

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**GLIKOGÉN FOSZFORILÁZ INHIBITOROK ÚJSZERŰ
METABOLIKUS HATÁSAI**

Nagy Lilla Nikoletta



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2017

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

GLIKOGÉN FOSZFORILÁZ INHIBITOROK ÚJSZERŰ METABOLIKUS HATÁSAI

Nagy Lilla Nikoletta

Témavezető: Dr. Bay Péter



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2017

GLIKOGÉN FOSZFORILÁZ INHIBITOROK ÚJSZERŰ METABOLIKUS HATÁSAI

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Nagy Lilla Nikoletta okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Bay Péter, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Sipeki Szabolcs, PhD
Dr. Mádi András, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet Könyvtára
2017. szeptember 26., 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Balla András, PhD
Dr. Fülöp Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Balla András, PhD
Dr. Fülöp Péter, PhD
Dr. Sipeki Szabolcs, PhD
Dr. Mádi András, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme
2017. szeptember 26., 13:00 óra

BEVEZETÉS

Glikogén metabolizmus

A glikogén a D-glükóz poliszacharidja, funkciója a glükóz raktározása állatokban. Glikogén tárolásra majdnem minden emlős sejt képes, de a két legfőbb glikogénraktár a máj és a vázizom. Táplálkozás után a felesleges glükózból a glikogenezis során épülnek fel a glikogénraktárak. Ezt a folyamatot a glikogén szintáz (GS) katalizálja a glikogén elágaztató enzimmel együttműködve. Az ezzel ellentétes folyamat a glikogén lebontása, más néven glikogenolízis, lehetővé teszi a glükóz felszabadulását a glikogénraktárakból a sejtek energiaszükségletének fedezésére. E folyamat sebesség meghatározó enzime a glikogén foszforiláz (GF). A GF enzimnek fiziológiai hatás szempontjából három különböző izoformája van, melyeket különböző gének kódolnak. Az izom GF az izom összehúzódást támogatja, a máj izoenzim központi szerepet játszik a vércukorszint szabályozásában, az agy izoenzim pedig az oxigénhiányos és hipoglikémiás állapotok esetén biztosítja a glükózt az agyműködéshez. Mindhárom GF izoforma ugyanazt a reakciót katalizálja, melyben a glikogén nem redukáló végeiről monoszacharid egységeket hidrolizál. Minden egyes cukoregység glükóz-1-foszfát (G1P) formájában szabadul fel és készen áll belépni a katalitikus útvonalakba, valamint a G1P átalakulhat glükóz-6-foszfáttá (G6P), így támogatva az ATP termelő folyamatokat. A máj G6Páz enzim segítségével képes eltávolítani a glükóz foszfátcsoportját, ezzel biztosítva szabad utat a glükóz véráramba kerülésének.

Glikogén foszforiláz enzim és gátlása

A biológiailag aktív dimer GF enzimnek van egy foszforilált, általában aktív és egy defoszforilált, általában inaktív formája. A GF foszforilációját a foszforiláz kináz végzi, míg a defoszforilációjáért, így inaktiválásáért a protein foszfatáz 1 (PP1) a felelős. A GF enzim hét kötőhellyel rendelkezik: a katalitikus, a gátló, az allosztérikus, a glikogén, az indol, a benzimidazol és a quercetin kötőhely. Mindegyik kötőhely, kivétel a glikogén kötőhely, a GF enzim allosztérikus szabályozásának egy potenciális célpontja. Az ATP, glükóz és G6P a GF fiziológiai inhibitorainak tekinthetők. Ezért úgy vélik, hogy azok a GF inhibitorok, amelyek a glükóz vagy G6P hatását utánozzák, vagy kapcsolódnak a GF más kötőhelyeihez és szinergisztikusan hatnak a glükózzal, képesek gátolni a glikogenolízist és stimulálni a glikogenezist. Így nem meglepő a glükóz analóg GF inhibitorok nagy száma, melyek elsősorban a katalitikus helyhez kapcsolódnak, így gátolva a szubsztrátok katalitikus helyhez történő kötődését, habár képesek az allosztérikus kötőhelyhez is kapcsolódni. Az N-acetil- β -D-glükopiranozilaminok az első hatékony glükóz analóg GF inhibitorok között voltak. Az

általunk alkalmazott KB228, BEVA335, TH, NV50 és NV76 glükóz analóg vegyületeket Dr. Somsák László laboratóriumában szintetizálták a Debreceni Egyetem Szerves Kémia Tanszékén. Referencia inhibitorként az indole-2-karboxamidok közé tartozó CP-316819 GF gátlószert használtuk, mely az új allosztérikus kötőhelyhez kapcsolódik, így segítve elő az aktív GF enzim defoszforilálását, így inaktiválását. A CP-316819 vegyület biztonságosságát fázis I. klinikai kutatások befejeztével igazolták. A GF enzim, a glikogén lebomlás katalizálása révén hozzájárul a máj glükóz termeléséhez, így a vércukorszint szabályozásának potenciális célpontjává vált a 2-es típusú cukorbetegségben.

Glikoszóma

A fehérjék egy része, beleértve a glikogén metalizmus enzimeit, kapcsolódik a glikogén szemcsékhez azért, hogy fenntartsa annak struktúráját, illetve szabályozza a szemcsék méretét, számát és sejten belüli lokalizációját. Ezek a makromolekuláris komplexek, a glikoszómák, olyan morfológiailag elkülönült sejtorganelumok, melyek képesek a glikogén metabolizmus hatékony szabályozására. Továbbá mikroszkopikus vizsgálatok során bizonyították a glikoszómák kapcsolódását különböző sejten belüli struktúrákhoz úgy, mint az endoplazmatikus retikulum és mitokondrium, vagy izomsejt specifikusan a szarkoplazmatikus retikulum, β -aktin, α -aktinin és simaizom tropomiozin. Ennek következtében a glikogén partikulumok, mint szubcelluláris kompartmentek képesek válaszolni a sejtek metabolikus követelményeire térben és időben szabályozottan.

A glikogén metabolizmus hormonális szabályozása

A glikogénraktárak dinamikus változása számos hormon által szabályozottan történik. Az inzulin a glikogén szintézisét támogatja, míg az ellentétes hatású hormonoknak – glukagon, adrenalin, kortizol és a növekedési hormonok – glikogenolitikus hatásuk van. Az inzulin a biológiai hatását saját receptorán keresztül fejt ki. Az aktivált inzulin receptor számos downstream szubsztrátot és dokkoló fehérjét foszforilál, köztük a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K) és a protein kináz B (Akt) útvonalat aktiválja. A PI3K működése okozza az Akt és a 3-foszfoinozitol-függő protein kináz-1 (PDK1) sejtmembránhoz történő lokalizációját. A PDK1 foszforilálja és aktiválja az Akt enzimet a 308-as treonin oldalláncon. Az Akt teljes aktivitásához viszont szükséges egy másik oldallánc foszforilációja. A 473-as szerin oldallánc egy mTORC2-specifikus foszforilációs hely. Az mTOR - emlős sejtekben jelen lévő rapamicin egyik célpontja (mammalian target of Rapamycin) - egy szerin/treonin protein kináz, melynek nagy szerepe van a metabolikus szabályozásban. Az mTORC2 indukciója

beindítja a tápanyag raktározást (glikogén, zsírsavszintézis) és a glikolízist, valamint gátolja a máj glükóz termelését az Akt aktiválásán keresztül.

A hasnyálmirigy β sejtek és a PDX1 transzkripciós faktor

A hasnyálmirigy β sejtek az inzulin szintézisére, tárolására és szekretálására specializálódtak, így képesek válaszolni a szervezet tápláltsági állapotára. A pankreász és duodenális homeobox 1 (PDX1) transzkripciós faktor kulcsszerepet tölt be a hasnyálmirigy fejlődésének korai szakaszában, a β sejtek differenciálódásában és az érett β sejtek fennmaradásában. A β sejtekben a PDX1 sejtmagi transzlokációja számos gént transzaktivál, köztük a glükóz-stimulált inzulin szekrécióban, glükóz érzékelésben és metabolizmusban szerepet játszó enzimek, illetve az inzulin génjét. A β sejt érése folyamán számos, az inzulin szekrécióban részt nem vevő és ezáltal nem támogatott metabolikus útvonal (laktát termelés vagy pentóz foszfát útvonal) génje még az élet korai szakaszában represszálódik. Ez egy β sejt specifikus génexpressziós mintázatot eredményez. A β sejtekben egy erős kapcsolat alakult ki a glikolízis és a mitokondriális metabolizmus között. A glikolízist követően a citromsav ciklus indukálta elektrontranszport a mitokondriális membrán hiperpolarizációjához és ATP termeléshez vezet. Az intracelluláris ATP kötődik az ATP-szenzitív K^+ csatornához, amely ezt követően záródik és ez a sejt depolarizációjához vezet. Ezt követi a feszültség vezérelt Ca^{2+} csatornák nyitása, és az így létrejövő Ca^{2+} beáramlás előidézi az inzulin tartalmú szekretoros vezikulumok exocitózisát. A milliányi β -sejtből kiszabaduló inzulin a véráramba kerül, és a szervezet sejtjein saját receptoraihoz való kapcsolódása révén fejti ki hatását. Tekintettel arra, hogy a β sejtek is rendelkeznek inzulin receptorral, valószínűsíthető az inzulin autokrin hatása a β sejtek funkciójára és szabályozására.

2-es típusú diabétesz mellitusz és az általa okozott változások az anyagcserében

A diabétesz mellitusz a leggyakoribb endokrin és anyagcsere rendellenesség egyre fokozódó prevalenciával. A diabéteszes esetek 90–95%-áért felelős 2-es típusú diabétesz mellituszt (T2DM) a genetikai hajlam és a környezeti faktorok (kevés testmozgás, elhízás, rossz táplálkozás) együttesen alakítják ki. Jellemzője az inzulin rezisztencia, a magas vércukorszint és a hasnyálmirigy β sejtek működésének zavara. Az elhízás az inzulin rezisztencia kialakulásának legfőbb oka, mivel a zsírszövet méretének növekedése hypoxiát okoz és stresszt indukál a zsírsejtekben, ami a gyulladás kialakulásához vezet. A gyulladási faktorok által beindított útvonalak pedig az inzulin jelátvitelt blokkolják. Inzulin rezisztens állapotban a fehérzsírszövet sejtjeinek inzulin-mediált glükózfelvétele leáll. Az energiahány következtében megindul a lipolízis és a zsírsav felszabadulás. A krónikus lipolízis és a plazma

megnövekedett szabad zsírsav szintje inzulin rezisztencia kialakulásához vezet vázizomban és májban, ami csökkenti a mitokondriumok oxidatív foszforilációját. Normális esetben a plazma megnövekedett szabad zsírsav szintje stimulálja az UCP2 mitokondriális szétkapcsoló fehérje kifejeződését és aktivitását, így kapcsolva át a sejt anyagcseréjét a glükóz oxidációról a zsírsav oxidációra. Az UCP2 egy mitokondriális intermembrán ion transzporter, ami a protoncsorgásért és így a sejtlégzés ATP termelésétől való szétkapcsolásáért felelős. Az UCP2 érzékeli és negatívan szabályozza a reaktív oxigéngyökök (ROS) keletkezését, így fejtve ki citoprotektív hatást. A ROS termelődésének oka lehet a túlzott glükózfelvétel és lebomlás, illetve a fokozott zsírsav felvétele és katabolizmusa. Ezzel párhuzamosan a megnövekedett UCP2 expresszió a fehér zsírszövetben és vázizomban csökkenti az elhízás veszélyét, ami a T2DM kialakulásának legfontosabb rizikófaktora.

A májban az inzulin hatásának elmaradása növeli a glükoneogenezist, amely mértéktelen glükóz felszabaduláshoz vezet, tovább növelve a magas éhgyomri vércukorszintet. Különböző inzulin rezisztens és T2DM állatmodellekben fokozott glikogénlebontás volt megfigyelhető. Eszerint, a GF gátlása fokozhatja a glükóz toleranciát és csökkentheti a máj glükóz termelését.

A T2DM kialakulásának korai szakaszában a Langerhans szigetek fokozott működése figyelhető meg a kompenzációs mechanizmusnak köszönhetően, amelyet egyrészt a β sejtek mennyiségének növekedése, másrészt fokozott inzulintermelésük biztosít. A tünetek akkor súlyosbodnak, ha ez az adaptív mechanizmus kimerül, és nem bírja tovább fedezni a megnövekedett inzulin szükségletet.

Az inzulin hatásának elmaradása fokozott glukagon termelést eredményez akkor is, ha a vércukorszint igen magas és a szövetek már nem képesek több glükóz felvenni. Az izom, a máj és a zsírszövet nem lesz képes érzékelni a szervezet tápláltsági állapotát.

CÉLKITŰZÉSEK

A glikogén foszforiláz (GF) enzimgátlás egy potenciális célpontja a vércukorszint szabályozásának 2-es típusú cukorbetegségben. Egy jó gátlási állandójú glükóz analóg GF inhibitor, a KB228 vegyületet alkalmaztuk egyrészt normál és magas zsírtartalmú diétán tartott egerekben, másrészt HepG2 és C2C12 sejteken, mint a metabolikus szervek – máj és vázizom - sejtés modelljein.

1. A következő célokat tűztük ki:

- KB228 vegyület alkalmazhatóságának meghatározása,
- a KB228 inhibitor glükóz metabolizmusra tett *in vivo* hatásainak feltérképezése,
- a KB228 vegyület glükóz metabolizmusra tett *in vitro* hatásainak vizsgálata HepG2 sejteken,
- a HepG2 sejtek génexpressziós profiljának elkészítése a fő metabolikus útvonalak markergénjeinek vizsgálatával,
- valamint az energia homeosztázisban fontos protein kinázok aktivitásának vizsgálata.

Figyelembe véve, hogy a hasnyálmirigy β sejtek állnak a diabétesz kutatások középpontjában, a következőkben a MIN6 inzulinóma sejtek, mint a β sejtek modellje, vált kutatásunk célpontjává. Tovább folytattuk *in vivo* vizsgálatainkat a KB228 jelű vegyülettel, míg az *in vitro* kísérletekben 3 különböző GF inhibitor használtunk (KB228, BEVA335 és CP-3016819).

2. Céljaink a következők voltak:

- MIN6 sejtekben a glikogén metabolizmus és a glikogén lokalizációjának meghatározása,
- feltérképezni a glikogén-kapcsolt fehérjét *in silico* elemzés során,
- megvizsgálni a GF gátlás hatását a sejtsztódásra és az inzulin termelésre *in vivo* és *in vitro*.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Anyagok

Ha másképp nincs jelölve, a reagenseket és vegyszereket a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) cégtől szereztük be, beleértve a CP-31819 GF inhibitor és a wortmannin (WM) PI3K inhibitor.

A glükóz analóg GF inhibitorokat – KB228, BEVA33, TH, NV50 és NV76 – a Debreceni Egyetem Szerves Kémia Tanszékén Dr. Somsák László laboratóriumában állították elő.

Állatkísérletek

A C57/Bl6J hím egerek egy része normál (10 kcal% zsírtartalmú), másik része magas zsírtartalmú (HFD, hiperkalorikus diéta, 60% zsírtartalom) táplálékot kapott. Az egerek randomizálást követően kerültek a kontroll és a kezelt csoportokba. A a kontroll csoportot vehikulummal (fiziológiás sóoldat + 1% DMSO) kezeltük, míg a másik csoportot 90 mg/tt. kg KB228 GF inhibitor egyetlen intraperitoneális (i.p.) bolus injekcióval kezeltük heti 1 alkalommal 5 egymást követő héten. 2 órával az injekció beadása után történtek a mérések és a szervek (máj, lábikra izom és hasnyálmirigy) eltávolítása.

Intraperitoneális glükóz tolerancia teszt (ipGTT)

Az állatokat 8 órán keresztül éhezettük a kísérletet megelőzően. A glükóz méréséhez minden egyes állat perifériális vérének egy cseppjét gyűjtöttük be a farkuk végének levágásával, majd elkezdtük a vércukorszint mérését Accu-Chek (Roche) kézi mérőeszközzel. Ezt követően minden állat kapott egy i.p. glükóz (20% m/m) injekciót (10 μ L/g testtömeg). A vércukorszintet rendszeresen, a megadott időpontokban mértük minden egyes állat esetében.

Indirekt kalorimetria

Az indirekt kalorimetria vizsgálathoz a CLAMS system (Columbus Instruments Comprehensive Laboratory Animal Monitoring, Columbus, OH, Amerikai Egyesült Államok) nevű berendezést alkalmaztunk, amely lehetővé teszi különböző fiziológiai és viselkedési paraméterek nem invazív, 24 órás, automatizált mintagyűjtését. Az első 24 órában az egerek hozzászoktak az új környezetükhöz. Dél előtt 8 órakor egy i.p. glükóz injekciót kaptak (KB228 (90 mg/kg) vagy vehikulum), aztán visszahelyeztük őket a mérőketrecekbe. Az ezt követő 6 órában az oxigénfogyasztásukról és a szén-dioxid termelésükről rögzítettük az adatokat.

A glükózfelvétel mérése

A glükózfelvétel méréséhez izofurán anesztézia során 120 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ ^{14}C -2-deoxiglükózt és 20 U/kg inzulint injektáltunk az egerek juguláris vénájába. A vércukorszint változását a következő 15-30 percen nyomon követtük. 30 perc múlva az állatok cervikális diszlokációt követő halála után, a vizsgálatokban felhasznált szerveiket eltávolítottuk, lemértük a szervdarabok tömegét, és azokat 0.5 mL 1 M NaOH-ban lizáltuk (70°C 60 perc). A lizátumokat Aqualight HIBEX (PerkinElmer Life Sciences, Hollandia) szcintillációs folyadékkal összekevertük, majd Wallac szcintillációs számláló segítségével lemértük (PerkinElmer, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok).

A hasnyálmirigy glikogén tartalmának hisztokémiai vizsgálata

A hasnyálmirigy szövet glikogén tartalmát PAS-festéssel (Periodic Acid Schiff) határoztuk meg. A mikroszkópos vizsgálatokat Zeiss Axioscope 20 mikroszkóppal végeztük Plan NEOFLUOR 40x objektív alkalmazásával. A képeket Leica Application Suite V4.8 szoftverrel dolgoztuk fel. A glikogén mennyiségét a festés intenzitásának mérésével (Image J szoftver) határoztuk meg, mikor is az intenzívebb PAS festődés egyenesen arányos a magasabb glikogén tartalommal.

Inzulin immunhisztokémia és szigetméret meghatározás

Az inzulin detektálására inzulin-specifikus tengerimalac poliklonális antitestet (DAKO, Glostrup, Dánia; 1:100) használtunk, majd mosást követően Envision one-step polymer HRP-vel (BioGenex Fremont CA, Amerikai Egyesült Államok) inkubáltuk a metszeteket. A színreakció kifejeződéséhez szubsztrátként nikkel 3,3'-diaminobenzidin tetrakloridot (Ni-DAB) alkalmaztuk. 2 perc reakciót 50 mM Tris-HCl-ban (pH 7.4) történő öblítés követett, majd a színt 2 perces 2% kobalt kloridban történő inkubálással mélyítettük el. 1% metilzöld oldattal háttérfestést végeztünk. Minden futásban alkalmaztunk negatív immunhisztokémiai kontrollt. A mikroszkópos vizsgálatokhoz Zeiss Axioscope 20 mikroszkópot használtunk. A képeket Leica Application Suite V4.8 szoftver segítségével értékeltük. A szigetméretet Image J szoftver alkalmazásával mértük le és μm^2 -ben adtuk meg.

Sejtkultúrák

HepG2 humán hepatokarcinóma és C2C12 egér mioblaszt sejtvonalakat az ATCC-től (Manassas, VA, Amerikai Egyesült Államok) szereztük be. A diabétesz mellitusz által indukált magas vércukorszint eléréséhez a 25 mM glükóz tartalmú médiumot használtuk, míg a normálállapotot az 5.5 mM glükóz tartalmú médium alkalmazásával demonstráltuk. A

MIN6 egér inzulinóma sejt vonalat Dr. J. Miyazaki (Osaka Orvosi Egyetem, Japán) biztosította és Dr. P. Halbantól (Genfi Egyetem Orvostudományi Kar, Svájc) szereztük be. A MIN6 sejteket 25 mM glükóz tartalmú DMEM médiumban tartottuk fenn, a sejtek kezelését és mérését 5.5 mM glükóz tartalmú DMEM médiumban végeztük. A mérések a kezeléseket követően az indikáció szerinti 1 vagy 2 napon belül történtek. A Wortmannin nevű PI3K inhibitor pedig a GF inhibitorokkal történő kezelés utolsó órájában adtuk a sejtekhez.

Biokémiai glikogén meghatározás

KOH-etanolos módszer segítségével végeztük a glikogén extrakcióját, majd fenol-kénsavas módszerrel meghatároztuk a glikogén mennyiségét. A minták abszorbanciáját 10-30 percen belül 450 nm-en lemertük. A kapott értékeket a minták fehérjetartalmára normalizáltuk sejtek esetében, az egerek esetében pedig a májdarab nedves tömegét vettük alapul.

RNS izolálás, reverz transzkripció és RT-qPCR

A sejtekből totál RNS-t izoláltunk TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, Amerikai Egyesült Államok) reagens alkalmazásával, követve a gyártó utasításait. Az RNS 2 µg-ját használtuk fel reverz transzkripcióhoz (RT), majd tízszeresen hígított cDNS mintákat használtunk a valós idejű kvantitatív PCR (qPCR) reakcióhoz, melyhez qPCR Supermixet (qPCRBIO SyGreen Mix, Nucleotest Bio Kft., Magyarország) és a vizsgálni kívánt gének primerjeit használtuk. Az RT-qPCR-t Light-Cycler 480 II készülékkel (Roche Applied Science, Penzberg, Németország) végeztük. A génexpresszió normalizálása három kontroll gén (β -aktin, ciklofillin, 36B4 és/vagy GAPDH) geometriai átlagára történt.

Fehérje extrakció és Western blot

A HepG2 sejtek és egér máj homogenizátumok lizálása RIPA pufferben történt. A MIN6 sejtek lizálása homogenizáló pufferrel történt. A MIN6 sejtek homogenizálása, majd centrifugálása után a felülúszó a citoplazmatikus frakciót, a pellet pedig a nukleáris frakciót tartalmazta. A pellet további izolálási lépéseket igényelt.

A kapott fehérjék molekulatömeg szerinti szétválasztását 10-12%-os SDS-PAGE-sel végeztük, amiről a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltunk blottolás során. A megfelelő antitestekkel jelölt blottokon Fluorchem FC2 Imager készülékkel detektáltuk a kemilumineszcens jelet. A denzitometrálist Image J szoftver alkalmazásával végeztük.

Az oxigénfogyasztás és az extracelluláris savasodás meghatározása

Az HepG2 oxigénfogyasztásának (oxygen consumption rate -OCR, a mitokondriális oxidáció mérése) meghatározása XF96 oximéter (Agilent Technologies, Santa Carla, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) segítségével történt. Az OCR alapvonal felvétele után a sejtek 3 μ M KB228 GF inhibitor kaptak. Ezt követően óránként mértük az OCR értékét. Az utolsó adat rögzítése 8 órával a kezelés után történt. Az adatokat a fehérje mennyiségére normalizáltuk.

Az OCR és a pH értékének (extracellular acidification rate -ECAR, glikolízis mérése) változását MIN6 sejtekben szintén XF96 oximéter segítségével mértük, ahol a MIN6 sejteket a mérést megelőző 1 vagy 2 napig kezeltük. Az alapvonal felvétele után az OCR és ECAR értékeit 3 percenként rögzítettük 1 órán keresztül.

Konfokális mikroszkópia

A MIN6 sejteket üveg fedőlemezekon növesztettük 1 napig, majd egy éjszakán át glükózmentes médiumban éhezettük. Következő reggel a sejteket 500 μ M fluoreszcens D-glükóz analóggal (2-NBDG) (Cayman Chemicals Company, Michigan, Amerikai Egyesült Államok) inkubáltuk, majd 5.5 mM glükóz tartalmú DMEM médiumban hagytuk a sejteket 1 napra. Ezt követte a metanolos fixálás, a mosás, majd a blokkolás. A jelölés elsődleges antitesttel (Inzulin receptor β , Cell signaling, 1:50) nedves kamrában 1 éjszakán át 4°C-on történt. A másodlagos antitesttel (Alexa Fluor® 647 számár anti-nyúl IgG (H+L), Life Technologies, 1:1000), történő jelöltést, majd mosást követően DAPI magfestést alkalmaztunk, majd rögzítettük a lemezeket tárgylemezre. A képek elkészítése Leica TCS SP8 konfokális mikroszkópon HC PL APO CS2 63x/1.40 OIL immerziós objektívvel, DMI6000 CS mikroszkópon történt. A képek feldolgozására LAS X 2.0.1.14392 szoftvert alkalmaztunk. A másodlagos antitestek nem specifikus kötődését kontroll kísérletekben ellenőriztük.

Elektronmikroszkópia

A GF inhibitor kezelést követően a sejtelleket ferrocianid-redukált ozmium módszerrel készítették elő elektronmikroszkópos vizsgálatra. A fixálás, mosás, dehidratálás, majd beágyazást követően kapott ultra vékony metszeteket JEOL 1010 transzmissziós elektronmikroszkópon vizsgáltuk. A képek 6000-10000x-es nagyítással készültek Olympus Veleta CCD kamera felhasználásával. A digitalizált képeket Adobe Photoshop CS5 szoftver segítségével kaptuk. A morfológiai analízist Image J szoftverrel végeztük. A festés

specificitásának ellenőrzésére negatív kontrollt készítették, ahol a sejtek egy része végigment ugyanezen a folyamaton a kálium-ferrocianid hozzáadása nélkül.

Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásának meghatározása

A MIN6 sejteket üveg fedőlemezekon növesztettük és kezeltük GF inhibitorokkal 1 illetve 2 napig. A kezeléseket követően a sejteket 5 μM Fura-2AM fluoreszcens Ca^{2+} indikátor festékkel (Molecular Probes) töltöttük 90-120 percen át, majd a lemezeket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (InCyte IM2 system, Intracellular Imaging Inc., Cincinnati, OH, Amerikai Egyesült Államok). A sejteket 340 és 380 nm-es fényel (excitáció) gerjesztettük és a képeket 510 nm (emisszió) hullámhossz felett készítettük. A sejteket a stabil alapvonal felvétele után (min. 60 másodperc) 20 mM glükóz oldattal indukáltuk.

Inzulin felszabadulás MIN6 sejtekből

Az inzulintermelés mérésére Mouse Insulin ELISA Kitet (Mercodia, Winston Salem, N.C., Amerikai Egyesült Államok) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A sejteken mérés előtt lecseréltük a médiumot (5.5 mM glükóz tartalmú DMEM médium) és 2 perc elteltével mintát vettünk belőle. A kapott értékeket a minták fehérjemennyiségére normalizáltuk.

Glükóz-indukált inzulin felszabadulás mérése MIN6 sejtekben

A MIN6 sejteket 96 lyukú lemezen növesztettem ~80% konfluencia eléréséig. Az alap inzulintermelés meghatározásához 1 mM glükóz tartalmú puffert használtunk. A sejteket 1 órán át 20 mM glükóz tartalmú Krebs-Ringer foszfát pufferben indukáltuk. Az inkubáló médiumokat begyűjtöttük, lecentrifugáltuk, majd hígítottuk. Az inzulin koncentrációjának meghatározására Mouse Insulin ELISA Kitet alkalmaztunk. A kapott értékeket a fehérjemennyiségekre normalizáltuk.

Totál inzulin protein meghatározása MIN6 sejtekben

MIN6 sejteket kezelés után begyűjtöttük és a savas-etanolos extrakciót egy éjszakán át -20°C -on végeztük. A következő nap a mintákat lecentrifugáltuk, a vizes oldatot két részre osztottuk. Egyik részét Tris bázissal neutralizáltuk, majd tovább hígítottuk Insulin ELISA 0 kalibráló oldattal és Mouse Insulin ELISA Kittel végeztük a meghatározást. A másik részét fehérjekoncentráció mérésére használtuk és a kapott értékeket a fehérjemennyiségekre normalizáltuk.

Transzfekció és Luciferáz assay

5 µg PDX1 promóter konstruktot (-6500STF-1luc plazmid Marc Montminy-től (Salk Institute, La Jolla, CA, Amerikai Egyesült Államok) és 1 µg β-galaktozidáz expressziós plazmidot transzfektáltunk a sejtekbe 150 mM NaCl tartalmú Pei (Polyethylenimine) transzfekciós reagens alkalmazásával. A sejtek feltárását követően a lizátumot centrifugálással tisztítottuk, és két részre osztottuk. Egy részét a β-galaktozidáz aktivitás méréséhez használtuk. Másik részét a luciferáz aktivitásának méréséhez használtuk fel és Victor Luminescence Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) készülékkel detektáltuk. A Luciferáz aktivitást a β-galaktozidáz aktivitásra normalizáltuk.

Glikogénköti fehérjék *in silico* analízise

A glikogénnel potenciálisan kapcsolódó fehérjék listáját tartalmazó adatbázis az UniProt adatbázis többszörös lekérdezéséből áll össze (<http://www.uniprot.org>). A kapott listát manuálisan felülvizsgáltuk, és a listában szereplő redundanciákat töröltük.

Statisztikai analízis

A statisztikai szignifikanciát két csoport között – kezelt és kontroll csoport – Student *t*-teszttel határoztuk meg. 3-5 csoportból álló elrendezések esetén – kontroll és több inhibitor – egytényezős ANOVA tesztet végeztünk Tukey-féle HSD próbával. A hibasávok a ± középérték közepes hibáját mutatják meg (SEM).

*, ** és *** a szignifikáns különbségeket ábrázolják a kontroll és a kezelt csoportok között, ahol $p < 0.05$, $p < 0.01$ vagy $p < 0.001$, a jelzéseknek megfelelően.

EREDMÉNYEK

A KB228 jelű glikogén foszforiláz inhibitor in vivo alkalmazásának meghatározása

A KB228 kezelés csökkentette a vércukor szintet 30 perccel a kezelés után, és ez a hatás 6 órán keresztül fennmaradt. Ez egybefügg a máj glikogén mennyiségének növelésével. Mindez a KB228 kezelés hatékonyságát igazolta. A HFD (magas zsírtartalmú diétán tartott) egerekben a máj glikogén mennyiségének szignifikáns növekedését figyelhettük meg. Mindez alátámasztotta a hatékony glikogén foszforiláz (GF) gátlást.

A KB228 hatása az energia háztartásra

Indirekt kalorimetriás vizsgálatokban a KB228 hatására emelkedett az oxigén fogyasztás (VO_2) normál egerekben, ami fokozott anyagcserére utalt. Ez összhangban volt a légzési hányados (RQ) értékének növelésével, ami fokozott glükóz oxidációra engedett következtetni. Ezekkel az eredményekkel párhuzamosan a KB228-kezelt egerek glükóz toleranciája javult. A radioaktív glükóz felvételének mérése során kiderült, hogy a glükóz felvételéért felelős szerv a máj.

A HFD egerek KB228 kezelése hasonló eredményeket hozott az oxigénfogyasztás és légzési hányados értékének emelkedése, valamint a glükóz tolerancia javulása terén. Azonban e változások mértéke kisebb volt a normál egerekhez képest. Ez azzal magyarázható, hogy a KB228 GF inhibitor hatékonysága csökken hiperglikémiás körülmények között.

A KB228 kezelés indukálta az UCP2 expresszióját

Az *in vivo* adatok a máj befolyásoltságára utaltak KB228 kezelés során, ezért vizsgálni kezdtük a HepG2 sejteket, mint a máj sejtes modelljét, normál (5.5 mM) és magas (25 mM) glükóz tartalom mellett. A glikogén mennyiség itt is emelkedett, alátámasztva a KB228 inhibitorral történő hatékony GF enzimgátlást. Továbbá, a KB228 kezelés fokozta a mitokondriális oxidációt normál körülmények között. A változás elhanyagolható volt magas glükóz szint esetén, hasonlóan az *in vivo* kísérletekben tapasztaltakhoz. RT-qPCR kísérletek során a KB228 kezelés hatására az UCP2 szétkapcsoló fehérje génexpressziójának nagymértékű növekedését figyelhettük meg. A KB228 GF inhibitor a kezelés hosszától függően indukálta az UCP2-t mind mRNS, mind fehérje szinten, és e tekintetben is kisebb volt a változás hiperglikémiás körülmények között. Ezt követően a sejtes modelleken 8 órás KB228 kezelést alkalmaztunk. Ugyanezen paraméter *in vivo* vizsgálata során azt találtuk, hogy a KB228 kezelés mRNS és fehérje szinten is indukálta az UCP2 expresszióját mind

normál, mind HFD egerek májmintáiban. A vázizomszövet UCP2 indukciójának tekintetében normál egerekben nem volt megfigyelhető változás, HFD egerekben kétszeres növekedést tapasztaltunk, míg C2C12 sejtekben hatszoros növekedést figyelhettünk meg KB228 kezelés hatására. Ebből kifolyólag más glükóz analóg GF inhibitorok (TH, $K_i=5.1 \mu\text{M}$, NV50, $K_i=3 \mu\text{M}$ és NV76, $K_i=0.47 \mu\text{M}$) is leteszteltünk HepG2 sejteken normál glükóz koncentráció mellett. Ezek a GF inhibitorok hatékonyan gátolták a GF enzim működését, ami tükröződött a sejtek glikogén mennyiségének növekedésében. Továbbá, körülbelül a duplájára emelték az UCP2 génjének expresszióját, a KB228-hoz hasonlóan. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az UCP2 indukció nem egy KB228-specifikus hatás, hanem maga a GF gátlása váltja ki. Ezen GF inhibitorok hatékonysága egyenesen arányos az inhibitor állandójukkal (K_i).

A KB228 kezelés aktiválta az mTORC2 enzinkomplexet

További metabolikus változások után kutatva több, az energia homeosztázisban fontos szerepet játszó protein kináz aktivitását vizsgáltuk. Ezek között volt az mTORC2, melynek aktiválódását az Akt foszforilációján keresztül vizsgáltuk. KB228 kezelés hatására az Akt mTORC2-specifikus helyének (473-as szerin) foszforiláltsága növekedett, míg a foszforilálatlan Akt szintje csökkent.

A glikogén jelenléte β sejtekben

Hogy betekintést nyerhessünk a glikogén és az aktív glikogén anyagcsere jelenlétére β sejtekben, MIN6 inzulinóma sejteken végeztünk vizsgálatokat. A glikogén részecskék jelenlétét konfokális mikroszkópia segítségével igazoltuk. A 2NBDG fluoreszcenciájának detektálásával különböző méretű glikogén szemcséket figyelhettünk meg a MIN6 sejtekben. A MIN6 sejteket struktúrájukban különböző GF inhibitorokkal 1 napig kezeltük. Ezek között volt glükóz analóg (KB228, BEVA335) és heterociklusos (CP-316819) inhibitor, melyeket a K_i értékükhöz közeli koncentrációban alkalmaztuk. A glikogén mennyiségét biokémiai módszerrel határoztuk meg. Mindegyik GF inhibitor növelte a glikogén mennyiségét, amiből aktív glikogén metabolizmusra lehetett következtetni a MIN6 sejtekben. A glikogén mennyiségének növekedését megfigyelhettük normál és HFD egerek Langerhans szigeteiben is KB228 kezelésének hatására. Következő lépés a MIN6 sejtek elektronmikroszkópos analízise volt, mely során azt is megfigyelhettük, hogy a GF enzim gátlása 1 nap után nem csak a glikogén mennyiségét, hanem a glikogén szemcsék méretét is növelte.

A glikogén szerepe MIN6 sejtekben

Azt feltételeztük, hogy a glikogén mennyiségének és méretének növekedésével kialakulhat a sejtekben egy olyan felület, melyhez β sejtek működésében fontos fehérjék kapcsolódhatnak. Végeztünk egy *in silico* elemzést, mely során több mint 100 potenciális glikogén-kötő fehérjét azonosítottunk. Fontos kiemelni, hogy ezek között vannak az IR, mTOR és Akt jelátviteli útvonalak fehérjéi. Mindezek fényében az IR és a glikogén szemcsék közötti feltételezhető kapcsolatot kezdtük vizsgálni. Mindenek előtt meghatároztuk az IR β lokalizációját MIN6 sejtekben immunfluoreszcens mikroszkóppal, mely más tanulmányokhoz hasonlóan pöttyös mintázatot mutatott. Ezt követően konfokális mikroszkóp segítségével megállapítottuk, hogy az IR β alegysége a glikogén szemcsékkel együtt helyezkedik el MIN6 sejtekben.

A glikogén foszforiláz inhibitorok aktiválták az inzulin jelátvitelt MIN6 sejtekben

A GF gátlószerekkel 1 napig kezelt MIN6 sejtekben az inzulin receptor β (IR β) 1345-ös tirozin oldalláncának foszforilációja, vagyis aktivitása fokozódott. Ezt követte az IR β downstream effektorjainak aktiválódása is. Az mTORC2 aktiválódást a foszfo-Akt (szerin 473) szintjének növekedése révén, az mTORC1 indukciót pedig a foszfo-p70S6K (treonin 389) szintjének emelkedése révén azonosítottuk. Az IR/PI3K/Akt útvonal további downstream effektora a hasnyálmirigy β sejtek szabályozásában központi szerepet játszó PDX1 transzkripciós faktor. A *Pdx1* promóter aktivitása és a PDX1 génexpressziós szintje is növekedett GF inhibitorok alkalmazása során, ami a PDX1 fehérje szintjének növekedéséhez vezetett a citoplazmában, de még kifejezettebben a sejtmagban. A növekedési és túlélési szignálok (PDX1, Akt, mTOR) aktiválása a MIN6 sejtek proliferációjának és a Langerhans szigetek méretének vizsgálatára ösztönzött minket. Habár a GF gátlószereknek nem volt hatása a MIN6 sejtek proliferációjára, a KB228-kezelt egerekben a Langerhans szigetek mérete szignifikánsan nőtt.

Továbbá, a PDX1 magi transzlokációja stimulálja az inzulin expresszióját, így ezt követően a β sejtek inzulin termelésére fókuszáltunk. GF gátlás hatására növekedett az inzulin mRNS és fehérje mennyisége, csakúgy, mint a nem glükóz-indukált és a glükóz-indukált inzulin felszabadulás. Szerettük volna bizonyítani azt, hogy a GF inhibitorok által kiváltott biokémiai változásokban az IR jelátviteli útvonal befolyásoltsága valóban szerepet játszik. Ennek érdekében PI3K-specifikus gátlószert, a wortmannint alkalmaztuk szintén MIN6 sejteken. A wortmannin kezelés megszüntette vagy az ellentétére fordította a GF inhibitorok által kiváltott hatásokat, értem ezalatt a PDX1 és inzulin mRNS illetve fehérje szintjének növekedését, valamint a nem glükóz-stimulált inzulin felszabadulást.

A KB228 és a CP-316819 fokozta a β sejtek működését

A β sejtek fő funkciója az inzulin szekréció. A GF inhibitorok közül a BEVA335-nek nem volt egyértelmű hatása a MIN6 sejtek inzulin felszabadulására. Ezért további kutatásainkban a BEVA335 vegyületet már nem alkalmaztuk. A sejtek kezeléséhez csak a KB228 és a CP-316819 inhibitorokat használtuk, melyek hatása az inzulin szekréciójára tovább tartott (2 nap), mint az előzőekben végzett kísérletek (1 nap) esetében. A KB228 és a CP-316819 fokozták a glikolízist és a mitokondriális oxidációt MIN6 sejtekben. A β sejtekben a mitokondriális aktivitás révén növekedik az ATP mennyisége, ami a sejtek depolarizációjához, majd az ezt követő feszültség-függő Ca^{2+} -csatornák nyitódásához vezet. A Ca^{2+} -beáramlás pedig az inzulin tartalmú vezikulumok membránnal történő fúziójához és exkréciójához vezet. A GF gátlás hatására fokozott glükóz-indukált Ca^{2+} -beáramlást és glükóz-stimulált inzulin szekréciót figyelhattunk meg MIN6 sejtekben. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a KB228 kezelés milyen hatással van az egerek inzulintermelésére. A kezelt egerekben a szérum inzulin szint növekedő tendenciát mutatott, főként magas zsírtartalmú diétán tartott egerek esetében.

MEGBESZÉLÉS

A disszertációban glikogén foszforiláz (GF) inhibitorok metabolikus hatásait jellemeztük. Kutatásunk első részében a KB228 vegyületet vizsgáltuk. Más GF inhibitorokkal végzett régebbi kutatásokhoz hasonlóan a KB228 növelte az oxigén fogyasztást, csökkentette a vércukorszintet és fokozta a máj glikogén mennyiségét. A KB228 hatékonyságát a magas glükóz tartalom csökkentette. Azt feltételezzük, hogy a glükóz motívumot tartalmazó KB228 kompetitív gátlás révén verseng a glükózzal a GF katalitikus centrumához kapcsolódásért. Így a glükóz mennyiségének növelése csökkentheti a KB228 affinitását a GF enzimhez.

A vércukorszint csökkenése a glükóz szövetekbe jutása révén valósulhat meg, és ebben a májnak van a legfőbb szerepe. Ezt radioaktívan jelölt glükózzal végzett kísérletben igazoltuk, ahol a KB228 kezelés hatására szignifikánsan nőtt a máj glükózfelvétele. Habár a vázizom szerepe itt nem volt kiemelkedő, más kutatók szerint a GF inhibitorral kezelt patkányok oxigénfogyasztása nőtt a glükózfelvétel növekedésének elmaradása ellenére. Továbbá leírtuk az UCP2 indukcióját egér vázizomban és egér mioblaszt sejtekben, ami valószínűleg hozzájárul a glükóz felhasználásához.

Az UCP2 mRNS sokféle szövetben jelen van és az UCP2 szabályozása mind transzkripció, mind transláció szinten megvalósulhat. Az UCP2 evolúciós szerepe és biológiai funkciója máig vitatott, habár e fehérje rövid felezési ideje arra utal, hogy alkalmas a gyors biológiai reakciók szabályozására. Elhízás során a megnövekedett UCP2 expresszió egy adaptív válasz a megnövekedett zsírsav β -oxidációra és ROS termelésre. Továbbá egyre több bizonyíték van az UCP2 jótékony hatására, ezalatt értve a mitokondriális légzési lánc támogatását, a ROS termelés és zsírsav felhalmozódás csökkentését, melyek hozzájárulhatnak az UCP2 gyulladáscsökkentő és zsírmáj kialakulását megelőző hatásaihoz. A mi szempontunkból fontos, hogy a magas vércukorszint melletti nagymértékű glükózbeáramlás a sejtekbe mitokondriális szabadgyökök képzéséhez vezet azáltal, hogy gátolja a mitokondriális légzési lánc működését. A mitokondriumok működési zavara pedig anyagcsere betegségek (pl. 2-es típusú diabétesz mellitusz (T2DM)) kialakulásához vezetnek. Éppen ezért feltételezhető, hogy a KB228 által indukált UCP2 feloldhatja a mitokondriális légzési láncban okozott gátat. A túlzott glükózbevitel okozta protonterhelést ellensúlyozza az UCP2 által közvetített protoncsorgás, így védve meg a sejtet az oxidatív stressztől. Tehát a GF gátlás nem csupán a glükóz felvételét és a mitokondriális oxidációt fokozza, de az UCP2 indukcióján keresztül hozzájárul az oxidatív károsodás fennálló veszélyének megszüntetéséhez.

Számos GF inhibitorot terveztek és teszteltek a T2DM kezelése érdekében. Korábbi tanulmányokban a GF farmakológiai gátlása javította a magas vércukorszintet diabéteszes

állatmodellekben, habár ezen inhibitorok hosszú távú alkalmazása káros hatásokat váltott ki. Zsír és glikogén felhalmozódást figyeltek meg a májban, melyek jellemzően a glikogén tárolási betegségek tünete. A mitokondriális oxidáció és az UCP2 aktiválás előnyei felhasználhatók lehetnek e káros hatásokkal szemben a GF inhibitorok hosszú távú alkalmazása során.

A KB228 aktiválta az mTORC2-t. Az mTOR jelátvitel számos anyagcsere betegséggel (elhízás, cukorbetegség, rák) áll kapcsolatban. Az inzulin jelátviteli útvonalán aktiválódó mTORC2 aktiválja a legfontosabb protein kinázokat, köztük az Akt-ot. Knockout egereken végzett vizsgálatokban kimutatták, hogy az mTORC2 működése nagyon fontos szerepet tölt be a máj glükóz és lipid homeosztázisának szabályozásában az Akt aktiválásán keresztül. A KO egerekben az mTORC2 hiánya miatt elmaradt az Akt 473-as szerin oldalláncon történő foszforilációja és csökkent a glükokináz aktivitása. Mindez fékezhetetlen glükoneogenezist és a glikolízis mérséklését idézte elő, ami szisztémás hiperglikémiához és hiperinzulinémiához, továbbá glükóz intoleranciához és inzulin rezisztenciához vezetett. Más kutatásokban azt állapították meg, hogy a rapamicin (mTOR inhibitor) krónikus alkalmazása drámaian súlyosbította a T2DM metabolikus tüneteit. A rapamicin hosszú távú alkalmazása során nem csupán az mTORC1, de az mTORC2 komplexet is gátolta. Ez megakadályozta az inzulin glükoneogenezisre gyakorolt szupresszióját, ami fokozta a glükóz intoleranciát és az inzulin rezisztenciát. A kérdés, hogy hogyan aktiválja a KB228 az mTORC2-t, még nyitott, de feltételezhetően az inzulin jelátvitelen keresztül, vagy egyszerűen a glükóz felvétele befolyásolja az mTOR jelátvitelt, melynek során a sejtek érzékelik a glükóz mennyiségének emelkedését és megkezdik a glikogén raktározást.

A GF gátlása során okozott mTORC2 aktiválás, és még annál is fontosabb, az mTORC1 indukció a hasnyálmirigy β sejtekben is megfigyelhető volt. KB228, BEVA335 és CP-316819 inhibitorok indukálták az inzulin receptor jelátvitelt, habár a CP-316819 hatása szinte minden tekintetben messze elmaradt a KB228 és BEVA335 gátlószerek mellett. Számos kutatás szerint az mTORC1 kulcsfontosságú a β sejtek növekedéséhez, proliferációjához, regenerálódásához illetve a magas vércukorszint és inzulin rezisztencia által kiváltott β sejt adaptációhoz. Az mTORC2 jelátvitel közvetetten kapcsolódik a β sejt proliferációjához és inzulin szekréciójához, mégpedig az Akt aktiválásán keresztül. Ezzel párhuzamosan a GF enzim gátlása aktiválta a 2 jól ismert növekedési és túlélési szignált, az Akt enzimet a PDX1 transzkripciós faktort, mely magyarázatot adhat az egerek hasnyálmirigy Langerhans szigeteinek GF gátlás hatására bekövetkező méretnövekedésére.

A cukorbetegség kutatásának legfőbb célja, hogy megtalálják a módját, hogyan lehetséges az inzulin termelő hasnyálmirigy β sejtek regenerációját és működését fokozni. Mi úgy véljük,

nem csak a májban és a vázizomban van szerepe a GF enzim gátlásának, hanem a β sejtekben is. Az eredményeink arra utalnak, hogy β sejtekben a glikogén mennyiségének kismértékű növekedése jótékony hatással van a β sejtek működésére. A GF inhibitorok proliferációt serkentő hatása viszont aggodalomra adhat okot. Bár ezt megerősítő vizsgálatok nincsenek, néhány kutatásban a GF inhibitorok anti-proliferatív hatását tapasztalták hasnyálmirigy adenokarcinóma és más tumoros sejteken, ami azt sugallja, hogy a GF inhibitoroknak citosztatikus hatása van daganatos sejtekre. A mi eredményeink azt mutatták, hogy habár a KB228 kezelés kismértékben, de szignifikánsan növelte a Langerhans szigetek méretét egerekben, MIN6 inzulinóma sejtek proliferációjában nem tapasztaltunk változást több nap kezelés (1-14 nap) után sem, egyik inhibitor (KB228, BEVA335, CP-316819) esetében sem. A proliferációs hatáson kívül, a GF gátlása β sejtekben fokozta az inzulin transzkripcióját és translációját, amit a spontán inzulin szekréció fokozódása is alátámasztott. Itt kell megemlítenem azt, hogy a PDX1 és az mTORC1 indukciója nagyban hozzájárul ezekhez a folyamatokhoz.

A GF gátlása olyan biokémiai változásokat idézett elő, melyekhez szorosan köthetőek az inzulin jelátvitel szereplői, konkrétan az IR-PI3K kaszkád. Ezt igazoltuk a PI3K inhibitor, a wortmannin alkalmazásával, ami megszüntette a GF inhibitorok által okozott változásokat (PDX1 és inzulin expressziójának növekedése, nem-stimulált inzulin szekréció fokozása).

Mindezek mellett, a KB228 és CP-316819 GF inhibitorok alkalmazása során fokozódott a glikolízis és a mitokondriális oxidáció mértéke, valamint növekedett a kalcium beáramlása β sejtekbe. Ezek a folyamatok a glükóz-stimulált inzulin szekréció útvonalának fő pillérei, és nem meglepő módon a GF inhibitorok, a KB228 szignifikánsan, növelték az inzulin szekrécióját *in vitro*, míg az *in vivo* vizsgálatokban látott növekedő tendencia is biztató lehet a jövőre nézve. A GF inhibitorok glükóz-indukált inzulin szekrécióra tett hatásával kapcsolatban nem tudunk pontos magyarázatot adni. Valószínűleg az általunk és más tanulmányokban is tapasztalt mitokondriális aktivitás növelése a kulcs. Emellett egyszerű magyarázatot biztosítana az IR jelátvitel bekapcsolása, mely fokozhatja a mitokondriális oxidációt és az inzulin szekrécióját. Azonban az inzulin szekrécióra tett hatás hosszabb ideig tartott (több, mint 2 napig), míg az IR jelátvitel aktiválása csak az 1 napos kezeléseknél volt tapasztalható. Továbbá a PI3K gátlása csak kis mértékben csökkentette a GF inhibitorok okozta inzulin szekréciós növekedést. Mindez újra felveti a még ismeretlen útvonal(ak) befolyásoltságát a GF inhibitorok hatásmechanizmusába.

Több tanulmány is hangsúlyozza a glikogén fiziológiai szerepét β sejtekben. A kapott eredmények viszont ellentmondásosak. Egyesek szerint β sejtekben glükózhiány során a glikogén lebontása biztosítja a glikolízishez szükséges glükózt, így támogatva a

mitokondriális oxidációt, majd a későbbi inzulin termelést. Magas vércukorszint esetén, pl. cukorbetegségben, a glikogén felhalmozódása β sejtekben viszont glükotoxicitáshoz vezet. Nemrégiben az előbbieknél ellentmondva azt tapasztalták, hogy a glikogén felhalmozódás önmagában nem elegendő a β sejt működési zavarának és halálának előidézéséhez, illetve a diabéteszes állapot romlásához, sőt mi több, a glikogén metabolizmus egyáltalán nem fontos a β sejt működésében. Ezen ellentmondásokat figyelembe véve, a mi eredményeink alapján úgy véljük, hogy az általunk alkalmazott GF inhibitorok növelték ugyan a glikogén mennyiségét, de jóval kisebb mértékben, mint a fent említett tanulmányokban. A máshol tapasztalt nagymértékű glikogén felhalmozódás, mely számos útvonalat gátolt és felelős volt a glükotoxicitásért, a mi modelljeinkben nem volt megfigyelhető. Mostanáig a glikogénre csak, mint glükóz raktár tekintettek, míg mi szeretnénk egy új perspektívát felkínálni a glikogén szerepével kapcsolatban. Úgy véljük, hogy a glikogén szemcsék felületének növekedése hozzájárult az IR jelátvitel indukálásához. Hogy maga a glikogén váltotta ezt ki, vagy inkább a glikogén egy felületet biztosított az IR útvonal elemei részére, nem tudjuk pontosan. A sejtekben más nagyméretű polimerek esetében is megfigyelték már, hogy képesek interaktív felületet biztosítani a nagyméretű fehérje komplexek számára.

A leírtakat összegezve, az eredményeink rávilágítanak arra, hogy a különböző struktúrájú GF inhibitoroknak sokkal többféle hatásuk van, mint egyszerűen a glikogén lebontásának gátlása. A májat illetően az eredményeink alapján a glikogén anyagcsere összefügg az mTORC2 jelátvitellel és a mitokondriális működéssel, ezért úgy gondoljuk, a GF enzim egy komplex metabolikus szabályozási rendszer részét képezi, amely alkalmazható lehet a cukorbetegség kezelésében. A hasnyálmirigy β sejtekben a GF farmakológiai gátlása és az ebből fakadó növekedés a glikogén mennyiségében összefügg az inzulin jelátviteli útvonallal és a glükóz-indukált inzulin szekrécióval. Ezen eredmények az eredetitől eltérő új megvilágításba helyezik a GF inhibitorokat, vagyis nem csak a máj által felszabadított glükóz mennyiségét képesek gátolni a 2-es típusú diabétesz mellitusz során, hanem felvetik annak lehetőségét, hogy a GF inhibitorok javítják a β sejt működését T2DM-ban. A GF inhibitorok klinikai vizsgálata a fázis II után megállt, és ennek okát eddig nem közölték. A kutatásaink viszont arra engednek következtetni, hogy a GF inhibitorok ritka, vagy alacsony dózisú adagolása az anyagcserében fontos jelátviteli útvonalakat céloz meg és nem váltja ki a régebben tapasztalt káros hatásokat, mint a hipoglikémia vagy glikogén tárolási betegségek.

ÖSSZEFOGLALÁS

A glikogén anyagcsere szabályozásában fontos glikogén foszforiláz enzimnek nagy szerepe van a máj glükóz termelésének szabályozásában, így a 2-es típusú cukorbetegség kezelésének egyik potenciális célpontja.

A KB228 jelű glükóz analóg GF inhibitor *in vivo* és *in vitro* vizsgálatát végeztük normál és hiperglikémiás körülmények között. Az *in vivo* KB228 kezelés hatására növekedett a máj glikogén mennyisége, ami összefüggésben van a máj glükóz felvételének szignifikáns növekedésével. A normál és magas zsírtartalmú diétán tartott egerek glikogén foszforiláz inhibitorral történő kezelése az oxigénfogyasztás emelkedéséhez és a glükóz tolerancia javulásához vezetett. Megjegyzendő, hogy a változás mértéke kisebb volt az elhízott egereknél, ami feltehetőleg azzal magyarázható, hogy a KB228 glükóz motívuma verseng a glükózzal a glikogén foszforiláz enzimhez való kapcsolódásért, így magasabb glükózsint esetén csökken a glikogén foszforiláz inhibitor hatékonysága. HepG2 sejtekkel végzett kísérletek során a KB228 kezelés fokozta a mitokondriális aktivitást és az UCP2 expressziót. Az UCP2 indukciója az egerek májában, sőt harántcsíkolt izomszövetében és C2C12 mioblaszt sejtekben is kimutatható volt, ami a vázizom KB228-indukált fokozott glükóz oxidációban való részvételére utal. További kutatásunk tárgya a metabolikus változások háttérében álló jelátviteli útvonalak feltérképezése volt, melynek során kimutattuk az mTORC2 aktiválódását glikogén foszforiláz gátlás hatására, mely hozzájárulhat a máj glükóz termelésének csökkentéséhez, a glükózfelvétel és a glikogén raktározás fokozásához, ezáltal javítva a cukorbetegség állapotán.

Egy másik kísérletsorozatban a glikogén foszforiláz gátlás hatásait vizsgáltuk β sejteken *in vivo* és *in vitro*. A KB228 mellett egy szintén glükóz analóg BEVA335 jelű, és egy strukturálisan eltérő CP-31819 GF inhibitor is alkalmaztunk. A glikogén foszforiláz gátlása során a β sejtek modelljeként használt MIN6 sejtekben lévő glikogén mennyisége, valamint a glikogén szemcsék mérete is növekedett. Az inhibitorok alkalmazása aktiválta az IR/PI3K/Akt jelátviteli útvonalat, amit a PI3K specifikus gátlásával is igazoltunk. Emellett észleltük az IR β glikogén szemcsékkel való kolokalizációját, valamint azonosítottuk az IR jelátviteli útvonal résztvevőit, mint glikogén-kapcsolt fehérjéket. A glikogén foszforiláz inhibitorok fokozták a glükóz-indukált inzulin felszabadulást, valamint növelték a Langerhans szigetek méretét.

Eredményeink alapján a glikogén foszforiláz enzim komplex szabályozó folyamatok részét képezi, mely a jövőben felhasználható a cukorbetegség kezelésében.

KÖVETKEZTETÉSEK

- A glikogén foszforiláz enzim gátlása fokozza a mitokondriális oxidációt és javítja a glükóz toleranciát egerekben.
- Hasnyálmirigy β sejtekben a glikogén foszforiláz farmakológiai gátlása, a glikogén szemcsék mennyiségének és méretének növelése révén, kapcsolatba hozható az inzulin jelátviteli útvonal indukciójával és a glükóz-stimulált inzulin szekréció növekedésével.
- A glikogén foszforiláz enzim nem csupán a glikogén lebontást katalizáló enzim, hanem feltételezhetően egy komplex metabolikus szabályozó rendszer része a májban, az izomban és a β sejtekben egyaránt.

KULCSSZAVAK

glikogén, glikogén foszforiláz, glikogén foszforiláz gátlószer, 2. típusú cukorbetegség, mitokondrium, UCP2, AKT2, mTORC2, hasnyálmirigy β sejtek, PDX1, inzulin, inzulin receptor, inzulin receptor jelátvitel



Nyilvántartási szám: DEENK/115/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

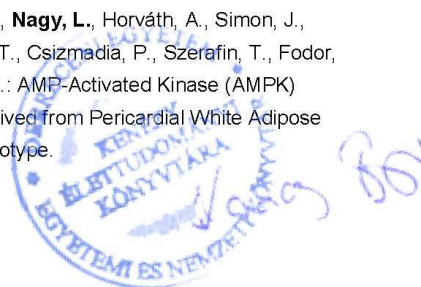
Jelölt: Nagy Lilla
Neptun kód: JLM2H9
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037938

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nagy, L.**, Márton, J., Vida, A., Kis, G., Bokor, É., Kun, S., Gönczi, M., Docsa, T., Tóth, A., Antal, M., Gergely, P., Csóka, B., Pacher, P., Somsák, L., Bai, P.: Glycogen phosphorylase inhibition improves [béta]-cell function.
Br. J. Pharmacol. [Epub ahead of print], 2017.
IF: 5.259 (2015)
2. **Nagy, L.**, Docsa, T., Szántó, M., Brunyánszki, A., Hegedűs, C., Márton, J., Kónya, B., Virág, L., Somsák, L., Gergely, P., Bai, P.: Glycogen Phosphorylase Inhibitor N-(3,5-Dimethyl-Benzoyl)-N'-(β -D-Glucopyranosyl)Urea Improves Glucose Tolerance under Normoglycemic and Diabetic Conditions and Rearranges Hepatic Metabolism.
PLoS One. 8 (7), e69420-, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069420>
IF: 3.534

További közlemények

3. Abdul-Rahman, O., Kristóf, E., Doan-Xuan, Q. M., Vida, A., **Nagy, L.**, Horváth, A., Simon, J., Maros, T. M., Szentkirályi, I., Palotás, L., Debreceni, T., Csizmadia, P., Szerafin, T., Fodor, T., Szántó, M., Tóth, A., Kiss, B. K., Bacsó, Z., Bai, P.: AMP-Activated Kinase (AMPK) Activation by AICAR in Human White Adipocytes Derived from Pericardial White Adipose Tissue Stem Cells Induces a Partial Beige-Like Phenotype.
PLoS One. 11 (6), e0157644, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0157644>
IF: 3.057 (2015)





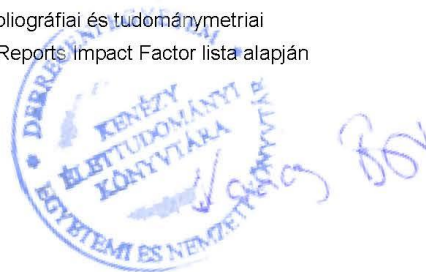
4. Fodor, T., Szántó, M., Abdul-Rahman, O., **Nagy, L.**, Dér, Á., Kiss, B. K., Bai, P.: Combined Treatment of MCF-7 Cells with AICAR and Methotrexate, Arrests Cell Cycle and Reverses Warburg Metabolism through AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and FOXO1. *PLoS One*. 11 (2), 1-16, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0150232>
IF: 3.057 (2015)
5. Bai, P., **Nagy, L.**, Fodor, T., Liaudet, L., Pacher, P.: Poly(ADP-ribose) polymerases as modulators of mitochondrial activity. *Trends Endocrinol. Metab.* 26 (2), 75-83, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2014.11.003>
IF: 8.964
6. Szántó, M., Brunyánszki, A., Márton, J., Vámosi, G., **Nagy, L.**, Fodor, T., Kiss, B. K., Virág, L., Gergely, P., Bai, P.: Deletion of PARP-2 induces hepatic cholesterol accumulation and decrease in HDL levels. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* 1842 (4), 594-602, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.12.006>
IF: 4.882
7. Szántó, M., Brunyánszki, A., Kiss, B. K., **Nagy, L.**, Gergely, P., Virág, L., Bai, P.: Poly(ADP-ribose) polymerase-2: emerging transcriptional roles of a DNA-repair protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 69 (24), 4079-4092, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-012-1003-8>
IF: 5.615

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 34,368

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,793

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.04.27.



KONFERENCIA ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

Konferencia előadások

Mikó E, Vida A, Kovács T, Újlaki Gy, Kovács P, Lovas B, Sári Zs, Jankó L, Márton J, **Nagy L**, Bai P (2016) *Diverz ötletek a mitokondrium körül*. Biotechnológiai nap, Debreceni Egyetem

Marton J, **Nagy L**, Fodor T, Bhattoa Pal H, Bai P (2016) *PARP2 interferes with skeletal muscle cholesterol homeostasis and steroid metabolism*. PARP Family and Friends, Cold Spring Harbor, NY, USA

Fodor T, Mikó E, Vida A, Kovács T, Abdul-Rahman O, **Nagy L**, Trencsényi Gy, Bai P (2015) *New ways to revert Warburg-type metabolism*. FEBS3+ meeting, Protoroz, Szlovénia

Szántó M, Brunyánszki A, Márton J, **Nagy L**, Fodor T, Kiss B, Bai P (2014) *The role of PARP-2 in the regulation of SREBP1*. MBKE 2014 Debrecen – előadás

Nagy L, Docsa T, Tóth A, Somsák L, Fodor T, Gergely P, Bai P (2014) *Glycogen phosphorylase inhibitors enhance pancreatic β -cell function and hepatic mitochondrial metabolism*. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Debrecen, Magyarország

Fodor T, Szántó M, Márton J, **Nagy L**, Bai P (2014) *The analysis of AMPK activation in MCF7 cell model*. Seahorse training, Cambridge

Szántó M, Fodor T, **Nagy L**, Márton J, Csumita M, Kiss B, Gergely P, Virág L, Bai P (2013) *Poly(ADP-ribose) polymerase enzymes in metabolic regulation*. MÉT Vándrogyűlés, Budapest.

Konferencia poszterek

Nagy L, Márton J, Vida A, Kis G, Bokor É, Kun S, Gönczi M, Docsa T, Tóth A, Antal M, Gergely P, Csóka B, Pacher P, Somsák L, Bai P (2017) *The role of glycogen phosphorylase in β -cells*. HunLifeSci 2017 Eger, Magyarország

Nagy L, Docsa T, Tóth A, Somsák L, Fodor T, Gönczi M, Gergely P, Bai P (2015) *Glycogen phosphorylase inhibition has positive effect on metabolism*. FEBS3+ Portoroz, Szlovénia

Szántó M, Brunyánszki A, Márton J, **Nagy L**, Fodor T, Kiss B, Bai P (2014) *The role of poly(ADP-ribose) polymerase enzymes in the regulation of cholesterol homeostasis* Frontiers in Metabolism: From Molecular Physiology to Systems Medicine EMBL Heidelberg 2014

Márton J, Szántó M, **Nagy L**, Fodor T, Kiss B, Bai P (2014) *The role of poly(ADP-ribose) polymerase-2 in the cholesterol homeostasis*. MBKE Debrecen 2014

Fodor T, Szántó M, Márton J, **Nagy L**, Bai P (2014) *Study of anti-Warburg effect of AMPK activators and antimetabolite drugs on MCF7 cell model*. MBKE Debrecen 2014

Nagy et al., (2014) *Beneficial metabolic changes induced by glycogen phosphorylase inhibitor treatment*. The FEBS-EMBO 2014 Conference, Paris, Franciaország.

Fodor T, Szántó M, Márton J, **Nagy L**, Bai P (2014) *Study of anti-Warburg effect of AMPK activators and antimetabolite drugs on MCF7 cell model* FEBS-EMBO Conference Paris, France

Docsa T, **Nagy L**, Szántó M, Hegedűs Cs, Márton J, Kónya B, Virág L, Somsák L, Gergely P, Bai P (2013) *Glycogen phosphorylase inhibitor N-(3,5-dimethyl-benzoyl)-N'-(β-D-glucopyranosyl)urea improves glucose tolerance under normoglycemic and diabetic conditions*. Europhosphatase 2013 Rehovot, Izrael

Fodor T, Szántó M, **Nagy L**, Brunyánszki A, Kiss B, Gergely P, Virág L, Bai P (2013) *The role of PARP10 in metabolic regulation*. MÉT Vándorgyűlés, Budapest.

Fodor T, Szántó M, **Nagy L**, Brunyánszki A, Gergely P, Virág L, Bai P (2013) *The role of PARP10 enzyme in mitochondrial metabolism*. Hungarian Molecular Life Sciences 2013, Siófok.

Nagy et al., (2012) *Investigation of the effect of glycogen phosphorylase inhibitor N-(3,5-dimethyl-benzoyl)-N'-(β-D-glucopyranosyl)urea on energy homeostasis*. MBKE Conference on Signal Transduction, Esztergom, Magyarország

Nagy L, Docsa T, Szántó M, Brunyánszki A, Hegedűs Cs, Márton J, Kónya B, Virág L, Somsák L, Gergely P, Bai P (2012) *Glycogen phosphorylase inhibitor N-(3,5-dimethyl-benzoyl)-N'-(β-D-glucopyranosyl)urea induces energy expenditure*. EMBL Diabetes and Obesity Symposium, Heidelberg, Németország

A publikáció/prezentáció/poszter elkészítését a GINOP- 2.3.2-15-2016-00006 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.