

Az endoplazmás retikulum piridin-nukleotid rendszerének redox változásai: összefüggés az elhízással, a 2-es típusú diabetes-szel és a metabolikus szindrómával

Bevezetés

A prohormonnak tekinthető kortizon kortizollá történő redukciója az endoplazmás retikulumban (ER) lokális glukokortikoid hatás fontos meghatározója a sejtekben. A folyamat két kulcsenzime közül a hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PD) glukóz-6-foszfát (G6P) felhasználásával NADPH-t termel, míg az 1-es típusú 11 β -hidroxi-szteroid-dehidrogenáz (11 β HSD1) NADPH felhasználásával redukálja a kortizont. A két enzim kapcsolt működését biztosítja, hogy az ER membrán nem átjárható a piridin-nukleotidok számára, vagyis az ER lumen – a két enzim által közösen használt – elkülönült NADP-NADPH készlettel rendelkezik.

Az utóbbi években számos megfigyelés utal az említett rendszer tápanyag-szenzor funkciójára, vagyis arra, hogy a tápanyagkínálat növekedése a NADPH-termelés fokozásán keresztül emelkedett kortizoltermelést válthat ki. A jelenségnek a fizioiógias szabályozás mellett az elhízás és ahhoz kapcsolódó betegségek patomechanizmusában is szerepe lehet. Ha ugyanis a tápanyagkínálat rendszeresen és tartósan növekszik (túltáplálás), a lokálisan termelődő kortizol a Cushing szindrómában megfigyelhetőkhöz hasonló hatásokat válthat ki, melyek közül kiemelendő a törzskörüli elhízás, hipertenzió, hiperglikémia, diszlipidémia és inzulin-rezisztencia, amelyek a metabolikus szindróma jellegzetes tünetei. Az elhízás, a metabolikus szindróma és a diabetes kialakulásának kockázatát a fruktóz-fogyasztás is jelentősen fokozza, ezért feltételeztük, hogy a fruktóz metabolikus intermedierjei is befolyásolhatják a lokális kortizoltermelést.

Vizsgálataink elsősorban a H6PD tulajdonságaira és szerepére, valamint a táplálékkínálat és a fruktóz-anyagcsere ismertett rendszeren keresztül kifejtett hatásaira irányultak. Mivel a tea, illetve flavanoltjai számos tanulmány szerint csökkentik az elhízás, és ahhoz kapcsolódó metabolikus betegségek kialakulásának kockázatát, azt is megvizsgáltuk, hogy a legismertebb teakatekin (epigallokatekin-gallát, EGCG) befolyásolja-e a lokális kortizoltermelést az ER-ben.

Eredmények

A H6PD expressziója patkány és humán szövetekben

(Marcolongo P. és mtsai., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 126: 57-64, 2011)

Az ER lumenében elhelyezkedő H6PD kettős funkciójú enzim, amely dehidrogenázként a G6P NADP-függő oxidációját, laktonázként pedig a köztitermék, 6-foszfoglukonolakton hidrolízisét katalizálja; így a kettős reakció végtermékeként 6-foszfoglukonát keletkezik. Korábbi megfigyeléseink arra utaltak, hogy az enzim konstitutív jelleggel fejeződik ki a legtöbb vizsgált szövettípusban. Példaként említhető, hogy a differenciálódó zsírsejtekben ugrásszerűen megemelkedik a kortizoltermelés, és ennek hátterében a H6PD indukcióját sejtették. Mi azonban kimutattuk, hogy a H6PD változatlan expressziója mellett a 11 β HSD1 mRNS és fehérje mennyisége emelkedik nagyságrendekkel a differenciálódás során. Célunk az volt, hogy szisztematikusan összehasonlítsuk különböző patkány és humán szövetek (máj, zsírszövet, vese, agy, szív, izom, tüdő, lép, here) H6PD expresszióját. A mintákban az mRNS-szintek (real time RT-PCR) mellett – ahol lehetett – a fehérje mennyiségét (Western blot) és az enzim mindkét aktivitását is mértük.

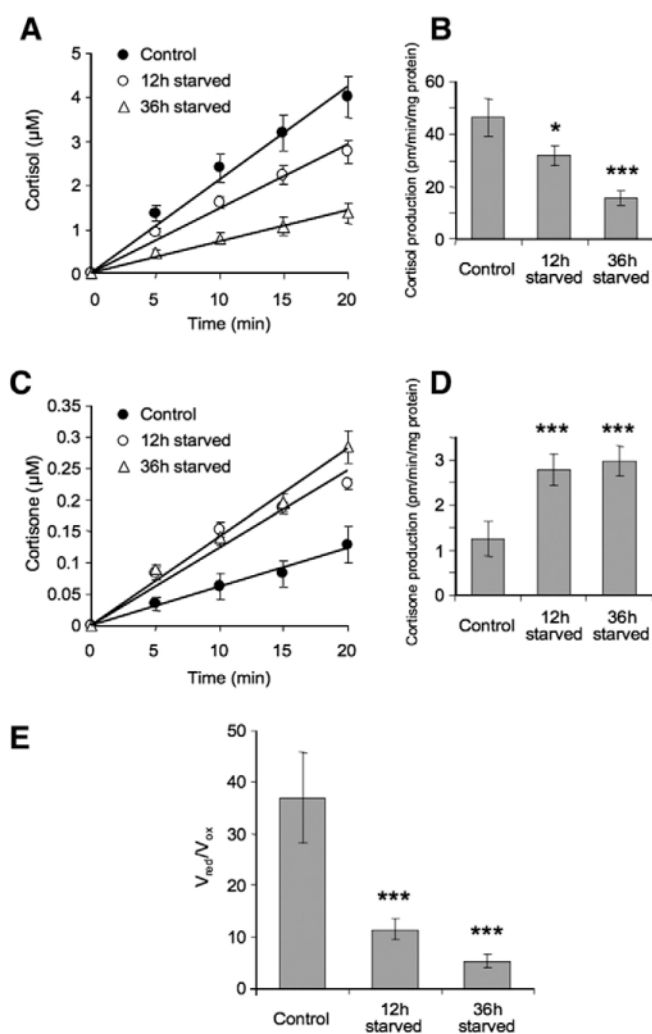
Azt találtuk, hogy a H6PD az összes tanulmányozott szövetben hasonló szinten fejeződött ki, az expresszió egy nagyságrenden belül ingadozott. Mindkét enzimaktivitás jól korrelált az mRNS és fehérjeszintekkel. Az eredmények egyrészt alátámasztják a fehérje és génje „housekeeping” jellegét, másrészt arra is utalnak, hogy az enzim a prereceptorális glukokortikoid-aktiválás mellett egyéb funkcióval is rendelkezik. A vizsgált szövetek között ugyanis van néhány (pl. vázizom, szív, vese), amelyek nem vagy alig tartalmaznak 11 β HSD1 enzimet, így az itt található sejtek ER-jében a luminális NADPH-termelés más okból szükséges. Saját korábbi megfigyeléseink is utaltak a luminális [NADPH]:[NADP] arány fenntartásának kortizoltermeléstől független vitális fontosságára, és feltételezhető, hogy a megfelelő mennyiségű NADPH az organellum antioxidáns védekezéséhez is nélkülözhetetlen.

Éhezés és jóllakottság hatása az ER kortizoltermelő képességére

(Kereszturi É. és mtsai., *FEBS Lett.* 584: 4703-4708, 2010)

Hipotézisünk szerint az ER luminális redox viszonyai a prereceptorális glukokortikoid-aktiválás révén összekapcsolják a metabolizmust a hormonháztartással, ami szerepet játszhat az elhízás és a hozzá kapcsolódó betegségek patomechanizmusában is. Megvizsgáltuk, hogy a szervezet tápanyag-ellátottsága hogyan befolyásolja az ER luminális piridin-nukleotidjainak redox állapotát, és ezen keresztül az ER kortizoltermelő képességét.

Kísérleteinket patkányokon végeztük. Az állatokat három csoportra osztottuk, melyek szabadon hozzáfértek a táplálékhoz, illetve 12 vagy 36 órán át éheztek, mielőtt májuktól mikroszóma frakciót izoláltunk. A luminális piridin-nukleotidok redox állapotát kétféle módszerrel vizsgáltuk. Közvetlen, fluorimetriás méréseink azt mutatták, hogy a máj mikroszóma [NADPH]:[NADP] aránya az éhezés előre haladtával folyamatosan csökken, vagyis az ER lumen egyre oxidáltabbá válik. Ezzel összhangban voltak azok az eredmények, amelyeket a mikroszóma endogén kortizonredukáló (kortizoltermelő) és kortizoloxidáló (kortizontermelő) kapacitásának mérésével kaptunk. A mikroszómát kortizonnal, illetve kortizollal inkubáltuk, és HPLC-s meghatározással összehasonlítottuk a kortizol- és kortizonkeletkezés kezdeti sebességét (1. ábra). Mivel az éhezés hatására Western blot analízisünk szerint a H6PD és 11 β HSD1 szintje, valamint ezen enzimek aktivitása nem változott jelentős mértékben, a mért sebességek a lumenben található [NADPH]:[NADP] aránytól függenek.



1. ábra. Patkány máj mikroszóma

endogén redukáló és oxidáló

kapacitásának változása éhezés során

A-B: Kortizonredukáló kapacitás.

Táplált és éhező patkányok májából izolált mikroszómát (5 mg fehérje / ml)

10 μ M kortizon jelenlétében

inkubáltunk 37 °C-on, és mértük a keletkező kortizol mennyiségét.

C-D: Kortizoloxidáló kapacitás. Táplált

és éhező patkányok májából izolált mikroszómát (5 mg fehérje / ml) 10 μ M

kortizol jelenlétében inkubáltunk 37 °C-on, és mértük a keletkező kortizon

mennyiségét.

E: A redukáló és oxidáló kapacitások aránya.

Átlag \pm szórás; n = 3; *P < 0,05; ***P < 0,001.

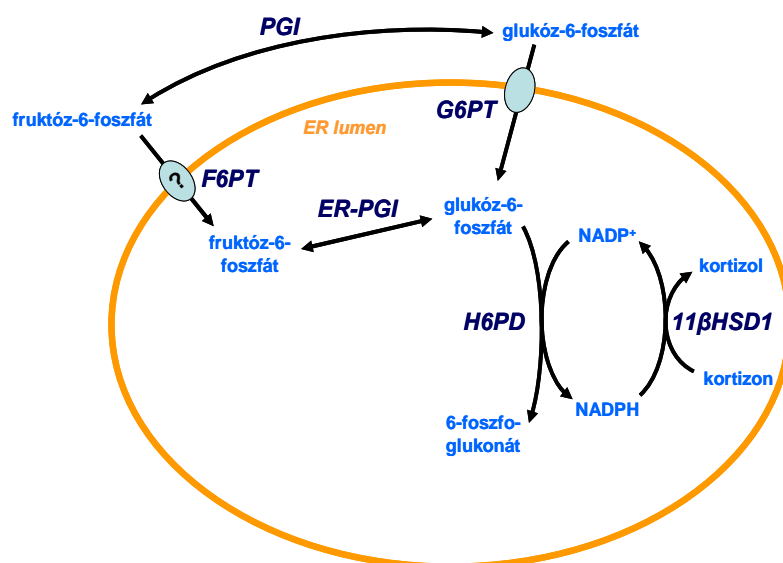
A kortizoltermelés az éhezéssel egyre csökkent, ugyanakkor a kortizontermelés fokozatosan nőtt. Eredményeinkből levonható a következtetés, hogy patkányokban in vivo éhezés során a májsejtek ER-jében fokozatosan csökken a [NADPH]:[NADP] arány, és ez az elsőként általunk észlelt redox eltolódás együtt jár a kortizoltermelő képesség változásával is. Mindez azt támasztja alá, hogy a vizsgált rendszer fiziológiai körülmények között valóban tápanyag-szenzor funkciót tölthet be.

Fruktóz-anyagcsere lehetséges hatása az ER kortizoltermelő képességére

(Senesi S. és mtsai., *Endocrinology* 151: 4830-4839, 2010)

Az elhízás és ahhoz kapcsolódó metabolikus betegségek kapcsán a túltáplálás – mint nyilvánvaló kockázati tényező – mellett egyre nagyobb érdeklődés irányul a fruktózfogyasztás szerepére, ezért a jóllakottság és éhezés mellett a fruktóz-anyagcsere prereceptorális glukokortikoid-termelésre gyakorolt hatásait is megvizsgáltuk.

Patkány máj mikroszómához fruktóz-6-foszfátot (F6P) adva ugyanolyan hatékonyan tudtuk serkenteni a kortizoltermelést, mint G6P-vel. Közvetlen, gyorszűréses transzportméréssel kimutattuk, hogy a F6P bejuthat az ER-be, és ebben a fehérjemediált transzportban (F6PT) a G6P ismert transzportere (G6PT) nem vesz részt. A lumenbe jutott F6P ugyan nem szubsztrátja a H6PD enzimnek, azonban egy – elsőként általunk leírt – ER-foszfoglukóz-izomeráz (ER-PGI) közreműködésével G6P-tá alakul, így táplálni tudja a luminális NADPH-termelést (2. ábra). A még azonosítatlan izomeráz gátolható fruktóz-1,6-bisz-foszfáttal, de különbözik a citoplazmában elhelyezkedő izomeráztól (PGI). Azt is bizonyítottuk, hogy a rekombináns, tisztított H6PD nem rendelkezik saját izomeráz-aktivitással.



2. ábra. Fruktóz-6-foszfát szerepe a prereceptorális kortizoltermelésben

A F6P bejut az ER lumenébe, ahol – a citoplazmaival nem azonos – foszfoglukóz-izomeráz (ER-PGI) G6P-vé alakítja, és így hozzájárulhat a lokális NADPH-termeléshez.

Emelkedett intracelluláris F6P-szint előfordulhat jóllakott állapotban, és különösen fruktózfogyasztás után. A glukózt inzulinfüggő transzporttal felvevő és hexokinázt tartalmazó sejtekben (pl. zsírsejtek), a fruktózmétabolizmus jelentősen fokozhatja a kortizoltermelést az ER-ben. Ez a mechanizmus elősegítheti a zsírsejtek differenciálódását, illetve hozzájárulhat az inzulinrezisztencia kialakulásához is. Az általunk leírt jelenség alapvető szerepet játszhat a fiziológiás szabályozásban, de fontos tényezője lehet az elhízással kapcsolatos anyagcsere-zavaroknak is.

EGCG hatása az ER kortizoltermelő képességére

A teakatekinék elhízás- és diabetes-ellenes hatása régóta ismert, ezért megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja az EGCG a fent ismertetett rendszer működését. Folyamatban lévő kutatásaink szerint az EGCG már kis koncentrációban hatékonyan gátolja az ER-ben zajló kortizonredukciót. Ezt a hatást nem az érintett transzporter (G6PT) vagy enzimek (H6PD és a 11 β HSD1) gátlása, hanem – a metiraponhoz hasonlóan – a luminális [NADPH]:[NADP] arány csökkenése révén fejt ki. Az észlelt jelenség jelentősen hozzájárulhat a teaflavanolok ismert antidiabetikus hatásához.

Következtetések és az eredmények lehetséges hasznosítása

Eredményeink megerősítették kiinduló hipotézisünket, mely szerint az ER-ben zajló kortizoltermelés közvetlenül sejtszinten összekapcsolja az intermedier anyagcserét az endokrin szabályozással, és ezáltal az organelumnak tápanyag-szenzor funkciót biztosít. Mivel az érzékelés kulcsszereplője, a H6PD minden általunk vizsgált szövetben jelen van, feltételezhetően a funkció is általános. Adataink szerint a tápanyagkínálat és a fruktó-anyagcsere intermedierei fokozzák a lokális kortizoltermelést. A leírt jelenség a fiziológiás kontroll új mechanizmusát jelenti, amelynek valószínűleg szerepe van a metabolikus betegségek kialakulásában is.

A szabályozás megismerése egyúttal potenciális gyógyszer-támadáspontokat is kínál. Ahogy ezt az EGCG-vel kapott eredmények mutatják, a G6PT, a H6PD és a 11 β HSD1 mellett a luminális [NADPH]:[NADP] arány is fontos beavatkozási pont lehet. Megfigyeléseink tehát rendkívüli jelentőséggel bírnak az elhízás, a metabolikus szindróma, illetve a diabetes megelőzése és terápiája szempontjából.