

A glikogenolízis és glukoneogenezis utolsó, közös lépését katalizáló glukóz-6-foszfát egy enzimrendszer, melyben a katalitikus alegység kevésbé specifikus, különböző foszfátésztereket tud hasítani és aktív centruma az endoplazmás retikulum lumene felé néz. A rendszer fajlagosságát a glukóz-6-foszfát transzporter (T1 vagy G6PT) biztosítja. A lumenben keletkező termékeket foszfát- és glukóz-transzporterek szállítják vissza a citoszólba. A rendszer elsősorban a májban expresszálódik és elsődleges szerepe van a vércukorszint fenntartásában. A rendszer egyes komponensei extrahepatikus megjelenésének funkciója ismeretlen, de fontos. A glikogéntárolási betegség 1b (GSD1b) altípusáért a glukóz-6-foszfát transzporter génjének mutációja felelős; a szénhidrát-anyagcsere zavarain kívül a kórképet a neutrofil granulociták funkciózavara és számának csökkenése jellemzi.

A pályázat elsődleges célja volt a glukóz-6-foszfát transzporter működésének és biológiai szerepének feltárása a granulocitákban. Vizsgálni kívántuk még a glukóz-6-foszfát rendszer elemei egyéb extrahepatikus manifesztációinak esetleges regulációs szerepét, valamint a glukóz-6-foszfát transzportertől független glukóz-6-foszfát transzportot, illetve transzportereket más sejttípusokban. Hipotézisünk szerint a glukóz-6-foszfát rendszer egyes komponensei extrahepatikus manifesztációjának, különösen a granulocita glukóz-6-foszfát transzporternek fontos, a glukoneogenezistől független szerepe van a glikogéntárolási betegség 1b típusában észlelt granulocita funkciózavarokban. A pályázat fő célkitűzései: a granulocita glukóz-6-foszfát transzporter működésének jellemzése, a transzport experimentális befolyásolása; a granulocita glukóz-6-foszfát transzporter szerepének feltárása; a granulocita és a máj glukóz-6-foszfát transzporter működésének összehasonlítása, szelektív gátlószerek keresése; más extrahepatikus szövetek glukóz-6-foszfát transzportjának vizsgálata, új glukóz-6-foszfát transzporterek keresése.

A pályázat keretében a következő kérdéseket kívántuk részleteiben vizsgálni:

A granulocita glukóz-6-foszfát transzporter működésének vizsgálata; a transzporter kinetikai jellemzői, specificitása, esetleges inhibitorai; a glukóz-6-foszfát transzporter gátlás hatása a granulocita funkciókra; a glukóz-6-foszfát felvétel szerepe az endoplazmás retikulum kalcium szekvesztrációjában permeabilizált sejteken és mikroszómális vezikulákon, a belső raktárakból történő kalcium mobilizáció útján ható ágensek hatása a granulocita funkcióira; a glukóz-6-foszfát transzporter funkció és a granulocita sejtciklus (differenciálódás, apoptózis) közötti kapcsolatok vizsgálata.

A granulocita endoplazmás retikulum luminális kompartmentumának jellemzése; glukóz-6-foszfát-dependens enzimeinek vizsgálata (glukóz-6-foszfát dehidrogenáz, hexóz-6-foszfát dehidrogenáz). A pentóz-foszfát ciklus kulcsenzimeinek aktivitásmérése. A lumenben a ciklus egyes intermedierjeinek mennyisége. Kofaktorok (NADPH, NADP⁺) intraluminális koncentrációjának és transzportjának tanulmányozása.

A glukóz-6-foszfát transzporter lokalizációjának vizsgálata; a hepatikus és granulocita glukóz-6-foszfát transzporter funkcionális összehasonlítása; máj-specifikus inhibitorok kutatása; a glukóz-6-foszfát transzporter inhibitorok által kiváltott apoptózis mechanizmusának vizsgálata; a granulocita glukóz-6-foszfát transzporter szint experimentális befolyásolásának lehetőségei és azok hatása a sejtfunkciókra; az extrahepatikus szövetekben kimutatható aspecifikus hexóz-foszfát transzport jellemzése, funkcionális és molekuláris azonosítására, esetleges szerepük feltárása.

A pályázat legfontosabb célkitűzései mind teljesültek.

A glukóz-6-foszfát transzporter extrahepatikus előfordulását vizsgálándó, antitesteket állítottunk elő három különböző peptid ellen a fehérje ismert aminosav-szekvenciája alapján. Az antitestek humán és patkány endoplazmás retikulumban felismertek egy fehérjét, melynek a látszólagos molekulatömege az SDS/PAGE alapján 33 kDa volt. Bár a várható molekulatömeg az aminosav-szekvencia alapján 46 kDa lenne, erősen hidrofób membránfehérjék esetében az eltérés a látszólagos és valóságos molekulatömeg között nem számít ritkaságnak. Az antitestek kimutatták a glukóz-6-foszfát transzporter jelenlétét vese mikroszómákban, míg humán fibrocitákban, patkány lépben és tüdőben, valamint különböző eredetű sejtvonalakban nem láttunk mérhető mennyiségű glukóz-6-foszfát transzporter fehérjét. A glukóz-6-foszfát transzporter expressziója minimális volt, vagy egyáltalán nem is volt detektálható glikogén tárolási betegség 1b típusában szenvedő betegek máj mikroszómájában (Senesi S. et al., *Biochem. J.* 389, 57-62, 2005). Az előállított antitesteket a későbbiekben még sikerrel használtuk fel a glukóz-6-foszfát transzporter kimutatására humán granulocitákban és patkány zsírszövetben.

A glikogén tárolási betegség 1b altípusában az endoplazmás retikulum glukóz-6-foszfát transzporterének hiánya nemcsak májtüneteket, hanem neutropéniát, granulocita és monocita funkciózavart is okoz. Mivel ezekben a sejtekben nincs glukóz-6-foszfátáz aktivitás, a transzporter funkciója rejtélyes volt. Humán granulocitákból és differenciálódott HL-60 sejtekből származó mikroszómákon ki tudtuk mutatni a glukóz-6-foszfát transzportját,

melynek kinetikai jellegzetességei hasonlóak voltak a máj mikroszómákéihoz. A transzportot gátolni lehetett a máj transzporter specifikus gátlószerével, a klorogénsav származék S3483-mal. Ez a molekula granulocitákban és differenciálódott HL-60 sejtekben apoptózist okozott, melyet antioxidánsokkal, illetve a prooxidánsokat termelő NADPH oxidáz gátlásával meg lehetett előzni. (Kontroll kísérletekben az S3483 hatástalan volt differenciálatlan HL-60 sejtekben és Jurkat limfocitákban.) Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a transzporter szerepet játszik az endoplazmás retikulum lumen redox státuszának fenntartásában. A transzport(er) hiányában a prooxidáns hatások dominanciája endoplazmás retikulum eredetű apoptózishoz vezet (Leuzzi *et al.* 2003, *Blood* 101, 2381-2387). Ez az első, kísérleti eredményekkel is alátámasztott hipotézis a glikogén tárolási betegség 1b altípusában jelentkező neutrofil granulocita funkciózavar magyarázatára.

A glukóz-6-foszfát az endoplazmás retikulum lumenében a glukóz-6-foszfátázon kívül a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim szubsztrátja is lehet. Ez az enzim két – dehidrogenáz és laktonáz – aktivitással rendelkezik, és előfordulása a máj endoplazmás retikulum lumenében jól ismert. Az enzim NAD(P)H-t termel, mely különböző redukzív folyamatokban használódhat fel. Ezek közül az egyik legfontosabb a 11β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa által katalizált reakció, melyben a kortizon kortizollá redukálódik. A kortizol prereceptorális, sejten belüli aktivációjának fontos szerepet tulajdonítanak a metabolikus szindróma patogenezisében. A két enzim - a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz és a 11β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa – közötti kooperáció funkcionális jelentőségét mutatja, hogy a két enzim együttes mutációja policisztás ovárium szindrómát okoz. A kooperáció metabolikus alapjait megvizsgáltuk patkány máj mikroszómális vezikulákban. Azt tapasztaltuk, hogy mindkét enzim aktivitása latens, összhangban aktív centrumuk intraluminális elhelyezkedésével. Glukóz-6-foszfát adása fokozta a 11β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa kortizon reduktáz aktivitását. A glukóz-6-foszfát transzport gátlása S3483 adásával kivédte a hatást. Kortizon adása fokozta a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitását, amit a radioaktív glukóz-6-foszfát oxidációjából származó metabolitok intravezikuláris akkumulációja alapján mértünk. Korrelációt észleltünk a glukóz-6-foszfát-függő kortizon redukció és a kortizon-függő glukóz-6-foszfát oxidáció között. Az eredmények azt mutatják, hogy a két enzim közötti funkcionális kapcsolat a ko-kompartimentáción és a kölcsönös kofaktor generáláson alapul (Bánhegyi G. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279, 27017-27021, 2004).

Kifejlesztettünk egy fluorimetriás módszert az endoplazmás retikulum intraluminális piridin nukleotidjai redukáltsági állapotának mérésére. A módszer segítségével direkt módon

is bizonyítottuk, hogy a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitás a NADP redukciójával, míg a 11β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus reduktáz aktivitása a NADPH oxidációjával jár. Ennek megfelelően glukóz-6-foszfát vagy kortizol adása emelte, míg kortizon, metirapon, dehidroaszorbát vagy FAD adása csökkentette a mikroszómák intraluminális NADPH koncentrációját (Czeglé I. et al., *Mol. Cell. Endocrinol.* 2005 Dec 5; [Epub ahead of print]). Az *in vivo* észlelhető kortizon reduktáz aktivitás azt jelzi, hogy az endoplazmás retikulum intraluminális piridin nukleotidjai túlnyomórészt redukált állapotban vannak. Ez ellentmondásban van azzal a nézettel, mely a lument oxidáló kompartmentumnak tekinti. Ezt tanulmányozandó, megvizsgáltuk a piridin nukleotidokra, illetve a tiol-diszulfid rendszerre ható redukáló és oxidáló ágensek hatását. Azt tapasztaltuk, hogy a piridin nukleotidok adása nem befolyásolta a mikroszómális tiolok redox állapotát, és viszont, GSSG vagy GSH adása sem befolyásolta a piridin nukleotidok redukáltsági állapotát. A glukóz-6-foszfát transzporter gátlása S3483-mal kivédte a glukóz-6-foszfát adásával okozott piridin nukleotid redukciót. A két redox rendszer szétkapcsolt működésének az oka, hogy a lumenben nincs jelen a glutation reduktáz (Piccirella S. et al, *J. Biol. Chem.* 2005 Dec 22; [Epub ahead of print]).

Célul tűztük ki a glukóz-6-foszfát transzporter extrahepatikus megjelenése patofiziológiás szerepének megismerését. Ehhez a transzporter olyan lehetséges funkcióit vizsgáltuk, amelyek nincsenek összefüggésben a glukoneogenezissel. A glukóz-6-foszfát transzporter egyik ilyen lehetséges funkciója egyéb (nem glukóz-6-foszfát) anionok transzportjának facilitálása lehet. A szteroid szulfatáz enzim szerkezetének és topológiájának ismeretében felvetődik a szulfát anion endoplazmás retikulum membránon keresztüli transzportjának fontossága. Az enzim a lumenben termel szulfátot, amelynek kijutása a citoplazmába valamilyen fehérje részvételét igényli. Gyorsszűrési és fényszórásos módszereket alkalmazva elsőként mutattuk ki a szulfát kétirányú mikroszómális transzportját. A transzporterről megállapítottuk, hogy az alacsony affinitású, nagy kapacitású és prototipikus aniontranszport-gátlószerezrel, DIDS-szel gátolható. Indirekt módszerekkel kizártuk a foszfát transzporterek szerepét; kimutattuk, hogy foszfát transzport ismert gátlószerei, és magas koncentrációjú foszfát a szulfát transzportjának sebességét nem befolyásolta. A glukóz-6-foszfát transzporter gátlószere, az S3483 azonban koncentrációfüggően hatott a szulfáttranszportra. Ennek alapján feltételeztük a glukóz-6-foszfát transzporter közvetlen szerepét, de ennek ellent mond az, hogy méréseink alapján a szulfát és a G6P között gyenge a kompetíció. A glukóz-6-foszfát transzportert overexpresszázó COS-7 sejtvonalon végzett kísérletek szintén nem erősítették meg a glukóz-

6-foszfát transzporter részvételét a szulfátranzportban (Csala M. et al, *Arch. Biochem. Biophys.* 440, 173-180, 2005).

Tovább vizsgáltuk a glukóz-6-foszfát rendszer és az endoplazmás retikulum intraluminális homeosztázisának kapcsolatát humán granulocitákban. Az előző években kapott eredményeink valószínűsítették, hogy a glukóz-6-foszfát transzporter (T1) gátlása endoplazmás retikulum stresszt okoz és így vált ki apoptózist humán granulocitákon és differenciált HL-60-as sejteken. Megvizsgáltuk a lehetséges aktivációs utakat, amik az apoptózishoz vezetnek. Kimutattuk, hogy 24 órás S3483 kezelés kaszpáz 3 aktivációt hoz létre. Ezt az aktivációt a sejtek egyidejű kortizol, ill. trolox C (E-vitamin analóg) kezelése kivédte. A kortizol antiapoptotikus hatása háttérében a 11 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának NADPH generáló hatását feltételezzük. Ezt támasztja alá, hogy granulocitákban ki tudtuk mutatni mind a glukóz-6-foszfát transzportert, mind a hexóz-6-foszfát dehidrogenázt, mind a 11 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusát, mRNS, fehérje és aktivitás szintjén egyaránt. Azt észleltük, hogy a kortizol antiapoptotikus hatása csak szuprafiziológiás koncentrációk esetében érvényesül, tehát a hatás metabolikus és nem receptoriális. Ennek megfelelően a 11 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának gátlása karbenoxolonnal kivédte a kortizol antiapoptotikus hatását. Az eredményeket tartalmazó kézirat megírás alatt áll.

Patkány epididimális zsírszövetben szintén ki tudtuk mutatni a teljes rendszert, vagyis mind a (máj típusú) glukóz-6-foszfát transzportert, mind a hexóz-6-foszfát dehidrogenázt, mind a 11 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusát, mRNS, fehérje és aktivitás szintjén egyaránt. A rendszernek szerepe lehet a metabolikus szindrómában kialakuló obezitás patomechanizmusában. A kéziratot közlésre benyújtottuk.

Összefoglalva: a glukóz-6-foszfát transzporter extrahepatikus manifesztációi vizsgálva kimutattuk a fehérje jelenlétét és funkcióját humán granulocitákban és patkány epididimális zsírszövetben. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a nem-glukoneogenetikus szövetekben a transzporter legfontosabb feladata a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz szubsztrátellátása, s így az intraluminális NADPH generálás. A NADPH termelés célja lehet az antioxidáns homeosztázis fenntartása (granulocita), vagy a 11 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának kofaktor ellátása (máj, zsírszövet). Az eredmények szerint a glukóz-6-foszfát transzporter és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz fontos terápiás célpont lehet a metabolikus szindróma gyógyszeres kezelésében.

Schematic representation of the proposed role of G6PT in extrahepatic tissues

