalmazó TBS puffer oldatban való blokkolás után 6 óráig inkubáltuk nyúlban termeltetett, PGI-ellenes elsődleges antitest (Abcam, anti-glucose 6 phosphate isomerase antibody: ab68643) 1:8000 arányú oldatában. Ezt összesen egy órán keresztül intenzív mosási lépések követték: 4 x 15 perc, 0,05% Tween 20-at tartalmazó TBS pufferrel. Másodlagos antitestként HRP-konjugált, kecskében termeltetett, nyúl immunglobulin elleni antitestet (Santa Cruz, goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004) használtunk. A PGI fehérje jelenlétét kemilumineszcens reagens (GE Healthcare) segítségével, röntgen filmre való előhívással állapítottuk meg.

3.8. Folyadékkromatográfiás vizsgálatok

A fentebb részletezett mikroszomális enzimaktivitás-mérésekből származó, 50 V/V% metanolban lévő mintákat a mérésig -20°C-on tároltuk. Mérés előtt a mintákat centrifugáltuk (20 000 g, 10 perc, 4°C), majd a fehérjementes felülúszóból 150 µl-t HPLC küvettába mértünk, és ebből párhuzamosan határoztuk meg a kortizon- és

kortizolszinteket. Az elválasztás HPLC segítségével történt (Alliance 2690; Waters Corporation), Nucleosil 100 C18 oszlopon (5Nm, 25 x 0.46) (Teknokroma Anlítica), izokratikus áramlás mellett, 0,7 ml/perc áramlási sebességgel. A mozgó fázisként 58:42 térfogatarányú metanol-víz elegyet alkalmaztunk. Az eluátum abszorbanciáját 245 nm-es hullámhosszon detektáltuk (Waters Dual λ Absorbance Detector 2487). A kortizon és kortizol retenciós idejét minden esetben a mérés elején injektált 10-10 μ M koncentrációjú referenciaoldatok alapján határoztuk meg.

3.9. Dehidrogenáz aktivitások fluoreszcens detektálása

A NADPH fluoreszcens emisszióját Cary Eclipse spektrofotométer segítségével mértük valós időben, 350 és 500 nm-es excitációs, illetve emissziós hullámhosszok alkalmazásával. Az intakt mikroszóma endogén NADPH-szintjét MOPS-KCl pufferben, 1 mg/ml fehérjekoncentráció mellett vizsgáltuk. A luminális piridin-nukleotidkészlet oxidációját metiraponnal (5 μ M), redukcióját G6P-tal (100 μ M) váltottuk ki. A kvantitatív meghatározáshoz minden mérés végén referenciául ismert koncentrációjú (0,5 μ M) NADPH-t adtunk az elegyhez.

A H6PD aktivitását a NADPH-termelés alapján határoztuk meg. Kvarcküvetében, MOPS-KCl pufferben inkubáltunk 1 mg/ml fehérjekoncentrációjú, intakt mikroszomaszuszpenziót, 2 mM NADP^+ és 100 μ M G6P jelenlétében, 37°C-on. Az intraluminális enzim által katalizált reakció mindaddig nem indul el, amíg a mikroszomális membrán ép, mert az enzim nem fér hozzá a kívülről hozzáadott szubsztrátokhoz. Miután a NADPH emissziós jelszintjével felvettünk egy stabil alapvonalat, alamethicin hozzáadásával (0,1 mg/mg fehérje), vagyis a membrán permeabilizálásával indítottuk el a reakciót, melyet a jelszint lineáris emelkedése alapján követtünk nyomon. Az enzimaktivitásokat a mérés végén hozzáadott NADPH-standard által okozott fluoreszcencia-intenzitás-emelkedés alapján számszerűsítettük.

A 11 β HSD1 enzim aktivitását hasonló kísérleti körülmények között vizsgáltuk, G6P helyett 100 μ M kortizolt adva az inkubációs elegyhez.

3.10. Endogén redukáló/oxidáló kapacitás mérése

A mikroszóma belső kortizon-redukáló illetve kortizol-oxidáló kapacitásának meghatározásához MOPS-KCl pufferben hígított, 0,5 mg/ml fehérjekoncentrációjú, intakt mikroszomaszuszpenziót használtunk. A mikroszómát 2 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on, 10 µM kortizon, vagy kortizol jelenlétében. A reakciót azonos térfogatú, jéghideg metanol hozzáadásával állítottuk le, majd a HPLC-vel történő kortizon illetve kortizol meghatározásig -20°C-on tároltuk.

3.11. Lipidperoxidáció mérése

A membránlipidek esetleges oxidatív károsodását tiobarbiturát reaktív anyagok (TBARS) keletkezésének mérésén keresztül vizsgáltuk. 1 mg/ml fehérjekoncentrációjú, MOPS-KCl pufferben szuszpendált mikroszomapreparátumokat inkubáltunk EGCG jelenlétében (50 vagy 100 µM), illetve hiányában, 5 percen keresztül, 37°C-on. Pozitív kontrollként, a lipidperoxidáció kiváltására Fe^{2+} /aszorbát (100 µM/1 mM) keveréket alkalmaztunk. A reakciót 5% végkoncentrációjú TCA hozzáadásával állítottuk le, a TBARS-szinteket a protokollban leírtaknak megfelelően határoztuk meg [108].

3.12. Statisztikai analízis

Kísérleteinket triplikátumokban végeztük, mindegyiket legalább három alkalommal megismételve. Grafikusan ábrázoltuk az eredmények átlagértékeit, a szórás, vagy a középérték közepes hibájának (SEM) feltüntetésével. Az adatokat egy szempon-tú varianciaanalízis (one-way ANOVA) és Tukey-Kramer teszt (Tukey-Kramer Multiple Comparison Test) alkalmazásával értékeltük, GraphPad Prism® program segítségével. A szignifikanciaszinteket 0,05, 0,01, illetve 0,005 p-értékeknél állapítottuk meg.

4. Eredmények

4.1. F6P metabolizmusa az endoplazmás retikulumban

4.1.1. F6P-függő glukóz- és kortizoltermelés máj mikroszómában

A G6PT-H6PD-11 β HSD1 triád működése azon alapul, hogy a kortizon kortizollá való redukciójához szükséges NADPH-t a G6P oxidációja szolgáltatja az endoplazmás retikulum lumenében [104, 109]. Megfigyelték azonban, hogy az izolált máj mikroszóma kortizoltermelését a F6P is táplálhatja [110], ami arra enged következtetni, hogy valamilyen módon ez a molekula is hozzájárulhat a lumenális NADPH-termeléshez az endoplazmás retikulumban, jöllehet az ezzel kapcsolatos transzport- és enzimatisus folyamatok egyelőre nem ismertek.

A mikroszómális kortizinredukció F6P általi stimulálásának mechanizmusa szempontjából kulcskérdés, hogy a folyamat során a F6P átalakul-e G6P-tá, és – ha igen – az izomerizáció az endoplazmás retikulum külső felszínén vagy az organelum lumenében történik. A citoplazmában található ugyanis hexóz-foszfát-izomeráz, amely az endoplazmás retikulum membránjához asszociálódva akár a mikroszóma preparátumban is jelen lehet. Elsőként összehasonlítottuk a F6P és a G6P kortizon-kortizol átalakulásra kifejtett hatását, a keletkezett kortizol mennyiségi meghatározásával, intakt máj mikroszómapreparátumokon. A korábban egy másik munkacsoport által közölt adatokkal [110] összhangban azt tapasztaltuk, hogy a F6P a G6P-hoz hasonló hatékonysággal táplálja a kortizonredukciót (1. táblázat). Ezután megvizsgáltuk, hogy a mikroszómális vezikulumok mosása, vagyis a membránhoz kívülről esetleg hozzátapadt fehérjék eltávolítása hogyan befolyásolja a kortizoltermelés sebességét. A mikroszómát PEG-gel ülepítettük, és centrifugálás után friss puffer oldatban szuszpendáltuk újra, hogy megszabaduljunk a citoszolisus fehérjéktől. Az első mosási lépés mindkét hexóz-foszfát esetében szignifikánsan, de különösen a F6P-tal táplált rendszerben csökkentette az aktivitást (a változás F6P esetén 32%, míg G6P esetén csupán 11% volt). A mikroszóma további mosása azonban már egyik hexóz-foszfát jelenlétében sem befolyásolta szignifikáns mértékben a kortizolképződés sebességét (1. táblázat). Az adatok alapján feltéte-

lehető, hogy a máj mikroszóma külső felszínéhez hexóz-foszfát-izomeráz aktivitás asszociálódott. A lazán tapadó izomeráz már egy mosási lépéssel hatékonyan eltávolítható. Az eredmények azonban nem zárják ki, hogy szorosabban asszociált – többszöri mosásnak is ellenálló – izomeráz marad a vezikulumok felszínén.

| Szubsztrát | Mosási lépések száma | | | |
|------------|----------------------|---------------|--------------|--------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 |
| G6P | 50,58 ± 0,37 | 44,80 ± 1,60* | 45,77 ± 1,99 | 43,05 ± 1,00 |
| F6P | 51,98 ± 1,31 | 35,16 ± 1,60* | 36,15 ± 0,81 | 33,98 ± 1,72 |

1. táblázat Kortizon-kortizol átalakulás intakt máj mikroszómában
(nmol/perc/mg fehérje)

Átlag ± szórás; n = 5; *p < 0,005, az előtte álló oszlophoz képest

Intakt mikroszómában a két hexóz-foszfát közel azonos mértékben táplálja a kortizol-termelést. A mosások a mikroszóma külső felszínéhez köthető izomeráz aktivitások eliminálására irányultak. Az első mosási lépés mindkettő esetén szignifikáns visszaesést eredményez az aktivitásban, amit további mosási lépések már nem befolyásolnak.

4.1.2. F6P-ből kiinduló glukóztermelés máj mikroszómában

Mivel a mikroszóma lumenében nem ismert más, a H6PD-vel összevethető kapacitású NADPH-termelő enzim, a fenti eredmények azt valószínűsítik, hogy a F6P G6P-tá alakul a mikroszómában. Ennek megerősítésére vagy kizárására megvizsgáltuk, hogy a G6P más mikroszomális anyagcsere-folyamatban is helyettesíthető-e F6P-tal. Mivel a máj mikroszóma lumenében a G6P-glukóz átalakulást katalizáló glukóz-6-foszfátáz enzim is jelen van, következő kísérletünkben megmértük a F6P-ből kiinduló glukózkeletkezést. Patkány májból izolált mikroszómát inkubáltunk G6P, illetve F6P jelenlétében, majd meghatároztuk a keletkezett glukóz mennyiségét. A kísérleteket intakt és permeabilizált mikroszómában egyaránt elvégeztük, ugyanis a G6P transzportja sebességmeghatározó és így a membrán permeabilizálása jelentősen gyorsítja a folyamatot. A G6P-glukóz átalakulás, korábbi adatoknak megfelelően, kb. 50%-os látenciát mutatott (2. táblázat). Méréseink szerint a F6P a G6P-tal összevethető glukózforrásként

szolgált, ami azt bizonyítja, hogy a mikroszómában nagy sebességgel alakul át G6P-tá. A látencia jelensége ez esetben is megfigyelhető volt, és annak mértéke (45%) is hasonló volt a G6P-tal mérthez (2. táblázat). Annak megállapítására, hogy a F6P-G6P izomerizáció milyen mértékben tulajdonítható egy esetleges luminális izomeráz, illetve milyen mértékben a citoplazmában található foszfo-glukóz-izomeráz (PGI) enzimnek, ismét mosási lépéseket iktattunk be a kísérletbe. A vezikulumok első mosása az intakt mikroszóma glukóztermelését F6P-ból közel egy kilenced részére (12%-ára), de G6P-ból is csaknem felére (57%-ára) csökkentette. A mikroszóma glukóztermelő aktivitása ismételt mosási lépésekkel egyik hexóz-foszfát esetén sem volt érdemben tovább csökkenthető (2. táblázat). Kijelenthető tehát, hogy az izolált máj mikroszóma – részben felszínéhez lazán tapadó, részben a vezikulumokról vagy azok belsejéből el nem távolítható izomeráz aktivitás segítségével – képes a F6P-ot G6P-tá alakítani. A későbbi kísérleteinkben mindig mosott mikroszómát használtunk, hogy mérési eredményeket a lehető legkisebb mértékben befolyásolja a citoszolikus izomeráz aktivitás.

| | | Mosási lépések száma | | | |
|------------|--------|----------------------|---------------|--------------|--------------|
| Szubsztrát | | 0 | 1 | 2 | 3 |
| G6P | Intakt | 80,15 ± 4,37 | 45,56 ± 3,82* | 41,60 ± 5,19 | 40,31 ± 4,73 |
| | Perm. | 156,23 ± 9,37 | 72,74 ± 5,82* | 70,14 ± 7,02 | 67,54 ± 3,91 |
| F6P | Intakt | 30,11 ± 5,12 | 3,58 ± 1,31* | 3,35 ± 0,95 | 3,22 ± 1,06 |
| | Perm. | 54,28 ± 4,73 | 23,39 ± 2,70* | 21,74 ± 1,99 | 20,83 ± 2,12 |

2. táblázat Intakt, illetve permeabilizált mikroszóma glukóztermelése
(nmol/perc/mg fehérje)

Átlag ± szórás; n = 5; *p < 0,005, az előtte álló oszlophoz képest

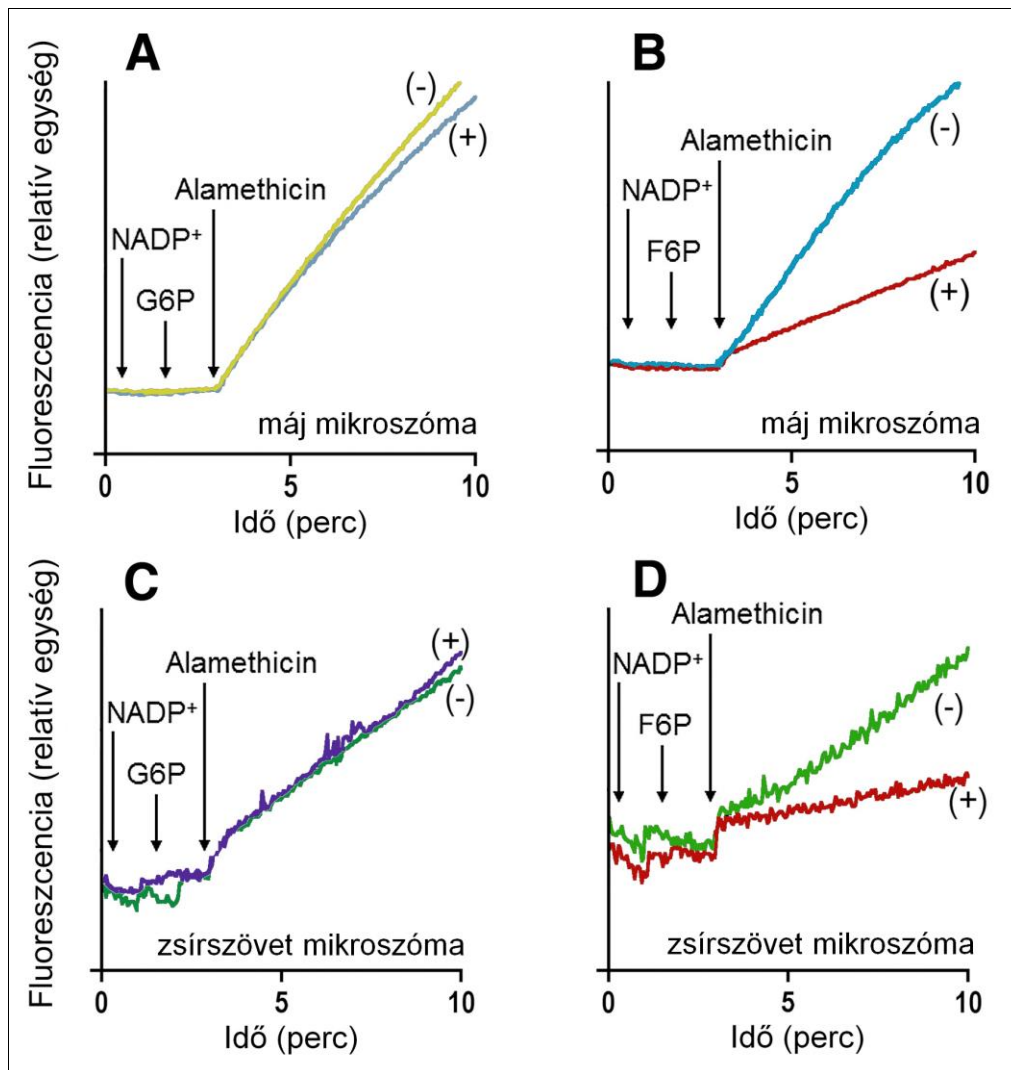
Intakt mikroszómában a F6P és a G6P nagyságrendileg azonos glukózforrás. A mikroszóma mosásával ebben az esetben is a külső felszínhez kötött izomeráz aktivitástól kívántunk megszabadulni. Egy mosási lépés intakt mikroszóma glukóztermelésében F6P-ból hatalmas, míg G6P-ból szerényebb visszaesést eredményezett. A mikroszóma glukóztermelő kapacitása ismételt mosási lépésekkel nem volt számottevően tovább csökkenthető.

4.1.3. F6P-függő NADPH- és 6-foszfo-glukonát-termelés máj- és zsírszövetből izolált mikroszómában

Miután meggyőződünk róla, hogy máj mikroszómában a F6P átalakul G6P-tá, és serkenti a lumenális kortizonredukciót, további bizonyítékot kerestünk arra, hogy a két jelenség összefügg, vagyis hogy a F6P-ból keletkező G6P a H6PD enzim által katalizált reakció révén szolgáltat NADPH-t a 11 β HSD1 számára. A zsírsejtek lokális kortizol-anyagcseréjének kiemelt jelentősége miatt vizsgálatainkat zsírszövetből származó mikroszómára is kiterjesztettük. A H6PD lumenális lokalizációja, illetve a mikroszomális membrán elhanyagolható piridin-nukleotid-áteresztőképesége miatt az enzim a kívülről hozzáadott NADP⁺-hez mindaddig nem fér hozzá, amíg a mikroszóma membránja intakt, az enzim aktivitása tehát szinte teljesen látens. Ha G6P és NADP⁺ hozzáadása után a lipid kettősréteget átjárhatóvá tesszük, intenzív NADPH-termelés indul meg, amit a fluoreszcens jel lineáris emelkedése mutat. Várakozásunknak megfelelően, és a kortizol- és glukóztermelés mérésekor kapott eredményeinkkel összhangban, a F6P a NADPH-termelés fokozásában is – a kontrollként alkalmazott G6P-hoz hasonlóan – hatékonyan bizonyult, mind máj-, mind zsírszövet eredetű mikroszómában (5. ábra).

E kísérleti felállásban az izomerizáció és a NADPH-termelés közötti összefüggést is sikerült igazolnunk. Fruktóz-1,6-biszfoszfáttal, a citoplazmatikus PGI ismert gátlószerével ugyanis a F6P-ból kiinduló NADPH-termelés szignifikáns mértékben csökkenthető volt, míg a G6P-tal inkubált mikroszóma NADPH-termelését a gátlószer nem befolyásolta (5. ábra).

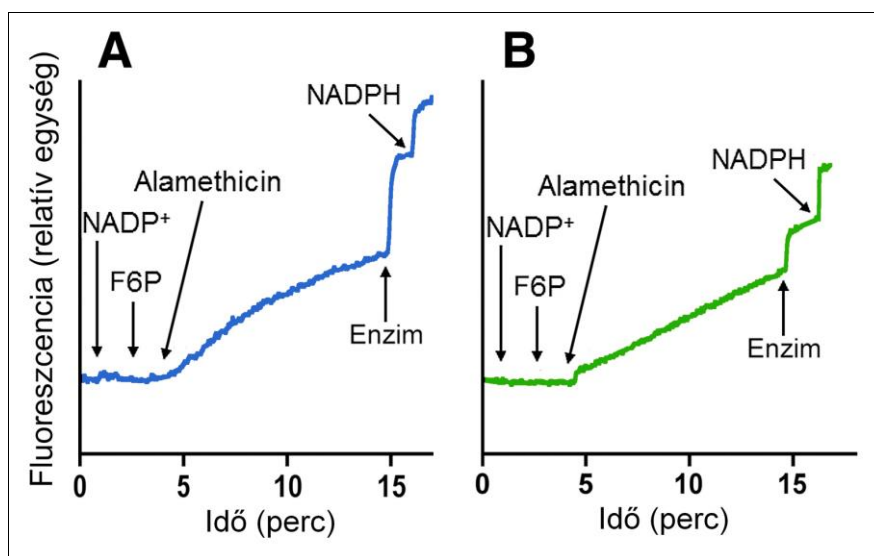
Annak megerősítése érdekében, hogy az észlelt NADPH-termelés valóban a G6P H6PD enzim általi oxidálásának tulajdonítható, megvizsgáltuk a F6P-ból kiinduló 6-foszfo-glukonát-termelést. Az eddigiekben alkalmazott modellt exogén 6-foszfo-glukonát-dehidrogenáz enzimmel egészítettük ki, és az általa katalizált reakciót szintén a termelő NADPH fluoreszcens mérésén keresztül detektáltuk. Máj- és zsírszövetből izolált mikroszómában egyaránt azt tapasztaltuk, hogy a F6P-ból kiinduló NADPH-termelés hasonló mennyiségű 6PG keletkezésével járt együtt, ami a H6PD szerepét bizonyítja (6. ábra).



5. ábra G6P-ból (A, C), illetve F6P-ból (B, D) kiinduló NADPH termelés máj- (A, B) és zsírszövet (C, D) eredetű mikroszómában, F1,6BP nélkül (–), illetve annak jelenlétében (+)

Aktivítások: A: $9,3 \pm 2,4$ (–) és $9,2 \pm 2,2$ (+) nmol/perc/mg fehérje
 B: $6,4 \pm 0,9$ (–) és $1,5 \pm 0,2$ (+) nmol/perc/mg fehérje
 C: $1,80 \pm 0,09$ (–) és $1,83 \pm 0,08$ (+) nmol/perc/mg fehérje
 D: $1,63 \pm 0,29$ (–) és $0,07 \pm 0,04$ (+) nmol/perc/mg fehérje

A F6P fokozza a NADPH termelését máj- és zsírszövetből izolált mikroszómában. A F6P-ból kiinduló folyamat (a G6P-ból kiindulóval ellentétben) gátolható a citoplazmatikus PGI inhibitorának hozzáadásával. Az ábrán reprezentatív kísérleti eredmények szerepelnek.



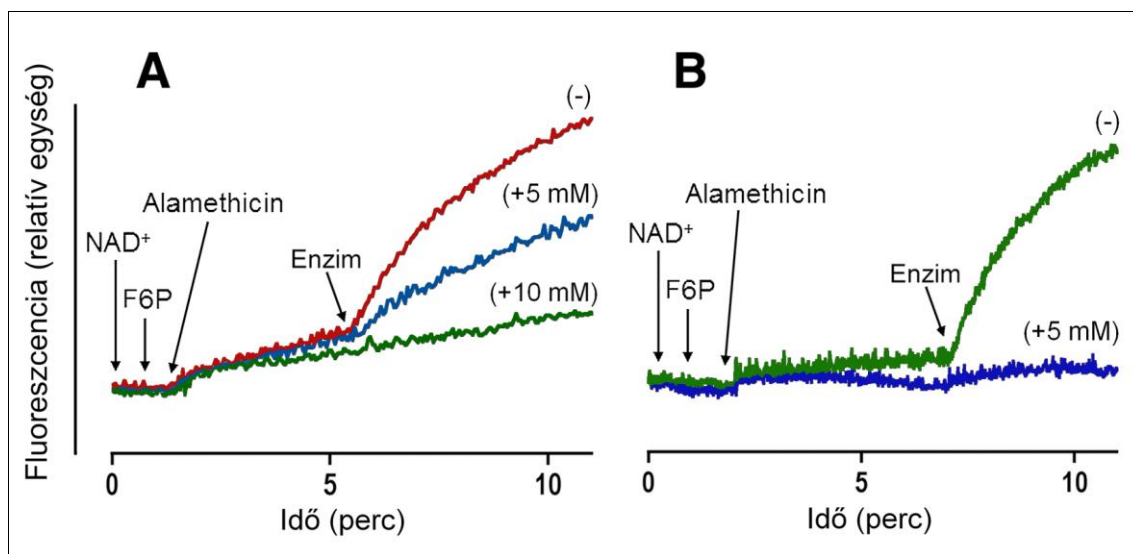
6. ábra F6P-függő 6PG termelés máj- (A), illetve zsírszövetből (B) izolált mikroszómában

G6P és NADP^+ jelenlétében a mikroszomális H6PD enzim 6PG-ot és NADPH-t termel. Előbbi jelenlétét a kívülről hozzáadott 6-foszfó-glukonát-dehidrogenáz általi intenzív NADPH-termelésfokozódás jelzi. A bemutatott ábra jellemző mérési eredményeket ábrázol.

4.1.4. Mikroszomális hexóz-6-foszfát izomeráz

Eredményeink a F6P G6P-tá alakulását bizonyítják máj-, illetve zsírszövetből izolált mikroszóma jelenlétében. Bár a vizsgált vezikulumok felszínéről eltávolítottuk a lazán asszociált citoplazmatikus fehérjéket, eddigi kísérleteink nem adnak választ arra a kérdésre, hogy ez az izomerizáció vajon az endoplazmás retikulum (és így a mikroszóma) membránjának lumenális, vagy sejtplazmai/külső oldalán zajlik-e. Ennek eldöntésére összehasonlítottuk a G6P termelésének sebességét intakt membránnal rendelkező, illetve permeabilizált mikroszómában, más szóval megvizsgáltuk a hexóz-6-foszfát izomeráz aktivitás latenciáját. Irodalmi adatok és saját korábbi megfigyeléseink szerint a H6PD enzim lényegesen (kb. 10-szer) kisebb affinitással rendelkezik NAD^+ , mint NADPH iránt, azaz a permeabilizált mikroszóma G6P jelenlétében igen kis sebességgel képes a hozzáadott NAD^+ koenzimet NADH-vá redukálni. Hasonlóan lassú

NADH-keletkezést detektáltunk, amikor a permeabilizált máj-, vagy zsírmikroszómát NAD^+ és F6P jelenlétében vizsgáltuk (7. ábra). Kb. 5-perces inkubálást követően G6P-ra és NAD^+ -ra specifikus, bakteriális (*Leuconostoc mesenteroides* eredetű) G6PD enzim adva az elegyhez, a NADH-termelés jelentős mértékű fokozódását tapasztaltuk. A jelenség alátámasztja a F6P hatékony izomerizációját G6P-tá permeabilizált mikroszómában. A korábbi méréseinkkel egybecsengő módon, a F1,6BP ebben a rendszerben is, mindkét szövetből izolált mikroszómában jelentősen gátolta a folyamatot (7. ábra).



7. ábra F6P-G6P izomerizáció máj- (A), illetve zsírszövetből (B) izolált, permeabilizált mikroszómában F1,6BP nélkül (–), illetve annak jelenlétében (+)

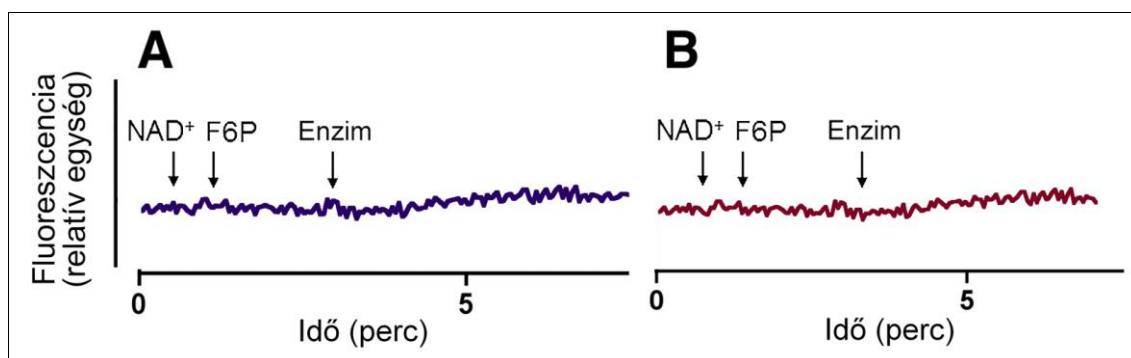
Aktivítások: A: $10,9 \pm 1,3$ (–), $4,7 \pm 0,5^*$ (+5 mM) és $1,5 \pm 0,4^*$ (+10 mM)

B: $12,2 \pm 2,0$ (–) és $0,7 \pm 0,4^*$ (+5 mM) nmol/perc/mg fehérje

(* $p < 0,01$ vs. kontroll)

A mikroszomális H6PD enzim G6P jelenlétében alacsony hatékonysággal NAD^+ koenzimet is képes használni, melyet a reakció közben NADH-vá redukál. A folyamat F6P jelenlétében is lezajlott. Intenzív NADH-termelés azonban csak az exogén G6PD hozzáadására kezdődött, ami – az enzim G6P-specifitása miatt – bizonyítja a F6P G6P-tá való átalakulását. Ezt erősíti az is, hogy a reakció a PGI inhibitorával (koncentrációfüggő mértékben) gátolható volt. Az ábrán reprezentatív kísérleti eredmények szerepelnek.

Ha azonban a fenti kísérletet a membrán permeabilizálása nélkül hajtottuk végre, a F6P-ot az intakt mikroszómához adva nem csupán az endogén H6PD általi NADH-termelés maradt el – amely magyarázható volna a membrán gyenge piridin-nukleotid-áteresztőképességével –, hanem a hozzáadott bakteriális G6PD is csak alig detektálható NADH-keletkezést eredményezett (8. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a vezikulumok külső felszínén zajló F6P-G6P átalakulás a lumenális izomerizációhoz viszonyítva elhanyagolható mértékű.



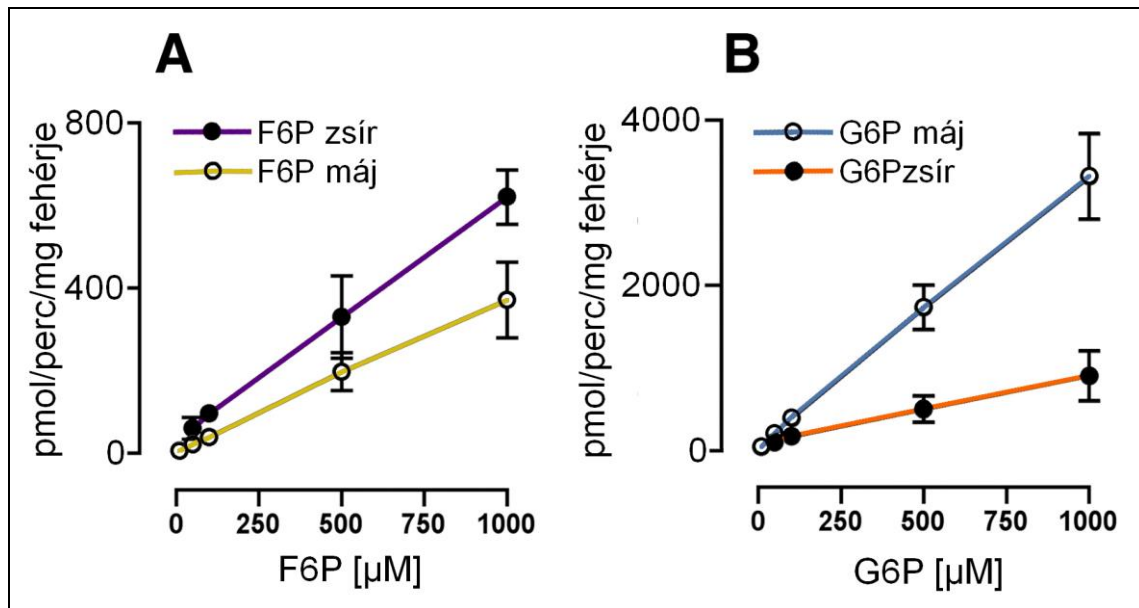
8. ábra F6P-G6P izomerizáció máj- (A), illetve zsírszövetből (B) izolált, intakt mikroszómában

Intakt membránnal rendelkező mikroszómához NAD^+ -ot és F6P-t adva gyakorlatilag nem mérhető NADH-termelés még az exogén G6PD jelenlétében sem. Ennek oka, hogy a kívülről hozzáadott NAD^+ a membránon nem képes bejutni, a külső felszínen történő F6P-G6P izomerizáció pedig elhanyagolható mértékű, vagyis az enzimet és szubsztrátját a mikroszomális membrán elválasztja egymástól. Az ábra jellemző kísérleti eredményeket mutat be.

4.1.5. F6P-transzport a mikroszomális membránon keresztül

Az intakt mikroszómához kívülről adott F6P körvonalazódó lumenális metabolizmusa csak úgy lehetséges, ha a vegyület – a G6P-hoz hasonlóan – képes átjutni az endoplazmás retikulum membránján. A transzport bizonyítása és alaposabb megismerése céljából összehasonlítottuk a G6P és a F6P felvételét máj-, valamint zsírszövetből izolált mikroszómapreparátumokon. A transzport kezdeti sebességét rapid filtrációs

technikával, fél perc inkubációs idővel határoztuk meg, hogy elkerüljük a G6P metabolitjainak (radioaktívan jelölt glukóz, illetve foszfo-glukonát) intravezikuláris felhalmozódását [111, 112]. A F6P, várakozásunknak megfelelően, jól mérhető sebességgel jutott be a mikroszóma lumenébe (9. ábra). A transzport aktivitás mindkét vizsgált szövet esetén a hozzáadott hexóz-foszfát koncentrációjával arányos volt. Zsírszövetből származó mikroszómában a F6P felvétele 1,7-szer nagyobb, míg a G6P felvétele 3,7-szer kisebb volt, mint máj mikroszómában. Másfelől zsírszövetben a G6P felvétele magasabb volt (nagyjából 1,4-szer), mint a F6P-é (9. ábra).

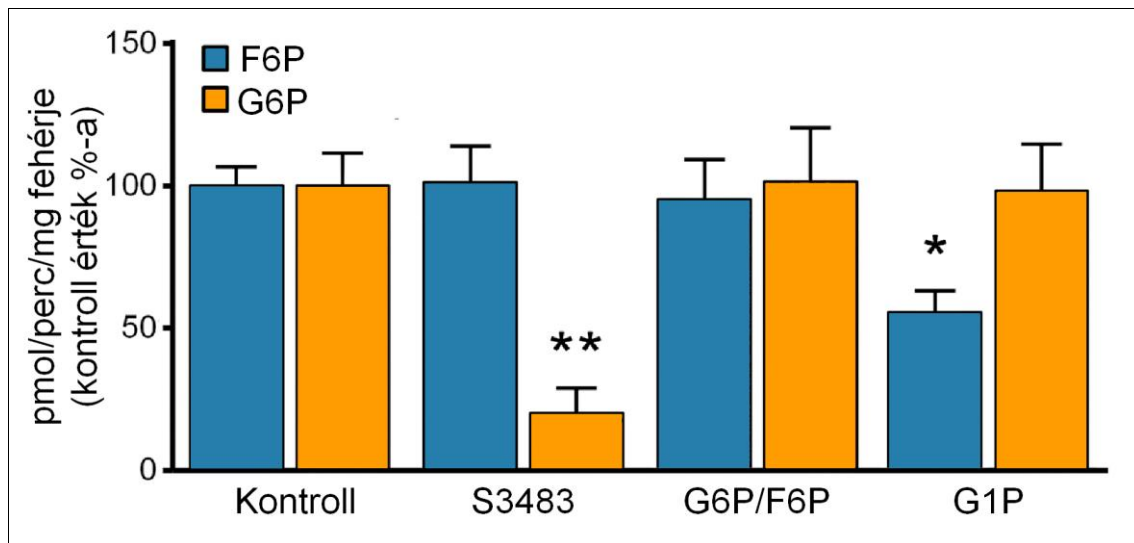


9. ábra F6P (A) és G6P (B) transzportja a mikroszomális membránon keresztül máj-, illetve zsírszövetből izolált mikroszóma lumenébe

A mikroszóma a F6P-ot, a G6P-hoz hasonlóan (annál kisebb kapacitással), koncentrációfüggő mértékben veszi fel. Az egyes hexóz-foszfátokat összehasonlítva a F6P felvétele zsír-, míg a G6P felvétele májszövetből izolált mikroszómában nagyobb.

Annak lehetőségét, hogy a F6P is a G6P ismert transzporterén keresztül jut be a mikroszóma lumenébe, a transzport gátlásának vizsgálatával közelítettük meg. A G6PT szelektív gátlószere, az S3483 [109, 113] a vártak megfelelően gátolta a G6P transzportját, a F6P-ét ellenben nem befolyásolta (10. ábra). Ráadásul a két hexóz-foszfát magas (kompetitív) koncentrációban alkalmazva sem gátolta egymás bejutását, ami szintén a két vegyület eltérő transzportútja mellett szól (10. ábra).

A F6P felvételének további lehetséges módja a nem specifikus glukóz-foszfát transzporterén (GPT) keresztül való bejutás, ahogy azt korábban már humán fibrocita mintákban leírták [114]. E lehetőség ellenőrzésére megmértük a G6P és a F6P transzportját, magas koncentrációban alkalmazott G1P jelenlétében, ami az említett transzporter ismert ligandja, így mindkét vizsgált hexóz-foszfát transzportjának potenciális kompetitív gátlószere. Míg a molekula jelenléte a G6P felvételére nem volt hatással, a F6P transzportjának sebességét közel felére (55%-ára) csökkentette (10. ábra).



10. ábra F6P és G6P transzportjának gátlása

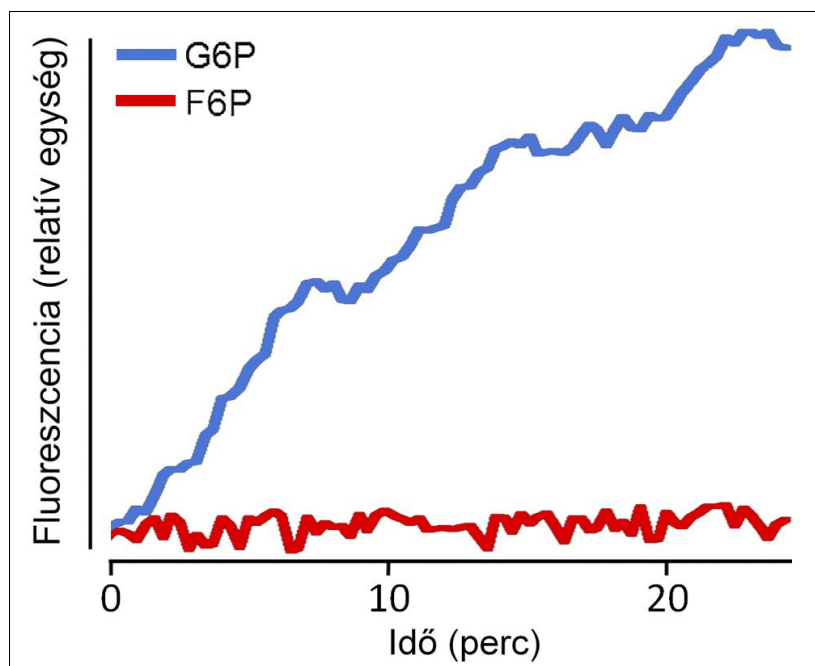
(* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$)

A transzport mérésekben nem befolyásolja a F6P bejutását a lumenbe sem a G6PT inhibitora, sem a G6P kompetitív koncentrációja. Ezzel szemben nagyjából felére (55%-ára) csökkentette a transzportot a G1P jelenléte, ami azonban a G6P bejutását nem befolyásolta. Az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a F6P és a G6P különböző transzporter fehérjéken keresztül kerülnek az endoplazmás retikulumba.

4.1.6. A mikroszomális hexóz-foszfát-izomeráz vizsgálata HEK-293 sejtekben

4.1.6.1. A F6P nem szubsztrátja a H6PD enzimnek

Felmerül a kérdés, hogy a F6P képes lehet-e átalakulás nélkül, mint ketóz-foszfát, önmagában a H6PD enzim szubsztrátjaként szolgálni. A kérdés megválaszolásához svájci kooperációs partnereink a Baseli Egyetem Gyógyszerészeti Intézetében HEK-293 sejtekben termeltetett, majd affinitás tisztítással kinyert humán H6PD működését vizsgálták. A kísérleteket. A tisztított enzimet NADP^+ , valamint G6P, vagy F6P jelenlétében inkubálták, és fluorimetriás módszerrel detektálták a NADPH-termelést. E kísérleti összeállításban, vagyis egyéb mikroszomális enzimek hiányában, a H6PD aktivitása kizárólag G6P esetén volt észlelhető (11. ábra).

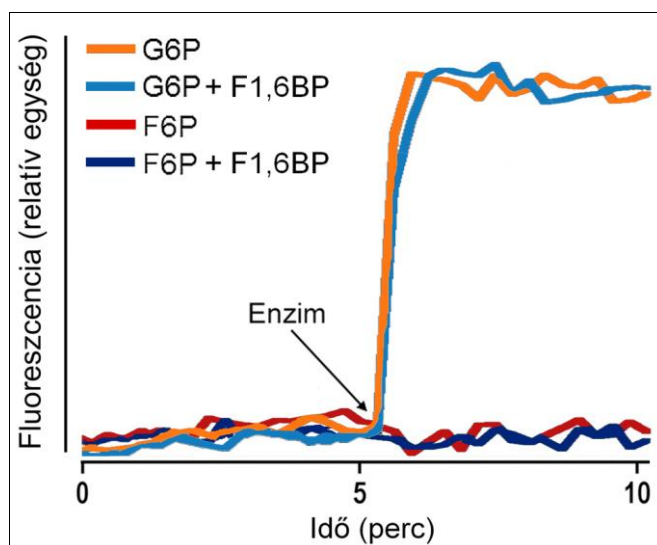


11. ábra H6PD aktivitása NADP^+ koenzim, ill. G6P, vagy F6P szubsztrát jelenlétében

A tisztított H6PD kizárólag G6P jelenlétében mutat aktivitást (NADPH termelést), vagyis a F6P önmagában nem képes szubsztrátként szolgálni az enzim számára. Az ábra a kísérlet egy tipikus eredményét mutatja.

4.1.6.2. A F6P-G6P izomerizációt nem a H6PD katalizálja

A tisztított H6PD fehérjével kapott eredmények azt mutatják, hogy az enzim nem képes a F6P felhasználására, így nyilván annak G6P-tá való átalakítását sem katalizálja. Ennek megerősítésére a tisztított enzim mellett ismét bakteriális eredetű (*Leuconostoc mesenteroides*) G6PD enzimet használtunk, amely G6P felhasználásával NAD^+ -ból NADH-t termel. Az előbbi pontban leírt mérést tehát úgy módosítottuk, hogy NADP^+ helyett NAD^+ -ot használtunk, amelyet – várakozásainknak megfelelően – az izolált H6PD nem redukált. Az öt perc inkubálási idő után hozzáadott, NAD^+ -specifikus, bakteriális enzim NADH-termelése kizárólag G6P alkalmazásakor volt észlelhető, ami azt bizonyítja, hogy számottevő mennyiségű F6P nem alakult át G6P-tá a humán H6PD jelenlétében. A reakció sebességét ráadásul az izomeráz aktivitás gátlószere, a F1,6BP jelenléte sem befolyásolta (12. ábra).

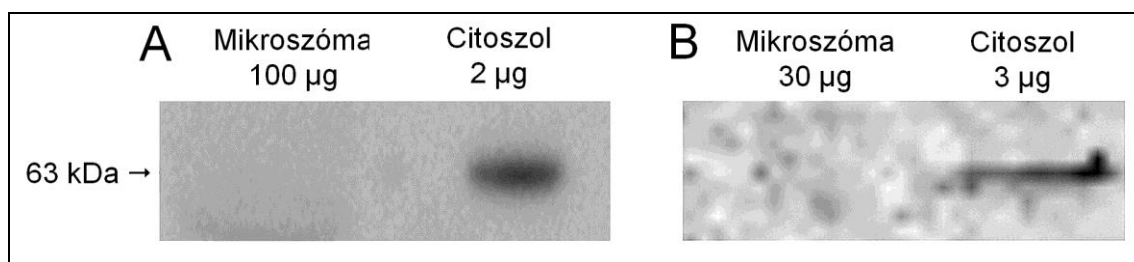


12. ábra Bakteriális G6PD NADH termelése G6P, vagy F6P szubsztrátok mellett, H6PD jelenlétében

A G6P- és NAD^+ -specifikus G6PD enzim aktivitását (NADH termelését) mértük, tisztított H6PD jelenlétében. Az ábrán a kísérlet egy jellemző eredménye szerepel. Mivel csak G6P mellett volt NADH-termelés, kizárható, hogy a H6PD enzim F6P-G6P átalakulást katalizálna. Az aktivitásokat nem befolyásolta a F1,6BP jelenléte sem, amivel az izomerizáció gátolható.

4.1.6.3. Önálló, mikroszomális hexóz-foszfát-izomeráz aktivitás

Korábbi, mikroszomális méréseink az endoplazmás retikulum lumenében zajló hexóz-foszfát izomerizáció mellett szólnak. További vizsgálatokat folytattunk HEK-293 sejteken annak megerősítésére, hogy a megfigyelt G6P-F6P izomerizációt nem a citoszolikus PGI enzim katalizálja. Elválasztottuk egymástól a sejtek mikroszomális, illetve citoplazmatikus frakcióit, majd a feltárt fehérjepreparátumokat egyrészt immunoblot módszerrel, másrészt enzimaktivitás-mérésekkel hasonlítottuk össze. A két preparátum hexóz-foszfát-izomeráz aktivitása gyakorlatilag megegyezett (4.1.4. fejezet), ezzel szemben immunoblot módszerrel, a citoszolikus PGI elleni antitesttel kizárólag a sejtplazmai frakciókban kaptunk jelet, dacára annak, hogy a mikroszomális fehérjepreparátumokból – a kétségek kizárására – tízszeres, illetve ötvenszeres fehérjemennyiségeket alkalmaztunk (13. ábra).

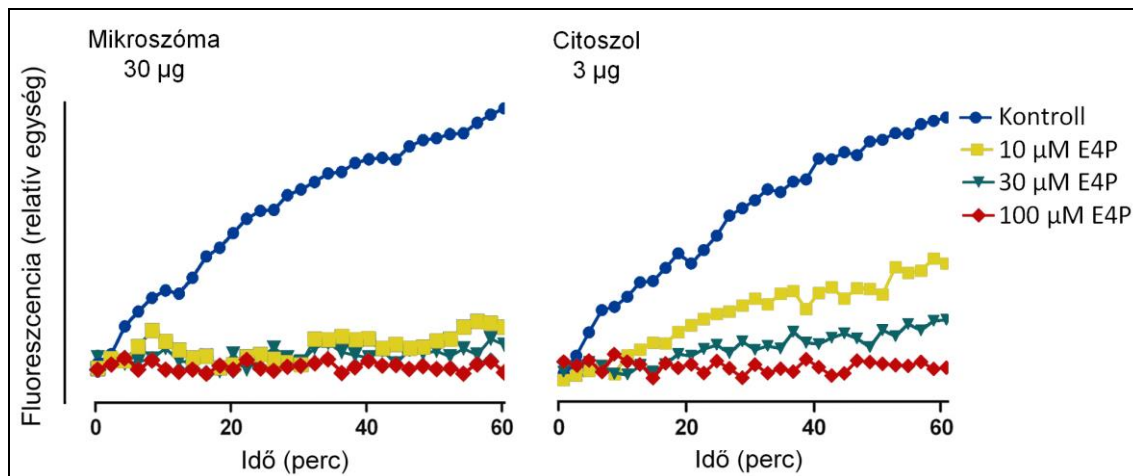


13. ábra PGI immunoblot

Mikroszomális, illetve citoplazmatikus frakciók vizsgálata patkány (A) és humán (B) PGI ellen termeltetett antitestekkel. Az ábra a kísérlet egyik tipikus eredményét mutatja. Az esetleges mennyiségi eltérések miatt jóval többet futtattunk a mikroszóma preparátumokból, jelet azonban így is csak a sejtplazmai frakciókban kaptunk. Az immunoblot alapján kizárható, hogy ugyanaz a fehérje lenne jelen a sejtplazmában és az endoplazmás retikulumban.

Megvizsgáltuk továbbá, hogy mennyire befolyásolja a két különböző sejtfrakció hexóz-foszfát izomeráz aktivitását az eritróz-4-foszfát (E4P), a F1,6BP mellett a humán citoszolikus PGI egy másik lehetséges inhibitora [115]. A korábbi kísérleti összeállításokhoz hasonlóan, kívülről hozzáadott G6PD enzimet alkalmaztunk, majd mértük a keletkező NADH mennyiségét. E4P jelenléte nélkül mindkét sejtfrakcióban hasonló

mértékű, időfüggő aktivitást detektáltunk. Ezzel szemben a gátlószer a mikroszomális izomeráz aktivitást lényegesen hatékonyabban csökkentette, mint a sejtplazmait (14. ábra).



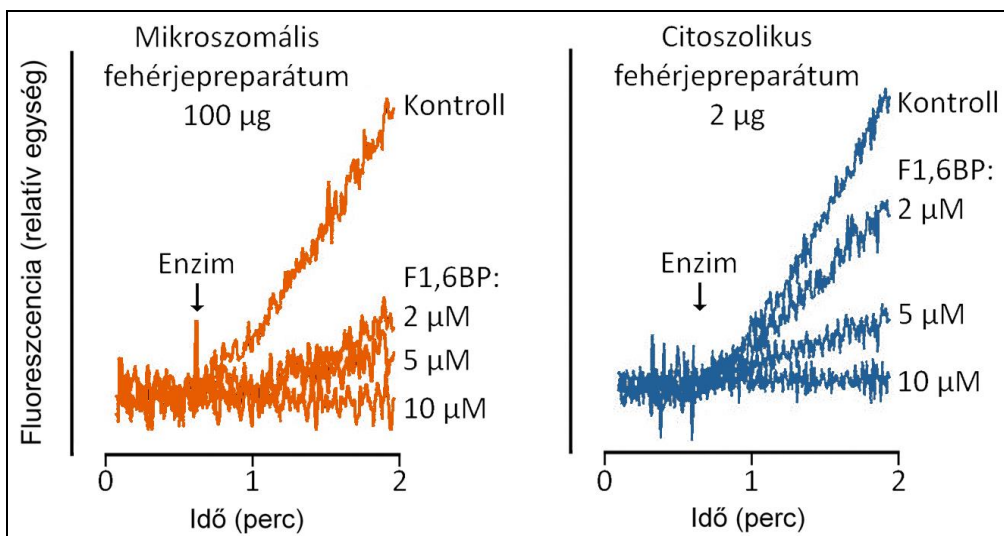
14. ábra Sejtfrakciók hexóz-foszfát izomeráz aktivitásának gátlása E4P segítségével

Az ábra két jellegzetes mérési eredményt mutat. A Mikroszomális, illetve citoplazmai preparátumok összehasonlításakor a mikroszomálisból tízszeres mennyiséget alkalmaztunk, hogy az esetleg gyengébb hatás is jól detektálható legyen. Az E4P az izomeráz aktivitást mindkét sejtfrakcióban hatékonyan, koncentrációfüggő módon gátolta; mikroszómában a citoplazmainál nagyobb mértékben.

Hasonló eredményeket kaptunk F1,6BP gátlószerként való alkalmazásával, mind HEK-293, mind patkány májból származó mikroszomális, illetve citoplazmai fehérje-preparátumok összehasonlításakor (15. ábra).

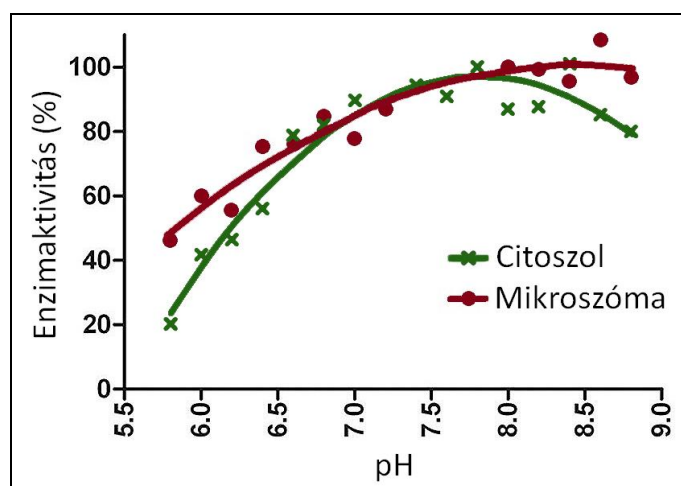
4.1.6.4. pH-érzékenység

Ezek alapján úgy tűnik, hogy a mikroszomális és citoplazmai hexóz-foszfát izomeráz különböző kinetikai paraméterekkel rendelkeznek. A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy vajon a két enzim hasonló mértékben tolerálja-e a környezet pH értékének ingadozását. Megállapítottuk, hogy a mikroszomális fehérje kevésbé szenzitív a pH-változásra, mint a citoplazmai, mintegy kétszeres relatív aktivitást mutatva alacsony pH értékek mellett (16. ábra). Az eltérő pH-érzékenység szintén a két sejtfrakcióból származó izomeráz különbözőségére utal.



15. ábra Sejtfrakciók hexóz-foszfát izomeráz aktivitásának gátlása F1,6BP segítségével

Az előző kísérleti összeállításhoz hasonlóan, a hatás biztos detektálhatóságának érdekében a mikroszómából nagyobb, ötvenszeres mennyiséget használtunk. A F1,6BP inhibítorként való alkalmazása az E4P-hoz hasonló eredményhez vezetett: mindkét esetben koncentráció-függésben, a mikroszomális frakcióban hatékonyabban gátolta az aktivitást. Az ábra két jellemző kísérleti eredményt mutat be.



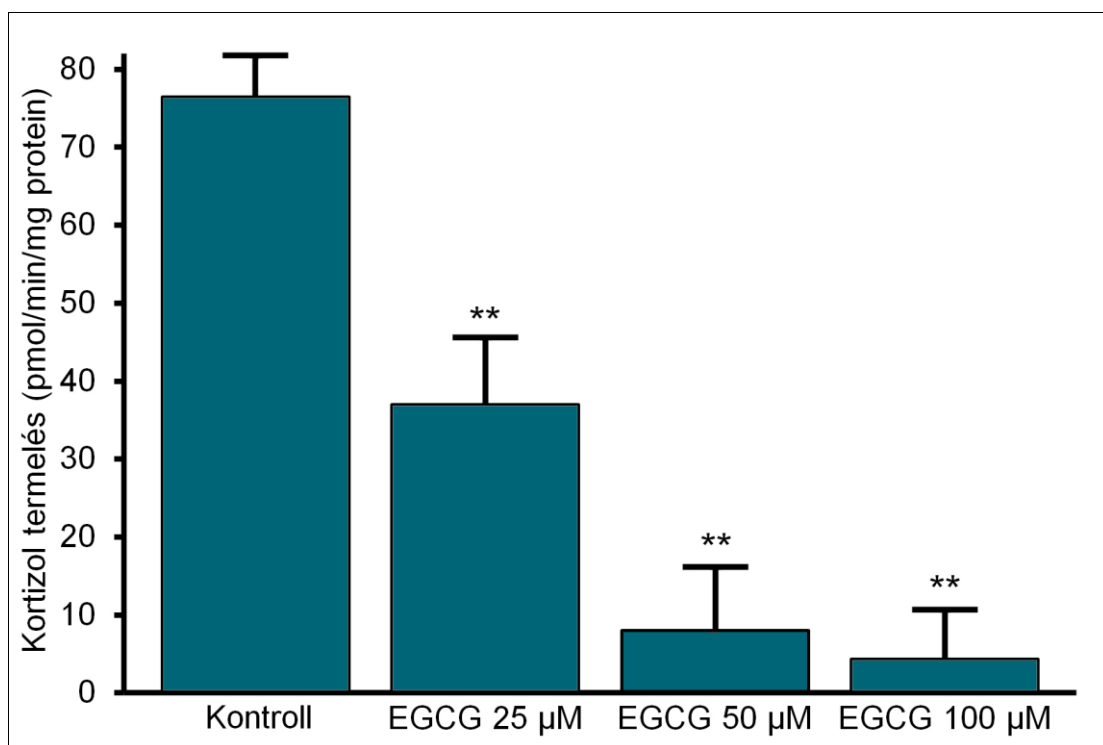
16. ábra pH-érzékenység

A két sejtfrakcióból származó fehérjepreparátumokat 50 percig inkubáltuk különböző pH értékű pufferekben, majd megmértük az izomeráz-aktivitásokat. A mikroszomális enzim alacsonyabb pH-érzékenységet, illetve szélsőséges pH értékek mellett magasabb aktivitást mutatott. A mérési pontok a párhuzamos minták középértékeit ábrázolják.

4.2. EGCG

4.2.1. EGCG koncentrációfüggő gátló hatása a mikroszomális kortizoltermelésre

Az EGCG lehetséges hatását először a G6PT-H6PD-11 β HSD1 katalitikus triád egészére, vagyis az endoplazmás retikulum kortizonredukáló apparátusának működésére vizsgáltuk. Patkány májból izolált, intakt mikroszóma vezikulumokat inkubáltunk kortizon és G6P jelenlétében 30 percen keresztül, majd HPLC-vel mértük a keletkezett kortizol mennyiségét. Az EGCG-kezelés koncentrációfüggően, szignifikáns mértékben gátolta a kortizon kortizollá való redukcióját. A kezeletlen mikroszómához képest 25 μ M EGCG kevesebb mint felére csökkentette a kortizoltermelés sebességét, 50 μ M-nál magasabb koncentrációk alkalmazása mellett pedig a keletkezett kortizol mennyisége már alig volt detektálható (17. ábra).



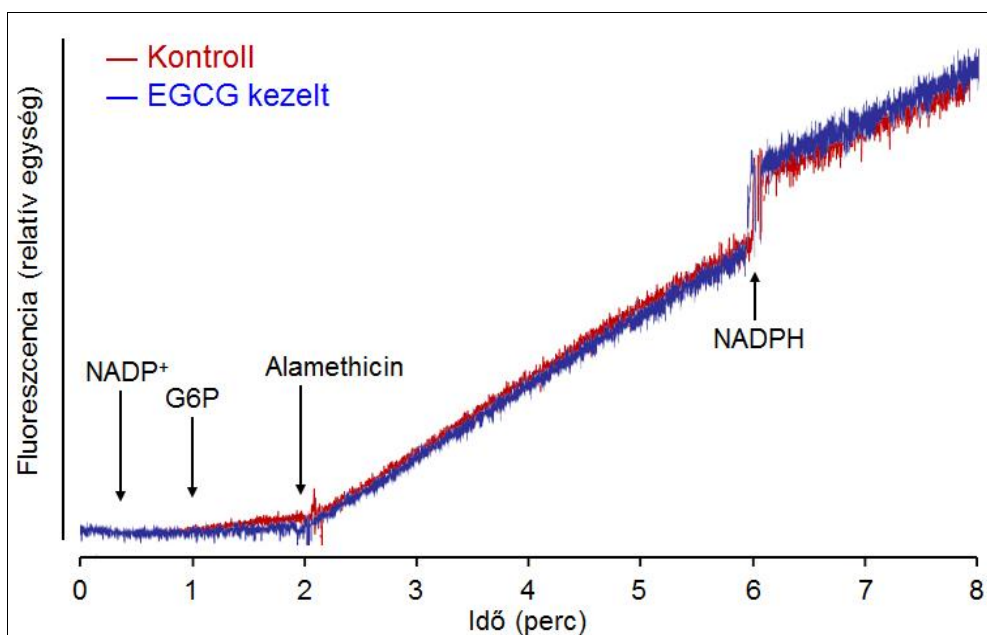
17. ábra EGCG hatása a kortizoltermelésre intakt máj mikroszómában

*Átlag + SEM; n = 3; **p < 0,01 vs. kontroll*

Az EGCG koncentrációfüggő mértékben, de már 25 μ M mellett is szignifikánsan gátolta a mikroszóma kortizoltermelését.

4.2.2. EGCG hatása a G6PT-H6PD-11 β HSD1 katalitikus triád fehérjekomponenseire

Miután a katalitikus triád egészének működését mérve markáns gátló hatást tapasztaltunk, a molekuláris támadáspont azonosítása céljából megvizsgáltuk az EGCG specifikus hatását a rendszer egyes fehérjekomponenseire külön-külön is. A mikroszóma G6P-felvételének, vagyis a G6PT működésének gátlását korábban már kizártuk [116], így maradt a két luminális dehidrogenáz enzim lehetséges közvetlen gátlása. A mikroszomális membrán permeabilizálásával a H6PD és 11 β HSD1 funkcionálisan szétkapcsolható, tehát aktivitásuk egymástól függetlenül tanulmányozható. Ráadásul ilyenkor a két enzim szabadon hozzáfér a kívülről hozzáadott kofaktoraihoz (NADP⁺/NADPH), vagyis aktivitásuk látenciája is megszűnik.

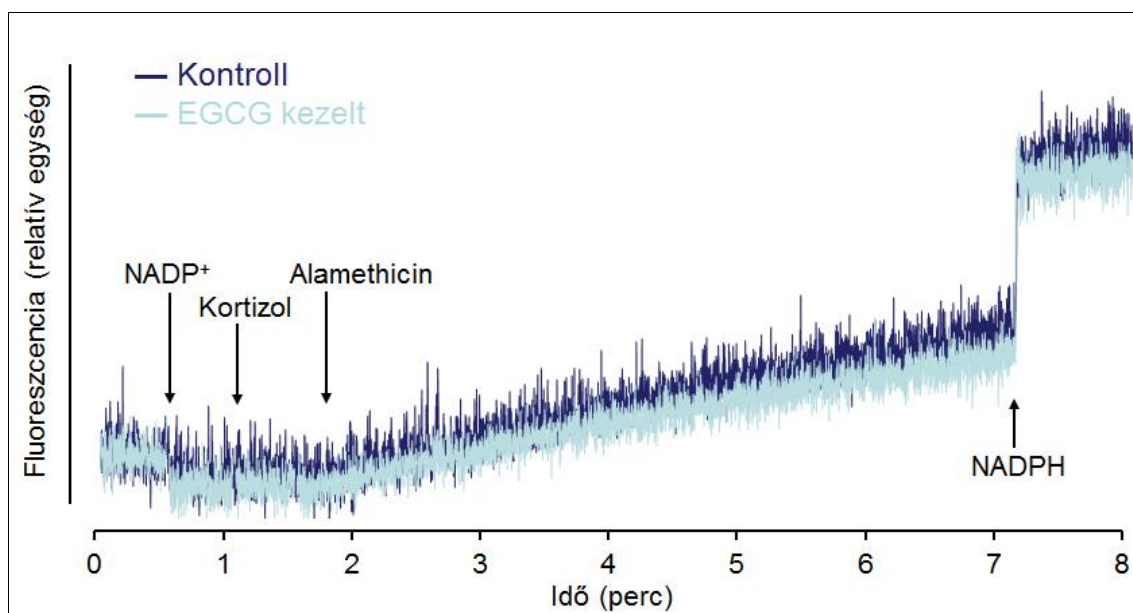


18. ábra EGCG hatása a H6PD aktivitására patkány májból izolált mikroszómában

Kontroll: $5,77 \pm 0,4$; EGCG: $5,76 \pm 0,65$ nmol/perc/mg fehérje

Enzimaktivitás a membrán permeabilizálásától (alamethicinnel) kezdve mérhető, ekkor a hozzáadott NADP⁺ szabadon beáramolhat a lumenbe. A nagy koncentrációban (100 μ M) alkalmazott EGCG az enzim működését nem befolyásolta. Az aktivitásokat a NADPH standard fluoreszcencia intenzitás emelkedéséből számoltuk ki. A bemutatott ábra egy jellemző mérési eredményt ábrázol.

Patkány máj eredetű mikroszómát NADP^+ jelenlétében G6P-tal (a H6PD vizsgálatához), vagy kortizollal (a $11\beta\text{HSD1}$ vizsgálatához) kezeltünk, és az enzimaktivitásokat a NADPH termelődésének valós-idejű fluoreszcens nyomon követése alapján határoztuk meg. Mindkét vizsgált enzim maximális látenciát mutatott, vagyis aktivitásuk csak a membrán permeabilizálásától kezdődően volt mérhető (18. és 19. ábra). Ez egyrészt a mikroszóma membránjának épségét mutatja a kísérlet elején, másrészt kizárja az esetleges zavaró, extravezikuláris aktivitás(ok)at is. A fluoreszcens jel lineáris emelkedése a H6PD, illetve $11\beta\text{HSD1}$ által katalizált NADPH-termelésnek felel meg. Permeabilizált mikroszómában a H6PD aktivitását gyakorlatilag még magas ($100\ \mu\text{M}$) koncentrációjú EGCG jelenléte sem befolyásolta (0,2%-os gátlás) (18. ábra), és a $11\beta\text{HSD1}$ működésében is csak kis mértékű (17%-os) gátlást tapasztaltunk (19. ábra).

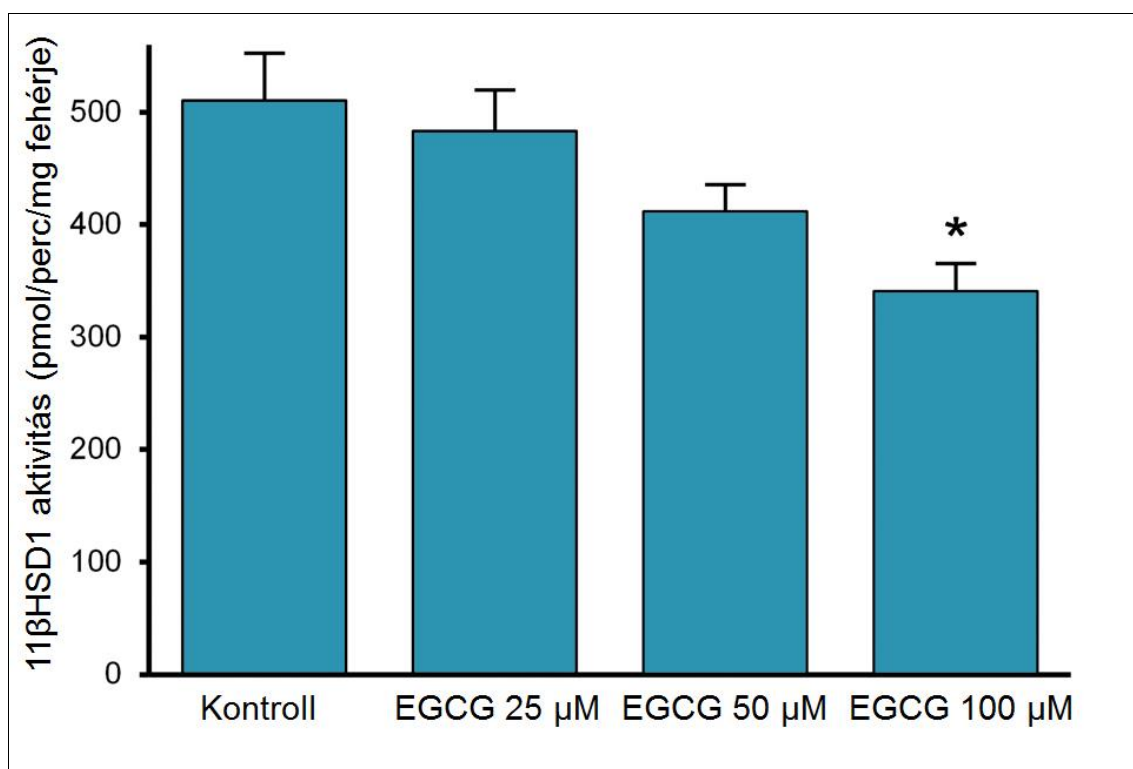


19. ábra EGCG hatása a $11\beta\text{HSD1}$ aktivitására (fluoreszcencia)

Kontroll: $0,82 \pm 0,03$; EGCG: $0,68 \pm 0,05$ nmol/perc/mg fehérje

A kísérletet a szubsztrátok hozzáadásával kezdtük, enzimaktivitás azonban csak a membrán permeabilizálásának pillanatától (alamethicin hozzáadása), vagyis a NADP^+ szabad beáramlásától mérhető. Az EGCG a magas, $100\ \mu\text{M}$ -os koncentráció ellenére is csak elhanyagolható mértékű gátló hatást fejtett ki a $11\beta\text{HSD1}$ -re. Az enzimaktivitásokat a hozzáadott NADPH standard által okozott fluoreszcencia intenzitás emelkedés alapján számoltuk ki. Az ábra egy tipikus kísérleti eredményt mutat.

E csekély, gátló hatást a kortizon-kortizol átalakulás 30 perces inkubációt követő, HPLC-vel végzett meghatározásával is megerősítettük. A fluoreszcens mérés eredményeivel összhangban, az EGCG a kortizon-kortizol átalakulásban csupán enyhe visszaesést eredményezett, statisztikailag szignifikáns, 30% körüli gátlást csak a legmagasabb (100 μM) koncentráció mellett tapasztaltunk (20. ábra), ám ez a hatás még mindig messze elmarad az intakt mikroszóma EGCG-kezelésekor kapott eredményeinktől (17. ábra).



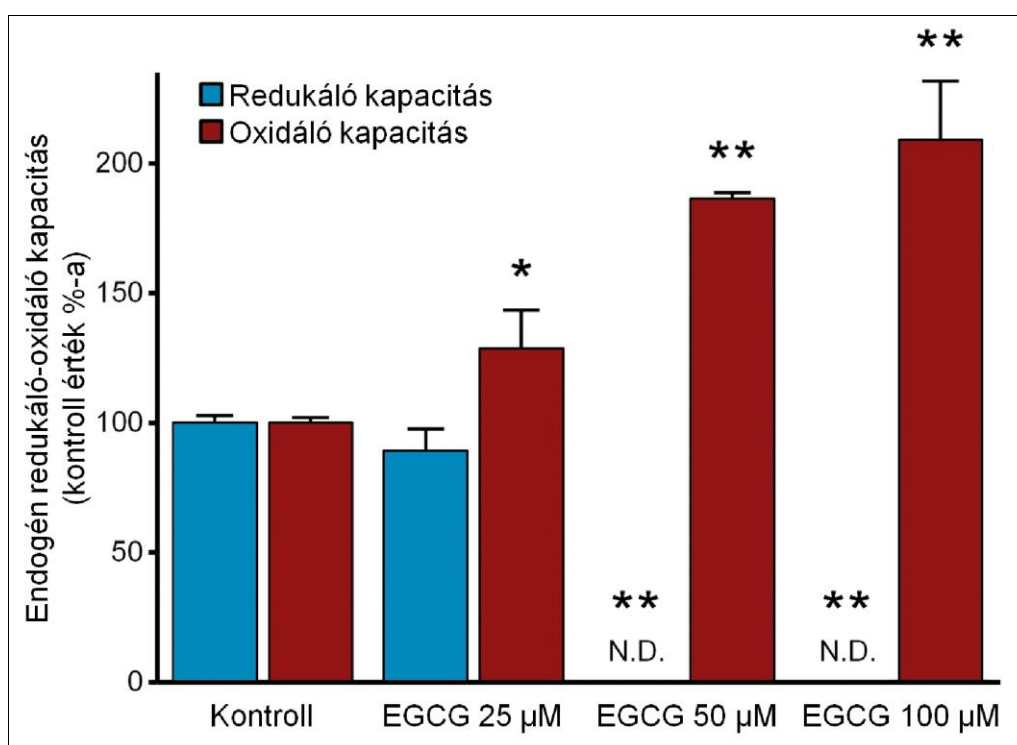
20. ábra EGCG hatása a 11βHSD1 aktivitására (HPLC)

Átlag + SEM; n = 3; *p < 0,05 vs. kontroll

Az előzőekhez hasonlóan permeabilizált mikroszómaiban mértük a 11βHSD1 aktivitását, ez esetben nem a NADPH keletkezése, hanem a hormonátalakulás alapján: a reakciók végeztével HPLC segítségével meghatároztuk a kortizon- és kortizolszinteket. Az EGCG-kezelés koncentrációfüggő hatást mutatott. Szignifikáns gátlást csak magas (100 μM) koncentrációval lehetett elérni, ez azonban még sem közelíti az intakt mikroszóma kapott eredményeket.

4.2.3. A luminális redox állapot eltolódása EGCG-kezelt mikroszómában

Az a tény, hogy az EGCG jelentős gátló hatása csak a mikroszóma membránjának sértetlensége, vagyis a H6PD és 11 β HSD1 enzimek kapcsolt működése, és a kortizoltermelő apparátus fiziológiás egysége esetén észlelhető, arra enged következtetni, hogy a hatás valamiképpen összefügg az endoplazmás retikulum saját, a környezettől független piridin-nukleotid készletével. Mint azt korábban a metirapon példáján bizonyítottuk, a luminális NADPH oxidációja nem csak gátolja a kortizon-kortizol átalakulást, hanem serkenti az ellentétes irányú kortizol-kortizon konverziót [57].



21. ábra EGCG hatása a máj mikroszóma endogén redukáló-oxidáló kapacitására

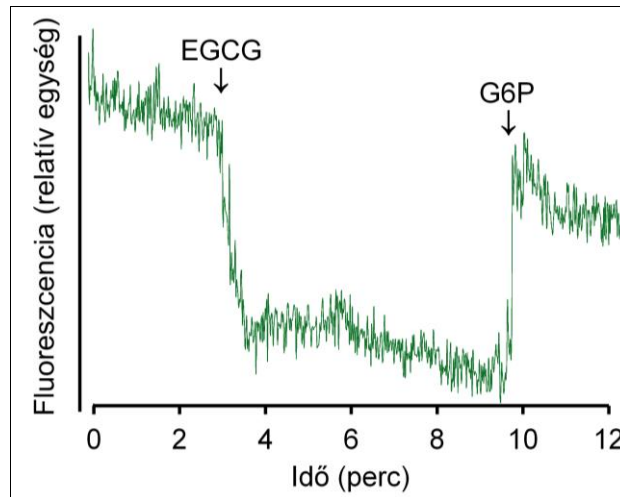
Átlag + SEM; $n = 3$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. kontroll

ND: nem detektálható (kontroll érték 1%-a alatt)

A mikroszóma redukáló kapacitását, mely jelen kísérleti összeállításban a luminális NADPH-készlet függvénye, az EGCG erősen gátolta: 50 µM, vagy magasabb koncentrációjú EGCG alkalmazása mellett nem volt mérhető kortizoltermelés. A vegyület ezzel párhuzamosan az oxidáló kapacitást, mely a mikroszóma belső NADP⁺-készletétől függ, szignifikánsan, koncentrációfüggő mértékben növelte.

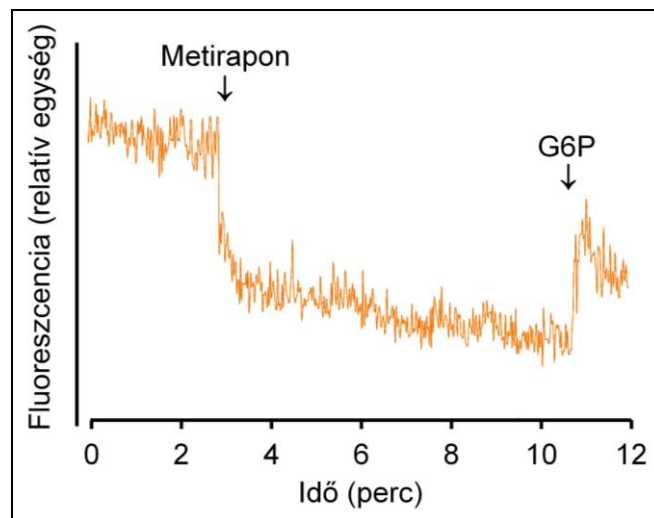
A luminális redox állapot megváltozásának tanulmányozását a mikroszóma endogén redukáló-oxidáló kapacitásának mérésével kezdtük, vagyis annak vizsgálatával, hogy a preparátum kívülről hozzáadott redukáló erő híján, kizárólag saját forrásból mennyi kortizonredukcióra, illetve kortizoloxidációra képes. Mivel az EGCG-kezelés a résztvevő fehérjék működését egyenként alapvetően nem befolyásolta, a luminális redox viszonyok ilyen közvetett vizsgálatától is megbízható eredményt várhattunk. Intakt mikroszómát inkubáltunk tehát 2 órán keresztül kortizonnal, vagy kortizollal, és folyadékkromatográfiával (HPLC) mértük az átalakulás mértékét, amely így kizárólag a vezikulumok endogén redukáló, illetve oxidáló képességének (alapvetően a luminális NADPH és NADP^+ mennyiségének) függvénye volt. A kortizon-redukáló kapacitást az EGCG-kezelés igen jelentősen és koncentrációfüggően csökkentette. A hatás már 25 μM mellett is szignifikáns volt, és 50 μM , vagy annál magasabb koncentrációk alkalmazásával a kortizoltermelés egyáltalán nem volt detektálható. A zöldtea flavanol ugyanakkor a kortizol oxidációját, vagyis az előzővel ellentétes átalakulást nagymértékben serkentette. A hatás telíthető volt: 50 μM EGCG hozzáadásával a kortizon termelésének mértéke a duplájánál is magasabb szintre emelkedett, ez azonban a koncentráció további emelésével nem növekedett tovább (21. ábra).

Az endogén kortizon-kortizol átalakulás kortizon irányába való eltolódása feltehetőleg a luminális piridin-nukleotidok oxidációjának köszönhető. Ezért a mikroszóma belső NADPH-szintjének változásait, fluorimetriás mérések segítségével, közvetlenül is megvizsgáltuk. Korábban igazoltuk, hogy intakt mikroszomális vezikulumok saját NADPH-szintje, illetve annak változásai valós időben, fluoriméterben detektálhatók [67]. A fluoreszcens jel szintjében EGCG hozzáadása nagymértékű csökkenést eredményezett, ami G6P-tal részlegesen helyreállítható volt (22. ábra). A megfigyelt jelenség alátámasztja a zöldtea flavanolnak a luminális NADPH-ra gyakorolt, feltételezett oxidáló hatását. Az EGCG hatására keletkezett NADP^+ G6P hozzáadása után ismét NADPH-vá alakul vissza. Hasonló redox eltolódást váltott ki metirapon (23. ábra), vagy kortizon hozzáadása is, több korábbi kutatás eredményeivel összhangban [67, 86]. Az észlelt jelenség enzimatisma jellegét támasztja alá – és egyben az EGCG és a NADPH floreszcens interferenciáját zárja ki –, hogy, mikor hasonló kísérleti összeállításban az EGCG-t fehérjementes NADPH oldathoz adtuk, a mikroszómában megfigyelt NADPH-oxidáció nem volt észlelhető.



22. ábra EGCG hatása a mikroszóma luminális NADPH-készletére

EGCG ($100\ \mu\text{M}$) hozzáadása a mikroszómához a belső NADPH-készlet szintjének csökkenését eredményezi, ami G6P ($100\ \mu\text{M}$) hozzáadásával részben ellensúlyozható. A bemutatott ábra egy jellegzetes kísérleti eredményt ábrázol.

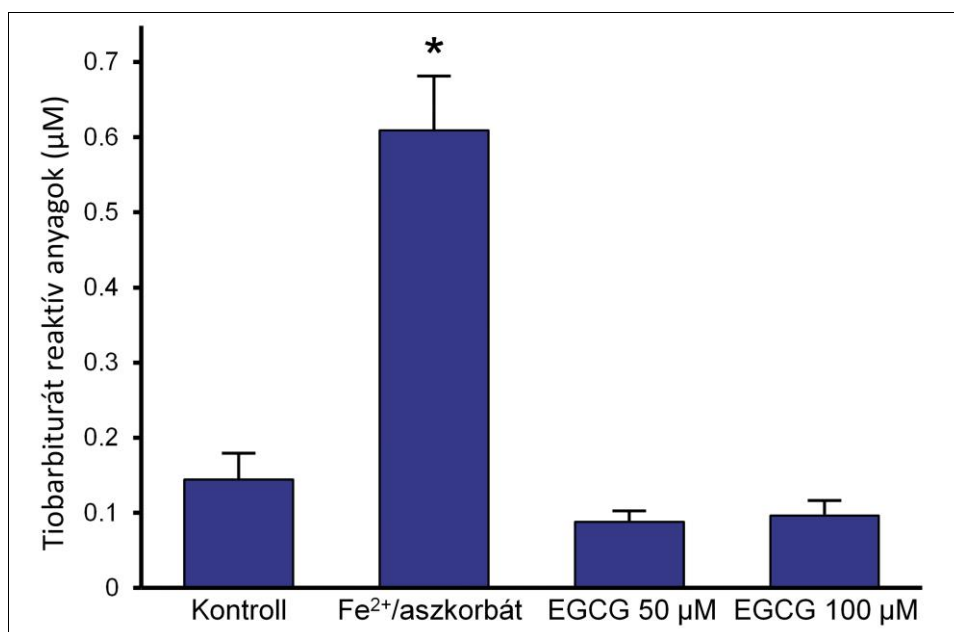


23. ábra Metirapon hatása a mikroszóma luminális NADPH-készletére

A metirapon (egyik mellékhatása), hogy csökkenti a mikroszóma luminális NADPH-szintjét. Az endogén NADPH mennyisége G6P hozzáadásával részlegesen visszaállítható. Mivel EGCG hozzáadására nagyon hasonló eredményt kaptunk, a metirapon ismert hatásának újbóli mérése az EGCG-kezelés kontrolljának tekinthető. A metirapont $10\ \mu\text{M}$, a G6P-t $100\ \mu\text{M}$ végkoncentrációban alkalmaztuk. Az ábrán a kísérlet egy jellemző mérési eredménye szerepel.

4.2.4. EGCG hatása a mikroszóma lipidperoxidációjára

Mivel a flavanokok, más antioxidáns vegyületekhez hasonlóan, oxigén jelenlétében prooxidáns aktivitással is rendelkeznek [117], a luminális piridin-nukleotidokat érintő oxidatív eltolódás akár egy esetleges, általános oxidatív hatás részjelensége is lehet. Ennek ellenőrzésére megvizsgáltuk az EGCG lipidperoxidációra kifejtett hatását, és összehasonlítottuk Fe^{2+} /aszorbát kezeléssel, mint pozitív kontrollal, megmérve a tiobarbiturát reaktív anyagok (TBARS) szintjét patkány máj mikroszómában. A tea flavanokok alapvető antioxidáns tulajdonságainak megfelelően [118] az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között antioxidánsként, és nem oxidánsként viselkedett, ugyanis nem növelte (sőt, némiképp csökkentette, bár nem szignifikáns mértékben) a membránlipidek peroxidációját (24. ábra). A mikroszóma luminális NADPH-készletében tapasztalt markáns oxidatív hatás tehát specifikus jelenség, és nem a ROS-termelés általános fokozódásának következménye.



24. ábra EGCG hatása tiobarbiturát reaktív anyagok keletkezésére

Átlag + SEM; $n = 3$; * $p < 0,01$ vs. kontroll

A különböző koncentrációjú EGCG jelenléte nem fokozta a lipidek peroxidációját a mikroszómában. Pozitív kontrollként Fe^{2+} /aszorbátot használtunk a lipid-peroxidáció kiváltására.

5. Megbeszélés

5.1. Az endoplazmás retikulum szerepe metabolikus betegségekben

Az elhízás, illetve a köré csoportosuló egyéb anyagcsere-betegségek járványszerű terjedése az elmúlt évtizedekben vált különösen szembetűnővé, és az elkövetkezendő évtizedekre vetített prognózis még a jelenlegi tendenciánál is aggasztóbb [1, 2]. Ennek megfelelően az ilyen típusú kórképek mind az alap-, mind a gyógyszerkutatás reflektorfényébe kerültek. Világszerte széles körben vizsgálják a betegségek hátterében rejlő molekuláris mechanizmusokat, miközben a gyógyszerfejlesztők igyekeznek minél hatékonyabb megelőző, illetve terápiás szereket kidolgozni [119]. Széles körű irodalommal alátámasztott tény, hogy az életmódbeli faktorok, köztük a táplálkozási tényezők komoly hatással vannak az említett kórképek kialakulására és progressziójára, azonban az *in vivo* folyamatok alapját képező biokémiai mechanizmusok közül jó néhány még tisztázásra szorul.

Az elhízással kapcsolatos betegségek és a túlzott kortizolhatás összefüggését valószínűsíti egyebek mellett a metabolikus szindróma és a Cushing-szindróma tünetei között található nagyfokú átfedés [51, 52]. Míg az előbbi kórkép patomechanizmusa nem teljesen tisztázott, az utóbbi tüneteiért egyértelműen a mellékvesekéreg túlműködéséből adódó abnormálisan magas hormonszint hatásai felelősek. A kóros eltérések nagyfokú hasonlósága ellenére a metabolikus szindrómában szenvedő páciensek esetén a plazma kortizolszintje nem emelkedett, így felmerül a túlzott prerreceptoriális hormonaktiválódás szerepe. A folyamat lényege, hogy a véráramban szállított kortizolt, illetve annak inaktív prohormonját, a kortizont erre specifikus enzimek szövetfüggő módon képesek egymásba alakítani, vagyis a glukokortikoid hatást aktiválni vagy inaktíválni. Ez egyaránt lehetővé teszi, hogy bizonyos szervekben az odajutott kortizol hatástalan maradjon, valamint, hogy más szövetekben a felvett kortizol aktivitásánál lényegesen erőteljesebb hormonhatás érvényesüljön. Ennek megfelelően, a prerreceptoriális glukokortikoid hormonaktiválódás kóros eltolódása akár normál szérumkoncentrációk mellett is eredményezhet Cushing-szerű tüneteket. Kialakult tehát az a hipotézis, mely szerint az aktivációs mechanizmus serkentése elősegítheti, míg gátlása akadályozhatja a

metabolikus szindróma, illetve a 2-es típusú cukorbetegség kialakulását és progresszióját. E jelenség vizsgálata tehát hozzájárulhat a patomechanizmus alaposabb megismeréséhez, ugyanakkor a rendszer megfelelő és hatékony befolyásolása az említett betegségek megelőzésének és kezelésének új távlatait nyithatja meg.

Munkacsoportunk évek óta foglalkozik az endoplazmás retikulum tápanyagszenzor funkciójával, valamint ennek esetleges patológiás szerepével [87]. Mivel az elhízással kapcsolatos metabolikus kórképekben az életmódbeli faktorok között az elfogyasztott élelmiszerek mennyisége és minősége kulcsfontosságú, kutatásaink során arra kerestük a választ, hogy bizonyos, a mindennapi étkezésben megtalálható vegyületek ismert ártalmas vagy jótékony hatása összefüggésbe hozható-e a tápanyagszenzor működés váltoásaival. Hipotézisünk lényege tehát úgy fogalmazható meg, hogy egyes, táplálékkal felvett anyagok, vagy azok metabolitjai az endoplazmás retikulum redox homeosztázisának, és azon keresztül a szöveti glukokortikoid-hatás modulálásának befolyásolása révén növelik vagy csökkentik az elhízás, a metabolikus szindróma és a 2-es típusú diabetes kialakulásának kockázatát.

A XX. század elejétől egyre szélesebb körben elterjedő, ún. „nyugati étrend” bizonyítottan fokozza az említett betegségek kialakulásának kockázatát. Számos ezzel foglalkozó tanulmány a káros hatásokért többek között a felvett táplálék magas szénhidrát-, különösen fruktóz-tartalmát teszi felelőssé. Érdekes megfigyelés ugyanakkor, hogy bár a távol-keleti emberek étkezésében is jelen vannak az anyagcsere-betegségekre hajlamosító tényezők, itt az elhízás, metabolikus szindróma, illetve cukorbetegség elterjedése messze nem olyan súlyos, mint a nyugati országokban. A jelenséget magyarázó hipotézisek közül a legelfogadottabb a rendszeres és nagy mennyiségű zöldteafogyasztásban látja a megoldást. E megfigyelésekből kiindulva két olyan táplálkozási tényezőt vizsgáltunk, melyek metabolikus hatásai meggyőző *in vivo* eredmények alapján egymással ellentétesek, és hipotézisünk szerint befolyásolják a kortizol prerreceptorális metabolizmusát: a glikolízis egyik – a fruktózanyagcserével is összefüggő – köztitermékét, a F6P-ot, valamint a zöldteában legnagyobb mennyiségben előforduló flavanolt, az EGCG-t. Míg az elhízás, a metabolikus szindróma, illetve a 2-es típusú cukorbetegség kialakulását és progresszióját a fokozott szénhidrát-, és különösen a fruktózfogyasztás bizonyítottan elősegíti [15, 16], velük szemben a zöldtea ismert megelőző és gyógyhatással bír [42-47]. Feltételeztük, hogy ezen élettani hatások – lega-

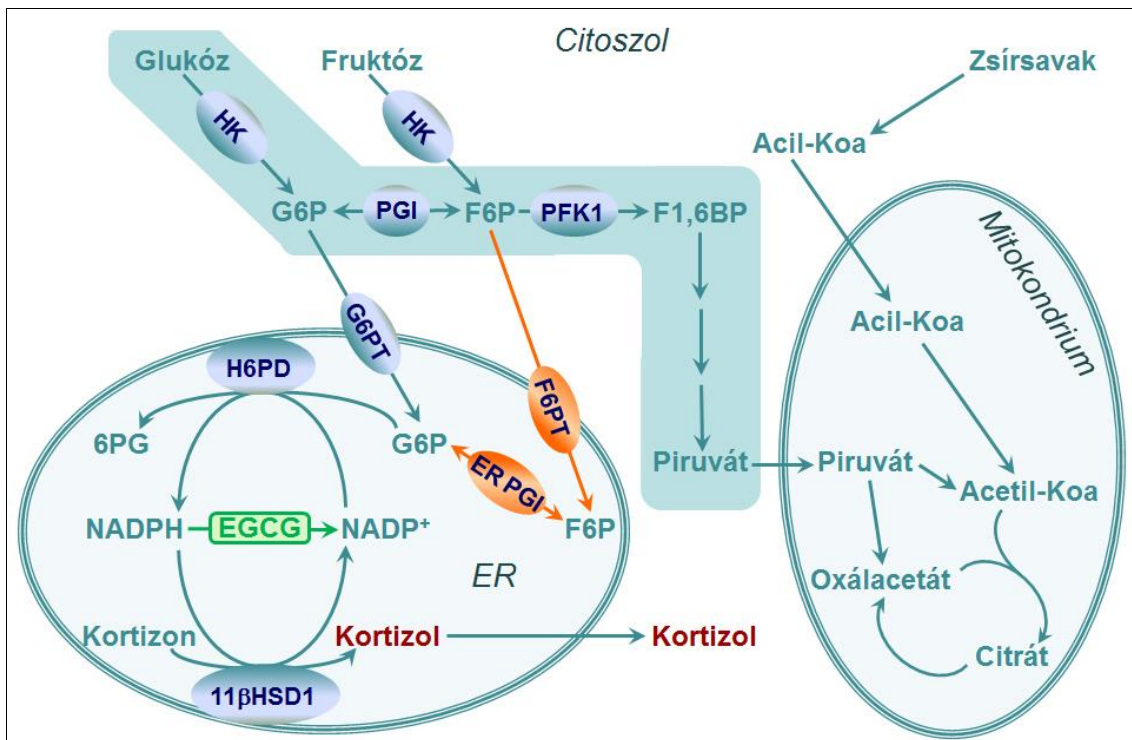
lább részben – az endoplazmás retikulum luminális redox állapota, illetve a prerreceptoriális kortizoltermelés befolyásolásán alapulnak. Kísérleti modellként az anyagcsere-betegségek szempontjából kiemelt jelentőségű máj- és zsigeri zsírszövetből izolált mikroszómát használtunk. E preparátumok túlnyomórészt endoplazmás retikulum eredetű membránvezikulumokat tartalmaznak, megtartva a membrán orientációját és az organelum luminális kompartmentjének fehérje- és kofaktorkészletét, így a fiziológiás viszonyoknak megfelelő, működőképes állapotban található bennük a vizsgálni kívánt folyamat lépéseit katalizáló fehérjeapparátus.

5.2. F6P mint a prerreceptoriális glukokortikoid-aktiválódás redukáló forrása

A mikroszomális kortizonredukció vizsgálata azt mutatta, hogy a folyamat G6P mellett F6P-tal is működtethető (1. táblázat). A F6P-függő kortizoltermelés molekuláris mechanizmusának alaposabb vizsgálatával, a mikroszóma glukóz-, NADPH-, illetve 6-foszfoglukonát-termelésének mérésével bebizonyítottuk, hogy a F6P G6P-tá alakulva járul hozzá a kortizol keletkezéséhez (2. táblázat, 5. és 6. ábra). Fontos, megválaszolando kérdés maradt azonban, hogy ez az átalakulás szükséges feltétele-e a rendszer működésének, valamint, hogy az izomerizáció a membrán melyik oldalán zajlik, és – ezzel szoros összefüggésben –, hogy a folyamat részét képezi-e a F6P membránon keresztüli transzportja. Ezért megpróbáltuk lépésről-lépésre végigkövetni a F6P útját. Közvetlen transzportmérésekkel sikerült alátámasztani a vegyület bejutását az endoplazmás retikulum eredetű vezikulumokba (9. ábra). A transzportfolyamatot tovább vizsgálva, különböző szubsztrátok, illetve gátlószerek alkalmazásával megállapítást nyert, hogy a F6P membránon keresztüli mozgása nem köthető a G6PT működéséhez, mivel azt a G6PT hatékony gátlószere nem befolyásolta; ráadásul a G6P és a F6P nem fejtett ki kompetitív gátló hatást egymás transzportjára (10. ábra). A nem specifikus glukóz-foszfát-transzporter (GPT) közreműködése mellett szól az a mérésünk, mely szerint ennek ismert ligandja (a G1P) szignifikánsan interferált a F6P felvételével. A transzportfehérje egyértelmű azonosítása további kutatást igényel. Tisztított H6PD-n végzett méréseink eredményei alapján kizárható egyrészt, hogy a F6P változatlan formában (G6P-tá való átalakulás nélkül) szubsztrátként szolgálhatna az enzimnek (11. ábra), másrészt az is, hogy a H6PD maga katalizálná a F6P-G6P átalakulást (12. ábra). A lu-

menben zajló izomerizáció vizsgálata céljából, mosási lépésekkel megszabadultunk az ismert citoszolikus izomeráz enzimtől, majd összehasonlítottuk a F6P-ból kiinduló reakcióutak intakt, illetve permeabilizált mikroszómában keletkező termékeit. Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy a F6P nagy hatékonysággal izomerizálódik G6P-tá a mikroszóma, vagyis az endoplazmás retikulum lumenében. Bár a mikroszóma lumenális – azonosítatlan – izomeráz enzime gátolható a citoszolikus PGI gátlószereivel, a különböző inhibitorokra való eltérő érzékenységű különböző kinetikai tulajdonságokra utal (14. és 15. ábra). Ezen túl az immunoblot eredmények (13. ábra), valamint a pH-tolerancia vizsgálatok (16. ábra) is kizárják, hogy ugyanarról a fehérjéről lenne szó. A F6P tehát bejut az endoplazmás retikulum lumenébe, ahol G6P-vá izomerizálódva szolgáltat szubsztátot a H6PD számára, mely a NADP^+ redukciójával újratermeli az organelum NADPH -készletét, táplálva ezzel a $11\beta\text{HSD1}$ által katalizált kortizokortizol átalakulást. A vizsgált vegyület így jól követhető biokémiai lépésekkel, G6P-on mint köztterméken keresztül, közvetve fokozza a lokális kortizoltermelést. A folyamat – igaz, különböző hatékonysággal – mind máj-, mind viscerális zsírszövetből izolált mikroszómában lejátszódik, ami összhangban van a prerreceptorális kortizolaktiválódás szervek közti megoszlására vonatkozó ismereteinkkel (25. ábra).

A tápanyag-túlkínálat gyakorlatilag bármilyen sejtben maga után vonhatja a F6P citoplazmatikus szintjének emelkedését. A glikolízis egyik intermedierjéről lévén szó, a szénhidrátbőség a glukózlebontás fokozódása révén a F6P mennyiségét is növeli. Májszövetben fruktóz lebontásából közvetlenül nem keletkezik ugyan F6P, mennyisége azonban közvetett hatás révén mégis növekszik. A glukokináz (GK) enzim aktivitását a „glucokinase regulatory protein” (GKRP) szabályozza, mely aktivált állapotban inaktív komplexben megkötöti a GK-t. A fruktózból fruktokináz által termelt F1P a GKRP fehérjéhez kötődve megakadályozza a GK-GKRP komplex kialakulását, így a fruktózlebontás a GK aktivitását fokozza, és a G6P és F6P szintjét emeli [120]. Az anyagcsere összehangolt szabályozása következtében persze a F6P-szint emelkedését a fokozott zsírsavkínálat is kiválthatja. Az acil-, és acetyl-KoA, valamint a lebontásukból származó ATP a szénhidrát-anyagcserét több ponton is befolyásolja, ami végeredményben a glikolízis korai intermediereinek (G6P és F6P) felhalmozódásához vezet (25. ábra). Olyan szövetekben (pl. zsírszövetben és izomban), amelyekben nincs fruktokináz aktivitás, a F6P a fruktózlebontás kötelező köztterméke is.



25. ábra A kortizol prereceptorális aktiválódását befolyásoló tényezők

A F6P citoplazmatikus koncentrációját a glukóz, a fruktóz, vagy a zsírsavak szintjének emelkedése is növelheti. A vegyület akár a citoplazmában, akár az endoplazmás retikulumba való transzportját követően, az organellumok lumenében G6P-tá izomerizálódhat, így a H6PD enzimen keresztül közvetve szubsztrátulkinálatot biztosít a 11 β HSD1 számára, aminek aktivitása, vagyis a perifériás kortizoltermelés ezért fokozódik. Az EGCG ezzel szemben az endoplazmás retikulum luminális NADPH-készletének enzimatis oxidációja révén, tehát a szubsztrátszintjének csökkentésével gátolja a kortizoltermelést.

Fruktózban gazdag táplálék fogyasztását követően a vér fruktózkoncentrációja megközelítheti a millimólos értéket mind patkányok [121], mind emberek [122] esetén. Ezt többek között a vázizomzat és a fehér zsírszövet sejtei (inzulin-független) GLUT5 fruktóz-transzportereik segítségével felveszik [123, 124]. Mivel a F6P és G6P endoplazmás retikulumba irányuló transzportja – megfigyeléseink szerint – azonos nagyságrendű, valamint a két vegyület a citoplazmában és az endoplazmás retikulumban egyaránt egymásba alakulhat, az említett szövetekben a F6P feltehetőleg

jelentősen hozzájárul a prereceptorális kortizoltermeléshez. A fruktózból származó F6P kontribúciója különösen jelentős lehet metabolikus szindrómában, amikor is az egyre rosszabbodó inzulinrezisztencia következtében a zsír- és izomszövet glukózfelvétele eleve csökkent.

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a túlzott táplálékbevitel, ezen belül a magas szénhidrát-, és különösen a magas fruktóztartalmú étrend okozta metabolikus zavarok kialakulásáért – legalább részben – a glukokortikoid célszervek lokális kortizoltermelésének fokozódása felelős. Ez a felfedezés rávilágít a metabolikus szindróma mögött húzódó molekuláris mechanizmusok egyikére, segítve ezzel a betegség kialakulásának pontosabb megértését, és hatékonyabb megelőző, gyógyító stratégiák kidolgozását.

5.3. EGCG hatása a szöveti kortizon-kortizol egyensúlyra

A másik vizsgált táplálkozási tényezőtől, a zöldtea-katekin EGCG-től, a számtalan publikált *in vivo* eredmény alapján éppen a F6P-tal ellentétes hatást vártunk. Feltételezésünknek megfelelően, az anyagcsere-betegségekkel szemben közismerten jótékony hatású vegyület gátolta a kortizol prereceptorális aktiválódását. A hatás intakt mikroszóma modellünkön igen látványos volt: már viszonylag alacsony koncentráció alkalmazása mellett is kevesebb mint felére csökkent a kortizoltermelés (17. ábra). Miatán az alapfeltevés beigazolódott, egyenként kezdtük vizsgálni a mikroszomális rendszer elemeit, az EGCG specifikus molekuláris támadáspontját keresve. A citoszol felől befelé haladva az első fehérjekomponens a G6PT, mely a H6PD enzim szubsztrátjául szolgáló G6P specifikus transzportere. Az EGCG e fehérjére gyakorolt, esetleges gátló hatását, szintén patkány máj mikroszóma preparátumokon, a G6P-felvételének közvetlen mérésével munkacsoportunk korábban már megvizsgálta és kizárta [116], így ezt a lehetőséget jelen munkánk során eleve elvetettük, és az erre irányuló kísérleteket nem ismételtük meg. Lumenbe jutását követően a G6P a H6PD enzim által katalizált reakcióban 6PG-vé alakul, miközben egy NADP^+ NADPH -vá redukálódik. A NADPH fluoreszcens detektálásán alapuló méréseink, melyek során az enzim aktivitása EGCG jelenlétében – még magas koncentrációk alkalmazása mellett is – változatlan maradt, azt

támasztják alá, hogy a flavanol e fehérje működését nem befolyásolja számottevően (18. ábra). Az ebben a reakcióban keletkezett NADPH ezután koenzimként redukáló erőt biztosít a 11 β HSD1 enzim működéséhez, vagyis lehetővé teszi a kortizon-kortizol átalakulást. A 11 β HSD1 működését fluoreszcens technikával és a termékek mennyiségének folyadékromatográfiás meghatározásával egyaránt megvizsgáltuk. A két eljárás egymással összhangban azt mutatta, hogy bár az EGCG (magas koncentrációban) elér némi gátlást, ez messze elmarad az intakt mikroszómában tapasztalttól (19. és 20. ábra). A vizsgált zöldtea-katekin mikroszomális kortizoltermelésre kifejtett gátló hatása tehát nem magyarázható önmagában a 11 β HSD1 enyhe, közvetlen gátlásával.

Eddigi vizsgálataink összegezve azt a meglepő eredményt hozták, hogy a G6PT-H6PD-11 β HSD1 katalitikus triád működésének EGCG általi hatékony gátlása az egyes fehérjekomponensek közvetlen befolyásolása nélkül érvényesül. Az endoplazmás retikulum, illetve a mikroszóma luminális NADP⁺-NADPH-készlete maradt tehát a kortizolaktiváló rendszer egyetlen olyan komponense, amely az EGCG támadáspontjaként szóba jöhet. Mivel az endoplazmás retikulum membránja piridin-nukleotidok számára gyakorlatilag nem átjárható, az organellum a citoszoltól teljesen elkülönült készletet tart fenn. Munkacsoportunk már több ízben rávilágított arra, hogy az endoplazmás retikulum luminális NADP⁺-NADPH aránya kiemelkedő jelentőséggel bír az ott zajló folyamatokra, ezáltal az egész sejt működésére. Megvizsgáltuk tehát, hogy a flavanol befolyásolja-e a mikroszóma piridin-nukleotid redox állapotát. Az vezikulumok endogén redukáló-, illetve oxidáló kapacitásának mérésekor (az EGCG-n kívül) csak kortizont, vagy kortizolt alkalmaztunk, amelyet így a mikroszomális vezikulumok kizárólag belső piridin-nukleotid-készletük függvényében tudnak átalakítani. Kiderült, hogy a zöldtea-katekin nemcsak erősen gátolja a kortizol keletkezését, de ezzel párhuzamosan serkenti annak inaktiválódását, holott mindkét reakciót ugyanaz az enzim (11 β HSD1) katalizálja (21. ábra). Így tehát egyértelművé vált, hogy a vegyület a mikroszóma piridin-redox státuszának befolyásolásával éri el a megfigyelt hatást. Ezt a következtetést megerősítették intakt mikroszómán végzett fluoreszcens méréseink is. EGCG hozzáadásakor ugyanis a vezikulumok intrinzik NADPH-szintjében csökkenést tapasztaltunk, ami G6P hozzáadásával jelentős részben ellensúlyozható volt (22. ábra). Mikroszóma nélkül, az endoplazmás retikulum lumenében lévőhöz hasonló koncentrációjú NADPH-oldatban a reakció nem játszódtott le, vagyis kizártuk, hogy az oxidáció

nem-enzmatikus lépése(ke)n keresztül zajlana. Mivel az antioxidánsok sok esetben kiválhatnak prooxidáns hatást is, EGCG jelenlétében megmértük a mikroszomális lipidek peroxidációját, melyet a vegyület nem fokozott, sőt, valamelyest – nem szignifikáns mértékben – gátolt (24. ábra). Ezzel kizártuk azt is, hogy a NADPH-szint csökkenése valamilyen általános oxidatív hatás következménye lenne.

A feltárt hatásmechanizmus nem volt számunkra példa nélküli: munkacsoporthunk korábban bebizonyította, hogy a metirapon szintén a luminális NADPH oxidációján keresztül gátolja a kortizol keletkezését [47]. Ez a gyógyszermolekula azonban alapvetően a szteroid 11 β -hidroxiláz gátlószere, ezért semmiképp nem jöhet szóba a 11 β HSD1 szelektív inhibitoraként, vagy a metabolikus szindróma bármilyen mechanizmusú terápiás szereként.

A teakatekineket viszonylag intenzív felszívódásuk és kiválasztásuk is kiemeli a flavonoidok közül [125]. Az EGCG fél-életideje kevesebb mint 4 óra; fogyasztását követően koncentrációja a vérben viszonylag hamar eléri a csúcst, majd gyorsan csökken [126]. Humán farmakokinetikai vizsgálatok alapján az orális bevitellel a vérben elérhető koncentráció mikromólos nagyságrendű. Egy 2012-ben közzétett tanulmány eredményei szerint, melyet 16 egészséges önkéntes bevonásával végeztek, 2 dl zöldtea elfogyasztását követően egy órával a plazma katekin koncentrációja – ennek nagyjából fele EGCG – átlagban 650 nmol/l-re emelkedett [127]. Rendszeres tea fogyasztók, vagy teakivonat-szedők esetén ez a szám akár 4 μ mol/l is lehet [128-130].

Az EGCG jótékony hatásai szempontjából azonban nem csak és nem elsősorban a vérben mérhető mennyiség mérvadó. A szakmai irodalom a 10 és 100 μ mol/l közötti tartományt tekinti hatékony koncentrációnak, így sejtes modelleken általában ilyen koncentrációkat alkalmaznak a molekuláris szintű hatások eléréséhez [131, 132]. Ugyanilyen hatások válthatók ki *in vivo*, intraperitoneális katekininjekcióval [133], illetve EGCG-kivonat, vagy zöldtea fogyasztásával is [134, 135]. Az *in vitro* és *in vivo* hatások közti párhuzam a vegyületek esetleges felhalmozódására utal a sejtekben, vagy bizonyos sejtorganellumokban, ami a hatékony lokális koncentrációk elérését eredményezheti. Az EGCG sejten belüli megoszlásának vizsgálatát bonyolítja a vegyület specifikus detektálhatóságának nehézsége. Humán endotél sejt vonalon történt kísérletekben fluoreszcensen jelölt EGCG – gyors felvételt követően – a sejtekben akkumulálódott, retikuláris megoszlást mutatva, valószínűleg főként az endoplazmás retikulumban és a

mitokondriumban [136]. Mitokondriális felhalmozódását neuronális eredetű sejtekben már korábban is megfigyelték [137]. Az eredmények tehát arra utalnak, hogy az EGCG akár szokásos tea fogyasztás következményeként is hatékony koncentrációt érhet el intracellulárisan.

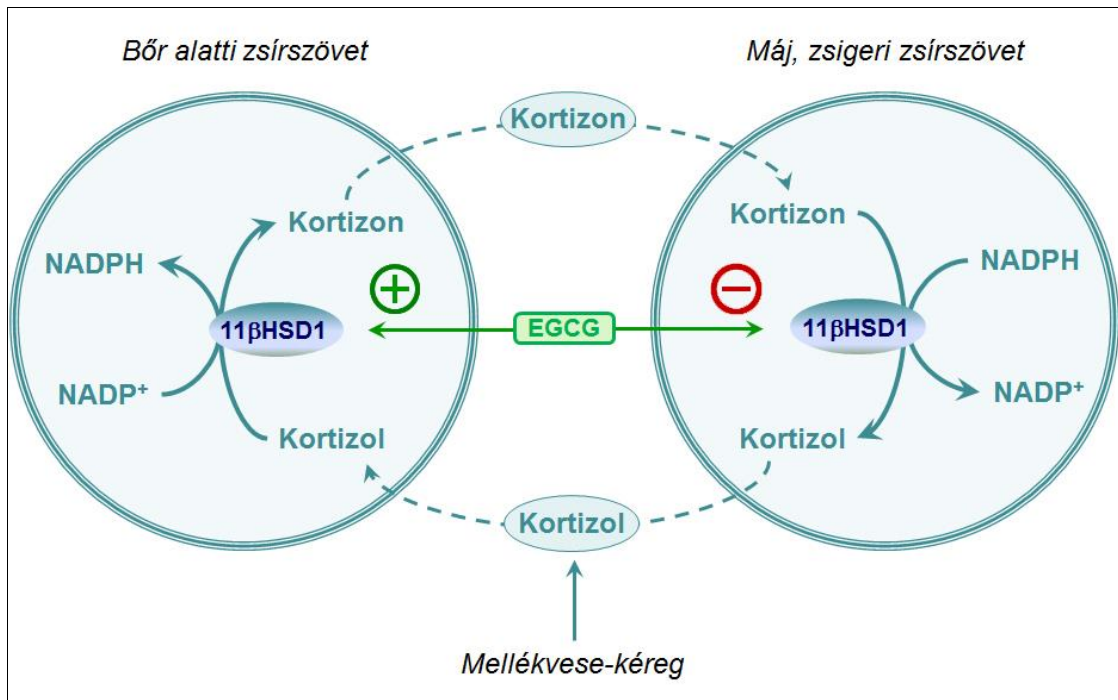
5.4. Az endoplazmás retikulum piridin-nukleotid redox rendszere mint lehetséges gyógyszertámadáspont

Metabolikus szindróma fennállása esetén a szövetek közti kortizon-kortizol ciklus valószínűleg zavart szenved, a reakciók (különösen a májban és a zsigeri zsírszövetben) a kortizoltermelés irányába tolódnak, így a kortizolhatás – akár normál szérum-kortizolszint mellett – erőteljesebb lesz. Ennek kivédésére nem hatékony megoldás magát a kortizon-kortizol átalakulásért felelős enzimet gátolni, hiszen bizonyos szövetekben (pl. bőr alatti zsírszövet) éppen ő katalizálja a hormon inaktiválódását [56]. Az EGCG kortizoltermelésre gyakorolt gátló hatását alaposan tanulmányozva megállapítottuk, hogy valamilyen, eddig nem tisztázott enzimatis lépésen, vagy lépéseken keresztül a zöldtea katekin intakt mikroszómában a luminális NADPH oxidációján keresztül gátolja a hormon termelődését, ugyanakkor serkenti inaktiválódását. Ez a szubsztrát-szintű hatás nagyfokú – dupla – szelektivitást tesz lehetővé: egyrészt specifikus az 1-es típusú izoenzimre (mivel a 2-es típusú enzim citoplazmatikus NAD^+ koenzimmel működik, és nem az endoplazmás retikulum lumenébe zárt NADPH-val), másrészt specifikus az egyik reakcióirányra (sőt, a másik irányt serkenti). Ez a különleges – enzimgátlószerekkel el nem érhető – hatás éppen megfelel annak, amit a metabolikus szindróma kezelésére alkalmas, ideális hatóanyagtól várunk (26. ábra).

A zöldtea-katekin olyan ponton befolyásolja a G6PT-H6PD-11 β HSD1 rendszert, amely nemcsak az EGCG hatásmechanizmusának kutatása szempontjából újdonság, de újabb bizonyítékot szolgáltat arra is, hogy az endoplazmás retikulum – mint metabolikus kompartment – tápanyag-szenzorként működik a szervezetben.

Érdekes módon, ugyanezen ponton, összességében ellentétesen hat az általunk vizsgált másik tápanyag-komponens, a F6P is. Arra következtethetünk tehát, hogy a vizsgált mikroszomális katalitikus triád működése a szervezet metabolikus állapotát

nagymértékben befolyásolja. Mivel az organelum redox mikrokörnyezetében bekövetkező változás kihat az egész sejt, illetve a szervezet állapotára is, az endoplazmás retikulum elkülönült NADP^+ - NADPH -készlete ígéretes gyógyszerátadáspont lehet a metabolikus szindróma, illetve a köré csoportosuló egyéb anyagcsere-betegségek megelőzésében és kezelésében.



26. ábra Az EGCG szerepe a szövetek közti kortizon-kortizol ciklus helyreállításában

Az anyagcsere-betegségekben kialakuló tápanyag-túlkínálat eredményeként a 11 β HSD1 enzimek működése megváltozik: a kortizol perifériás aktiválódása növekszik, míg inaktiválódása csökken. Mivel az EGCG szubsztrát-szinten befolyásolja az enzimet, a reakciókat mindkét esetben a kívánt irányba tolja el, csökkentve ezzel az aktív hormon kórosan magas szintjét.

A 11 β HSD1 közvetlen gátlása helyett sokkal célszerűbb tehát olyan hatóanyagot tervezni, mely az EGCG-éhez hasonló mechanizmus alapján befolyásolja a kortizol aktiválódását-inaktiválódását. Az általunk megfigyelt molekuláris mechanizmus szerepet játszhat a zöldtea elhízással kapcsolatos betegségekben betöltött egészségmegőrző hatásában is.

6. Következtetések

Doktori munkám során arra kerestem választ, hogy két, a metabolikus állapot szempontjából egymással ellentétes hatású, a mindennapi táplálkozás részét képező vegyület befolyásolja-e a perifériás kortizoltermelést, és ha igen, szerepet játszhat-e ez a mechanizmus a két anyag *in vivo* hatásában. A kísérletek eredményei alapján az alábbi megállapításokat tehetjük:

1. A F6P hozzájárul az endoplazmás retikulum NADPH-termeléséhez, és ez által elősegíti a lokális kortizolaktiválódást is.
2. A F6P NADPH-generáló és kortizonredukáló hatásának előfeltétele a vegyület G6P-tá alakulása, melyet az endoplazmás retikulumban, egy, a citoplazmaitól eltérő izomeráz enzim katalizál.
3. A F6P fehérjemediált transzport révén jut be az endoplazmás retikulum lumenébe. A még azonosítatlan transzporter nem azonos a G6PT fehérjével.
4. A zöldtea-flavanol EGCG intakt máj mikroszómában gátolja a kortizon-kortizol átalakulást. EGCG hatására a mikroszóma endogén kortizonredukáló kapacitása csökken, és kortizoloxidáló kapacitása nő.
5. A kortizoltermelés EGCG általi gátlása nem a folyamatban résztvevő fehérjéken, hanem a luminális NADPH oxidációján keresztül érvényesül.
6. Az EGCG NADPH-oxidáló hatásának specifikus és enzimatis jellegét támasztja alá, hogy mikroszóma hiányában nem észlelhető, és nem kíséri fokozott lipidperoxidáció.

Összességében tehát levonhatjuk a következtetést, hogy a fruktózban gazdag táplálkozás negatív, illetve a teaflavanolok fogyasztásának pozitív metabolikus hatásai összefüggésbe hozhatók az endoplazmás retikulum prerreceptoriális kortizolaktiváló funkciójának befolyásolásával. Ez egyben alátámasztja azt is, hogy az organelum megfelelő tápanyagszenzor működése az egész szervezet metabolikus állapotának fontos meghatározója. Eredményeink azt mutatják, hogy az endoplazmás retikulum luminális

piridin-nukleotid-készlete az elhízással kapcsolatos betegségek (metabolikus szindróma, 2-es típusú diabetes stb.) prevenciója és terápiája szempontjából ígéretes gyógyszertámadáspont, amelyen keresztül a 11 β HSD1 kortizonredukáló aktivitása szelektíven gátolható.

7. Összefoglalás

Bár a metabolikus szindróma korunk népbetegsége, a tüneteit kiváltó molekuláris hatásokat eddig csak részben sikerült feltérképezni. Érdekes hasonlóságot mutat a mellékvesekéreg túlműködése nyomán kialakuló, kortizol-túltermelésen alapuló Cushing-szindrómával. Ebből adódik a feltevés, hogy – a normális vér kortizolszintek ellenére – a metabolikus szindrómában is szerepet játszhat a túlzott glukokortikoid-hatás. A kortizol szövetspecifikus, prereceptorális metabolizmusa ugyanis a szérum-koncentráció változása nélkül modulálja a lokális hormonszinteket. Mivel az elhízással kapcsolatos metabolikus zavarokban az étrend kiemelt jelentőségű, két, egymással ellentétes *in vivo* hatású táplálkozási tényezőt tanulmányoztunk, melyek hipotézisünk szerint befolyásolják a kortizol aktiválódását: a zöldtea-ban nagy mennyiségben előforduló EGCG-t és a glikolízis, valamint a fruktóz-anyagcsere egyik köztitermékét, a F6P-ot. Míg előbbi fogyasztása bizonyítottan véd a metabolikus betegségekkel szemben, utóbbi nagy mennyisége ugyanezen körképek egyértelmű rizikófaktor.

A fokozott táplálékbevitel, különösen a túlzott fruktózfogyasztás nyomán kialakuló tápanyag-túlkínálat a F6P intracelluláris mennyiségét jelentősen növeli. Eredményeink szerint a F6P bejut az endoplazmás retikulumba, ahol G6P-tá alakulva serkenti prereceptorális kortizoltermelést. Kimutattuk a folyamatban részt vevő, még azonosítatlan mikroszomális F6P-transzporter, illetve lúminális hexóz-foszfát izomeráz enzim jelenlétét. Az általunk leírt mechanizmus részben felelős lehet a magas fruktóztartalmú étrend okozta metabolikus zavarok kialakulásáért.

A zöldtea-katekin EGCG a metabolikus szindrómában feltételezett funkciózavar korrekciója irányában hat. Intakt mikroszómában jelentős mértékben gátolja a kortizol termelését, ugyanakkor fokozza inaktiválódását. Kimutattuk, hogy az EGCG a lúminális NADPH oxidációját eredményezi, vagyis szubsztrát-szinten befolyásolja a folyamatot. Az EGCG feltárt hatása egyrészt hozzájárul a zöldtea antidiabetikus hatásának pontosabb megértéséhez, másrészt újfajta hatásmechanizmus alapján működő gyógyszerek modelljeként szolgál.

8. Summary

Although the metabolic syndrome is a major public health issue worldwide, its underlying molecular mechanisms are not fully characterized. It shares multiple symptoms with Cushing's syndrome, a complex metabolic disorder based on cortisol overproduction. Therefore, in spite of normal blood cortisol levels, an impaired glucocorticoid metabolism has been implicated in the pathomechanism of the metabolic syndrome too. Tissue-specific pre-receptorial metabolism of cortisol can modulate local cortisol levels without elevating its plasma concentration. According to our hypothesis, stimulating local cortisol-production may promote the development of metabolic diseases, while its inhibition may traverse it. Since nutrition is a key factor in the obesity-related diseases, we have chosen to examine the potential influence of two dietetic constituents of antagonistic *in vivo* health effects on cortisone-cortisol interconversion in the endoplasmic reticulum. One of them is EGCG, the best studied green tea catechin, a documented anti-diabetic agent, while the other is F6P, a common metabolite of glycolysis and fructose metabolism, and a known risk factor of metabolic diseases.

Nutritional surplus caused by overfeeding – and particularly high fructose intake – notably raises the intracellular concentration of F6P. According to our results, F6P enters the endoplasmic reticulum, where it can stimulate cortisol-production after having been isomerized to G6P. The existence of a microsomal F6P transporter and a luminal hexose phosphate isomerase enzyme were evidenced; nevertheless both proteins remain to be identified. Metabolic disorders caused by high-fructose diet can be partly attributed to the presented mechanism.

The green tea catechin EGCG acts towards the correction of the shift in cortisol-cortisone cycle supposed to occur in the metabolic syndrome. It remarkably inhibits the production, and stimulates the inactivation of cortisol in intact microsomal vesicles. It has been demonstrated that EGCG causes the oxidation of luminal NADPH, thus affecting the process at the substrate level. Our findings promote a better understanding of the antidiabetic effects of EGCG. In addition, they provide a model for drug development based on a new and promising molecular target and a novel mechanism of action.

9. Irodalomjegyzék

1. Alwan A, WHO: Global status report on noncommunicable diseases (2010). In. Geneva: World Health Organization.
2. IDF. (2006) Diabetes Atlas, Third edition edn. Brussels: International Diabetes Federation.
3. WHO: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus (1999). In. Geneva: World Health Organization.
4. Temelkova-Kurktschiev T, Stefanov T. (2012) Lifestyle and genetics in obesity and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 120(1):1-6.
5. Inadera H. (2013) Developmental origins of obesity and type 2 diabetes: molecular aspects and role of chemicals. *Environ Health Prev Med*, 18(3):185-197.
6. Caprio S. (2012) Development of type 2 diabetes mellitus in the obese adolescent: a growing challenge. *Endocr Pract*, 18(5):791-795.
7. Huang PL. (2009) A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech*, 2(5-6):231-237.
8. Keys A. (1953) Atherosclerosis: a problem in newer public health. *J Mt Sinai Hosp N Y*, 20(2):118-139.
9. Yudkin J. (1964) Patterns and Trends in Carbohydrate Consumption and Their Relation to Disease. *Proc Nutr Soc*, 23:149-162.
10. Hauner H, Bechthold A, Boeing H, Bronstrup A, Buyken A, Leschik-Bonnet E, Linseisen J, Schulze M, Strohm D, Wolfram G, German Nutrition S. (2012) Evidence-based guideline of the German Nutrition Society: carbohydrate intake and prevention of nutrition-related diseases. *Ann Nutr Metab*, 60 Suppl 1:1-58.

11. Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, Gersch MS, Benner S, Sanchez-Lozada LG. (2007) Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 86(4):899-906.
12. Jimenez-Gomez Y, Marin C, Peerez-Martinez P, Hartwich J, Malczewska-Malec M, Golabek I, Kiec-Wilk B, Cruz-Teno C, Rodriguez F, Gomez P, Gomez-Luna MJ, Defoort C, Gibney MJ, Perez-Jimenez F, Roche HM, Lopez-Miranda J. (2010) A low-fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with long-chain (n-3) fatty acids alters the postprandial lipoprotein profile in patients with metabolic syndrome. *J Nutr*, 140(9):1595-1601.
13. Wood RJ, Fernandez ML, Sharman MJ, Silvestre R, Greene CM, Zern TL, Shrestha S, Judelson DA, Gomez AL, Kraemer WJ, Volek JS. (2007) Effects of a carbohydrate-restricted diet with and without supplemental soluble fiber on plasma low-density lipoprotein cholesterol and other clinical markers of cardiovascular risk. *Metabolism*, 56(1):58-67.
14. Sharman MJ, Gomez AL, Kraemer WJ, Volek JS. (2004) Very low-carbohydrate and low-fat diets affect fasting lipids and postprandial lipemia differently in overweight men. *J Nutr*, 134(4):880-885.
15. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. (2002) Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr*, 76(5):911-922.
16. Tappy L, Le KA. (2010) Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev*, 90(1):23-46.
17. Hoekstra JH, van den Aker JH. (1996) Facilitating effect of amino acids on fructose and sorbitol absorption in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 23(2):118-124.

18. Mithieux G, Misery P, Magnan C, Pillot B, Gautier-Stein A, Bernard C, Rajas F, Zitoun C. (2005) Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab*, 2(5):321-329.
19. Lewis GF, Uffelman K, Naples M, Szeto L, Haidari M, Adeli K. (2005) Intestinal lipoprotein overproduction, a newly recognized component of insulin resistance, is ameliorated by the insulin sensitizer rosiglitazone: studies in the fructose-fed Syrian golden hamster. *Endocrinology*, 146(1):247-255.
20. Bode C, Durr HK, Bode JC. (1981) Effect of fructose feeding on the activity of enzymes of glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate shunt in the liver and jejunal mucosa of rats. *Horm Metab Res*, 13(7):379-383.
21. Kyriazis GA, Soundarapandian MM, Tyrberg B. (2012) Sweet taste receptor signaling in beta cells mediates fructose-induced potentiation of glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(8):E524-532.
22. Bray GA. (2007) How bad is fructose? *Am J Clin Nutr*, 86(4):895-896.
23. Vila L, Roglans N, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, Laguna JC. (2008) Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism. *Hepatology*, 48(5):1506-1516.
24. Cha SH, Wolfgang M, Tokutake Y, Chohnan S, Lane MD. (2008) Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(44):16871-16875.
25. Thorburn AW, Crapo PA, Griver K, Wallace P, Henry RR. (1990) Long-term effects of dietary fructose on carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 39(1):58-63.

26. Sumpio BE, Cordova AC, Berke-Schlessel DW, Qin F, Chen QH. (2006) Green tea, the "Asian paradox," and cardiovascular disease. *J Am Coll Surg*, 202(5):813-825.
27. Weisburger JH, Chung FL. (2002) Mechanisms of chronic disease causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. *Food Chem Toxicol*, 40(8):1145-1154.
28. Arts IC, Hollman PC, Kromhout D. (1999) Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet*, 354(9177):488.
29. Holiman PCH, Hertog MGL, Katan MB. (1996) Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 57(1):43-46.
30. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4):152-159.
31. Sato T, Miyata G. (2000) The nutraceutical benefit, part I: green tea. *Nutrition*, 16(4):315-317.
32. Dufresne CJ, Farnworth ER. (2001) A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem*, 12(7):404-421.
33. Chen A, Zhang L. (2003) The antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits rat hepatic stellate cell proliferation in vitro by blocking the tyrosine phosphorylation and reducing the gene expression of platelet-derived growth factor-beta receptor. *J Biol Chem*, 278(26):23381-23389.
34. Pillai SP, Mitscher LA, Menon SR, Pillai CA, Shankel DM. (1999) Antimutagenic/antioxidant activity of green tea components and related compounds. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 18(3):147-158.
35. Katiyar S, Mukhtar H. (1996) Tea in chemoprevention of cancer. *Int J Oncol*, 8(2):221-238.

36. Yoshino K, Miyase T, Sano M. (2010) Preventive effects of C-2 epimeric isomers of tea catechins on mouse type I allergy. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 56(3):211-215.
37. Ali M, Afzal M, Gubler CJ, Burka JF. (1990) A potent thromboxane formation inhibitor in green tea leaves. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 40(4):281-283.
38. Sagesaka-Mitane Y, Miwa M, Okada S. (1990) Platelet aggregation inhibitors in hot water extract of green tea. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 38(3):790-793.
39. Magyar JE, Gamberucci A, Konta L, Margittai E, Mandl J, Banhegyi G, Benedetti A, Csala M. (2009) Endoplasmic reticulum stress underlying the pro-apoptotic effect of epigallocatechin gallate in mouse hepatoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(3):694-700.
40. Konta L, Szaraz P, Magyar JE, Revesz K, Banhegyi G, Mandl J, Csala M. (2011) Inhibition of glycoprotein synthesis in the endoplasmic reticulum as a novel anticancer mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Biofactors*, 37(6):468-476.
41. Gamberucci A, Konta L, Colucci A, Giunti R, Magyar JE, Mandl J, Banhegyi G, Benedetti A, Csala M. (2006) Green tea flavonols inhibit glucosidase II. *Biochem Pharmacol*, 72(5):640-646.
42. Thielecke F, Boschmann M. (2009) The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome - a review. *Phytochemistry*, 70(1):11-24.
43. Yang TT, Koo MW. (1997) Hypocholesterolemic effects of Chinese tea. *Pharmacol Res*, 35(6):505-512.
44. Juhel C, Armand M, Pafumi Y, Rosier C, Vandermander J, Lairon D. (2000) Green tea extract (AR25) inhibits lipolysis of triglycerides in gastric and duodenal medium in vitro. *J Nutr Biochem*, 11(1):45-51.

45. Kao YH, Chang HH, Lee MJ, Chen CL. (2006) Tea, obesity, and diabetes. *Mol Nutr Food Res*, 50(2):188-210.
46. Wolfram S, Wang Y, Thielecke F. (2006) Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol Nutr Food Res*, 50(2):176-187.
47. Lin Y-L, Cheng C-Y, Lin Y-P, Lau Y-W, Juan IM, Lin J-K. (1998) Hypolipidemic Effect of Green Tea Leaves through Induction of Antioxidant and Phase II Enzymes Including Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione S-Transferase in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5):1893-1899.
48. Gerich JE. (1993) Control of glycaemia. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 7(3):551-586.
49. Yabaluri N, Bashyam MD. (2010) Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J Biosci*, 35(3):473-484.
50. Mazziotti G, Gazzaruso C, Giustina A. (2011) Diabetes in Cushing syndrome: basic and clinical aspects. *Trends Endocrinol Metab*, 22(12):499-506.
51. Walker BR. (2006) Cortisol--cause and cure for metabolic syndrome? *Diabet Med*, 23(12):1281-1288.
52. Krikorian A, Khan M. (2010) Is metabolic syndrome a mild form of Cushing's syndrome? *Rev Endocr Metab Disord*, 11(2):141-145.
53. Rask E, Olsson T, Soderberg S, Andrew R, Livingstone DE, Johnson O, Walker BR. (2001) Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(3):1418-1421.
54. Walker BR, Soderberg S, Lindahl B, Olsson T. (2000) Independent effects of obesity and cortisol in predicting cardiovascular risk factors in men and women. *J Intern Med*, 247(2):198-204.

55. Travison TG, O'Donnell AB, Araujo AB, Matsumoto AM, McKinlay JB. (2007) Cortisol levels and measures of body composition in middle-aged and older men. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 67(1):71-77.
56. Hughes KA, Manolopoulos KN, Iqbal J, Cruden NL, Stimson RH, Reynolds RM, Newby DE, Andrew R, Karpe F, Walker BR. (2012) Recycling between cortisol and cortisone in human splanchnic, subcutaneous adipose, and skeletal muscle tissues in vivo. *Diabetes*, 61(6):1357-1364.
57. Marcolongo P, Senesi S, Gava B, Fulceri R, Sorrentino V, Margittai E, Lizak B, Csala M, Banhegyi G, Benedetti A. (2008) Metirapone prevents cortisone-induced preadipocyte differentiation by depleting luminal NADPH of the endoplasmic reticulum. *Biochem Pharmacol*, 76(3):382-390.
58. Basu R, Singh RJ, Basu A, Chittilapilly EG, Johnson CM, Toffolo G, Cobelli C, Rizza RA. (2004) Splanchnic cortisol production occurs in humans: evidence for conversion of cortisone to cortisol via the 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-hsd) type 1 pathway. *Diabetes*, 53(8):2051-2059.
59. Andrew R, Westerbacka J, Wahren J, Yki-Jarvinen H, Walker BR. (2005) The contribution of visceral adipose tissue to splanchnic cortisol production in healthy humans. *Diabetes*, 54(5):1364-1370.
60. Draper N, Stewart PM. (2005) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J Endocrinol*, 186(2):251-271.
61. Ozols J. (1995) Lumenal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem*, 270(5):2305-2312.
62. Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM. (2004) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev*, 25(5):831-866.

63. Csala M, Banhegyi G, Benedetti A. (2006) Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment. *FEBS Lett*, 580(9):2160-2165.
64. Banhegyi G, Csala M, Benedetti A. (2009) Hexose-6-phosphate dehydrogenase: linking endocrinology and metabolism in the endoplasmic reticulum. *J Mol Endocrinol*, 42(4):283-289.
65. Marcolongo P, Senesi S, Giunti R, Csala M, Fulceri R, Banhegyi G, Benedetti A. (2011) Expression of hexose-6-phosphate dehydrogenase in rat tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 126(3-5):57-64.
66. Senesi S, Csala M, Marcolongo P, Fulceri R, Mandl J, Banhegyi G, Benedetti A. (2010) Hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum. *Biol Chem*, 391(1):1-8.
67. Czegle I, Piccirella S, Senesi S, Csala M, Mandl J, Banhegyi G, Fulceri R, Benedetti A. (2006) Cooperativity between 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase is based on a common pyridine nucleotide pool in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Endocrinol*, 248(1-2):24-25.
68. Lizak B, Csala M, Benedetti A, Banhegyi G. (2008) The translocon and the non-specific transport of small molecules in the endoplasmic reticulum (Review). *Mol Membr Biol*, 25(2):95-101.
69. Csala M, Marcolongo P, Lizak B, Senesi S, Margittai E, Fulceri R, Magyar JE, Benedetti A, Banhegyi G. (2007) Transport and transporters in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 1768(6):1325-1341.
70. Lizak B, Czegle I, Csala M, Benedetti A, Mandl J, Banhegyi G. (2006) Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to small anions. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291(3):C511-517.

71. Staines AG, Burchell B, Banhegyi G, Mandl J, Csala M. (2005) Application of high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry to measure microsomal membrane transport of glucuronides. *Anal Biochem*, 342(1):45-52.
72. Csala M, Senesi S, Banhegyi G, Mandl J, Benedetti A. (2005) Characterization of sulfate transport in the hepatic endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys*, 440(2):173-180.
73. Csala M, Staines AG, Banhegyi G, Mandl J, Coughtrie MW, Burchell B. (2004) Evidence for multiple glucuronide transporters in rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 68(7):1353-1362.
74. Csala M, Fulceri R, Mandl J, Benedetti A, Banhegyi G. (2003) Glutathione transport in the endo/sarcoplasmic reticulum. *Biofactors*, 17(1-4):27-35.
75. Piccirella S, Czegle I, Lizak B, Margittai E, Senesi S, Papp E, Csala M, Fulceri R, Csermely P, Mandl J, Benedetti A, Banhegyi G. (2006) Uncoupled redox systems in the lumen of the endoplasmic reticulum. Pyridine nucleotides stay reduced in an oxidative environment. *J Biol Chem*, 281(8):4671-4677.
76. Csala M, Kereszturi E, Mandl J, Banhegyi G. (2012) The endoplasmic reticulum as the extracellular space inside the cell: role in protein folding and glycosylation. *Antioxid Redox Signal*, 16(10):1100-1108.
77. Banhegyi G, Margittai E, Szarka A, Mandl J, Csala M. (2012) Crosstalk and barriers between the electron carriers of the endoplasmic reticulum. *Antioxid Redox Signal*, 16(8):772-780.
78. Csala M, Margittai E, Banhegyi G. (2010) Redox control of endoplasmic reticulum function. *Antioxid Redox Signal*, 13(1):77-108.
79. Banhegyi G, Csala M, Szarka A, Varsanyi M, Benedetti A, Mandl J. (2003) Role of ascorbate in oxidative protein folding. *Biofactors*, 17(1-4):37-46.

80. Margittai E, Csala M, Mandl J, Banhegyi G. (2009) Participation of low molecular weight electron carriers in oxidative protein folding. *Int J Mol Sci*, 10(3):1346-1359.
81. Mandl J, Meszaros T, Banhegyi G, Csala M. (2013) Minireview: endoplasmic reticulum stress: control in protein, lipid, and signal homeostasis. *Mol Endocrinol*, 27(3):384-393.
82. Banhegyi G, Benedetti A, Csala M, Mandl J. (2007) Stress on redox. *FEBS Lett*, 581(19):3634-3640.
83. Csala M, Szarka A, Margittai E, Mile V, Kardon T, Braun L, Mandl J, Banhegyi G. (2001) Role of vitamin E in ascorbate-dependent protein thiol oxidation in rat liver endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys*, 388(1):55-59.
84. Csala M, Banhegyi G, Kardon T, Fulceri R, Gamberucci A, Giunti R, Benedetti A, Mandl J. (1996) Inhibition of glucuronidation by an acyl-CoA-mediated indirect mechanism. *Biochem Pharmacol*, 52(7):1127-1131.
85. Banhegyi G, Mandl J, Csala M. (2008) Redox-based endoplasmic reticulum dysfunction in neurological diseases. *J Neurochem*, 107(1):20-34.
86. Kereszturi E, Kalman FS, Kardon T, Csala M, Banhegyi G. (2010) Decreased prereceptorial glucocorticoid activating capacity in starvation due to an oxidative shift of pyridine nucleotides in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett*, 584(22):4703-4708.
87. Mandl J, Meszaros T, Banhegyi G, Hunyady L, Csala M. (2009) Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. *Trends Endocrinol Metab*, 20(4):194-201.
88. Czegle I, Csala M, Mandl J, Benedetti A, Karadi I, Banhegyi G. (2012) G6PT-H6PDH-11betaHSD1 triad in the liver and its implication in the pathomechanism of the metabolic syndrome. *World J Hepatol*, 4(4):129-138.

89. Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmolli D, Jamieson P, Best R, Brown R, Edwards CR, Seckl JR, Mullins JJ. (1997) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26):14924-14929.
90. Morton NM, Holmes MC, Fievet C, Staels B, Tailleux A, Mullins JJ, Seckl JR. (2001) Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. *J Biol Chem*, 276(44):41293-41300.
91. Lavery GG, Hauton D, Hewitt KN, Brice SM, Sherlock M, Walker EA, Stewart PM. (2007) Hypoglycemia with enhanced hepatic glycogen synthesis in recombinant mice lacking hexose-6-phosphate dehydrogenase. *Endocrinology*, 148(12):6100-6106.
92. Rogoff D, Ryder JW, Black K, Yan Z, Burgess SC, McMillan DR, White PC. (2007) Abnormalities of glucose homeostasis and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in mice lacking hexose-6-phosphate dehydrogenase. *Endocrinology*, 148(10):5072-5080.
93. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. (2001) A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*, 294(5549):2166-2170.
94. Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, Seckl JR, Mullins JJ. (2004) Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(18):7088-7093.
95. Alberts P, Engblom L, Edling N, Forsgren M, Klingstrom G, Larsson C, Ronquist-Nii Y, Ohman B, Abrahmsen L. (2002) Selective inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 decreases blood glucose concentrations in hyperglycaemic mice. *Diabetologia*, 45(11):1528-1532.

96. Hermanowski-Vosatka A, Balkovec JM, Cheng K, Chen HY, Hernandez M, Koo GC, Le Grand CB, Li Z, Metzger JM, Mundt SS, Noonan H, Nunes CN, Olson SH, Pikounis B, Ren N, Robertson N, Schaeffer JM, Shah K, Springer MS, Strack AM, Strowski M, Wu K, Wu T, Xiao J, Zhang BB, Wright SD, Thieringer R. (2005) 11 β -HSD1 inhibition ameliorates metabolic syndrome and prevents progression of atherosclerosis in mice. *J Exp Med*, 202(4):517-527.
97. Ge R, Huang Y, Liang G, Li X. (2010) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors as promising therapeutic drugs for diabetes: status and development. *Curr Med Chem*, 17(5):412-422.
98. Henne V, Soling HD. (1986) Guanosine 5'-triphosphate releases calcium from rat liver and guinea pig parotid gland endoplasmic reticulum independently of inositol 1,4,5-trisphosphate. *FEBS Lett*, 202(2):267-273.
99. Brattin WJ, Jr., Waller RL, Recknagel RO. (1982) Analysis of microsomal calcium sequestration by steady state isotope exchange. Enzyme kinetics and role of membrane permeability. *J Biol Chem*, 257(17):10044-10051.
100. Benedetti A, Fulceri R, Romani A, Comporti M. (1988) MgATP-dependent glucose 6-phosphate-stimulated Ca²⁺ accumulation in liver microsomal fractions. Effects of inositol 1,4,5-trisphosphate and GTP. *J Biol Chem*, 263(7):3466-3473.
101. Burchell A, Hume R, Burchell B. (1988) A new microtechnique for the analysis of the human hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. *Clin Chim Acta*, 173(2):183-191.
102. Pan J, Tieleman DP, Nagle JF, Kucerka N, Tristram-Nagle S. (2009) Alamethicin in lipid bilayers: combined use of X-ray scattering and MD simulations. *Biochim Biophys Acta*, 1788(6):1387-1397.
103. Tsyrllov IB, Gromova OA, Lyakhovich VV. (1976) Mechanism of inhibition by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone and sodium deoxycholate of

- cytochrome P-450-catalysed hepatic microsomal drug metabolism. *Biochem J*, 160(1):75-83.
104. Banhegyi G, Benedetti A, Fulceri R, Senesi S. (2004) Cooperativity between 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 279(26):27017-27021.
 105. Jungnickel B, Rapoport TA. (1993) DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid) inhibits an early step of protein translocation across the mammalian ER membrane. *FEBS Lett*, 329(3):268-272.
 106. Atanasov AG, Nashev LG, Gelman L, Legeza B, Sack R, Portmann R, Odermatt A. (2008) Direct protein-protein interaction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum lumen. *Biochim Biophys Acta*, 1783(8):1536-1543.
 107. Atanasov AG, Nashev LG, Schweizer RA, Frick C, Odermatt A. (2004) Hexose-6-phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as an oxoreductase. *FEBS Lett*, 571(1-3):129-133.
 108. Wills ED. (1987). In: *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. Edited by Snell K, Mullock B. Oxford: IRL Press: 153–182.
 109. Marcolongo P, Piccirella S, Senesi S, Wunderlich L, Gerin I, Mandl J, Fulceri R, Banhegyi G, Benedetti A. (2007) The glucose-6-phosphate transporter-hexose-6-phosphate dehydrogenase-11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 system of the adipose tissue. *Endocrinology*, 148(5):2487-2495.
 110. McCormick KL, Wang X, Mick GJ. (2008) Modification of microsomal 11 β -HSD1 activity by cytosolic compounds: glutathione and hexose phosphoesters. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 111(1-2):18-23.

111. Banhegyi G, Marcolongo P, Fulceri R, Hinds C, Burchell A, Benedetti A. (1997) Demonstration of a metabolically active glucose-6-phosphate pool in the lumen of liver microsomal vesicles. *J Biol Chem*, 272(21):13584-13590.
112. Gerin I, Van Schaftingen E. (2002) Evidence for glucose-6-phosphate transport in rat liver microsomes. *FEBS Lett*, 517(1-3):257-260.
113. Arion WJ, Canfield WK, Ramos FC, Su ML, Burger HJ, Hemmerle H, Schubert G, Below P, Herling AW. (1998) Chlorogenic acid analogue S 3483: a potent competitive inhibitor of the hepatic and renal glucose-6-phosphatase systems. *Arch Biochem Biophys*, 351(2):279-285.
114. Leuzzi R, Fulceri R, Marcolongo P, Banhegyi G, Zammarchi E, Stafford K, Burchell A, Benedetti A. (2001) Glucose 6-phosphate transport in fibroblast microsomes from glycogen storage disease type 1b patients: evidence for multiple glucose 6-phosphate transport systems. *Biochem J*, 357(Pt 2):557-562.
115. Chirgwin JM, Parsons TF, Noltmann EA. (1975) Mechanistic implications of the pH independence of inhibition of phosphoglucose isomerase by neutral sugar phosphates. *J Biol Chem*, 250(18):7277-7279.
116. Csala M, Margittai E, Senesi S, Gamberucci A, Banhegyi G, Mandl J, Benedetti A. (2007) Inhibition of hepatic glucose 6-phosphatase system by the green tea flavanol epigallocatechin gallate. *FEBS Lett*, 581(8):1693-1698.
117. Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N. (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4):513-523.
118. Revesz K, Tutto A, Konta L. (2007) [Effect of green tea flavonols on the function of the endoplasmic reticulum]. *Orv Hetil*, 148(40):1903-1907.
119. Taylor JR, Dietrich E, Powell JG. (2013) New and emerging pharmacologic therapies for type 2 diabetes, dyslipidemia, and obesity. *Clin Ther*, 35(1):A3-17.

120. Pautsch A, Stadler N, Lohle A, Rist W, Berg A, Glocker L, Nar H, Reinert D, Lenter M, Heckel A, Schnapp G, Kauschke SG. (2013) Crystal structure of glucokinase regulatory protein. *Biochemistry*, 52(20):3523-3531.
121. Prieto PG, Cancelas J, Villanueva-Penacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. (2004) Plasma D-glucose, D-fructose and insulin responses after oral administration of D-glucose, D-fructose and sucrose to normal rats. *J Am Coll Nutr*, 23(5):414-419.
122. Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, Manitius J, Sanchez-Lozada LG, Feig DI, Shafiu M, Segal M, Glassock RJ, Shimada M, Roncal C, Nakagawa T. (2009) Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev*, 30(1):96-116.
123. Darakhshan F, Hajduch E, Kristiansen S, Richter EA, Hundal HS. (1998) Biochemical and functional characterization of the GLUT5 fructose transporter in rat skeletal muscle. *Biochem J*, 336 (Pt 2):361-366.
124. Hajduch E, Darakhshan F, Hundal HS. (1998) Fructose uptake in rat adipocytes: GLUT5 expression and the effects of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 41(7):821-828.
125. Stalmach A, Troufflard S, Serafini M, Crozier A. (2009) Absorption, metabolism and excretion of Cholaadi green tea flavan-3-ols by humans. *Mol Nutr Food Res*, 53 Suppl 1:S44-53.
126. Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS. (2002) Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11(10 Pt 1):1025-1032.
127. Fung ST, Ho CK, Choi SW, Chung WY, Benzie IF. (2013) Comparison of catechin profiles in human plasma and urine after single dosing and regular intake of green tea (*Camellia sinensis*). *Br J Nutr*, 109(12):2199-2207.

128. Chow HH, Cai Y, Hakim IA, Crowell JA, Shahi F, Brooks CA, Dorr RT, Hara Y, Alberts DS. (2003) Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res*, 9(9):3312-3319.
129. Miyazawa T. (2000) Absorption, metabolism and antioxidative effects of tea catechin in humans. *Biofactors*, 13(1-4):55-59.
130. Nakagawa K, Okuda S, Miyazawa T. (1997) Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci Biotechnol Biochem*, 61(12):1981-1985.
131. Anton S, Melville L, Rena G. (2007) Epigallocatechin gallate (EGCG) mimics insulin action on the transcription factor FOXO1a and elicits cellular responses in the presence and absence of insulin. *Cell Signal*, 19(2):378-383.
132. Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M, Granner DK. (2002) Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem*, 277(38):34933-34940.
133. Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. (2000) Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology*, 141(3):980-987.
134. Wolfram S, Raederstorff D, Preller M, Wang Y, Teixeira SR, Riegger C, Weber P. (2006) Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. *J Nutr*, 136(10):2512-2518.
135. Koyama Y, Abe K, Sano Y, Ishizaki Y, Njelekela M, Shoji Y, Hara Y, Isemura M. (2004) Effects of green tea on gene expression of hepatic gluconeogenic enzymes in vivo. *Planta Med*, 70(11):1100-1102.
136. Piyaviriyakul S, Shimizu K, Asakawa T, Kan T, Siripong P, Oku N. (2011) Anti-angiogenic activity and intracellular distribution of epigallocatechin-3-gallate analogs. *Biol Pharm Bull*, 34(3):396-400.

137. Schroeder EK, Kelsey NA, Doyle J, Breed E, Bouchard RJ, Loucks FA, Harbison RA, Linseman DA. (2009) Green tea epigallocatechin 3-gallate accumulates in mitochondria and displays a selective antiapoptotic effect against inducers of mitochondrial oxidative stress in neurons. *Antioxid Redox Signal*, 11(3):469-480.

10. Saját közlemények jegyzéke

10.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Szelényi P**, Révész K, Konta L, Tuttó A, Mandl J, Kereszturi É, Csala M. (2013) Inhibition of microsomal cortisol production by (-)-epigallocatechin-3-gallate through a redox shift in the endoplasmic reticulum-A potential new target for treating obesity-related diseases. *Biofactors*, 39(5):534-41.; IF: 3,088
2. Senesi S, Legeza B, Balázs Z, Csala M, Marcolongo P, Kereszturi É, **Szelényi P**, Egger C, Fulceri R, Mandl J, Giunti R, Odermatt A, Bánhegyi G, Benedetti A. (2010) Contribution of fructose-6-phosphate to glucocorticoid activation in the endoplasmic reticulum: possible implication in the metabolic syndrome. *Endocrinology*, 151(10):4830-4839.; IF: 4,717

10.2. A disszertációtól független közlemények

1. Révész K, Tuttó A, **Szelényi P**, Konta L. (2011) Tea flavan-3-ols as modulating factors in endoplasmic reticulum function. *Nutrition research*, 31(10):731-740.; IF: 2,142
2. Zámbó V, Simon-Szabó L, **Szelényi P**, Kereszturi E, Bánhegyi G, Csala M. (2013) Lipotoxicity in the liver. *World Journal of Hepatology*, 5(10):550-557.

Köszönetnyilvánítás

PhD munkámat a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetében végeztem, Csala Miklós témavezetése alatt – elsősorban neki tartozom hálával a témérdek szakmai és emberi támogatásáért. Külön köszönet illeti Mandl József professzor urat, aki nemcsak lehetővé tette munkámat az intézetben, de mindvégig figyelemmel kísérte, és támogatta azt. Köszönettel tartozom Bánhegyi Gábor professzor úrnak a kísérletekhez nyújtott szakmai támogatásért. Kivétel nélkül köszönöm a laborunk minden tagjának, hogy bárkihez fordulhattam szakmai segítségért, miközben a munkanapok mindig jó hangulatban teltek. Külön hálás vagyok Mile Valéria áldozatos munkájáért, és Sonnevend Kinga szervezésben nyújtott segítségéért. A bemutatott kísérletek egy része a Sienai Egyetemen készült, ahol rövid ideig magam is dolgozhattam – az ott kapott támogatásért köszönettel tartozom Angelo Benedetti professzor úrnak és munkacsoportjának, különösen Alessandra Greconak. Köszönet illeti másik kooperációs partnerünket, Alex Odermatt professzor urat, akinek vezetésével az affinitás tisztítás, valamint az ezzel nyert enzim aktivitásának mérései zajlottak a Baseli Egyetem Gyógyszerészeti Intézetében.