

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. Gyires Klára, DSc., professzor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Tímár Orsolya, Ph.D., belgyógyász szakorvos

Dr. Horváth Eszter Mária Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2022

Bevezetés

A vércukorszint fiziológias szinten tartása rendkívül fontos az egészség megőrzéséhez; eltérésekor különböző szénhidrát-anyagcsere zavarok alakulnak ki. Ezek az elváltozások sok esetben elhízással társulnak, mint például a metabolikus szindróma (MetS) és a 2-es típusú diabetes (T2DM). Ma már köztudott tény, hogy a MetS és T2DM kialakulásában döntő szerepet játszik a túlzott mértékű cukorfogyasztás, melyek közül kiemelendő a szacharóz (kristálycukor), illetve a magas fruktóz tartalmú kukoricaszirup szerepe. Kutatásaim során a szénhidrát-anyagcsere azon lépéseivel foglalkoztam, melyek az endoplazmás retikulumban mennek végbe.

Endoplazmatikus retikulum szerepe a szénhidrát anyagcserében

Az endoplazmás retikulumot 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 alapul és a szélsőséges táplálkozási körülményekre adott sejtválaszt segíti.

Az ER lumenében a reakciók a citoszóltól elszeparált térben játszódhatnak le, ezáltal lehetővé téve azok szabályozását. Az ER lumene a citoplazmához képest lényegesen oxidáltabb állapotban van, ráadásul az ER saját piridin-nukleotid raktárral rendelkezik.

Számos ER enzimnek van intraluminális aktív centruma, ezek közül kettővel foglalkoztam, a glukóz-6-foszfátáz (G6Páz) és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz (H6PDH) enzimekkel. Mindkettő az intraluminális G6P-ot hasznosítja; magas lumenális G6P szint esetén inkább a H6PDH, míg alacsony G6P-koncentrációnál, (mint például éhezés során) inkább a G6Páz aktív.

A G6Páz rendszer

Ez az enzimszisztéma felelős a glukoneogenezis és a glikogénolízis utolsó közös, sebességmeghatározó lépéséért. Az enzim aktív centruma a lumen felé néz, így működéséhez szükséges a szubsztrátjának (G6P) és a termékeknek (glukóz, foszfát) az ER membránon keresztüli transzportja. A G6P bejutásáért a specifikus glukóz-6-foszfát transzporter (G6PT) a felelős, a termékek kifelé történő transzportjára azonban több elmélet is létezik. A G6Páz enzim nem specifikus a glukóz-6-foszfátra; többféle hexóz-foszfátot is képes hidrolizálni, pl. mannóz-6-foszfátot (M6P). A rendszer nagyfokú specificitását tehát a G6P szubsztrátot adó G6PT biztosítja, mely szintén az ER membránjában helyezkedik el.

Emberekben ezidáig három különböző féle G6Páz izoformát azonosítottak; ezeket különböző gének kódolják, és egyedi szerepekkel, szöveti eloszlással és kinetikai tulajdonságokkal bírnak. Az elsőként felfedezett G6Páz- α a G6PC1 által kódolt fehérje, a második az ún. pankréász sziget-specifikus G6PC rokon fehérje (IGRP) (G6PC2 gén kódolja) és végül a G6Páz- β (G6PC3 gén kódolja). Habár a három

izoforma csupán mérsékelt homológiát mutat, a membrán topológiájuk és a katalitikus centrumuk nagyon hasonló. Általánosan elfogadott nézet, hogy jelentős mértékben csak a májban, a vesében, és a vékonybélben kifejeződő G6Páz- α felelős a vércukorszint fenntartásáért.

A glukóz-6-foszfát transzportert elsőként Gerin és mtsai azonosították 1997-ben; azóta a glukóz-6-foszfát transzportja a máj mikroszómákban (ER-ben gazdag sejtfrakció) jól feltérképezett.

G6PT-H6PDH-11 β HSD1 triád működése

A 11 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz (11 β HSD1) a glukokortikoid-célszervekben, azaz a májban, a vázizomzatban, valamint a zsírszövetben van jelen, és általában a kortizol prereceptorális aktivációját katalizálja.

Az endoplazmás retikulum membránjához kötve, annak lumenében helyezkedik el, koenzimként pedig – a reakció irányától függően – NADP⁺-t vagy NADPH-t használ. Ez azért fontos, mert az organelum membránja piridin-nukleotidok számára átjárhatatlan, vagyis a reakció katalíziséhez kizárólag az endoplazmás retikulum elkülönült, luminális NADPH-készlete áll rendelkezésre. Az enzim által elhasznált NADPH újratermelődését, vagyis a NADP⁺ visszaredukálását a szintén luminális és a 11 β HSD1-hez fizikailag is kapcsolt hexóz-6- foszfát-dehidrogenáz enzim (H6PD) végzi, miközben glukóz-6-foszfát (G6P) 6-foszfoglukonáttá (6PG) való átalakulását katalizálja. A G6P a glukóz-6-

foszfát-transzporterén (G6PT) keresztül jut be az endoplazmás retikulum lumenébe.

Ahol a H6PD nem redukálja vissza a keletkezett NADP⁺-t NADPH-vá, ott az enzim oxidál, vagyis kortizol-kortizon átalakulást katalizál. Így végső soron a 11 β HSD1 megfelelő funkciójához nem csak maga az enzim jelenléte és épsége szükséges, hanem az említett három fehérjéből álló „katalitikus triád” egészének együttes működése.

G6Páz a bélben, fajok közti ellentmondások

A G6Páz jelenlétét elsőként májban, majd vesében, végül vékonybélben igazolták. Bár a vékonybél glukoneogenezisét már az ötvenes évektől kutatták, a különböző fajokban végzett vizsgálatok sokszor egymásnak ellentmondó eredményekhez vezettek.

A különböző módszerekkel (radioaktív prekursorok használata, mérések proteoliposzómákon, mikroszómákon) próbáltak kvantitatív becslést adni a vékonybél glukoneogenezisben betöltött szerepére, melyre így számos elmélet született. Egyes kutatócsoportok a születés utáni időszakban mértek nagyobb enzimaktivitást, és a vékonybél izomszövetének glukózellátásában feltételezték a funkcióját, míg több kutatás azt támasztotta alá, hogy éhezés, diabéteszes állapot, illetve a fehérjedús táplálkozás vannak legnagyobb hatással az enzimrendszer aktivitására.

A legfontosabb és leggyakrabban használt laborállatok, a különböző egértörzsek. 2009-ben létrehozták az első G6Páz génkiütött (KO) egereket. Azóta már több szövetspecifikus (májra, vékonybélre) KO egértörzs létezik. Ezen állatokon végzett kísérletekből megállapították, hogy a vékonybélnek létfontosságú szerepe van az éhomi vércukorszint fenntartásában olyan esetekben, mikor a máj glukoneogenezise hiányzik.

Célkitűzés

Mivel a különböző fajok vékonybelében a glukoneogenezis kimutatására irányuló kísérletek ellentmondásos eredményeket adtak, ezért szeretnénk volna tisztázni, hogy vannak-e faji különbségek. Ehhez 3 különböző táplálkozású fajt választottunk: embert, tengerimalacot és patkányt. Hiszem logikusnak tűnt a feltételezés, hogy ha vannak faji különbségek, ezek összefüggésbe hozhatók a táplálkozással, elsősorban a fruktózfogyasztással.

Tudvalevő, hogy a fruktóz-6-foszfát a citoplazmában a foszoglukoizomeráz (PGI) enzim segítségével glukóz-6-foszfáttá tud alakulni, de kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai alapján ez az átalakulás az ER-ben is megtörténhet, egy ún. foszfohexóz izomeráz útvonal segítségével. Felvetődött a kérdés, hogy ez az útvonal megfigyelhető-e bél esetén is. Szintén korábbi eredmények alapján tudjuk, hogy a glukóz képes a 11β -HSD1-függő glukokortikoid aktiváció fokozására. Szerettük 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 11β -HSD1 oxidoreduktáz illetve dehidrogenáz aktivitását?

Módszerek

qPCR

A patkány és tengerimalac máj és bél szövetéből az RNS-t RNeasy Plus Mini Kittel (Qiagen) izoláltuk. A humán máj és bél szövetekből származó RNS-ek az Ambion-Applied Biosystems (First Choice® Human Total RNA Survey Panel) és Biochain cégektől származtak. 2 mikrogram RNS-t írtunk át reverz transzkripcióval 20 ml végtérfogatban Superscript® III First Strand Synthesis System (Invitrogen™) és random hexamerek segítségével. Az expressziós szinteknél a máj expressziója volt a referencia, melyet 100%-nak vettünk.

Mikroszóma izolálás

A mikroszómák izolálását hím Wistar patkány (180-230 g) ill. tengerimalac (400-450g) felhasználásával, standard differenciál centrifugálással végeztük. Az emberi máj illetve bél mikroszómák

kereskedelemben kapható minták voltak, melyeket a Thermo Scientific (máj esetében) ill. Xenotech (bél esetében) cégektől szereztünk be.

A kiolvasztott mikroszóma mintákat 1 mg/ml fehérjekoncentrációra hígítottuk, majd három mosási lépést iktattunk be, hogy a mikroszómához lazán asszociált citoplazmatikus fehérjéket eltávolítsuk. Ehhez a mintákat 4,5% Polietilén glikolt tartalmazó MOPS pufferben centrifugáltuk, majd a csapadékot újrasszuszpendálva ezt a lépést még kétszer megismételtük.

G6Páz enzimaktivitás mérése

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

Mindkét méréshez a mintákat két csoportra osztottuk, és az egyik csoport PH-ját 1N HCl-el 5-re vittük le, majd 20 perc 37°C-on való inkubálás után 1N KHCO₃-al visszaállítottuk. Ezzel a lépéssel a G6Páz-t specifikusan gátoltuk, így az így megmaradt aktivitás teljes mértékben nem specifikus foszfatázoknak tulajdonítottuk. A másik csoport esetén mért aktivitás a teljes aktivitás, melyből a nem specifikus aktivitást kivonva kaptuk a specifikus aktivitást. Mindkét csoportot további két alcsoportra osztottuk; intakt, és permeabilizált mikroszómák. Utóbbi esetben a mintához (0,05 mg/mg mikroszómális fehérje

koncentrációban) alamethicint (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtunk, mely a membránba beépülve, azon pórusokat alakít ki, így a vezikulumok szétroncsolása nélkül a membránt szabadon átjárhatóvá teszi.

Western Blot

A western blot mérésekhez egyenlő mennyiségű mikroszómális fehérjét (40 mg) vittünk fel minden mintából 12%-os poliakrilamid géltre. A mintákat 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 blotokat ImageJ szoftver segítségével elemeztük. A minták fehérje mennyiségét Ponceau festést követően kvantifikáltuk, majd erre normalizáltuk.

Mikroszómális kortizon-kortizol átalakulás

A 11 β -HSD1 enzim aktivitását az általa termelt kortizon ill. kortizol mennyiségéből mértük. A kortizon-redukció mértékének meghatározására a HHH7 nevű humán embrionális vese sejteket (melyek stabilan expresszálják a humán 11 β -HSD1 és H6PDH enzimeket) 5 μ 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 μM kortizon, és 50 μM NADP⁺ hozzáadása után. A reakciót minden esetben 150 μl jéghideg metanol hozzáadásával állítottuk le, ezután a mintákat a HPLC-vel történő kortizon/kortizol mérésig -20°C -on tároltuk.

Statisztikai analízis

Minden bemutatott kísérlet három független mérés eredménye. 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 szignifikanciaszinteket a következők szerint alkalmaztuk: $p = 0.05$ -0.01 *; $p = 0.01$ –0.001 **; $p \leq 0.001$ ***.

Eredmények

A glukóz-6-foszfataz rendszer expressziójának vizsgálata máj és bél mikroszómákban

A G6Páz és G6PT mRNS-einek kifejeződését real-time PCR vizsgálattal, míg fehérjeinek expresszióját Western blot analízissel elemeztük.

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. Ezzel

szemben a G6Páz mRNS kifejeződése a patkány vékonybélben csupán az egyötöde a májban lévőnek. A G6PT mRNS szinteket szintén megvizsgáltuk mindhárom fajban. 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 májban mért 17%-a volt.

A következőkben megvizsgáltuk a G6Páz és G6PT fehérje szintű jelenlétét is különböző fajokból származó mikroszóma mintáinkban. 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.

Hasonlóan a real-time PCR során kapott eredményekhez, mind a G6Páz, mind a G6PT expresszálódott a tengerimalacból és humán vékonybélből származó mikroszómákban.

Tengerimalacban a bél G6Páz expressziója a májéhoz hasonló volt, míg humán minták esetén a bélben detektálható G6Páz expressziója körülbelül a fele volt a májénak. A G6PT fehérjeszintek tengerimalac és humán 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 humán bél mikroszóma mintához

A G6Páz enzimaktivitása

Májszövetben a szakirodalomban jól meghatározott a G6Páz rendszer jelenléte, melyet korábban ismertetett expressziós vizsgálataink is alátámasztanak. Saját kísérleti rendszerünkben szeretnénk volna beállítani a G6Páz enzimaktivitásának pontos mérését, valamint megvizsgálni ezen a módon az esetleges fajok közötti eltéréseket.

Annak érdekében, hogy az esetlegesen a membránhoz lazábban kapcsolódó citoszólikus fehérjéket eltávolítsuk a mikroszómákról, az aktivitásmérést megelőzően három egymást követő mosási lépést alkalmaztunk.

A 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 aktivitáscsökkenést 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. Ezután a G6P-ot feltehetőleg a luminális G6Páz hidrolizálja glukózzá és foszfáttá az intraluminális reakciók számára. Ezért kísérleteinket elvégeztük F6P szubsztráttal is.

A mosások hatására F6P szubsztrát esetében egy számottevőbb, 50% körüli csökkenés is detektálható volt a G6Páz aktivitásban mindhárom faj májából izolált mikroszóma esetében. 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, melyből arra következtettünk, hogy ebben a szövetben a citoszólikus nem-specifikus foszfatázok jobban hozzájárulnak az összaktivitáshoz. Ezért a továbbiakban kizárólag háromszor mosott mikroszómákon mértünk enzimaktivitásokat, ezeket mutatjuk be alább részletesebben.

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. Ebből kiszámolhatjuk a G6Páz enzim latenciát, mely G6P szubsztrát adásakor tengerimalac májnál 49,2%, patkány májnál 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.

Régóta ismert, hogy a G6Páz enzim érzékeny a pH változásokra, és míg pH optimuma 6,5-6,7 körül van, pH 5, illetve ez alatti értékeknél elveszíti az aktivitását. 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 májban, mely megfelelt az elvárásainknak. Az enzimaktivitást első körben a keletkezett glukóz mérésével detektáltuk.

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. A foszfáttermelés mérése hasonló eredményeket adott mindhárom faj esetében, azonban itt a fajok között nem volt szignifikáns különbség az aktivitásokban.

Annak érdekében, hogy a G6Páz rendszer jelenlétét bélben is teszteljük, ugyanezen fajok beléből izolált mikroszómákon is megmértük a G6P-függő G6Páz aktivitást. Minden kísérletet elvégeztünk a két végtermék, azaz a glukóz és a foszfát detektálásával egyaránt.

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 foszfatazoknak 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.

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 az M6P nem képes átjutni. A mikroszómális vezikulumok permeabilizálása a pórusokat kialakító alamethicinnel 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. Bél mikroszómák esetén a tengerimalac és humán minták esetén a latencia 84, illetve 49% volt. 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.

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

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.

A fruktóz hatása a 11 β -HSD1 enzimaktivitásra

Mivel korábbi tanulmányok alapján tudjuk, hogy az extracelluláris glukóz jelenlétében megnő a 11 β -HSD1 enzim aktivitása, ezért kíváncsiak voltunk, hogy vajon fruktóz hatására is hasonló változásokat tapasztalunk-e. Ezen okból megmértük a 11 β -HSD1 oxidoreduktáz és dehidrogenáz aktivitását különböző fruktóz-koncentrációjú médium

hozzáadására HHH7 sejteken, melyek stabilan koexpresszálják a 11β -HSD1 és H6PDH enzimeket.

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 elégnék 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.

Következtetések

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 11β -HSD1 aktivitását, mely a növekvő fruktóz koncentráció hatására a dehidrogenáz aktivitástól az oxidoreduktáz aktivitás irányába tolódott el.

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: 3,647)
- 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: 2,163)