

# A prereceptoriális kortizoltermelést befolyásoló tényezők

Doktori tézisek

**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 bizottságtagjai: Dr. Gróf Pál egyetemi docens, Ph.D.  
Dr. Monostory Katalin tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest  
2014



## **Bevezetés**

### **Metabolikus szindróma**

Súlyos egészségügyi problémát jelent világszerte a metabolikus szindrómának nevezett tünetegyüttes, mely voltaképpen átmenet az elhízás és a 2-es típusú cukorbetegség között, de manapság már külön kórképnek tekintjük. Akkor beszélünk metabolikus szindrómáról, ha a felsorolt öt 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. A kórkép gyors terjedése miatt komoly igény van olyan hatóanyagok tervezésére és alkalmazására, melyek védenek kialakulásával szemben. Nehézséget jelent, hogy, bár a rizikófaktorok jól ismertek, a betegség kialakulásának pontos biokémiai mechanizmusai még tisztázásra szorulnak.

### **Táplálkozási tényezők**

A metabolikus szindróma kialakulását és súlyosbodását genetikai faktorok, illetve a csökkent fizikai aktivitás mellett elsősorban táplálkozási tényezők befolyásolják. Számos tanulmány bizonyítja, hogy a „nyugati étrenddel” járó fokozott cukorfogyasztás nagymértékben növeli kialakulásának kockázatát. Nem csak az elfogyasztott szénhidrát mennyisége meghatározó, hanem az azt felépítő monoszacharid alegységek megoszlása is: a metabolikus zavarok kialakulása szempontjából a cukor fruktóz tartalma kritikus tényező.

A fruktóz felszívódása gyorsan zajlik, nem ATP-igényes, illetve a Na<sup>+</sup> felszívódásától is független. Az anyagcserét már a bélhámsejtekbe jutva befolyásolja a bél *de novo* lipogenetikus és glukoneogenetikus aktivitásának fokozásán keresztül. A portális keringésbe került fruktóz nagy részét a máj veszi fel, ahol lebontási útja kikerüli a glikolízis kezdeti lépéseit, így a szabályozott foszfofruktokináz 1 enzimet is. Lebontása egyrészt inzulintól független, másrészt mentesül a citrát és az ATP visszacsatolásos gátlása alól, vagyis a glukóz lebontásával ellentétben szabályozatlan, ráadásul annál gyorsabb folyamat. Fruktóz lebontásakor a glicerín-3-foszfát és az acetyl-CoA folyamatos termelődése

fokozza a májban a lipogenezist és a VLDL-termelést. Az étvágy-jóllakottság hormonális szabályozására sem hat, így növeli a táplálékbevitelt.

Ezzel szemben a zöldtea, valamint legjelentősebb katekin komponense, az EGCG éppen az anyagcsere-betegségekben betöltött jótékony szerepe miatt keltette fel a tudományos érdeklődést. Az EGCG hatékonyan véd az elhízás, a metabolikus szindróma és a 2-es típusú cukorbetegség ellen. Mindezt nagyrészt humán, vagy állatmodellen végzett tanulmányok bizonyítják, melyekben átfogóan vizsgálták a megfigyelt személyek, vagy egyedek metabolikus állapotát. Következésképpen az EGCG hatását a teljes anyagcsere-re, vagy bizonyos kórképekre jól ismerjük, a mögötte rejlő molekuláris folyamatok azonban még nagyrészt tisztázatlanok.

### **Cushing-szindróma**

Szembetűnő, hogy a metabolikus szindróma tünetei milyen nagy mértékben fednek át a hiperkortizolémia következményeként kialakuló Cushing-szindrómával. Ez azt sugallja, hogy – bár a metabolikus szindrómában nem figyelhető meg emelkedett plazma kortizolszint – e kórképben is szerepe lehet a fokozott kortizolhatásnak. Kérdés, hogyan kialakulhat ki túlzott hormonhatás a plazma hormonszintjének emelkedése nélkül. Míg a hagyományos endokrinológia a hormonok mennyiségi változásait elsősorban a plazmában vizsgálta, újabb kutatások rávilágítottak a különböző szövetekben észlelhető hormonkoncentrációk eltéréseire és ennek jelentőségére.

### **Perifériás kortizolciklus**

Létezik a kortizolnak – a mellékvesekéreg által aktuálisan termelt mennyiségtől független – szövetek közti fluktuációja, amit a hormont inaktiváló, illetve reaktiváló enzimaktivitások szervek közötti sajátos megoszlása tesz lehetővé. A kortizol kortizonná alakítása (inaktiválása) 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. Az elmúlt évtized során világossá vált, hogy a kortizolhatás jelentős hányada e lokális/prereceptoriális aktiválódásnak tulajdonítható. Izotópos jelölés segítségével megállapították, hogy a szöveti kortizol-újratermelésből annyi aktív hormon származik, mint

a mellékvesekéreg által újonnan termelt mennyiség 25%-a. Ennek pedig nagyjából egyharmada a májból, kétharmada a zsigeri (hasúri/viszcerális) zsírszövetből származik.

### **11 $\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenázok**

A kortizol hormon és a kortizon prohormon egymásba alakítását a perifériás szövetekben a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (11 $\beta$ HSD) enzimek katalizálják.

Emlősökben két típusa ismert: a kettes típusú izoenzim (11 $\beta$ HSD2) elsősorban a vesében, a bélrendszerben és a nyálmirigyekben fejeződik ki. Sejten belüli elhelyezkedését tekintve citoszolikus fehérje, mely NAD<sup>+</sup> koenzim segítségével oxidálja a kortizolt kortizonná, vagyis a hormon inaktiválását katalizálja.

Az egyes típus (11 $\beta$ HSD1) ezzel szemben a glukokortikoid-célszervekben, azaz a májban, a vázizomzatban, valamint a zsírszövetben van jelen, és általában ellentétes irányú reakciót katalizál (kivéve a bőr alatti zsírszövetben, ahol inaktiválja a hormont). Ez a fehérje az endoplazmás retikulum lumenében helyezkedik el, koenzimként pedig – a reakció irányától függően – NADP<sup>+</sup>-t vagy NADPH-t használ. Mivel az organelum membránja piridin-nukleotidok számára átjárhatatlan, a reakció katalíziséhez kizárólag az endoplazmás retikulum elkülönült, luminális NADPH-készlete áll rendelkezésre. Az enzim által elhasznált NADPH újratermelődését, vagyis a NADP<sup>+</sup> visszaredukálását a szintén luminális és a 11 $\beta$ HSD1-hez fizikailag is kapcsolt hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzim (H6PD) végzi, miközben glukóz-6-foszfát (G6P) 6-foszfoglukonáttá (6PG) való átalakulását katalizálja. Szubsztrátja, a G6P egy szelektív transzporter fehérjén, a glukóz-6-foszfát-transzporterén (G6PT) keresztül jut be az endoplazmás retikulumba. Ahol a H6PD nem redukálja vissza a keletkezett NADP<sup>+</sup>-t NADPH-vá, ott az enzim oxidál, vagyis kortizol-kortizon átalakulást katalizál. Így végső soron a 11 $\beta$ HSD1 megfelelő funkciójához nem csak maga az enzim jelenléte és épsége szükséges, hanem az említett három fehérjéből álló „katalitikus triád” egészének együttes működése.

## **Prereceptorális kortizoltermelés és metabolikus szindróma**

A  $11\beta$ HSD enzimek megoszlása a szervezetben, valamint az 1-es típusú izoforma változó irányú aktivitása lehetővé teszi tehát egy dinamikus kortizol-újrafelhasználódást a szövetek között anélkül, hogy a hormon koncentrációja a szérumban változna. Ez a megfigyelés, illetve a kortizol anyagcserére gyakorolt hatásai rávilágítottak a hormon prereceptorális metabolizmusának lehetséges szerepére különböző anyagcserebetegségek patomechanizmusában. A feltételezést transzgenikus, illetve génkiütött állatmodelleken végzett kísérletek eredményei is alátámasztják: azon egerek, amelyekben kiütötték a  $11\beta$ HSD1, vagy a H6PD enzim génjét, sovány testalkatúak lettek, hipoglikémiát, valamint magas glukóz-toleranciát 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 a diabetogén diétával szemben. Ugyanakkor a zsírszövetben túltermeltetett  $11\beta$ HSD1 lényegében a komplett metabolikus szindróma kifejlődését előidézte. Az enzim májban való szelektív túltermelése pedig a metabolikus szindróma tüneteire vezetett, bár elhízás nélkül. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a kortizol prereceptorális aktiválásának fokozása – szövetenként eltérő tüneteket okozva – összességében metabolikus szindrómához vezet.

### **A lokális kortizoltermelés mint gyógyszerterápiás pont**

A prereceptorális kortizoltermelés jelentőségének és metabolikus szindrómában betöltött szerepének felismerése lendületet adott a  $11\beta$ HSD-gátlók mint új antidiabetikumok fejlesztésének. Ilyesfajta hatóanyag tervezése nem egyszerű feladat, mert a kívánt hatás elérésére kétszeres szelektivitást kell elérni. Alapvető elvárás a hatóanyaggal szemben, hogy kizárólag az egyes típusú izoenzimet gátolja, mert a kettes típusú gátlásával megakadályoznánk a kortizol inaktiválódását a mineralokortikoid célszövetekben, ezzel az egész szervezet só-víz háztartása felborulna. A kipróbált, szelektív  $11\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ HSD1 szelektív gátlószere az enzim működését csak a kortizoltermelés irányában gátolná, a kortizontermelés irányában pedig legalábbis nem akadályozná, esetleg serkentené. Ez azonban enzimológiai szempontból – tekintve, hogy a biokatalizátorok csupán az adott reakció sebességét képesek befolyásolni, irányát nem – nehezen megvalósítható feladat.

### **Célkitűzések**

Kutatásainkkal az említett diabetogén (fruktózfogyasztás) és antidiabetikus (katekinbevétel) táplálkozási tényezők hatását kívántuk tanulmányozni. Konkrét célunk volt annak tisztázása, hogy a fruktóz-anyagcsere és a glikolízis köztiterméke, a fruktóz-6-foszfát vajon fokozza-e, illetve a zöldtea katekin EGCG gátolja-e a mikroszomális G6PT-H6PD-11 $\beta$ HSD1 katalitikus triád kortizoltermelő aktivitását.

### **Kísérleteinkkel az alábbi kérdésekre kerestünk választ:**

- Hogyan befolyásolja a F6P a 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 $\beta$ 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 egy általános redox effektus részei?

## Módszerek

*Mikroszómápreparálás:* A mikroszómápreparátumokat Wistar patkányok májából és viszcerális zsírszövetéből differenciál centrifugálással állítottuk elő, és felhasználásig folyékony nitrogénben tároltuk.

*Glukóztermelés:* A máj mikroszómát 2 mM G6P, vagy F6P jelenlétében inkubáltuk, a reakciót hődenaturációval (100°C, 5 perc) állítottuk le. A minták glukóztartalmát a Sigma-Aldrich által forgalmazott „Glucose (GO) Assay Kit” segítségével végeztük, a gyártó utasításai alapján.

*Mikroszomális kortizon-kortizol átalakulás:* A 11 $\beta$ HSD1 enzim aktivitását közvetve és közvetlenül is mértük. A kortizon-redukció mértékének meghatározására az intakt patkány máj mikroszómát 5  $\mu$ M kortizon és 50  $\mu$ M G6P, vagy F6P jelenlétében inkubáltuk. A kortizol oxidációját hasonló kísérleti körülmények között vizsgáltunk alamethicinnel (0,1 mg/mg fehérje) előkezelt, vagyis permeabilizált mikroszómában, 5  $\mu$ M kortizon, és 50  $\mu$ M NADP<sup>+</sup> hozzáadása után. A mintákat a HPLC-vel történő kortizon/kortizol mérésig -20°C-on tároltuk.

*H6P-izomeráz aktivitás:* Az izomeráz aktivitást közvetett módon vizsgáltuk, bakteriális (*Leuconostoc mesenteroides*) eredetű G6PD enzim segítségével. Mosott mikroszóma-, illetve citoszolikus frakciókat inkubáltunk MOPS-KCl pufferben, 22°C-on. A G6PD enzim jelenlétében a NADH-szint növekedése egyenesen arányos a sebességmeghatározó 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.

*Mikroszomális fruktóz-6-foszfát-transzport:* A mikroszomális F6P-felvételt rapid filtrációs technikával mértük.

*Immunoblot:* A citoplazmatikus PGI enzim jelenlétét különböző sejtfrakciókban Western blot módszerrel vizsgáltuk.

*Folyadékkromatográfiás vizsgálatok:* A mikroszomális enzimaktivitás-mérésekből származó mintákból párhuzamosan határoztuk meg a kortizon- és kortizolszinteket. Az elvá-



lasztás HPLC segítségével történt, Nucleosil 100 C18 oszlopon, 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. A kortizon és kortizol retenciós idejét minden esetben a mérés elején injektált 10-10  $\mu$ M koncentrációjú referenciaoldatok alapján határoztuk meg.

*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.

*Endogén redukáló/oxidáló kapacitás mérése:* A mikroszóma belső kortizon-redukáló illetve kortizol-oxidáló kapacitásának meghatározásához intakt mikroszómát 2 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on, 10  $\mu$ M kortizon, vagy kortizol jelenlétében, majd HPLC-vel meghatároztuk a kortizon- illetve kortizolszinteket.

*Lipidperoxidáció mérése:* A membránlipidek esetleges oxidatív károsodását tiobarbiturát reaktív anyagok (TBARS) keletkezésének mérésén keresztül vizsgáltuk.

*Statisztikai analízis:* Kísérleteinket triplikátumokban végeztük, mindegyiket legalább három alkalommal megismételve. Grafikusan ábráztuk az eredmények átlagértékeit, a szórás, vagy a középérték közepes hibájának (SEM) feltüntetésével. Az adatokat egy szempontú varianciaanalízis és Tukey-Kramer alkalmazásával értékeltük, GraphPad Prism® program segítségével. A szignifikanciaszinteket 0,05, 0,01, illetve 0,005 p-értékeknél állapítottuk meg.

## **Eredmények**

### **F6P metabolizmusa az endoplazmás retikulumban**

#### **F6P-függő glukóz- és kortizoltermelés máj mikroszómában**

A G6PT-H6PD-11 $\beta$ HSD1 triád működése azon alapul, hogy a kortizon kortizollá való redukációjához szükséges NADPH-t a G6P oxidációja szolgáltatja az endoplazmás retikulum lumenében. Megfigyelték, hogy az izolált máj mikroszóma kortizoltermelését a F6P is táplálhatja, ami arra enged következtetni, hogy valamilyen módon ez a molekula is

hozzájárulhat a luminális NADPH-termeléshez az endoplazmás retikulumban, jóllehet az ezzel kapcsolatos transzport- és enzimatis folyamatok egyelőre nem ismertek.

A mikroszomális 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 összhangban azt tapasztaltuk, hogy a F6P a G6P-hoz hasonló hatékonysággal táplálja a kortizonredukciót. Ezután megvizsgáltuk, hogy a mikroszomális 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 citoszolikus 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 11% volt). A mikroszóma további mosása azonban már egyik hexóz-foszfát jelenlétében sem befolyásolta szignifikáns mértékben a kortizolképződés sebességét. Az adatok alapján feltételezhető, 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.

### **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-ból 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. 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. 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 kilencedére (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. Kijelenthető tehát, hogy 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 PGI.

### **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 luminális 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 $\beta$ HSD1 számára. A zsírsejtek lokális kortizol-anyagcseréjének kiemelt jelentősége miatt vizsgálatainkat zsírszövetből származó

mikroszómára is kiterjesztettük. A H6PD luminális lokalizációja, illetve a mikroszomális membrán elhanyagolható piridin-nukleotid-áteresztőképesége miatt az enzim a kívülről hozzáadott  $\text{NADP}^+$ -hez mindaddig nem fér hozzá, amíg a mikroszóma membránja intakt, az enzim aktivitása tehát szinte teljesen látens. Ha G6P és  $\text{NADP}^+$  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.

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-általi NADPH-termelés szignifikáns mértékben csökkenthető volt, míg a G6P-tal inkubált mikroszóma NADPH-termelését a gátlószer nem befolyásolta.

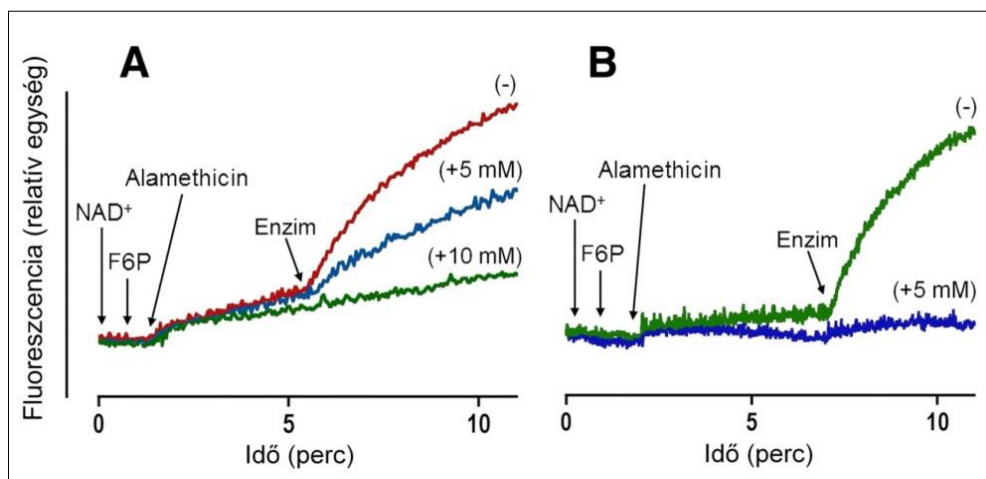
Annak megerősítése érdekében, hogy az észlelt NADPH-termelés valóban a G6P H6PD enzim általi oxidálásának tulajdonítható, megvizsgáltuk a F6P-ból kiinduló 6-foszfoglukonát-termelést. Az eddigiekben alkalmazott modellt exogén 6-foszfoglukonát-dehidrogenáz enzimmel egészítettük ki, és az általa katalizált reakciót szintén a termelődő 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.

### **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 luminális, 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  $\text{NAD}^+$ , mint NADPH iránt, azaz a permeabilizált mikroszóma G6P jelenlétében igen kis sebességgel képes a hozzáadott  $\text{NAD}^+$  koenzimet NADH-vá redukálni. Hasonlóan lassú NADH-keletkezést detektáltunk, amikor a permeabilizált máj-, vagy zsírszöveti mikroszómát  $\text{NAD}^+$  és F6P jelenlétében vizsgáltuk. Kb. 5-perces inkubálást követően G6P-ra és  $\text{NAD}^+$ -ra specifikus, bakteriális (*Leuconostoc mesenteroides* eredetű) G6PD enzimet 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 (1. ábra).



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

*Aktivitások:* 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)

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. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a vezikulumok külső felszínén zajló F6P-G6P átalakulás a luminális izomerizációhoz viszonyítva elhanyagolható mértékű.

### **F6P-transzport a mikroszomális membránon keresztül**

Az intakt mikroszómához kívülről adott F6P körvonalazódó luminális metabolizmus 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. A F6P, várakozásunknak megfelelően, jól mérhető sebességgel jutott be a mikroszóma lumenébe. A transzport aktivitás mindkét vizsgált szövet esetén a hozzáadott hexóz-foszfát koncentrációjával arányos volt. Adipocita eredetű 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. 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 gátlószer, az S3483 a vártan megfelelően gátolta a G6P transzportját, a F6P-ét ellenben nem befolyásolta. Ráadásul a két hexóz-foszfát magas (kompetitív) koncentrációban alkalmazva sem gátolta egymás bejutását, ami szintén a két vegyület eltérő transzportútja mellett szól.

A F6P felvételének további lehetséges módja a nem specifikus glukóz-foszfát transzporterén (GPT) keresztül való bejutás, ahogy azt korábban már humán fibrocita mintákban leírták. 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 gátló-

szere. Míg a molekula jelenléte a G6P felvételére nem volt hatással, a F6P transzportjának sebességét közel felére (55%-ára) csökkentette.

## **A mikroszomális hexóz-foszfát-izomeráz vizsgálata HEK-293 sejtekben**

### **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  $\text{NADP}^+$ , 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.

### **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  $\text{NAD}^+$ -ból NADH-t termel. Az előbbi pontban leírt mérést tehát úgy módosítottuk, hogy  $\text{NADP}^+$  helyett  $\text{NAD}^+$ -ot használtunk, amelyet – várakozásainknak megfelelően – az izolált H6PD nem redukált. Az öt perc inkubálási idő után hozzáadott,  $\text{NAD}^+$ -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.

### **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, ezzel szemben immunoblot módszerrel, a citoszolikus PGI elleni antitesttel kizárólag a sejtplazmái frakciókban kaptunk jelet, dacára annak, hogy a mikroszomális fehérjepreparátumokból – a kétségek kizárására – tízszeres, illetve ötvenszeres fehérjemennyiségeket alkalmaztunk.

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. 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.

Hasonló eredményeket kaptunk F1,6BP gátlószerként való alkalmazásával, mind HEK-293, mind patkány májból származó mikroszomális, illetve citoplazmái fehérjepreparátumok összehasonlításakor.

### **pH-érzékenység**

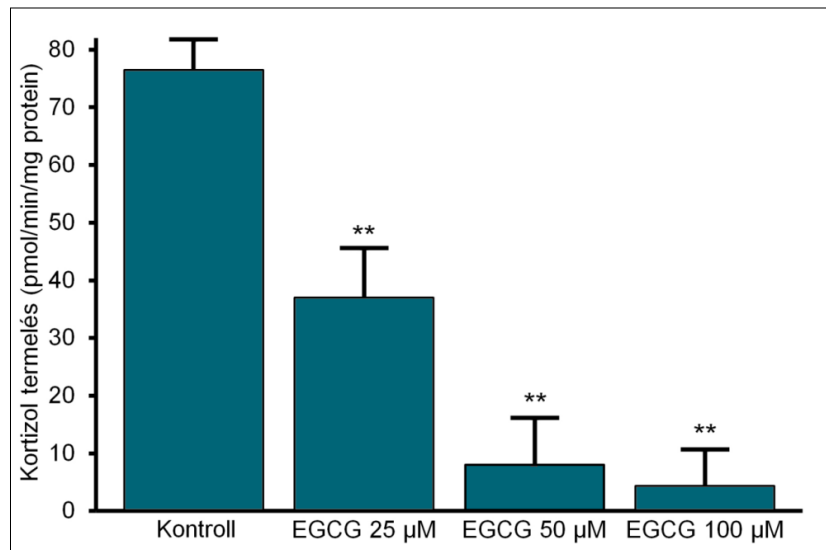
Ezek alapján úgy tűnik, hogy a mikroszomális és citoplazmái hexóz-foszfát-izomeráz különböző kinetikai paraméterekkel rendelkeznek. A továbbiakban utánajártunk annak is, hogy vajon a két enzim hasonló mértékben tolerálja-e a környezet pH értékének ingadozását. Kiderült, hogy a mikroszomális fehérje kevésbé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



## EGCG

### EGCG koncentrációfüggő gátló hatása a mikroszomális kortizoltermelésre

Az EGCG lehetséges hatását először a G6PT-H6PD-11 $\beta$ 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.



**2. ábra** EGCG hatása a kortizoltermelésre intakt máj mikroszómában

(*átlag + SEM; n = 3; \*\*p < 0,01 vs. kontroll*)

Az EGCG-kezelés koncentrációfüggően, szignifikáns mértékben gátolta a kortizon kortizollá való redukcióját. A kezeletlen mikroszómaéhoz képest 25  $\mu$ M EGCG kevesebb mint felére csökkentette a kortizoltermelés sebességét, 50  $\mu$ M-nál magasabb koncentrációk alkalmazása mellett pedig a keletkezett kortizol mennyisége már alig volt detektálható (2. ábra).

### EGCG hatása a G6PT-H6PD-11 $\beta$ 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, így maradt a két lumenális dehidrogenáz enzim lehetséges közvetlen gátlása. A mikroszomális membrán permeabilizálásával a H6PD és 11 $\beta$ HSD1 funkcionálisan szétkapcsolható, tehát aktivitásuk egymástól függetlenül tanulmányozható. Ráadásul ilyenkor a két enzim szabadon

hozzáfér a kívülről hozzáadott kofaktoraihoz (NADP<sup>+</sup>/NADPH), vagyis aktivitásuk látenciája is megszűnik.

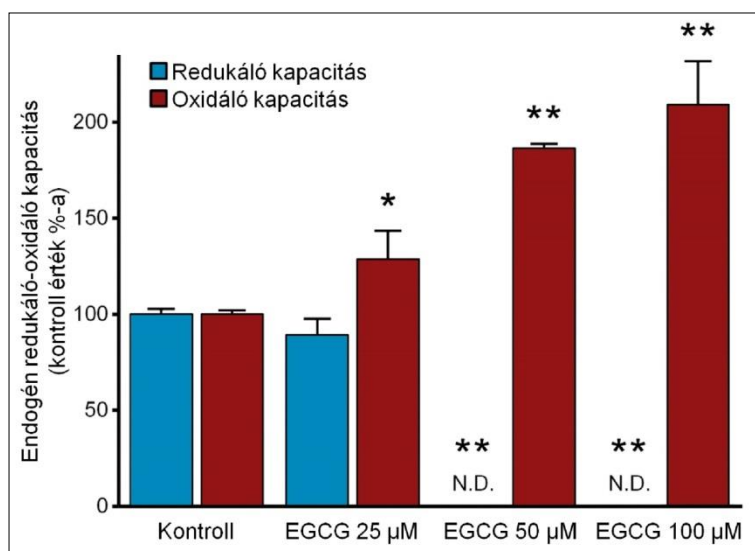
Patkány máj eredetű mikroszómát NADP<sup>+</sup> jelenlétében G6P-tal (a H6PD vizsgálatához), vagy kortizollal (a 11βHSD1 vizsgálatához) kezeltünk, és az enzimaktivitásokat a NADPH termelődésének valós-idejű fluoreszcens nyomon követése alapján határoztuk meg. Mindkét vizsgált enzim maximális látenciát mutatott, vagyis aktivitásuk csak a membrán permeabilizálásától kezdődően volt mérhető. 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 11βHSD1 által katalizált NADPH-termelésnek felel meg. Permeabilizált mikroszómában a H6PD aktivitását gyakorlatilag még magas (100 μM) koncentrációjú EGCG jelenléte sem befolyásolta (0,2%-os gátlás), és a 11βHSD1 működésében is csak kis mértékű (17%-os) gátlást tapasztaltunk.

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

### **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 11βHSD1 enzimek kapcsolt működése, és a kortizoltermelő apparátus fiziológias egysége esetén észlelhető, arra enged következtetni, hogy a hatás valamiképpen összefügg az endoplazmás retikulum saját, a környezetétől 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. A luminális redox állapot megváltozásának tanulmányozását a mikroszóma endogén redukáló-oxidáló kapacitá-

sának 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<sup>+</sup> 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 (3. ábra).



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

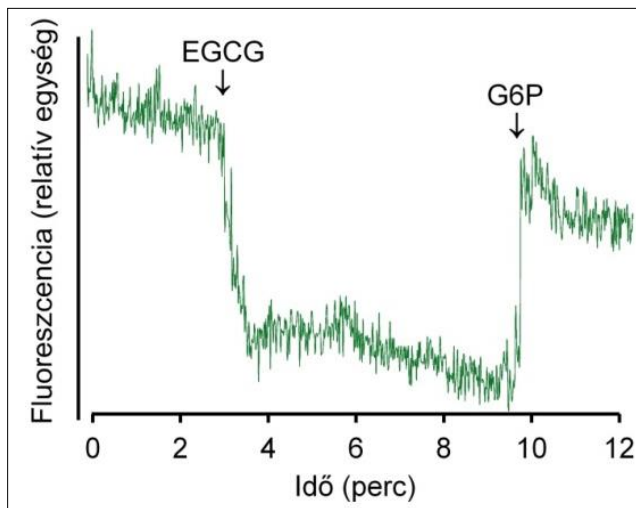
átlag + SEM; n = 3; \*p < 0.05; \*\*p < 0.01 vs.

kontroll

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

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. A

fluoreszcens jel szintjében EGCG hozzáadása nagymértékű csökkenést eredményezett, ami G6P-tal részlegesen helyreállítható volt (4. ábra). A megfigyelt jelenség alátámasztja a zöldtea flavanolnak a luminális NADPH-ra gyakorolt, feltételezett oxidáló hatását. Az EGCG hatására keletkezett NADP<sup>+</sup> G6P hozzáadása után ismét NADPH-vá alakul vissza. Hasonló redox eltolódást váltott ki metirapon, vagy kortizon hozzáadása is, több korábbi



**4. ábra** EGCG hatása a mikroszóma  
luminális NADPH-készletére

kutatás eredményeivel összhangban. Az észlelt jelenség enzimátikus jellegét támasztja alá – és egyben az EGCG és a NADPH fluoreszcens interferenciáját zárja ki –, hogy, mikor hasonló kísérleti összeállításban az EGCG-t fehérjementes NADPH oldathoz adtuk, a mikroszóma megfigyelt NADPH-oxidáció nem volt észlelhető.

### EGCG hatása a mikroszóma lipidperoxidációjára

Mivel a flavanolok, más antioxidáns vegyületekhez hasonlóan, oxigén jelenlétében prooxidáns aktivitással is rendelkeznek, 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<sup>2+</sup>/aszorbát kezeléssel, mint pozitív kontrollal, megmérve a tiobarbiturát reaktív anyagok (TBARS) szintjét patkány máj mikroszómaiban. A tea flavanolok alapvető antioxidáns tulajdonságainak megfelelően az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között antioxidánsként, és nem oxidánsként viselkedett, ugyanis nem növelte (sőt, némiképp csökkentette, bár nem szignifikáns mértékben) a membránlipidek peroxidációját. A mikroszóma luminális NADPH-készletében tapasztalt markáns oxidatív hatás tehát specifikus jelenség, és nem a ROS-termelés általános fokozódásának következménye.

## 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 közvetlenül 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 levonhatjuk a következtetést, hogy a fruktózban gazdag táplálkozás negatív, illetve a teaflavanolok fogyasztásának pozitív metabolikus hatásai összefüggésbe hozhatók az endoplazmás retikulum prereceptorális kortizolaktiváló funkciójának befolyásolásával. Ez egyben alátámasztja azt is, hogy az organelum megfelelő tápanyagszen-

zor működése az egész szervezet metabolikus állapotának fontos meghatározója. Eredményeink azt mutatják, hogy az endoplazmás retikulum luminális piridin-nukleotid-készlete az elhízással kapcsolatos betegségek prevenciója és terápiája szempontjából ígéretes gyógyszertámadáspont, amelyen keresztül a  $11\beta$ HSD1 kortizonredukáló aktivitása szelektíven gátolható.

## Saját közlemények jegyzéke

### 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

### 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.