

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2735.**

**VARGA VIOLA MÁRIA**

**Patobiokémia**  
című program

Programvezető: Dr. Csala Miklós, egyetemi tanár  
Témavezető: Dr. Margittai Éva, egyetemi adjunktus

# A vékonybél szerepe a vércukorszint fenntartásában – fajspecifikus különbségek

Doktori tézisek

**Varga Viola**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Margittai Éva, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók:

Dr. Czegle Ibolya, Ph.D., belgyógyász szakorvos

Dr. Csizmadia Tamás, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Kulka Janina, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Zádori Zoltán Sándor, Ph.D., egyetemi oktató

Dr. Wunderlich Lívius Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2022

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	4
1. Irodalmi bevezető .....	9
1.1. A vékonybél szerepe a vércukorszint szabályozásában.....	9
1.2. Szénhidrát anyagcserét érintő metabolikus betegségek- metabolikus szindróma, diabetes, elhízás .....	10
1.2.1. Fruktóz fogyasztás szerepe a metabolikus zavarokban.....	12
1.3. Az endoplazmás retikulum szerepe a szénhidrát-anyagcserében .....	15
1.3.1. A glukóz-6-foszfataz rendszer .....	16
1.3.1.1. A glukóz-6-foszfataz .....	20
1.3.1.2. A rendszerhez kapcsolódó transzporterek .....	23
1.3.1.2.1. G6PT .....	23
1.3.1.2.2. Foszfát transzporter.....	25
1.3.1.2.3. A glukóz transzportja.....	27
1.3.2. A G6PT-H6PDH-11 $\beta$ HSD1 triád működése .....	29
1.3.3. Fruktóz hatása a G6PT-H6PDH-11 $\beta$ -HSD1 triád működésére .....	36
1.4. Foszfohexóz-izomeráz útvonal az endoplazmás retikulumban .....	40
1.5. Felszívódás.....	41
1.6. G6Páz a bélben, fajok közti ellentmondások.....	43
2. Célkitűzések .....	48
3. Módszerek .....	49
3.1. Real-time RT-PCR.....	49
3.2. A mikroszómák.....	50
3.2.1. Mikroszómák eredete .....	50
3.2.2. Máj mikroszómák izolálása .....	51
3.2.3. Bél mikroszómák izolálása.....	51

3.2.4. Mikroszómák tisztaságának ellenőrzése.....	52
3.2.5. Mikroszómák épségének validálása .....	52
3.3. Enzimaktivitás mérések előkészítő lépései.....	52
3.3.1. Mosási lépések.....	52
3.3.2. pH Inaktiválás.....	52
3.3.3. Mikroszómák permeabilizálása az enzim latenciájának meghatározásához ....	52
3.4. Enzimaktivitás mérések.....	53
3.4.1. Glukóz termelés mérése.....	53
3.4.2. Foszfát termelés mérése.....	54
3.5. Fehérje koncentráció mérése .....	54
3.6. Western Blot.....	54
3.7. Mikroszomális kortizon-kortizol átalakulás .....	55
3.8. Statisztikai analízis .....	55
4. Eredmények .....	56
4.1 A glukóz-6-foszfátáz rendszer expressziójának vizsgálata máj és bél mikroszómákban.....	56
4.2 A H6PDH expresszió vizsgálata tengerimalac, patkány és humán mikroszóma mintákon.....	59
4.3 A G6Páz enzimaktivitás kinetikai analízise .....	60
4.5 A latencia vizsgálata a mikroszóma épségének meghatározásához .....	63
4.6 A G6Páz enzimaktivitása G6P szubsztráttal a különböző fajok máj mikroszómáin .....	64
4.7 A G6Páz enzimaktivitása G6P szubsztráttal a különböző fajok bél mikroszómáin .....	65
4.8 A G6Páz rendszer a vékonybélben intraluminálisan orientált.....	66
4.9 F6P-függő glukóztermelés a májban és a bélben különböző fajok esetében .....	67
4.10 A fruktóz hatása a 11 $\beta$ -HSD1 enzimaktivitásra .....	69

5. Diszkusszió.....	71
6. Következtetések.....	79
7. Összefoglalás.....	80
8. Summary.....	81
9. Irodalomjegyzék.....	82
10. Saját publikációk jegyzéke.....	112
11. Köszönetnyilvánítás.....	113
Függelék.....	114
Ábrák jegyzéke.....	114
Táblázatok jegyzéke.....	115

## Rövidítések jegyzéke

1,5-AG6P	1,5-anhidroglucitol-6-foszfát
11 $\beta$ -HSD1	11 $\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1
3T3-L1	egér adipocita sejtvonal
6-PG	6-foszfoglukonát
ACTH	adrenocorticotrop hormon
ALIOS	American Lifestyle-induced Obesity Syndrome- amerikai életvitel által okozott elhízás szindróma
AMP	adenozil-monofoszfát
ANOVA	analysis of variance – egyszempontos varianciaanalízis
ATP	adenozil-trifoszfát
BMI	Body Mass Index - testtömegindex
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein – CAAT/enhancer-kötő fehérje
DHA	dehidroaszorbát
DKO	dupla génkiütött (állat)
DNS	deoxiribonukleinsav
EGT	endogén glukóz termelés
ER	endoplazmás retikulum
F1,6BP	fruktóz-1,6-biszfoszfát
F6P	fruktóz-6-foszfát
FABP4	fatty acid-binding protein 4 – zsírsav kötő fehérje 4
FBPáz	fruktóz-1,6-biszfoszfátáz

FRET	Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzfer
G1P	glukóz-1-foszfát
G6P	glukóz-6-foszfát
G6Páz	glukóz-6-foszfataz
G6PC	glukóz-6-foszfataz katalitikus alegység
G6PDH	glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz
G6PT	glukóz-6-foszfát transzporter
GCSF	granulocyte colony-stimulating factor granulocita-kolónia stimuláló faktor
GLUT	glukóz-transzporter
GR	glukokortikoid receptor
GSD	glikogéntárolási betegség (glycogen storage disease)
GSH	glutation
GSSG	glutation diszulfid
H6P	hexóz-6-foszfát
H6PDH	hexóz-6-foszfát dehidrogenáz
HDL	high-density lipoprotein – nagy sűrűségű lipoprotein
HEK293	humán embionális vesesejtek
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-piperazin-1-etánszulfonsav
HepG2	humán hepatokarcinóma sejtvonala
HFCS	magas fruktóztartalmú kukoricaszirup
HHH7	humán embrionális vesesejt, mely stabilan expresszálja

a 11 $\beta$ -HSD1 és H6PDH enzimeket

HPA	hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely
IGF-1 faktor-1	Insulin-like growth factor 1 –inzulinszerű növekedési faktor-1
IGRP	pankreász sziget-specifikus G6Páz rokon fehérje
KHK	ketohekináz
K <sub>m</sub>	Michaelis konstans
KO	génkiütött (állat)
LDL	low-density lipoprotein – kis sűrűségű lipoprotein
M6P	mannóz-6-foszfát
MetS	metabolikus szindróma
MOPS	4-morfolinopropánszulfonsav
MR	mineralokortikoid receptor
mRNS	messenger – hírvívó ribonukleinsav
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid-adenin-dinukleotid (oxidált)
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid (redukált)
NADP <sup>+</sup>	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (oxidált)
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (redukált)
NAFLD	nem alkoholos zsírmáj betegség
NCEP-ATP III	National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III A – Nemzeti Koleszterin Oktatási Program, Felnőtt Panel III.
NHANES	National Health and Nutrition Examination study (Nemzeti Egészségügyi és Táplálkozástudányi Tanulmány)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance -mágneses magrezonancia



NPT	mikroszómális foszfát transzporter
PEG	polietilén-glikol
PEPCK	foszfoenolpiruvát-karboxi-kináz
PGI	foszfo-glukóz-izomeráz
Pi	inorganikus foszfát
PPAR $\gamma$	peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma
PVDF	polivinilidén-fluorid
RER	rough endoplasmic reticulum – durvafelszínű endoplazmás retikulum
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction – reverz transzkripció polimeráz láncreakció
SCN4	severe congenital neutropenia type 4 – súlyos veleszületett neutropénia szindróma
SD	standard deviation – szórás
SDR	short-chain dehydrogenases/reductases – rövid láncú dehidrogenázok/reduktázok
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát – poliakrilamid gélelektroforézis
SEM	standard error of the mean – középérték közepes hibája
SER	smooth endoplasmic reticulum – simafelszínű endoplazmás retikulum
SERCA	szarkoplzmás retikulum kalcium transzport ATPáz
SGLT transzporter	sodium-glucose linked transporter – nátrium-glukóz transzporter
SLC37A4 foszfátcsereélő	Solute Carrier Family 37 Member 4 – glukóz-6-foszfátcsereélő

SREBP-1c	sterol response element binding protein-1c
STZ	sztreptozotocin
T2DM	2-es típusú diabétesz mellitusz
TBST	tris-pufferelt sóoldat 1% Tween 20-szal
TG	triglicerid
THE	tetrahidrokortizon
THF	tetrahidrokortizol
UGPR	ubiquitous glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein – mindenütt kifejeződő G6PC rokon fehérje
UhpT	bakteriális hexóz-6-foszfát transzporter
UPR válasz	unfolded protein response – nem feltekeredett fehérje válasz
VLDL lipoprotein	very low-density lipoprotein – nagyon kis sűrűségű lipoprotein
WHO	World Health Organization – Egészségügyi Világszervezet

## 1. Irodalmi bevezető

### 1.1. A vékonybél szerepe a vércukorszint szabályozásában

Az emberi szervezet homeosztázisának fenntartásához elengedhetetlen vércukor megfelelő szintjének fenntartása (3,3-6 mmol/l). Testünk glukózsükségletét leggyorsabban a szénhidrátok, azon belül is az egyszerű cukrok elfogyasztásával tudjuk biztosítani. Ha azonban nem fogyasztunk elegendő szénhidrátot, akkor a máj – érzékelve az alacsony vércukorszintet – el kezdi lebontani a rakározott glikogénkészletét (glikogenolízis). A májban található a legjelentősebb glikogénraktár, melyből a glukóz sokkal hatékonyabban előállítható, mint a zsírokból. A glikogén lebontásából származó glukózt nem a máj hasznosítja, hanem a vérbe kerülve hozzájárul a homeosztázis fenntartásához.

Ezzel párhuzamosan aktiválódik egy másik folyamat is, mely során a glukóz egyszerűbb molekulákból „újraszintetizálódik” (glukoneogenezis). Ehhez más anyagcsereutak köztiterékei, végtermékei és egyes aminosavak szolgálhatnak kiindulási anyagként. Ez legfőképp szintén a májban, kisebb mértékben a vesékben figyelhető meg.

Annak a gondolata, hogy a májon és vesén kívül más szervek is képesek lehetnek endogén glukóztermelésre (EGT) onnan ered, hogy néhány glukoneogenetikus enzimet sikerült más szövetekben is kimutatni, melyeket ezidáig nem tartottak glukoneogenetikusnak. Ezek közül a legjelentősebb és azóta is legvitatottabb a vékonybél szerepe az EGT-ben és így a vércukorszint szabályozásban. Az egyik elmélet szerint a bél glukoneogenezisének növekedése nagyban hozzájárulhat azon 2-es típusú diabéteszben szenvedő betegek állapotának gyors javulásához, akik bariatriai műtéten mentek keresztül (1).

A vékonybél szerepe a glukoneogenezisben évtizedeken át vitatott volt. A glukóz-6-foszfát rendszer tagjainak jelenlétét sok független laboratóriumban vizsgálták, és néhány kutató szerint a vékonybélnek szerepe lehet a vércukorszint szabályozásában (2-4), legalábbis speciális körülmények esetében, mint a hosszútávú éhezés, vagy amikor a máj glukóztermelése kiesik (5), illetve magas fehérjetartalmú táplálkozás esetén (6). Másrészt, a különböző kísérleti állatokkal történt megfigyelések nem hoztak egyértelmű eredményeket a G6Páz rendszer jelenlétével és aktivitásával kapcsolatosan. Egy nemrég

megjelent összefoglaló cikk a vékonybél glukoneogenikus áramlásának vizsgálatára alapozva azt a következtetést vonta le, hogy nem áll elegendő bizonyíték rendelkezésünkre, mely a bél glukóztermelését bizonyítaná (7). A vékonybél fontos szerepet játszik a fruktóz felvételében és metabolizmusában is (8). Kutatócsoportunk korábbi tanulmányai alapján a felvett fruktóz glukózzá alakulhat (9). Így azoknál a fajoknál, melyek főként fruktóz tartalmú táplálékon élnek, a bél G6Páz rendszerére feltétlenül szükség van a fruktóz metabolizmusához. Ez egy nemrég felfedezett útvonalon keresztül valósulhat meg, melyben a fruktóz-6-foszfát egy speciális fruktóz-6-foszfát transzporterrel keresztül jut az ER lumenébe, majd itt egy ezidáig ismeretlen foszfohexóz-izomeráz aktivitású enzim glukóz-6-foszfáttá alakítja (10).

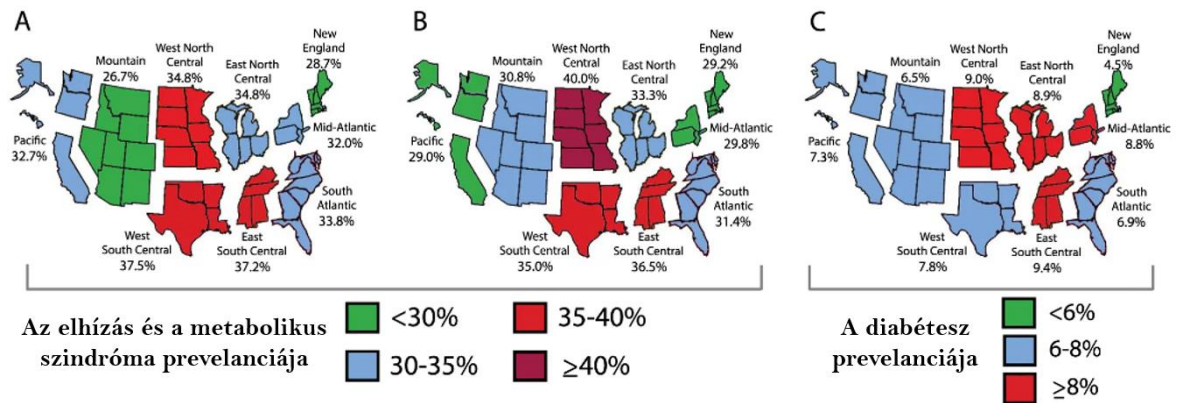
## **1.2. Szénhidrát anyagcserét érintő metabolikus betegségek- metabolikus szindróma, diabetes, elhízás**

A metabolikus szindróma (MetS) fogalmát Reaven alkotta meg 1988-ban és azóta több definíció is született ennek leírására. A legáltalánosabban elfogadott definíciók a következő szervezetek ajánlásai alapján születtek: az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization-WHO) 1999-as ajánlása, az American Heart Association 2001-es állásfoglalása (National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III A –NCEP-ATP III), valamint a Nemzetközi Diabétesz Társaság (International Diabetes Federation) 2005-ös definíciója, illetve 2009-ben született egy harmonizált definíció is (11), mely az utóbbi kettőt egyesíti. Ezek alapján az a személy szenved metabolikus szindrómában, akire az alábbiak közül legalább 3 igaz: 1. centrális típusú elhízás, mely megnövekedett derékkörfoggal jellemezhető (102 cm fölött európai férfiak és 88 cm fölött európai nők esetén), 2. megemelkedett triglicerid-szint (150 mg/dl fölött), 3. csökkent HDL-koleszterol szint (40 mg/dl alatt férfiak és 50 mg/dl alatt nők esetén), 4. magas vérnyomás (130 Hgmm fölötti szisztolés és 85 Hgmm fölötti diasztolés nyomás), és 5. magas éhomi vércukorszint (100 mg/dl fölött). Bizonyos gyógyszeres kezelések ill. cukorbetegségben szenvedő egyének esetén a 2-4., illetve 5. kritériumot kell csak teljesíteni a diagnózishoz.

Ezek közül a kritériumok közül a legfontosabb az elhízás, melyet a testtömegindex (body mass index: BMI) alapján is meghatározhatunk. A testtömegindex egy nemzetközileg elfogadott arányszám a tápláltsági szint megállapítására, kiszámításának

képlete:  $BMI = \text{testsúly (kg)} / \text{magasság}^2 \text{ (m}^2\text{)}$ . Hivatalosan  $25 \text{ kg/m}^2$  BMI felett túlsúlyról,  $30 \text{ kg/m}^2$  BMI felett pedig elhízásról beszélünk. Habár a BMI által leírt túlsúly és elhízás általánosságban jól korrelál a metabolikus szindrómával és annak szövődményeivel, mégis a derékkörfogatot érdemes a fontosabbnak tekinteni. Ennek egyik oka, hogy a BMI nem jól alkalmazható olyan sportolók esetén, akik jelentős mennyiségű izommal rendelkeznek, hiszen náluk a megemelkedett BMI nem az elhízásra utal. Szintén nem jól alkalmazható olyan személyek esetében sem, akiknél a közelmúltban valamilyen okból súlyos izomvesztés következett be. Ezeket az extrém eseteket leszámítva is korlátozottan alkalmazható, ugyanis nem utal pontosan a testzsír eloszlására; nem fejezi ki a centrális típusú elhízás, illetve a szubkután zsírfelhalmozás arányát. Ezzel ellentétben a derékkörfogat mérése egyszerű és jó mutatója a viszcerális zsír felhalmozódásának, ami károsabb a szubkután lerakódott zsíroknál, mivel elsősorban a belőle felszabaduló szabad zsírsavak felelősek a lipotoxicitásért (12). A szabad zsírsavak a portális keringésen keresztül közvetlenül a májba jutnak, ahol a felhalmozódó trigliceridek zsírmáj kialakulásához vezethetnek. A szabad zsírsavak eljutnak a hasnyálmirigybe és szívbe is, ezek diszfunkcióját okozva. Előbbiben az inzulintermelés szabályozását befolyásolják hátrányosan, ezáltal elősegítve az inzulinrezisztencia, illetve a kettes típusú diabétesz mellitusz (T2DM) kialakulását. A szívbe jutva akadályozzák a normális szívfunkciókat, ami különböző kardiovaszkuláris megbetegedésekhez vezet. A metabolikus szindróma egyike a legveszélyesebb anyagcsere-eltéréseknek, mely a T2DM és az ischaemiás szívbetegség kialakulásának kockázatával jár. A MetS fennállása a cukorbetegség kialakulásának esélyét hatszorosára, míg a kardiovaszkuláris rizikót csaknem kétszeresére növeli (13).

Ezek alapján nem meglepő tehát, hogy az elhízás, a MetS és a T2DM prevalenciája nagymértékben átfed egymással (1. ábra). Egy 2015-ös felmérés szerint, melyet 195 ország részvételével végeztek, 604 millió felnőtt és 108 millió gyerek szenved elhízásban. Az elhízás nagymértékű elterjedésével párhuzamosan az utóbbi évtizedekben többszörösére nőtt a metabolikus szindrómával diagnosztizált emberek száma is; Észak-Amerikában már minden harmadik embert érint a betegség. A MetS manapság azonban már nemcsak a fejlett, de a fejlődő országokban is egyre nagyobb problémát jelent.



1. ábra. Az elhízás (A), a metabolikus szindróma (B) és a cukorbetegség (C) elterjedése az Egyesült Államokban a 20 és 60 év közötti felnőttek között az 1999-2014 között végzett Nemzeti Egészség- és Táplálkozásügyi Felmérés alapján (National Health and Nutrition Examination Survey NHNES) (14)

Az 1. ábráról az is leolvasható, hogy bizonyos területeken a cukorbetegek száma meghaladja a népesség 8%-át is. Világszerte is riasztóak az adatok: 2015-ben körülbelül 415 millió (20 és 79 év közötti) ember szenvedett 2-es típusú diabéteszben, közel 5 millió ember halálát okozva. A cukorbetegek száma 2040-re a becslések szerint akár 640 millióra is nőhet (15).

### 1.2.1. Fruktóz fogyasztás szerepe a metabolikus zavarokban

A metabolikus szindróma kialakulásáért elsősorban a megváltozott, ún. „nyugati étrend” és a csökkent fizikai aktivitás a felelősek. Bár a korai tanulmányok elsősorban a zsírok fokozott fogyasztására fókuszáltak, már az 1960-as évektől elkezdték vizsgálni a különböző szénhidrátok hatásait az elhízással kapcsolatos betegségekre. Számos tanulmány kimutatta azóta, hogy a MetS kialakulásában döntő szerepet játszanak a különböző cukrok, elsősorban a gyümölcsben található fruktóz, a kristálycukor, azaz szacharóz (mely egy glukóz- és egy fruktózgyűrűt tartalmaz) és a magas fruktóztartalmú kukoricakeményítő (HFCS), másnéven izoglukóz, melyet elsősorban üdítőitalok édesítésére használnak (16).

Epidemiológiai tanulmányok a szacharóz, illetve HFCS fogyasztásával hozták összefüggésbe a MetS, a kardiovaszkuláris betegségek, a T2DM és a nem-alkoholos zsírmáj betegség (NAFLD) kialakulását is. Egy nagyszabású vizsgálat szerint (National Health and Nutrition Examination study-NHANES 1999-2006) a hozzáadott cukrok

mennyisége (melyeket 24 órás étkezési napló alapján mértek) szoros összefüggést mutatott a vér lipid értékeivel; a megnövekedett átlagos triglicerid (TG) szinttel és csökkent HDL-koleszterol szinttel. Ebben a tanulmányban több mint 6000 felnőttet vizsgáltak, de nem tettek különbséget a fruktóz és glukóz fogyasztás között, csupán a teljes elfogyasztott cukormennyiséget vették számításba (17). Egy másik tanulmány összefüggést mutatott ki a magas cukorbevitel és a kettes típusú diabétesz között, melyben a túlsúly, illetve az obezitás figyelembe vétele az eredményt módosította, de nem változtatta meg és nem mutatott összefüggést a mozgásszegény életmóddal sem (18).

Egy olyan felmérés is megjelent, mely a NAFLD-ben szenvedő emberek étkezési szokásait, vérszérum- és májszövetmintáit vizsgálta az egyező nemű, korú és BMI-vel rendelkező kontroll csoporthoz képest. Kiderült, hogy a NAFLD betegek magasabb máj fruktokináz és zsírsav-szintáz expresszióval rendelkeztek, és 2-3-szor annyi fruktózt fogyasztottak (HCSF formájában) (19).

A különböző étkezési naplókat vizsgáló tanulmányok alapján szintén elmondható, hogy elsősorban a cukortartalmú üdítőitalok fogyasztása felelős az obezitás, magas vérnyomás és kettes típusú cukorbetegség kialakulásáért (20). A magas cukortartalmú üdítők hatásait elemezte egy olyan tanulmány, mely a vizcerális/zsigeri zsírszövet változásait követte nyomon a résztvevők 4 csoportjában (cukortartalmú üdítőitalokat nem fogyasztók; kevesebb, mint heti egyszer fogyasztók; kevesebb, mint napi egyszer fogyasztók; minden nap fogyasztók) (21). A tanulmány 6 évig tartott, és a végkövetkeztetés szerint a fruktóz, mint a cukortartalmú üdítőitalok fő összetevője inzulinrezisztenciát és a vizcerális zsírszövet növekedését okozta a nagy mennyiségben fogyasztók esetében. Azonban ebben az esetben is vitatott, hogy az üdítőitalok fruktóz vagy glukóz összetevője, esetleg mindkettő együttesen felelős a káros anyagcsere-elváltozásokért. Szintén kérdéses a patofiziológiai mechanizmus, mely a kettes típusú cukorbetegség és szívbetegségek kialakulásához vezet. Ezért a glukóz, illetve a fruktóz külön-külön vizsgálata logikus lenne, ez azonban a gyakorlatban nehezen kivitelezhető. Ennek oka, hogy az emberi táplálkozásban mindkét cukorfajtát jelentős mennyiségben - ráadásul általában együttesen (lsd. szacharóz) - fogyasztjuk.

Egy korábbi klinikai tanulmány a glukóz- és a fruktóz-édesítésű italok fogyasztásának relatív hatásait vizsgálta elhízott és túlsúlyos személyek esetében, ahol ezek az italok a

teljes energiaszükséglet 25%-át fedezték 10 teljes héten keresztül (22). Annak ellenére, hogy a különböző édesítésű italok fogyasztása hasonló mértékű súlynövekedést eredményezett, arra is fény derült, hogy a glukózzal édesített italokkal szemben a fruktózzal édesített italok fogyasztása során fokozódott a *de novo* lipogenezis, különös tekintettel a viszcerális zsírszövet növekedésére, stimulálva a diszlipidémiát, megváltoztatva a lipoproteinek átrendeződését és csökkentve az inzulin érzékenységet. Még nem tisztázott, hogy ez a hatás akkor is érvényesül-e, ha tisztán fruktóz-édesített italok fogyasztására kerülne sor, vagy ha izokalorikus fruktózt és / vagy glukózt kombinálnak különböző zsírtartalmú étrendekkel.

Annak ellenére, hogy a fruktózfogyasztás és az elhízás összefüggenek, egyértelmű kapcsolat mégsem volt kimutatható a fruktózbevitel és a kardiometabolikus betegségek között, amennyiben azok nem jártak túlzott tápanyagbevitellel és súlygyarapodással (23-26). Egy másik koncepció szerint a fruktóz azáltal járul hozzá az elhízáshoz, hogy az inzulintól függetlenül stimulálja a SREBP-1c-t (sterol regulatory element-binding protein 1c), amely egy fontos transzkripciós faktor, és a májba bejutva aktiválja a *de novo* lipogenezisben részt vevő géneket (27), zsírsavakat generálva a trigliceridek termeléséhez a májban. Túlzott fruktóz-bevitel esetén megfigyelhető volt, hogy egészséges egyéneknél (28), valamint a T2DM-es betegekben (29) is megemelkedett az éhomi plazma trigliceridszint. Ezenkívül a máj lipid szintje is megnövekedett, ami VLDL szintézisével és szekréciójával járt együtt. A szisztémás szabad zsírsav és VLDL emelkedett szintje fokozta a perifériás szervek lipidfelvételét, például a zsírszövetben és a vázizomban, hozzájárulva a szisztémás inzulinrezisztenciához (30).

Ezen kívül a fruktóz szerepet játszhat a leptinrezisztencia kialakulásában is, így fokozva az elhízás és az inzulinrezisztencia súlyosságát (31). Az inzulinrezisztencia az elhízás másodlagos oka is lehet magas kalória- és fruktóztartalmú étrend fogyasztásakor (32, 33), ezért további kutatásokra van szükség a fruktóz- és a szacharózbevitel hatásainak tanulmányozására izokalorikus étrend mellett meghatározott alcsoportokban, mint pl. elhízott, 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő és kardiovaszkuláris betegségben szenvedő populációkban is.

Állatkísérletek során is vizsgálták a túlzott fruktózbevitel elhízásra gyakorolt hatását. Olyan étrendek esetén, melyekben patkányok a napi kalóriabevitel 60%-át (34), rhesus



majmok pedig a 30%-át (35) fruktózból nyerték, a zsírszövet megnövekedett és más metabolikus szindrómára (MetS) utaló tünet is megjelent. A fruktózzal táplált majmoknál az adipozitás mellett diszlipidémiát, inzulinrezisztenciát és megnövekedett gyulladási mediátorok jelenlétét is kimutatták. Noha a meglévő bizonyítékok meggyőzően mutatják, hogy a MetS markerei (beleértve a megnövekedett TG szintet, a diszlipidémiát, az inzulinrezisztenciát és a gyulladási mediátorokat) fokozódnak a magas fruktóztartalmú diéta esetén (23-26), a fruktóznak a MetS markereire gyakorolt hatása nem volt konzisztens súlymegtartó diéta esetén (25). Ez azt sugallja, hogy a megnövekedett fruktóz-fogyasztás csupán a túlzott tápanyagbevitellel és elhízással együttesen felelős a káros egészségügyi hatások megjelenéséért.

### **1.3. Az endoplazmás retikulum szerepe a szénhidrát-anyagcserében**

Az endoplazmás retikulumot (ER) a magmembránnal is összefüggő folytonos membrán határolja és a citoplazmától jelentősen eltérő proteommal, metabolommal és redox környezettel rendelkező önálló sejtszervecske. A legfrissebb kutatások az ER tápanyagérzékelésben betöltött szerepét hangsúlyozzák, mely az ER redox állapotán alapszik (36), és a szélsőséges táplálkozási körülményekre adott sejtválaszt segíti.

Az ER elsődleges feladata a fehérjék és zsírok szintézise, emellett a szénhidrát-anyagcserében, a kalcium-homeosztázis szabályozásában, a gyógyszerek metabolizmusában és a xenobiotikumok detoxifikációjában is fontos szerepet játszik. Számos enzimnek van intraluminális aktív centruma, melyek gyakran a citoszólból kapják a szubsztrátjukat, illetve a végtermékek is ide kerülnek.

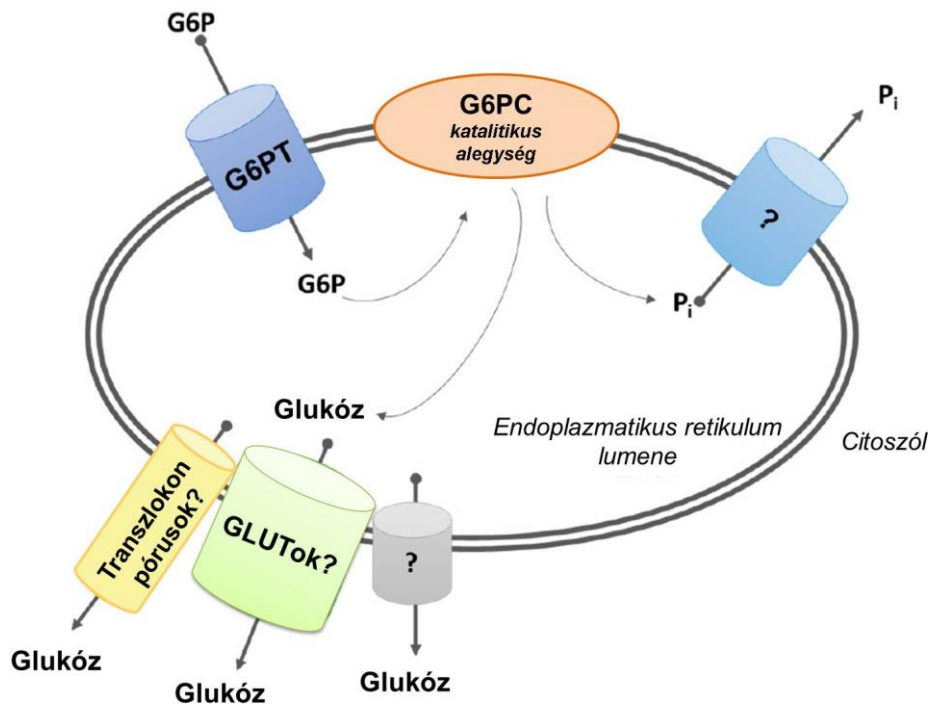
Az ER lumenében a reakciók a citoszólól elszeparált térben játszódhatnak le, ezáltal lehetővé téve azok szabályozását. Az ER lumene a citoplazmához képest lényegesen (mintegy 30-100-szor) oxidáltabb állapotban van. A glutation redukált és oxidált (glutation-diszulfid) formájának aránya (GSH/GSSG arány) a citoplazmában 30-100:1, míg az ER lumenében mindössze 1-3:1 (37); ráadásul az ER saját piridin-nukleotid poolal rendelkezik (38). Az egyik legérdekesebb folyamat, a glukóz-, illetve fruktóz-fogyasztás hatására bekövetkező anyagcsereváltozások egyik velejárója az intracelluláris glukóz-6-foszfát (G6P) szint emelkedése, mely az ER-be jutva többféle hatást is kifejt.

Az ER luminális G6P készletét ugyanis két enzim is hasznosíthatja, a glukóz-6-foszfátáz (G6Páz) és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz (H6PDH). Előbbi a fő glukoneogenikus szervekben (máj, vese, vékonybél), míg utóbbi főként a májban, izomban és a zsírszövetben expresszálódik. Magas G6P szint esetén a H6PDH hatására NADPH termelődik, mely a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1 (11 $\beta$ -HSD1) kofaktoraként serkenti a lokális kortizolszintézist. A kortizol hatására csökken a G6P H6PDH általi felhasználása, biztosítva a G6Páz enzimnek a könnyebb hozzáférését a G6P szubsztráthoz. Alacsony luminális G6P-koncentrációnál, mint például éhezés során, ez az akut kortizol-indukálta redoxállapotbeli változás elősegíti a glukóztermelést (39).

### 1.3.1. A glukóz-6-foszfátáz rendszer

A glukóz-6-foszfátáz enzim felelős a glukogenezis és glukoneogenezis közös utolsó lépésének, a glukóz-6-foszfát glukózzá és inorganikus foszfáttá történő hidrolízisének katalizálásáért. Az enzim aktív centruma a lumen felé néz, így működéséhez szükséges a szubsztrát (G6P) és a termékek (glukóz, foszfát) ER membránon keresztüli transzportja. Ez alapján a G6Páz rendszer a következőkből áll: a G6Páz enzimből, és három transzlokázból, melyeket T1, T2 és T3-nak neveztek el. Ebben a modellben T1 felelős a G6P ER-be befelé, a T2 és T3 pedig a P<sub>i</sub> és a glukóz ER-ből kifelé történő transzportjáért (40). Azóta tudjuk, hogy a G6P bejutásáért a specifikus glukóz-6-foszfát transzporter (G6PT) a felelős, a termékek kifelé történő transzportjára azonban több elmélet is létezik (2. ábra).

A glukóz-6-foszfátáz enzim nem specifikus a glukóz-6-foszfátra; többféle hexóz-foszfátot is képes hidrolizálni, pl. mannóz-6-foszfátot (M6P) (41). A rendszer nagyfokú specificitását a tehát a G6P szubsztrátot adó G6PT biztosítja, mely az ER membránjában helyezkedik el.



2. ábra. A G6Páz rendszer elemei. (Lizák B. és munkatársai alapján módosítva) (42)

A G6PC egy transzmembrán enzim, melynek katalitikus alegysége az ER lumene felé néz. Ez az enzim hidrolizálja a G6P-ot glukózzra és inorganikus foszfátra ( $P_i$ ). Ezek szállításához az ER-be illetve az ER-ből speciális transzporterekre van szükség. A  $P_i$  transzportjéért felelős fehérjét még nem azonosították. A glukóz ER-ből történő kijutására 3 elmélet van: transzlokon póruson keresztül, GLUT glukóz transzporterén keresztül a szekréciós útvonalon, illetve egy még nem azonosított glukóz transzporterén keresztül. G6Páz = glukóz-6-foszfátáz; G6PC = glukóz-6-foszfátáz katalitikus alegység; ER = endoplazmás retikulum;  $P_i$  = inorganikus foszfát; G6PT = glukóz-6-foszfát transzporter.

Létezik egy, a rendszert érintő humán genetikai betegség, melynek vizsgálata lehetővé tette a felépítő elemek azonosítását és pontos fiziológiás szerepük feltérképezését. Ez a betegség a glikogéntárolási betegség I típusa (glycogen storage disease type 1-GSDI), melyet elsőként Edgar von Gierke írt le 1929-ben, két gyermekben mutatva ki a májban és vesében felhalmozódó glikogént. Elsőként Cori és Cori feltételezték 1952-ben, hogy a betegség hátterében a glukóz-6-foszfátáz (G6Páz) enzim hiánya áll (43). Az enzim első mutációját azonban még jóval később, 1993-ben azonosították (44), majd megtörtént a teljes gén feltérképezése a 17q21 kromoszómán.

A máj és a vese G6Páz hiánya maga után vonja a glikogén felhalmozódását ezekben a szervekben, mely a vesében főként a proximális tubulust érinti. Ez ún. Fanconi szindróma tüneteire vezet, amely azt jelenti, hogy bizonyos kis molekulák visszaszívódása nem megfelelő (pl. glukóz, aminosavak, húgysav, foszfát, bikarbonát, stb.), ennek következtében a betegekre jellemző a vesekövesség, magas vérnyomás, a

glomeruláris filtrációs ráta romlása, proteinuria (45). Emellett a glikogéntárolási betegségben gyakori a májmegnagyobbodás és a nem-alkoholos zsírmáj kialakulása. Megfelelő kezelés hiányában a krónikusan alacsony vércukorszint tejsavas acidózishoz, és abnormálisan magas vérzsírszinthez vezet. Az elsődleges kezelés egy speciális diéta, mely elsősorban kukoricakeményítő és egyéb szénhidrátok fogyasztását foglalja magába.

Ahogy egyre több GSDI-ben szenvedő beteget azonosítottak, két alcsoportot lehetett megkülönböztetni. A fagyasztott májmintákból enzimaktivitás mérésekkel bizonyították, hogy az egyik alcsoportban nem volt mérhető G6Páz aktivitás, míg a másik csoportban a G6Páz aktivitás megmaradt. Ennek a biokémiai heterogenitásnak a figyelembe vételével Senior és Loridan (46) a betegeket két csoportba sorolta: a GSDIa-ba sorolta be azokat, akik nem rendelkeznek G6Páz aktivitással, és a GSDIb-be azokat, akik megtartották a G6Páz-aktivitást.

A GSDIa kimutatása a G6Páz katalitikus alegységének hiányzó aktivitása által egyszerű volt, de a GSDIb defektusának azonosítása már nem volt ilyen egyértelmű. 1972 és 1980 között Arion és mtsai egy sor G6Páz aktivitásmérést végeztek intakt és roncsolt máj mikroszómán (47). Ezekből a tanulmányokból arra következtettek, hogy a G6P hidrolízise *in vivo* több membránfehérje integrációját foglalja magában, beleértve a G6Páz katalitikus alegységét és a hozzá kapcsolódó transzportereket. Ezt a többkomponensű enzimkomplext „G6Páz rendszer” -nek nevezték el. Nilsson és munkatársai 1978-ban bebizonyították, hogy az ép mikroszómákban a G6Páz aktivitása ellenáll a limitált proteolízisnek (48). Ez arra utalt, hogy az enzim aktív helye az ER lumenében helyezkedik el, és a reakció egy transzmembrán szubsztrát transzportertől függ. További vizsgálatok során kiderült (49, 50), hogy a GSDIb betegekből származó mikroszómák csak akkor mutatnak normális G6Páz-aktivitást, ha a mikroszómákat detergenssekkel megbontják. Ebből arra következtettek, hogy a GSDIb-t egy feltételezett G6PT hiánya okozza. Azóta molekuláris genetikai vizsgálatok során ezt megerősítették, és felfedezték a G6PT gén inaktiváló mutációit, melyek a GSDIb-t okozzák (51). Mikroszatellita markerek segítségével megtörtént a GSDIb génjének feltérképezése a 11. kromoszóma hosszú karján.

A GSDIb a súlyosabb altípus, ugyanis magában hordozza a GSDI minden klinikai tünetét, ideértve az éhgyomri hipoglikémiát, hepatomegáliát, növekedési

retardációt, tejsavas acidózist, hiperlipidémiát és hiperurikémiát, amelyek közvetlenül tükrözik a G6P anyagcseréjének hibáit. Emellett a GSDIb fő jellemzője a krónikus neutropénia, melyet a csontvelő neutrofil termelésének diszfunkciója okoz. Ez az immundeficiencia ha kezeletlenül marad, fogékonyabbá tesz a fertőzésekre. Az elsődleges kezelése a Filgrastim injekció, mely a természetesen is megtalálható granulocita kolónia stimuláló faktor (granulocyte colony-stimulating factor GCSF) egy rekombináns DNS-ét tartalmazza, ezzel stimulálva a szervezet neutrofil-termelését. Emellett a betegek kiegészítő kezeléseket is igényelnek a folyamatos fertőzésekre és a krónikus lépmegnagyobbodásra. Gyakori tünet még a gyulladósos bélbetegség is (52).

A GSDI a glikogéntárolási betegségek leggyakoribb formája, körülbelül 1:50-100 ezer embert érint. Ebből 80% GSDIa-ba, 20% a GSDIb-be sorolható.

Tradicionálisan még két típusú glikogéntárolási betegséget feltételeztek, nevezetesen a GSDIc és GSDId altípusokat, melyeket az inorganikus foszfát, illetve a glukóz ER-ből való transzport defektusának tulajdonítottak. Azonban mostanáig minden nem-GSDIa fenotípusról kiderült, hogy tulajdonképpen a G6PT valamely mutációját hordozzák, így genotípusosan és patológiásan is a GSDIb-be sorolandók (53).

A G6Páz enzimnek 3 izoformája ismert; G6PC1 (G6Páz- $\alpha$ ), G6PC2 (IGRP) és G6PC3 (G6Páz- $\beta$ , vagy UGRP). A G6Páz- $\beta$  (G6PC3) hiánya esetén 4. típusú súlyos veleszületett neutropénia szindróma (SCN4) alakul ki, amely nem egy igazi glikogéntárolási betegség, de glikogéntárolási betegség 1-gyel rokon szindrómának (GSDIrs – GSDI related syndrome) tekinthető. A G6PC3 hiánya esetén a GSDIb-re jellemző neutropénia és a neutrofil funkciók hibák jelentkeznek (54).

A GSDIa és GSDIb betegek tehát közös metabolikus fenotípussal jellemezhetők, beleértve a károsodott vércukorszint homeosztázist, ami azonban a GSDIrs-re nem jellemző. A GSDIb és GSDIrs betegeknél pedig közös tünetek a neutropénia és neutrofil/makrofág diszfunkció, mely a GSDIa-ra nem jellemző. Míg a G6Páz- $\alpha$ /G6PT komplex aktivitásában bekövetkező zavarok jó magyarázatot adnak a GSDIa és GSDIb betegek károsodott glukóz homeosztázisára, a GSDIb és GSDIrs esetén bekövetkező neutropénia és mieloid diszfunkció háttere még nem teljesen tisztázott. Mindhárom betegségre léteznek már állatmodellek, melyek lehetővé teszik a betegség pontosabb felderítését és új kezelési módszerek kidolgozását, ideértve a génterápiát is (55).

### 1.3.1.1. A glukóz-6-foszfátáz

Amint az előző fejezet végén említettük, emberekben ezidáig három G6Páz izoformát azonosítottak; ezek különböző gének által vannak kódolva, és egyedi szerepekkel, szöveti eloszlással és kinetikai tulajdonságokkal bírnak (1. táblázat). Az elsőként felfedezett G6Páz- $\alpha$  a G6PC1 által kódolt fehérje, a második az ún. pankreász sziget-specifikus G6PC rokon fehérje (IGRP), melyet a G6PC2 gén kódol, a harmadik pedig a G6Páz- $\beta$  (G6PC3 gén kódolja). Habár a három izoforma csupán mérsékelt homológiát mutat, membrán topológiájuk és katalitikus centrumuk nagyon hasonló. Általánosan elfogadott nézet, hogy jelentős mértékben a leginkább májban és vesében kifejeződő G6Páz- $\alpha$  felelős a vércukorszint fenntartásáért (54).

A klasszikus G6Páz, más néven G6PC1 a májban, a vesében és a vékonybélben fejeződik ki (54, 56). A máj G6Páza szabályozza a teljes glukóz homeosztázist, folyamatosan fenntartva a megfelelő vércukorszintet éhezés esetén is. A vese G6Páza akár 25%-ban is hozzájárulhat a teljes glukóz-turnoverhez éhezés, illetve diabétesz esetén, továbbá olyan esetekben, melyeknél a vese az elsődleges glukoneogenetikus szerv (pl. májtranszplantáció közben). Citogenetikailag a 17-es kromoszóma q karjának 21-es pozíciójában helyezkedik el, és az 5 exonból álló G6PC1 kódolja. Ez egy 35 kDa fehérje, mely erősen hidrofób tulajdonságú és az ER membránjába mélyen beágyazódva található. 9 transzmembrán doménnel rendelkezik, és az N-terminálisa az ER lumene felé, C-terminálisa a citoszól felé néz (57). Jól ismert, hogy a G6PC1 hatékonyan hidrolizálja a glikogénolízisből vagy a glukoneogén prekursorokból származó G6P-t. Ennek a fehérjének a kiesése felelős a GSDIa altípusának kialakulásáért.

A G6PC2 elsősorban a hasnyálmirigy béta-sejtjeiben expresszálódik, ezért eredetileg „pankreász sziget-specifikus G6PC rokon fehérjének” nevezték el (IGRP Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein) (54). Ez egy 40,7 kDa-os fehérje, amelyet a G6PC egyszeres kópiaszámú génje kódol. Ez egy öt exonból álló, a kromozóm a 2q31 lókuszon található gén. A G6PC2 szerepe a génkiütött egértörzsekkel végzett vizsgálatok alapján vált egyértelművé (58). Ezek az állatok viszonylag normális fenotípussal rendelkeznek, az éhomi vércukorszintjük és a triacilglicerol szintjük némileg alacsonyabb a vad típusénál. A G6PC2 patofiziológiai szerepe kevésbé ismert. A különböző kísérleti eredmények és az egész genomra kiterjedő asszociációs vizsgálatok

alapján úgy tűnik, hogy a G6PC2 ún. „negatív glukóz-szenzor”-ként működik a hasnyálmirigy-szigetekben (54).

A G6PC3 minden szövetben kifejeződik (54). Az emberi G6PC3 gén hat exonból áll, és a kromoszómán a 17q21 helyen található. Az általa kódolt fehérje 38,7 kDa. Az eredetileg “UGRP ubiquitous glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein”-ként elnevezett fehérje felfedezése és leírása Martin és mtsai által (59) újabb lendületet adott a glukoneogenezis kutatásának a különböző szövetekben. A leírásuk alapján ez az enzim a G6Páz- $\alpha$ -val ellentétben nem rendelkezik foszfohidroláz aktivitással. Ezt nem sokkal utána egy másik cikk cáfolta, melyben a G6Páz- $\beta$  elnevezést kapta, megkülönböztetve a máj/vese/vékonybélben kifejeződő G6Páz- $\alpha$ -tól. Egyben kísérletesen bizonyították, hogy a G6Páz- $\beta$  a G6PT-vel funkcionális komplexet képez, és feltételezték, hogy ez az enzim is hozzájárulhat a vércukorszint homeosztázis fenntartásához, ami megmagyarázná a glikogéntárolási betegség Ia típusban szenvedőknél megfigyelhető minimális szintű endogén glukóztermelést. A szerzők rákövetkező évben megjelent cikke azt állította, hogy az izomnak is szerepe van a vércukorszint homeosztázis fenntartásában, szintén a G6PT-G6Páz- $\beta$  jelenlétére hivatkozva, aktivitásmérésekkel támasztva alá állításukat. Azóta tudjuk, hogy ez nem így van; a G6PC3-nak elsősorban a makrofágok és neutrofil sejtek homeosztázisának fenntartásában van szerepe. A pontos mechanizmus azonban még nem ismert. Feltételezhetően a 4. típusú súlyos veleszületett neutropénia szindróma (SCN4) hátterében a G6PC3 / G6PT komplex diszfunkciója állhat. A G6PC3-nak (hasonlóan a G6PC1-hez) G6P-ellátásra van szüksége az ER-lumenben; tehát, ha a komplex nem működik megfelelően, akkor a hidrolízis sem működhet. A neutrofilek túléléséhez glukózra van szükség, ennek hiányában hajlamosabbak az apoptózisra (60). Így a zavart glukóz homeosztázis neutropéniához és neutrofil diszfunkcióhoz vezet. Ez a jelenség a monociták illetve a makrofágok esetén is megfigyelhető. Lehetséges, hogy a Hipoxia Indukálta Faktor-a (HIF-1a) is szerepet játszik a folyamatban (61). Az ER-ben a glukóztermelés kiesése rendellenes glikozilációhoz vezethet, ami a neutrofil funkció romlását okozza. Egy nemrégiben megjelent tanulmány szerint (62) a G6PC3 elsődleges szubsztrátja az 1,5-anhidroglucitol-6-foszfát (1,5-AG6P), amely a G6P szerkezeti analógja. Mint ilyen, az alacsony  $K_m$ -mel rendelkező hexokinázokat gátolja, melyek a glikolízis első lépését katalizálják. Az 1,5-AG6P alacsony koncentrációban természetesen

is megtalálható a vérplazmában, azonban ha túl magas a koncentrációja (kb. 3 mM) pl. SCN4 betegekben, ez a glukóz-hasznosítás csökkenéséhez, végső soron pedig sejthalálhoz vezet. Ezeket a folyamatokat G6PC3 KO egerekben, illetve humán leukocitákban is kimutatták. Ezek az eredmények logikus magyarázatot adnak a G6PC3 és G6PT mutációval rendelkező betegek leukocitáinak patológiájára és támogatják azt a hipotézist, miszerint a G6PC3 toxikus metabolitokat eltávolító enzimmé viselkedik a G6P-től eltérő szubsztrátok esetében (54).

1. táblázat. A glukóz-6-foszfát izoformáinak tulajdonságai (54).

G6PC = glukóz-6-foszfát katalitikus alegység; G6Páz = glukóz-6-foszfátáz; ER = endoplazmás retikulum

Izoformák	G6PC	G6PC2	G6PC3
Szinonimák	G6PC1, G6Páz- $\alpha$	pankreász sziget-specifikus G6Páz rokon fehérje - (IGRP)	G6Páz- $\beta$ , mindenütt kifejeződő G6PC rokon fehérje (UGRP)
A humán gén lokalizációja a kromoszómán	17q21 (63)	2q31 (64)	17q21 (65)
Molekulatömeg	35 kDa (66)	40,7 kDa (67)	38,7 kDa (67)
Aminosav szekvencia homológia a G6PC százalékában	100	50 (67)	36 (67)
Membrán topológia	9 ER transzmembrán domén (57, 66) Intraluminális, feltehetően a katalízisben szerepet játszó funkciók csoportok: Arg83, His119 és His176 (67).	9 ER transzmembrán domén (68) Katalízisben szerepet játszó funkciók csoportok (59)	9 ER transzmembrán domén (69, 70) Katalízisben szerepet játszó funkciók csoportok (69, 70)



Szervi eloszlása	máj, vese, hasnyálmirigy $\beta$ sejtek, bélhámsejtek (56).	hasnyálmirigy $\beta$ -sejtek (64, 67)	mindenhol kifejeződik (65, 69)
Glukóz-6-foszfátáz aktivitás	Jól ismert. A rekombináns fehérjének nincs aktivitása (56).	A rekombináns fehérjének nincs aktivitása (59) A rekombináns fehérjének van aktivitása (67, 71); Km és a Vmax alacsonyabb, mint a G6PC (71)	Nincs aktivitása a rekombináns fehérjének (65). Az aktivitás jelen van (69, 72) ; Km magasabb, de Vmax alacsonyabb, mint a G6PC (69). A vázisomban a G6PC3 aktivitása 40-szer alacsonyabb, mint a máj G6PC-é (72).
Patofiziológiás vonatkozásai	Öröklött enzimhiány: glikogéntárolási betegség 1a (GSD1a) (73, 74) overexpresszió 2-es típusú diabéteszben (67, 75, 76)	Autoantigén 1-es típusú diabéteszben? (77-83) Az éhomi vércukorszint szabályozása (84-91)	4. típusú súlyos veleszületett neutropénia szindróma (SCN4) és fejlődési zavarok (92- 98)

### 1.3.1.2. A rendszerhez kapcsolódó transzporterek

#### 1.3.1.2.1. G6PT

A glukóz-6-foszfát transzportert elsőként Gerin és mtsai azonosították (99), és azóta a glukóz-6-foszfát transzportja a máj mikroszómákban jól feltérképezett.

A fehérjét a G6PT (SLC37A4) gén kódolja, mely egy egyszeres kópiaszámú gén a kromoszóma 11q23 lókusán.

Northern blot analízis szerint legalább 2 különböző G6PT mRNS létezik, melyek alternatív splicing révén jöttek létre. A máj mRNS-e 8 exonból áll, míg az agyi mRNS

mind a 9 exont tartalmazza. Az utóbbi verziót találták a szívben és a vázizomszövetben is, és vGPT-nek nevezték el (100). A G6PT mRNS-e nagyobb mennyiségben a májból a veséből mutatható ki, de kisebb mennyiségben szinte minden szövetben megtalálható, pl. vastagbél, vékonybél, gyomor, herék és neutrofil sejtek.

A G6PT fehérjét a máj mellett kimutatták vese mikroszómákban is, de az emberi fibrocitákból, patkány lépéből és tüdőből, valamint különféle sejtvonalakból származó mikroszómákban nem volt detektálható (101). A humán G6PT feltételezett molekulatömege 46 kDa, míg a humán vG6PT további 22 aminosavat tartalmaz, melyeket a 7. exon kódol. A FLAG-jelölt fehérjét COS-1 sejtekben overexpresszáva 37 kDa molekulatömegnél detektálták a G6PT-t. Az antitesteket a hidrofíli peptid szekvenciára tervezve, az SDS-PAGE során a humán máj G6PT fehérjét 33 kDa-nál detektálták. Számos bizonyíték szól amellett, hogy a valós molekulatömeg 46 kDa, és az SDS-PAGE során tapasztalt gyorsabb migráció a magas hidrofóbicitásnak tulajdonítható.

Az egyik modell szerint a G6PT hasonlít a bakteriális H6P transzporterhez, az UhpT-hez, és a homológia modellezés alapján 12 helikázt tartalmaz, és az UhpT-nál esszenciálisan fontos aminosavak a G6PT esetében is fontos szerepet játszanak. Mutagenézis vizsgálatok alapján azonban az UhpT aktivitáshoz szükséges 4 csoport közül csak 1 létfontosságú a G6PT-nél. Egy másik modell alapján a G6PT 10 transzmembrán domént tartalmaz és az N és C terminális vége is a citoplazma felé néz. A transzport aktivitásért felelős aminosavhelyek a R28, K240, H366, és V369 (102). A glikozilációs és a proteázérzékenységi vizsgálatok azt mutatták, hogy a G6PT 10-doménes modellje valószínűbb, mint a 12-doménes UhpT-szerű modell (103).

A G6P transzport egyik elmélete szerint a máj mikroszómáiban egy kétirányú, facilitált diffúzió zajlik, mely nagy kapacitással és alacsony affinitással jellemezhető. A megfigyelt nagy kapacitás a transzportereknek az ER membrán adott területegységére eső viszonylag nagy számának tudható be (104). Ezek a transzport paraméterek egységben állnak a G6Páz kinetikai tulajdonságaival, mely lehetővé teszi az elegendően gyors glukóztermelést a vércukorszint fenntartásához. A G6P felvételének és hidrolízisének egyensúlya meghatározza a metabolikusan aktív mikroszómális G6P mennyiségét. A mikroszómális G6P transzportot számos vegyület gátolja, pl. DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid), tiol reagensek, merkaptó-pikolinsav,

különbéféle proteáz inhibitorok, zsírsavak, acil-KoA, hidroxinitrobenzaldehyd, a klorogénsav és származékai. Az S3483 klorogénszármazék különösen hatékony ( $K_i = 1 \mu\text{M}$ ) és nagy szelektivitású, ennek használata nagyban hozzájárult a rendszer működésének feltárásához (105).

Egyik nézet szerint a G6PT szerepet játszik a foszfát transzportban, mint foszfát/G6P antiporter (66, 106); ezt az aktivitását rekonstituált transzporter fehérjét tartalmazó liposzómákban írták le. Marcolongo és mtsai azonban közvetlenül vizsgálták a G6P transzport mechanizmusát patkánymáj mikroszomális vezikulákban. A kísérletek során a mikroszómák előzetes feltöltése szervesen foszfáttal ( $P_i$ ) nem stimulálta a G6P vagy a  $P_i$  bejutását a vezikulákba. A  $P_i$  kiáramlását szintén nem lehetett G6P vagy  $P_i$  addíciójával meggyorsítani. A G6PT inhibitor S3483 a kísérleti körülményektől függetlenül blokkolta a G6P transzportját. Ebből megállapítható volt, hogy a májban található G6PT uniporterként működik (107).

Tehát a G6P transzport a májban kétirányú és független a  $P_i$  grádiénstól. Ennek további bizonyítéka, hogy ha a  $P_i$ -t az ER lumenében  $Pb^{2+}$  illetve  $Ca^{2+}$  ionokkal komplexben tartották, ez sem változtatott a G6P hidrolízisének illetve transzportjának a sebességén.

#### 1.3.1.2.2. Foszfát transzporter

Hagyományosan a  $P_i$  transzport defektusát tartották a GSD1c okának. Azonban később kiderült, hogy a GSD1c háttérében is a G6PT mutációja áll. Ebből arra következtettek, hogy a G6PT felelős a G6P és a  $P_i$  transzportjáért is. Ezt tovább erősítette az a feltevés, hogy az SLC37A családba tartozó többi transzporter, cukor-foszfát/ $P_i$  antiporterek, pl. az SLC37A1 és az SLC37A2  $P_i$ -kapcsolt G6P transzporterek, és mind a homológ ( $P_i/P_i$ ), mind a heterológ (G6P/ $P_i$ ) cserét elősegítik, míg az SLC37A3 transzport tulajdonságai egyelőre ismeretlenek (66).

Proteoliposzómákban vizsgálva a G6PT enzimaktivitását azt tapasztalták, hogy ha a proteoliposzóma fel volt töltve  $P_i$ -tal, a G6P és a  $P_i$  felvétele is megtörtént. A G6P-felvétel csökkent a külső/belső  $P_i$  arány csökkenésével, és a  $P_i$ -felvétel csökkent a külső G6P adásával. Ha a G6PT mutáns verzióját alkalmazták, sem a G6P, sem a  $P_i$  felvétele nem volt detektálható. A G6PT specifikus inhibitorainak (klorogénsav, vanadát) használatával

ugyanazt az eredményt kapták. A G6Páz- $\alpha$  szintén nem tudta a G6P felvételét elősegíteni a  $P_i$ -vel töltött liposzómákba (106). A kutatócsoport a különböző természetesen előforduló mutációkat hordozó G6PT-eket is megvizsgálta, és megmérte a G6P és  $P_i$  transzport-aktivitásokat. A G6PC1 nélküli, csupán G6PT-t tartalmazó proteoliposzómán mért enzimaktivitások megegyeztek a koexpressziós assay-k eredményeivel (108).

A G6P hidrolízisével kapott  $P_i$  a mikroszóma lumenében csapdába eshet a  $Pb^{2+}$  ionokkal képzett oldhatatlan komplexben. Ez szolgáltatott közvetlen bizonyítékot a G6Páz luminális aktivitására. A  $P_i$  mikroszómából történő kiáramlásának féléletideje nagyon rövid (kb 1 másodperc).

A mikroszómákon végzett kinetikai vizsgálatok alapján a  $P_i$ -nek  $PP_i$ -nek és karbamilfoszfátnak közös transzportere van, ami különbözik a G6P transzporterétől (109).

Egy másik tanulmány bizonyítékot szolgáltatott egy olyan mikroszómális  $P_i$  transzporter létezésére, amely nem szállít  $PP_i$ -t. A mikroszóma  $P_i$ -re való permeabilitása nem változik GSDIb betegek esetében, és nem befolyásolja a G6P koncentrációja sem, ami alapján a  $P_i$ -nek és G6P-nak külön transzportere van. Annak a lehetőségét is kizárták, hogy a  $P_i$  és a szulfát transzport közös fehérje segítségével történhet, mivel sem a  $P_i$  sem a különféle foszfát inhibitorok nem befolyásolták a szulfát transzportját máj mikroszómákban (110).

Az ER membránon keresztüli  $P_i$  transzportban részt vevő fehérjéket a mai napig nem azonosították. Az emlős sejtek többféle  $P_i$  transzportert tartalmaznak. A belső mitokondriális membránban egy 34 kDa-os fehérje található, amely az egybázisú foszfát és az  $OH^-$  kicserélését végzi. A plazmamembrán  $P_i$  transzporterei  $Na^+$ -függőek és legalább három különböző családba tartoznak: 1-es típusú kotranszporterek pl. NPT1 (SLC17A1), NPT3 (SLC17A2), NPT4 (SLC17A3), és NPT5 (SLC17A4); 2-es típusú kotranszporterek pl. NPT2a (SLC34A1) és NPT2b (SLC34A2) NPT2c (SLC34A3); és a 3-as típusú kotranszporterek pl. PiT1 (SLC20A1) és PiT2 (SLC20A2).

Ezek közül is egyesek részt vehetnek a  $P_i$  kijutásában az ER-ből, ilyen lehet például a Pit-1 fehérje, melyet az ER-ben lokalizáltak simaizomsejtekben (111). Az emlős vázizomrostokban található szarkoplazmatikus retikulumban (SR) több kutatás is kimutatta a  $P_i$  transzporter jelenlétét. A transzporter működése során kalciumot szállít a

SR lumenébe, ahol az a  $P_i$ -vel koprecipitál (112). Az izomsejtekben az inorganikus foszfát kétirányú transzportja az endo/szarkoplazmatikus retikulumon régóta ismert (113). A SERCA (szarko-endoplazmatikus retikulum kalcium ATPáz) hidrolitikus aktivitása által  $P_i$  jut ki az ER-ből, mialatt kalcium megy be, mely ott raktározódik (114). A foszfát ionok koncentrációja nagyban befolyásolja a gyorsan üríthető intracelluláris kalcium raktárakat a legtöbb sejtípusban. Az alacsony foszfátkoncentráció, amilyen a citoszólban van, kedvez a kalcium felvételének és raktározásának az ER-ben a májban, illetve számos egyéb szövetben.

Egy másik lehetséges ER  $P_i$  transzporter az NPT4, ami 1-es típusú kotranszporterek családjába tartozik. Kimutatták, hogy a máj és a vese ER membránjában helyezkedik el. Az egyik allél mutációját kimutatták egy GSDIc betegben, és feltételezték, hogy a G6Páz aktivitásának hiányát az elégtelen  $P_i$  transzport okozza (115).

### 1.3.1.2.3. A glukóz transzportja

A G6P hidrolízisével előállított glukóz kijutása az ER-ből alapvető fontosságú, kiváltképp a májban, a vesében és a vékonybélben; az ehhez kapcsolódó transzportfolyamatok azonban még nem teljesen tisztázottak (42).

Elméletben több lehetséges magyarázat is van a glukóz ER-ből történő kiáramlására: 1. egy kifejezetten az ER glukóz-exportjéért felelős transzporter létezése, 2. az ER membránjában található pórus-szerű struktúrák permeábilisak a kicsi, töltés nélküli molekulákra, mint pl. a glukóz, 3. vezikuláris transzport, 4. a GLUT család tagjai végzik, miközben a plazma-membrán felé vándorolnak a szekréciós pályán.

Az első hipotézis ellen szól, hogy nem ismerünk olyan mutációt, mely a glukóz ER-ből való transzportját gátolná; ez a transzporterek redundanciája mellett szól. Természetesen egy ilyen fajta mutáció letális volta is magyarázatot adhat erre. Ezen kívül a funkcionális vizsgálatok különböző transzport-rendszerek jelenlétére utalnak (116).

A máj mikroszómán végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy feltehetően két kétirányú facilitált transzportrendszer működik, melyek valószínűleg a két ER glukózpool-hoz kapcsolódnak (117). A glukóz ER membránon keresztüli átjutásának tanulmányozására genetikailag kódolt nanoszenzorokat alkalmaztak HepG2 hepatóma sejtekben, melyek a citoszól, illetve az ER lumene felé néztek (118). Ezen kísérletek közvetlen bizonyítékként

szolgálnak egy nagykapacitású, kétirányú glukóz transzportrendszer jelenlétét illetően az ER-ben.

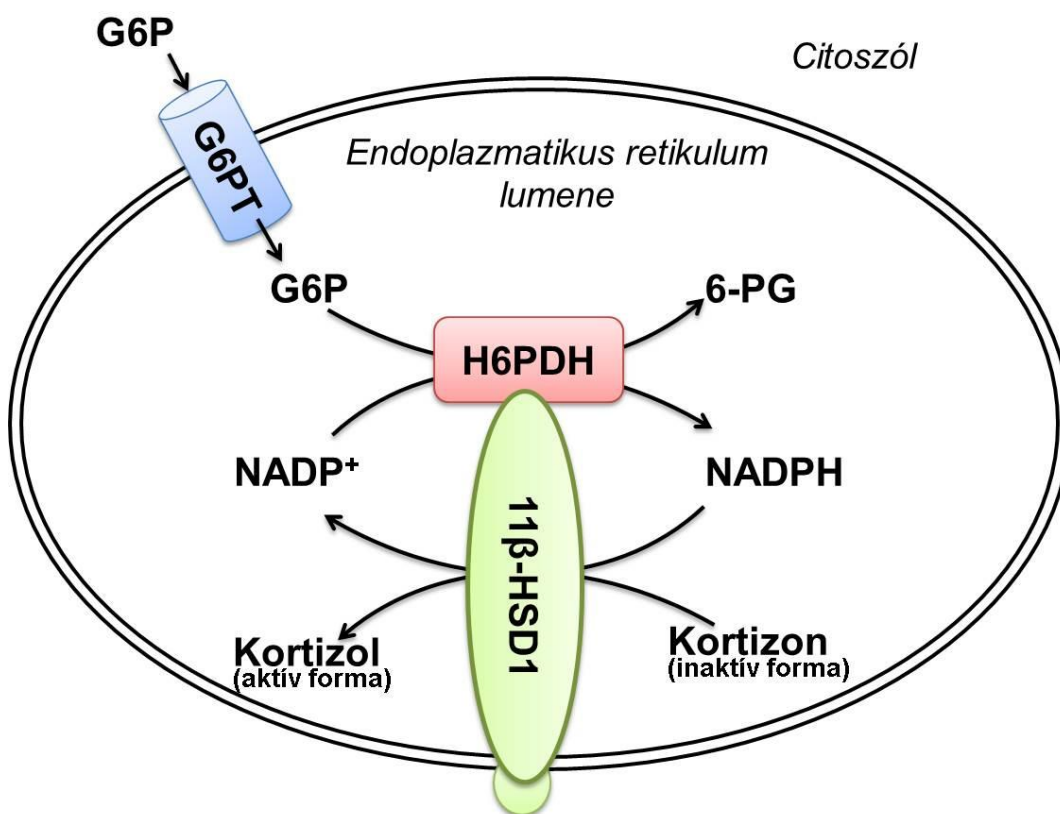
A másik lehetséges útja a glukóz kijutásának az ER-ből a transzlokon pórusokon át valósulhat meg, melyek bizonyítottan átengednek kisméretű, töltéssel rendelkező molekulákat nyitott állapot esetén (119-121). A transzlokon csatornáknak nagy valószínűséggel szerepük lehet a glukóz kijuttatásában, habár ez semmiképp sem lehet az egyetlen út. Ugyanis a transzlokonok főként a durva felszínű ER-ben (RER) fordulnak elő, míg a G6Páz rendszer elsősorban a sima felszínű ER-ben (SER) található (120). Ez leginkább a májra igaz, míg hasnyálmirigy esetén nem-specifikus póruszerű struktúrák megfigyelhetők voltak RER esetén is (119).

Egy másik feltételezés szerint a glukóz ER-ből történő kijutása történhet vezikuláris transzporttal, melynek során a glukóz az ER-ből közvetlenül a véráramba jut (122). Ez azonban nem ad magyarázatot a glukóz gyors kiáramlására a májból különböző körülmények, pl. éhezés esetén (56).

A GLUT transzporterek főként a sejtek plazmamembránjában találhatóak és a sejtek glukóztanszportjában van elsődlegesen szerepük. Ezek a fehérjék is az ER-ben íródnak át és a szekréciós úton érik el végső célhelyüket, így jelenlétük az ER membránjában sem meglepő. A Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzfer (FRET-Förster/fluorescence resonance energy transfer)- alapú nanoszenzorok használatával nyomon követhető az ER-en keresztülhaladó GLUT-ek szerepe a glukózkiráramlásban (123). A májban többféle GLUT is kifejeződik. Az ezek közötti együttműködés lehet a magyarázata a transzport funkcionális redundanciájának és annak, hogy miért nincs egy jól elkülöníthető patológiája az ER-ből való glukóz-kiáramlás defektusának. Az egyik glikogéntárolási betegség, a GLUT2 hiányából adódó Fanconi-Bickel szindróma azonban pont erre a kérdésre adhat választ. A GLUT2 izoforma a máj legfontosabb GLUT transzportere, mely megtalálható a vesékben és a bélben is. Alapvetően a plazmamembrán glukóztanszportjában vesz részt, de az ER-en áthaladva, itt is részt vesz a glukóz kijuttatásában. Fanconi-Bickel szindróma esetén a glukóz kijutása gátolt, így az glikogén formájában felhalmozódik a májban (124).

### 1.3.2. A G6PT-H6PDH-11 $\beta$ HSD1 triád működése

A G6P nem csupán a G6Páznak, hanem a hexóz-6-foszfát dehidrogenáznak (H6PDH) is a szubsztrátja az ER lumenében (56). Ez az enzim katalizálja a pentóz-foszfát út első két lépését azáltal, hogy a G6P-t és NADP<sup>+</sup>-t 6-foszfoglukonáttá és NADPH-vá alakítja. A G6PT-H6PDH-11 $\beta$ HSD1 triád működését a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra. A G6PT–H6PDH–11 $\beta$ -HSD1 tengely működésének sematikus ábrázolása [40].

A citoszólikus G6P a G6PT-n keresztül az ER lumenébe jutva szubsztrátként szolgál a H6PDH számára, ami ezt 6-foszfoglukonáttá alakítja. Ennek következményeként a NADP<sup>+</sup> NADPH-vá redukálódik, ami a 11 $\beta$ -HSD1 enzim kofaktora, így az enzim oxidoreduktáz aktivitása érvényesül, és az inaktív kortizont aktív kortizollá alakítja. G6PT = glukóz-6-foszfát transzporter; H6PDH = hexóz-6-foszfát dehidrogenáz; 11 $\beta$ -HSD1 = 11  $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz-1; G6P = glukóz-6-foszfát; ER = endoplazmás retikulum; 6-PG = 6-foszfoglukonát; NADP<sup>+</sup> = nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (oxidált); NADPH = nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (redukált).

A H6PDH egy nagyon fontos enzim, amely összeköttetést biztosít az intermedier anyagcsere, a redox homeosztázis és a hormonális szabályozás között az ER-ben. Elsőként nyúl máj mikroszómából mutatták ki és klónozták, majd azonosították a humán cDNS-ét és génjét. A szekvencia homológia analízis alapján a H6PDH biokémiaailag különbözik a glukóz-6-foszfát-dehidrogenáztól (G6PDH), amelyik ugyanezt a reakciót katalizálja a citoszólban, habár a két gén homológiája alapján közös ősök lehetett. A H6PDH szélesebb szubsztrát-specifitással rendelkezik mint a G6PDH, így nemcsak a

G6P-ot, de más hexóz-foszfátokat is hasznosít, mint például a galaktóz-6-foszfátot, a glukózamin-6-foszfátot, a 2-deoxiglukóz-6-foszfátot és a glukózt (125). Azonban élettani körülmények között az ER-ben leginkább a G6P-t hasznosítja. Mivel az ER membránja impermeábilis a piridin-nukleotidokra, ezért a NADP<sup>+</sup>/NADPH arányt a H6PDH és intraluminális reduktázok együttműködése tartja fenn. Emellett a H6PDH katalizálja a 6-foszfoglukonolakton hidrolízisét 6-foszfoglukonáttá. Ez az aktivitása azért is fontos, mert a 6-foszfoglukonolakton toxikus köztitermék.

A H6PDH legtöbb szövetben kifejeződik és aktív, ami szintén azt erősíti meg, hogy ez az enzim létfontosságú funkciót tölt be, elsősorban az ER intraluminális NADP<sup>+</sup>/NADPH arányának fenntartásában (126). Ezzel, hogy tulajdonképpen feltölti az ER intraluminális NADPH készletét, segíti a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1 (11 $\beta$ -HSD1) enzim kortizol-termelését. Legnagyobb mennyiségben a májban, vesében és a Leydig-sejtekben fejeződik ki. Az agyban általánosságban nem expresszálódik számottevő mennyiségben, de néhány neuronban kifejeződik. Minden olyan szövetben megtalálható, ahol a 11 $\beta$ -HSD1 is kifejeződik, kivéve a vese intersticiális sejtjeit, ahol a 11 $\beta$ -HSD1 dehidrogenáz aktivitása feltehetőleg a glukokortikoid receptort aktiválja, mivel ezek a sejtek nem rendelkeznek számottevő mineralokortikoid receptorral (127).

A 11 $\beta$ -HSD1 enzim az úgynevezett „rövid láncú dehidrogenázok/reduktázok - short-chain dehydrogenases/reductases (SDR)” szuperfamilia tagja. Számos szövetben kifejeződik, emberben legnagyobb mennyiségben a májban, vázizomban és zsírszövetben fordul elő. Intracellulárisan az ER-ben található (128). Aktív formája homodimer szerkezetű, ennek kialakulásában a fehérje C-terminálisa vesz részt, ennek módosítása az enzim aktivitásának jelentős csökkenését eredményezi. Az enzim megfelelő működéséhez elengedhetetlen a fehérje glikozilációja, ennek részleges gátlása mintegy felére csökkenti az enzim dehidrogenáz aktivitását, ugyanakkor a reduktázaktivitás nem károsodik. Az enzim kettős funkcióval bír; NADPH jelenlétében az enzim oxidoreduktáz hatása érvényesül, melynek következtében a kortizon aktív kortizollá történő átalakulását katalizálja. Magas NADP<sup>+</sup>/NADPH aránynál azonban az enzim dehidrogenáz aktivitása által a kortizol inaktiválásában játszik szerepet, pl. a bőr alatti zsírszövetben. Ennek a változó irányú aktivitásnak köszönhető, hogy adott szérumszint mellett is, a különböző szövetek eltérő kortizolhatásnak vannak kitéve, mely a rendszer finomhangolását teszi lehetővé.



Ez a finomhangolás a  $11\beta$ -HSD1 legfontosabb szerepe, de emellett multifunkcionális karbonil-reduktáz aktivitása is van, számos 11-és 7-oxidoszterolt a 7-hidroxilált formára alakítja. Emellett részt vesz a biotranszformáció első fázisának reakcióiban és számos nem-szteroid xenobiotikum karbonil-redukcióját katalizálja. Több tanulmány rámutatott a  $11\beta$ -HSD1 szerepére az oxiszterol metabolizmusában és az epesav homeosztázisban, bizonyítékot szolgáltatva a glukokortikoid-független gének expresszióját befolyásoló hatására (129).

Konfokális mikroszkópos kísérletek megerősítették a H6PDH és a  $11\beta$ -HSD1 kolokalizációját az ER lumenben a mindkét gént kifejező HEK293 sejtekben. A  $11\beta$ -HSD1 oxidoreduktáz aktivitását ötszörösére emeli, a dehidrogenáz aktivitást hatodrészt csökkenti a H6PDH jelenléte, így közvetlen hatást gyakorol annak katalitikus tulajdonságaira (130). Patkány máj mikroszómán vizsgálva megállapították, hogy az ER saját luminális piridin-nukleotid készlettel rendelkezik és a H6PDH és a  $11\beta$ -HSD1 közösen termelik egymás kofaktorait (39). Atanasov és mtsai szolgáltatottak először arra bizonyítékot, hogy a H6PDH és a  $11\beta$ -HSD1 között közvetlen fizikai kapcsolat van. Ezt három különböző módon is igazolták; ko-immunoprecipitációval, FRET módszerrel és N-terminális  $11\beta$ -HSD1 mutáns segítségével (131).

Az ER lumenében keletkezett kortizol aktiválhatja a citoplazmái glukokortikoid receptort vagy kötődhet az ER lumenében lévő fehérjékhez. A  $11\beta$ -HSD1 kompartmentalizációja fontos a H6PDH általi szabályozásában, és a 7-ketokoleszterol, mint alternatív szubsztrát metabolizmusa szempontjából is. Ez az ateroszklerotikus plakkokban található fő koleszterol oxidációs termék, mely a koleszterindús táplálékokból származik. Egy olyan  $11\beta$ -HSD1 mutáns használatával, mely a citoplazma felé irányul, megállapítható volt, hogy a kortizon oxidoredukcióját katalizálja, azonban a 7-ketokoleszterolét nem, ugyanis ez csak a lumen felől érhető el (132).

A kortizol szövetspecifikus aktivitása és az anyagcserére gyakorolt hatásai rávilágítottak a hormon lehetséges szerepére a szénhidrátanyagcsere-betegségek patomechanizmusában.

Ismert tény, hogy a  $11\beta$ -HSD1 szintje emelkedett elhízás esetén a zsírszövetben (133, 134), ahol ez metabolikus komplikációkhoz vezet. Ezzel ellentétben a  $11\beta$ -HSD1 expressziója átlagos, vagy alacsonyabb a májban elhízásban, illetve 2-es típusú

cukorbetegségben szenvedőknél (134-136). A 11 $\beta$ -HSD1 és a BMI összefüggését vizsgáló tanulmányok eredményei ellentmondásosak; bizonyos kutatások azt találták, hogy a csökkent reduktázaktivitás emelkedett BMI-vel járt együtt elhízott betegekben, míg más tanulmányok a BMI és a 11 $\beta$ -HSD-1 reduktázaktivitása közötti pozitív korrelációról számoltak be. Egyik kutatás szerint például elhízott egyéneknél a 11 $\beta$ -HSD1 szintje szignifikánsan magasabb, mint a kontrollcsoportban, és a 11 $\beta$ -HSD1 mRNS gén expressziója pozitívan korrelál a máj zsírtartalmával és fordítottan arányos az inzulinérzékenységgel. Elhízott férfiak és nők szubkután abdominalis zsírszövetében a 11 $\beta$ -HSD1 fokozott dehidrogenáz aktivitását mutatták ki. Ugyanakkor 150 gyereket és 150 felnőttet elemző klinikai vizsgálat kimutatta, hogy a pubertás korú fiúkban a BMI és a 11 $\beta$ -HSD1-enzimaktivitás között negatív összefüggés van, de leányokban a 11 $\beta$ -HSD1 aktivitása a pubertás során, míg fiúknál ugyanez a pubertás előtt alacsony szintű. A zsírszövet kortizolkoncentrációja és a 11 $\beta$ -HSD1 aktivitása között egyik tanulmány sem igazolt összefüggést, ami további vizsgálatok szükségességére hívja fel a figyelmet.

A szubkután zsír 11 $\beta$ -HSD1 mRNS szintje magasabb metabolikus szindrómában, illetve 2-es típusú diabéteszben szenvedő egyéneknél. A szubkután zsírszövetben megemelkedett 11 $\beta$ -HSD1 expresszió összefüggésben áll a metabolikus komplikációkkal, mert a magas glukokortikoid termelés a zsírszövetben csökkenti az adiponektin felszabadulását (137).

A 11 $\beta$ -HSD1 expresszióját és működését legintenzívebben a májban tanulmányozták. A krónikus májbetegség kóros kortizol-metabolizmussal jár, amelyre a vizelet kóros szteroidhormon-profiljából lehet következtetni. A vizelettel ürített emelkedett tetrahydrokortizol (THF) és allotetrahydrokortizol (allo-THF), tetrahydrokortizon (THE) arány a 11 $\beta$ -HSD1 fokozott oxidoreduktáz-aktivitásának következménye vagy a renális 11 $\beta$ -HSD2-aktivitás csökkenésének eredménye. Humán vizsgálatokban igazolták, hogy elhízás során a 11 $\beta$ -HSD1 expressziója csökken a májban, ezzel egyidőben növekszik a zsírszövetben, ami a glukokortikoidreceptorok aktiválásához vezethet (138). Ezek az eredmények megerősítik a Tomlinson és mtsai által javasolt modellt, ami azt valószínűsíti, hogy elhízásban a máj 11 $\beta$ -HSD1 aktivitása eleve alacsony, és ez fontos protektív mechanizmus lenne az elhízás káros metabolikus hatásainak kivédésében. Kimutatták, hogy csökkent glukóztoleranciában szenvedő nőkben a szubkután zsírszövet 11 $\beta$ -HSD1 mRNS-expressziója emelkedett és korrelál az

OGTT eredményével. Ugyanakkor a vizszerális zsírszövetben is fokozott a  $11\beta$ -HSD1-aktivitás és –expresszió, ami korrelál a H6PDH mRNS-szintjével.

Az embereken történt megfigyeléseket transzgenikus, illetve génkiütött állatmodelleken végzett vizsgálatok is megerősítették. Transzgenikus egerek vizsgálatából kiderült, hogy a  $11\beta$ -HSD1 minimális szintű overexpressziója elegendő ahhoz, hogy a vizszerális zsírszövetben megnövekedjen a zsírlakódás (139). Ez együtt járt a zsírsejtek méretének növekedésével, és a szabad zsírsavak termelődésével.

Olyan transzgenikus egerekben, melyekben a H6PDH-t túlexpresszálják a zsírszövetben, megnövekedett kortikoszteroid termelést és  $11\beta$ -HSD1 aktivációt lehet megfigyelni. Ez az emelkedett kortikoszteroid termelés abdominális zsírfelhalmozódással jár és a C/EBP mRNs-ének expressziója is megnövekedett enyhe testsúlygyarapodás mellett. Emellett éhgyomri hipoglikémiát, glukóz intoleranciát és inzulinrezisztenciát, emelkedett plazma szabad zsírsav koncentrációt és ezzel együtt járó megnövekedett adipóz lipolitikus aktivitást mértek ezeknél az egereknél. Ezek az eredmények megerősítik, hogy a H6PDH zsírszövet-specifikus overexpressziója elegendő a lokális glukokortikoid termelés kiváltásához és a káros metabolikus elváltozások kialakulásához (140).

Ha a  $11\beta$ -HSD1 gént kiütötték, a zsírszövetben nem volt fenotípusos elváltozás megfigyelhető, viszont magas zsírtartalmú táplálkozás és stressz alatt az egerekben mérséklődött a hiperglikémia és a vizszerális zsírszövet mennyisége, valamint javult az inzulin-válasz a vad típusú egerekhez képest (141).

A H6PDH knockout (KO) egerekben alacsonyabb a NADPH képződése az endoplazmás retikulumban. Következésképpen a  $11\beta$ -HSD1 enzimaktivitása oxidoreduktárról dehidrogenázra vált át, ami glukokortikoid inaktivációhoz vezet és a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely (HPA) aktiválódik.

A  $11\beta$ -HSD1-nak fontos szerepe van a máj glukózkibocsátásának szabályozásában; ezért megvizsgálták a KO egerek glukóz-homeosztázisát. Ezek az egerek súlyos vakuolizációs miopátiával, felborult glukóz homeosztázissal, az ER stressz következtében aktiválódott UPR—rel (unfolded protein response) „nem feltekeredett fehérje válasszal” rendelkeznek (142).

A vad típusú egerekkel összehasonlítva a KO egereknek csökkent a súlygyarapodása, perifériás éhgyomri hipoglikémiát, magasabb a glukóztoleranciát és emelkedett plazma kortikoszteron szintet mértek náluk. Mind az etetett, mind az éheztetett KO egerek plazma inzulinszintje normális volt. Azonban az inzulin és a plazma glukóz csökkent szintet mutatott az éheztetés után 4 órával újraetett KO állatok esetében, ami jobb inzulinérzékenységet jelez. A glukoneogenetikus enzimek; a foszfoenolpiruvát-karboxi-kináz (PEPCK) és G6Páz enzimek indukciója és aktivitása is megőrződött éheztetett KO egerekben. A táplált KO egerek májában megnövekedett a glikogéntárolás, a glikogenezis felgyorsulásának következtében; ez elsősorban laktátból valósult meg. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a glukokortikoid érzékenység részlegesen megmarad a máj szintjén. Ennek alapján feltételezhetően a megnövekedett glikogénszintézis tükrözi a G6P megnövekedett metabolizmusát glikogénné a H6PDH-közvetített anyagcsere hiányában (143).

A zsírszövetben a glukokortikoidok szabályozzák a lipogenezist és a lipolízist. A H6PDH KO egerekben kimutatták, hogy a  $11\beta$ -HSD1 és a GR- $\alpha$  mRNS szintje nem különbözött a vad típusétól a májban és a gonadális zsírdepókban. A mikroszómális  $11\beta$ -HSD1 fehérjeszint jól korrelált a gonadális zsírban expresszálandó mRNS-sel. Ennek ellenére az enzimaktivitás elsősorban oxidoreduktáz volt vad típusú, míg dehidrogenáz a KO egerek esetén. A kulcsfontosságú lipogén enzimek mRNS-ei; acetyl-CoA-karboxiláz, adiponutrin, sztearoil-CoA deszaturáz-2, alacsonyabb szintűek voltak KO egerekben, ami a lipogenezis károsodására utal. Ráadásul a lipolízis sebessége szintén alulmaradt a vad típusú egerekhez képest, és a szérum szabadzsírsav-koncentrációja sem emelkedett éhezés esetén (144).

Ha a H6PDH-t és a  $11\beta$ -HSD1-t is kiütötték, a dupla génkiütött (DKO) állatok glukokortikoid metabolizmusa és a HPA is a  $11\beta$ -HSD1 génkiütött állatokéra hasonlított. Azonban a legfontosabb fenotípusos tulajdonságaikban mégis inkább H6PDH KO egerekre hasonlítottak, csökkent testtömegükkel, izomsorvadással, a II-es típusú rostokat tartalmazó izmok vakuolizációjával, éhgyomri hipoglikémiával, megnövekedett izom glikogén-szinttel és az UPR gének magasabb expressziójával. Ez egybeesik a H6PDH  $11\beta$ -HSD1-független funkciójával, mely során a G6P metabolizmus és a NADP<sup>+</sup>/NADPH arány a legfontosabb az izom homeosztázisának fenntartásában (142).

H6PDH KO egerek mellékveséje 69% -kal volt nagyobb, mint a vad típusé, míg a 11 $\beta$ -HSD1 KO és a DKO mellékvese kb. 30% -kal nagyobb, mint a vad típus, ami arra utal, hogy a KO állatokban megnőtt a HPA aktivitása. Az ACTH-stimulált plazma kortikoszteron koncentrációk 2,2-szer magasabbak voltak a H6PDH KO állatokban és 1,5-szer magasabbak a 11 $\beta$ -HSD1 KO és DKO állatokban a vad típushoz képest, arányosan a megfigyelt mellékvese hipertrófiával (145).

Mivel a G6Páz és a H6PDH is a G6P-ot használja szubsztrátjaként, feltételezhető volt, hogy a különböző glikogéntárolási betegségekben szenvedőknél az egészségesekétől eltérő 11 $\beta$ -HSD1 aktivitásokat lehet mérni. Walker és mtsai két GSDIb és öt GSDIa betegen és további génkiütött egereken vizsgálták a 11 $\beta$ -HSD1 reduktáz aktivitását. GSDIb esetén a reduktáz aktivitás csökkent, míg GSDIa esetén jelentős növekedés volt megfigyelhető. Ezzel igazolódott a glukóz metabolizmus és a HPA közötti közvetlen kapcsolat (146).

A 11 $\beta$ -HSD1 expressziója hormonálisan is szabályozott az inzulinszerű növekedési faktor 1-es típusa (IGF-1) és a leptin által. Az IGF-1 knockout, a leptinhiányos (ob/ob) és a leptinrezisztens egérmodellekben a máj 11 $\beta$ -HSD1 mRNS szintje alacsonyabb (147, 148).

Leptin rezisztens db/db egereket használva megvizsgálták a G6PT-H6PDH-11 $\beta$ -HSD1 triád működését. A magasabb H6PDH szint a G6PT felülszabályozásával járt együtt a májban, és magasabb kortikoszteron szinttel a keringésben. Az egereket egy glukokortikoid antagonistával, RU486-al kezelve mind a H6PDH, mind a 11 $\beta$ -HSD1 szintje csökkent, és a hipoglikémia és az inzulinrezisztencia javult. Ez együtt járt a máj G6PT mRNS-ének csökkenésével (149). A G6PT expresszió csökkenése összefüggésben áll a máj glukoneogénikus enzimeinek; a G6Páznak és a PEPCCKnek a szuppressziójával.

A H6PDH és az 11 $\beta$ -HSD1 expressziója és aktivitása a diabéteszes patkányok májában megnövekedett, a PEPCCK és a G6Páz illetve a máj kortikoszteron expressziójával együtt. Azt is kimutatták, hogy a H6PDH gátlása siRNSsel gátolta a 11 $\beta$ -HSD1 fehérje expresszióját és enzimaktivitását, és gátolta a glukoneogenezis fokozódását, és csökkentette a kortikoszteron által stimulált inzulinrezisztenciát (150).

Egerekben az STZ-indukált diabétesz nem volt hatással a máj 11 $\beta$ -HSD1 reduktáz aktivitására, viszont csökkentette a H6PDH és növelte az izocitrát-dehidrogenáz szintjeit (151). Egy másik tanulmány azonban rávilágított, hogy elsősorban a glukóz szabályozza a H6PDH-11 $\beta$ -HSD1 rendszert, és az inzulinnak kevés hatása van rá, ami csak magas glukózkoncentráció mellett érvényesül, alacsony mellett nem (152).

A prerreceptorális kortizoltermelés szerepének megismerése a szénhidrátanyagcsere-zavarokban előmozdította a 11 $\beta$ -HSD1 gátlószereinek vizsgálatát. A 11 $\beta$ -HSD-1 legismertebb gátlószerei a következők: PF-00915275, BVT116429, BVT2733, oleanan, ursan, adamantil-karboxamid, carbenoxolon, INCB13739 MK-0916, MK-0736 és MK-0916.

*In vitro* rendszerekben vizsgálva a 11 $\beta$ -HSD1 különböző inhibitorainak hatásait, azt találták, hogy a 7-keto-dehidroepiandroszteron dózisfüggően gátolta a 11 $\beta$ -HSD1-át THP1 makrofágokban és HEK293 sejtekben. Ellenben a 7-ketokoleszterol nem gátolta a 11 $\beta$ -HSD1-et HEK293 sejtekben H6PDH jelenlétében sem, viszont THP1 makrofágokban gátolta annak reduktáz aktivitását (153).

### **1.3.3. Fruktóz hatása a G6PT-H6PDH-11 $\beta$ -HSD1 triád működésére**

A szisztémás glukokortikoid-felesleg, ahogy Cushing-kórban is megfigyelhető, elhízáshoz és a metabolikus szindróma tüneteéhez vezet (pl. diszlipidémia, inzulinrezisztencia és magas vérnyomás) (154, 155). Ugyanakkor a Cushing-kórban nem szenvedő, csupán centrálisan elhízott embereknél a vérben keringő kortizol szintje nem emelkedett (154). A centrális elhízásban szenvedőknél a napi glukokortikoid-ritmus károsodása figyelhető meg, melyek alacsonyabb csúcshintekkel, de magasabb mélypontokkal rendelkeznek (156, 157). Ez esetben a glukokortikoid metabolitok összkiválasztása is emelkedett, valószínűleg az 5 $\alpha$ -reduktáz fokozott expressziója miatt megnövekedett máj „clearance” következtében (158-161). Mivel a keringésben lévő glukokortikoidok szintje a normál tartományban van, ez magasabb hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely aktivitást jelez. Fontos megjegyezni, hogy a zsírszövetben a lokális kortizolszintézis szintje magasabb, és ez köztudottan szerepet játszik az elhízással kapcsolatos betegségekben (133, 158, 162).

A zsírsejtek funkcionális G6PT—H6PDH—11 $\beta$ -HSD1 rendszerrel rendelkeznek, így a rendszer mindhárom komponense lehetséges gyógyszer-támadáspont lehet, amint erre a metyraponnal végzett vizsgálatok is utalnak. A metyrapon NADPH-depléciót okoz az ER-ben, ezáltal befolyásolja a lokális glukokortikoid aktivációt (163). Metyrapon kezelés hatására a 11 $\beta$ -HSD1 az oxidoreduktáz aktivitásról dehidrogenáz aktivitásra vált 3T3-L1 és humán őssejt eredetű differenciálódott zsírsejtekben egyaránt (163). Ezenkívül a luminális piridin-nukleotidok kimerülése az ER-ben csökkent 11 $\beta$ -HSD1 oxidoreduktáz aktivitáshoz és a lipidcseppek csökkent akkumulációjához vezet a preadipociták differenciálódása során. Az adipociták érésének korai szakaszában, a preadipocitákban a 11 $\beta$ -HSD1 expressziója alacsony, míg a késői fázisában növekszik. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a glukokortikoidok fontos szerepet játszanak a preadipociták differenciálódásában, mivel a végső adipogenezishez és a sejt-prolifерáció leállításához aktív glukokortikoidokra van szükség (164-166). A 11 $\beta$ -HSD1 gátlása különböző ágensekkel vagy shRNS-sel gátolta az inaktív 11-oxidoglukokortikoidok differenciálódást elősegítő képességét (167, 168). Ezek a megfigyelések mind megerősítik a glukokortikoidok adipogenetikus szerepét.

A hosszantartó magas fruktóztartalmú étrend hozzájárul a metabolikus szindróma kialakulásához. Hatására a zsírszövetben megemelkedik a H6PDH és a 11 $\beta$ -HSD1 expressziója és a kortikoszteron szintje, a GR sejtmagbéli felhalmozódásával párhuzamosan. Egérkísérletek során már az állatok elhízása előtt emelkedett a szabad zsírsav és a plazma trigliceridek szintje, ami arra utal, hogy a prereceptorális glukokortikoid aktiváció megteremti a környezetet a később bekövetkező elhízáshoz (169). Patkányokban a túlzott szacharóz-, fruktóz- és glukózfogyasztás elhízást okoz azáltal, hogy képes növelni a 11 $\beta$ -HSD1 szintjét a zsírszövetben. A májban a kezdeti emelkedést csökkenés követi. Így a glukokortikoid szabályozás finomhangolása még az elhízás előtt bekövetkezik, és a leggyorsabb hatás a fruktóz esetén figyelhető meg (170).

A magas fruktóztartalmú diéta egerekben megnövelte a 11 $\beta$ -HSD1 és H6PDH fehérje kifejeződését, míg a máj kortikoszteron szintje változatlan maradt. Ennek következtében a GR egyre jobban felszaporodott a citoplazmában, mialatt a magi szintje változatlan maradt és ez a PEPCCK mRNS szintjének csökkenésével társult. A lipin-1-szint emelkedése a máj mikroszómában a megnövekedett lipogenezisre és hipertrigliceridémiára utal. Az inzulin receptor szubsztrát-1 szerin (307)

foszforilációjának növekedése a károsodott inzulin jelpályának a jele, és valószínűleg a  $11\beta$ -HSD1 és a lipin-1 szint változásának eredménye. A magas fruktóztartalmú étrend ezáltal megzavarja a máj prereceptorális glukokortikoid metabolizmusát és lipogenezisét, ami hipertrigliceridemiához és csökkent máj inzulin szenzitivitáshoz vezet (171).

A legfrissebb eredmények tükrében a máj megnövekedett *de novo* lipogenezise és TG termelődése hatással van a zsírszövetre a köztes anyagcsereutak és a gyulladásos folyamatok révén. A fruktóz-indukálta proinflammatorikus folyamatok a zsírszövetbe beszűrődő makrofágok és az adiponektin-rezisztencia révén a legfontosabb tényezők az inzulinrezisztencia és a globális anyagcsere-változások szempontjából a fruktóztúlfogyasztás esetén (172).

Az adipogenezis és az adipocita-funkció másik fontos közvetítői a glukokortikoidok. Bár mind a glukokortikoid receptor (GR), mind a mineralokortikoid receptor (MR) expresszálódik zsírszövetben és szerepet játszik a leptin expressziójának szabályozásában, a géncsendesítést alkalmazó kísérletek kimutatták, hogy a GR játszik fontosabb szerepet az adipogenezis és az adipokinek termelése szempontjából az emberi zsírsejtekben (173, 174). Ezenkívül az aktív glukokortikoidok intracelluláris képződése a monocitákban / makrofágokban szabályozza a proinflammatorikus molekulák felszabadulását (175). Kimutatták, hogy a  $11\beta$ -HSD1 szelektív gátlása több metabolikus szindrómához kapcsolódó paraméter javulását eredményezte; csökkentette a zsírszöveti gyulladást (176), anti-inflammatorikus hatást gyakorolt az lipopoliszacharid-aktiválta makrofágokra a hem-oxigenáz-1 aktiválásán keresztül (177), és csökkentette a proinflammatorikus génexpressziót az atheroszklerotikus szövetekben (178) az állatkísérletek során.

A fruktóz általi metabolikus hatások másik aspektusa, hogy amikor a májban gyorsan metabolizálódik fruktóz-1-foszfáttá, és ezáltal intracelluláris foszfát-kimerülést és AMP képződést okoz, ami az AMP-deamináz aktivációjához és húgyképződéshez vezet (179). A húgysavtermelés érzékeny markere a máj ATP depléciójának (180). A szérum húgysavszint gyorsan megemelkedhet intravénás adagolás vagy szájon át való fruktózfogyasztás esetén, akár egészen 2 mg/dl koncentrációig (181, 182). Bár ez a kezdeti emelkedés tranziens, megfigyelték, hogy a heteken át tartó fruktózfogyasztás



megemeli az éhomi húgysavszintet (183, 184). A megemelkedett húgysavszint összefüggésbe hozható egy sor patológiás állapottal, beleértve az inzulinrezisztenciát, az elhízást, a 2-es típusú diabéteszt és a krónikus vesebetegséget (185, 186), és feltehetőleg magasabb kockázati tényezőt jelent a miokardiális infarktus és neurológiai betegségek (pl. stroke) szempontjából (187, 188). A xantin-oxidáz gátló febuxostat a húgysavszint csökkentése révén véd a fruktóz-indukálta metabolikus szindróma kialakulásától (189).

Az egyik feltételezett mechanizmus szerint a húgysav közvetlen hatást fejt ki az adipocitákra. Sejttenyészetben a húgysav oxidatív stresszt és gyulladást indukált az zsírs sejtekben (190). A xantin oxidoreduktáz gén kiütése gátolta az adipogenezist és a PPAR $\gamma$  aktivitást (191). Ezek a vizsgálatok azt mutatják, hogy a húgysavnak fontos szabályozó szerepe van az adipogenezisben; így a fruktóz-mediált húgysavszintézis összefüggésben állhat az inzulinrezisztencia és metabolikus szindróma kialakulásával.

Fontos megjegyezni, hogy legtöbb emlőshöz hasonlóan a patkányok rendelkeznek egy úgynevezett (húgysav oxidáz) urikáz enzimmal, mely képes a húgysavat allantoinra lebontani, ezáltal magyarázatot adva arra, hogy esetükben a fruktóz miért nem emeli meg a húgysavszintet. Ha patkánnyal végzett kísérletben urikáz inhibitor alkalmaztak, ez 10-szeresére emeli a húgysavszintet fruktóz-fogyasztás hatására (192). Ha egerekben gátolják az urikáz funkcióját, az állatok kb. 4 hetesen elpusztulnak a magas húgysavszint következtében. Emberekben azonban nincs funkcionális urikáz enzim (193), ugyanis az evolúció során mutációk következtében az enzim aktivitása folyamatosan csökkent, végül egy pszeudogén jött létre, így az enzim termelődése is megszűnt. Egyes elméletek szerint ez egybeesik azzal az időszakkal, amikor a késői miocén időszakában a földi klíma hűlni kezdett. Eurázsia gyümölcssevő főemlőseinek egyre hosszabb teleket kellett túlélniük, így hatékonyabb fruktóz metabolizmusra volt szükségük, melynek során a zsírszövetben raktározták az energiát. Ezért a fruktóz hatását vizsgáló állatkísérletek sosem mutatnak 100-os átfedést az embernél megfigyeltekkel, és ez magyarázatot adhat a fruktóz-anyagcsere faji különbségeire.

A fruktóz toxicitást vizsgáló tanulmányokban szintén korlátozott bizonyos állatkísérletek (pl. patkánnyal végzett kísérletek) relevanciája. Ugyanis a patkány képes a C-vitamin szintézisére, mely semlegesítheti a fruktóz káros hatásait. Mint fontos

antioxidáns, a C-vitamin csökkenti a húgysav általi vaszkuláris simaizomsejt károsodást és magas vérnyomást (194, 195).

Az oxidatív stressz okozta szövődmények szerepével összhangban számos tanulmány utalt arra, hogy az antioxidánsok alkalmazása megakadályozhatja a fruktóz által kiváltott zsírszöveti diszfunkciókat (196), vagy a szteatózis és gyulladás progresszióját zsírmáj betegségben (197, 198). Összegezve, a folyamatos fruktóz-túladagolás által okozott túlzott lipid-felhalmozódásról ismert, hogy összefüggésben van az ER-stresszel és az adipociták celluláris diszfunkciójával.

Mikroszómán és sejtes rendszerben vizsgálva körülbelül tízszeres vagy ennél nagyobb NADPH/NADP<sup>+</sup> arány szükséges a 11 $\beta$ -HSD1 reduktáz aktivitásához. Az ER lumenében található NADPH koncentráció erősen függ az extracelluláris glukóz szinttől. A médium glukóz szintjét csökkentve koncentrációfüggően csökkent a 11 $\beta$ -HSD1 oxidoreduktáz aktivitása és nőtt a dehidrogenáz aktivitása, melyet a kortizol/kortizon arány mérésével lehet nyomon követni (199).

A 11 $\beta$ -HSD1 reduktáz aktivitása H4IIE májsejtekben és 3T3-L1 adipocitákban kevésbé volt érzékeny a médium glukózkoncentráció-változásaira. A 11 $\beta$ -HSD1 dehidrogenáz aktivitása H4IIE májsejtekben csupán rendkívül alacsony glukóz szintnél volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy a H6PDH szubsztráthozzáférése és NADPH termelése nagyon hatékony. A NADPH termelés erősen sejttípusfüggő, így a glukokortikoid hatás finomhangolásának szabályozásában fontos szerepet játszik (199).

*In vitro* rendszerben a fruktóz, mint kizárólagos szénhidrátforrás hozzáadása a médiumhoz elegendő a 3T3-L1 sejtek adipocitákká differenciálódásához, miközben a 11 $\beta$ -HSD1 kifejeződése és aktivitása nő. Transzfektált HEK293 sejtekkel végzett kísérletek alapján az ER NADPH termelése sokkal hatékonyabb fruktóz, mint glukóz esetén. A fruktóz jelenlétében differenciálódott adipociták emelkedett FABP4 expresszióval, C/EBP $\alpha$ : C/EBP $\beta$  aránnyal és lipolízissel jellemezhetők (200).

#### **1.4. Foszfohexóz-izomeráz útvonal az endoplazmás retikulumban**

Munkacsoportunk régóta vizsgálta a G6PT–H6PD–11 $\beta$ -HSD1 triád működését az endoplazmás retikulumban. Számos kísérlet támasztotta alá, hogy a G6P stimulálja a kortizon redukcióját kortizollá az enzimtriád által (201, 202). Megjelent egy cikk, mely

szerint azonban nem csupán a G6P, hanem a F6P is hozzájárul a mikroszómális kortizon-redukcióhoz, ami arra utal, hogy ez a hexóz-foszfát is szerepet játszhat a luminális NADPH termelésben (203).

Így született meg az az elképzelés, miszerint a F6P G6P-á alakulhat az endoplazmás retikulum lumenében. A citoplazmában ezt az átalakítást a foszfo-glukóz-izomeráz (PGI) enzim katalizálja, az ER-ben azonban ilyen funkciójú enzim nem ismert. Kutatócsoportunk így különféle mérésekkel megvizsgálta egy luminális hexóz-foszfát izomeráz funkciójú enzim létezésének lehetőségét patkány máj- és zsírmikroszóma felhasználásával (10). A mikroszómákból F6P adása után detektálták a keletkezett glukóz mennyiségét, megmérték a kortizon-kortizol átalakulás mértékét, valamint NADPH és a 6-foszfoglukonát termelődését. A G6P szubsztráthoz viszonyítva azt találták, hogy a F6P szintén jelentős mértékben hozzájárulhat a lokális glukokortikoid aktivációhoz. Többféle módon is próbálták kizárni annak lehetőségét, hogy a citoszólikus PGI szennyezés befolyásolja az eredményeket. Elsősorban mosási lépéseket iktattak be, melyek során szedimentációs és puffercseréléses módszerek biztosították a membránhoz lazán kapcsolódó citoplazmatikus fehérjék eltávolítását. Az első mosás az enzimaktivitás jelentős csökkenését eredményezte, a további mosások azonban már nem jártak számottevő aktivitáscsökkenéssel. A citoszólikus és a mikroszóma frakciókból egyforma mértékű enzimaktivitásoknál elvégezték a PGI immunoblottal történő analizését, mely csak a citoszólikus frakcióban volt detektálható. Emellett megállapították az enzim intraluminális lokalizációját is. Megmérték a F6P transzport sebességét gyorsfiltrációs transzport assayvel, mely során a G6P transzportjához képest kisebb mértékű, de zsír mikroszóma esetén a májhoz viszonyítva 1,7-szeres transzport-sebességet kaptak. Kísérleteik alapján a F6P transzportjában a G6PT-től eltérő fehérje játszik szerepet.

A cikk fő megállapítása szerint, bár a májban nem valószínű, hogy a F6P nagymértékben hozzájárul a lokális glukokortikoid aktivációhoz, az extrahepatikus szervekben, elsősorban a fehér zsírszövetben azonban fontos szerepe lehet, különösképpen inzulinrezisztencia esetén.

### **1.5. Felszívódás**

A glukóznak és a fruktóznak már a béllumenből a bélhámsejtekbe való felszívódása is eltér. Míg a glukóz transzportja ATP igényes és Na<sup>+</sup>-függő folyamat (SGLTI-n

keresztül), a fruktóz a specifikus GLUT5 transzportereken keresztül szívódik fel, mely nem igényel ATP-t, és a Na<sup>+</sup> felszívódásától is független (204). Egy gyermekeknél elvégzett tanulmány szerint a glukóz, illetve bizonyos aminosavak elősegítik a fruktóz hatékony felszívódását a bélből (205). Egy patkány vékonybélben végzett kutatás szerint glukóz hiányában egy specifikus, könnyen telítődő karrier, míg glukóz jelenlétében egy diszacharid-függő transzport rendszer felelős a fruktóz abszorpciójáért (206). Ha a GLUT5 transzporter génjét egerekben kiütötték, azt tapasztalták, hogy a fruktóz felszívódás 75%-al csökkent a jejunumban, a vérszérum fruktóz koncentrációja pedig 90%-kal csökkent a vad típusú egerekhez képest magas fruktóztartalmú étrend esetén. Standard étrendnél a génkiütött egerek normális vérnyomást és testtömegnövekedést mutattak. Magas fruktóztartalmú diétánál a vad típusú egereknél nőtt a só abszorpció és szisztémás magas vérnyomásban szenvedtek már 2 hét elteltével, míg a GLUT5 génkiütött egereknél nem volt megfigyelhető a megnövekedett só-felszívódás, ellenben ezek az egerek egyéb tápanyagfelszívódási rendellenességeket produkáltak (207).

A felszívódott glukóz, illetve fruktóz egy részét a bélsejtek lebontják. A metabolizmus egyik végtermékeként zsírsavakat szintetizálnak. Másrészt, ma már ismert, hogy a májon és vesén kívül a bélnek is van glukoneogenetikus tulajdonsága. Ebben a glukóz-6-foszfát rendszernek van szerepe, mely a glukóz-6-foszfátot hidrolizálja glukózzá és inorganikus foszfáttá. A glukóz-6-foszfát származhat glukoplasztikus aminosavakból, glikogén lebontásából, illetve fruktóz-6-foszfátból is, melyet az ER lumenében feltételezhetően egy hexofoszfát-izomeráz aktivitású enzim alakít át. Egy elmélet szerint a bél által termelt glukóz (főként fehérjedús táplálkozás esetén) a portális vénába jutva, az ottani glukóz-szenzorok segítségével a hipotalamikus magvakba továbbítja az információt, így csökkentve az éhségérzetet (3).

A bélnek *de novo* lipogenetikus tulajdonsága is van, melyet a fokozott fruktózbevitel szintén megnövel. Ezáltal a bél megnövekedett lipoprotein termelésbe kezd, ez az inzulin-választ serkentő, cukorbetegségekre alkalmazott rosiglitazone hatóanyaggal csökkenthető (208).

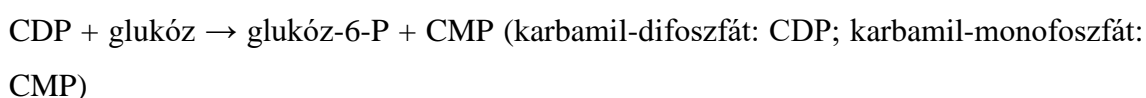
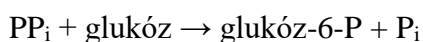
A bélsejtekben fel nem használt glukóz és fruktóz a bélhámsejtek bazális oldalán passzív transzporttal, a GLUT2 transzporter segítségével (fruktóz esetén részben GLUT5

segítségével) távozik. Innen a véráramba kerülnek és a portális keringésen keresztül pedig a májba jutnak.

### 1.6. G6Páz a bélben, fajok közti ellentmondások

A G6Páz jelenlétét elsőként májban, majd vesében, végül vékonybélben igazolták; azonban jelenléte az mRNS expressziós vizsgálatok alapján számos szövetben felmerült (209). Ezt elsősorban fehérje szintű expressziós vizsgálatokkal illetve enzimaktivitás mérésekkel igyekeztek megerősíteni, emellett radioaktív jelöléssel nyomon követhető a glukóz átáramlása a különböző szervekben. A glukóz-6-foszfát foszfohidrolitikus aktivitása révén a G6P glukózzá és inorganikus foszfáttá történő hidrolízisét katalizálja, melynek fontos szerepe van a vércukorszint homeosztázisának fenntartásában. Az 1960-as évek óta vizsgálják az egyéb reakciókban betöltött szerepét is, illetve a szöveti megoszlását különböző fajokban.

Az egyik korai ilyen tanulmány David G. Lygre és Robert C. Nordlie nevéhez fűződik (210), akik főként nyúl illetve patkány vékonybélben mutatták ki a G6Páz enzimaktivitásait az alábbi reakciókban:



Ebben a cikkben meghatározták a G6Páz enzim pH optimumát (6.2) illetve hőmérsékletfüggését is. Az enzim foszfotranszferáz aktivitását megmérték különböző fajokban és különböző szövetekben: hasnyálmirigy (borjú) mellékvese (marha), here, agy, lép, tüdő (patkány) is (211). Az első 4 szövetben mérhető foszfotranszferáz aktivitásokról arra következtettek, hogy az enzim ezekben a szövetekben eltérő funkcióval van jelen.

Emellett egérben például már 1971-ben kimutatták, hogy a glukóz-6-foszfát aktivitása mérhető volt az emésztőrendszer minden szegmensében legnagyobb aktivitással a középső jejunumban (212). Két évvel később megvizsgálták a

glukoneogeneziséért felelős enzimek, köztük a glukóz-6-foszfataz aktivitását tengerimalac jejunumban (213), és jelentős enzimaktivitás értékeket mértek, mely a májának 31%-a volt. A kísérleteket elvégezték 72 órán át éheztetett állatokon is, és azt tapasztalták, hogy az endogen glukóztermelés szintje megnőtt. Nemsokkal később Lamers és mtsai ennek az ellenkezőjét állították, ugyanis az ő méréseik szerint a C14-vel jelölt piruvát csupán 10%-a felelős a glukóz termelődésért, melynek szintje szerintük elhanyagolható a májhoz képest (214). Más szerzők rámutattak, hogy technikailag nincs ideális olyan mérés, mellyel *in vivo* megfelelően kvantifikálható lenne a bél glukoneogenezisének szintje, ugyanis pl. a C14-el jelölt prekursorok (alanin) glukózzá alakulása csak kvalitatív értelmezhető, a számszerűsítéshez bonyolult kinetikai analízisre van szükség (215). A szintén C14-el jelölt laktát glukózzá alakulásának vizsgálata patkány és nyúl vékonybélben arra az eredményre vezetett, hogy ez születés után megfigyelhető, de csak az elválasztás idejéig (216). A bél glikogéntartalma bár mindig alacsony, az elválasztás körüli időszakban a legmagasabb. Mindebből arra következtettek a szerzők, hogy a bél glukoneogenezisének főként az elválasztás előtt van szerepe, mégpedig a vékonybél izomszövetének glukózellátásában. Szintén izotópos vizsgálatokkal a laktátból és az alaninból származó glukoneogenezist vizsgálták kutyák májában és vékonybelében nyugalomban, illetve testmozgás közben (217). Ha a hasnyálmirigyet eltávolították, ebben az inzulinmentes állapotban 5-10-szer magasabb glukoneogenezist detektáltak, mint a kontrol állatoknál, mind pihenés, mind testmozgás alatt.

Egy másik cikkben Rajas és mtsai (218) analizálták a patkány és emberi vékonybél szakaszaiban (duodenum, jejunum, ileum) a G6Páz génexpresszióját és aktivitását. Fontos megjegyezni, hogy mielőtt a G6Páz cDNS-ét izolálták volna 1993-ban, az enzim jelenlétére csupán az enzimaktivitás vizsgálatokból következtettek. Ezek az enzimaktivitásmérések vagy teljes homogenátumból, vagy mikroszómából történtek, és többnyire a máj és vese kivételével alacsony értékek voltak, a vizsgálatok jelentős hányadában valószínűleg nem-specifikus foszfatazoknak tudhatók be. A fent említett cikkben RT-PCR és Northern blot vizsgálatok alapján a G6Páz a patkány duodenum és jejunum, míg embernél a duodenum, jejunum és legerőteljesebben az ileum szakaszában expresszálódott. Diabéteszes és éheztetett patkányok vékonybelében vizsgálva northern blot analízissel a G6Páz relatív mennyisége magasabb volt, míg inzulinkezelés hatására csökkent. Ezt a tendenciát követték az enzimaktivitások eredményei is. Az

enzimaktivitás-mérésekkel kapcsolatosan fontos megjegyezni, hogy ezek teljes bél homogenátumok felhasználásával készültek, ugyanis a szerzők leírása szerint a bél mikroszómán végzett enzymaktivitások nem voltak eredményesek patkány esetében. Ezt a szerzők egy speciális inhibitornak, vagy pedig a patkány bél G6Páz labilitásának tulajdonították. Ugyanezekkel a módszerekkel megmérték az újonnan szintetizálódott glukóz mennyiségét inzulinhiány esetén, és azt találták, hogy a vékonybél az endogén glukózproduktum 20-25%-áért felelős ebben az esetben. Csakúgy, mint ahogy a májnál is megfigyelhető, az inzulin a vékonybélben akutan szupresszálta a glukóztermelést. Az újonnan keletkezett glukóz prekursoraiként elsősorban a glutamint, kisebb mennyiségben a glicerolt azonosították, míg máj esetén a fő prekursorok az alanin és a laktát. Inzulinhiány esetén a foszfoenolpiruvát karboxikináz génje erősen indukálódott mind mRNS, mind fehérje szinten. A glicerokináz gén bár expresszálódott, ennek a szintje nem változott, míg a piruvát karboxiláz génje 80%-kal csökkent. Ebben a tanulmányban a vékonybelet inzulin-szenzitív glukoneogenetikus szervként azonosították, melynek szerepe lehet a diabétesz patofiziológiájában.

Nem sokkal ezután a cikk után megvizsgálták emberekben is a két fő glukoneogenetikus enzim, a fruktóz-1,6-biszfoszfátáz (FBPáz) és a PEPCCK szöveti megoszlását (219). Előbbit kimutatták a prosztatában, a méhben, a szuprarenális kortexben, a gyomorban és a szívben, a vékonybél epiteliális sejtjeiben és 2-es típusú pneumocitákban, a hasnyálmirigyben és a mellékvesében. Habár a PEPCCK szöveti megoszlása hasonló volt a FBPázéhoz, a hasnyálmirigyben, a mellékvesében és az 1-es típusú pneumocitáknál eltérések voltak. Mindazonáltal a két enzim együttes előfordulása egyéb szövetekben (pl. vékonybél, gyomor, mellékvese, here, prostata) felvetette a kérdést, hogy ezeknek szerepük lehet-e a glukoneogenezisben. Mivel a glukóz-6-foszfátáz enzim expresszióját már humán vékonybélben kimutatták, így a szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy ez a szerv szerepet játszhat a glukóz homeosztázis fenntartásában emberben.

A patkányokon végzett kísérleteknek ellentmondó cikk is megjelent, melyben a 48-72 órát éheztetett, diabéteszes és magas fehérjetartalmú tápon élő patkányok vékonybelében történő glukoneogenezist mérték  $3\text{-}^{13}\text{C}$ -glutamin felhasználásával (220). Az inkubációs idő letelte után, a szubsztrátok felhasználtságát illetve a termékek akkumulációját mérték enzymatikusan, illetve NMR - mágneses magrezonancia

spektroszkópiával. Habár a <sup>13</sup>C-glutamin felhasználásra került, nem volt ebből számottevő glukóz detektálható.

Míg több tanulmány is született, miszerint emberben (és egerben is (221)) a bél glukoneogenezis fokozódik gyomor bypass műtét után, és ennek elsődleges szerepe van abban, hogy sok diabéteszben szenvedő embernél a műtét után javulás következik be (222), de ettől eltérő vélemények is napvilágot láttak (223). Mithieux és mtsai abban látják a bél glukoneogenezisének elsődleges szerepét, hogy ennek indukciójakor a termelt glukóz a portális vénába jut, ahol a glukózszenzorok az agyba küldenek egy jóllakottsági szignált. Ez csökkenti az éhségérzetet, és javítja a máj glukóztermelésének inzulinválaszát. Így például fehérjedús táplálkozás vagy gyomor bypass műtét esetén ez elsősorban a táplálékbevitelre van hatással (224).

Egy másik tanulmány patkány jejunum endotéliumban vizsgálta a G6Páz enzimaktivitását fruktóz diéta hatására (225). Az első 3 napban egy tranziens emelkedés volt megfigyelhető, majd csökkenés következett be. Az eredmények összhangban állnak azzal a feltételezéssel, hogy a fruktóz diéta a jejunális nyálkahártyában elsősorban azoknak az enzimeknek az adaptációs megváltoztatásához vezet, amelyek részt vesznek a fruktóz lebontásában, míg a májban azon enzimek aktivitása növekszik, melyek részt vesznek az új glukóz-6-foszfát szintézisében, vagy amelyek a glukóz-6-foszfátot a pentóz-foszfát út felé irányítják.

Már 1970-es évektől vizsgálták a G6Páz enzim jelenlétét és aktivitását a különböző fajok vékonybelében a kígyófejű halaktól (226) az egéren át (227) az emberig (228). A bél glukoneogenezisének mennyiségét pl. két napos malacoknál vizsgálva azt találták, hogy nagyon kis mértékben járul csak hozzá a glukóz homeosztázis fenntartásához (229).

A legfontosabb és leggyakrabban használt laborállatok a különböző egértörzsek. 2009-ben létrehozták az első G6Páz génkiütött (KO) egereket (230). Azóta már több szövetspecifikus G6Páz KO egértörzs létezik: máj G6Páz KO (LKO), vékonybél G6Páz KO (IKO) és mindkét szövet G6Páz KO (ILKO).

Mutel és mtsai (4) cikkében arra keresi a választ, hogy a máj glukoneogenezisének kiesése okoz-e problémát az éhgyomri vércukorszint fenntartásában. A G6Páz



májspecifikus kiütésével létrehozott egértörzsön végzett vizsgálataiból az derült ki, hogy a vese és a vékonybél glukoneogenezise kompenzálni tudta a májának a kieséséből származó hiányt. Később a vékonybélben is kiütötték a G6Páz génjét dupla génkiütött törzset létrehozva (5), melyen megállapították, hogy a vékonybélnek létfontosságú szerepe van az éhomi vércukorszint fenntartásában olyan esetekben, mikor a máj glukoneogenezise hiányzik. A cikkben egy kvantitatív becslést is adnak a bél glukoneogenezisére vonatkozóan.

Másrészt tudjuk, hogy a G6Pázra feltétlenül szükség van a fruktóz-glukóz átalakuláshoz, melyet már több faj vékonybéljében kimutattak, pl. kutyák (231) és ember (232). Így a G6Páznak szerepe van a fruktóz metabolizmusában is.

Egy nemrég megjelent cikk a bél glukoneogenezis protektív szerepét hangsúlyozza a máj szteatózisz, illetve nem-alkoholos zsírmáj kialakulása kapcsán (233). A G6Páz overexpresszáló egértörzsek ugyanis védettek voltak a fentiktől hiperkalóriás táplálás esetén. Ez a máj *de novo* lipogenezisének és lipid importjának gátlásán keresztül történt, míg az IKO egereknél megnövekedtek a máj TG raktárai.

A G6Páz enzimrendszer vizsgálatának leginkább elterjedt módja a mikroszóma izolálását követő enzimaktivitás-vizsgálat. Ez történhet egy ún. gyorszűrési- és ezt követő radioaktív jelöléssel, illetve light-scattering módszerrel, valamint a termékek (a glukóz vagy a foszfát) mérésével. A máj mikroszómában (humán, patkány) validált módszerrel a hozzáadott G6P koncentráció, inkubálási idők, pH5-ön való inaktiválás, alamethicin koncentráció pontosan beállítható, és az enzimaktivitás-mérésnek nagyfóú (95%-os) pontosságát teszi lehetővé. A G6P transzportja a G6Páz enzim hiányában is megfigyelhető, mely egy különálló transzporter jelenlétét igazolja (234).

## 2. Célkitűzések

Elsődleges célunk volt, hogy feltárjuk a fajspecifikus különbségeket a glukóz-6-foszfát rendszer működését illetően vékonybélben. A különböző táplálkozás ugyanis magával hozhatja a rendszer alternatív működését. Ezért megvizsgáltuk a G6Páz rendszer jelenlétét és aktivitását egy gyümölcssevő ősszel rendelkező mindenevőben (ember), egy növényevő-gyümölcssevőben (tengerimalac) és egy növényevőben (patkány).

Másrészt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a kutatócsoportunk által korábban máj mikroszómában azonosított foszfohexóz izomeráz útvonal megfigyelhető-e bél esetén is. Szintén korábbi eredmények alapján tudjuk, hogy a glukóz képes a  $11\beta$ -HSD1-függő glukokortikoid aktiváció fokozására. Szeretnénk volna tisztázni, hogy ez a hatás megfigyelhető-e fruktóz esetén is.

Kísérleteinkkel az alábbi konkrét tudományos kérdéseket kívántuk megválaszolni:

1. A különböző táplálkozású emlősök vékonybelében megerősíthető-e a G6Páz rendszer jelenléte és aktivitása?
2. Ugyanezen fajok vékonybél mikroszómáiban a F6P szubsztrát hozzájárul-e a G6Páz rendszer aktivitásához?
3. A fruktóz hogyan befolyásolja *in vitro* a  $11\beta$ -HSD1 oxidoreduktáz illetve dehidrogenáz aktivitását?

### 3. Módszerek

#### 3.1. Real-time RT-PCR

A patkány és tengerimalac máj és bél szövetéből az RNS-t RNeasy Plus Mini Kittel (Qiagen) izoláltuk a gyártó utasításai szerint. A humán máj és bél szövetekből származó RNS-ek az Ambion-Applied Biosystems (First Choice<sup>®</sup> Human Total RNA Survey Panel) és Biochain cégektől származtak. 2 mikrogram RNS-t írtunk át reverz transzkripcióval 20 ml végtérfogatban Superscript<sup>®</sup> III First Strand Synthesis System (Invitrogen<sup>™</sup>) és random hexamerek segítségével. A G6Páz és G6PT expressziós szinteket fluoreszcens Real-time PCR-rel kvantifikáltuk DNA engine thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA) és Opticon Monitor 4 szoftver segítségével. A kísérleteket háromszor ismételtük 25ml reakcióelegyben. A cDNS-eket Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen<sup>™</sup>)-vel sokszorosítottuk 200 nM sense és antisense primerek használatával, melyeket az 2. táblázat tartalmaz.

2. táblázat. Real-time PCR primerek

Enzim	fajok	primerek
<b>G6Páz</b>	tengerimalac	5'-ACGTGATGGTCACATCTACTCTT-3'
		5'-AGACAGACATTCAGCTGCACA-3'
	patkány	5'-TTCCGGTGCTTGAATGTCGT-3'
		5'-GCAAGGTAGATCCGGGACAG-3'
<b>G6PT</b>	ember	5'-ACGTGATGGTCACATCTACTCTT-3'
		5'-AGACAGACATTCAGCTGCACA-3'
	Tengerimalac és ember	5'-TGTCCCCCTACCTGTGGGTGCTCTC-3'
		5'-CCAGGAGAGAGGACAGTCCGCTCTC-3'
patkány	5'-GGACGATTTGGGGCTCATCA-3'	
	5'-ACGTTGACCAGACCAACCAG-3'	

Az amplifikációs protokollként a G6Páz esetében a következőt alkalmaztuk: 95 °C (10 perc), 40 ciklus 95 °C (20 mp), 60 °C (20 mp), and 72 °C (20 mp). Az RT-PCR a G6PT esetében is a fentiek szerint zajlott, annyi különbséggel, hogy a kapcsolódási (annealing) hőmérséklet 57°C volt. Az expressziós szinteknél a máj expressziója volt a referencia, melyet 100%-nak vettünk. A PCR amplifikációs hatékonyságot Marcolongo és mtsai publikációja alapján számoltuk (235). Minden assayt 3 párhuzamossal, negatív kontrolok (templát nélküli, ill. reverz transzkriptáz nélküli templát) mellett végeztünk. Negatív kontrolok esetén nem volt jel a megfigyelt tartományban.

### **3.2. A mikroszómák**

A mikroszóma a tudomány által általánosan elfogadott ER modell, ugyanis 95%-ban olyan vezikulumok alkotják, melyek az ER-ből származnak és azok integritását, eredeti orientációját illetve speciális lúminális mikrokörnyezetét is megtartják. Kutatócsoportunk régóta foglalkozik az ER-ban található enzimrendszerekkel, így a mikroszóma izolálás is évtizedes, jól bevált protokollok alapján rutinszerűen történt, a lentebb részletesen is ismertetett protokoll alapján.

#### **3.2.1. Mikroszómák eredete**

A patkány mikroszómális frakciók 180–230 g testtömegű, hím Wistar patkányokból (Charles River (Europe) Laboratories Inc. Toxi-Coop Ltd., Budapest, Hungary) készültek, a tengerimalacokat pedig a LAB-ÁLL BT.-től szereztük be (Budapest, Hungary), 400-450 g testtömeggel. Az állatokat normál körülmények között tartottuk, szabad hozzáféréssel a táplálékoz. Máj mikroszóma izolálás esetében azonban a kísérlet előtti estétől már nem kaptak több táplálékot, ugyanis a májban felhalmozódott glikogén ronthatja a mikroszóma izolálás minőségét. Az állatokat erre elkülönített szobában dekapitációval áldoztuk fel. Az emberi máj és bél mikroszómák kereskedelmi forgalomban lévő termékek, melyek információi részletesen is elérhetőek a cégek honlapján. A humán máj mikroszómákat (katalógusszám: HMMCPL) a Thermo Fisher Scientific Inc. cégtől (Waltham, MA, USA), míg a humán bél mikroszómákat (katalógusszám: H0610.I) a Sekisui XenoTech LLC-től (Kansas city, KS, USA) vásároltuk. Ez bél esetében 15, máj esetében 50 különböző, vegyes nemi összetételű, főként kaukázusi populációból származó egyének kevert mikroszóma mintáit tartalmazta, akik valamilyen hirtelen bekövetkező ok miatt haláloztak el.

### 3.2.2. Máj mikroszómák izolálása

Az állatokból történő mikroszóma izolálás standard differenciál centrifugálással történt (236). Röviden, a májából ötszörös mennyiségű szukróz-HEPES pufferben (0.3 M szukróz és 0.02 M HEPES, pH 7.0) Potter-Elvehjem homogenizátorral egységes szuszpenziót készítettünk. Ezután 10 percig centrifugáltuk (1000 x g, 4°C) a mintákat a sejttörmelékek, illetve a sejtmag kiülepítéséhez, majd a felülúszót ultracentrifugával (Beckman Coulter Optima™ LE-80K) további 20 percig centrifugáltuk (18 000 x g, 4°C), ezzel megkapva a mitokondriális frakciót. A felülúszót ezután új csövekbe rakva, azt további 60 percig centrifugáltuk (195 000 x g, 4°C) a mikroszóma frakció kinyeréséhez. Az utolsó centrifugálási lépést változatlan paraméterekkel megismételtük MOPS-KCl (100 mM KCl, 20 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MOPS, pH=7,2) pufferben. A mikroszómális pelletet 5 ml MOPS-KCl pufferben szuszpendáltuk fel, mely körülbelül 30 mg/ml fehérjekoncentrációt eredményezett.

### 3.2.3. Bél mikroszómák izolálása

A bél mikroszómát Wistar patkány illetve tengerimalac vékonybeléből nyertük, az izolálási lépések Behera és mtsai. cikke (237) alapján történtek. Miután az állatokból eltávolítottuk a vékonybél részeket (mely az ileum és jejunum részeket tartalmazta), jéghideg 1,14 %-os KCl oldattal 50 ml-es fecskendővel óvatosan átmostuk. A belet hosszanti irányban felnyitottuk, majd annak belső feléről a felső bélbolygó réteget egy tárgylemez segítségével óvatosan eltávolítottuk és jéghideg homogenizációs pufferben (100 mM kálium-foszfát puffer, 1 mM EDTA, 150 mM KCl, 0.1 mM dithiotreitol, 250 mM szukróz, pH 7.4) szuszpendáltuk fel, mely proteáz-inhibitorokat is tartalmazott. Miután a sejteket háromszor 3000 x g-n 6 percig centrifugáltuk, a pelletet négyszeres homogenizációs pufferbe szedtük fel és 30 másodpercig szonikáltuk. Ezt követően a mintákat ultracentrifuga csövekbe mértük és 18000 x g-n 35 percig centrifugáltuk. A felülúszókat új csöbe téve, további 70 percig 195 000 x g-n centrifugáltuk. A mikroszómális pelletet MOPS-KCl pufferben felsuszpendáltuk és az utolsó centrifugálási lépést megismételtük ugyanezekkel a paraméterekkel. Végül a mikroszómákat MOPS-KCl pufferben (2-3 mg/ml fehérjekoncentráció) folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és felhasználásig (3 hónapon belül) itt tároltuk.

### **3.2.4. Mikroszómák tisztaságának ellenőrzése**

A mikroszómális frakciók tisztaságát specifikus marker fehérjék expressziójával vizsgáltuk Western blot segítségével (238). ER specifikus fehérje gyanánt a Grp94 expresszióját vizsgáltuk, míg a VDAC mitokondriális szennyezettségre, a Lamin A/C magi kontaminációra utal.

### **3.2.5. Mikroszómák épségének validálása**

A mikroszómális vezikulák épségét két módszerrel ellenőriztük. Vizsgáltuk az endoplazmás retikulum membránjában elhelyezkedő, intraluminális aktív centrummal rendelkező enzimek, az UDP-glukuroniltranszferáz (239) és a mannóz-6-foszfátáz (240) enzimek latenciáját. Ez mindkét enzim esetében 90-95% körüli értéknek adódott, ami a membrán épségére utal.

## **3.3. Enzimaktivitás mérések előkészítő lépései**

### **3.3.1. Mosási lépések**

Közvetlenül az enzimaktivitás mérések előtt a minták felénél extra mosási lépéseket is beiktattunk, hogy az esetlegesen a mikroszómális vezikulumokhoz gyengén asszociált citoszolikus és egyéb szennyező fehérjéket eltávolítsuk (10). Röviden, a mikroszómákat 4,5 v/w%-os polietilén-glikolt (8000 wt/vol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (PEG) tartalmazó MOPS-KCl pufferben felszuszpendáltuk, majd 30 másodpercig, 6000 x g-n centrifugáltuk. Ezt háromszor megismételtük, majd a mikroszómális pelletet MOPS-KCl pufferben szuszpendáltuk fel a soron következő kísérletekhez.

### **3.3.2. pH Inaktiválás**

Ezután a mikroszóma minták felét egy rövid időre savas pH-nak tettük ki; 5.0-re vittük le a pH-t 1 N HCl-lel és 20 perc 37°C inkubálás után a pH-t visszaállítottuk 7.2-re 1 M KHCO<sub>3</sub> segítségével. A specifikus G6Páz aktivitást a pH inaktivált és nem kezelt minták különbsége adta.

### **3.3.3. Mikroszómák permeabilizálása az enzim latenciájának meghatározásához**

A G6Páz aktív centruma intraluminárisan orientált, és nem-specifikus hexóz-foszfátáz aktivitással rendelkezik. A specificitását a szubsztrátjainak a transzportja adja, melynek

mértéke befolyásolhatja az enzim mikroszómán mérhető aktivitását. Ennek a jellemzésére használjuk a latenciát. A latencia meghatározásához szükségünk van a teljes aktivitás mérésére, ami azt az állapotot tükrözi, mikor a szubsztrátok szabadon hozzáférhetnek az enzim aktív centrumához, nem kell számolni a transzport esetleges korlátozó hatásával.

Ezért kísérleteinket mind intakt, mind permeabilizált mikroszómákon is elvégeztük. Utóbbi esetben a mintához (0,05 mg/mg mikroszómális fehérje koncentrációban) alamethicint (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtunk. Ez egy 20 aminosavból álló peptid, mely a membránba beépülve, azon pórusokat alakít ki, így a vezikulumok szétroncsolása nélkül a membránt szabadon átjárhatóvá teszi (47).

A latenciát a következőképpen számolhatjuk ki:

$$\text{Latencia} = \frac{(\text{Teljes aktivitás} - \text{Mért aktivitás}) \times 100}{\text{Teljes aktivitás}} \%$$

Ez egy százalékos érték lesz, mely megmutatja, hogy ép membrán esetén az enzimaktivitás hányad része marad látens a permeabilizált membrán esetén mért teljes aktivitáshoz képest. Például olyan esetben, ahol a szubsztrát transzportja kismértékű, ott a teljes aktivitásnak csak kis százalékát tudjuk mérni intakt mikroszómán, tehát nagy latencia értéket fogunk kapni.

### 3.4. Enzimaktivitás mérések

A G6Páz enzimaktivitás méréseket kétféle módszerrel is elvégeztük, minthogy az általa katalizált reakció során glukóz és inorganikus foszfát keletkezik, és mindkét termék mérhető, előbbit a Sigma GO Glucose Kit, utóbbit molibdát módszerrel detektáltuk.

#### 3.4.1. Glukóz termelés mérése

A bél és máj mikroszómákat (0.5mg/ml fehérje) MOPS-KC pufferben inkubáltuk 10mM glukóz-6-foszfát (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)(G6P), mannóz-6-foszfát (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)(M6P) illetve fruktóz-6-foszfát (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (F6P) jelenlétében 37°C -on. Az enzimaktivitás pontos meghatározásához első körben felvettük az enzim kinetikai görbét, mely során a mintákat 0, 1, 5, 10, 30

60 és 120 perc reakcióidő elteltével hővel denaturáltuk (100 °C, 5 perc). A többi kísérlethez 5 illetve 30 perces inkubálási időket alkalmaztunk, majd ezek átlagával számoltunk. Centrifugálás után (20000 x g, 10 percig 4 °C –on) megmértük a felülúszó glukóz koncentrációját Glucose (GO) Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) segítségével a gyártó leírása alapján.

#### **3.4.2. Foszfát termelés mérése**

A mosott máj és bél mikroszómákat 10 mM G6P és M6P jelenlétében inkubáltuk 37°C –on 10 percig MOPS-KC pufferben. A reakció végét ezen esetben is a hő denaturálás jelentette. Centrifugálás után (20000 x g, 10 percig 4 °C –on) a felülúszó foszfát koncentrációját mértük malachitzöld reagens segítségével Puskás és mtsai szerint (241). A standard kalibrációs sor elkészítéséhez Na-foszfátot használtunk, az abszorbanciát 660 nanométeren mértük.

#### **3.5. Fehérje koncentráció mérése**

A mikroszómák fehérje koncentrációjának mérése két szempontból is fontos volt számunkra; így tudtuk az enzimaktivitásokhoz az 1 mg/ml fehérjekoncentrációt beállítani, illetve western blothoz minden wellbe ugyanannyi fehérjét felvinni. Eza BC A (Bicinchoninic Acid) Protein assay kittel (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) történt, a gyártó utasításai szerint. A méréshez BSA (Bovine serum albumin) fehérjéből készítettük a standard sort MOPS-KCl pufferrel, majd a mintákat 562 nm-en fotometriásan megmértük.

#### **3.6. Western Blot**

A western blot mérésekhez egyenlő mennyiségű mikroszómális fehérjét (40 mg) vittünk fel minden mintából 12%-os poliakrilamid gélre. A fehérjéket SDS-PAGE-vel elválasztottuk, majd polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra blottoltuk. A membrán blokkolását 1 órán szobahőn 5%-os tejport tartalmazó TBST-ben végeztük.

Az immunoblottokat a következő elsődleges antitestekkel blottoltuk egy éjszakán át, 4 °C –on: G6Páz katalitikus alegység (nyúl, poliklonális) (Abcam, Cambridge, UK) és G6PT (nyúl, poliklonális) (Abcam, Cambridge, UK). Mindkét antitestet 1:500 hígításban, 5%-os tejben alkalmaztuk. A nyúl ellen termeltetett tormaperoxidázzal konjugált másodlagos



antitestekkel (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Németország) való reakció (1 óra, szobahőn) után a fehérje jeleket SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kittel (Pierce, Rockford, IL, USA) detektáltuk. A blotokat ImageJ szoftver segítségével elemeztük. A minták fehérje mennyiségét Ponceau festést követően kvantifikáltuk, majd erre normalizáltuk.

### 3.7. Mikroszomális kortizon-kortizol átalakulás

A 11 $\beta$ -HSD1 enzim aktivitását az általa termelt kortizon ill. kortizol mennyiségéből mértük. A kortizon-redukció mértékének meghatározására a HHH7 nevű humán embrionikus vese sejteket (melyek stabilan expresszálják a humán 11 $\beta$ -HSD1 és H6PDH enzimeket) 0,5 mg/ml fehérjekoncentrációban 5  $\mu$ M kortizon, és különböző koncentrációjú (0; 0,1; 0,3; 1 és 4,5 g/l) 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 kísérleteket mikrocentrifuga csövekben végeztük, 150  $\mu$ l térfogatban, 37°C-on, 30 percen keresztül. A reakciót minden esetben 150  $\mu$ l jéghideg metanol hozzáadásával állítottuk le, ezután a mintákat a HPLC-vel történő kortizon/kortizol mérésig -20°C-on tároltuk.

### 3.8. Statisztikai analízis

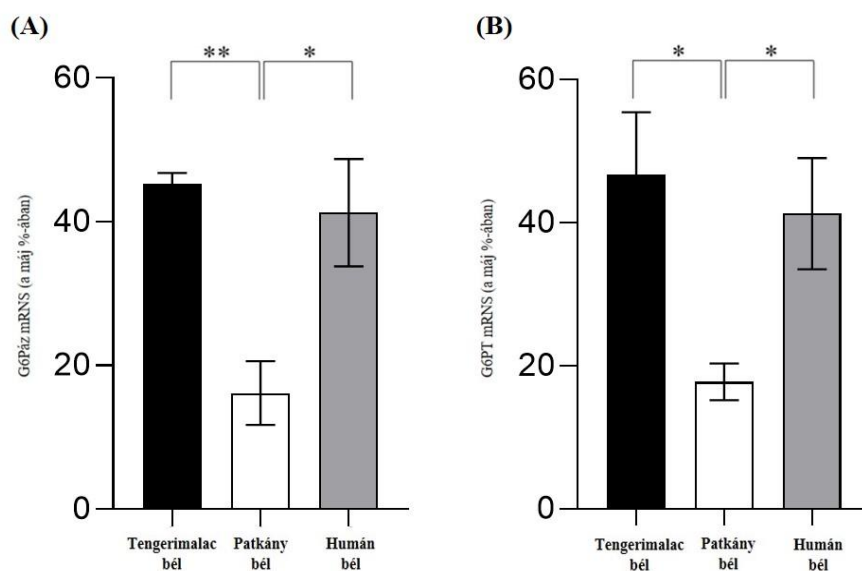
Minden bemutatott kísérlet három független mérés eredménye. Az aktivitásmérések esetén minden kísérletet három párhuzamos mintával végeztünk. Az eredményeket átlag  $\pm$  középérték közepes hibája (standard error of the mean (SEM) alakban mutattuk be. A statisztikai analízishez a GraphPad Prism 8 szoftvert (GraphPad, La Jolla, CA, USA) alkalmaztuk. A csoportok közti statisztikai különbségeket egy szempontos varianciaanalízissel (one-way ANOVA) vizsgáltuk, melyet Tukey-teszt követett. A különbségeket  $p \leq 0,05$  értéknél tekintettük szignifikánsnak. A szignifikanciaszinteket a következők szerint alkalmaztuk:  $p = 0.05$  -0.01 \*;  $p = 0.01$ –0.001 \*\*;  $p \leq 0.001$  \*\*\*.

## 4. Eredmények

### 4.1 A glukóz-6-foszfátáz rendszer expressziójának vizsgálata máj és bél mikroszómákban

A G6Páz és G6PT mRNS-einek kifejeződését real-time PCR vizsgálattal, míg fehérjéinek expresszióját Western blot analízissel elemeztük. Mindkét esetben a bélben mért expressziós szinteket mutatjuk be, melyeket a májban detektált expressziós szintek százalékában ábrázoltunk, utóbbit 100%-nak beállítva.

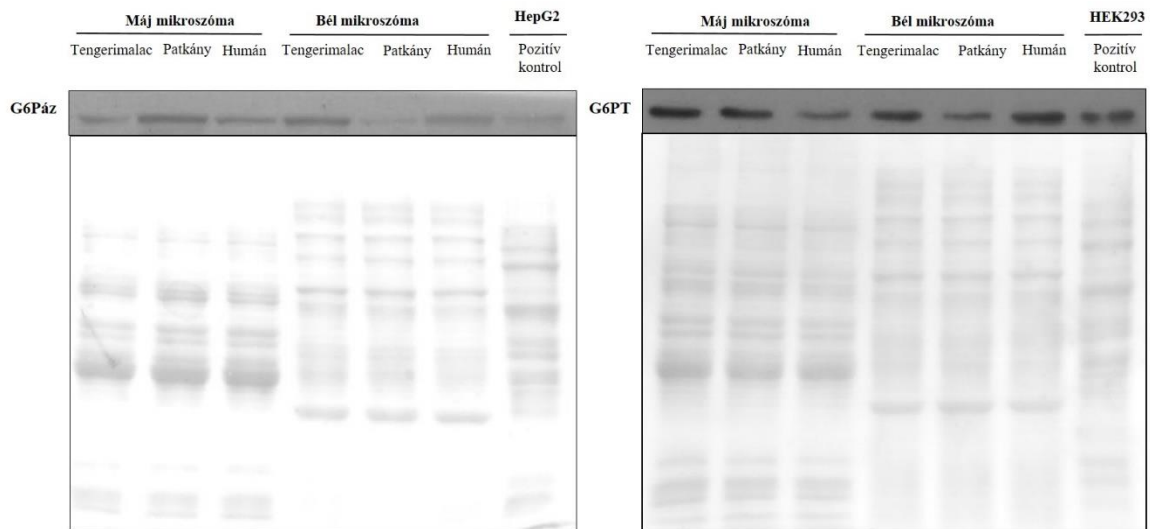
Eredményeink azt mutatják, hogy a G6Páz kifejeződik a bélből izolált mikroszómákban, de az expresszió mértéke erősen fajfüggő. Tengerimalacból és humán mintából származó bél esetén a G6Páz mRNS expressziója körülbelül fele a májban detektálható expressziónak (4. ábra.). Ezzel szemben a G6Páz mRNS kifejeződése a patkány vékonybélben csupán az egyötöde a májban lévőnek. A G6PT mRNS szinteket szintén megvizsgáltuk mindhárom fajban (4.B ábra). Azt találtuk, hogy a G6PT expressziós mintázata nagyon hasonló a G6Páz-éhoz. A tengerimalac és humán bél mikroszómában a transzporter kifejeződése körülbelül 50% volt a májhoz viszonyítva, míg patkány esetén a bélben található expresszió csupán a máj 17%-a volt.



4. ábra. A glukóz-6-foszfátáz (A) és a glukóz-6-foszfát transzporter (B) mRNS kifejeződése real-time PCR-rel vizsgálva. Minden kísérletet három párhuzamos mintával végeztünk, negatív kontrollok használatával,  $n=3$  ismétléssel minden faj esetében. Az expressziós szintek a máj expressziójának %-ában vannak kifejezve, melyet 100%-nak definiáltunk. Az oszlopok az átlag expressziókat reprezentálják  $\pm$  a középérték közepes hibája. A statisztikai analízist egyszempontos varianciaanalízissel, majd azt követő Tukey teszttel végeztük. Szignifikancia:  $p = 0.0-0.01$  \* és  $p = 0.01-0.001$  \*\*.

*G6Páz = glukóz-6-foszfataáz; G6PT = glukóz-6-foszfát transzporter.*

A következőkben megvizsgáltuk a G6Páz és G6PT fehérje szintű jelenlétét is különböző fajokból származó mikroszóma mintáinkban (5. ábra). Mindkét fehérje detektálásánál pozitív kontrollokat alkalmaztunk; G6Páz esetén HepG2 sejtizátumot, G6PT esetén pedig HEK293T sejtizátumot vizsgáltunk a mikroszóma mintákkal párhuzamosan. A fehérjék azonos mennyiségben történő felvitelét Ponceau festéssel ellenőriztük.



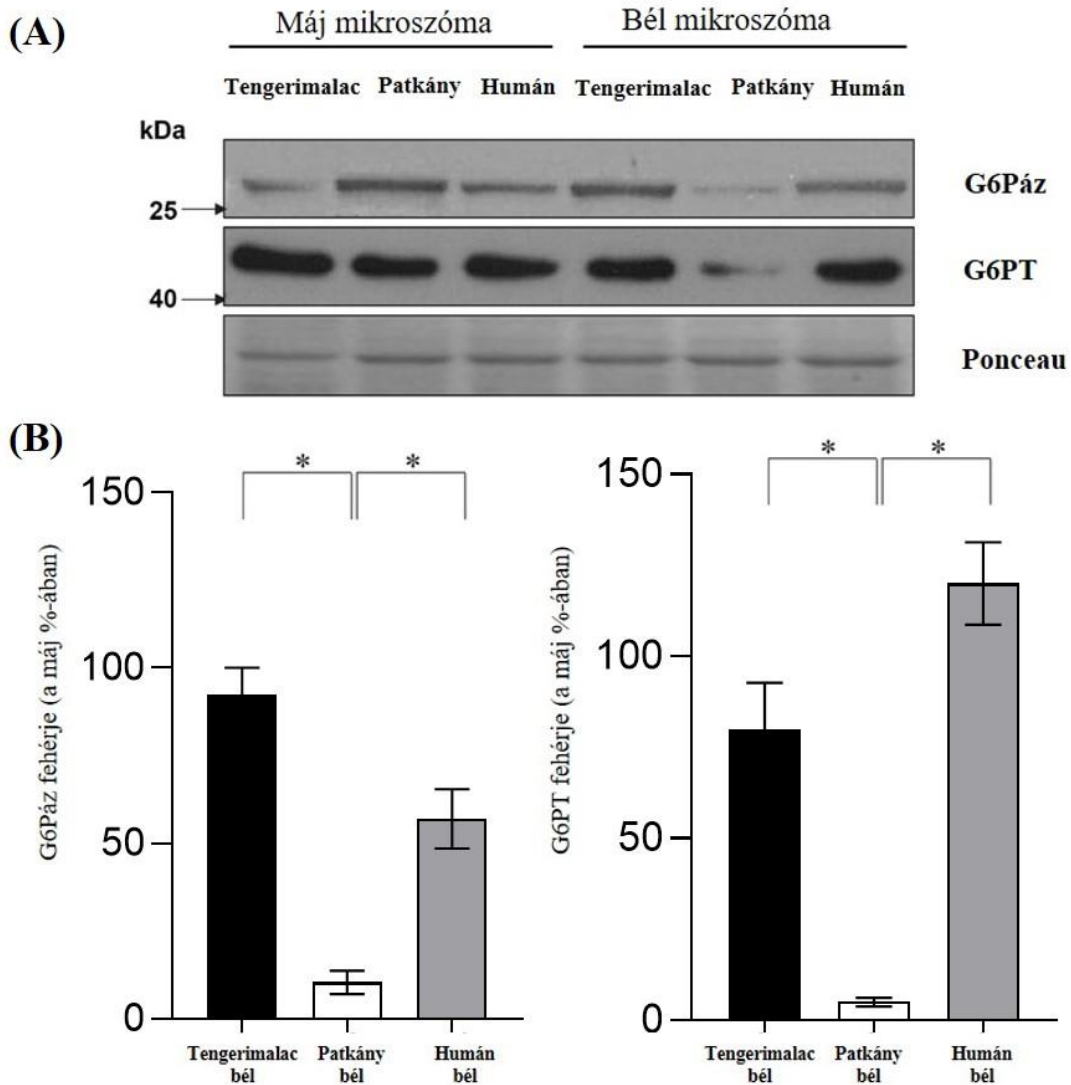
5. ábra. A glukóz-6-foszfataáz és a glukóz-6-foszfát transzporter fehérjék expresszió vizsgálata Western blot analízissel tengerimalac, patkány és human mikroszóma mintákon.

A kísérleteket háromszori ismétléssel végeztük, az ábrán egy reprezentatív eredmény látható. A fehérjemennyiségek normalizálására Ponceau festést alkalmaztunk. Glukóz-6-foszfataáz esetén HepG2 sejtizátumot, glukóz-6-foszfát transzporter esetén HEK293 sejtizátumot alkalmaztunk pozitív kontrollként. G6Páz = glukóz-6-foszfataáz; G6PT = glukóz-6-foszfát transzporter.

Hasonlóan a real-time PCR során kapott eredményekhez, mind a G6Páz, mind a G6PT expresszálódott a tengerimalacból és human vékonybélből származó mikroszómákban (6.A ábra).

Tengerimalacban a bél G6Páz expressziója a májéhoz hasonló volt, míg human minták esetén a bélben detektálható G6Páz expressziója körülbelül a fele volt a májénak. A G6PT fehérjeszintek tengerimalac és human bél mikroszómákban is magasak voltak. Patkány vékonybélből származó mikroszómákat vizsgálva azonban azt tapasztaltuk, hogy mind a G6Páz, mind a G6PT expressziója nagyon alacsony volt akár a májhoz, akár a tengerimalac, illetve human bél mikroszóma mintához viszonyítva. Minden kísérletet

háromszor megismételtünk, és az adatokat ImageJ szoftverrel számszerűsítettük (6.B ábra).

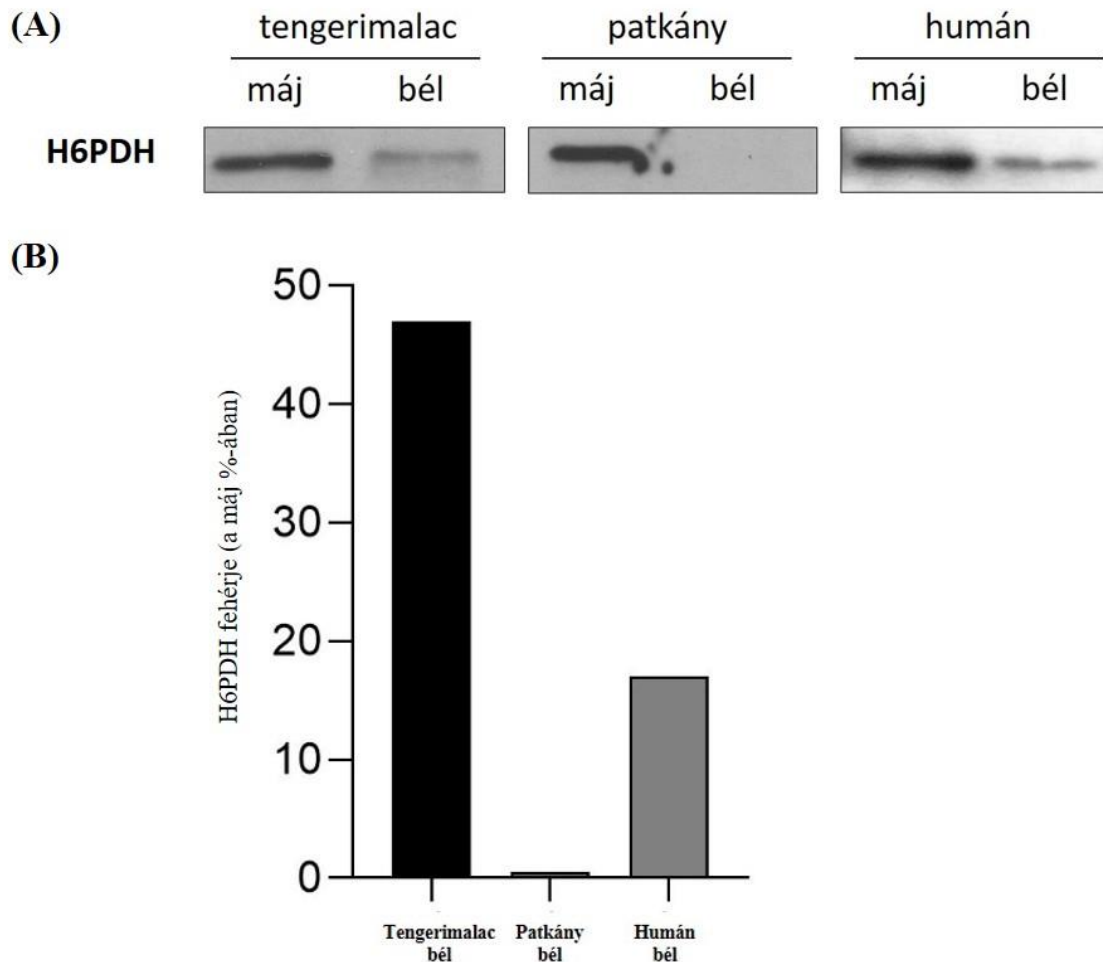


6. ábra. Glukóz-6-foszfátáz és glukóz-6-foszfát transzporter fehérje expressziójának vizsgálata tengerimalac, patkány és humán mikroszómákban.

Mindhárom fajból mikroszómális fehérjemintákat készítettünk elő Western blot analízishez. A mintákkal három kísérletet végeztünk, melyekből egy reprezentatív ábrát mutatunk be (A). A mintákat anti-glukóz-6-foszfátáz és anti-glukóz-6-foszfát transzporter antitestekkel blotoltuk. Ponceau festéssel igazoltuk az egyforma mennyiségű fehérjék felvitelét. A Western blot képeket kvantifikáltuk, és a vizsgált fehérjék bélben detektált expresszióit a májban lévő expressziók %-ában ábrázoltuk (B) Az oszlopok az átlag  $\pm$  SEM-et ábrázolják, a statisztikát Student t-tesztel analízissel végeztük,  $p = 0.05-0.01$  \* szignifikanciaszinttel. G6Páz = glukóz-6-foszfátáz; G6PT = glukóz-6-foszfát transzporter.

#### 4.2 A H6PDH expresszió vizsgálata tengerimalac, patkány és humán mikroszóma mintákon

A bevezetésben már említettük, hogy a mikroszómában egy másik enzimszisztéma is működik, mely a G6P-ot, mint szubsztrátot hasznosítani tudja. Ennek legfontosabb enzime a H6PDH, mely a G6P-ot 6PG-á alakítja NADPH termelés mellett, melyet pedig a 11 $\beta$ -HSD1 hasznosít a kortizol termeléséhez. Ezért megvizsgáltuk a H6PDH fehérje expresszióját is máj és bél mikroszómák esetében, melyeket a korábban részletezett fajokból izoláltunk (7.A ábra). Minden esetben jól látszik, hogy a bélben alacsonyabb a H6PDH fehérjeszintje a májhoz viszonyítva, illetve patkány bél esetén a fehérje nem volt detektálható. Az expressziós szinteket ImageJ szoftverrel számszerűsítettük, mely a 7.B ábrán látható.

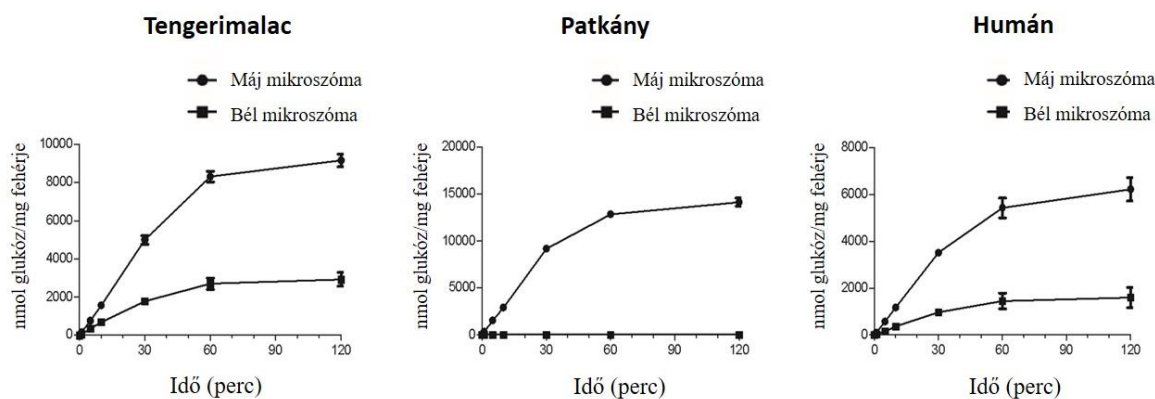


7. ábra. A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz fehérje kifejeződése tengerimalac, patkány és humán mikroszómákban Western blot analízissel.

Mindhárom faj esetén mikroszóma mintákat alkalmaztunk, melyeket anti-hexóz-6-foszfát dehidrogenáz antitesttel blottoltunk (A). A Western blot képeket ImageJ szoftverrel kvantifikáltuk és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz expresszióját ábrázoltuk a májban detektált expresszió %-ában (B). H6PDH = hexóz-6-foszfát dehidrogenáz.

### 4.3 A G6Páz enzimaktivitás kinetikai analízise

Májszövetben a szakirodalom szerint jól definiált a G6Páz rendszer jelenléte, melyet korábban ismertetett expressziós vizsgálataink is alátámasztanak. Saját kísérleti rendszerünkben szerettük volna beállítani a G6Páz enzimaktivitásának pontos mérését, valamint megvizsgálni ezen a módon az esetleges fajok közötti eltéréseket. Ehhez Sigma (GO) glucose kittel mértük a keletkezett glukóz mennyiségét G6P szubsztrát hozzáadása után. Annak érdekében, hogy megfelelően tudjuk mérni a G6Páz aktivitását mikroszóma mintáinkban, elvégeztük a G6Páz aktivitás kinetikai analízisét a glukóztermelés mérésével 10 mM G6P szubsztrát hozzáadását követően (8. ábra). A megfelelő szubsztrátkoncentrációt kutatócsoportunk előző kísérleteire alapozva határoztuk meg.



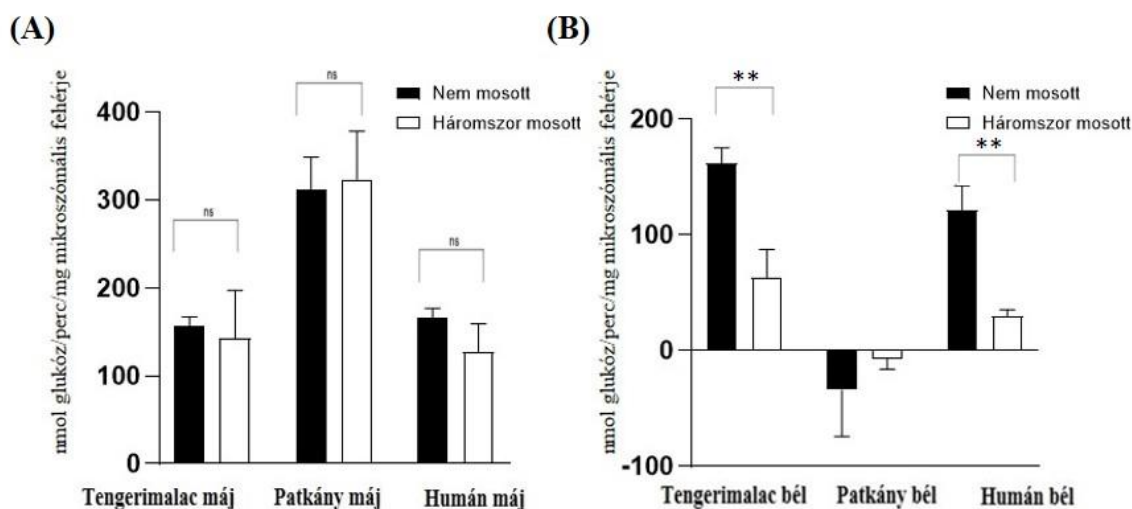
8. ábra. A glukóz-6-foszfát enzimaktivitásának kinetikai analízise glukóz-6-foszfát szubsztrát jelenlétében különböző eredetű mikroszómák esetében, a reakció által termelt glukóz (nmol/mg protein) mérésével. A mintákat 3 mosási lépés után 37 °C-on inkubáltuk 10 mM glukóz-6-foszfát jelenlétében 0, 1, 5, 10, 30, 60 és 120 percig. Minden kísérletet háromszor megismételtünk minden faj esetében. Az ábra három párhuzamos mérés átlagát  $\pm$  standard szórását ábrázolja.

A glukóz termelődés a vizsgálat 120 perce alatt az első 30 percben lineárisan növekedett mindhárom faj bélből és májból izolált mikroszóma mintáiban, ezért további méréseinkhez az 5 és 30 perces időpontokat választottuk az enzimaktivitás vizsgálatához.

Az is leolvasható az ábrákról, hogy minden faj esetében a máj mikroszóma mintákban magasabb aktivitás volt detektálható a bél mikroszóma mintákhoz viszonyítva, illetve patkány bél mikroszómában nem volt mérhető aktivitás.

#### 4.4 A mikroszóma tisztítási lépéseinek hatása az enzimaktivitásra

Annak érdekében, hogy az esetlegesen a membránhoz lazábban kapcsolódó citoszolikus fehérjéket eltávolítsuk a mikroszómákról, a mikroszómákat az aktivitásmérést megelőzően három egymást követő lépésben 4,5 v/w%-os polietilén-glikolt (8000 wt/vol) tartalmazó MOPS-KCl pufferrel mostuk. A nem mosott, illetve háromszor mosott mintákkal készült méréseket minden faj esetében elvégeztük máj (9.A ábra) és bél mikroszómákon is (9.B ábra).

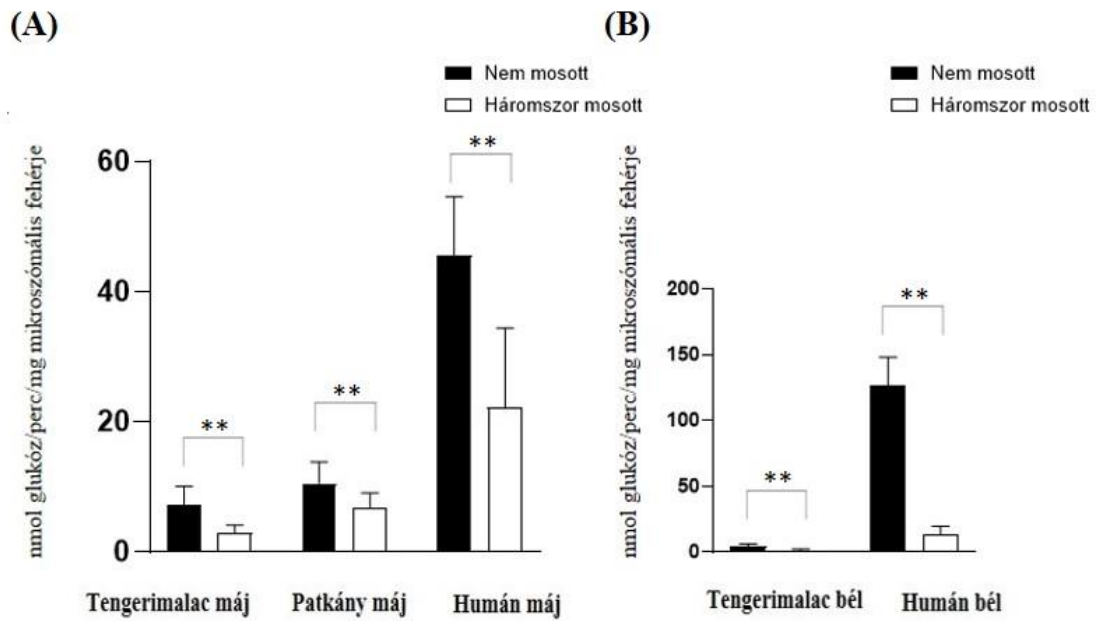


9. ábra. A glukóz-6-foszfátáz enzimaktivitása G6P szubsztráttal máj (A) illetve bél (B) mikroszómákon a glukóztermelés mérésével.

Minden minta esetén a mikroszómákat 10mM G6P-tal 37 °C-on inkubáltuk 5 és 30 percig. Az oszlopok ezen időpontokból számított átlag aktivitásokat ábrázolják  $\pm$  SEM. Minden kísérletet 3 párhuzamossal végeztünk és háromszor ismételtünk. Az oszlopok az átlag  $\pm$  SEM-et ábrázolják, a statisztikát Student t-tesztel analizáltuk,  $p = 0.01-0.001$  \*\* szignifikanciaszinttel. ns: nem szignifikáns

Az 9.A ábrán látható, hogy G6P szubsztrát hozzáadására a májban nem volt számottevő különbség az enzimaktivitásokban a mosott és nem mosott minták esetében. A humán mikroszómáknál észleltünk egy nem-szignifikáns aktivitás-csökkenést a mosási lépések hatására, mely feltehetőleg a G6P-nak egy extra-mikroszómális defoszforilációjára utal.

Kutatócsoportunk korábbi eredményei bebizonyították, hogy F6P transzportálódik az ER lumenébe, ahol egy ezidáig még ismeretlen hexóz-izomeráz aktivitású enzim segítségével G6P-tá alakul (10). Ezután a G6P-ot feltehetőleg a luminális G6Páz hidrolizálja glukózzá és foszfáttá az intraluminális reakciók számára. Ezért kísérleteinket elvégeztük F6P szubsztráttal is (10. ábra).



10. ábra. A glukóz-6-foszfátáz enzimaktivitása F6P szubsztráttal máj (A) illetve bél (B) mikroszómákon a glukóztermelés mérésével.

Minden minta esetén a mikroszómákat 10mM F6P-tal 37 °C-on inkubáltuk 5 és 30 percig. Az oszlopok ezen időpontokból számított átlag aktivitásokat ábrázolják  $\pm$  SEM. Minden kísérletet 3 párhuzamossal végeztünk és háromszor ismételtünk. Az oszlopok az átlag  $\pm$  SEM-et ábrázolják, a statisztikát Student t-tesztel végeztük,  $p = 0.01-0.001$  \*\* szignifikanciaszinttel. ns: nem szignifikáns

F6P szubsztrát esetében egy számottevőbb, 50% körüli csökkenés is detektálható volt a G6Páz aktivitásban mindhárom fajból izolált mikroszóma esetében (10. ábra). Ez azzal magyarázható, hogy a mosási lépésekkel a F6P-G6P izomerizációjáért felelős citoplazmatikus foszfo-glukóz-izomeráz (PGI) enzim is eltávolításra kerülhetett a mikroszómák külső felszínéről, ezáltal csökkentve a F6P G6P-tá alakulását, így a szubsztrát G6Páz általi felhasználását.

Mind humán, mind tengerimalac bél mikroszómában a G6Páz aktivitás jelentősen csökkent a mosási lépéseket követően (9.B és 10.B ábrák), melyből arra következtettünk, hogy ebben a szövetben a citoszólikus nem-specifikus foszfátázok jobban hozzájárulnak az összaktivitáshoz. Ezért a továbbiakban kizárólag háromszor mosott mikroszómákon mértünk enzimaktivitásokat, ezeket mutatjuk be alább részletesebben.



#### 4.5 A latencia vizsgálata a mikroszóma épségének meghatározásához

A szakirodalomból ismert, hogy a G6P ER-ba való bejutásához speciális transzporterre van szükség (G6PT), így ép membrán esetében a transzport sebessége limitálja a G6P hidrolízisét glukózzá és anorganikus foszfáttá. Alamethicin hozzáadására az ER membránján apró pórusok képződnek, így a G6P diffúzióval bejutva szabadon hozzáférhetővé válik a G6Páz számára, ezáltal az enzim teljes aktivitása mérhetővé válik. A módszerekben leírt módon így kiszámolható az enzim latenciája, melyet a 3. táblázat tartalmaz.

A G6Páz enzim latenciája G6P szubsztrát adásakor tengerimalac májban 49,2%, patkány májban 35,7% volt. A humán máj és bél mikroszómákon mért alacsonyabb latenciák (17,4% és 27,1%) abból adódhatnak, hogy ezeket a mintákat cégektől vásároltuk, így a szállítás, illetve tárolás körülményei bizonytalanok voltak. Bél esetében tengerimalac mikroszóma mintáknál is alacsonyabb latencia volt megfigyelhető (15%).

A latencia értékeket megmértük F6P szubsztrát hozzáadására is, melyek minden esetben magasnak bizonyultak, tengerimalac májban 55,8%, patkány májban 49,3%, humán májban 54,1%, tengerimalac bélben 89,7%, humán bélben 54,7%. A magas latenciákból arra következtethetünk, hogy a szubsztrát ER-be történő transzportja nagyban befolyásolja a G6P további lebontásának sebességét.

3. táblázat. A glukóz-6-foszfátáz enzimaktivitás latenciája a különböző fajok mikroszómáiban.

G6P= glukóz-6-foszfát; F6P= fruktóz-6-foszfát

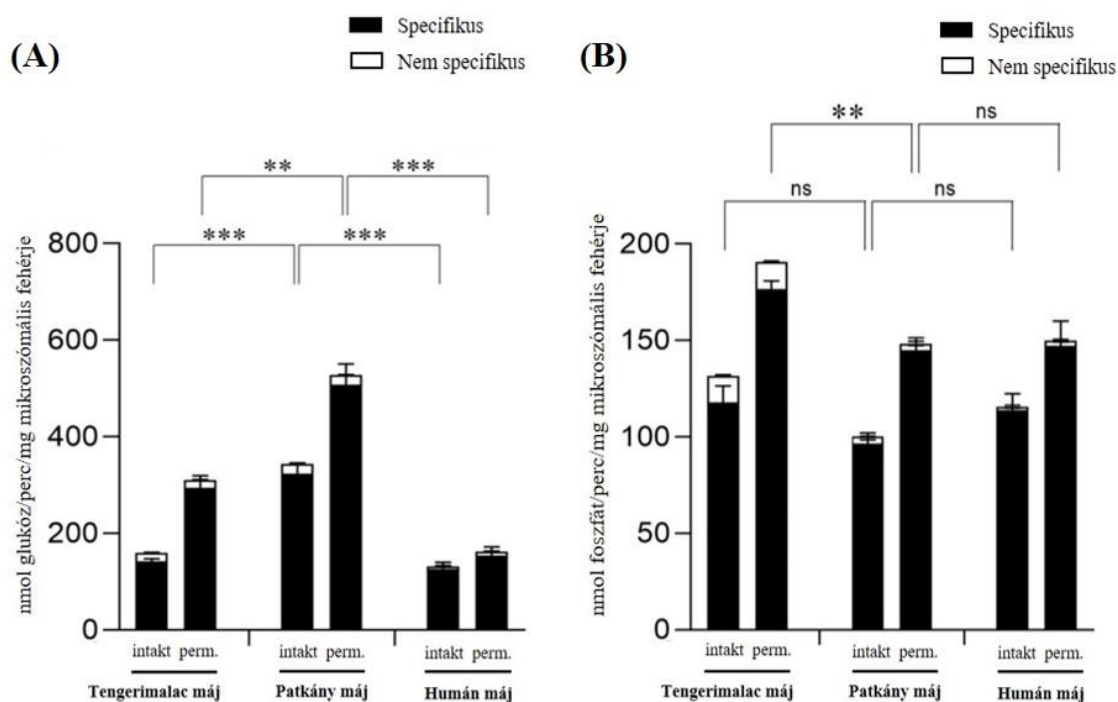
Mikroszómák eredete	Szubsztrát	Latencia (%)
Tengerimalac máj	G6P	49,2 ± 14,3
	F6P	55,8 ± 11
Patkány máj	G6P	35,7 ± 4,4
	F6P	49,3 ± 6,6
Humán máj	G6P	17,4 ± 10,1
	F6P	54,1 ± 14,6
Tengerimalac bél	G6P	15 ± 7,9
	F6P	89,7 ± 6,1
Humán bél	G6P	27,1 ± 13,5
	F6P	54,7 ± 15

#### **4.6 A G6Páz enzimaktivitása G6P szubsztráttal a különböző fajok máj mikroszómáin**

Régóta ismert, hogy a G6Páz enzim érzékeny a pH változásokra, és míg pH optimuma 6,5-6,7 körül van, pH5, illetve ez alatti értékeknél elveszíti az aktivitását (242). Kísérleteink során el szeretnénk volna különíteni a specifikus G6Páz aktivitásból eredő szubsztrát hidrolízist, valamint az aspecifikus foszfohidrolázok által történő hasítást, ezért a minták egy részét rövid ideig tartó pH 5-ös kezelésnek tettük ki, így inaktíválva az enzimet. Az ezen mintáknál kapott aktivitást nem-specifikus aktivitásnak neveztük el, melyet a mintában lévő egyéb foszfohidrolázok aktivitásának tulajdonítottunk. A specifikus aktivitást a kontroll mintákon mért teljes aktivitás és a nem-specifikus aktivitás különbségeként számoltuk ki.

Mindhárom faj esetében kiemelkedően magas, specifikus G6Páz aktivitást tapasztaltunk, mely megfelelt az elvárásainknak (11. ábra). Az enzimaktivitást első körben a keletkezett glukóz mérésével detektáltuk (11.A ábra). Általánosságban elmondható, hogy patkány májban mértük a legmagasabb aktivitást, melyet a tengerimalac, végül a humán májban mért aktivitás követett.

A G6P-függő G6Páz aktivitás mérését elvégeztük malachit zöld –molibdát módszerrel is, mely a G6P hidrolízisének másik végtermékét, a foszfátot detektálja (11.B ábra). A foszfáttermelés mérése hasonló eredményeket adott mindhárom faj esetében, azonban itt a fajok között nem volt szignifikáns különbség az aktivitásokban. Minden kísérlet előtt a mikroszóma mintákat háromszor mostuk a korábban leírt módon. A minták felét alamethicinnel permeabilizáltuk, mely használatával felfedhető az enzim latenciája.



11. ábra. A glukóz-6-foszfátáz enzimaktivitása glukóz-6-foszfát szubsztráttal máj mikroszómákban a keletkezett glukóz (A) illetve foszfát (B) detektálásával.

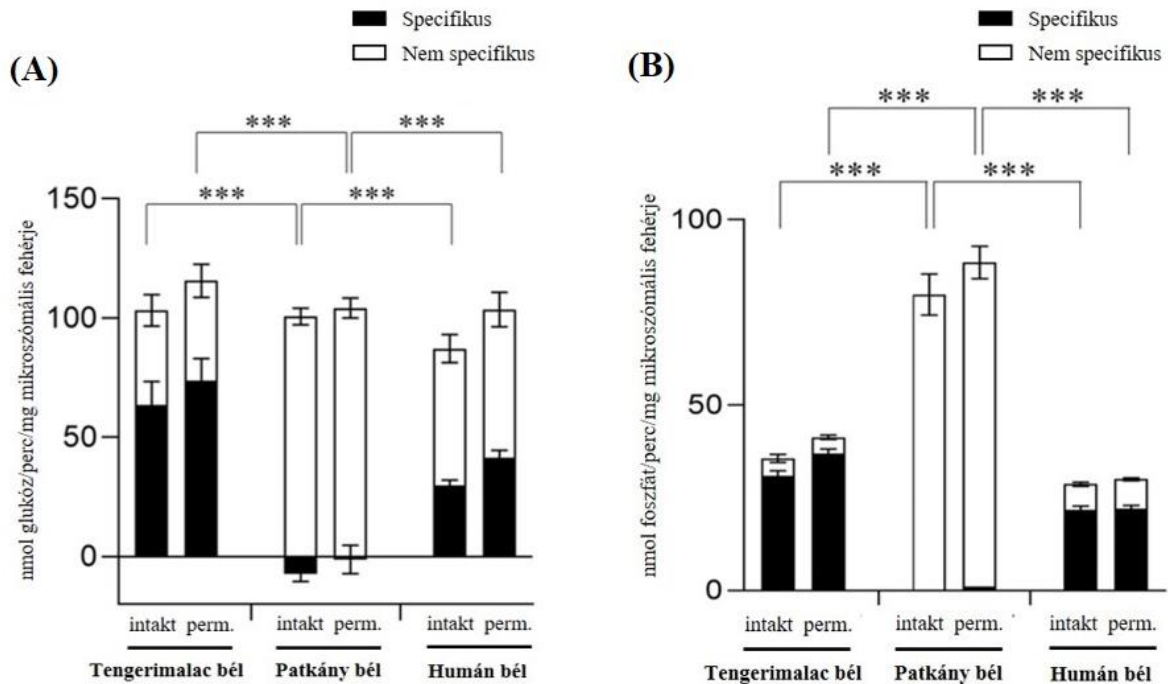
Minden minta esetén háromszor mosott mikroszómát inkubáltunk 10mM glukóz-6-foszfáttal 37°C-on 5 és 30 percig. Az oszlopok ezen időpontokból számított átlag aktivitásokat ábrázolják  $\pm$  SEM. Minden kísérletet 3 párhuzamossal végeztünk és háromszor ismételtünk. A statisztikai elemzést egy szempontos variancia analízissel (one-way ANOVA) vizsgáltuk, melyet Tukey-teszt követett. A szignifikanciaszinteket a következők szerint alkalmaztuk:  $p = 0.05 - 0.01$  \*;  $p = 0.01 - 0.001$  \*\*;  $p \leq 0.001$  \*\*\*. Perm: permeabilizált mikroszóma alamethicinnel (0,05 mg/mg mikroszómális fehérje koncentrációban) kezelve. Intakt: intakt, nem permeabilizált mikroszómák. Nem specifikus: a méréseket a glukóz-6-foszfátáz specifikus inaktivációja (rövid 5-ös pH-n történő inkubációval) után végeztük el. Specifikus: a specifikus glukóz-6-foszfátáz aktivitást a pH inaktívált és nem-inaktívált mintákon történt mérések különbsége adta.

#### 4.7 A G6Páz enzimaktivitása G6P szubsztráttal a különböző fajok bél mikroszómáin

Annak érdekében, hogy a G6Páz rendszer jelenlétét bélben is teszteljük, ugyanezen fajok beléből izolált mikroszómákon is megmértük a G6P-függő G6Páz aktivitást (12. ábra). Minden kísérletet elvégeztünk a két végtermék, azaz a glukóz (12.A ábra) és a foszfát (12.B ábra) detektálásával egyaránt. Szintén minden kísérletet háromszor mosott mikroszómákon végeztünk, majd a minták felét pH inaktíválásnak vetettük alá. Mind a kontroll, mind a pH inaktívált mintáknál 2-2 csoportot alakítottunk ki, melyeknél az egyik csoportot alamethicinnel permeabilizáltuk.

Ezek a mérések eltérő eredményeket adtak attól függően, hogy a bél mikroszómák milyen fajból származtak. Patkány esetén nem volt mérhető specifikus G6Páz aktivitás, a glukóz-6-foszfát hidrolitikus hasítása teljes mértékben nem-specifikus foszfátázoknak

volt tulajdonítható. Bár minden fajnál megfigyelhető, hogy bél estén alacsonyabb volt a specifikus aktivitás, mint májnál, azonban a humán és tengerimalac mikroszómákban is szignifikáns G6Páz aktivitás volt detektálható. Tengerimalac bélben mértük a legmagasabb aktivitást G6P szubsztrát hozzáadását követően mindkét módszerrel.



12. ábra. A glukóz-6-foszfátáz enzimaktivitása glukóz-6-foszfát szubsztráttal bél mikroszómákban a glukóztermelés (A) illetve a keletkezett foszfát (B) mérésével.

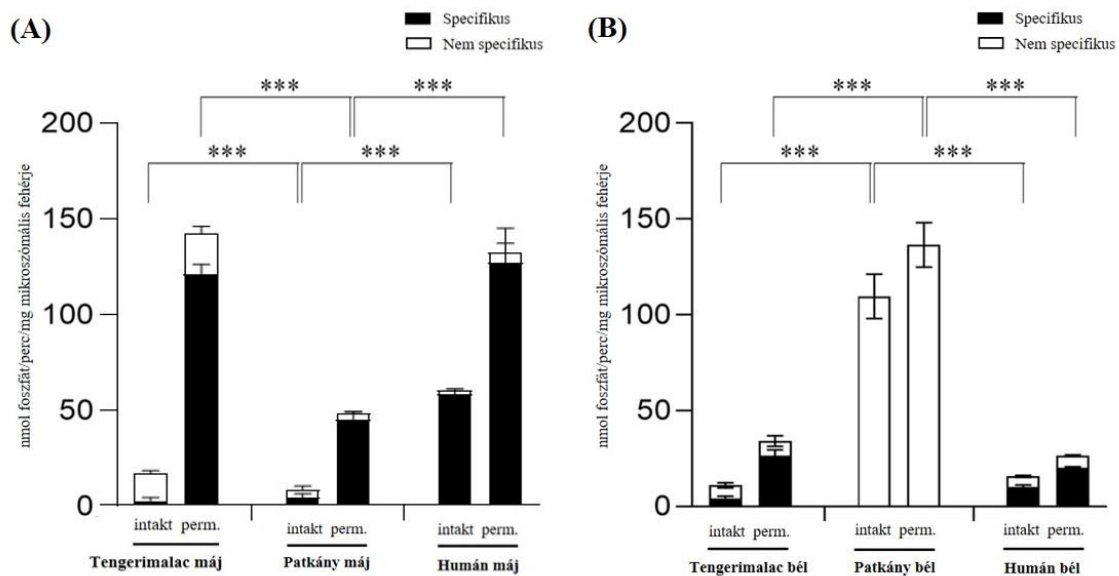
Minden minta esetén háromszor mosott mikroszómát inkubáltunk 10mM glukóz-6-foszfáttal-tal 37 °C-on 5 és 30 percig. Az oszlopok ezen időpontokból számított átlag aktivitásokat ábrázolják  $\pm$  SEM. Minden kísérletet 3 párhuzamossal végeztünk és háromszor ismételtünk. A statisztikai elemzést egy szempontos varianciaanalízissel (one-way ANOVA) vizsgáltuk, melyet Tukey-teszt követett. A szignifikanciaszinteket a következők szerint alkalmaztuk:  $p = 0.05$  -0.01 \*;  $p = 0.01$ -0.001 \*\*;  $p \leq 0.001$  \*\*\*.

Perm: permeabilizált mikroszóma alamehticinnel (0,05 mg/mg mikroszómális fehérje koncentrációban) kezelve. Intakt: intakt, nem permeabilizált mikroszóma. Nem specifikus: A méréseket a glukóz-6-foszfátáz specifikus inaktivációja (rövid 5-ös pH-n történő inkubáció) után végeztük el. Specifikus: a specifikus glukóz-6-foszfátáz aktivitást a pH inaktívált és nem-inaktívált mintákon történt mérések különbsége adta.

#### 4.8 A G6Páz rendszer a vékonybélben intraluminálisan orientált

A G6Páz rendszer intraluminális orientáltságát vizsgáltuk tengerimalac, patkány és ember máj, illetve vékonybél mikroszóma mintáin M6P szubsztrát hozzáadásával. A M6P fiziológiás körülmények között nem szubsztrátja a G6Páznak, ugyanis a membrán impermeábilis erre a szubsztrátra, natív membránon M6P nem képes átjutni. A mikroszómális vezikulumok permeabilizálása a pórusokat kialakító alamehticinnel azonban lehetővé teszi a M6P eljutását az enzimhez, ezáltal a G6Páz enzimaktivitás mérhetővé válik.

A G6Páz totál foszfohidroláz aktivitása látens volt mindhárom faj mikroszómáival végzett kísérletben M6P szubsztrát hozzáadása után. A tengerimalac máj mikroszómán és patkány máj mikroszómán 90% fölötti latenciát mértünk, míg humán mikroszómán 54%-ot (13.A ábra). Bél mikroszómák esetén a tengerimalac és humán minták esetén a latencia 84, illetve 49% volt (13.B ábra). Ezek az eredmények megerősítik továbbá, hogy a kísérletek során használt mikroszómális vezikulumok ép membránnal rendelkeztek. A humán mikroszómák esetén észlelt alacsonyabb latenciára magyarázat lehet, hogy ezek a minták nem frissen izolált mikroszómák voltak. A patkány bél mikroszómákkal végzett aktivitásmérések tovább erősítik azt a hipotézist, hogy itt nem tapasztalható G6Páz aktivitás (M6P szubsztrát hozzáadására sem), azaz a M6P G6Páz általi hidrolízise nem volt detektálható.



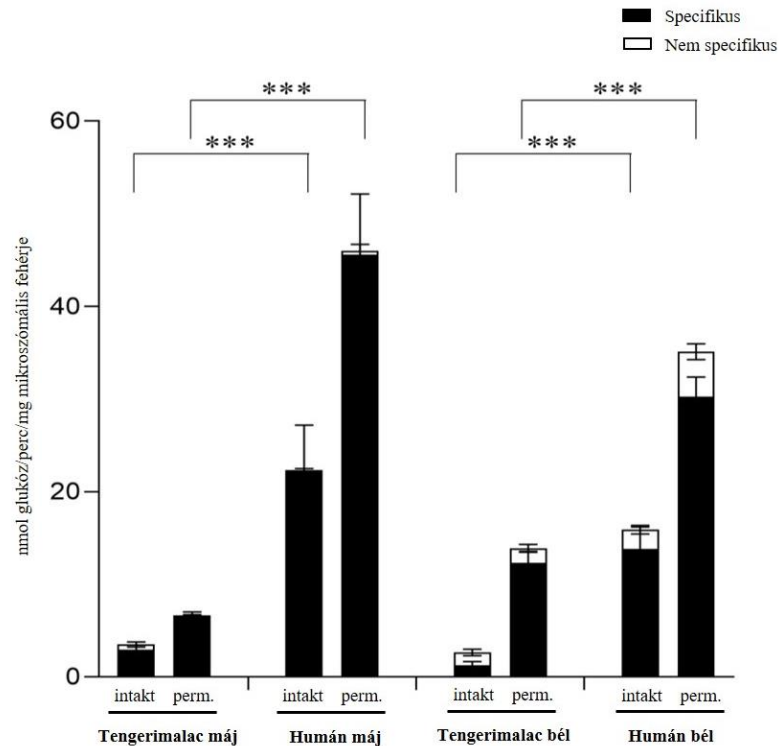
13. ábra. Mannóz-6-foszfát hidrolízise foszfáttermelés mérésével tengerimalac, patkány és humán máj, illetve vékonybélben.

Minden mikroszómát háromszor mostunk és 37 °C-on inkubáltunk 10mM mannóz-6-foszfát szubsztrát jelenlétében 10 percig. Minden kísérletet háromszor ismételtünk három párhuzamossal. Az oszlopok az átlag  $\pm$  SEM –et ábrázolják, a statisztikai analízist egy-szemponstú ANOVA és Tukey teszttel végeztük,  $p \leq 0.001$  \*\*\* értéket véve szignifikánsnak. Az aktivitásméréseket a minták felénél egy rövid pH5-ös inaktiválás után végeztük, mely a glukóz-6-foszfátot specifikusan inaktiválja. A specifikus glukóz-6-foszfátáz aktivitást a pH 5-tel kezelt és nem-kezelt mintáknál mért aktivitások különbsége adta.

#### 4.9 F6P-függő glukóztermelés a májban és a bélben különböző fajok esetében

Az enzim latenciájának mérésénél már említettük, hogy F6P-ot is használhatunk szubsztrátként, ugyanis ezt egy hexóz-izomeráz enzim képes G6P-tá alakítani. Ez a

mechanizmus májban jól definiált, azonban szeretnénk volna megvizsgálni, hogy kimutatható-e vékonybélben is. Ezért azokon a fajokon végeztük a következő méréseket, melyek vékonybélben bizonyítottan működik a G6Páz rendszer. F6P-ot adtunk szubsztrátként a tengerimalac és humán bél mikroszómákhoz, majd a termelt glukóz mennyiségét mértük (14. ábra).



14. ábra. Fruktóz-6-foszfát-függő glukóztermelés tengerimalac és humán máj, illetve vékonybél mikroszómákban. Minden mikroszómát háromszor mostunk és 37 °C-on inkubáltunk 10mM fruktóz-6-foszfát szubsztrát jelenlétében 5 és 30 percig. Az ábrák a két időpontból számolt aktivitások átlagát mutatják. Minden kísérletet háromszor ismételtünk három párhuzamossal. Az oszlopok az átlag  $\pm$  SEM –et ábrázolják, a statisztikai analízist egy-szempon-tú ANOVA és Tukey teszttel végeztük,  $p \leq 0.001$  \*\*\* értéket véve szignifikánsnak. Perm: permeabilizált mikroszóma alamethicin-nel (0,05 mg/mg mikroszómális fehérje koncentrációban) kezelve. Intakt: intakt, nem permeabilizált mikroszómák. Az aktivitásméréseket a minták felénél egy rövid pH 5-ös inaktiválás után végeztük, mely a glukóz-6-foszfátot specifikusan inaktiválja. A specifikus glukóz-6-foszfátáz aktivitást a pH 5-tel kezelt és nem-kezelt mintáknál mért aktivitások különbsége adta.

Az első kísérletek során a F6P-ból történő glukóztermelést máj mikroszómákon végeztük, mely megerősítette a korábbi eredményeket – specifikus, látens G6Páz-függő glukóztermelést figyelhetünk meg mind tengerimalac, mind humán máj mikroszómák esetén. Ugyanezeket a kísérleteket megismételtük bél mikroszómákkal is. Azt találtuk, hogy számottevő volt a glukóztermelés F6P adására tengerimalac és humán bél mikroszómák esetében is, mely specifikusan a G6Páz aktivitásnak volt köszönhető, és az

enzim látens volt erre a szubsztrátra is. A F6P-függő glukóztermelés alacsonyabbnak bizonyult, mint a G6P-függő, mely feltételezhetően a kisebb kapacitású F6P transzport, vagy az izomerizációs lépés limitált kapacitása miatt volt megfigyelhető. A két fajt összehasonlítva elmondható, hogy humán minták esetén mind a májból, mind a bélből készült mikroszómákban nagyobb aktivitást mértünk, mint a tengerimalac mikroszómák esetén.

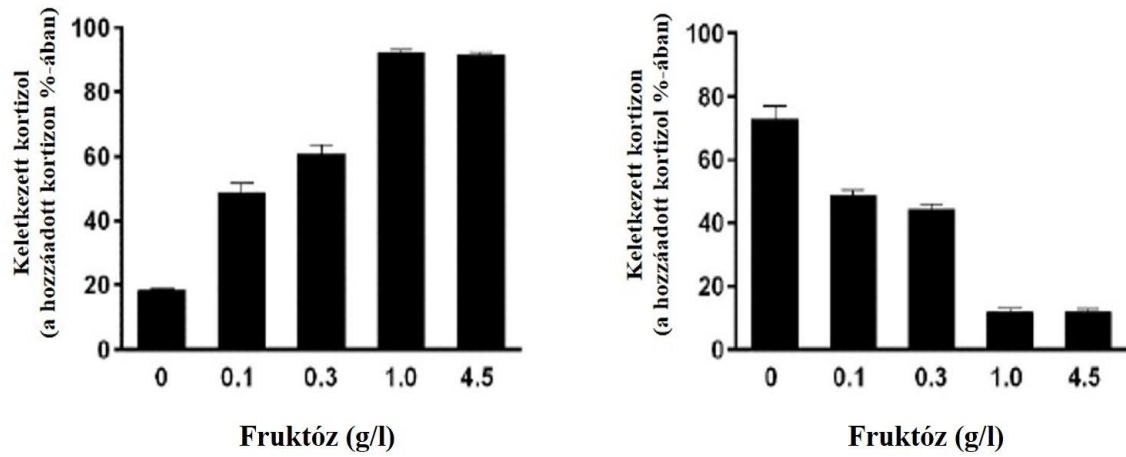
#### **4.10 A fruktóz hatása a 11 $\beta$ -HSD1 enzimaktivitásra**

Mivel korábbi tanulmányok alapján tudjuk, hogy az extracelluláris glukóz jelenlétében megnő a 11 $\beta$ -HSD1 enzim aktivitása (199), ezért kíváncsiak voltunk, hogy vajon fruktóz hatására is hasonló változásokat tapasztalunk-e. Ezen okból megmértük a 11 $\beta$ -HSD1 oxidoreduktáz és dehidrogenáz aktivitását különböző fruktóz-koncentrációjú médium hozzáadására HHH7 sejteken, melyek stabilan koexpresszálják a 11 $\beta$ -HSD1 és H6PDH enzimeket (15. ábra).

A HHH7 sejteket 0; 0,1; 0,3; 1 és 4,5 g/l koncentrációjú fruktózt tartalmazó médiumban inkubáltuk. Eredményeink alapján még 0,1 g/l fruktóz koncentráció is elégnek bizonyult, hogy az enzim oxidoreduktáz aktivitása fennmaradjon (50%-os volt a 4,5 g/l fruktózkoncentrációhoz viszonyítva).

Az enzim dehidrogenáz aktivitására a keletkezett kortizon mennyiségének méréséből következtethetünk. Ez szintén erős koncentráció-függést mutatott. Fruktóz jelenléte nélkül a hozzáadott kortizol csaknem 80%-a kortizonná alakult. Ez az átalakulás 4,5 g/l fruktózkoncentráció esetén 20% alatt ment végbe.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a fruktóz még a glukóznál is jobban hozzájárul az ER lumenében történő NADPH termeléshez.



15. ábra. Exogén fruktóz hatása a  $11\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1 enzimaktivitás szabályozására.  $11\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1 és hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimeket stabilan kifejező humán embrionikus vesesejteket (HHH7 sejt klón) inkubáltunk különböző fruktózkoncentrációjú médiumban 24 h-ig, ezt követően meghatároztuk a  $11\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1 oxidoreduktáz (bal oldali ábra) és dehidrogenáz (jobb oldali ábra) aktivitását. A növekvő fruktóz koncentráció hatására az enzimaktivitás a dehidrogenáz aktivitástól az oxidoreduktáz aktivitás irányába tolódott el. Az oszlopok négy független kísérletből származó eredmények átlagát  $\pm$  szórását ábrázolják.



## 5. Diskusszió

A vér glukózsztintjének fenntartása és szabályozása nélkülözhetetlen a gerincesek számára. Mára már tudományosan elfogadott nézet, hogy a máj és a vese mellett a vékonybélnek is van glukoneogenikus szerepe (218). Habár sok adatot ismerünk a különféle fajokból és kísérleti rendszerekből a G6Páz rendszer tagjainak jelenlétét és a nettó glukóztermelését illetően, ennek fiziológiai szerepét és folyamatát sok vita övezi (54). Az irodalmi eltérések feloldása valószínűleg a vizsgált fajok közötti táplálkozási szokások és étkezések különbségeiben keresendő (243).

Ezért célul tűztük ki, hogy újból megvizsgáljuk a G6Páz rendszert egy gyümölcssevő őssökkel rendelkező mindenevőben (ember), egy növényevő-gyümölcssevőben (tengerimalac) és egy növényevőben (patkány). Az általunk kimutatott fajok közötti nagy eltérések legalább részben megmagyarázzák az irodalom ellentmondásos eredményeit.

Összegezve az eredményeinket, a G6Páz és a G6PT jól detektálható volt mind az mRNS, mind a fehérje szintjén az emberek és a tengerimalacok vékonybél mikroszómáiban. Ebből adódóan a bél mikroszómális glukóztermelése a G6P hozzáadásakor szintén megfigyelhető volt, bár alacsonyabb szinten mint máj mikroszómák esetén. A bél G6Páz rendszer máj mikroszómákhoz képesti alacsonyabb aktivitása a rendszer komponenseinek alacsonyabb expressziós szintjének tulajdonítható. A G6Páz rendszer tulajdonságai (az intraluminális elhelyezkedés az ER-ben, a latencia és az intakt vezikulumok specifikitása) alapvetően megfeleltek a májban találhatóaknak. A tengerimalac bél mikroszómáiban azonban alacsonyabb enzimikus latenciát találtunk (15%), mint a tengerimalac máj mikroszóma mintákban, ami valószínűleg magasabb G6P-transzport kapacitásra utal, vagy nem-specifikus transzporterek jelenlétére a bél ER-ben. A bél mikroszómákban az alacsonyabb specifikus G6Páz-aktivitás magasabb nem-specifikus foszfohidroláz-aktivitással társult, amely valószínűleg a bélhámsejtek plazmamembránjához (kefeszegély) kapcsolódó nem-specifikus foszfatázoknak tulajdonítható (244, 245). Másrészt, patkányok vékonybél-mikroszómáiból hiányoznak a G6Páz rendszer elemei, és semmi, vagy nagyon alacsony olyan glukóztermelés volt megfigyelhető a G6P hozzáadásakor, melyet a G6Páz rendszer specifikus aktivitásának lehetett volna tulajdonítani.

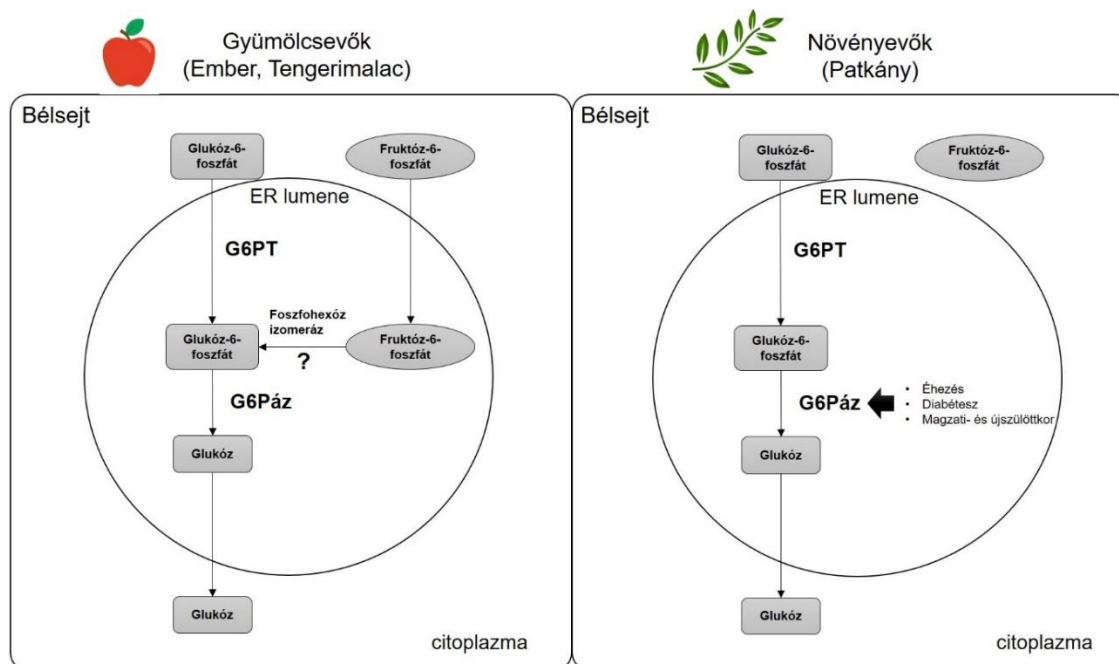
Az eredményeink kimutatták, hogy funkcionális G6Páz-zal rendelkező fajok bél-mikroszómái a F6P szubsztrát hozzáadása esetén képesek glukóztermelésre. Így felmerül a kérdés: mi állhat ennek a jelenségnek a hátterében? Az egyik lehetséges magyarázat a különböző étrend hatása a génexpresszió szabályozására. Régebbi tanulmányok kimutatták, hogy a magas fruktóztartalmú étrend indukálja a bél G6Páz rendszerét (245, 246). Egy nemrég megjelent cikk megerősítette, hogy magas fruktóztartalmú étrend határozottan indukálja a bélben a ChREBP- $\beta$  expresszióját (247, 248). A fruktózáról ismert, hogy aktiválja a ChREBP transzkripciós aktivitását a fokozott DNS-kötődés, a foszforiláció és az acetiláció révén (8). A bél ChREBP fehérje-szintje megemelkedett a magas fruktóztartalmú étrend hatására, és ezt a glukoneogenetikus enzimek expressziójának fokozódása kísérte (249). A ChREBP valóban képes néhány glukoneogenetikus enzim génjének a szabályozására, mint pl. a glukóz-6-foszfátáz katalitikus alegysége, a G6PT és fruktóz-1,6-biszfoszfátáz (250).

A fruktóz feltételezett induktív hatásával kapcsolatban meg kell említeni, hogy a F6P transzportot kutatócsoportunk már leírta máj mikroszómában; az ER lumenébe szállított F6P-ot egy foszfohexóz-izomeráz aktivitású enzim G6P-tá alakítja, ez az enzim a mai napig még ismeretlen (10). A tengerimalacokból és az emberekből izolált vékonybél mikroszómákon végzett kísérleteink azt mutatták, hogy ezek a mikroszómák szintén rendelkeznek egy ilyen útvonallal, mint a máj (14. ábra). Csábító feltételezni, hogy ez a fruktóz-glukóz-átalakításnak egy újonnan felfedezett útvonala a bélben, amely hozzájárul a fruktóz-függő glukoneogenezis indukációjához a gyümölcssevők vékonybelében.

Egy másik figyelembe veendő tény a rendszer szinte teljes hiánya a normál felnőtt patkányok bélrendszerében. A G6Páz rendszer különböző tagjainak jelenlétét és a glukóztermelést megfigyelték a vékonybélben különböző patofiziológiás körülmények között, melyek emelkedett glukóz szükséglettel járnak (éhezés, cukorbetegség, magzati / újszülöttkori időszak) (218, 251, 252). Felvetődött a patkány vékonybél lehetséges szerepe mint inzulin-érzékeny glukoneogenetikus szerv (253); a rendszer a táplálkozási szokásokra is érzékeny (254). Ennek ellenére glukóztermelés nehezen detektálható az egészséges patkányok vékonybelében normál táplálkozási körülmények között. Mivel a glukóztermelésnek nincsenek alternatív forrásai, úgy tűnik, hogy szükség van a G6Páz

rendszer tartós indukciójára a patkányok belében, és a normál körülményekhez való visszatérés a G6Páz rendszer szinte teljes eltűnésével jár.

Az eredményeink összhangban állnak a korábbi megfigyelésekkel a bélben történő fruktóz – glukóz átalakulással kapcsolatosan különböző fajokban (255, 256). Leírták, hogy a fruktóz átalakul glukózzá a tengerimalacok (és a nyulak) vékonybelében; a patkányok esetében ez a mechanizmus hiányzik, feltehetőleg a bél glukóz-6-foszfataz rendszerének a hiánya miatt. Következtetéseink szerint, feltehetően a glukóz-6-foszfataz rendszer jelenléte és a fruktóz – glukóz átalakulás a vékonybélben fajspecifikus és függhet a különböző fajok táplálkozási szokásaitól. Azoknak az emlősöknek, amelyek főként csak nagy mennyiségű gyümölcsöt fogyasztanak, hatékony rendszerre van szükségük a vékonybélben a fruktóz energiaforrásként történő felhasználásához, míg azoknál a fajoknál, amelyek elsősorban növényekből fedezik az energiaszükségletüket, ez a fruktóz-glukóz átalakító rendszer hiányozhat.



16. ábra. A gyümölcssevők és növényevők bélsejtjeinek feltételezett eltérő glukóz és fruktózmetabolizmusa. Míg gyümölcssevőknél a fruktóz fruktóz-6-foszfáttá, majd glukóz-6-foszfáttá alakulhat a G6Páz rendszeren keresztül, növényevők esetén feltehetően ez az átalakulás nem megy végbe, és a G6Páz rendszer is csak bizonyos állapotok fennállásakor pl. éhezés, diabétesz magzati/újszülött életkor indukálódhat. G6Páz = glukóz-6-foszfataz; G6PT = glukóz-6-foszfát transzporter

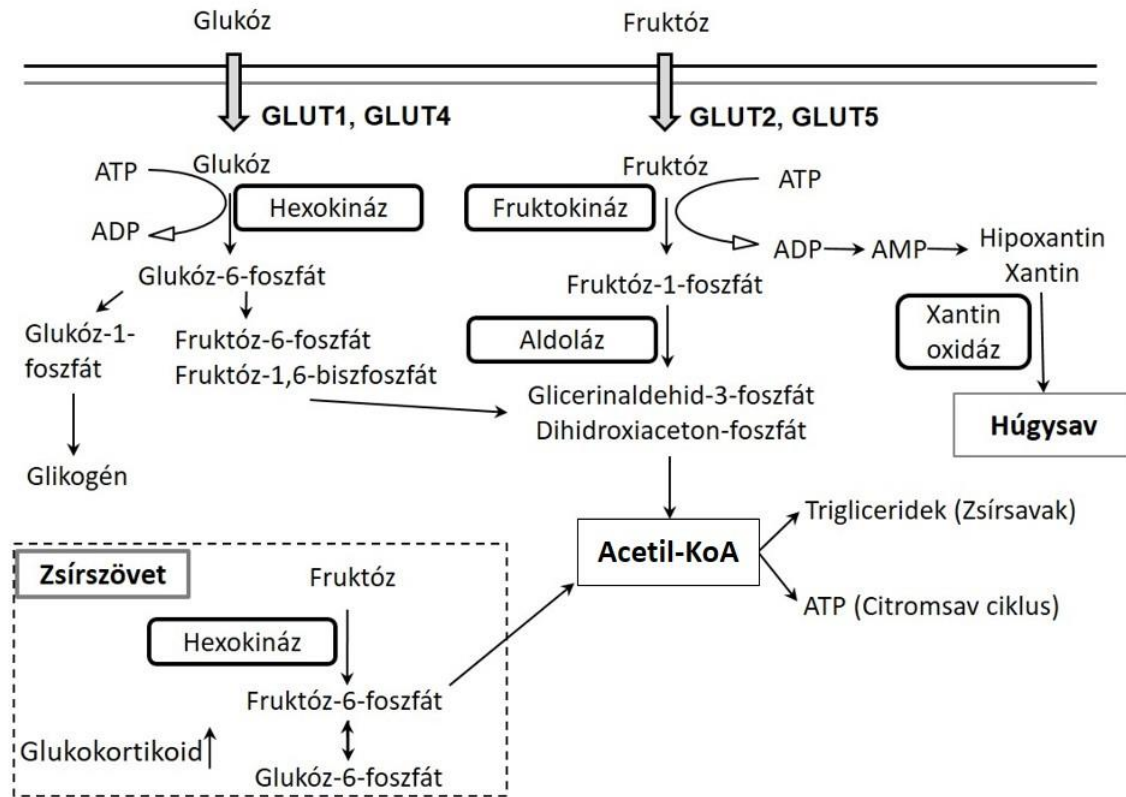
Azoknak a fajoknak a vékonybelében azonban, ahol a fruktóz-6-foszfát glukóz-6-foszfáttá történő átalakulása végbemegy, ez a H6PDH enzim számára is szubsztrátként szolgálhat, így elősegítve a lokális glukokortikoid termelést. Korábbi kísérletek során

patkány és sertés máj mikroszómát használva azt találták, hogy G6P és F6P hozzáadására a  $11\beta$ -HSD1 oxidoreduktáz aktivitása megnövekedett, de galaktóz-1-foszfát, glukóz-1-foszfát és fruktóz-1-foszfát hozzáadására ez az emelkedés nem következett be (203). Érdekes módon a G6P-vel ellentétben a F6P nem tudta növelni a  $11\beta$ -HSD1 oxidoreduktáz aktivitását sertés zsír mikroszómákban, de ennek a megfigyelésnek az oka továbbra is homályos. Kutatócsoportunk egy korábbi vizsgálatában kimutatta, hogy patkány máj- és zsírszövet mikroszómában a F6P hatékonyan indukálja a  $11\beta$ -HSD1 oxidoreduktáz aktivitását. Ez a tanulmány bizonyítékot szolgáltatott az F6P transzporter létezésére is az ER membránban, amely különbözik a G6P transzportertől. Szintén bizonyította egy ER-luminális F6P-izomeráz létezését, amely G6P-t képez a H6PDH-függő NADPH termeléshez (10). Ez a luminális F6P izomeráz különböző tulajdonságokkal rendelkezik, mint a citoplazmatikus megfelelője, mely arra utal, hogy különböző gének által kódolt fehérjékről van szó. A luminális F6P-izomerázt, valamint a 6-foszfoglukonát-dehidrogenázt kódoló gének azonosítása fontos lenne az energiaállapot-váltások és a  $11\beta$ -HSD1 mediált glukokortikoid aktiváció kapcsolatának jobb megértéséhez.

Amint az eddigiekből látható, mind a glukóz, mind a fruktóz jól hasznosítható a H6PDH- $11\beta$ -HSD1 rendszer szempontjából, felmerül azonban a kérdés, hogy vajon a glukóz vagy a fruktóz járul-e jobban hozzá a  $11\beta$ -HSD1-függő glukokortikoid aktiváció stimulálásához. Kísérleteink alapján egyértelműnek látszik, hogy a fruktóz az előnyben részesített forrása az ER luminális NADPH termelésnek.

Ennek oka elsődlegesen a glukóztól eltérő sejten belüli metabolizmusában keresendő. A fruktóz a májban fruktóz-1-foszfáttá metabolizálódik megkerülve a kulcsfontosságú glikolízist szabályozó enzimet, a foszfofruktokináz-1 enzimet. A fruktóz fő metabolizáló enzime a fruktokináz (ketoheksokináz, KHK), ami ATP felhasználásával foszforilálja a fruktózt fruktóz-1-foszfáttá. Így mentesül a citrát és az ATP visszacsatolós gátlása alól, vagyis a glukóz lebontásával ellentétben szabályozatlan, ráadásul annál gyorsabb folyamat. Így a túlzott fruktózfogyasztás az intracelluláris ATP-szint gyors kimerüléséhez, az AMP-deamináz aktivációjához és húgysavképződéshez vezet (17. ábra). Fruktóz lebontásakor a glicerín-3-foszfát és az acetyl-CoA folyamatos termelődése fokozza a májban a zsírsav szintézist. Az adipocitákban a fruktokináz hiánya miatt a fruktózt a hexonkináz metabolizálja fruktóz-6-foszfáttá, mely glukóz-6-foszfáttá

alakulhat, így elősegítve a glukokortikoidok termelődését a 11 $\beta$ -HSD1 aktivációján keresztül.



17. ábra. A glukóz és a fruktóz intracelluláris metabolizmusa.

A fruktóz intracelluláris metabolizmusa különbözik a glukózétól, mely a különböző transzportereknek és az első enzimatis lépéseknek köszönhető. ATP = adenozil-trifoszfát; ADP = adenozil-difoszfát; AMP = adenozil-monofoszfát; GLUT = glukóz transzporter

A másik logikus magyarázat a fruktóz hatékonyabb felhasználására az ER-luminális NADPH termeléséhez abból adódhat, hogy a fruktóz illetve a F6P transzportja előnyösebb a glukóz, illetve a G6P transzportjánál plazmamembránon illetve az ER membránján keresztül. A fruktóz a GLUT5 révén stimulálja saját felvételét a gén expressziójának szabályozásán keresztül, míg az adipociták legfontosabb glukóztranszportere, a GLUT4 csak hiperglikémiás körülmények között aktív. Az F6P és a G6P ER membránon keresztüli transzportjának sebességét még nem hasonlították össze, ezzel a kérdéssel remélhetőleg majd a jövőbeli kutatások fognak foglalkozni.

A fruktóz nem csupán a 11 $\beta$ -HSD1 oxidoreduktáz aktivitását serkenti azáltal, hogy növeli a luminális NADPH termelést, hanem befolyásolja a gén expresszióját is. Emelkedett 11 $\beta$ -HSD1 expressziót és aktivitást figyeltek meg olyan 3T3-L1

adipocitákban, amelyek médiuma csak fruktózt tartalmazott egyedüli szénhidrátforrásként glukóz helyett (200). A megnövekedett expresszió lehetséges magyarázata a C/EBP $\alpha$  C/EBP $\beta$ -hoz viszonyított arányának növekedése, mely transzkripciós faktorokról korábban leírták, hogy részt vesznek a 11 $\beta$ -HSD1 transzkripciós szabályozásában (257, 258). Ráadásul azok a 3T3-L1 adipociták, melyek fruktóztartalmú közegben differenciálódtak, fokozott GLUT5 expresszióval rendelkeztek, mely tovább fokozta a fruktóz felvételét és stimulálta a 11 $\beta$ -HSD1 expressziót és aktivitást. Ezenkívül a lipolízis indukálódott és fokozott perilipin foszforilációval, fokozott hormonszenzitív lipáz és adipocita triglicerid lipáz expresszióval, valamint a glicerol és a szabadzsírsavak megnövekedett felszabadulásával járt. Ezek alapján a fruktóz erősen stimulálja az adipocita differenciálódást, fokozva a helyi glukokortikoid aktivációt.

A fent leírt megfigyeléseket állatokon végzett kísérletek is alátámasztják. Egy *in vivo* kísérlet 9 hétig, 10 %-os fruktóz oldattal táplált Sprague Dawley patkányokkal megerősítette hipotézisünket, miszerint a fruktóz túlterhelés elősegíti a glukokortikoid termelést a 11 $\beta$ -HSD1 és H6PDH fokozott expressziója és aktivitása révén, további NADPH-val látva el a patkány epididimális fehér zsírszövetét (259). Fontos megjegyezni, hogy ezek a patkányok a MetS néhány tünetét is mutatták, mint például a hipertrigliceridémia és a hipertónia. Más kutatók kimutatták, hogy a patkányoknál a magas fruktóztartalmú étrend rövidebb, akár 24 órás expozíciója is már a 11 $\beta$ -HSD1 megemelkedett expresszióját eredményezte a májban és viscerális zsírszövetben (170). A 11 $\beta$ -HSD1, valamint a GR által szabályozott lipogén gének fokozott expressziója együtt járt az adipogenezis serkentésével a Wistar patkányokon végzett vizsgálatok alapján (169, 260, 261). Azok a hím patkányok, melyek mind a fruktózban gazdag étrendnek, mind krónikus, kiszámíthatatlan stressz hatásának voltak kitéve, a kortikoszteron szintjük enyhén emelkedett volt és magasabb 11 $\beta$ -HSD1 expresszióval rendelkeztek (de a H6PDH nem volt emelkedett, ellentétben az előző állatkísérlettel), és fokozott GR aktiváció volt megfigyelhető (169). Ezen kívül acetil-CoA-karboxiláz, a zsírsav-szintáz és a hormon-szenzitív lipáz expressziós szintjük is emelkedett volt. Ez arra utal, hogy a krónikus stressz tovább súlyosbítja a 11 $\beta$ -HSD1 fruktóz-mediált indukcióját és lokális glukokortikoid hatásait a lipolízisre és az adipogenezisre. Egy másik vizsgálatban az egereket 60 napig magas fruktóztartalmú táplálékkal etették,

melynek hatására megnövekedett a máj- és zsírszövet glukokortikoid szintje, valamint megemelkedett GR szintje a magban és a célgénjei aktiválódtak (262). A plazma szabad zsírsav, TG, inzulin és glukóz szintek megemelkedtek, a máj glikogénszintje lecsökkent. A GR antagonistá RU486-al történő kezelés csökkentette a plazma lipideket, a szöveti glukokortikoidszintet és a GR aktivációt, valamint célgénjeinek expresszióját. Továbbá, csökkent a zsírszöveti lipid akkumuláció és javult az inzulinérzékenység. Érdekes módon, a magas fruktóztartalmú étrend megnövekedett  $11\beta$ -HSD1, H6PDH és G6PT expressziót eredményezett a májban és a zsírszövetben.

Ezen kívül a Hes-1 anti-lipogén transzkripciós faktort leszábellyozta a megemelkedett GR aktivitás, miközben a PPAR $\gamma$ , CD36 és SREBP1-c expressziója fokozódott, magyarázva a megnövekedett szabadzsírsav és TG termelést. Ezek a megfigyelések alátámasztják, hogy magas a fruktózfogyasztás fokozza a  $11\beta$ -HSD1-H6PDH-G6PT triád expresszióját és aktivitását, és elősegíti a lokális GR aktivációt és a glukokortikoid-mediált lipolízist és adipogenezist. További vizsgálatok szükségesek annak felderítésére, hogy a  $11\beta$ -HSD1 szelektív gátlása megvédhet-e a magas fruktózfogyasztás káros metabolikus hatásaitól.

Ebben a tekintetben megvizsgálták, hogy mi történik a hím egerekkel 16 hetes ún. ALIOS (American Lifestyle-induced Obesity Syndrome) diéta után. Ez ad libitum táplálást jelent, melyben a kalória 45%-a zsírból áll, 11,6% transz-zsírokból és emellett 42 g /l HFCS-ből az ivóvízben. Ennek következtében az egerek elhíztak, inzulinrezisztencia, diszlipidémia és a nem alkoholos zsírmájbetegség (NAFLD) bizonyos fokozata alakult ki náluk (263). Meglepő módon a globális  $11\beta$ -HSD1 KO egerek sem voltak védve a metabolikus rendellenességekkel szemben a 16 hetes ALIOS diéta után. A glukokortikoidokról ismert, hogy elősegítik a szteatózist, többek között azért, hogy serkentik a lipolízist a zsírszövetben, és ez serkenti a szabadzsírsavak májba áramlását, ahol a *de novo* lipogenezis fokozódik (264-266). A  $11\beta$ -HSD1 KO egerek védettek voltak a szteatohepatitistól, amikor glukokortikoidokat kaptak az ivóvízükben, de csak standard diéta mellett (267). Ez a tanulmány kiemeli a zsírszöveti  $11\beta$ -HSD1 fontosságát és a máj fenotípusára gyakorolt hatását. Érdekes módon az ALIOS diéta a gyulladós betegség korai stádiumához vezetett gyulladós markerekkel, immunsejt beszivárgással és fibrózissal a  $11\beta$ -HSD1 KO egerekben, mely az alkoholmentes szteatohepatitiszre (NASH) való átmenet jele (263). Felvetődik a kérdés, hogy Larner és

mtsai tanulmányában a globális  $11\beta$ -HSD1 KO egerek miért nem voltak védettek az ALIOS diéta ellen [145], míg a  $11\beta$ -HSD1 KO egerek rezisztensek voltak az elhízás vagy stressz által kiváltott hiperglikémiára Kotelevtsev és mtsai tanulmányában. Az állatok fenntartásának, az étrendnek és a kezelés időtartamának különbségei némi magyarázattal szolgálhatnak. Meg kell jegyezni, hogy egész életen át tartó adaptáció a különböző kompenzációs mechanizmusok révén, ideértve a megnövekedett mellékvese glukokortikoid termelést, lehet az oka annak, hogy a  $11\beta$ -HSD1 KO egerek nem élveznek védeltséget a magas fruktóz- és zsírtartalmú étrend ellen. Azonban nincs kizárva, hogy a  $11\beta$ -HSD1 farmakológiai gátlószereinek használata, különösen a zsírszövetet célba véve, más eredményre vezetne.



## 6. Következtetések

Doktori munkám során arra kerestem választ, hogy a különböző fajok vékonybelében mérhető-e a G6Páz enzim aktivitás és ha igen, ez milyen mértékű? Továbbá kíváncsiak voltunk arra, hogy a májban már leírt fruktóz-glukóz átalakulás az ER lumenében megfigyelhető-e a különböző fajok vékonybelében is, illetve a fruktóz *in vitro* hogyan befolyásolja a lokális kortizoltermelést.

A kísérletek eredményei alapján az alábbi megállapításokat tehetjük:

1. A G6Páz rendszer aktivitása mérhetően jelen van ember és tengerimalac vékonybélből származó mikroszómákon, és nem lehet kimutatni patkány bél mikroszómán.
2. A rendszer tagjainak (G6PC, G6PT) expressziója jól detektálható mRNS és fehérje szinten ember és tengerimalac bélben, azonban patkány bélből származó mintákon ez jelentősen kisebb mértékű.
3. A humán és tengerimalac mikroszóma G6Páz aktivitása intraluminális, M6P (vagyis membránon nem átjutó) szubsztrát számára nem hozzáférhető.
4. A humán és tengerimalac bél G6Páz rendszere F6P-t is képes szubsztrátként hasznosítani.
5. A fruktóz *in vitro* befolyásolja a 11 $\beta$ -HSD1 aktivitását, mely a növekvő fruktóz koncentráció hatására a dehidrogenáz aktivitástól az oxidoreduktáz aktivitás irányába tolódott el.

Minden kísérlet tervezésekor figyelembe kell venni a fajspecifikus különbségeket. A fruktóz, valamint a glukokortikoid metabolizmus a rágcsálókban és az emberekben számos szempontból különbözik, és ideális esetben klinikai vizsgálatokat kellene végezni a kapcsolat jobb megértése érdekében.

## 7. Összefoglalás

A metabolikus szindróma századunk egyik legnagyobb egészségügyi problémájává nőtte ki magát az étrendi cukrok egyre növekvő mértékű fogyasztásának köszönhetően. Elsősorban a fruktóz felelős a metabolikus szindróma sok káros hatásáért, mivel magasabb lipogén tulajdonságai vannak, mint a glukóznak, és a metabolizmusa sem olyan szigorúan szabályozott. Kutatócsoportunk korábban patkánymáj mikroszómák alkalmazásával bizonyította, hogy az F6P bejut az endoplazmás retikulumba, ahol G6P-vá alakulva stimulálja a lokális kortizoltermelést. Ez egy mikroszomális F6P transzporter és egy luminalis hexóz-foszfát-izomeráz enzim létezését feltételezi; mindkét fehérje még azonosításra vár. A máj glukoneogenesisben betöltött szerepe már régóta ismert, azonban mai napig vita tárgyát képezi, hogy a vékonybél hogyan vesz részt a vércukorszint szabályozásában. Az endogén glukóztermelésért felelős fő enzim a glukóz-6-foszfátáz rendszer, amely a glukoneogenesis és a glikogenolízis közös utolsó lépését katalizálja. A különböző kísérleti állatokon végzett kísérletek azonban ellentmondásos eredményeket hoztak a glukóz-6-foszfátáz rendszer jelenlétét illetően a vékonybélben.

Ezért összehasonlítottuk három eltérő táplálkozású faj vékonybélét, és megállapítottuk, hogy a glukóz-6-foszfátáz rendszer nagymértékben expresszálódik tengerimalacokban és emberekben, míg a patkányokban nem. A fent említett fruktóz-6-foszfát transzporter – intraluminalis hexóz-izomeráz út aktivitása szintén jelen volt a tengerimalacok és az emberek bél mikroszómáiban. A máj mellett az adipociták is funkcionális G6PT–H6PDH–11 $\beta$ -HSD1 rendszerrel rendelkeznek, amely közvetlen kapcsolatot biztosít a fruktóz-anyagcsere és a lokális glukokortikoid aktivitás között. Ezért megvizsgáltuk, hogy a glukózzal összehasonlítva mennyi fruktóz szükséges a glukokortikoid aktivációhoz. Megállapítottuk, hogy ha fruktózt adtunk a HHH7 sejtek médiumához, az már alacsony koncentrációban is képes volt fenntartani a 11 $\beta$ -HSD1 oxidoreduktáz aktivitását. Tehát a fruktóz még hatékonyabban hozzájárul az ER intraluminalis NADPH termeléséhez, mint a glukóz.

Megállapíthatjuk, hogy a magas fruktózbevitel hátrányosan befolyásolja a metabolikus szindróma progresszióját, és a 11 $\beta$ -HSD1 szelektív gátlása zsírszövetben egy jó terápiás célpont lehet. Ezen kívül figyelembe kell venni a fajspecifikus különbségeket is.

## 8. Summary

Metabolic syndrome had emerged as one of the greatest health issue in our century, due to the increasing intake of dietary sugars. Mainly fructose is blamed for the adverse effects due to its higher lipogenic properties, and its loosely regulated metabolism. Our research group had previously proved using rat liver microsomes that F6P enters the endoplasmic reticulum, where it can stimulate cortisol-production after having been isomerized to G6P. This suppose the existence of a microsomal F6P transporter and a luminal hexose phosphate isomerase enzyme; both proteins remain to be identified. While the role of the liver in the gluconeogenesis had been well established, it was always a target of debates, how the small intestine is involved of in blood glucose control, especially during fasting or protein feeding. The main enzyme responsible for the endogenous glucose production is the glucose-6-phosphatase system, which catalyses the common terminal reaction of gluconeogenesis and glycogenolysis. However, observations gained in different experimental animals have given ambiguous results concerning the presence of the glucose-6-phosphatase system in the small intestine.

Therefore, we compared the small intestine of three species with different feeding behaviour, and found that the glucose-6-phosphatase system is highly expressed in guinea pigs and humans while poorly represented in rats. The activity of the above mentioned fructose-6-phosphate transporter–intraluminal hexose isomerase pathway was also present in intestinal microsomes of guinea pigs and humans.

Besides liver, adipocytes are also equipped with a functional G6PT—H6PDH—11 $\beta$ -HSD1 system, which provides a direct link between fructose metabolism and local glucocorticoid activation. We were also curious that in comparison with glucose, how much fructose is necessary for the glucocorticoid activation. We found that when we added fructose into cell culture of HHH7 cells, even at low concentration was efficient to maintain 11 $\beta$ -HSD1 oxidoreductase activity. So, fructose constitutes an even more efficient source of ER-luminal NADPH than glucose.

We could conclude that high fructose intake is also responsible to trigger the progression of the metabolic syndrome, and 11 $\beta$ -HSD1 inhibition might be a good target in adipose tissue. Furthermore, species-specific differences need to be considered.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Yan Y, Zhou Z, Kong F, Feng S, Li X, Sha Y, Zhang G, Liu H, Zhang H, Wang S, Hu C, Zhang X. (2016) Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery Suppresses Hepatic Gluconeogenesis and Increases Intestinal Gluconeogenesis in a T2DM Rat Model. *Obes Surg*, 26: 2683-2690.
2. Mithieux G, Rajas F, Gautier-Stein A. (2004) A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. *J Biol Chem*, 279: 44231-44234.
3. 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: 321-329.
4. Mutel E, Gautier-Stein A, Abdul-Wahed A, Amigo-Correig M, Zitoun C, Stefanutti A, Houberton I, Tourette JA, Mithieux G, Rajas F. (2011) Control of blood glucose in the absence of hepatic glucose production during prolonged fasting in mice: induction of renal and intestinal gluconeogenesis by glucagon. *Diabetes*, 60: 3121-3131.
5. Penhoat A, Fayard L, Stefanutti A, Mithieux G, Rajas F. (2014) Intestinal gluconeogenesis is crucial to maintain a physiological fasting glycemia in the absence of hepatic glucose production in mice. *Metabolism*, 63: 104-111.
6. Penhoat A, Mutel E, Amigo-Correig M, Pillot B, Stefanutti A, Rajas F, Mithieux G. (2011) Protein-induced satiety is abolished in the absence of intestinal gluconeogenesis. *Physiol Behav*, 105: 89-93.
7. Previs SF, Brunengraber DZ, Brunengraber H. (2009) Is there glucose production outside of the liver and kidney? *Annu Rev Nutr*, 29: 43-57.
8. Lee HJ, Cha JY. (2018) Recent insights into the role of ChREBP in intestinal fructose absorption and metabolism. *BMB Rep*, 51: 429-436.
9. Jang C, Hui S, Lu W, Cowan AJ, Morscher RJ, Lee G, Liu W, Tesz GJ, Birnbaum MJ, Rabinowitz JD. (2018) The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab*, 27: 351-361 e353.
10. Senesi S, Legeza B, Balazs Z, Csala M, Marcolongo P, Kereszturi E, Szelenyi P, Egger C, Fulceri R, Mandl J, Giunti R, Odermatt A, Banhegyi G, Benedetti A. (2010) Contribution of fructose-6-phosphate to glucocorticoid activation in the

- endoplasmic reticulum: possible implication in the metabolic syndrome. *Endocrinology*, 151: 4830-4839.
11. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr., International Diabetes Federation Task Force on E, Prevention, National Heart L, Blood I, American Heart A, World Heart F, International Atherosclerosis S, International Association for the Study of O. (2009) Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, 120: 1640-1645.
  12. Bjorndal B, Burri L, Staalesen V, Skorve J, Berge RK. (2011) Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J Obes*, 2011: 490650.
  13. Dragsbaek K, Neergaard JS, Laursen JM, Hansen HB, Christiansen C, Beck-Nielsen H, Karsdal MA, Brix S, Henriksen K. (2016) Metabolic syndrome and subsequent risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in elderly women: Challenging the current definition. *Medicine (Baltimore)*, 95: e4806.
  14. Gurka MJ, Filipp SL, DeBoer MD. (2018) Geographical variation in the prevalence of obesity, metabolic syndrome, and diabetes among US adults. *Nutr Diabetes*, 8: 14.
  15. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, Cavan D, Shaw JE, Makaroff LE. (2017) IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract*, 128: 40-50.
  16. Hanover LM, White JS. (1993) Manufacturing, composition, and applications of fructose. *Am J Clin Nutr*, 58: 724S-732S.
  17. Welsh JA, Sharma A, Abramson JL, Vaccarino V, Gillespie C, Vos MB. (2010) Caloric sweetener consumption and dyslipidemia among US adults. *JAMA*, 303: 1490-1497.

18. Basu S, Yoffe P, Hills N, Lustig RH. (2013) The relationship of sugar to population-level diabetes prevalence: an econometric analysis of repeated cross-sectional data. *PLoS One*, 8: e57873.
19. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, Johnson RJ, Abdelmalek MF. (2008) Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 48: 993-999.
20. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. (2004) Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*, 79: 537-543.
21. Ma J, McKeown NM, Hwang SJ, Hoffmann U, Jacques PF, Fox CS. (2016) Sugar-Sweetened Beverage Consumption Is Associated With Change of Visceral Adipose Tissue Over 6 Years of Follow-Up. *Circulation*, 133: 370-377.
22. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W, McGahan JP, Seibert A, Krauss RM, Chiu S, Schaefer EJ, Ai M, Otokozawa S, Nakajima K, Nakano T, Beysen C, Hellerstein MK, Berglund L, Havel PJ. (2009) Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest*, 119: 1322-1334.
23. 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: 899-906.
24. Ha V, Jayalath VH, Cozma AI, Mirrahimi A, de Souza RJ, Sievenpiper JL. (2013) Fructose-containing sugars, blood pressure, and cardiometabolic risk: a critical review. *Curr Hypertens Rep*, 15: 281-297.
25. Sievenpiper JL, de Souza RJ, Mirrahimi A, Yu ME, Carleton AJ, Beyene J, Chiavaroli L, Di Buono M, Jenkins AL, Leiter LA, Wolever TM, Kendall CW, Jenkins DJ. (2012) Effect of fructose on body weight in controlled feeding trials: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*, 156: 291-304.
26. Wang DD, Sievenpiper JL, de Souza RJ, Chiavaroli L, Ha V, Cozma AI, Mirrahimi A, Yu ME, Carleton AJ, Di Buono M, Jenkins AL, Leiter LA, Wolever

- TM, Beyene J, Kendall CW, Jenkins DJ. (2012) The effects of fructose intake on serum uric acid vary among controlled dietary trials. *J Nutr*, 142: 916-923.
27. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Tomita S, Sekiya M, Hasty A, Nakagawa Y, Sone H, Toyoshima H, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N. (2004) Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes*, 53: 560-569.
  28. Bantle JP, Raatz SK, Thomas W, Georgopoulos A. (2000) Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, 72: 1128-1134.
  29. Bantle JP, Swanson JE, Thomas W, Laine DC. (1992) Metabolic effects of dietary fructose in diabetic subjects. *Diabetes Care*, 15: 1468-1476.
  30. Stanhope KL, Havel PJ. (2008) Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*, 19: 16-24.
  31. Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. (2008) Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295: R1370-1375.
  32. Le KA, Faeh D, Stettler R, Ith M, Kreis R, Vermathen P, Boesch C, Ravussin E, Tappy L. (2006) A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr*, 84: 1374-1379.
  33. Le KA, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C, Boesch C, Tappy L. (2009) Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*, 89: 1760-1765.
  34. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM, Johnson RJ. (2006) A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290: F625-631.
  35. Bremer AA, Stanhope KL, Graham JL, Cummings BP, Wang W, Saville BR, Havel PJ. (2011) Fructose-fed rhesus monkeys: a nonhuman primate model of

- insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes. *Clin Transl Sci*, 4: 243-252.
36. Mandl J, Meszaros T, Banhegyi G, Hunyady L, Csala M. (2009) Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. *Trends Endocrinol Metab*, 20: 194-201.
  37. Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF. (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, 257: 1496-1502.
  38. Csala M, Banhegyi G, Benedetti A. (2006) Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment. *FEBS Lett*, 580: 2160-2165.
  39. Czegle I, Piccirella S, Senesi S, Csala M, Mandl J, Banhegyi G, Fulceri R, Benedetti A. (2006) Cooperativity between 11beta-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: 24-25.
  40. Arion WJ, Wallin BK, Lange AJ, Ballas LM. (1975) On the involvement of a glucose 6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose 6-phosphatase. *Mol Cell Biochem*, 6: 75-83.
  41. Pederson BA, Foster JD, Nordlie RC. (1998) Low-Km mannose-6-phosphatase as a criterion for microsomal integrity. *Biochem Cell Biol*, 76: 115-124.
  42. Lizak B, Szarka A, Kim Y, Choi KS, Nemeth CE, Marcolongo P, Benedetti A, Banhegyi G, Margittai E. (2019) Glucose Transport and Transporters in the Endomembranes. *Int J Mol Sci*, 20.
  43. Cori GT, Cori CF. (1952) Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *J Biol Chem*, 199: 661-667.
  44. Lei KJ, Shelly LL, Pan CJ, Sidbury JB, Chou JY. (1993) Mutations in the glucose-6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type 1a. *Science*, 262: 580-583.
  45. Itakura M, Yamashita N, Fujita T, Koide Y, Kugai N, Yamamura H, Yamashita K. (1984) A case of glycogen storage disease type I associated with an incomplete type of Fanconi syndrome; the protective role of lysosomal alpha 1,4-glucosidase and insulin deficiency against hypoglycemia. *Horm Metab Res*, 16 Suppl 1: 204-206.



46. Senior B, Loridan L. (1968) Functional differentiation of glycogenoses of the liver with respect to the use of glycerol. *N Engl J Med*, 279: 965-970.
47. Arion WJ, Wallin BK, Carlson PW, Lange AJ. (1972) The specificity of glucose 6-phosphatase of intact liver microsomes. *J Biol Chem*, 247: 2558-2565.
48. Nilsson OS, Arion WJ, Depierre JW, Dallner G, Ernster L. (1978) Evidence for the involvement of a glucose-6-phosphate carrier in microsomal glucose-6-phosphatase activity. *Eur J Biochem*, 82: 627-634.
49. Narisawa K, Igarashi Y, Otomo H, Tada K. (1978) A new variant of glycogen storage disease type I probably due to a defect in the glucose-6-phosphate transport system. *Biochem Biophys Res Commun*, 83: 1360-1364.
50. Lange AJ, Arion WJ, Beaudet AL. (1980) Type Ib glycogen storage disease is caused by a defect in the glucose-6-phosphate translocase of the microsomal glucose-6-phosphatase system. *J Biol Chem*, 255: 8381-8384.
51. Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, Moses SW, Chou JY. (1999) Inactivation of the glucose 6-phosphate transporter causes glycogen storage disease type 1b. *J Biol Chem*, 274: 5532-5536.
52. Dale DC, Bolyard AA, Marrero T, Kelley ML, Makaryan V, Tran E, Leung J, Boxer LA, Kishnani PS, Austin S, Wanner C, Ferrecchia IA, Khalaf D, Maze D, Kurtzberg J, Zeidler C, Welte K, Weinstein DA. (2019) Neutropenia in glycogen storage disease Ib: outcomes for patients treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*, 26: 16-21.
53. Veiga-da-Cunha M, Gerin I, Chen YT, Lee PJ, Leonard JV, Maire I, Wendel U, Vikkula M, Van Schaftingen E. (1999) The putative glucose 6-phosphate translocase gene is mutated in essentially all cases of glycogen storage disease type I non-a. *Eur J Hum Genet*, 7: 717-723.
54. Marcolongo P, Fulceri R, Gamberucci A, Czegle I, Banhegyi G, Benedetti A. (2013) Multiple roles of glucose-6-phosphatases in pathophysiology: state of the art and future trends. *Biochim Biophys Acta*, 1830: 2608-2618.
55. Chou JY, Mansfield BC. (2007) Gene therapy for type I glycogen storage diseases. *Curr Gene Ther*, 7: 79-88.
56. van Schaftingen E, Gerin I. (2002) The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J*, 362: 513-532.

57. Pan CJ, Lei KJ, Annabi B, Hemrika W, Chou JY. (1998) Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem*, 273: 6144-6148.
58. Wang Y, Martin CC, Oeser JK, Sarkar S, McGuinness OP, Hutton JC, O'Brien RM. (2007) Deletion of the gene encoding the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein autoantigen results in a mild metabolic phenotype. *Diabetologia*, 50: 774-778.
59. Martin CC, Bischof LJ, Bergman B, Hornbuckle LA, Hilliker C, Frigeri C, Wahl D, Svitek CA, Wong R, Goldman JK, Oeser JK, Lepretre F, Froguel P, O'Brien RM, Hutton JC. (2001) Cloning and characterization of the human and rat islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP) genes. *J Biol Chem*, 276: 25197-25207.
60. Kuijpers TW, Maiani NA, Tool AT, Smit GP, Rake JP, Roos D, Visser G. (2003) Apoptotic neutrophils in the circulation of patients with glycogen storage disease type 1b (GSD1b). *Blood*, 101: 5021-5024.
61. Jun HS, Weinstein DA, Lee YM, Mansfield BC, Chou JY. (2014) Molecular mechanisms of neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type 1b. *Blood*, 123: 2843-2853.
62. Veiga-da-Cunha M, Chevalier N, Stephenne X, Defour JP, Paczia N, Ferster A, Achouri Y, Dewulf JP, Linster CL, Bommer GT, Van Schaftingen E. (2019) Failure to eliminate a phosphorylated glucose analog leads to neutropenia in patients with G6PT and G6PC3 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 1241-1250.
63. Brody LC, Abel KJ, Castilla LH, Couch FJ, McKinley DR, Yin G, Ho PP, Merajver S, Chandrasekharappa SC, Xu J, et al. (1995) Construction of a transcription map surrounding the BRCA1 locus of human chromosome 17. *Genomics*, 25: 238-247.
64. Dogra RS, Vaidyanathan P, Prabakar KR, Marshall KE, Hutton JC, Pugliese A. (2006) Alternative splicing of G6PC2, the gene coding for the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP), results in differential expression in human thymus and spleen compared with pancreas. *Diabetologia*, 49: 953-957.

65. Martin CC, Oeser JK, Svitek CA, Hunter SI, Hutton JC, O'Brien RM. (2002) Identification and characterization of a human cDNA and gene encoding a ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *J Mol Endocrinol*, 29: 205-222.
66. Pan CJ, Chen SY, Jun HS, Lin SR, Mansfield BC, Chou JY. (2011) SLC37A1 and SLC37A2 are phosphate-linked, glucose-6-phosphate antiporters. *PLoS One*, 6: e23157.
67. Hutton JC, O'Brien RM. (2009) Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family. *J Biol Chem*, 284: 29241-29245.
68. Shieh JJ, Pan CJ, Mansfield BC, Chou JY. (2004) The islet-specific glucose-6-phosphatase-related protein, implicated in diabetes, is a glycoprotein embedded in the endoplasmic reticulum membrane. *FEBS Lett*, 562: 160-164.
69. Guionie O, Clottes E, Stafford K, Burchell A. (2003) Identification and characterisation of a new human glucose-6-phosphatase isoform. *FEBS Lett*, 551: 159-164.
70. Ghosh A, Shieh JJ, Pan CJ, Chou JY. (2004) Histidine 167 is the phosphate acceptor in glucose-6-phosphatase-beta forming a phosphohistidine enzyme intermediate during catalysis. *J Biol Chem*, 279: 12479-12483.
71. Petrolonis AJ, Yang Q, Tummino PJ, Fish SM, Prack AE, Jain S, Parsons TF, Li P, Dales NA, Ge L, Langston SP, Schuller AG, An WF, Tartaglia LA, Chen H, Hong SB. (2004) Enzymatic characterization of the pancreatic islet-specific glucose-6-phosphatase-related protein (IGRP). *J Biol Chem*, 279: 13976-13983.
72. Shieh JJ, Pan CJ, Mansfield BC, Chou JY. (2004) A potential new role for muscle in blood glucose homeostasis. *J Biol Chem*, 279: 26215-26219.
73. Froissart R, Piraud M, Boudjemline AM, Vianey-Saban C, Petit F, Hubert-Buron A, Eberschweiler PT, Gajdos V, Labrune P. (2011) Glucose-6-phosphatase deficiency. *Orphanet J Rare Dis*, 6: 27.
74. Chou JY, Matern D, Mansfield BC, Chen YT. (2002) Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex. *Curr Mol Med*, 2: 121-143.

75. Efendic S, Karlander S, Vranic M. (1988) Mild type II diabetes markedly increases glucose cycling in the postabsorptive state and during glucose infusion irrespective of obesity. *J Clin Invest*, 81: 1953-1961.
76. Agius L. (2007) New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 21: 587-605.
77. Lieberman SM, Evans AM, Han B, Takaki T, Vinnitskaya Y, Caldwell JA, Serreze DV, Shabanowitz J, Hunt DF, Nathenson SG, Santamaria P, DiLorenzo TP. (2003) Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 8384-8388.
78. Han B, Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Maree AF, Edelstein-Keshet L, Santamaria P. (2005) Prevention of diabetes by manipulation of anti-IGRP autoimmunity: high efficiency of a low-affinity peptide. *Nat Med*, 11: 645-652.
79. Vincent BG, Young EF, Buntzman AS, Stevens R, Kepler TB, Tisch RM, Frelinger JA, Hess PR. (2010) Toxin-coupled MHC class I tetramers can specifically ablate autoreactive CD8+ T cells and delay diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 184: 4196-4204.
80. Yang J, Danke NA, Berger D, Reichstetter S, Reijonen H, Greenbaum C, Pihoker C, James EA, Kwok WW. (2006) Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein-reactive CD4+ T cells in human subjects. *J Immunol*, 176: 2781-2789.
81. Krishnamurthy B, Dudek NL, McKenzie MD, Purcell AW, Brooks AG, Gellert S, Colman PG, Harrison LC, Lew AM, Thomas HE, Kay TW. (2006) Responses against islet antigens in NOD mice are prevented by tolerance to proinsulin but not IGRP. *J Clin Invest*, 116: 3258-3265.
82. Oeser JK, Parekh VV, Wang Y, Jegadeesh NK, Sarkar SA, Wong R, Lee CE, Pound LD, Hutton JC, Van Kaer L, O'Brien RM. (2011) Deletion of the G6pc2 gene encoding the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein does not affect the progression or incidence of type 1 diabetes in NOD/ShiLtJ mice. *Diabetes*, 60: 2922-2927.
83. DiLorenzo TP. (2011) Multiple antigens versus single major antigen in type 1 diabetes: arguing for multiple antigens. *Diabetes Metab Res Rev*, 27: 778-783.

84. Bouatia-Naji N, Rocheleau G, Van Lommel L, Lemaire K, Schuit F, Cavalcanti-Proenca C, Marchand M, Hartikainen AL, Sovio U, De Graeve F, Rung J, Vaxillaire M, Tichet J, Marre M, Balkau B, Weill J, Elliott P, Jarvelin MR, Meyre D, Polychronakos C, Dina C, Sladek R, Froguel P. (2008) A polymorphism within the G6PC2 gene is associated with fasting plasma glucose levels. *Science*, 320: 1085-1088.
85. Chen WM, Erdos MR, Jackson AU, Saxena R, Sanna S, Silver KD, Timpson NJ, Hansen T, Orru M, Grazia Piras M, Bonnycastle LL, Willer CJ, Lyssenko V, Shen H, Kuusisto J, Ebrahim S, Sestu N, Duren WL, Spada MC, Stringham HM, Scott LJ, Olla N, Swift AJ, Najjar S, Mitchell BD, Lawlor DA, Smith GD, Ben-Shlomo Y, Andersen G, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Saramies J, Valle TT, Buchanan TA, Shuldiner AR, Lakatta E, Bergman RN, Uda M, Tuomilehto J, Pedersen O, Cao A, Groop L, Mohlke KL, Laakso M, Schlessinger D, Collins FS, Altshuler D, Abecasis GR, Boehnke M, Scuteri A, Watanabe RM. (2008) Variations in the G6PC2/ABCB11 genomic region are associated with fasting glucose levels. *J Clin Invest*, 118: 2620-2628.
86. Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N, Thorleifsson G, Loos RJ, Manning AK, Jackson AU, Aulchenko Y, Potter SC, Erdos MR, Sanna S, Hottenga JJ, Wheeler E, Kaakinen M, Lyssenko V, Chen WM, Ahmadi K, Beckmann JS, Bergman RN, Bochud M, Bonnycastle LL, Buchanan TA, Cao A, Cervino A, Coin L, Collins FS, Crisponi L, de Geus EJ, Dehghan A, Deloukas P, Doney AS, Elliott P, Freimer N, Gateva V, Herder C, Hofman A, Hughes TE, Hunt S, Illig T, Inouye M, Isomaa B, Johnson T, Kong A, Krestyaninova M, Kuusisto J, Laakso M, Lim N, Lindblad U, Lindgren CM, McCann OT, Mohlke KL, Morris AD, Naitza S, Orru M, Palmer CN, Pouta A, Randall J, Rathmann W, Saramies J, Scheet P, Scott LJ, Scuteri A, Sharp S, Sijbrands E, Smit JH, Song K, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Tuomi T, Tuomilehto J, Uitterlinden AG, Voight BF, Waterworth D, Wichmann HE, Willemsen G, Witteman JC, Yuan X, Zhao JH, Zeggini E, Schlessinger D, Sandhu M, Boomsma DI, Uda M, Spector TD, Penninx BW, Altshuler D, Vollenweider P, Jarvelin MR, Lakatta E, Waeber G, Fox CS, Peltonen L, Groop LC, Mooser V, Cupples LA, Thorsteinsdottir U, Boehnke M, Barroso I, Van Duijn C, Dupuis J, Watanabe RM, Stefansson K,

- McCarthy MI, Wareham NJ, Meigs JB, Abecasis GR. (2009) Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet*, 41: 77-81.
87. Reiling E, van 't Riet E, Groenewoud MJ, Welschen LM, van Hove EC, Nijpels G, Maassen JA, Dekker JM, t Hart LM. (2009) Combined effects of single-nucleotide polymorphisms in GCK, GCKR, G6PC2 and MTNR1B on fasting plasma glucose and type 2 diabetes risk. *Diabetologia*, 52: 1866-1870.
88. Rose CS, Grarup N, Krarup NT, Poulsen P, Wegner L, Nielsen T, Banasik K, Faerch K, Andersen G, Albrechtsen A, Borch-Johnsen K, Clausen JO, Jorgensen T, Vaag A, Pedersen O, Hansen T. (2009) A variant in the G6PC2/ABCB11 locus is associated with increased fasting plasma glucose, increased basal hepatic glucose production and increased insulin release after oral and intravenous glucose loads. *Diabetologia*, 52: 2122-2129.
89. Dos Santos C, Bougneres P, Fradin D. (2009) A single-nucleotide polymorphism in a methylatable Foxa2 binding site of the G6PC2 promoter is associated with insulin secretion in vivo and increased promoter activity in vitro. *Diabetes*, 58: 489-492.
90. Kelliny C, Ekelund U, Andersen LB, Brage S, Loos RJ, Wareham NJ, Langenberg C. (2009) Common genetic determinants of glucose homeostasis in healthy children: the European Youth Heart Study. *Diabetes*, 58: 2939-2945.
91. Li X, Shu YH, Xiang AH, Trigo E, Kuusisto J, Hartiala J, Swift AJ, Kawakubo M, Stringham HM, Bonnycastle LL, Lawrence JM, Laakso M, Allayee H, Buchanan TA, Watanabe RM. (2009) Additive effects of genetic variation in GCK and G6PC2 on insulin secretion and fasting glucose. *Diabetes*, 58: 2946-2953.
92. Boztug K, Appaswamy G, Ashikov A, Schaffer AA, Salzer U, Diestelhorst J, Germeshausen M, Brandes G, Lee-Gossler J, Noyan F, Gatzke AK, Minkov M, Greil J, Kratz C, Petropoulou T, Pellier I, Bellanne-Chantelot C, Rezaei N, Monkemoller K, Irani-Hakimeh N, Bakker H, Gerardy-Schahn R, Zeidler C, Grimbacher B, Welte K, Klein C. (2009) A syndrome with congenital neutropenia and mutations in G6PC3. *N Engl J Med*, 360: 32-43.

93. Arostegui JI, de Toledo JS, Pascal M, Garcia C, Yague J, Diaz de Heredia C. (2009) A novel G6PC3 homozygous 1-bp deletion as a cause of severe congenital neutropenia. *Blood*, 114: 1718-1719.
94. Boztug K, Rosenberg PS, Dorda M, Banka S, Moulton T, Curtin J, Rezaei N, Corns J, Innis JW, Avci Z, Tran HC, Pellier I, Pierani P, Fruge R, Parvaneh N, Mamishi S, Mody R, Darbyshire P, Motwani J, Murray J, Buchanan GR, Newman WG, Alter BP, Boxer LA, Donadieu J, Welte K, Klein C. (2012) Extended spectrum of human glucose-6-phosphatase catalytic subunit 3 deficiency: novel genotypes and phenotypic variability in severe congenital neutropenia. *J Pediatr*, 160: 679-683 e672.
95. Banka S, Chervinsky E, Newman WG, Crow YJ, Yeganeh S, Yacobovich J, Donnai D, Shalev S. (2011) Further delineation of the phenotype of severe congenital neutropenia type 4 due to mutations in G6PC3. *Eur J Hum Genet*, 19: 18-22.
96. Banka S, Wynn R, Newman WG. (2011) Variability of bone marrow morphology in G6PC3 mutations: is there a genotype-phenotype correlation or age-dependent relationship? *Am J Hematol*, 86: 235-237.
97. McDermott DH, De Ravin SS, Jun HS, Liu Q, Priel DA, Noel P, Takemoto CM, Ojode T, Paul SM, Dunsmore KP, Hilligoss D, Marquesen M, Ulrick J, Kuhns DB, Chou JY, Malech HL, Murphy PM. (2010) Severe congenital neutropenia resulting from G6PC3 deficiency with increased neutrophil CXCR4 expression and myelokathexis. *Blood*, 116: 2793-2802.
98. Smith BN, Evans C, Ali A, Ancliff PJ, Hayee B, Segal AW, Hall G, Kaya Z, Shakoori AR, Linch DC, Gale RE. (2012) Phenotypic heterogeneity and evidence of a founder effect associated with G6PC3 mutations in patients with severe congenital neutropenia. *Br J Haematol*, 158: 146-149.
99. Gerin I, Veiga-da-Cunha M, Achouri Y, Collet JF, Van Schaftingen E. (1997) Sequence of a putative glucose 6-phosphate translocase, mutated in glycogen storage disease type Ib. *FEBS Lett*, 419: 235-238.
100. Lin B, Pan CJ, Chou JY. (2000) Human variant glucose-6-phosphate transporter is active in microsomal transport. *Hum Genet*, 107: 526-529.

101. Senesi S, Marcolongo P, Kardon T, Bucci G, Sukhodub A, Burchell A, Benedetti A, Fulceri R. (2005) Immunodetection of the expression of microsomal proteins encoded by the glucose 6-phosphate transporter gene. *Biochem J*, 389: 57-62.
102. Pan CJ, Chen SY, Lee S, Chou JY. (2009) Structure-function study of the glucose-6-phosphate transporter, an eukaryotic antiporter deficient in glycogen storage disease type Ib. *Mol Genet Metab*, 96: 32-37.
103. Chen LY, Lin B, Pan CJ, Hiraiwa H, Chou JY. (2000) Structural requirements for the stability and microsomal transport activity of the human glucose 6-phosphate transporter. *J Biol Chem*, 275: 34280-34286.
104. Fulceri R, Bellomo G, Gamberucci A, Scott HM, Burchell A, Benedetti A. (1992) Permeability of rat liver microsomal membrane to glucose 6-phosphate. *Biochem J*, 286 ( Pt 3): 813-817.
105. 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: 1693-1698.
106. Chen SY, Pan CJ, Nandigama K, Mansfield BC, Ambudkar SV, Chou JY. (2008) The glucose-6-phosphate transporter is a phosphate-linked antiporter deficient in glycogen storage disease type Ib and Ic. *FASEB J*, 22: 2206-2213.
107. Marcolongo P, Fulceri R, Giunti R, Margittai E, Banhegyi G, Benedetti A. (2012) The glucose-6-phosphate transport is not mediated by a glucose-6-phosphate/phosphate exchange in liver microsomes. *FEBS Lett*, 586: 3354-3359.
108. Chen SY, Pan CJ, Lee S, Peng W, Chou JY. (2008) Functional analysis of mutations in the glucose-6-phosphate transporter that cause glycogen storage disease type Ib. *Mol Genet Metab*, 95: 220-223.
109. Arion WJ, Lange AJ, Walls HE, Ballas LM. (1980) Evidence for the participation of independent translocation for phosphate and glucose 6-phosphate in the microsomal glucose-6-phosphatase system. Interactions of the system with orthophosphate, inorganic pyrophosphate, and carbamyl phosphate. *J Biol Chem*, 255: 10396-10406.
110. Csala M, Senesi S, Banhegyi G, Mandl J, Benedetti A. (2005) Characterization of sulfate transport in the hepatic endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys*, 440: 173-180.



111. Villa-Bellosta R, Levi M, Sorribas V. (2009) Vascular smooth muscle cell calcification and SLC20 inorganic phosphate transporters: effects of PDGF, TNF-alpha, and Pi. *Pflugers Arch*, 458: 1151-1161.
112. Laver DR, Lenz GK, Dulhunty AF. (2001) Phosphate ion channels in sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *J Physiol*, 535: 715-728.
113. 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: 1325-1341.
114. McMullen DC, Kean WS, Verma A, Cole JT, Watson WD. (2012) A microplate technique to simultaneously assay calcium accumulation in endoplasmic reticulum and SERCA release of inorganic phosphate. *Biol Proced Online*, 14: 4.
115. Melis D, Havelaar AC, Verbeek E, Smit GP, Benedetti A, Mancini GM, Verheijen F. (2004) NPT4, a new microsomal phosphate transporter: mutation analysis in glycogen storage disease type Ic. *J Inherit Metab Dis*, 27: 725-733.
116. Marcolongo P, Fulceri R, Giunti R, Burchell A, Benedetti A. (1996) Permeability of liver microsomal membranes to glucose. *Biochem Biophys Res Commun*, 219: 916-922.
117. Banhegyi G, Marcolongo P, Burchell A, Benedetti A. (1998) Heterogeneity of glucose transport in rat liver microsomal vesicles. *Arch Biochem Biophys*, 359: 133-138.
118. Fehr M, Takanaga H, Ehrhardt DW, Frommer WB. (2005) Evidence for high-capacity bidirectional glucose transport across the endoplasmic reticulum membrane by genetically encoded fluorescence resonance energy transfer nanosensors. *Mol Cell Biol*, 25: 11102-11112.
119. Le Gall S, Neuhof A, Rapoport T. (2004) The endoplasmic reticulum membrane is permeable to small molecules. *Mol Biol Cell*, 15: 447-455.
120. Lizak B, Czeglé 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: C511-517.
121. Roy A, Wonderlin WF. (2003) The permeability of the endoplasmic reticulum is dynamically coupled to protein synthesis. *J Biol Chem*, 278: 4397-4403.

122. Guillam MT, Burcelin R, Thorens B. (1998) Normal hepatic glucose production in the absence of GLUT2 reveals an alternative pathway for glucose release from hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 12317-12321.
123. Takanaga H, Frommer WB. (2010) Facilitative plasma membrane transporters function during ER transit. *FASEB J*, 24: 2849-2858.
124. Santer R, Groth S, Kinner M, Dombrowski A, Berry GT, Brodehl J, Leonard JV, Moses S, Norgren S, Skovby F, Schneppenheim R, Steinmann B, Schaub J. (2002) The mutation spectrum of the facilitative glucose transporter gene SLC2A2 (GLUT2) in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Hum Genet*, 110: 21-29.
125. Beutler E, Morrison M. (1967) Localization and characteristics of hexose 6-phosphate dehydrogenase (glucose dehydrogenase). *J Biol Chem*, 242: 5289-5293.
126. Zielinska AE, Fletcher RS, Sherlock M, Doig CL, Lavery GG. (2017) Cellular and genetic models of H6PDH and 11beta-HSD1 function in skeletal muscle. *Cell Biochem Funct*, 35: 269-277.
127. Gomez-Sanchez EP, Romero DG, de Rodriguez AF, Warden MP, Krozowski Z, Gomez-Sanchez CE. (2008) Hexose-6-phosphate dehydrogenase and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 tissue distribution in the rat. *Endocrinology*, 149: 525-533.
128. Bujalska IJ, Draper N, Michailidou Z, Tomlinson JW, White PC, Chapman KE, Walker EA, Stewart PM. (2005) Hexose-6-phosphate dehydrogenase confers oxo-reductase activity upon 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Mol Endocrinol*, 34: 675-684.
129. Odermatt A, Klusonova P. (2015) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1: Regeneration of active glucocorticoids is only part of the story. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 151: 85-92.
130. Atanasov AG, Nashev LG, Schweizer RA, Frick C, Odermatt A. (2004) Hexose-6-phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as an oxoreductase. *FEBS Lett*, 571: 129-133.
131. Atanasov AG, Nashev LG, Gelman L, Legeza B, Sack R, Portmann R, Odermatt A. (2008) Direct protein-protein interaction of 11beta-hydroxysteroid

- dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum lumen. *Biochim Biophys Acta*, 1783: 1536-1543.
132. Odermatt A, Atanasov AG, Balazs Z, Schweizer RA, Nashev LG, Schuster D, Langer T. (2006) Why is 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 facing the endoplasmic reticulum lumen? Physiological relevance of the membrane topology of 11beta-HSD1. *Mol Cell Endocrinol*, 248: 15-23.
  133. Rask E, Walker BR, Soderberg S, Livingstone DE, Eliasson M, Johnson O, Andrew R, Olsson T. (2002) Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 3330-3336.
  134. 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: 1418-1421.
  135. Stewart PM, Boulton A, Kumar S, Clark PM, Shackleton CH. (1999) Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone-->cortisol conversion in subjects with central adiposity. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 1022-1027.
  136. Westerbacka J, Yki-Jarvinen H, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Andrew R, Wake DJ, Seckl JR, Walker BR. (2003) Body fat distribution and cortisol metabolism in healthy men: enhanced 5beta-reductase and lower cortisol/cortisone metabolite ratios in men with fatty liver. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 4924-4931.
  137. Alberti L, Girola A, Gilardini L, Conti A, Cattaldo S, Micheletto G, Invitti C. (2007) Type 2 diabetes and metabolic syndrome are associated with increased expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 in obese subjects. *Int J Obes (Lond)*, 31: 1826-1831.
  138. Konopelska S, Kienitz T, Hughes B, Pirlich M, Bauditz J, Lochs H, Strasburger CJ, Stewart PM, Quinkler M. (2009) Hepatic 11beta-HSD1 mRNA expression in fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 70: 554-560.
  139. 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: 2166-2170.
  140. Wang Y, Liu L, Du H, Nagaoka Y, Fan W, Lutfy K, Friedman TC, Jiang M, Liu Y. (2014) Transgenic overexpression of hexose-6-phosphate dehydrogenase in

- adipose tissue causes local glucocorticoid amplification and lipolysis in male mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 306: E543-551.
141. Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmoll D, Jamieson P, Best R, Brown R, Edwards CR, Seckl JR, Mullins JJ. (1997) 11beta-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: 14924-14929.
  142. Semjonous NM, Sherlock M, Jeyasuria P, Parker KL, Walker EA, Stewart PM, Lavery GG. (2011) Hexose-6-phosphate dehydrogenase contributes to skeletal muscle homeostasis independent of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Endocrinology*, 152: 93-102.
  143. 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: 6100-6106.
  144. Bujalska IJ, Hewitt KN, Hauton D, Lavery GG, Tomlinson JW, Walker EA, Stewart PM. (2008) Lack of hexose-6-phosphate dehydrogenase impairs lipid mobilization from mouse adipose tissue. *Endocrinology*, 149: 2584-2591.
  145. Abrahams L, Semjonous NM, Guest P, Zielinska A, Hughes B, Lavery GG, Stewart PM. (2012) Biomarkers of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in mice lacking 11beta-HSD1 and H6PDH. *J Endocrinol*, 214: 367-372.
  146. Walker EA, Ahmed A, Lavery GG, Tomlinson JW, Kim SY, Cooper MS, Ride JP, Hughes BA, Shackleton CHL, McKiernan P, Elias E, Chou JY, Stewart PM. (2007) 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Regulation by Intracellular Glucose 6-Phosphate Provides Evidence for a Novel Link between Glucose Metabolism and Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Function. *J Biol Chem*, 282: 27030-27036.
  147. Huang Y, Li X, Lin H, Chu Y, Chen B, Lian Q, Ge RS. (2010) Regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 by IGF-1 in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 391: 1752-1756.
  148. Liu Y, Nakagawa Y, Wang Y, Li R, Li X, Ohzeki T, Friedman TC. (2003) Leptin activation of corticosterone production in hepatocytes may contribute to the

- reversal of obesity and hyperglycemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Diabetes*, 52: 1409-1416.
149. Wang Y, Nakagawa Y, Liu L, Wang W, Ren X, Anghel A, Lutfy K, Friedman TC, Liu Y. (2011) Tissue-specific dysregulation of hexose-6-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate transporter production in db/db mice as a model of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 54: 440-450.
  150. Yao F, Chen L, Fan Z, Teng F, Zhao Y, Guan F, Zhang M, Liu Y. (2017) Interplay between H6PDH and 11beta-HSD1 implicated in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Bioorg Med Chem Lett*, 27: 4107-4113.
  151. Hyatt T, Chen R, Wang X, Mick G, McCormick K. (2010) Effect of diabetes on enzymes involved in rat hepatic corticosterone production. *J Diabetes*, 2: 275-281.
  152. Fan Z, Du H, Zhang M, Meng Z, Chen L, Liu Y. (2011) Direct regulation of glucose and not insulin on hepatic hexose-6-phosphate dehydrogenase and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Mol Cell Endocrinol*, 333: 62-69.
  153. Balazs Z, Nashev LG, Chandsawangbhuwana C, Baker ME, Odermatt A. (2009) Hexose-6-phosphate dehydrogenase modulates the effect of inhibitors and alternative substrates of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1. *Mol Cell Endocrinol*, 301: 117-122.
  154. Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM. (1997) Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet*, 349: 1210-1213.
  155. Stewart PM. (2003) Tissue-specific Cushing's syndrome, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases and the redefinition of corticosteroid hormone action. *Eur J Endocrinol*, 149: 163-168.
  156. Corbalan-Tutau D, Madrid JA, Nicolas F, Garaulet M. (2014) Daily profile in two circadian markers "melatonin and cortisol" and associations with metabolic syndrome components. *Physiol Behav*, 123: 231-235.
  157. Cardoso EM, Arregger AL, Monardes G, Contreras LN. (2013) An accurate, non-invasive approach to diagnose Cushing's syndrome in at-risk populations. *Steroids*, 78: 476-482.
  158. Tomlinson JW, Finney J, Gay C, Hughes BA, Hughes SV, Stewart PM. (2008) Impaired glucose tolerance and insulin resistance are associated with increased

- adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and elevated hepatic 5alpha-reductase activity. *Diabetes*, 57: 2652-2660.
159. Reinehr T, Kulle A, Wolters B, Knop C, Lass N, Welzel M, Holterhus PM. (2014) Relationships between 24-hour urinary free cortisol concentrations and metabolic syndrome in obese children. *J Clin Endocrinol Metab*, 99: 2391-2399.
  160. Livingstone DE, Jones GC, Smith K, Jamieson PM, Andrew R, Kenyon CJ, Walker BR. (2000) Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. *Endocrinology*, 141: 560-563.
  161. Wake DJ, Strand M, Rask E, Westerbacka J, Livingstone DE, Soderberg S, Andrew R, Yki-Jarvinen H, Olsson T, Walker BR. (2007) Intra-adipose sex steroid metabolism and body fat distribution in idiopathic human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 66: 440-446.
  162. 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: 831-866.
  163. 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: 382-390.
  164. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF. (1989) Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*, 84: 1663-1670.
  165. Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF. (1987) Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 64: 832-835.
  166. Tomlinson JW, Stewart PM. (2002) The functional consequences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in adipose tissue. *Horm Metab Res*, 34: 746-751.

167. Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Stewart PM. (1999) Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*, 140: 3188-3196.
168. Liu Y, Park F, Pietrusz JL, Jia G, Singh RJ, Netzel BC, Liang M. (2008) Suppression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 with RNA interference substantially attenuates 3T3-L1 adipogenesis. *Physiol Genomics*, 32: 343-351.
169. Bursac BN, Djordjevic AD, Vasiljevic AD, Milutinovic DD, Velickovic NA, Nestorovic NM, Matic GM. (2013) Fructose consumption enhances glucocorticoid action in rat visceral adipose tissue. *J Nutr Biochem*, 24: 1166-1172.
170. London E, Castonguay TW. (2011) High fructose diets increase 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in liver and visceral adipose in rats within 24-h exposure. *Obesity (Silver Spring)*, 19: 925-932.
171. Vasiljevic A, Velickovic N, Bursac B, Djordjevic A, Milutinovic DV, Nestorovic N, Matic G. (2013) Enhanced pre-receptor glucocorticoid metabolism and lipogenesis impair insulin signaling in the liver of fructose-fed rats. *J Nutr Biochem*, 24: 1790-1797.
172. Marek G, Pannu V, Shanmugham P, Pancione B, Mascia D, Crosson S, Ishimoto T, Sautin YY. (2015) Adiponectin resistance and proinflammatory changes in the visceral adipose tissue induced by fructose consumption via ketohexokinase-dependent pathway. *Diabetes*, 64: 508-518.
173. Lee MJ, Fried SK. (2014) The glucocorticoid receptor, not the mineralocorticoid receptor, plays the dominant role in adipogenesis and adipokine production in human adipocytes. *Int J Obes (Lond)*, 38: 1228-1233.
174. Hoppmann J, Perwitz N, Meier B, Fasshauer M, Hadaschik D, Lehnert H, Klein J. (2010) The balance between gluco- and mineralo-corticoid action critically determines inflammatory adipocyte responses. *J Endocrinol*, 204: 153-164.
175. Zhang TY, Daynes RA. (2007) Macrophages from 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice exhibit an increased sensitivity to lipopolysaccharide stimulation due to TGF-beta-mediated up-regulation of SHIP1 expression. *J Immunol*, 179: 6325-6335.

176. Wang L, Liu J, Zhang A, Cheng P, Zhang X, Lv S, Wu L, Yu J, Di W, Zha J, Kong X, Qi H, Zhong Y, Ding G. (2012) BVT.2733, a selective 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, attenuates obesity and inflammation in diet-induced obese mice. *PLoS One*, 7: e40056.
177. Park SB, Park JS, Jung WH, Kim HY, Kwak HJ, Ahn JH, Choi KJ, Na YJ, Choi S, Dal Rhee S, Kim KY. (2016) Anti-inflammatory effect of a selective 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor via the stimulation of heme oxygenase-1 in LPS-activated mice and J774.1 murine macrophages. *J Pharmacol Sci*, 131: 241-250.
178. Luo MJ, Thieringer R, Springer MS, Wright SD, Hermanowski-Vosatka A, Plump A, Balkovec JM, Cheng K, Ding GJ, Kawka DW, Koo GC, Grand CB, Luo Q, Maletic MM, Malkowitz L, Shah K, Singer I, Waddell ST, Wu KK, Yuan J, Zhu J, Stepaniants S, Yang X, Lum PY, Wang IM. (2013) 11beta-HSD1 inhibition reduces atherosclerosis in mice by altering proinflammatory gene expression in the vasculature. *Physiol Genomics*, 45: 47-57.
179. Mayes PA. (1993) Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr*, 58: 754S-765S.
180. Petrie JL, Patman GL, Sinha I, Alexander TD, Reeves HL, Agius L. (2013) The rate of production of uric acid by hepatocytes is a sensitive index of compromised cell ATP homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 305: E1255-1265.
181. Perheentupa J, Raivio K. (1967) Fructose-induced hyperuricaemia. *Lancet*, 2: 528-531.
182. Fiaschi E, Baggio B, Favaro S, Antonello A, Camerin E, Todesco S, Borsatti A. (1977) Fructose-induced hyperuricemia in essential hypertension. *Metabolism*, 26: 1219-1223.
183. Israel KD, Michaelis OEt, Reiser S, Keeney M. (1983) Serum uric acid, inorganic phosphorus, and glutamic-oxalacetic transaminase and blood pressure in carbohydrate-sensitive adults consuming three different levels of sucrose. *Ann Nutr Metab*, 27: 425-435.
184. Reiser S, Powell AS, Scholfield DJ, Panda P, Ellwood KC, Canary JJ. (1989) Blood lipids, lipoproteins, apoproteins, and uric acid in men fed diets containing fructose or high-amylose cornstarch. *Am J Clin Nutr*, 49: 832-839.



185. 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: 96-116.
186. Odermatt A. (2011) The Western-style diet: a major risk factor for impaired kidney function and chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 301: F919-931.
187. Bos MJ, Koudstaal PJ, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. (2006) Uric acid is a risk factor for myocardial infarction and stroke: the Rotterdam study. *Stroke*, 37: 1503-1507.
188. Jin M, Yang F, Yang I, Yin Y, Luo JJ, Wang H, Yang XF. (2012) Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17: 656-669.
189. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Bautista-Garcia P, Soto V, Avila-Casado C, Vega-Campos IP, Nakagawa T, Zhao L, Franco M, Johnson RJ. (2008) Effects of febuxostat on metabolic and renal alterations in rats with fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294: F710-718.
190. Sautin YY, Nakagawa T, Zharikov S, Johnson RJ. (2007) Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293: C584-596.
191. Cheung KJ, Tzamelis I, Pissios P, Rovira I, Gavrilova O, Ohtsubo T, Chen Z, Finkel T, Flier JS, Friedman JM. (2007) Xanthine oxidoreductase is a regulator of adipogenesis and PPARgamma activity. *Cell Metab*, 5: 115-128.
192. Stavric B, Johnson WJ, Clayman S, Gadd RE, Chartrand A. (1976) Effect of fructose administration on serum urate levels in the uricase inhibited rat. *Experientia*, 32: 373-374.
193. Watanabe S, Kang DH, Feng L, Nakagawa T, Kanellis J, Lan H, Mazzali M, Johnson RJ. (2002) Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. *Hypertension*, 40: 355-360.
194. Vasdev S, Gill V, Parai S, Longerich L, Gadag V. (2002) Dietary vitamin E and C supplementation prevents fructose induced hypertension in rats. *Mol Cell Biochem*, 241: 107-114.

195. Kanellis J, Watanabe S, Li JH, Kang DH, Li P, Nakagawa T, Wamsley A, Sheikh-Hamad D, Lan HY, Feng L, Johnson RJ. (2003) Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. *Hypertension*, 41: 1287-1293.
196. Farina JP, Garcia ME, Alzamendi A, Giovambattista A, Marra CA, Spinedi E, Gagliardino JJ. (2013) Antioxidant treatment prevents the development of fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction. *Clin Sci (Lond)*, 125: 87-97.
197. Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P, Abrams SH, Scheimann AO, Sanyal AJ, Chalasani N, Tonascia J, Unalp A, Clark JM, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR, Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research N. (2011) Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA*, 305: 1659-1668.
198. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A, Van Natta M, Clark J, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR, Nash CRN. (2010) Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*, 362: 1675-1685.
199. Dzyakanchuk AA, Balazs Z, Nashev LG, Amrein KE, Odermatt A. (2009) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1 reductase activity is dependent on a high ratio of NADPH/NADP(+) and is stimulated by extracellular glucose. *Mol Cell Endocrinol*, 301: 137-141.
200. Legeza B, Balazs Z, Odermatt A. (2014) Fructose promotes the differentiation of 3T3-L1 adipocytes and accelerates lipid metabolism. *FEBS Lett*, 588: 490-496.
201. Banhegyi G, Benedetti A, Fulceri R, Senesi S. (2004) Cooperativity between 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 279: 27017-27021.
202. 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-11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 system of the adipose tissue. *Endocrinology*, 148: 2487-2495.
203. McCormick KL, Wang X, Mick GJ. (2008) Modification of microsomal 11beta-HSD1 activity by cytosolic compounds: glutathione and hexose phosphoesters. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 111: 18-23.
  204. Tappy L, Le KA. (2010) Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev*, 90: 23-46.
  205. Hoekstra JH, van den Aker JH. (1996) Facilitating effect of amino acids on fructose and sorbitol absorption in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 23: 118-124.
  206. Ushijima K, Riby JE, Fujisawa T, Kretchmer N. (1995) Absorption of fructose by isolated small intestine of rats is via a specific saturable carrier in the absence of glucose and by the disaccharidase-related transport system in the presence of glucose. *J Nutr*, 125: 2156-2164.
  207. Barone S, Fussell SL, Singh AK, Lucas F, Xu J, Kim C, Wu X, Yu Y, Amlal H, Seidler U, Zuo J, Soleimani M. (2009) Slc2a5 (Glut5) is essential for the absorption of fructose in the intestine and generation of fructose-induced hypertension. *J Biol Chem*, 284: 5056-5066.
  208. 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: 247-255.
  209. Ashmore J. (1959) Physiology of glucose-6-phosphate utilization: role of adrenal steroids. *Rev Can Biol*, 18: 229-244.
  210. Lygre DG, Nordlie RC. (1968) Phosphohydrolase and phosphotransferase activities of intestinal glucose 6-phosphatase. *Biochemistry*, 7: 3219-3226.
  211. Colilla W, Jorgenson RA, Nordlie RC. (1975) Mammalian carbamyl phosphate : glucose phosphotransferase and glucose-6-phosphate phosphohydrolase: extended tissue distribution. *Biochim Biophys Acta*, 377: 117-125.
  212. Hugon JS, Maestracci D, Menard D. (1971) Glucose 6-phosphatase activity in the intestinal epithelium of the mouse. *J Histochem Cytochem*, 19: 515-525.

213. Anderson JW, Rosendall AF. (1973) Gluconeogenesis in jejunal mucosa of guinea pig. *Biochim Biophys Acta*, 304: 384-388.
214. Lamers JM, Kurpershoek-Davidov R, Hulsmann WC. (1974) Absence of significant rates of gluconeogenesis in intestinal mucosa of starved guinea pigs. *Biochim Biophys Acta*, 343: 427-430.
215. Chiasson JL, Liljenquist JE, Lacy WW, Jennings AS, Cherrington AD. (1977) Gluconeogenesis: methodological approaches in vivo. *Fed Proc*, 36: 229-235.
216. Hahn P, Wei-Ning H. (1986) Gluconeogenesis from lactate in the small intestinal mucosa of suckling rats. *Pediatr Res*, 20: 1321-1323.
217. Wasserman DH, Johnson JL, Bupp JL, Lacy DB, Bracy DP. (1993) Regulation of gluconeogenesis during rest and exercise in the depancreatized dog. *Am J Physiol*, 265: E51-60.
218. Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, Mithieux G. (1999) The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology*, 117: 132-139.
219. Yanez AJ, Nualart F, Droppelmann C, Bertinat R, Brito M, Concha, II, Slebe JC. (2003) Broad expression of fructose-1,6-bisphosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase provide evidence for gluconeogenesis in human tissues other than liver and kidney. *J Cell Physiol*, 197: 189-197.
220. Martin G, Ferrier B, Conjard A, Martin M, Nazaret R, Boghossian M, Saade F, Mancuso C, Durozard D, Baverel G. (2007) Glutamine gluconeogenesis in the small intestine of 72 h-fasted adult rats is undetectable. *Biochem J*, 401: 465-473.
221. Troy S, Soty M, Ribeiro L, Laval L, Migrenne S, Fioramonti X, Pillot B, Fauveau V, Aubert R, Viollet B, Foretz M, Leclerc J, Duchamp A, Zitoun C, Thorens B, Magnan C, Mithieux G, Andreelli F. (2008) Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab*, 8: 201-211.
222. Hayes MT, Foo J, Besic V, Tychinskaya Y, Stubbs RS. (2011) Is intestinal gluconeogenesis a key factor in the early changes in glucose homeostasis following gastric bypass? *Obes Surg*, 21: 759-762.

223. Mithieux G. (2012) Comment about intestinal gluconeogenesis after gastric bypass in human in relation with the paper by Hayes et al., *Obes. Surg.* 2011. *Obes Surg*, 22: 1920-1922; author reply 1923-1924.
224. Mithieux G. (2009) A novel function of intestinal gluconeogenesis: central signaling in glucose and energy homeostasis. *Nutrition*, 25: 881-884.
225. 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: 379-383.
226. Sastry KV, Agrawal VP, Kumar V. (1976) Histochemical localization of glucose-6-phosphatase and 5-nucleotidase in the digestive system of *Ophiocephalus Channa punctatus*. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)*, 14: 77-82.
227. Calvert R, Malka D, Menard D. (1979) Developmental pattern of glucose-6-phosphatase activity in the small intestine of the mouse fetus. *Histochemistry*, 63: 209-220.
228. Shieh JJ, Pan CJ, Mansfield BC, Chou JY. (2003) A glucose-6-phosphate hydrolase, widely expressed outside the liver, can explain age-dependent resolution of hypoglycemia in glycogen storage disease type Ia. *J Biol Chem*, 278: 47098-47103.
229. Cherbuy C, Vaugelade P, Labarthe S, Honvo-Houeto E, Darcy-Vrillon B, Watford M, Duee PH. (2017) The Contribution of Intestinal Gluconeogenesis to Glucose Homeostasis Is Low in 2-Day-Old Pigs. *J Nutr*, 147: 361-366.
230. Peng WT, Pan CJ, Lee EJ, Westphal H, Chou JY. (2009) Generation of mice with a conditional allele for *G6pc*. *Genesis*, 47: 590-594.
231. Shoemaker WC, Yanof HM, Turk LN, 3rd, Wilson TH. (1963) Glucose and fructose absorption in the unanesthetized dog. *Gastroenterology*, 44: 654-663.
232. Ockerman PA, Lundborg H. (1965) Conversion of fructose to glucose by human jejunum absence of galactose-to-glucose conversion. *Biochim Biophys Acta*, 105: 34-42.
233. Vily-Petit J, Soty-Roca M, Silva M, Raffin M, Gautier-Stein A, Rajas F, Mithieux G. (2020) Intestinal gluconeogenesis prevents obesity-linked liver steatosis and non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, doi:10.1136/gutjnl-2019-319745.

234. Marcolongo P, Banhegyi G, Benedetti A, Hinds CJ, Burchell A. (1998) Liver microsomal transport of glucose-6-phosphate, glucose, and phosphate in type 1 glycogen storage disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 224-229.
235. 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: 57-64.
236. 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: 13584-13590.
237. Behera D, Damre A, Varghese A, Addepalli V. (2008) In vitro evaluation of hepatic and extra-hepatic metabolism of coumarins using rat subcellular fractions: correlation of in vitro clearance with in vivo data. *Drug Metabol Drug Interact*, 23: 329-350.
238. Benedetti A, Fulceri R, Romani A, Comporti M. (1988) MgATP-dependent glucose 6-phosphate-stimulated Ca<sup>2+</sup> accumulation in liver microsomal fractions. Effects of inositol 1,4,5-trisphosphate and GTP. *J Biol Chem*, 263: 3466-3473.
239. Fulceri R, Banhegyi G, Gamberucci A, Giunti R, Mandl J, Benedetti A. (1994) Evidence for the intraluminal positioning of p-nitrophenol UDP-glucuronosyltransferase activity in rat liver microsomal vesicles. *Arch Biochem Biophys*, 309: 43-46.
240. Burchell A, Waddell ID, Countaway JL, Arion WJ, Hume R. (1988) Identification of the human hepatic microsomal glucose-6-phosphatase enzyme. *FEBS Lett*, 242: 153-156.
241. Puskas F, Marcolongo P, Watkins SL, Mandl J, Allan BB, Houston P, Burchell A, Benedetti A, Banhegyi G. (1999) Conformational change of the catalytic subunit of glucose-6-phosphatase in rat liver during the fetal-to-neonatal transition. *J Biol Chem*, 274: 117-122.
242. Chiquoine AD. (1953) The distribution of glucose-6-phosphatase in the liver and kidney of the mouse. *J Histochem Cytochem*, 1: 429-435.
243. Maestri R, Patterson BD, Fornel R, Monteiro LR, de Freitas TR. (2016) Diet, bite force and skull morphology in the generalist rodent morphotype. *J Evol Biol*, 29: 2191-2204.

244. Hugon JS, Borgers M, Maestracci D. (1970) Glucose 6-phosphatase and thiamine pyrophosphatase activities in the jejunal epithelium of the mouse. *J Histochem Cytochem*, 18: 361-364.
245. Hugon JS, Maestracci D, Menard D. (1973) Stimulation of glucose-6-phosphatase activity in the mucosal cells of the mouse intestine. *J Histochem Cytochem*, 21: 426-440.
246. Hugon JS, Maestracci D, Menard D. (1972) Smooth endoplasmic reticulum proliferation in mouse enterocytes induced by fructose feeding. *Histochemie*, 29: 189-197.
247. Kim MS, Krawczyk SA, Doridot L, Fowler AJ, Wang JX, Trauger SA, Noh HL, Kang HJ, Meissen JK, Blatnik M, Kim JK, Lai M, Herman MA. (2016) ChREBP regulates fructose-induced glucose production independently of insulin signaling. *J Clin Invest*, 126: 4372-4386.
248. Kim M, Astapova, II, Flier SN, Hannou SA, Doridot L, Sargsyan A, Kou HH, Fowler AJ, Liang G, Herman MA. (2017) Intestinal, but not hepatic, ChREBP is required for fructose tolerance. *JCI Insight*, 2.
249. Oh AR, Sohn S, Lee J, Park JM, Nam KT, Hahm KB, Kim YB, Lee HJ, Cha JY. (2018) ChREBP deficiency leads to diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Metabolism*, 85: 286-297.
250. Ma L, Robinson LN, Towle HC. (2006) ChREBP\**Mlx* is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J Biol Chem*, 281: 28721-28730.
251. Habold C, Foltzer-Jourdainne C, Le Maho Y, Lignot JH, Oudart H. (2005) Intestinal gluconeogenesis and glucose transport according to body fuel availability in rats. *J Physiol*, 566: 575-586.
252. Chatelain F, Pegorier JP, Minassian C, Bruni N, Tarpin S, Girard J, Mithieux G. (1998) Development and regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in rat liver, intestine, and kidney: in vivo and in vitro studies in cultured fetal hepatocytes. *Diabetes*, 47: 882-889.
253. Croset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot JM, Montano S, Mithieux G. (2001) Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes*, 50: 740-746.

254. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Zitoun C, Duchamp A, Backhed F, Mithieux G. (2016) Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. *Cell Metab*, 24: 151-157.
255. Ginsburg V, Hers HG. (1960) On the conversion of fructose to glucose by guinea pig intestine. *Biochim Biophys Acta*, 38: 427-434.
256. Bismut H, Hers HG, Van Schaftingen E. (1993) Conversion of fructose to glucose in the rabbit small intestine. A reappraisal of the direct pathway. *Eur J Biochem*, 213: 721-726.
257. Apostolova G, Schweizer RA, Balazs Z, Kostadinova RM, Odermatt A. (2005) Dehydroepiandrosterone inhibits the amplification of glucocorticoid action in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288: E957-964.
258. Balazs Z, Schweizer RA, Frey FJ, Rohner-Jeanrenaud F, Odermatt A. (2008) DHEA induces 11 $\beta$ -HSD2 by acting on CCAAT/enhancer-binding proteins. *J Am Soc Nephrol*, 19: 92-101.
259. Prince PD, Santander YA, Gerez EM, Hocht C, Polizio AH, Mayer MA, Taira CA, Fraga CG, Galleano M, Carranza A. (2017) Fructose increases corticosterone production in association with NADPH metabolism alterations in rat epididymal white adipose tissue. *J Nutr Biochem*, 46: 109-116.
260. Kovacevic S, Nestorov J, Matic G, Elakovic I. (2017) Fructose and stress induce opposite effects on lipid metabolism in the visceral adipose tissue of adult female rats through glucocorticoid action. *Eur J Nutr*, 56: 2115-2128.
261. Bursac BN, Vasiljevic AD, Nestorovic NM, Velickovic NA, Vojnovic Milutinovic DD, Matic GM, Djordjevic AD. (2014) High-fructose diet leads to visceral adiposity and hypothalamic leptin resistance in male rats--do glucocorticoids play a role? *J Nutr Biochem*, 25: 446-455.
262. Priyadarshini E, Anuradha CV. (2017) Glucocorticoid Antagonism Reduces Insulin Resistance and Associated Lipid Abnormalities in High-Fructose-Fed Mice. *Can J Diabetes*, 41: 41-51.
263. Larner DP, Morgan SA, Gathercole LL, Doig CL, Guest P, Weston C, Hazeldine J, Tomlinson JW, Stewart PM, Lavery GG. (2016) Male 11 $\beta$ -HSD1 Knockout Mice Fed Trans-Fats and Fructose Are Not Protected From Metabolic Syndrome or Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Endocrinology*, 157: 3493-3504.



264. Hellerstein MK. (1999) De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *Eur J Clin Nutr*, 53 Suppl 1: S53-65.
265. Baxter JD, Forsham PH. (1972) Tissue effects of glucocorticoids. *Am J Med*, 53: 573-589.
266. Dolinsky VW, Douglas DN, Lehner R, Vance DE. (2004) Regulation of the enzymes of hepatic microsomal triacylglycerol lipolysis and re-esterification by the glucocorticoid dexamethasone. *Biochem J*, 378: 967-974.
267. Morgan SA, McCabe EL, Gathercole LL, Hassan-Smith ZK, Lerner DP, Bujalska IJ, Stewart PM, Tomlinson JW, Lavery GG. (2014) 11beta-HSD1 is the major regulator of the tissue-specific effects of circulating glucocorticoid excess. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: E2482-2491.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

### *A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:*

- Legeza B, Marcolongo P, Gamberucci A, **Varga V**, Banhegyi G, Benedetti A, Odermatt A. (2017) Fructose, Glucocorticoids and Adipose Tissue: Implications for the Metabolic Syndrome. *Nutrients*, 9. (IF: 4,196)
- **Varga V**, Muranyi Z, Kurucz A, Marcolongo P, Benedetti A, Banhegyi G, Margittai E. (2019) Species-Specific Glucose-6-Phosphatase Activity in the Small Intestine-Studies in Three Different Mammalian Models. *Int J Mol Sci*, 20. (IF: 4,556)

### *A disszertációtól független közlemények:*

- Shih CK, Chen CM, **Varga V**, Shih LC, Chen PR, Lo SF, Shyur LF, Li SC. (2020) White sweet potato ameliorates hyperglycemia and regenerates pancreatic islets in diabetic mice. *Food Nutr Res*, 64. (IF: 3,894)
- Shyur LF, **Varga V**, Chen CM, Mu SC, Chang YC, Li SC. (2021) Extract of white sweet potato tuber against TNF-alpha-induced insulin resistance by activating the PI3K/Akt pathway in C2C12 myotubes. *Bot Stud*, 62: 7. (IF: 2,673)

## 11. Köszönetnyilvánítás

Az értekezés alapját képező kísérletek 2013-2019 között a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetében készültek Dr. Bánhegyi Gábor, ezt követően pedig Dr. Margittai Éva témavezetésével. Dr. Bánhegyi Gábornak nemcsak szakmai támogatásáért tartozom köszönettel, hanem jó szívéért, emberségéért is. Úgy éreztem, hogy Dr. Margittai Évával egy erős bátyaként állnak mögöttem. Elvesztése óriási szomorúság mindmáig. Különösen köszönöm Dr. Margittai Évának az elsőszerzős cikkem publikálásában nyújtott segítségét, melyre egy nagyon nehéz időszakban is energiát és időt áldozott.

Emellett nagyon hálás vagyok a munkacsoport minden tagjának a vidám légkörért, és hogy bátran fordulhattam hozzájuk segítségért, tanácsokért. Kiemelném Mile Valéria munkáját, amit a kísérletekhez szükséges eszközök és reagensok beszerzésében, a mikroszóma izolálás protokolljának megismertetésében adott, és főként, hogy mindvégig a közösség mozgatórugója volt. Köszönettel tartozom Lizák Beátának az értekezéshez nyújtott szakmai támogatásért.

Az elsőszerzős cikkemben publikált kísérletek egy része a Sienai Egyetem Molekuláris és Fejlődésbiológiai Tanszékén készült, Dr. Angelo Benedetti és Dr. Paola Marcolongo közreműködésével. Nagyon köszönöm nekik az elméleti és kísérletes munkájukat.

Nem utolsó sorban köszönöm a családom támogatását.

## Függelék

### Ábrák jegyzéke

1. ábra. Az elhízás (A), a metabolikus szindróma (B) és a cukorbetegség (C) elterjedése az Egyesült Államokban a 20 és 60 év közötti felnőttek között az 1999-2014 között végzett Nemzeti Egészség -és Táplálkozásügyi Felmérés alapján (National Health and Nutrition Examination Survey NHNES) (14) .....	12
2. ábra. A G6Páz rendszer elemei.(Lizák B. és munkatársai alapján módosítva) (42) ..	17
3. ábra. A G6PT— H6PDH — 11 $\beta$ -HSD1 tengely működésének sematikus ábrázolása [40]. .....	29
4. ábra. A glukóz-6-foszfátáz (A) és a glukóz-6-foszfát transzporter (B) mRNS kifejeződése real-time PCR-rel vizsgálva.....	56
5. ábra. A glukóz-6-foszfátáz és a glukóz-6-foszfát transzporter fehérjék expresszió vizsgálata Western blot analízissel tengerimalac, patkány és human mikroszóma mintákon.....	57
6. ábra. Glukóz-6-foszfátáz és glukóz-6-foszfát transzporter fehérje expressziójának vizsgálata tengerimalac, patkány és humán mikroszómákban. ....	58
7. ábra. A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz fehérje kifejeződése tengerimalac, patkány és humán mikroszómákban Western blot analízissel.....	59
8. ábra. A glukóz-6-foszfátáz enzimaktivitásának kinetikai analízise glukóz-6-foszfát szubsztrát jelenlétében különböző eredetű mikroszómák esetében, a reakció által termelt glukóz (nmol/mg protein) mérésével.....	60
9. ábra. A glukóz-6-foszfátáz enzimaktivitása G6P szubsztráttal máj (A) illetve bél (B) mikroszómákon a glukóztermelés mérésével. ....	61
10. ábra. A glukóz-6-foszfátáz enzimaktivitása F6P szubsztráttal máj (A) illetve bél (B) mikroszómákon a glukóztermelés mérésével. ....	62
11. ábra. A glukóz-6-foszfátáz enzimaktivitása glukóz-6-foszfát szubsztráttal máj mikroszómákban a keletkezett glukóz (A) illetve foszfát (B) detektálásával. ....	65
12. ábra. A glukóz-6-foszfátáz enzimaktivitása glukóz-6-foszfát szubsztráttal bél mikroszómákban a glukóztermelés (A) illetve a keletkezett foszfát (B) mérésével. ....	66
13. ábra. Mannóz-6-foszfát hidrolízise foszfáttermelés mérésével tengerimalac, patkány és humán máj, illetve vékonybélben. ....	67

14. ábra. Fruktóz-6-foszfát-függő glukóztermelés tengerimalac és humán máj, illetve vékonybél mikroszómákban. ....	68
15. ábra. Exogén fruktóz hatása a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1 enzimaktivitás szabályozására. ....	70
16. ábra. A gyümölcssevők és növényevők bélsejtjeinek feltételezett eltérő glukóz és fruktózmetabolizmusa. ....	73
17. ábra. A glukóz és a fruktóz intracelluláris metabolizmusa.....	75

### **Táblázatok jegyzéke**

1. táblázat. A glukóz-6-foszfátáz izoformáinak tulajdonságai (54).....	22
2. táblázat. Real-time PCR primerek .....	49
3. táblázat. A glukóz-6-foszfátáz enzimaktivitás latenciája a különböző fajok mikroszómáiban. ....	63