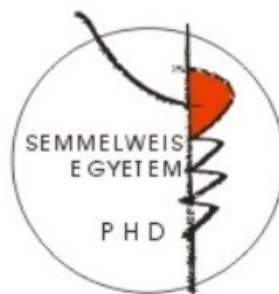


# Az endoplazmás retikulum redox rendszerei és a metabolikus szindróma

Doktori értekezés

**Dr. Czegle Ibolya Anett**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Bánhegyi Gábor egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Szűcs Nikolette, egyetemi tanársegéd, PhD  
Dr. Jemnitz Katalin, tudományos főmunkatárs, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Enyedi Péter egyetemi tanár, az MTA Doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tretter László egyetemi docens, PhD  
Dr. Lőw Péter egyetemi adjunktus, PhD

Budapest  
2007.

## Tartalomjegyzék

<b>I. Rövidítések jegyzéke</b>	7
<b>II. Bevezetés</b>	8
<b>Metabolikus szindróma</b>	8
Definíció és klinikai tünetek	8
A glukokortikoidok szerepe az obezitás és a metabolikus X szindróma patogenezisében	11
<b>A kortikoszteroidok élettana</b>	12
A kortizolkatabolizmus legfontosabb lépései és enzimei	12
<b>Patofiziológiai bizonyítékok a glukokortikoidok és a metabolikus szindróma kapcsolatára</b>	15
<b>A kortikoszteroidok prereceptorális átalakulása, aktiválódása</b>	16
<b>11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenázok- történeti áttekintés</b>	16
A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 2-es típusa és a mineralokortikoid receptor paradoxon	16
A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa: prereceptorális aktiváció	17
<b>11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus: klasszifikáció és fehérjeszerkezet</b>	18
<b>Enzimkinetika</b>	20
<b>A 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szerepe májban és zsírszövetben</b>	22
<b>A 11<math>\beta</math> hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szerepe májban</b>	22
Glukokortikoid hatás és a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának előfordulása	22
A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szerepe az inzulinérzékenységben és a hepatikus glukoneogenesis szabályozásában	22
11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szabályozása májban	24
<b>A 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa zsírszövetben</b>	24
Expresszió és enzimaktivitás	24

<i>1-es típusú 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz expresszió és enzimaktivitás változása a zsírszövetben a fejlődés során</i>	25
<b><i>Metabolikus szindróma és 2-es típusú diabetes modell transzgén állatok-bizonyítékok a 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa és a metabolikus szindróma kapcsolatára</i></b>	27
<i>11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus transzgén állatok</i>	27
<i>Hepatitis 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz overexpresszáló transzgén egér</i>	27
<i>Zsírszöveti 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz overexpresszáló transzgén egér</i>	27
<i>11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz knockout egér</i>	28
<i>Poligén metabolikus szindróma modell</i>	28
<i>11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 aktivitás egyéb 2-es típusú diabetes modelleken</i>	29
<i>Goto-Kakizaki patkány</i>	29
<i>Zucker patkány</i>	29
<i>Ob/ob egér</i>	29
<i>Db/db egér</i>	30
<i>KKAY egér</i>	30
<b><i>A 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szerepe az obezitás és a metabolikus szindróma kialakulásában emberben</i></b>	30
<i>A hepatikus 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 szerepe</i>	31
<i>A zsírszöveti 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 szerepe</i>	31
<b><i>Hexóz-6-foszfát dehidrogenáz</i></b>	32
<b><i>A 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus működésének iránya-reduktáz vagy dehidrogenáz?</i></b>	32
<i>Biokémiai sajátosságok</i>	32
<i>Genetika</i>	33
<i>A transzkripció és a transláció szabályozása</i>	34
<i>A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz fehérje</i>	34
<b><i>A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz és a 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz együttműködése</i></b>	35
<i>Kolokalizáció az endoplazmás retikulum lumenében</i>	35

<i>Biokémiai bizonyíték-a glukóz-6-foszfát transzporter-hexóz-6-foszfát dehidrogenáz- 1-es típusú 11β-hidroxiszteroid dehidrogenáz rendszer</i>	35
<i>Genetikai bizonyítékok</i>	38
<i>Kortizon reduktáz hiány-policisztás ovárium szindróma</i>	38
<i>Hexóz-6-foszfát dehidrogenáz knockout egér</i>	39
<i>A két enzim génjének koexpressziója emlős sejtekben</i>	39
<b><i>Új terápiás lehetőségek a metabolikus szindróma kezelésére- a 11β-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának gátlószerei</i></b>	<b>39</b>
<i>Nem szelektív gátlószerek</i>	39
<i>A nem szelektív gátlószerek hatásai</i>	40
<i>Karbenoxolon</i>	40
<i>Glicirretinsav</i>	40
<i>Szelektív gátlószerek</i>	41
<i>A 11β-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus szelektív gátlásának hatása a hyperglukaemiás és hyperinzulinaemiás egértörzsek szénhidrát-háztartására</i>	41
<i>A 11β-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus szelektív gátlásának hatása a szérum lipidek szintjére</i>	42
<i>Természetes gátlószerek</i>	42
<b><i>Az endoplazmás retikulum</i></b>	<b>44</b>
<i>Redoxpotenciál és redox rendszerek az endoplazmás retikulumban</i>	45
<i>Redukált glutation és glutation diszulfid</i>	45
<i>Aszkorbát és dehidroaszkorbát</i>	46
<i>FAD</i>	47
<i>Piridinnukleotidok: NAD(P)<sup>+</sup> és NAD(P)H</i>	47
<b><i>III. Célkitűzések</i></b>	<b>48</b>
<b><i>IV. Módszerek</i></b>	<b>50</b>
<i>Mikroszomális vezikulák és szubcelluláris frakciók preparálása patkány májból</i>	50
<i>Zsírszövet mikroszóma preparálás patkány epidydymális és retroperitoneális zsír szövetből</i>	52
<i>Fluorimetriás NADPH mérések</i>	52

<i>Transzport mérések light scattering technikával</i>	52
<i>Transzport mérések rapid szedimentációs technikával</i>	54
<i>Enzimaktivitás-mérések</i>	55
<i>11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus</i>	55
<i>Hexóz-6-foszfát dehidrogenáz</i>	56
<i>Western blot</i>	57
<b><i>V. Eredmények</i></b>	<b>58</b>
<b><i>A patkány máj mikroszóma főleg redukált piridinnukleotidokat tartalmaz</i></b>	<b>58</b>
<b><i>A mikroszómális membrán permeabilitása piridinnukleotidokra nézve</i></b>	<b>59</b>
<i>Magas piridinnukleotid koncentráció- fényszórásos technika</i>	59
<i>Fiziológiás piridinnukleotid koncentráció- rapid szedimentációs technika</i>	60
<b><i>Az intraluminális piridinnukleotidok redox állapota</i></b>	<b>62</b>
<i>A membránpermeabilizálás, illetve oxidáló anyagok hatása az intraluminális NADPH pool redox állapotára</i>	62
<i>Az intraluminális piridinnukleotid pool koncentrációja</i>	63
<i>Az intraluminális NADPH pool befolyásolása</i>	65
<b><i>A 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim együtműködése egy közös NADPH pool-on alapul</i></b>	<b>65</b>
<i>A 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim latenciája</i>	65
<i>NADPH pool a patkány máj mikroszómában</i>	65
<b><i>1-es típusú 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitás és fehérjeszintű expresszió két 2-es típusú diabetes modell patkánytörzsön</i></b>	<b>71</b>
<i>Zucker patkány</i>	71
<i>Goto-Kakizaki patkány</i>	72
<b><i>VI. Megbeszélés</i></b>	<b>74</b>
<i>Az endoplazmás retikulum membránja piridinnukleotidokra nézve nem permeábilis</i>	74
<i>Piridinnukleotid pool az endoplazmás retikulum mikroszómában</i>	75
<i>Az endoplazmás retikulum piridinnukleotid pooljának redox állapota</i>	76

<i>Az intraluminális piridinnukleotidok koncentrációja</i>	76
<i>Biokémiai bizonyítékok a 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim együttműködésére</i>	77
<i>A 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz együttműködése-kolokalizáció az endoplazmás retikulum lumenében</i>	77
<i>A 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz együttműködése egy közös intraluminális piridinnukleotid poolon alapul</i>	77
<i>A 11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szerepe a metabolikus szindróma különböző fenotípusainak kialakításában</i>	78
<i>11<math>\beta</math>-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitása és expressziója Zucker és Goto- Kakizaki patkány májban és zsírszövetben</i>	78
<b>VII. Következtetések</b>	<b>81</b>
<b>VIII. Összefoglalás</b>	<b>83</b>
<b>IX. Summary</b>	<b>84</b>
<b>X. Irodalomjegyzék</b>	<b>85</b>
<b>XI. Saját publikációk jegyzéke</b>	<b>110</b>

## ***I. Rövidítések jegyzéke***

A.U.: arbitrary unit, azaz mesterséges egység a fluorimetriás és light scattering méréseknél

NAD<sup>+</sup>: nikotinsavamid adenin dinukleotid

NADP<sup>+</sup>: nikotinsavamid dinukleotid foszfát

NADH: nikotinsavamid adenin dinukleotid, redukált forma

NADPH: nikotinsavamid adenin dinukleotid foszfát, redukált forma

GSH: redukált glutation

GSSG: oxidált glutation, glutation diszulfid

FAD: flavin-adenin dinukleotid

S.D: standard deviáció

S.E.: standard hiba

11 $\beta$ HSD1: a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusa

H6PDH: hexóz-6-foszfát dehidrogenáz

IFG: impaired fasting glucose (emelkedett éhomi vércukor)

IGT: impaired glucose tolerance (csökkent glukóztolerancia)

HDL: high density lipoprotein

LDL: low density lipoprotein

BMI: body mass index (testtömegindex)

WHO: World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

HEK-293: Human Embryonic Kidney Cell Line (humán embrionális vese sejtvonala)

CHO: Chinese Hamster Ovary sejtvonala

TGF $\beta$ : transzformáló növekedési faktor  $\beta$

bFGF: bázikus fibroblaszt növekedési faktor

EGF: epitheliális növekedési faktor

HGF: hepatocita növekedési faktor

IGF-1: inzulinszerű növekedési faktor 1

## ***II. Bevezetés (Irodalmi háttér)***

### ***Metabolikus szindróma***

#### ***Definíció és klinikai tünetek***

A metabolikus X szindróma kifejezés az utóbbi két évtizedben jelent meg az irodalomban az inzulinrezisztenciával és ennek következtében kialakuló kompenzatorikus hiperinzulinémiával, android típusú elhízással, hipertóniával, illetve diszlipidémiával jellemezhető klinikai szindróma jellemzésére. A metabolikus X szindróma fogalmát Reaven alkotta meg 1988-ban.

A szindróma az európai és észak-amerikai népesség mintegy 20-25%-ában fellelhető, azaz körülbelül minden 4-5 emberből egy metabolikus szindrómában szenved. A hatvanéves észak-amerikai populáció csaknem felét érinti ez a betegség. Jelentősége, hogy egyike a legveszélyesebb anyagcsere-elváltozásoknak, mely a 2-es típusú diabétesz mellitusz és az ischaemiás szívbetegség kialakulásának kockázatával jár. A metabolikus szindróma fennállása a cukorbetegség kialakulásának esélyét csaknem hétszeresére, míg a kardiovaszkuláris rizikót csaknem kétszeresére növeli.

A metabolikus X szindróma pontos definíciójában, az utóbbi évtizedben megjelent klinikai ajánlásokban, protokollokban évről-évre számos változtatás történt.

Az Egészségügyi Világszervezet 1999-es definíciójában metabolikus X szindrómának írja le azt az állapotot, melyben a csökkent glukóztoleranciával, illetve diabétesz mellitussal jellemezhető inzulinrezisztencia mellett a következő négy faktor közül legalább kettő fennáll: magasvérnyomás, aterogén diszlipidémia, obezitás és mikroalbuminuria. A csökkent glukóztolerancia definíciója, hogy a terhelés után két órával mért plazma vércukorszint 7,8 mmol/liternél nagyobb. Diabétesz mellitusz esetén az éhomi vércukorszint nagyobb, mint 6,1 mmol/liter, terhelés esetén a két órás érték nagyobb, mint 11,1 mmol/liter.

Az American Heart Association 2004-es állásfoglalása (National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III) alapján a következő öt paraméter közül legalább három fennállásakor beszélünk metabolikus szindrómáról: abdominális elhízás, hipertrigliceridémia, csökkent HDL koleszterinszint, magasvérnyomás,



emelkedett éhomi vércukor. Ez az ajánlás a WHO 1999-es definíciójához képest annyiban jelent újat, hogy figyelembe veszi a diagnózis felállításának időpontjában esetleg már elkezdett gyógyszeres kezelést (antidiabetikumok, antihipertenzívumok, koleszterincsökkentő szerek), valamint izolált szisztolés és diasztolés hipertóniát is elkülönít. Derékkörfogat tekintetében is szigorúbbak a kritériumok a korábbi ajánláshoz képest (Grundy és mtsai, 2004).

A metabolikus szindróma legújabb definícióját 2005-ben a Nemzetközi Diabétesz Társaság (International Diabetes Federation) alkotta meg. A diagnózis középpontjába a derékkörfogatot állítja, részletesen elkülönítve a különböző rasszok esetében. (1. táblázat)

1 táblázat: A metabolikus szindróma klinikai definíciói (Chew és mtsai, 2006)

	WHO ajánlás	ATP III	IDF
Szükséges kritérium	Hiperglikémia/inzulinrezisztencia + 2 v. több a négy másik kritériumból	Öt kritériumból három vagy több jelenléte	Centrális elhízás + 2 vagy több a négy másik kritériumból
Centrális elhízás	Csípő/derék arány >0,9 (férfi) >0,85 (nő) és/vagy BMI > 30 kg/m <sup>2</sup>	Derékkörfogat: kaukázusi: ≥ 102 cm (férfi), ≥ 88 cm (nő) ázsiai: ≥ 90 cm (férfi), ≥ 80 cm (nő) szorosabb a határérték inzulinrezisztenciát okozó genetikai predispozíciót hordozó, nem ázsiai embereknél: ≥ 94 cm (férfi), ≥ 80 cm (nő)	Derékkörfogat: európai, szub-szaharai afrikai, kelet-mediterrán és közel-keleti (arab): ≥ 94 cm (férfi), ≥ 80 cm (nő) dél-ázsiai, kínai, dél-és közép amerikai: ≥ 90 cm (férfi), ≥ 80 cm (nő)
Hiperglikémia	Inzulinrezisztencia: diabétesz, IFG, IGT	Éhomi vércukorszint ≥5,6 mmol/liter vagy hiperglikémia miatt gyógyszeres kezelés	Éhomi vércukorszint ≥ 5,6 mmol/liter, vagy korábban diagnosztizált 2-es típusú diabétesz
Diszlipidémia	Szérum triglicerid szint ≥ 1,7 mmol/l és/vagy HDL-koleszterin < 0,9 mmol/l (férfi), <1,0 mmol/l (nő)	Szérum triglicerid ≥ 1,7 mmol/l vagy hipertrigliceridémia miatti gyógyszeres kezelés HDL-koleszterinszint < 1,0 mmol/l (férfi), < 1,3 mmol/l (nő) vagy gyógyszeres kezelés alacsony HDL-koleszterinszint miatt	Szérum triglicerid ≥ 1,7 mmol/l vagy hypertrigliceridémia miatti gyógyszeres kezelés HDL-koleszterinszint < 1,0 mmol/l (férfi), < 1,3 mmol/l (nő) vagy gyógyszeres kezelés alacsony HDL-koleszterinszint miatt
Hipertónia	≥ 140/90 Hgmm	Szisztolés vérnyomás ≥ 130 Hgmm, diasztolés vérnyomás ≥ 85 Hgmm vagy antihipertenzív kezelés	Szisztolés vérnyomás ≥ 130 Hgmm, diasztolés vérnyomás ≥ 85 Hgmm vagy antihipertenzív kezelés
Egyéb	Mikroalbuminuria: vizelet albumin kiválasztási ráta > 20 µg/perc vagy albumin/kreatinin arány > 3,5 mg/mmol		

*A glukokortikoidok szerepe az obezitás és a metabolikus X szindróma patogenezisében*

A metabolikus szindróma és a glukokortikoidok kapcsolatára csupán amiatt is gondolhatunk, hogy a kórkép legjellemzőbb tünetei feltűnően emlékeztetnek a Cushing szindrómáéra (2. táblázat). A hasonló fenotípus mellett azonban a legfontosabb eltérés, hogy a metabolikus szindrómában a plazma kortizolszintje normális vagy akár alacsony, míg Cushing szindrómában emelkedett. Mindkét kórkép hátterében tehát a glukokortikoid receptorok fokozott aktiválódása áll. Cushing szindróma esetén ezt az emelkedett szérumban glukokortikoid szint, metabolikus szindrómánál pedig a lokális glukokortikoid hatás felerősödése okozza.

*2. táblázat: A metabolikus szindróma és a Cushing szindróma tünetei. A betegek fenotípusa hasonló, ám a metabolikus szindróma normál szérumban kortizolszinttel jár.*

Metabolikus szindróma	Cushing szindróma
<ul style="list-style-type: none"><li>• magasvérnyomás,</li><li>• abdominális típusú elhízás,</li><li>• csökkent glukóz tolerancia</li><li>• inzulinrezisztencia</li><li>• érrelmeszesedésre hajlamosító diszlipidémia,</li><li>• gyulladás- és trombózishajlam</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• magasvérnyomás</li><li>• abdominális típusú elhízás</li><li>• csökkent glukóz tolerancia</li><li>• vékony, sérülékeny bőr</li><li>• holdvilágarc</li><li>• livid striák</li><li>• oszteoporózis</li><li>• proximális izomgyengeség</li><li>• hipogonadizmus</li><li>• akne</li><li>• pszichés zavarok</li></ul>
<i>Szérumban kortizolszint normális</i>	<i>Szérumban kortizolszint emelkedett</i>

### *A kortikoszteroidok élettana*

A mellékvesekéregben termelődő szteroidhormonok funkcionális szempontból három csoportra, glukokortikoidokra, mineralokortikoidokra és androgénekre oszthatók. A glukokortikoidok legfontosabb fiziológiás funkciói a szénhidrát-, fehérje- és lipidanyagcsere szabályozása, vérnyomásfenntartás, illetve a stresszre adott válaszreakció, valamint a szöveti szintű gyulladásos folyamatok modulálása (Munck és mtsai, 1992). Ezzel szemben a mineralokortikoidok fő hatása a nefronban az epitheliális  $\text{Na}^+$ -transzport fokozása (Marver, 1984).

A glukokortikoidok és mineralokortikoidok a többi szteroidhoz hasonlóan lipofilek, emiatt a sejtmembránon áthatolva könnyedén jutnak intracelluláris receptorukhoz. A legfontosabb keringő glukokortikoid a kortizol, termelődése a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely szabályozása alatt áll. A kortizol a termelődését szabályozó hormonokra valamennyi szinten negatív feedback hatást gyakorol. A mineralokortikoidok közül legnagyobb fiziológiás jelentőséggel az aldoszteron bír, a mellékvesekéreg zona glomerulosájának külső része termeli, termelődését a renin-angiotenzin rendszer és a szérum  $\text{K}^+$  koncentrációja szabályozza. A glukokortikoidok jóval nagyobb mennyiségben termelődnek szervezetünkben, mint a mineralokortikoidok: kortizolból napi 15 mg (Cope és mtsai, 1958, Esteban és mtsai, 1991), kortizonból 2 mg képződik (Peterson és mtsai, 1960), míg aldoszteronból mindössze napi 150  $\mu\text{g}$ -ot szekretál a mellékvesekéreg. A keringő kortizol 90%-a fehérjéhez kötött formában fordul elő. A kortizol főleg az  $\alpha_2$ -makroglobulin frakcióba tartozó kortizolkötő fehérjéhez (CBG, cortisol binding globulin) kötve kering. Ugyanakkor biológiai aktivitással csak a vérben keringő szabad kortizol rendelkezik. A szabad kortizol a vesével választódik ki, így mérésére a vizelet szabad kortizolkoncentráció ad lehetőséget: a termelődő összes kortizolnak ez mindössze 1%-át teszi ki. A keringő szabad kortizol féléletideje 70-120 perc (Tomlinson és mtsai, 2003).

### *A kortizolkatabolizmus legfontosabb lépései és enzime*

A kortizol és a kortizon közötti különbség, hogy a 11-es szénatomon hidroxil, illetve ketocsoport van-e. Így kortizol esetében a metabolizmus első lépése lehet ennek

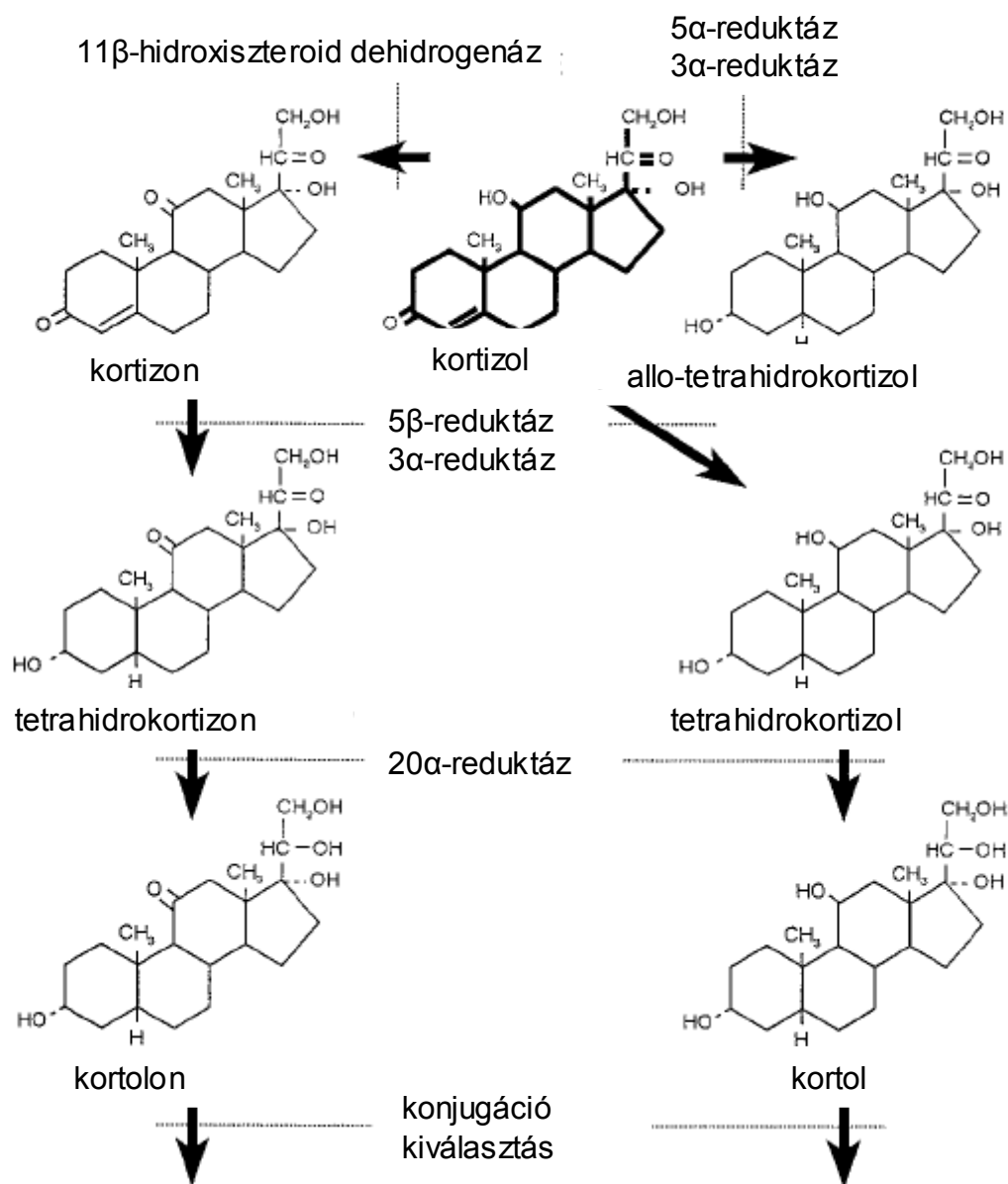
a 11-hidroxicsoporthnak ketocsoporttá alakulása a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim által katalizált reakcióban (Monder és Shackleton, 1984, Monder és White, 1993). A kortizon és a kortizol metabolizmusa innenől azonos lépésekben zajlik.

A következő lépés a C4-5 kettős kötés redukciója (dihidro-kortizol, illetve dihidro-kortizon képződik), majd a 3-oxo csoport hidroxilációja, mely során tetrahydro-kortizol, illetve tetrahydro-kortizon alakul ki. A C4-5 kettős kötés redukcióját katalizálhatja az 5 $\beta$ -, illetve 5 $\alpha$ -reduktáz is, ezzel egy lépésben képezve 5 $\beta$ , illetve 5 $\alpha$ -tetrahydro-metabolitokat (McGuire és mtsai, 1959). Fiziológias esetben az 5 $\beta$  és 5 $\alpha$  metabolitok aránya 2:1. Ezek a tetrahydro-metabolitok glukuronsavval konjugálódnak és a vizelettel választódnak ki (Cope és mtsai, 1972). A tetrahydro-kortizol és a tetrahydro-kortizon metabolizmusának egy további lehetséges útja, hogy 19 szénatomos 11-oxo vagy 11-hidroxi androszteronná, illetve etiokolanolonná alakulnak.

A 20 $\beta$ , illetve 20 $\alpha$ -dehidrogenázok által katalizált reakcióban 20 $\beta$ , illetve 20 $\alpha$ -kortol és kortolon képződik. Ha a 20-oxocsoport redukciója az A gyűrű redukciója nélkül történik, 20 $\alpha$ -és 20 $\beta$  hidrokortizol képződik. (Shackleton és mtsai, 1993). A kortol és a kortolon továbbalakulhat kortol-és kortolonsavvá (Monder és Bradlow, 1980)

A 6 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenázok a C6-hidroxilációt katalizálják.

A különböző mechanizmusok a kortizol és a kortizon metabolizmusában eltérő arányban vesznek részt. A vizelettel ürített kortizol 50%-a tetrahydro-kortizol, alól (5 $\alpha$ )-tetrahydro-kortizol és tetrahydro-kortizon, 25%-a kortol és kortolon, 10%-a C19 szteroid és 10 %-a kortolsav és kortonsav formájában hagyja el a szervezetet. A maradék néhány százalékot szabad, nem konjugált kortizon és kortizol, valamint 6 $\beta$ , 20 $\alpha$  és 20 $\beta$  metabolitok adják (Fukushima és mtsai, 1960). (1. ábra)



1. ábra: A kortizol katabolizmusa

A vérben keringő szabad kortizon frakció (bár valamennyit a mellékvesekéreg is termel) főleg kortizolból, a vesében működő 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 2-es típusának oxidatív működéséből származik. A keringő szabad kortizolnak ilyen módon kb. egyötöde alakul át (kb. 60 nmol/liter). Ugyanakkor a kortizon a kortikoszteroidkötő fehérjéhez jóval kisebb affinitással kötődik, így a kevesebb termelődő mennyiség ellenére a szabad kortizonkoncentráció a vérben a kortizoléval kb. azonos (Tortorella és mtsai, 1990, Meulenberg és mtsai, 1990).

## ***Patofiziológiai bizonyítékok a glukokortikoidok és a metabolikus szindróma kapcsolatára***

A hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely válaszkészsége kövér emberekben különböző stimulatív hatásokra - pl. akut stresszre, kortikotróp releasing hormon vagy arginin-vazopresszin stimulációra, hipoglikémiára – fokozott (Bjorntorp és mtsai, 1999; Pasguali, 2003; Vicenatti és mtsai, 2002). Megváltozik a centrális glukokortikoid receptorok érzékenysége a kortizol iránt, ami a glukokortikoidokra adott feedback válasz csökkenéséhez vezet (Jessop és mtsai, 2001; Ljung és mtsai, 2002). Egyes glukokortikoid receptor polimorfizmusok abnormális hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely működést, inzulinrezisztenciát, fokozott zsírfelhalmozódást, illetve magasvérnyomást okoznak.

Kövér egyéneknél a plazma kortizolszint változásának napi ingadozása is eltér a normálistól: éjszaka folyamán, amikor a kortizolszint fiziológiásan a legalacsonyabb lenne, obezitás esetén emelkedett kortizolszintet, a reggeli csúcs helyett pedig a szérumban a kortizolkoncentráció csökkenését tapasztaljuk (Ljung és mtsai, 1996; Rosmond és mtsai, 1998; Walker és mtsai, 2000).

A hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely fokozott működésének, ugyanakkor a normális szérumban a kortizolszintnek a háttérben két kompenzációs mechanizmust feltételeznek: gyorsult kortizolmetabolizmust és a szöveti aktiválódást.

A fokozott kortizolmetabolizmust a vizelettel ürülő kortizolmetabolitok vizsgálatával lehet nyomon követni. Az A gyűrűn redukált kortizolmetabolitok relatív koncentrációja a vizeletben kövér egyéneknél emelkedett, ami a májbeli 5 $\alpha$  és 5 $\beta$  reduktáz enzimek fokozott működésére utal (Andrew és mtsai, 1998; Fraser és mtsai, 1999). Az 5 $\alpha$  és 5 $\beta$  reduktáz enzimek működése kövér emberekben fokozott. Ennek magyarázata nem ismert, háttérben feltehetően az enzimek aktivitását befolyásoló táplálkozási faktorok, lipidek és az inzulin, valamint az enzimek szubsztrátellátottsága áll (Wake és mtsai, 2004).

Az előbb említett hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely és a lebontó enzimek túlműködésén kívül az obezitásban előforduló fokozott glukokortikoid hatásért a kortizolhatás szöveti szintű felerősödése is felelős, ami a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának köszönhető. (Wake és mtsai, 2004)

### ***A kortikoszteroidok prereceptorális átalakulása, aktiválódása***

Még tíz évvel ezelőtt is úgy gondolták, hogy a kortikoszteroidok hatását azok vérbeli koncentrációja, plazmafehérjékhez való kötődése, és a célszövetek eltérő intracelluláris receptormintázata határozza meg csupán. Az utóbbi időben vált nyilvánvalóvá, hogy a kortikoszteroid hatást szövetspecifikus prereceptorális enzimek is befolyásolják. Ilyen prereceptorális átalakulás egyéb szteroidok esetében is ismert: androgének esetén az  $5\alpha$  reduktázok, ösztrogének esetén a  $17\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenázok és az aromatázok, tiroid hormonok esetén az  $5'$ -monodejodináz felelős ezért a mechanizmusért.

A glukokortikoidok biológiai aktivitásáért a 11-es pozícióban levő hidroxilcsoport is felelős. Így például a kortizol és a kortikoszteron aktív szteroidok, míg 11-keto formáik biológiailag inaktív vegyületek. Így glukokortikoidok esetében ezért a prereceptorális átalakulásért a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenázok a felelősek. Azaz egy adott szövet saját szintjén a helyi aktív kortikoszteroidok arányát a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenázok expresszióján, szabályozásán keresztül szabályozni képes (Seckl és mtsai, 2004).

### ***$11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenázok - történeti áttekintés***

#### *A $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 2-es típusa és a mineralokortikoid receptor paradoxon*

A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzimaktivitást, azaz a 11-hidroxiglukokortikoidok enzimátikus átalakulását 11-keto formákká 50 évvel ezelőtt írták le először (Amelung és mtsai, 1953) Ezt az enzimaktivitást több sejtben, szövetben is felfedezték később: placentában (Osinski és mtsai, 1960), vesében (Jenkins és mtsai, 1966), májban (Bush és mtsai, 1969). 1980-ban Monder és társai patkány májsejtben NADPH függő  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzimaktivitást írtak le, ami a kortizon  $11\beta$  redukcióját kortizollá és a kortizol inaktív kortizonná alakulását egyaránt képes katalizálni (Monder és mtsai, 1984). Kezdetben az újonnan felfedezett enzimet a glukokortikoidok egyik lebontójának gondolták minden egyéb funkció nélkül, később



írták csak le a kortizol kortizonná alakulásával történő inaktiválódásának fiziológias szerepét (Funder és mtsai, 1990, Edwards és mtsai, 1988). Felfedezték továbbá, hogy ez az enzim lehet a mineralokortikoid receptor paradoxon megoldása. A mineralokortikoid receptor paradoxon azt jelentette, hogy a tisztított, illetve rekombináns mineralokortikoid receptor affinitása in vitro kortizol és aldoszteron iránt körülbelül egyenlő. Ezzel szemben in vivo a disztális tubulusban a mineralokortikoid receptoron főleg aldoszteron hatás érvényesül, a glukokortikoid hatás minimális. Ezért a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz a felelős, ami az aldoszteron célszerveiben a kortizolt prereceptorálisan inaktív kortizonná alakítja.

Nyilvánvalóvá vált azonban, hogy a Monder által patkány májsejtben felfedezett  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz széleskörű előfordulása, alacsony affinitása, mikromoláris nagyságrendű  $K_M$  értéke miatt nem játszhat szerepet a kortizol prereceptorális szintű inaktivációjában. Ezeknek az ellentmondásoknak a tisztázása vezetett egy másik izoenzim, a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 2-es típusának a leírásához (Albiston és mtsai, 1994; Agarwal és mtsai, 1994).

A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 2-es típusa az aldoszteron célszerveiben, azaz a disztális tubulusban, a colonban, a nyálmirigyekben és a placentában expresszálódik. Az enzim egy  $NAD^+$ -függő dehidrogenáz, ami a kortizolt inaktiválja kortizonná ( $K_M$  nanomoláris nagyságrendű),  $11\beta$ -reduktáz aktivitása elhanyagolható. A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 2-es típusának génjében levő mutációk veleszületett mineralokortikoid hiányt okoznak. Az előbbieket alapján valószínűsíthető, hogy a mineralokortikoid receptort a glukokortikoidoktól a szervezetben ez az enzim védi (Albiston és mtsai, 1994).

#### *A $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa: prereceptorális aktiváció*

Az enzim ellenkező irányú működése, azaz a kortizon kortizollá alakulásának katalizálása már a kortizon felfedezésekor kiderült: ezt a molekulát először rheumatoid arthritisben szenvedő betegektől szérumban találták, anti-inflammatorikus hatású anyagnak gondolták, ami a szükséges helyen a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz által katalizált reakcióban aktív kortizollá tud alakulni (Kendall, 1971). A több szervben, több irányban leírt  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitások között végül izotópos

eredmények (Hellmann és mtsai, 1971), illetve a szérum kortizon/kortizol arány mérése vesebetegekben (Srivastava és mtsai, 1973, Whithworth és mtsai, 1989), valamint a venae hepaticae és a v. renalisok szelektív angiográfiás vizsgálatának lehetősége (Walker és mtsai, 1992) segített rendet teremteni. Igazolták ugyanis vesebetegeken, hogy a kortizol kortizonná alakulásában a vese lényeges szerepet játszik, valamint a katéterezéssel nyert, v. renalisból származó vérben a kortizol/kortizon arány jóval alacsonyabb, míg a v. hepaticában jóval magasabb a perifériás vérhez viszonyítva. Így lett a reduktáz irányba működő máj-izoenzim a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa, míg az oxidáz irányba működő, fentebb már részletezett vese-izoenzim pedig a 2-es típus.

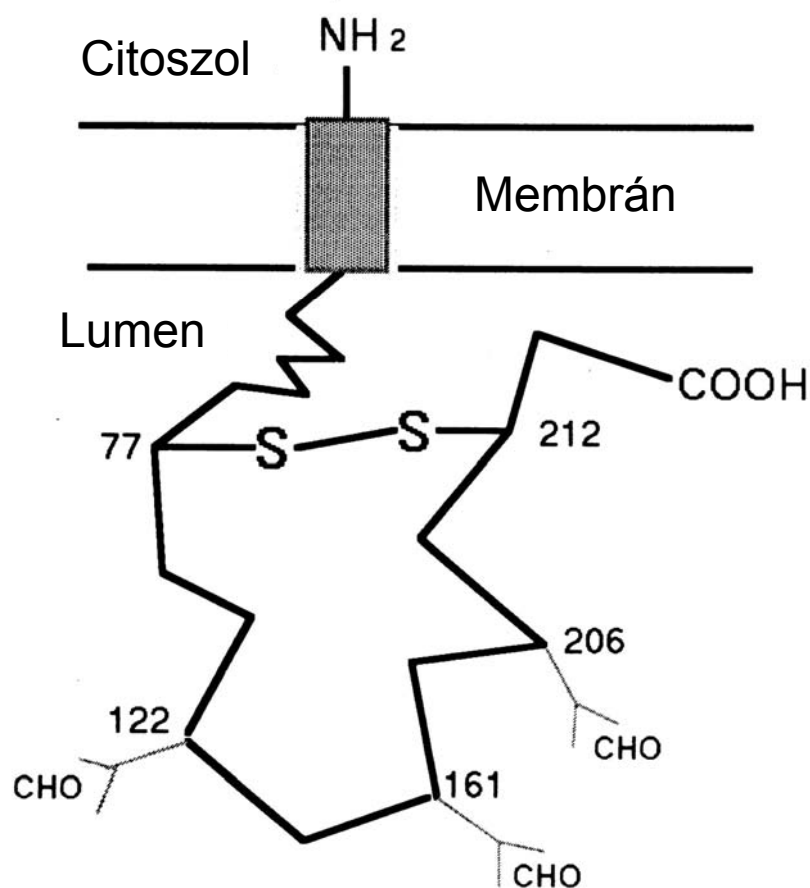
### ***11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus: klasszifikáció és fehérjeszerkezet***

A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa a rövid láncú dehidrogenáz/reduktáz szupercsaládba tartozik. Ez a napjainkban ismert egyik legnépesebb enzimes család, csaknem 3000 tagot számlál (Matsugana és mtsai, 2006). A család valamennyi tagjában konzervált régió a nukleotid-kofaktorkötő hely és az aktív centrum. A nukleotidkötő-hely a benne található GXXXGXG szekvencia miatt specifikus NADPH-ra (Jornwall és mtsai, 1995). A kofaktorkötőhely másodlagos szerkezete  $\alpha$ -hélixekből és  $\beta$ -redőzetekből épül fel meghatározott,  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$  sorrendben, ún. Rossmann-zsebet alkotva (Grundy és mtsai, 1997). Az aktív centrum primer szerkezetére sok tirozin, lizin és szerin előfordulása jellemző, szintén konzervált sorrendben (Stewart és mtsai, 1999).

A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusa egy citoszólikus részből, egy transzmembrán doménből és egy intraluminálisan elhelyezkedő katalitikus alegységből vagy aktív centrumból áll (2. ábra). A citoszólban elhelyezkedő domén igen rövid, mindössze 5 aminosav hosszúságú. Ezt egy szintén rövid, néhány aminosavból álló transzmembrán domén követi. Az N-terminális régió a citoplazma felé, míg a C-terminális régió az endoplazmás retikulum lumene felé néz. Az enzim orientációjában az N-terminálison elhelyezkedő, a citoszólban levő két, pozitív töltésű lizin, illetve a C-terminálison levő, az endoplazmás retikulum lumenében elhelyezkedő két, negatív töltésű glutamát kulcsfontosságú. Az 5-ös pozícióban levő lizin mutáció-

analízise mutatott rá ennek az aminosavnak, illetve oldalláncának az enzim topológiájában betöltött fontos szerepére (Odermatt és mtsai, 1999, Frick és mtsai, 2004). Az N-terminális enzimaktivásban betöltött szerepének vizsgálatokor ellentmondásos eredmények születtek. A COS és CHO sejtekben expresszált, N-terminálisától megfosztott fehérje inaktívnak bizonyult, bár ebből az aktív centrum egyes részei is hiányoztak (Obeid és mtsai, 1992, Mercer és mtsai, 1993). Szignál szekvencia hiányában itt az enzim a citoszólban helyezkedett el, így az endoplazmás retikulum lumenében kialakuló, a működés szempontjából fontos diszulfidhidak hiányoztak (Ozols, 1995). Sejtekből kivont 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim molekulák C-terminálisán szintén inaktívnak bizonyult, ami igazolhatná az N-terminális domén fontos szerepét az enzim működésében (Duax és mtsai, 2000). Ugyanakkor az *E. coli*-ban expresszált N-terminális nélküli 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz molekula enzimaktivitása magasabb volt az eredetinel (Walker és mtsai, 2001).

A patkány enzimfehérjén elhelyezkedő két glikozilált aszparagin-X-szerin szekvencia is a működés szempontjából fontos: CHO sejt vonalon végzett expressziós kísérletekben az egyik glikozilációs hely mutációja az enzimaktivitás 75%-os, a másiké pedig 50%-os csökkenését eredményezte. Az emberi hepatikus 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz molekula három glikozilációs helyet tartalmaz. Mind az *E. coli*-ban végzett expressziós kísérletek (Blum és mtsai, 2000), mind pedig a glikozilációs helyek mutációja azt bizonyította, hogy a humán enzim esetén a protein foldinghoz és az enzimaktiváshoz a glikoziláció nem feltétlenül szükséges (Walker és mtsai, 2001). A szintén három glikozilációs hellyel rendelkező nyúl 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenázon végzett vizsgálatok is alátámasztották az előbbieket (Pu és mtsai, 2000).



2. ábra: A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusa (Ozols, 1995)

### Enzimkinetika

A Monder által felfedezett eredeti enzim, a patkány májsejtben talált  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz (a továbbiakban a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa) a szervezetben számos helyen expresszálódik: májban, tüdőben, zsírszövetben, erekben, ováriumban és a központi idegrendszerben. Patkányban a vesében és a herében is leírták ezt az enzimet. Ezeken a helyeken a glukokortikoid receptor nagymennyiségben expresszálódik, hiszen a glukokortikoidok jelentős szerepet játszanak az előbbi szervek esetében az anyagcsere szabályozásában.

A Monder által eredetileg patkány májsejtéből származó, mikroszomális  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus bidirekcionális enzim, bár in vitro reduktáz aktivitása instabil. Sejtmentes rendszerben pedig az eredeti enzim esetén csak

dehidrogenáz aktivitást detektáltak (Lakshmi és mtsai, 1988). Az enzim Michaelis konstansa kortikoszteronra  $1,83 \pm 0,06 \mu\text{M}$ , kortizolra nézve pedig  $17,3 \pm 2,24 \mu\text{M}$ .

Ha az enzimmolekula cDNS-ét különböző sejtvonalakban expresszálták, ép sejtekben az enzim reduktáz irányba működött (Duperrex és mtsai, 1993, Low és mtsai, 1994). Hepatocitákból, fibroblasztokból, zsírszöveti őssejtekből, tüdőből, hippokampális sejtekből származó sejt kultúrákon végzett kísérletekkel szintén erre az eredményre jutottak (Jamieson és mtsai, 1995, Hammami és mtsai, 1991, Bujalska és mtsai, 1997, Bujalska és mtsai, 1999, Hundertmark és mtsai, 1995, Rajan és mtsai, 1996). Ezt *in vitro* végzett enzimkinetikai elemzésekkel is alátámasztották: kortizonra az enzim  $K_M$  értéke  $0,3 \mu\text{M}$ , míg kortizolra  $2,1 \mu\text{M}$ , ami arra utal, hogy az enzim fiziológiás működési iránya *in vivo* reduktáz (Tannin és mtsai, 1991, Stewart és mtsai, 1994). Később számos más szövetből, szervből is előállítottak tisztított 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz fehérjét, illetve cDNS-t, illetve végeztek ezeken enzimkinetikai vizsgálatokat. Emberen (Tannin és mtsai, 1991), egéren (Rajan és mtsai, 1995), majmon (Moore és mtsai, 1993), bárányon (Yang és mtsai, 1992), sertésen, tehénen és tengerimalacon (Pu és mtsai, 2000, Shafqat és mtsai, 2003) is végeztek ilyen méréseket.

Az enzim intakt szervekben való reduktáz működését izolált és perfundált macska és patkány májon is leírták. Hasonló reduktáz működést írtak le emberi májon *in vivo* is: orálisan adott kortizon *first pass* metabolizmusa során kortizollá alakul. A per os adott kortizonnak emiatt csupán néhány százaléka éri el a szisztémás keringést, és a vena hepatica kortizol/ kortizon hányadosa magas.

Vannak azonban olyan szervek is, ahol az enzimaktivitás iránya különböző fiziológiás állapotokban, illetve a fejlődés során megváltozik: Leydig sejtekben és neuronokban például *in vivo* mindkét irányú aktivitást leírták (Gao és mtsai, 1997, Philips és mtsai, 1989, Wang és mtsai, 2002, Jellinck és mtsai, 1999, Seckl és mtsai, 2001). Zsírszöveti stromasejtekben pedig a kezdetben dehidrogenáz aktivitású enzim a preadipocitából adipocitáváérés folyamán reduktáz irányú lesz (Bujalska és mtsai, 2002).

## *A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szerepe májban és zsírszövetben*

### *A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szerepe májban*

#### *Glukokortikoid hatás és a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának előfordulása*

Májban a glukokortikoidok az inzulinnal ellentétes hatásúak. Legfontosabb májbeli hatásuk, hogy stressz, illetve éhezés esetén tápanyagokat mobilizálnak a raktárokból, biztosítva ezzel a normoglikémia fenntartását. Ennek egyik legfontosabb eleme a glukoneogenezis serkentése. Fokozzák ugyanis a glukoneogenezis sebességmeghatározó enzimének, a foszfoenol-piruvát karboxikináznak az expresszióját.

A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának expresszióját rágcsgáló és emberi májban egyaránt leírtak. Emberben a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid 1-es típusának expressziója a v. centralis körül a legmagasabb (Ricketts és mtsai, 1998). Humán és patkány májsejtkultúrákon az enzim aktivitása kizárólag reduktáz irányú volt, izolált és perfundált patkány májon leírtak dehidrogenáz aktivitást is (Ricketts és mtsai, 1998, Jamieson és mtsai, 1995).

#### *A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szerepe az inzulinérzékenységben és a hepatikus glukoneogenezis szabályozásában*

A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szerepét az inzulinérzékenység szabályozásában Cushing-szindrómás embereken tapasztalt jelenségek vetik fel. Ezek a betegekre ugyanis glukóz intolerancia és csökkent inzulinérzékenység jellemző.

Számos különböző módon, pl. transzgen 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz-hiányos egerekkel, illetve az enzim szelektív gátlásával (Jamieson és mtsai, 2000) bizonyították, hogy az enzim csökkent aktivitása következtében kialakuló csökkent glukokortikoid koncentráció a hepatociták megnövekedett inzulinérzékenységéhez vezet.

Annak bizonyítására, hogy májsejtben a lokális glukokortikoid hatás felerősítéséért a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa felelős, 1-es típusú  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz knockout egereket hoztak létre. Az 1-es típusú  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz-knockout egér normálisan fejlődik, fertilis, vérnyomása normális. Adrenalectomizált knockout egér képtelen a kapott 11-dehidrokortikoszteron kortikoszteronná alakítására. Az emelkedett plazma kortizonszint ellenére az 1-es típusú  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz knockout egérben az intracelluláris glukokortikoid regeneráció csökkent mértékű, így a glukokortikoidok intracellulárisan kevésbé antagonizálják az inzulin hatását. Így a foszfoenolpiruvát karboxikináz és a glukóz-6-foszfátáz aktivitása csökken, ami a stressz által kiváltott hipoglikémiás válasz csökkenéséhez vezetett (Kotelevtsev és mtsai, 1997).

A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szerepét a glukoneogenezis szabályozásában az enzim szelektív gátlásával is igazolták. Rágcsálók hét napos karbenoxolon kezelése jelentősen csökkentette a foszfoenol-piruvát-karboxikináz és a glukóz-6-foszfátáz expresszióját (Alberts és mtsai, 2002). Leírták továbbá 2-es típusú diabéteszes egér modelleken, hogy az enzim szelektív gátlása az állatok inzulinérzékenységének fokozódásához vezetett (Alberts és mtsai, 2002).

Klinikai vizsgálatok során is hasonló eredményekre jutottak. Egészséges emberek karbenoxolon kezelése a májbeli glukózprodukción csökkentette (Walker és mtsai, 1995). Hasonló kezelés 2-es típusú diabéteszben szenvedő emberek inzulinérzékenységét is javította (Andrews és mtsai, 2003)

Érdekes további megfigyelés, hogy mind transzgénikus egér modelleken, mind humán kísérletek során az abdominális zsírszövet mennyisége fordított arányban áll a májbeli 1-es típusú  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzimaktivitással. Ugyanakkor egészséges és 2-es típusú diabétesz mellitusban szenvedő emberek hepatikus 1-es típusú  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitása között a vizelettel ürített kortizolmetabolitok ürítése alapján nem volt különbség (Kerstens és mtsai, 2000), míg az orálisan adott kortizon kortizollá alakulása szintén csökkent mértékű volt (Andrews és mtsai, 2002).

### *A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szabályozása májban*

A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitását a májban számos tényező befolyásolja. Rágcsálók májában az ösztrogén és az inzulin az enzim aktivitását csökkentette (Low és mtsai, 1994). Növekedési faktorok (TGF $\beta$ , bFGF, EGF, HGF) azonban hatástalannak bizonyultak (Ricketts és mtsai, 1998). Patkányból származó hepatoma sejtvonalon az enzim reduktáz aktivitása inzulinnal és IGF1-el gátolható volt, míg dexamethason az aktivitást fokozta (Voice és mtsai, 1996).

A májbeli 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szabályozása a CEBP $\alpha$  transzkripciós faktor segítségével valósul meg (Williams és mtsai, 2000). Feltételezik továbbá, hogy a tiroxin mind transzkripciós szinten, mind az enzimaktivitás szintjén hat: patkány és emberi májon is több ilyen vizsgálat készült, eltérő eredménnyel (Whorwood és mtsai, 1993, Zumoff és mtsai, 1983). Birka májon a metirapon a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitást gátolja (Sampath-Kumar és mtsai, 1997).

Májcirrhosis esetén emberben eddig ismeretlen ok miatt a májbeli 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitása fokozódik (Stewart és mtsai, 1993).

### *A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa zsírszövetben*

#### *Expresszió és enzimaktivitás*

A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának jelenlétét zsírszövetben először a radioaktívan jelzett kortizol abdominális zsírszövetben való kortizonná alakulásának kapcsán írták le. Megfigyelték, hogy mind az expresszió, mind pedig az enzimaktivitás a cseplesz zsírsejtjeiben jóval magasabb, mint a subcutan zsírsejtékben (Bujalska és mtsai, 1997). Ez olyannyira igaz, hogy találóan az egyik szerző az abdominális zsírfelhalmozódást a „cseplesz Cushing-kórjának” nevezi (Bujalska és mtsai, 1999).

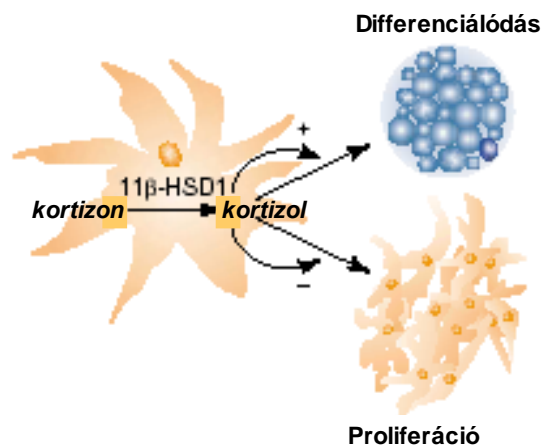


*1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz expresszió és enzimaktivitás változása a zsírszövetben a fejlődés során*

Az enzim aktivitása zsírszövetben bidirekcionális, a működés irány a zsírsejt, illetve a még kialakulóban lévő preadipocita fejlődési stádiumától függ. Kezdeti fejlődési stádiumban lévő preadipocitákban, ilyenek a cseplesz zsírsejtjei, a dehidrogenáz aktivitás dominál. Ezzel szemben frissen izolált kifejlett adipocytákban reduktáz aktivitást írtak le (3. ábra).

A glukokortikoidok szerepet játszanak egyrészt a zsírszövet eloszlásában, másrészt a funkciójában is. Gátolják a preadipociták adipocitává alakulását. Ha a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz dehidrogenázként működik, a kortizol és a kortikoszteron inaktiválódik, a preadipociták proliferációja gátlódik. (Bujalska és mtsai. 2002). Amikor a preadipociták fejlődése megindul, az enzim egyre növekvő reduktáz aktivitása révén egyre több és több aktív kortizolt termel, ami elősegíti a zsírsejtek differenciálódását (Ringold és mtsai, 1986; Hauner és mtsai, 1989; Bujalska és mtsai, 1999). Ez a mechanizmus okozza a pathológiásan emelkedett kortizolszinttel járó állapotokban, pl. Cushing- kórban és Cushing szindrómában a zsírszövet jellegzetes eloszlását a törzsön. Fiziológiásan a csepleszben ugyanis stromasejtek, azaz preadipocyták találhatóak, emelkedett szérum glukokortikoid koncentráció hatására ezek fejlődésnek indulnak, és lipideket halmoznak fel, ami a Cushing kórra jellemző centrális vagy más néven viscerális zsírfelhalmozódást okozza.

Habár a glukokortikoid termelés és szekréció kövér egyéneknél általában fokozott, a plazma kortizolszint nem feltétlenül emelkedett. A zsírszövet felhalmozódásáért ezekben az esetekben a viscerális, illetve a szubkután zsírban észlelt fokozott 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitás a felelős, mely a glukokortikoidok lokális hatását felerősíti a keringő kortizon kortizollá alakításával.



3. ábra: A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz szerepe a zsírszövetben: a kortizol az adipociták fejlődésében kulcsfontosságú. Az enzim aktivitása a fejlődés kezdetén dehidrogenáz irányú, később az enzim működésének iránya reduktáz irányba fordul. A kortizol a preadipociták proliferációját gátolja, míg differenciálódásukat érett adipocitává elősegíti.

Az előbbieket transzgén állatokon, illetve különböző adipocita sejtvonalakon végzett kísérletekkel is alátámasztották. Kiderült ugyanis, hogy a zsírszöveti  $11\beta$ -hidroxiszteroid 1-es típusát overexpresszáló transzgén egérben az adipocita differenciáció fokozott. Ez a zsírsejtek igen nagy méretében nyilvánul meg (Masuzaki és mtsai, 2001).

Rágcsálóból származó adipocita sejtvonalakon (3T3-L1, illetve 3T3-F442A) szintén megfigyelték az enzimaktivitás fejlődési stádiumtól függő eltérő irányát (Napolitano és mtsai, 1998, Jessen és mtsai, 2002).

## *Metabolikus szindróma és 2-es típusú diabétesz modell transzgén állatok - bizonyítékok a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus és a metabolikus szindróma kapcsolatára*

A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának pontos szerepét az obezitás kialakulásában génmanipulált állatok segítségével is próbálták tisztázni. Az emberi obezitás, metabolikus szindróma és 2-es típusú diabétesz mellitusz modellezésére transzgén egereket állítottak elő. Készültek a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusát overexpresszáló, illetve knockout állatok, illetve vizsgálták a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának működését egyéb, korábban már széles körben használt diabétesz modell állatokon.

### *11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus transzgén állatok*

#### *Hepatitis 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz overexpresszáló transzgén egér*

A májbeli 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusát overexpresszáló transzgén egér az obezitás kivételével a metabolikus szindróma valamennyi tünetét mutatja: ezeken az állatokon zsírmáj, hipertónia és inzulinrezisztencia egyaránt kifejlődik (Paterson és mtsai, 2004)

#### *Zsírszöveti 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz overexpresszáló transzgén egér*

A zsírszövetben található 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz overexpressziója - az előbbieken már említett AP2 transzkripciós faktor a gén promoterén keresztül (AP2-HSD1 egér) - a metabolikus szindrómához hasonló fenotípus kialakulásához vezet, azaz centrális obezitással, magasvérnyomással, inzulin rezisztenciával és diszlipidémiával jár (Masuzaki és mtsai, 2001; 2003). Ez magas zsírszöveti kortikoszteron, plazma leptin, tumor nekrozis faktor- $\alpha$  koncentrációval, és emelkedett zsírszöveti lipoprotein lipáz mRNS szinttel jár együtt. A

vérnyomásemelkedés oka az emelkedett angiotenzinogén szint. Ezek az állatok hyperphagiásak.

#### *11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 knockout egér*

A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus -/- homozigóta egérenél a metabolikus X szindróma nem alakul ki (Kotelevtsev és mtsai, 1997; Morton és mtsai, 2001). Magas zsírtartalmú táplálás esetén sem kell esetükben obezitás kialakulásával számolni. Az enyhén emelkedett szérumban kortikoszteron szint ellenére (ez egérben a kortizol megfelelője) intracellulárisan a normálhoz képest csökkent kortikoszteron szintet találtak. Az állatok szérumban lipid profilja is igen kedvező volt: esetükben alacsony szérumban triglicerid szintet, és emelkedett HDL koleszterinszintet találtak (Harris és mtsai, 2001; Yau és mtsai, 2001). Ezt magas zsírtartalmú táplálkozással illetve krónikus stressz okozta tartós hiperglikémiával sem lehetett befolyásolni. Hasonlóan kedvező változást tapasztaltak a májban a glukokortikoid-függő génexpressziójú enzimek esetében is: a glukoneogenezis enzimeinek - főleg a foszfoenolpiruvát karboxikináznak - az expressziója jelentősen csökkent, a lipoxidáció enzimeinek expressziója viszont jelentősen fokozódott.

#### *Poligénes metabolikus szindróma modell*

Morton és mtsai 2005-ben hoztak létre poligénes metabolikus szindrómás egereket. A „fat” állatok testének zsírtartalma 21%, a „lean” állatoké 4%. A fat állatokon metabolikus szindróma alakul ki inzulinrezisztenciával, zsírmájjal és magasvérnyomással. A fat állatokban a zsírszöveti 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitás és a plazma glukokortikoidok szintje jelentősen csökkent, míg a hepatikus 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitása emelkedett. A lean egéren kívülről adott glukokortikoidok és zsírokban gazdag táplálkozás ellenére sem alakul ki metabolikus szindróma.

## *11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 aktivitás egyéb 2-es típusú diabétesz modelleken*

### *Goto-Kakizaki patkány*

A Goto-Kakizaki patkány a humán 2-es típusú diabétesz mellitusz modellje. Az emberi 2-es típusú diabétesz mellitusz összes metabolikus, hormonális és vaszkuláris rendellenességét fellelhetjük rajta. Sok más diabétesz modellállattal ellentétben ez az állat sovány. Eddig a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának működését ezen a modellállaton nem vizsgálták.

### *Zucker patkány*

A Zucker fat patkány a humán metabolikus szindróma modellje. Kontrollja a Zucker lean állat. Ismert, hogy a Zucker fat patkány zsírszövetében a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim expressziója fokozott, míg májában csökkent. Ennek a szövetspecifikus expressziókülönbségnek az oka, illetve szabályozása ezidáig ismeretlen. Feltételezték inzulin, növekedési faktorok és citokinek szerepét ebben, de pontosan igazolni egyiket sem sikerült (Livingstone és mtsai, 2000, Tomlinson és mtsai, 2001). Az állat hippokampuszában is csökkent 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 működést írtak le, ami feltehetően a humán obezitásban is tapasztalt hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely működésében tapasztalt eltérésekért felelős (Mattson és mtsai, 2003).

### *Ob/ob egér*

Az obezitás modellezésére használt leptin deficiens, illetve rezisztens ob/ob egéren a hepatikus 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 expressziója csökkent volt. (Liu és mtsai, 2003)

### *Db/db egér*

A diabétesz modell db/db egéren a májbeli 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitása emelkedett. Ezt fokozott glukokortokoid-receptor-expresszió, emelkedett foszfoenol-piruvát-karboxikináz szint és megnövekedett inzulinérzékenység kíséri (Liu és mtsai, 2005).

### *KKAY egér*

A KKA $\gamma$  egér poligénes 2-es típusú diabétesz modell. A felnőtt állat hiperglikémiás, hiperinzulinémiás, glukóz intolerancia jellemzi. Az egér májában a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitása és mRNS szintű expressziója a nem diabéteszes kontrollal összehasonlítva csökkent (Alberts és mtsai, 2003).

### ***A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szerepe az obezitás és a metabolikus szindróma kialakulásában emberben***

Emberekben a szervezetben előforduló összes 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus enzimaktivitást a vizelettel ürített tetrahydrokortizol, illetve tetrahydrokortizon aránnyal lehet nyomon követni. Az enzim részvétele a metabolikus szindróma és az obezitás patogenezisében azonban nem pontosan tisztázott. Több szerző vizsgálta a BMI és a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus működése közötti kapcsolatot. Egyes tanulmányok obezitásban a reduktáz irányú működés fokozódását (Rask és mtsai, 2002, Andrew és mtsai, 1998, Tiosano és mtsai, 2003), mások csökkenését írják le (Rask és mtsai, 2001, Stewart és mtsai, 1999). Voltak, akik nem találtak összefüggést a BMI növekedés és az enzim működése között (Fraser és mtsai, 1999, Csabi és mtsai, 2000, Reynolds és mtsai 2001).

A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus különböző szöveti enzimeinek szerepét is vizsgálták az obezitás és a metabolikus szindróma kialakulásában. Feltételezték egyrészt a májbeli, másrészt a zsírszöveti enzim részvételét a folyamatban.

### *A hepatikus 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 szerepe*

Emberben a májbeli 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitás a testtömegindex növekedésével fordítottan arányos. Ennek háttérében valószínűleg az áll, hogy az enzim aktivitásának csökkenése a hepatikus glukózprodukciónak csökkenéséhez, ezáltal jobb inzulinérzékenységhez vezet (Rask és mtsai 2002).

### *A zsírszöveti 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 szerepe*

Kövér testtömegű emberek zsírszövetéből származó szöveti homogenátumokban a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának dehidrogenáz aktivitása és mRNS szintű expressziója emelkedett volt a normál testtömegű emberekhez képest. Ugyanakkor a májhoz hasonlóan a reduktáz aktivitás fordított arányú változását is leírták a BMI növekedésével. Az az állítás tehát, hogy az abdominális elhízás a zsírszövet Cushing kórja, az emelkedett 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz reduktáz aktivitás, illetve az emiatt emelkedett zsírszöveti kortizolkoncentráció miatt, még további megerősítésre szorul.

Ami biztosan igaz, hogy kövér emberekben a cseplesz zsírsejtekben mért 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitás a szubkután zsírszövethez képest emelkedett (Mariniello és mtsai, 2006).

## *Hexóz-6-foszfát dehidrogenáz*

### *A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus működésének iránya -reduktáz vagy dehidrogenáz?*

A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus működésének irányát, azaz azt, hogy az enzim reduktázként vagy dehidrogenázként működik, a kofaktorellátottsága szabja meg. NADPH jelenlétében az enzim reduktázként, hiányában dehidrogenázként működik. Az enzim működéséhez szükséges NADPH ellátást az endoplazmás retikulum lumenében működő hexóz-6-foszfát dehidrogenáz biztosítja. Tehát a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz expressziója, illetve aktivitása az adott sejtben döntő mértékben meghatározza a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim működésének irányát. (Bánhegyi és mtsai, 2004)

### *Biokémiai sajátosságok*

Az endoplazmás retikulum hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzime a citoszól glukóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimének intraluminális megfelelője, bár attól számos tulajdonságában eltér.

A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimaktivitás az endoplazmás retikulumban látens, ami azt jelenti, hogy az enzim aktív centruma intraluminálisan helyezkedik el. (Romanelli és mtsai, 1994, Hori és mtsai, 1974, Barash és mtsai, 1990, Tanahashi és mtsai, 1980). Míg a citoplazmatikus glukóz-6-foszfát dehidrogenáz egyetlen szubsztrátja a glukóz-6-foszfát, az intraluminális hexóz-6-foszfát dehidrogenáz a glukóz-6-foszfáton kívül a galaktóz-6-foszfátot, ezen kívül más hexóz-6-foszfátokat (pl. 2-dezoxiglukóz-6-foszfát), valamint egyszerű cukrokat (pl. glukóz) is képes oxidálni (Romanelli és mtsai, 1994, Beutler és mtsai, 1967). In vitro az enzim kofaktor-specifitása is kettős: működéséhez NAD<sup>+</sup>-ot és NADP<sup>+</sup>-t egyaránt képes használni (Kulkarni et al, 1982). Fiziológias szubsztrátja azonban a glukóz-6-foszfát, a többi lehetséges szubsztrát számára ugyanis az endoplazmás retikulum membránja impermeábilis. A glukóz-6-foszfát bejutását a lumenbe az endoplazmás retikulum membránjának glukóz-6-foszfát transzportere biztosítja (van Schaftingen és mtsai,



2002, Chou és mtsai, 2002). A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz fiziológias kofaktora, a NADP<sup>+</sup>.

A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz bifunkcionális enzim, a pentóz-foszfát ciklus első két lépését (tehát a glukóz-6-foszfát oxidációját 6-foszfoglukonolaktonná, majd ennek további átalakulását 6-foszfoglukonáttá) katalizálja (Bublitz és mtsai, 1988). Rendelkezik tehát a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitáson kívül 6-foszfoglukonolaktonáz aktivitással is (Collard és mtsai, 1999). A foszfoglukonolaktonáz aktivitást genetikai úton és biokémiai úton, egérből származó hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim tisztításával egyaránt igazolták (Mason és mtsai, 1999). Az enzim pH optimuma a citoszólbéli 6-foszfoglukonolaktonáz enzimhez hasonlónak bizonyult. Az endoplazmás retikulumban mérhető 6-foszfoglukonolaktonáz aktivitás a citoszólban működő hasonló enzimnél hőlabilisabb. Az emberi hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimről hasonló 6-foszfoglukonolaktonáz aktivitást egyértelműen igazolni ezidáig nem sikerült. Annyi bizonyított, hogy a humán hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim a rágcsálókéval nagyfokú szekvenciahomológiát mutat, így várható, hogy az emberi enzimről is bebizonyosodik előbb-utóbb ez a második enzimaktivitás (Clarke és mtsai, 2003).

A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim Michaelis-Menten modell szerinti enzimkinetikai leírása is ismert:  $K_M$  értéke NADP<sup>+</sup>-re nézve  $2,61 \times 10^{-5}$  M, glukóz-6-foszfátra nézve  $4,93 \times 10^{-5}$  M, 2-dezoxi-glukóz-6-foszfátra nézve pedig  $2,14 \times 10^{-4}$  M (Kimura és mtsai, 1979).

### *Genetika*

A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim autoszómálisan öröklődő, az endoplazmás retikulumban elhelyezkedő enzim. Különbözik a citoszól glukóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimétől, ennek öröklődése ugyanis nemhez kötött (Hewitt és mtsai, 2005).

Az emberi hexóz-6-foszfát dehidrogenáz cDNS és gén klónozása, illetve identifikálása a nyúl hexóz-6-foszfát dehidrogenáz fehérje szekvenálása segítségével valósulhatott meg (Mason és mtsai, 1999). Az emberi hexóz-6-foszfát dehidrogenáz gén

az 1. kromoszóma rövid karján helyezkedik el (1p36), hossza 37 kb, 5 exont és 4 intront tartalmaz. Egy 89 kDa-os fehérjét ír le, ennek több mint felét az 5. exon kódolja.

A rágsálók hexóz-6-foszfát dehidrogenáz génje a 4. kromoszómán helyezkedik el, szintén egy 89 kDa-os 789 aminosavból álló fehérjét kódol.

#### *A transzkripció és a transláció szabályozása*

A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz gén transzkripciójának és translációjának szabályozása ezidáig kevésbé ismert. Régebben, a 60-as években született eredmények szerint a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz szint nőstény egerekben magasabb, mint hímekben, ami feltételezte, hogy az enzim működése esetleg hormonális szabályozás alatt áll. Az enzim szintjének változása azonban terhességgel, szoptatással nem mutatott összefüggést (Shaw és mtsai, 1968). Születés előtt a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitás fokozódik, a felnőttkori értékre a harmincadik postpartum napon tér vissza (Mandula és mtsai, 1970). Patkány májban pedig az enzim aktivitása fenobarbitállal indukálható (Hori és mtsai, 1974)

#### *A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz fehérje*

A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim aminosav szekvenciáját először a nyúl máj mikroszómában található izoenzimből határozták meg. Erről azonban hamarosan kiderült, hogy ez a szekvencia csak a nyúl hexóz-6-foszfát dehidrogenázra jellemző. Ez a fehérje 90 kDa-os és 763 aminosavat kódol. Ehhez képest a citoszól glukóz-6-foszfát dehidrogenázának molekulatömege 89 kDa, éppúgy, mint a humán intraluminális enzimé.

A nyúl hexóz-6-foszfát dehidrogenázról tudjuk még, hogy a 138. és 263. pozícióban levő Asn-hoz szénhidrátlánc kapcsolódik. Ez felelős az enzim aktív centrumának intraluminális orientációjáért (Ozols, 1993, Brands, 1985). Endoplazmás retikulum retencós szignált és transzmembrán domént az enzimfehérje nem tartalmaz. A fehérje N-terminális régiója a citoszól glukóz-6-foszfát dehidrogenázával nagyfokú homológiát mutat. Mindkét enzimen szinte azonos szerkezetű koenzimkötő hely és glukóz-6-foszfát kötőhely található. A C-terminális rész homológiát mutat egy bakteriális fehérjével (devB), valamint két Plasmodium faj glukóz-6-foszfát

dehidrogenáz fehérjéjének N-terminális részével, továbbá az emberi citoszólbeli 6-foszfoglukonát dehidrogenázzal. (Ozols, 1993)

### ***A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz és a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának együttműködése***

#### *Kolokalizáció az endoplazmás retikulum lumenében*

HEK-293 sejtek konfokális mikroszkópos analízisével igazolták, hogy mind a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának, mind a hexóz-6-foszfát dehidrogenáznak az aktív centruma az endoplazmás retikulumban intraluminálisan helyezkedik el (Atanasov és mtsai, 2004). Ezt igazolja az a tény is, hogy mindkét enzim aktivitása látens, azaz kofaktoruk számára az endoplazmás retikulum membránja nem permeábilis, így a membrán permeabilizálása után enzimaktivitásukban a permeabilizálás előttihez képest jelentős növekedés tapasztalható (Bánhegyi és mtsai, 2004).

#### *Biokémiai bizonyíték - a glukóz-6-foszfát transzporter-hexóz-6-foszfát dehidrogenáz-1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz rendszer*

Az előbbieken ismertetett kompetitív gátlószereken kívül az 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim működésének befolyásolására lehetőséget nyújt kofaktor-ellátottságának változtatása is. Az előbbieken láthattuk, hogy az enzim reduktáz működéséhez NADPH kofaktor szükséges. Régóta ismert, hogy a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz működése során NADPH-t termel, amit más enzimek működésükhöz felhasználhatnak.

A két mikroszomális enzim, a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz, illetve a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa egymással funkcionális kapcsolatban áll. A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz stimulációra bekövetkező kortizoltermelést, illetve a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz stimulációra fokozódó glukóz-6-foszfát oxidációt patkány

májsejt endoplazmás retikulumában, mikroszomális vezikulákon igazolták (Bánhegyi és mtsai, 2004).

A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz működése során termelődő NADPH-t a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusa használja fel, és közben ugyanez fordítva is megvalósul: az 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz működése során képződő NADP<sup>+</sup> pedig a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz kofaktorellátását biztosítja (4. ábra).

A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitása ugyanis glukóz-6-foszfát adására jelentősen emelkedett. Ha azonban az endoplazmás retikulum membránjában elhelyezkedő glukóz-6-foszfát transzportert specifikus gátlószerevel, az S3483-mal gátolták, a glukóz-6-foszfát hozzáadása a kortizon reduktáz aktivitást nem befolyásolta. Ha a mikroszómákhoz glukózamin-6-foszfátot adtak, ami a hexóz-6-foszfát dehidrogenáznak szubsztrátja, de a glukóz-6-foszfát transzporterrel át nem képes átjutni, szintén nem befolyásolta a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusát. A mikroszomális, NAD<sup>+</sup> kofaktorral működő glukóz-dehidrogenáz enzim (Bublitz és mtsai, 1988) szubsztrátja, a glukóz a kortizon reduktáz aktivitást szintén nem befolyásolta.

A rendszerhez adott kortizon a glukóz-6-foszfátból képződő metabolitok intraluminális akkumulációját fokozta, ami a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitásának növekedésére utal. A kortizon koncentrációfüggő módon fokozta az enzimaktivitást. A glukóz-6-foszfát transzporter gátló S3483, ahogy az az előbbiekből alapján várható volt, a radioaktivitás csökkenéséhez vezetett kortizon jelenlétében és hiányában egyaránt.

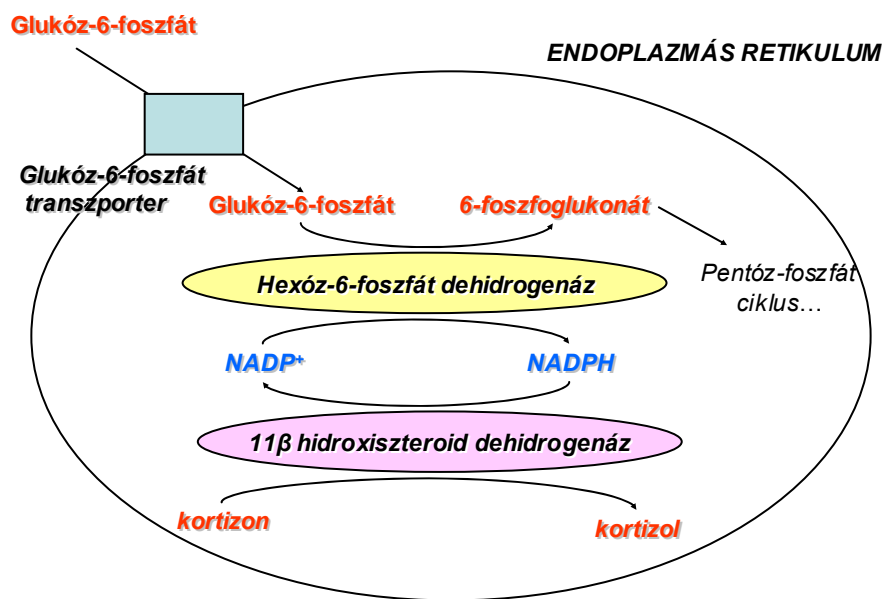
A mikroszomális NADP<sup>+</sup>/NADPH redox ciklusra a két enzim együttes működése hatást gyakorol: kortizon jelenlétében a NADPH képződés a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz működése következtében csökkent.

A glukóz-6-foszfát függő kortizon reduktáz aktivitás, illetve a kortizon-függő intraluminális glukóz-6-foszfát ekvivalens radioaktivitás sztöchiometriáját is kiszámították. Ez 3-4:1-nek adódott a kortizolképződés javára. Ezt egyrészt az magyarázza, hogy a NADPH-t a pentóz-foszfát ciklus második enzime, a 6-foszfoglukonát dehidrogenáz is termeli, másrészt pedig a pentóz foszfát ciklus számos

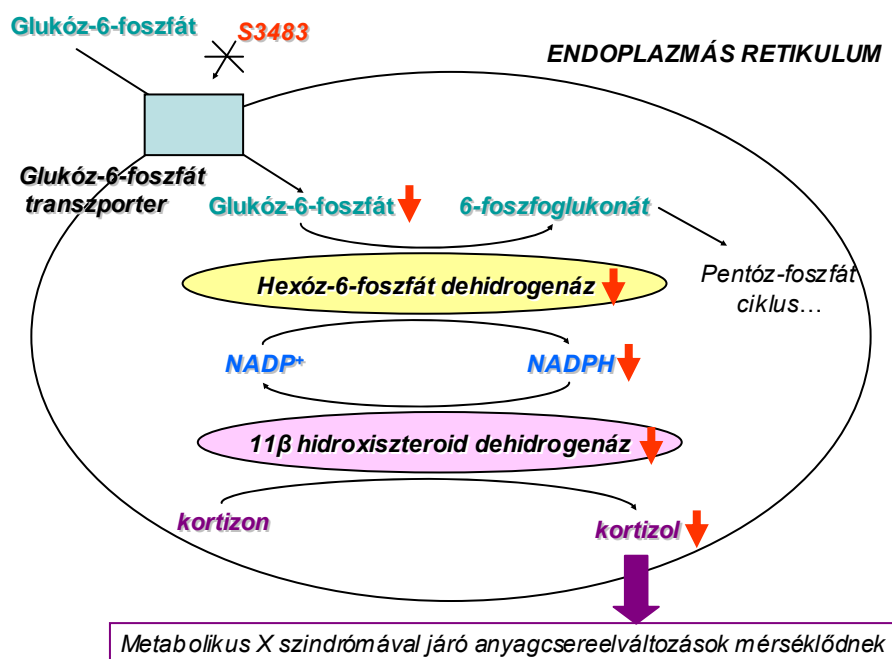
intermedierjére nézve az endoplazmás retikulum membránja permeábilis, ami az intraluminális radioaktivitás csökkenését okozhatja.

Így az előbbieket során ismertetett, a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusának működési zavaraival összefüggő betegségek kialakulásában a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz is szerepet játszhat.

Ezen betegségek, különösen a metabolikus X szindróma kezelésében egy lehetséges terápiás célpont lehetne az endoplazmás retikulum membránjának glukóz-6-foszfát transzportere (5. ábra), melynek gátlószerei egyrészt a vércukorszintet csökkentik a glukóz-6-foszfát szubsztátellátásának csökkentésével, másrészt a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának előbb ismertetett, indirekt úton történő gátlásával. (Bánhegyi és mtsai, 2004)



4. ábra: A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz és a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzimek együttműködése az endoplazmás retikulumban kofaktorellátottságukon alapul.



5. ábra: A glukóz-6-foszfát transzporter gátlása az intracelluláris kortizolkoncentráció csökkentése révén a metabolikus X szindróma terápiás célpontja lehetne

### Genetikai bizonyítékok

#### Kortizon reduktáz hiány-policisztás ovárium szindróma

A 11β-hidroxisteroid dehidrogenáz 1-es típusának és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz együttműködését az a tény is alátámasztja, hogy a két enzim génjének együttes mutációja kortizon reduktáz hiányt eredményez, ami klinikailag a policisztás ovárium szindróma kialakulásában manifesztálódik (Draper és mtsai, 2003). A teljes kortizon reduktáz hiány nagyon ritka, a két enzim génjének bizonyos gyakori polimorfizmusai azonban nőkben a policisztás ovárium szindróma kialakulásának veszélyét hordozhatják (White, 2005).

### *Hexóz-6-foszfát dehidrogenáz knockout egér*

A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz knockout egérben a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 enzimaktivitás megfordulását tapasztalták: a fiziológiásan reduktáz irányba működő enzim ezeknek az állatoknak a májában dehidrogenáz irányba működik. Ennek oka, hogy mivel a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitás teljesen hiányzik, a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz működéséhez szükséges NADPH-t így nem termeli (Lavery és mtsai, 2006).

### *A két enzim génjének koexpressziója emlős sejtekben*

Hexóz-6-foszfát dehidrogenázt és a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusát koexpresszáló HEK-293 és CHO sejtekben az 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz reduktáz aktivitásának fokozódását írták le (Atanasov és mtsai, 2004, Bujalska és mtsai, 2005). Ha a sejteket a citoszólbeli glukóz-6-foszfát dehidrogenázzal transzfektálták, az enzim reduktáz irányú működése nem fokozódott. Ez az eredmény igazolja, hogy a NADPH ugyanabban a kompartmentumban, azaz az endoplazmás retikulum lumenében termelődik (White és mtsai, 2007).

### ***Új terápiás lehetőségek a metabolikus szindróma kezelésére - a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának gátlószerei***

#### *Nem szelektív gátlószerek*

A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának gátlószereit két csoportba sorolhatjuk: ismertek olyan anyagok, melyek aspecifikus inhibitorok, azaz a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusán kívül a 2-es típust is gátolják. Ezen vegyületek terápiás felhasználásának gátat szab, hogy a 2-es típusú izoenzim fiziológiás, mineralokortikoid receptort védő funkcióját is meggátolná. Ilyen nem szelektív inhibitor pl. a glicirretinsav, a karbenoxolon, az alkohol, a bioflavonoidok, a triterpén-származékok, egyes polifenolok, a grapefruit juice és a tea, valamint a gossypol (Hult és mtsai, 1998, Valentino és mtsai, 2003, Zhang és Wang, 1997).

## *A nem szelektív gátlók hatásai*

### *Karbenoxolon*

A karbenoxolon az enzim reduktáz aktivitását gátolja. Számos tanulmány foglalkozott a nem szelektív gátlók közül a karbenoxolon jótékony hatásával a humán metabolikus X szindróma és a 2-es típusú diabétesz mellitusz esetén, mivel egyrészt csökkenti a vércukorszintet, másrészt az inzulinérzékenységet fokozza. A szer hatását metabolikus szindrómát modellező transzgén állatokon is vizsgálták.

Livingstone és Walker kövér és sovány Zucker patkányokon vizsgálta a karbenoxolon hatását. A karbenoxolon a kövér állatokban a májban gátolta, míg az inzulin célszerveiben, azaz a vázizomban és a zsírszövetben a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusát nem befolyásolta. Ennek megfelelően az inzulinérzékenységet nem befolyásolta ugyan, de egy kardiovaszkuláris rizikó szempontjából kedvezőbb lipidprofil alakított ki (alacsony triglicerid és magas LDL koleszterinszint). Sovány állatokon a karbenoxolon az előbbieknél megfelelően szövetspecifikus gátló hatást okozott, ám az előbbi lipidprofil-változások a hat napos karbenoxolon kezelés hatására nem következtek be. Megfigyelték továbbá, hogy a kövér Zucker patkányon a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg fokozott aktiválhatóságát is csökkentette. Ennek hátterében azonban inkább a vesében expresszáldó 11 $\beta$ HSD2 gátlását feltételezik.

2-es típusú diabéteszes betegek hét napos karbenoxolon kezelése a hepatikus glukózprodukción csökkentette, a májbeli inzulinérzékenységet pedig fokozta. Egészséges embereken azonban az előbbi paramétereket nem befolyásolja, viszont az összkoleszterin-szintet csökkenti (Walker és mtsai, 1995; Andrews és mtsai, 2003).

### *Glicirretinsav*

A másik igen alaposan vizsgált vegyület a glicirretinsav, ami az enzim oxidatív hatását gátolja. Így a lokális szteroidkoncentráció emelése révén autoimmun betegségek kivédésében játszhat szerepet. Ezt a humán systemás lupus erythematosus modelljeként



használt MRL 1pr egértörzs esetében írták le: a glicirretinsav a systemás lupus erythematosus progresszióját késlelteti (Horigome és mtsai, 2001).

### *Szelektív gátlószer*

Az 1-es típus szelektív gátlásának számos lehetséges terápiás következménye miatt rengeteg különböző kutatást végeztek ilyen vegyületek irányába. A kenodezoxikólsav a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz szelektív gátlója, de a szer hatékonysága igen alacsony (Diedrich és mtsai, 2000). Újabb generációs, az előbbinél jóval hatékonyabb gátlószercsoport az arilszulfonamidotiazolok (Barf és mtsai, 2002). Adipocitákban kimutatták, hogy az orális antidiabetikumként használt tiazolidindionok hatásmechanizmusában is szerepet játszhat a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenázra gyakorolt gátló hatása (Berger és mtsai, 2001). A koleszterinszint csökkentőként ismert fenofibrát szintén rendelkezik 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz-gátló hatással, humán májsejt kultúrákban (Hermanowsky-Vosatka és mtsai, 2000). Az enzim újabban leírt szelektív gátlószerei még a zearalenon, a flavonon, a metiljazmonát, a dibenzoil-metán, a BVT.2733 és a naringenin is. A flavonon a jövő egyik ígéretes antidiabetikuma lehet.

### *A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus szelektív gátlásának hatása a hiperglikémiás és hiperinzulinémiás egértörzsek szénhidrát-háztartására*

A BVT. 2733 szelektív gátlószerről leírták, hogy a hiperglikémiás KKA $\gamma$  egérben csökkenti a vér glukózkoncentrációját, a szérum inzulinkoncentrációt, és a májban expresszáldó foszfoenol-piruvát karboxikináz mRNS szintet. A vércukorszint és a szérum inzulinkoncentráció hasonló csökkenését figyelték meg az ob/ob, illetve a db/db egértörzsekben is. A BVT. 2733 kezelés hatására a normál egérben vércukorszint csökkenést nem tapasztaltak.

A vércukorszinttel párhuzamosan változik az egerek táplálkozási magatartása is: a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz gátlása a táplálékkereső magatartás fokozódásához, és hyperphagiához vezet, hiszen emberhez hasonlóan az éhségérzet kialakulásában is a glukokortikoidok játszanak szerepet.

Mind egészséges, mind hiperglikémiás és hiperinzulinémiás egerek esetén a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szelektív gátlása az inzulinrezisztencia jelentős csökkenését idézte elő, amit orális glukóz tolerancia teszttel is igazoltak. (Alberts és mtsai, 2002)

#### *A $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus szelektív gátlásának hatása a szérumban lévő lipidek szintjére*

A BVT.2733 szelektív gátlószer adásakor az állatok szérumban koleszterin, triglicerid és szabad zsírsav szintjében is jelentős csökkenést tapasztaltak. Ezért a hatásért feltehetően az a felelős, hogy az enzim gátlása révén bekövetkező kortizolkoncentráció csökkenés a lipolízis enzimeinek csökkent aktivitását vonja maga után (Andrews és mtsai, 2003). A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz overexpresszált egerekben tapasztalt emelkedett zsírszöveti kortikoszteron szint okozta lipoprotein-lipáz mRNS, illetve szérumban szabadzsírsav emelkedésnek szintén ez az oka (Masuzaki és mtsai, 2001).

#### *Természetes gátlók*

In vitro kísérletekben igazolták, hogy a növekedési hormon önmagában nem, míg az IGF-1 a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusát gátolja (Moore és mtsai, 1999). Hasonló eredményre jutottak különböző, a növekedési hormon termelődésével kapcsolatos betegségekben szenvedő betegek vizsgálatával is. A növekedési hormon hiányban fellépő akromegália, obezitás, inzulinrezisztencia és osteopenia kialakulásában feltehetően a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es izoenzime játszik szerepet (Bengtsson és mtsai, 1989; Sacca és mtsai, 1994). A betegek vizeletének kortizon/kortizol metabolit aránya akromegáliában csökkent, hipofízis növekedési hormon hiányban pedig emelkedett. Az akromegáliában tapasztalt csökkenés a növekedési hormont termelő góc sebészi kiirtásával, illetve növekedési hormon receptor antagonistákkal, valamint szomatostatinnal korrigálható volt (Moore és mtsai, 1999; Trainer és mtsai, 2001). A növekedési hormon hiányban tapasztalt

vizelet kortizon/kortizolmetabolit aránynövekedés pedig pedig hormonpótlásra normalizálódott.

### *Az endoplazmás retikulum*

Az endoplazmás retikulum a citoszólban található hálózatos membránrendszer (Palade, 1956). Az endoplazmás retikulum, belső, zárt része, a lumen, a teljes sejt térfogatának csaknem 10%-át adja. Számos metabolikus folyamat helye az ER lumen, mint például a szénhidrát és szteroidanyagcsere egyes folyamatai, egyes biotranszformációs reakciók. A szekréciós fehérjék szintézise és az azt követő poszttranszlációs módosítások inkább a durva felszínű endoplazmás retikulumban, míg a többi folyamat inkább a sima felszínű endoplazmás retikulumban zajlik. Ezekhez az anyagcserefolyamatokhoz szükséges enzimek kofaktor-és szubsztrátellátásukat általában a citoszólból kapják, termékeiket pedig ide adják le (Benedetti és mtsai, 2005).

Emiatt az endoplazmás retikulum membránján át számos transzportfolyamat zajlik. Aktív transzporttal jut át a membránon a kalcium ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz (SERCA)) és a protonok ( $\text{H}^{+}$ -ATPáz). A kalcium ioncsatornákon keresztül is átlépheti a membránt (IP3-receptor kalcium csatorna, ryanodin receptor). Az endoplazmás retikulum membránjában számos uniporter is található (a glukóz, a glukóz-6-foszfát, az anorganikus foszfát, a pirofoszfát, a glutation, a dehidroaszorbát és kisebb glukuronidok számára). Antiportert az ATP, egyes nukleotid-cukrok és a nagyobb glukuronidok használnak (Hirschberg és mtsai, 1998, Abeijon és mtsai, 1997, Lin és mtsai, 2000, Marcolongo és mtsai, 1998, Bánhegyi és mtsai, 1996, Corbett és mtsai, 2000).

Biokémiai szempontból az ER lumen számos paraméterében eltér a citoszóltól. A citoszólhoz képest az ionizált  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja az endoplazmás retikulum lumenében négy nagyságrenddel magasabb (Meldolesi és mtsai, 1998), továbbá a redukált glutation (GSH) és a glutation diszulfid (GSSG) arány kb. századrésze a citoszolénak (Hwang és mtsai, 1992). Aszkorbát esetében a koncentráció a lumenben egy nagyságrenddel magasabb. Az endoplazmás retikulum lumene a citoszólnál savasabb pH-jú, valamint eltér a két szubcelluláris kompartmentum redox potenciálja is.

A sejten belüli kompartmentumok fiziológias redox állapotának fenntartásában, illetve az egyes sejtalkotók és a citoszól közötti transzmembrán redoxpotenciál

fenntartásában fiziológias redox pufferek, (a továbbiakban redox rendszerek) játszanak szerepet.

### *Redoxpotenciál és redox rendszerek az endoplazmás retikulumban*

#### *Redukált glutation és glutation-diszulfid*

Egy szubcelluláris kompartmentum redox potenciáljának a jelentősége az, hogy megszabja a kompartmentumban zajló redoxreakciók irányát. Az endoplazmás retikulum legfontosabb és ezidáig leginkább vizsgált redox tényezője a redukált glutation és a glutation-diszulfid (GSH/GSSG) által alkotott rendszer. A citoszól és az endoplazmás retikulum között az egyik legfontosabb eltérés, hogy az intraluminális tiolok (a glutation és a protein tiolok egyaránt) jóval oxidáltabb formában vannak jelen. Ismert ugyanis, hogy a citoszólban a redukált és oxidált glutation aránya 100:1, míg az endoplazmás retikulumban ez az arány mindössze 1-2:1 (Hwang és mtsai, 1992). Az endoplazmás retikulum lumenének teljes glutation koncentrációja 6-10 mM körüli érték, ami körülbelül megfelel a citoszól totál glutation koncentrációjának. Ismert továbbá, hogy az ER lumenben található glutation fele az ott levő rezidens, illetve különböző szekréciós fehérjékkel alkotott kevert diszulfid formájában van jelen. (Bass és mtsai, 2004).

A redukált glutation és glutation diszulfid koncentrációk alapján a citoszól redox potenciálja -0,24 V-nak, míg az endoplazmás retikulum lumenének redox potenciálja -0,18 V-nak adódik.

Régebben úgy gondolták, hogy az előbb említett oxidáló környezet kialakításáért elsősorban az a felelős, hogy a glutation oxidált formájának transzportja az endoplazmás retikulum lumenébe elsőbbséget élvez a redukált formával szemben. Felmerült az a lehetőség is, miszerint a redukált glutation endoplazmás retikulumból történő kiáramlása a felelős. (Hwang és mtsai, 1992). Újabb eredmények alapján az endoplazmás retikulum membránján át inkább a glutation redukált formája transzportálódik, az intraluminális oxidatív környezet kialakításáért ennek oxidációja felelős. A redukált glutation oxidálódhat a dehidroaskorbát GSH-függő redukciója

kapcsán, valamint a protein diszulfid izomeráz által katalizált reakcióban és számos egyéb helyi enzim működése következtében is (Bánhegyi és mtsai, 1999).

Más közlemények szerint az oxidatív környezet kialakításáért egyes, az endoplazmás retikulum lumenében és membránjában lokalizált enzimek tehetők felelőssé, melyek működése során reaktív oxigén szabadgyökök képződnek. Ilyen, az irodalomban leírt enzimek a citokróm P450 enzimsalád egyes tagjai, a NADPH citokróm P450 reduktáz, a gulonolakton oxidáz, a NADPH oxidáz, stb. (Puskás és mtsai, 1998; Ziegler és mtsai, 1998; Issacs és mtsai, 1987; Janolino és mtsai, 1987; Vermeer, 1990; Minotti és mtsai, 1991).

Jelenlegi ismereteink szerint az endoplazmás retikulumban zajló oxidatív protein folding felelős leginkább az oxidatív környezet kialakításáért. Az endoplazmás retikulumban egy elektrontranszfer-lánc végzi a cisztein tiolok folyamatos oxidációját, ennek első tagja a protein diszulfid izomeráz (PDI) enzim. Az elektrontranszfer lánc a tiolokról a végső elektronakceptor oxigén felé szállítja az elektronokat, fehérjékből (PDI, Ero-Ls fehérje és analógjai) és kis molekulatömegű redox-aktív anyagokból áll (Bardwell, 2002, Tu és mtsai, 2000, Frand és mtsai, 2000, Debarbieux és Beckwith, 1999, Fassio és Sitia, 2002). A fehérjék mellett igazolták a glutation-diszulfid (Hwang és mtsai, 1992), aszkorbinsav (Csala és mtsai, 1999), K-vitamin (Soute és mtsai, 1992), az E-vitamin (Csala és mtsai, 2001) és a FAD (Varsányi és mtsai, 2003) szerepét az elektronszállításban.

A GSH/GSSG rendszer szerepe az oxidatív protein foldingban a folyamatos működéshez szükséges redoxpotenciál beállításán keresztül is megvalósul. A lumen glutation utánpótlása az endoplazmás retikulum membránján keresztüli facilitált GSH transzport révén valósul meg.

#### *Aszkorbát és dehidroaszkorbát*

Az endoplazmás retikulum lumenére jellemző oxidatív környezet fenntartásában az aszkorbát/dehidroaszkorbát pufferrendszer is fontos szerepet játszik. A dehidroaszkorbát az ER membránon át transzportálódik (Bánhegyi és mtsai, 1998) Az endoplazmás retikulum lumenében feltehetően enzimatis és nem enzimatis dehidroaszkorbát redukciók egyaránt szerepet játszanak az intraluminális aszkorbát

akkumulációjában (Bánhegyi és mtsai, 1998, Nardai és mtsai, 2001, Wells és mtsai, 1994). A citoszól igen alacsony dehidroaszorbát koncentrációja a citoszólban uralkodó redukáló környezetnek, illetve az itt működő dehidroaszorbát reduktázok működésének köszönhető.

### *FAD*

Intraluminális oxidatív hatást a FAD esetében is leírtak. A FAD szintén átjut az endoplazmás retikulum membránján és felhalmozódik az endoplazmás retikulum lumenében. Elősegíti a mikroszomális protein tiol oxidációt és szerepet játszik az intraluminális glukóz-6-foszfát oxidációban, feltehetően a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz által termelt NADPH folyamatos visszaoxidálása révén (Varsányi és mtsai, 2003).

### *Piridinnukleotidok: NAD(P)<sup>+</sup> és NAD(P)H*

Az előbbieket alapján úgy tűnhet, hogy az endoplazmás retikulum lumene tisztán oxidatív hatású közeg. Azonban számos olyan intraluminális reakciót ismerünk, amelyek redukáló hatású anyagokat jelenlétét igénylik. Ilyen reakciók például a diszulfidhidak izomerizációja (Molteni és mtsai, 1997), a K-vitamin ciklus lépései (Soute és mtsai, 1992), egyes endogén és exogén ketonok és aldehidek lebontásáért felelős biotranszformációs folyamatok (Bannenberget és mtsai, 2003). Ezek között redukált piridinnukleotidok felhasználásával járó reakciók is vannak. A GSH/GSSG arányból számított redoxpotenciál alapján az endoplazmás retikulum lumenében a NADP<sup>+</sup>/NADPH arány kb. 10<sup>10</sup>-nek adódna, azaz az oxidált alak dominálna.

Az intraluminális fő NADPH termelő enzim, így a lumenben található NADPH készlet fő forrása is a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz, mely a glukóz-6-foszfát oxidálása révén termel NADPH-t (Clarke és mtsai, 2003). Intraluminális NADPH függő oxidoreduktáz a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusa is. Habár az enzim oxidáz és reduktáz irányba is képes működni, működésének irányát kofaktorellátottsága határozza meg. In vivo tudjuk, hogy az enzim működése reduktáz irányú, ami az endoplazmás retikulum lumenében szintén főleg redukált állapotú piridinnukleotidok jelenlétét feltételezi.

### *III. Célkitűzések*

A genetikai és biokémiai úton már igazolt együttműködés a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz között újabb bizonyítéka lehet egy közösen használt piridinnukleotid pool az endoplazmás retikulum lumenében. Az intraluminális piridinnukleotidok összetétele és redox állapota az endoplazmás retikulum lumenében ezidáig ismeretlen volt. Az endoplazmás retikulum redoxpotenciálját az eddig ismert luminális redox komponensek alapján inkább oxidatívnak gondolták, azonban az endoplazmás retikulum lumenében számos olyan reakció is ismert volt, ami redukált koenzimek jelenlétét feltételezi.

Feltételeztük, hogy a két intraluminális enzim, a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim együttműködésének alapja egy közösen használt piridinnukleotid pool. Célunk egyrészt a két enzim együttműködésének, másrészt az endoplazmás retikulum redox viszonyainak pontosabb megértése érdekében az endoplazmás retikulumból származó mikroszóma frakció piridinnukleotid pooljának meghatározása volt. Méréseink alapján szerettünk volna az intraluminális piridinnukleotid koncentráció nagyságrendjére következtetni, illetve ezek alapján a  $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$  arányt kiszámítani. Ez lehetőséget nyújt az intraluminális redoxpotenciál számítására a  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  redox rendszer komponensei alapján. Vizsgálni szerettük volna továbbá, hogy a két fent említett enzim, azaz a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz működése hogyan befolyásolja az intraluminális piridinnukleotid pool redox állapotát, illetve ezen keresztül egymás működését.

Feltételeztük ugyanis, hogy a mikroszomális  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim működését az endoplazmás retikulum lumenének redox állapota kofaktorellátásán keresztül döntően meghatározza. Az endoplazmás retikulum redox állapota így fontos szerepet játszhat a metabolikus szindróma patogenezisében, illetve az intraluminális piridinnukleotidokon keresztül is lehetőség nyílik terápiás beavatkozásra.

Vizsgálni szerettük volna továbbá, hogy milyen szerepet játszhatnak a különböző szövetekben - esetünkben a májban és a zsírszövetben expresszálandó - 1-es típusú  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz izoformák a metabolikus szindróma



különböző fenotípusos megjelenéseinek kialakulásában. Irodalmi adatok alapján számos humán és transzgén állatokon kapott eredmény támasztja már alá a zsírszöveti és májbeli enzim szerepét a metabolikus szindróma kövér és sovány fenotípusának kialakulásában. Terveztük a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus aktivitásának, illetve fehérjeszintű expressziójának meghatározását egy kövér és egy sovány 2-es típusú diabétesz modell patkánytörzsön.

#### ***IV. Módszerek***

##### *Mikroszomális vezikulák preparálása patkány májból*

A kísérletekhez használt mikroszomális vezikulákat Sprague-Dawley, illetve Wistar, valamint Zucker és Goto-Kakizaki patkányok májából (180-230 g) állítottuk elő differenciál-centrifugálással (Bánhegyi és mtsai, 1997, Henne és mtsai, 1986). A patkányokból kivett friss májat apró darabokra vágva először 0,3 mM szacharózt és 20 mM HEPES-t tartalmazó pH=7,2 pufferbe tettük. A patkány májból ezután Potter-Elvehjem homogenizátorban homogenizátumot készítettünk. A szuszpenzió koncentrációját 20%-ra állítottuk be szacharóz-HEPES pufferrel, majd lecentrifugáltuk (1000 g, 10 perc, 4 °C). A sejttörmelékot tartalmazó csapadékot eldobtuk. A felülúszót ultracentrifugával tovább centrifugálva (11000 g, 20 perc, 4 °C), a mitokondrium frakcióhoz jutottunk. A felülúszó ekkor már csak a citoszólt és a mikroszóma frakciót tartalmazza. Ezt tovább centrifugálva (100000 g, 60 perc, 4 °C) a felülúszó a citoplazmát tartalmazza, a csapadék pedig a mikroszóma frakciónak felel meg. A mikroszomális vezikulákat ezután MOPS-KCl pufferben mostuk, illetve reszuszpendáltuk. (A MOPS-KCl puffer összetétele: 100 mM KCl, 20mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM morfolinpropánszulfonsav, pH=7,2.). A vezikulákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és felhasználásukig ott tároltuk. Az elkészült mikroszomális vezikulákat fél éven belül felhasználtuk.

A mikroszómák fehérjetartalmát standardként marha szérum albumint használva Lowry és mtsai. módszere alapján határozzuk meg, (Lowry és mtsai, 1951).

A mikroszomális vezikulák épségét két, az endoplazmás retikulumban intraluminálisan elhelyezkedő enzim, a mannóz-6-foszfátáz, illetve az UDP-glukuroniltranszferáz latenciájával mértük (Fulceri és mtsai, 1994, Csala és mtsai, 2004). Az UDP-glukuroniltranszferáz esetén a para-nitrofenol glukuronidáció latenciáját mértük. A latenciát olyan enzimek működésének jellemzésére használjuk, melyek sebességmeghatározó lépése szubsztrátjuk valamilyen membránon (jelen esetben ez az endoplazmás retikulum membránja) át való transzportja. A latencia az enzimek mért aktivitásának és a teljes aktivitásnak a különbsége a lehetséges teljes aktivitás százalékában kifejezve.

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

Az UDP-glukuroniltarnszferáz és a glukóz-6-foszfátáz olyan enzimek, melyek aktív centruma az endoplazmás retikulum lumenében helyezkedik el. A mérésre azért ezek az enzimek a legalkalmasabbak, mert szubsztrátjaik számára - az UDP-glukuronsav, illetve a glukóz-6-foszfátáz esetében egy mesterséges szubsztrát, a mannóz-6-foszfát - az endoplazmás retikulum membránja minimálisan vagy egyáltalán nem átjárható. Ennek magyarázata az, hogy ezek a szubsztrátok egyrészt specifikusan saját transzportereiken keresztül, másrészt aspecifikusan membráncsatornákon keresztül juthatnak az endoplazmás retikulum lumenébe, ezen transzporterek kapacitása azonban minimális. Így az előbb említett enzimek szubsztrátjaikhoz nem férnek hozzá, mért aktivitásuk ezért alacsony, latenciájuk így közel 100 % (Beaufay és mtsai, 1954). Ha azonban a membrán permeabilitása bármilyen okból nő, a szubsztrátok enzimeik számára hozzáférhetővé válnak. Az enzimek mért aktivitása ezért nő, latenciájuk így csökken. Kísérleteink során a latenciaméréskor a teljes enzimaktivitás méréséhez a mikroszómákat alameticinnel (pórusképző antibiotikum) permeabilizáltuk. Mindkét enzim esetén a latencia 95%-nál nagyobbnak bizonyult, amiből a mikroszomális membrán épségére következtettünk.

A mikroszóma-preparálás során a membrán átmenetileg fragmentálódik, így annak bizonyítására, hogy a preperálás során a citoszólban található piridinnukleotidok nem kerülnek a vezikula belsejébe, a mikroszóma frakcionálást radioaktívan jelzett piridinnukleotidok jelenlétében is elvégeztük. A pufferhez a homogenizálás előtt és után radioaktívan jelzett NAD<sup>+</sup>-ot ([<sup>14</sup>C]NAD<sup>+</sup>, 0,76 µCi/ml) adtunk. A mért radioaktivitások (2060 ± 100 a homogenizálás előtt és 2110 ± 100 a homogenizálás után, dpm ± SD, n = 3) a teljes homogenátum radioaktivitásának mindössze 0,11%-ának felelnek meg. Az eredmény bizonyítja, hogy a homogenizálás során a citoszólból számottevő mennyiségű piridinnukleotid nem kerülhetett a mikroszomális vezikula belsejébe.

### *Zsírszövet mikroszóma preparálás patkány epididimális és retroperitoneális zsírszövetből*

A kísérleteinkhez használt zsírszövet mikroszómát szintén differenciálcentrifugálással állítottuk elő. A patkányból eltávolított epididimális és retroperitoneális zsírszövetet először 250 mM szacharózt, 25 mM HEPES-t, 2 mM EGTA-t, 1 mM pepstatint és 200 ml-enként 1 ml P8340 proteáz inhibitor koktélt tartalmazó pufferbe (A puffer) tettük. Ezután a máj mikroszómához hasonlóan a zsírszövetet Potter-Elvehjem homogenizátorban homogenizáltuk, 0,5 g zsírszövetenként 5 ml A puffer kíséretében. A homogenizátumot ezután lecentrifugáltuk (15000 g, 30 perc, 4 °C). Ezután a felülúszót eltávolítottuk, majd ezt ismét centrifugáltuk (150000 g, 2 h, 4 °C). A csapadékot pH=7,2, 100 mM KCl-t, 20 mM NaCl-t, 1 mM MgCl<sub>2</sub>-t, 20 mM MOPS-t, 2 mM EGTA-t és 1 mM pepstatint, valamint proteáz inhibitor tartalmazó pufferben (B puffer) reszuszpendáltuk. Az elkészült zsírszövet mikroszómákat folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk, és felhasználásukig abban tároltuk (Simpson és mtsai, 1983)

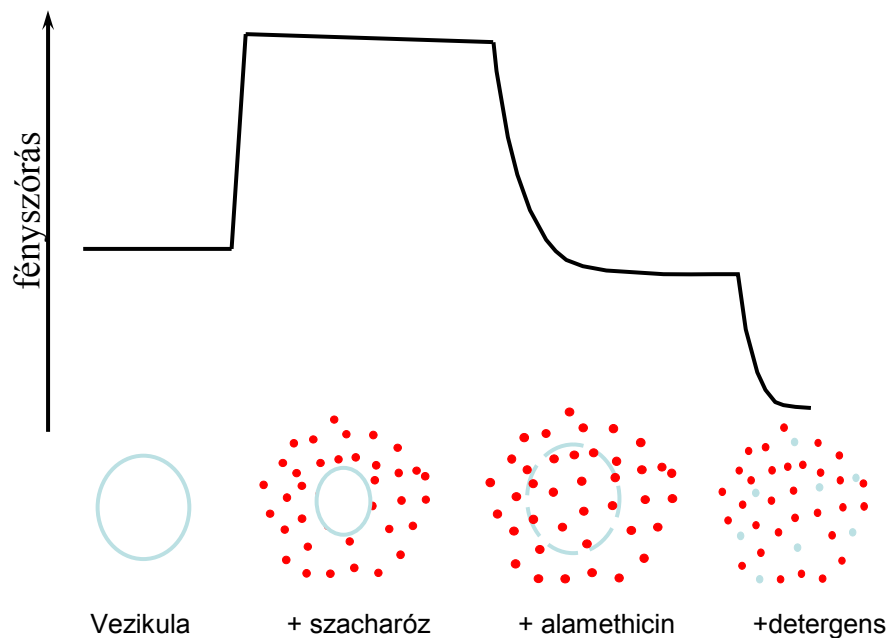
### *Fluorimetriás NADPH mérések*

A mikroszómák redukált piridinnukleotid tartalmát karakterisztikus fluoreszcens spektrumuknak megfelelően, 350 nm excitációs és 460 nm emissziós hullámhosszon vizsgáltuk. Méréseinket Cary Eclipse (Varian) fluoreszcens spektrofotométerben végeztük

### *Transzport mérések light scattering technikával*

A light scattering technika kisméretű vezikulákból álló rendszer fényszórási képességének mérésén alapul. A rendszer fényszórását mesterséges egységekben mérjük. Ozmotikus hatású anyaggal való kezelés hatására a vezikulák vizet veszítenek, zsugorodnak, fényszórási képességük fokozódik. Ez kezdeti emelkedett light scattering értékekben nyilvánul meg. Ha a vezikula membránja az adott anyagra nézve impermeábilis, a kezdeti fokozott light scattering szignál hosszú ideig fennmarad.

Abban az esetben, ha a vezikula az adott molekulára nézve áteresztő, az ozmotikus grádiens megszűnik, a vezikulák tágulnak, a görbe fokozatosan a kiindulási értékre tér vissza. Ha olyan szerrel kezeljük a membránt, ami a vezikula permeabilitását fokozza, például alameticinnel, a fényszórás gyorsan a kiindulási értékre tér vissza. Az alameticin pórusképző antibiotikus hatású oligopeptid, a vezikula permeabilitását számos hidrophil anyagra nézve, például UDP-glukuronsav, szacharóz, glukóz-6-foszfát, redukált és oxidált glutation, stb. fokozza. Detergenssel kezelve a rendszert a membránszerkezet megszűnik, a vezikulák szétesnek, a fényszórás jelentősen csökken (6. ábra). (Meissner, 1988, Bánhegyi, 1997)



6. ábra: A light scattering technika elve. A kezdeti alap light scattering szignálhoz képest ozmotikus hatású anyaggal való kezelés hatására a vezikulák zsugorodnak, fényszórási képességük fokozódik. A vezikula membránját permeabilizálva az ozmotikus grádiens megszűnik, a light scattering szignál a kiindulási értékre tér vissza. Detergenssel való kezelés hatására a vezikulák szétesnek, a fényszórás jelentősen csökken.

Kísérleteink során a mikroszómákat (50 µg/ml fehérjekoncentráció) hipotóniás médiumban (5 mM 1,4-piperazindietánszulfonsav káliumsója, pH=7,0) inkubáltuk két óráig, 22 °C-on. A mikroszómák fényszórását 550 nm-es excitációs és emissziós

hullámhosszon detektáltuk, Cary Eclipse (Varian) fluoreszcens spektrofotométerrel, szintén 22 °C-on. A kivetta mágneses keverővel van ellátva. A vizsgálandó anyagokat kis mennyiségben (a teljes inkubáló térfogat <5 %-ában) adtuk a rendszerhez nagy koncentrációjú oldatok formájában (0,5 M a NADP, NADPH és a glukóz-6-foszfát esetén, 2 M a szaharóz esetén). A fentiek alapján tehát ozmotikusan aktív anyagok hozzáadásakor a light scattering szignál a kiindulási értékhez képest emelkedik. Ha az adott anyagra nézve a vezikula membránja nem permeábilis, ez az emelkedett szignál fennmarad. Ha viszont a membrán az illető anyagra nézve átjárható, a vezikulák duzzadása miatt a szignál fokozatos csökkenését tapasztaljuk.

#### *Transzport mérések rapid szedimentációs technikával*

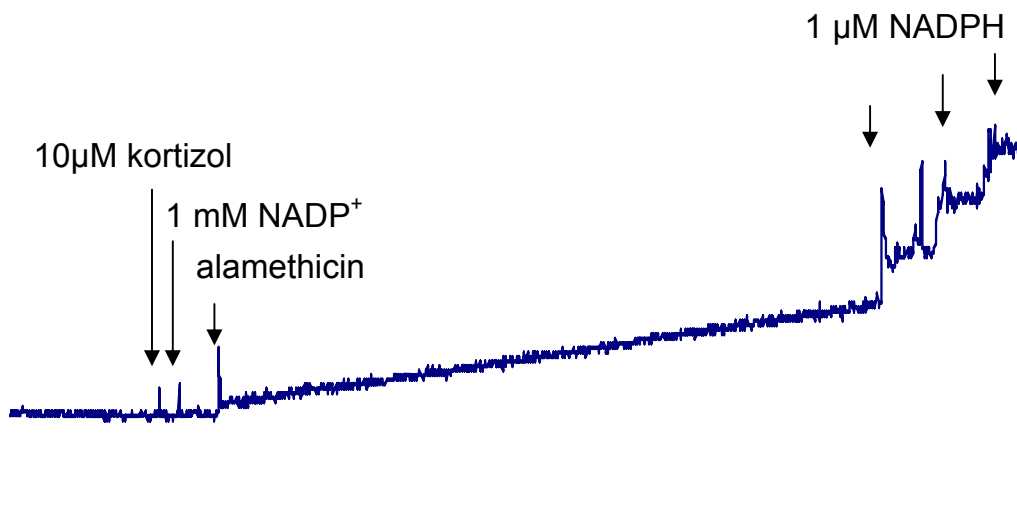
A rapid szedimentációs technika a mikroszomális transzportmechanizmusok és intravezikuláris pool-ok detektálására alkalmas módszer (Bánhegyi és mtsai, 1999, Bánhegyi és mtsai, 1996, Puskás és mtsai, 1998).

A mikroszómákat (10 mg/ml fehérjekoncentráció) 0,2 mM NADP<sup>+</sup> jelenlétében MOPS-KCl pufferben inkubáltuk 37 °C-on. Ebből 15 percenként 0,5 ml térfogatú mintákat vettünk, amit 0,5 ml térfogatú jéghideg, 10% polietilén-glikolt tartalmazó pufferrel kicsaptunk. A mikroszómákat ezután rövid idejű (13000 rpm, 20 másodperc) centrifugálással ülepítettük. A csapadékot ezután kétszer 5% polietilén-glikolt tartalmazó pufferben mostuk. A végén a kapott csapadékot 1% Triton X-100 tartalmazó MOPS-KCl pufferben reszuszpendáltuk. A minták NADP<sup>+</sup> koncentrációját ezután enzimatis úton, a 6-foszfoglukonát-dehidrogenáz enzim (6 mU/ml) és szubsztrátja, 6-foszfoglukonát segítségével a NADPH képződésen keresztül mértük. A NADPH képződést fluoremetriás módszerrel mértük.

## *Enzimaktivitás-mérések*

### *11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa*

A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusának kortizon reduktáz aktivitását kortizolképződésen keresztül detektáltuk. A mikroszómákat (1 mg/ml proteinkoncentráció) 10  $\mu$ M kortizont tartalmazó MOPS-KCl pufferben inkubáltuk 22°C-on (Bánhegyi és mtsai, 2004). A kortizolképződést ELFA módszerrel (enzyme-linked fluorescent assay) mértük. A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusának vizsgálatára lehetőséget nyújt ezen kívül a működése során képződő piridinnukleotidok detektálása is. Az enzim in vitro a kofaktorellátottságtól függően dehidrogenáz és reduktáz irányba egyaránt képes működni. Kísérleteink során az enzim kortizol-dehidrogenáz működése során képződő NADPH-t fluorimetriás módszerrel mértük. A mikroszómákhoz (2 mg/ml fehérjekoncentráció) 10  $\mu$ M kortizolt, majd 1 mM koncentrációjú NADP<sup>+</sup>-t adva a mikroszómák membránját alameticinnel permeabilizálva tettük lehetővé, hogy a kofaktor a vezikula lumenébe jusson (7. ábra). Az enzim reduktáz irányú működésének fluorimetriás detektálása azért nem lehetséges, mert a kívülről adott NADPH felszíni NADPH-oxidáz áldozatává válik.



7. ábra: A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz I-es típus kortizol dehidrogenáz aktivitásának mérése patkány máj mikroszómán. A mikroszóma alapvonalának felvétele után a rendszerhez  $10\ \mu\text{M}$  kortizolt, majd  $1\ \text{mM}$   $\text{NADP}^+$ -t adtunk. A mikroszomális membránt alameticinnel permeabilizáltuk. A mérés végén  $1\ \mu\text{M}$   $\text{NADPH}$  adásával kalibráltunk.

#### Hexóz-6-foszfát dehidrogenáz

A hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz aktivitást rapid filtrációs technika segítségével vizsgáltuk. A rapid filtrációs technika a mikroszomális transzportmechanizmusok és intravezikuláris pool-ok detektálására alkalmas módszer. A módszer lényege, hogy a mikroszomális vezikulákat radioaktívan jelzett molekulákkal rövid ideig inkubáljuk, vákuum segítségével gyorsan átszűrjük, majd a felvett radioaktivitást szcintillációs számlálóval meghatározzuk (Bánhegyi és mtsai, 1997).

A mikroszómákat ( $1\ \text{mg/ml}$  fehérje)  $1\ \text{mM}$  radioaktívan jelzett glukóz-6-foszfát ( $^{14}\text{C}$ ][G6P,  $25\ \mu\text{Ci/ml}$ ) jelenlétében inkubáltuk KCl/MOPS pufferben. Az intravezikuláris és a kötött radioaktivitás elkülönítéséhez a reakcióelegyhez  $0,1\%$  dezoxikolátot adtunk (Fulceri és mtsai, 1994). A radioaktivitásnak azt a részét tekintettük intravezikulárisnak, ami dezoxikoláttal felszabadítható volt. A megfelelő



időpontokban a mintákat (0,05 ml) gyorsan cellulózacetát/nitrát filteren szűrtük át (pórusméret: 0,22  $\mu\text{m}$ ). A filtert ezután jéghideg, 20 mM-os HEPES pufferrel mostuk át (pH=7,2, 250 mM szaharóz, 1 mM 4,4'-diizotiocianostilbén-2,2'-diszulfonsav). A mikroszómákhoz asszociált, így a filterrel kiszűrt radioaktivitást ezután szcintillációs számlálóval határoztuk meg.

#### *Western blot*

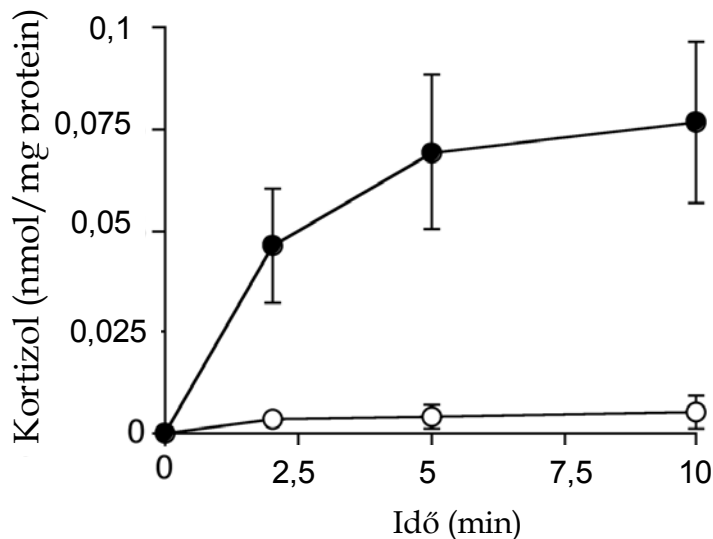
A különböző enzimek fehérjeszintű expressziójának vizsgálatához Western blotot használtunk. Egyenlő mennyiségű fehérjét (50  $\mu\text{g}$ ) vittünk fel az általunk előállított máj- és zsírszövet mikroszómából és homogenátumból. SDS-poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk. A csíkok fehérjetartalmát a filter membránon Red Ponceau festéssel ismét leellenőriztük. Elsődleges antitestként patkány 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus ellenes antitestet használtunk.

## V. Eredmények

### *A patkány máj mikroszóma főleg redukált piridinnukleotidokat tartalmaz*

A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa a máj endoplazmás retikulumában intraluminálisan helyezkedik el, a kortizon-kortizol átalakulást katalizálja mindkét irányba. In vivo az átalakulás iránya redukció (Hewitt és mtsai, 2005), ami eleve azt feltételezi, hogy az endoplazmás retikulumban a piridinnukleotidoknak egy része biztosan redukált állapotú. Irodalmi adatok alapján az enzim működéséhez NADPH-t használ.

A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitását a termelt kortizol mérésén keresztül ELFA (enzyme-linked fluorescent assay) módszerrel követtük nyomon. Az előbbieknél megfelelően, ha az endoplazmás retikulum mikroszómákhöz kortizont adunk, gyors kortizolképződést figyelhetünk meg, ami maximumát néhány perc alatt eléri (8. ábra). Ugyanakkor a mikroszomális membrán permeabilizálása alameticinnel a kortizonredukciót csaknem teljesen megszüntette.



8. ábra: A mikroszomális kortizonredukcióhoz a membrán épsége szükséges. A mikroszómákat (1 mg/ml fehérjekoncentráció) 22°C-on 10  $\mu$ M kortizont tartalmazó MOPS-KCl pufferben inkubáltuk alameticin (0,1 mg/mg fehérje) jelenlétében (üres körök) és hiányában (fekete körök). A kortizoltermelés ELFA módszerrel detektáltuk. A grafikonon négy mérés összesített eredménye látható (átlag  $\pm$  S. D.).

Az eredmény egy lehetséges magyarázata, hogy a vezikula lumenében a kortizon redukciójához szükséges mennyiségű NADPH megtalálható, permeabilizáláskor azonban ez az inkubáló médiumba kerül, így az intraluminális NADPH koncentráció túl alacsonnyá válik, a kortizon redukcióját nem teszi többé lehetővé. A mikroszóma intravezikuláris víztere ugyanis mindössze 3-4  $\mu\text{l}/\text{mg}$  fehérje (Marcolongo és mtsai, 1996), míg az inkubáló médiumból 1 mg mikroszomális fehérjére 1 ml víztér jut. Továbbá a mikroszóma külső felszíne NADPH oxidáz aktivitással bír, ami felelőssé tehető a vezikula lumenéből az inkubáló médiumba került NADPH eloxidálásáért.

#### ***A mikroszomális membrán permeabilitása piridinnukleotidokra nézve***

Előbbi eredményeink ugyanakkor arra is utaltak, hogy a patkány máj mikroszóma lumenében a preparálás, azaz a mikroszóma készítése során a redukált piridinnukleotid pool megmarad, azaz a mikroszomális membrán sem  $\text{NAD(P)}^+$ -ra, sem  $\text{NAD(P)H}$ -ra nézve nem permeábilis. A mikroszomális membrán permeabilitását piridinnukleotidokra nézve két módszerrel detektáltuk. Vizsgáltuk egyrészt fényszórásos (light scattering) technikával, az ozmotikusan aktív  $\text{NADP}^+$  és  $\text{NADPH}$  okozta mikroszomális méretváltozások detektálásával. A light scattering technika kivitelezéséhez azonban a fiziológiásnál jóval nagyobb piridinnukleotid koncentrációkra volt szükség. Így a permeabilitás vizsgálatát egy másik módszerrel is kiegészítettük, hogy a mikroszóma permeabilitását piridinnukleotidokra nézve fiziológiás  $\text{NADP}^+$ , illetve  $\text{NADPH}$  koncentráció mellett is meg tudjuk vizsgálni.

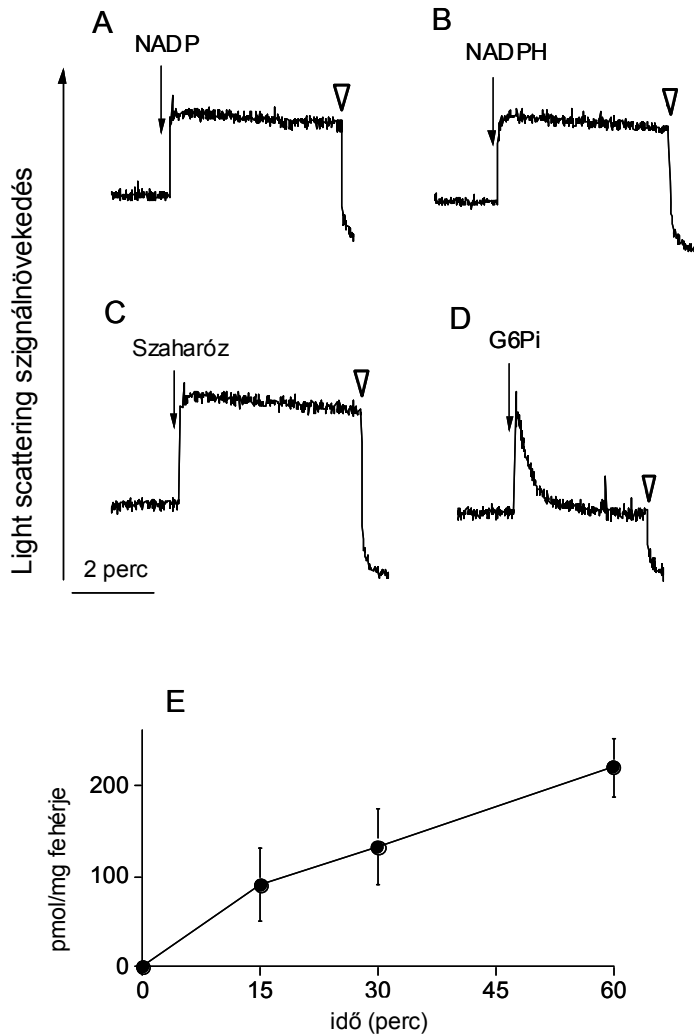
#### ***Magas piridinnukleotid koncentráció - fényszórásos technika***

A mikroszomális membrán permeabilitását piridinnukleotidokra nézve magas koncentrációk esetén light scattering technika segítségével vizsgáltuk. A rendszerhez 20 mM  $\text{NADP}^+$ -t, illetve  $\text{NADPH}$ -t adva a light scattering szignál tartósan emelkedett marad, azaz a membrán ezekre az anyagokra nézve nem vagy alig permeábilis. A 9. ábrán az előbbieket mellett egy permeábilis anyag, a glukóz-6-foszfát, és egy nem permeábilis anyag, a szaharóz light scatteringes regisztrációs görbáját egyaránt

feltüntették. A szaharóz esetén a kezdeti emelkedett light scattering szignál tartósan fennmarad, míg glukóz-6-foszfát esetén fokozatosan a kiindulási értékre tér vissza.

#### *Fiziológiás piridinnukleotid koncentráció - rapid szedimentációs technika*

A vezikula membránjának permeabilitását alacsonyabb, fiziológiás piridinnukleotid koncentrációk esetén is vizsgáltuk, ehhez rapid szedimentációs technikát használtunk (Bánhegyi és mtsai, 2004). 200  $\mu\text{M}$   $\text{NADP}^+$  jelenlétében 15 percnél rövidebb inkubációs idő esetén nukleotidfelvételt gyakorlatilag nem tapasztaltunk. Hosszabb inkubációs idők esetén időfüggő nukleotidfelvételt figyeltünk meg. Koncentrációkiegyenlítődés az extra-és intravezikuláris tér között azonban több mint egy órás inkubációs időt követően sem alakult ki. A számított intravezikuláris NADPH koncentráció egy óra után is az extravezikulárisnak csupán egyharmada volt. A számítások során a mikroszóma intravezikuláris vízterét irodalmi adatok alapján 3,6  $\mu\text{l}/\text{mg}$  fehérjének vettük (Bánhegyi és mtsai, 1997). (9. ábra)



9. ábra: A mikroszomális membrán piridinnukleotidokra nézve alig permeábilis. Az ábra A, B, C és D részében a mikroszomális vezikulák (50  $\mu\text{g/ml}$  fehérjetartalom) ozmotikus hatásra történő változását regisztráltuk az idő függvényében light scattering technika segítségével. A nyilakkal jelzett időpontokban adtuk hozzá a grafikonokon feltüntetett ozmotikus hatású anyagot a rendszerhez. Az A görbén 20 mM  $\text{NADP}^+$ , a B görbén 20 mM  $\text{NADPH}$  hozzáadásakor észlelt fényszórásváltozások láthatók. Összehasonlításképpen a C görbén egy nem permeábilis anyag (75 mM szaharóz), a D görbén pedig egy permeábilis anyag (25 mM glukóz-6-foszfát) hatására bekövetkező ozmotikus változásokat regisztráltuk. A nyílhegyek az alameticin (0,1 mg/mg fehérje) hozzáadását jelölik. Az ábrákon reprezentatív méréseket mutatunk be. Az ábra E részén 0,2 mM  $\text{NADP}^+$  felvételét vizsgáltuk rapid szedimentáció segítségével. Az intravezikuláris  $\text{NADP}^+$  koncentrációt enzimátikus úton mértük. Az adatok négy mérés összesítéséből származnak, a grafikonon az átlagok  $\pm$  S.E. vannak feltüntetve.

### *Az intraluminális piridinnukleotidok redox állapota*

Az intraluminális piridinnukleotidok redox állapotát fluorimetriás módszerrel vizsgáltuk. A mikroszómákat fluoriméter küvettában inkubálva a piridinnukleotidokra karakterisztikus 350 nm-es excitációs és 460 nm-es emissziós hullámhosszon végeztük méréseinket. Először a natív mikroszómákra jellemző alapvonalat rögzítettük szubsztrát hozzáadása nélkül. Ez az alapvonal időben változatlanak bizonyult (*10. ábra*), ami arra utal, hogy oxigén jelenlétében, szubsztrát hozzáadása nélkül az intraluminális piridinnukleotidok redox állapota a mikroszómában nem változik.

### *A membránpermeabilizálás, illetve oxidáló anyagok hatása az intraluminális NADPH pool redox állapotára*

Az alapvonal, azaz a natív mikroszómán felvett fluoreszcens szignál a membrán permeabilizálása, illetve az intraluminális NADPH poolt oxidáló anyagok hatására egyaránt csökkent. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a fluoreszcens szignálért nagyrészt az intraluminális redukált piridinnukleotidok felelősek. Fluoreszcens NADPH méréseink során tehát a piridinnukleotidok redox állapotára az előbbieken felvett alapvonal süllyedéséből, illetve emelkedéséből következtethetünk. Ha az alapvonal süllyed, ez azt jelzi, hogy a mikroszóma redukált piridinnukleotidjai oxidálódnak, azaz mennyiségük csökken. A fluoreszcens szignál emelkedése a redukált piridinnukleotidok arányának növekedését jelenti.

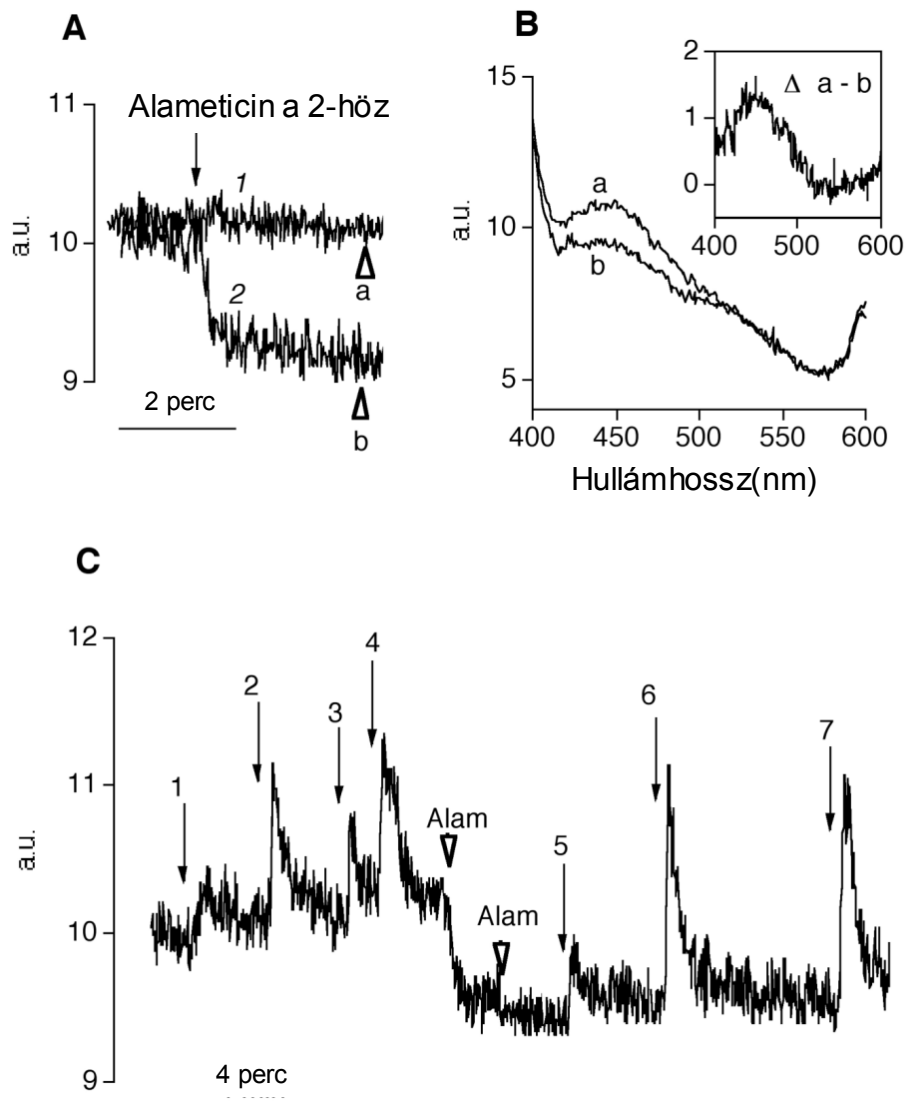
A mikroszomális membránt a pórusképző alameticinnel permeabilizáltuk. Alameticin hozzáadásakor a mikroszóma redukált piridinnukleotid tartalma amiatt csökken, hogy az egyébként intraluminális pool a mikroszóma külső felszínén található NADPH oxidáz számára elérhetővé válik, így annak jelentős része eloxidálódik. A *10. ábra A részén* a fluoreszcens szignál csökkenését tüntettük fel alameticin hozzáadása után.

A *10. ábra A részén* feltüntetett időpillanatokban a mikroszómákról fluoreszcens spektrumot készítettünk: az egyik spektrum alameticin hozzáadása előtt, a másik pedig utána készült. A *10. ábra B részén* ez a két mikroszomális fluoreszcens spektrum látható tehát, alameticin hozzáadása előtt és után, mellékként pedig a két spektrum

különbsége. A mellékletben látható görbe alakja a NADPH fluoreszcens spektrumának megfelelő. Megállapíthatjuk tehát, hogy mivel a membrán permeabilizálás előtti és utáni görbe különbsége a NADPH fluoreszcens spektrumának megfelelő alakú, ezért a különbségért nagy valószínűséggel a mikroszóma redukált piridinnukleotid tartalmának csökkenése a felelős. A permeabilizálás során bekövetkező fluoreszcenciacsökkenés jelzi ugyanis, hogy a natív mikroszóma spektrumából mekkora részt tettek ki a redukált piridinnukleotidok. Az inkubáló médiumba került NAD(P)H eloxidálásáért ebben az esetben is a mikroszóma külső felszínén működő NADPH oxidáz tehető felelőssé.

#### *Az intraluminális piridinnukleotid pool koncentrációja*

Az intraluminális piridinnukleotidok koncentrációját fluorimetriás méréssel becsültük meg. A mikroszóma fluoreszcens alapvonalának felvétele után a rendszerhez kívülről adott NADPH, illetve a membránpermeabilizálás hatását vizsgáltuk. A 10. ábra C részén NADPH adására bekövetkező szignálemelkedés a mikroszóma felszínén működő NADPH oxidáz aktivitás hatására tér vissza az alapvonalra. A membrán permeabilizálása az alapvonal csökkenését okozza, hiszen a vezikula belsejéből kikerülő NADPH is a külső felszín NADPH oxidáz aktivitásának áldozata lesz, ami a rendszer NADPH tartalmának, így a fluoreszcens alapvonalnak is a csökkenését okozza. Az előbbi két jelenségből, illetve a mikroszóma intravezikuláris vízteréből (3,6 µg/ml) kalkuláltuk az intraluminális NADPH koncentrációt, ami kb. 0,4 mM –nak adódott.



10. ábra: Az intraluminális NADPH pool az extraluminális NADPH oxidáz számára nem elérhető. A mikroszómákat (2 mg/ml fehérjetartalom) fluoriméter küvettában inkubálva a piridinnukleotidokra karakterisztikus hullámhosszakon mértük a mikroszómák redukált piridinnukleotid tartalmát. A: Az intraluminális piridinnukleotidokat a mikroszóma külső felszínén működő NADPH oxidáz számára a membrán permeabilizálása tette elérhetővé. Az alameticin hozzáadását a 2. regisztrátumon nyíl jelöli. B: a mikroszóma fluoreszcens spektruma 350 nm hullámhosszon permeabilizálás előtt és után, az (A ábráról a nyílhegyeknek megfelelően), a melléklet pedig a két görbe különbségét ábrázolja. C: a mikroszómahoz kívülről adott NADH-t és NADPH-t a mikroszómális NADPH oxidáz eloxidálja. A nyilak jelzik a hozzáadásokat (1: 1  $\mu\text{M}$  NADPH, 2: 2  $\mu\text{M}$  NADPH, 6: 5  $\mu\text{M}$  NADPH, 3:



1  $\mu\text{M}$  NADH, 4: 2  $\mu\text{M}$  NADH, 5: 1  $\mu\text{M}$  NADH 7: 5  $\mu\text{M}$  NADH). Az elkészült 4-6 mérésből reprezentatív kísérleteket mutatunk be.

*Az intraluminális NADPH pool befolyásolása*

***A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim együttműködése egy közös NADPH pool-on alapul***

*A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim latenciája*

Mindkét enzim latenciáját fluorimetriás módszerrel, az enzimek működése során termelt NADPH detektálásán keresztül mértük. A méréshez differenciál-centrifugálással előállított hím Wistar patkány máj mikroszómát használtunk. A mikroszómákat fluoriméter küvettában inkubáltuk. A vizsgálatot 2 mg/ml fehérjekoncentráció mellett végeztük. A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa esetén a mikroszómához 10  $\mu\text{M}$  kortizolt, majd 1 mM NADP<sup>+</sup>-t adtunk. A fentiekben már említett módon nem az enzim májban tapasztalt fiziológias irányú, kortizon-kortizol átalakulást mértük, mivel ez NADPH kofaktort igényel, ezt pedig a mikroszóma külső felszínén működő NADPH oxidáz aktivitás rögtön a hozzáadáskor lebontatná. A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz esetén a mikroszómákhoz 10  $\mu\text{M}$  glukóz-6-foszfátot, majd 100  $\mu\text{M}$  NADP<sup>+</sup>-t adtunk. Mindkét enzim esetében a mikroszomális membrán permeabilizálása alameticinnel tette lehetővé, hogy az intraluminális aktív centrummal rendelkező enzimekhez kofaktoruk eljusson.

Méréseink alapján mind a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának, mind a hexóz-6-foszfát dehidrogenáznak a latenciája 90% felettinek bizonyult, ami megerősíti, hogy mindkét enzim aktív centruma intraluminálisan helyezkedik el.

*NADPH pool a patkány máj mikroszómában*

A mikroszomális NADPH pool jelenlétének igazolásához a mikroszómához olyan enzimek szubsztrátjait adtuk, melyek működésük során igazoltan NADP<sup>+</sup>-t

használnak, illetve NADPH-t termelnek. Ilyen NADPH-t termelő enzim a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz, míg működéséhez NADP<sup>+</sup>-t használ a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa. A NADPH pool jelenlétét, illetve azt, hogy ezt a fenti két enzim közösen használja, a két enzim termékeinek mérésével követtük nyomon. A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz esetén ebben az esetben a fiziológiás, kortizon-kortizol irányú, NADPH-t használó átalakulást vizsgáltuk. A kortizoltermelést ELFA (enzyme-linked fluorescent assay) módszerrel követtük nyomon. A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz esetén radioaktívan jelzett glukóz-6-foszfát hozzáadása után a mikroszomális radioaktivitás akkumulációját (azaz a 6-foszfoglukonát, illetve a pentóz-foszfát ciklus többi intermedierjének felhalmozódását a mikroszóma lumenében) rapid filtrációs technikával követtük nyomon.

10  $\mu$ M kortizon hozzáadása a mikroszómához mérhető kortizoltermelődést eredményezett. Ez négy kísérlet eredménye alapján 10 perc alatt  $75 \pm 20$  pmol kortizol termelődését jelentette 1 mg mikroszomális fehérjére számolva ( $\pm$  S.D.). Ez az eredmény már önmagában egy legalább akkora NADPH poolt feltételez a natív mikroszómában, ami a kortizon redukcióját lehetővé teszi. Ha a natív mikroszómához 10  $\mu$ M glukóz-6-foszfátot, a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz szubsztrátját adtuk, a kortizon reduktáz aktivitás fokozódását figyeltük meg, ami megnövekedett kortizoltermelődésben nyilvánul meg. Ez a megnövekedett kortizoltermelés 290 $\pm$ 75 pmol kortizol volt 1 mg mikroszomális fehérjére számolva 10 perc alatt ( $\pm$ S.D., n=4).

Megvizsgáltuk azt is, hogy hogyan hat a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szubsztrátja, a kortizon a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim aktivitására. Ezt rapid filtrációs technikával követtük nyomon, tehát kortizon adásakor a mikroszómához radioaktívan jelzett glukóz-6-foszfátot adtunk, és a radioaktivitás intravezikuláris halmozódását figyeltük. A kortizon adása az intravezikuláris radioaktivitás akkumulációját fokozta.

Ugyanakkor a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim szubsztrátellátását biztosító, a mikroszóma membránjában található glukóz-6-foszfát transzporter gátlása a glukóz-6-foszfát kortizoltermelődést fokozó hatását kivédi. Ha a kortizoltermelést S3483 (a mikroszomális glukóz-6-foszfát transzporter gátló specifikus gátlószer) jelenlétében mértük, mindössze 80 $\pm$ 32 pmol kortizol termelődését detektáltuk 1 mg mikroszomális fehérjére számolva 10 perc alatt (négy mérés készült,  $\pm$ S.D.).

Igazoltunk tehát, hogy a munkacsoportunk által korábban leírt glukóz-6-foszfát függő kortizonredukció, illetve kortizonfüggő glukóz-6-foszfát oxidáció, azaz a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz együttműködése az endoplazmás retikulum lumenében (Bánhegyi és mtsai, 2004) egy közösen használt intraluminális NADPH poolon alapul.

Ezt a közösen használt NADPH poolt más módszerekkel is vizsgáltuk. Fluorimetriás úton is igazoltuk, hogy mind a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának, mind a hexóz-6-foszfát dehidrogenáznak a szubsztrátja a NADPH pool redox állapotát befolyásolja.

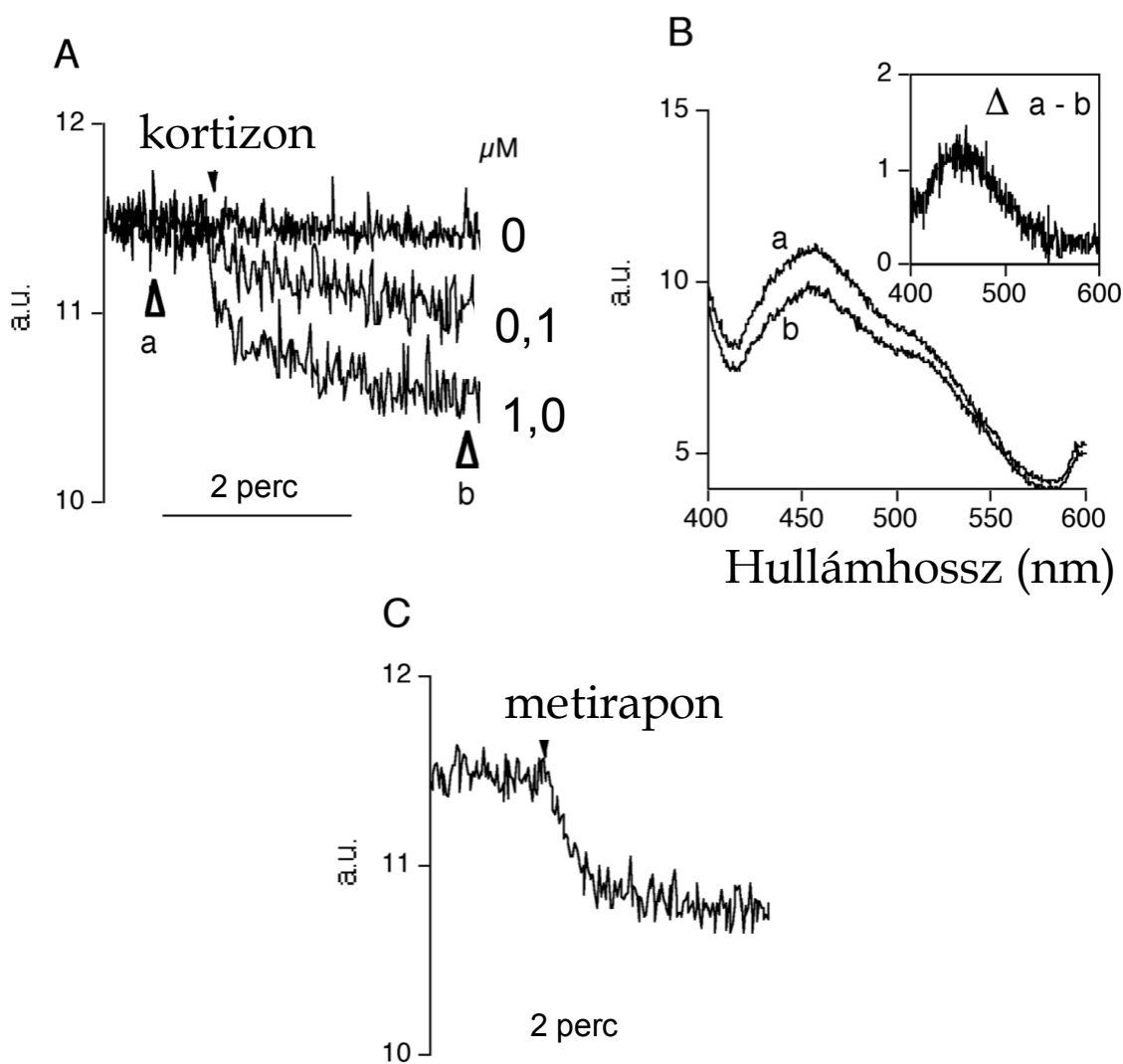
A mikroszómákhoz kortizont, az intraluminálisan működő 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szubsztrátját adva a fluoreszcens szignál koncentrációfüggő csökkenését figyelhettük meg (11. ábra A rész). Ez arra utal, hogy a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa működése során, amikor a kortizont kortizollá alakítja, ezt az előbbieken leírt NADPH poolt használja. Emiatt a mikroszómák intravezikuláris NADPH tartalma csökken, ami a fluoreszcens szignál csökkenésében nyilvánul meg.

A mikroszómáról az ábrán jelölt időpillanatokban fluoreszcens spektrumot készítettünk. Az egyik fluoreszcens spektrum a kortizon hozzáadása előtt, a másik utána készült. A fentiekhez hasonlóan ezután itt is a két fluoreszcens spektrum különbségét képeztük. A kortizon hozzáadása előtti és utáni görbe különbsége szintén a NADPH fluoreszcens spektrumának megfelelő (11. ábra B rész).

Ugyanezt a mérést az 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim egy mesterséges szubsztrátjával, metiraponnal is elvégeztük. Metirapon hozzáadásakor a kortizonhoz hasonló hatást tapasztaltunk (11. ábra C rész)

A kortizon hozzáadásakor tapasztalt legnagyobb fluoreszcencia-csökkenés  $1,17 \pm 0,11$  volt (öt mérésből,  $\pm$ S.E., 2 mg/ml mikroszomális fehérjére számolva, mesterséges egységben). Ha a mikroszóma membránját alameticinnel permeabilizáltuk, a tapasztalt legnagyobb fluoreszcenciacsökkenés  $1,28 \pm 0,18$ -nak adódott (négy mérésből).

Az előbbiek alapján a domináns intraluminális piridinnukleotid a NADPH, hiszen ez a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának kofaktora.



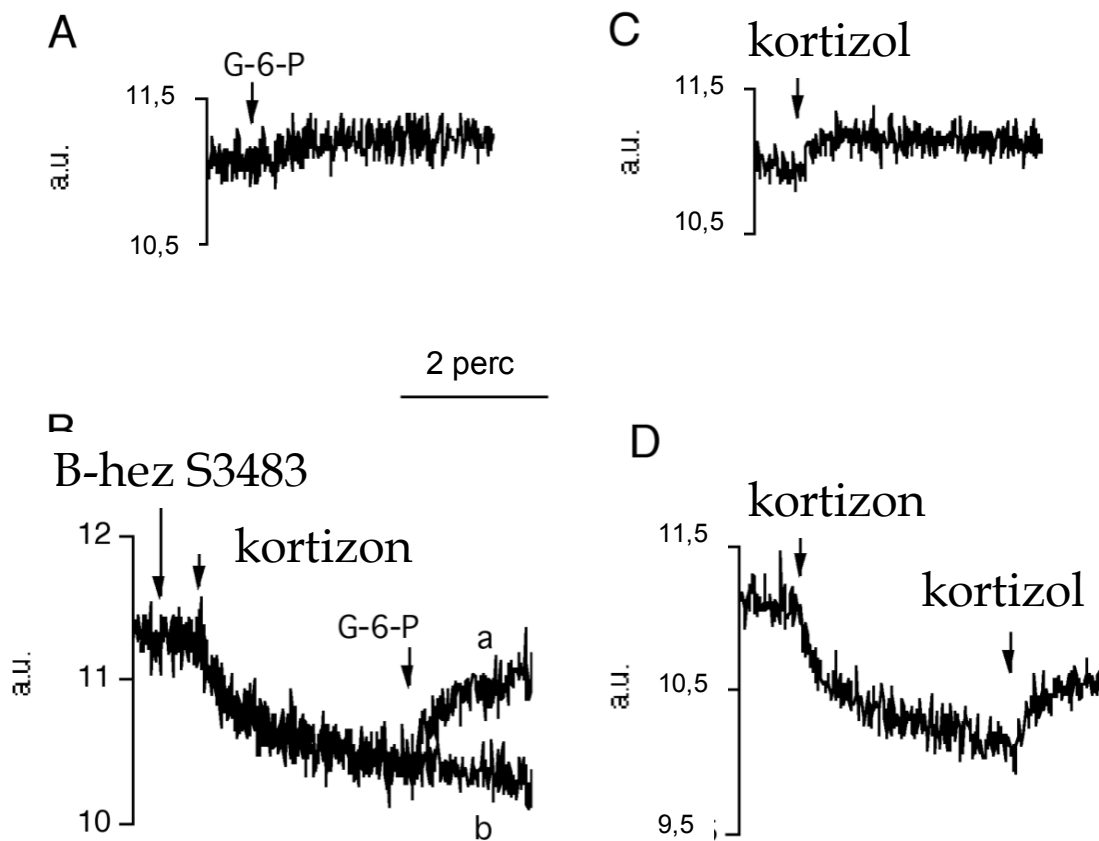
11. ábra: A kortizon és analógja, a metirapon az intraluminális NAD(P)H poolt oxidálják. A mikroszómákat (2 mg/ml) küivettában inkubáltuk, a rendszer redukált piridinnukleotid tartalmát fluorimetriás módszerrel mértük. Az ábra A részén a kortizon hatása látható különböző koncentrációk esetén, C részén pedig 5  $\mu\text{M}$  metirapont adtunk a mikroszómákhoz. Az ábra B részén a mikroszómák fluoreszcens spektruma látható 1  $\mu\text{M}$  kortizon hozzáadása előtt (a) és után (b), a regisztrációk időpontját az ábra A részén nyílhegyekkel jeleztük. A melléklet a két spektrum különbségét mutatja. Az elvégzett 4-6 mérésből reprezentatív kísérleteket mutatunk be.

Redukálószernek hatását is vizsgáltuk az intraluminális piridinnukleotid poolra. Glukóz-6-foszfátot, illetve kortizolt használtunk. Ezek esetében a fluoreszcens szignál

emelkedésére számítottunk, hiszen az intraluminális NADPH pool redukálódik. Mindkét szer esetében a fluoreszcens szignál csak egészen minimálisan emelkedett.

A glukóz-6-foszfát, a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim segítségével  $\text{NADP}^+$ -t redukál. Ha a rendszerhez önmagában adtunk glukóz-6-foszfátot, az ugyan minimális szignálemelkedést okozott, azonban glukóz-6-foszfát adásával a kortizon okozta fluoreszcenciacsökkenést vissza lehetett fordítani. Eszerint tehát a kortizon NADPH poolt oxidáló hatását a glukóz-6-foszfát visszafordította. Ha a rendszert a glukóz-6-foszfát hozzáadása előtt az endoplazmás retikulum glukóz-6-foszfát transzporter gátló S3483-mal kezeltük, ez a hatás kiküszöbölhető volt (*12. ábra B rész*).

Kortizol adása szintén a szignál minimális emelkedését okozta (*12. ábra C rész*), ami az intraluminális NADPH pool kismértékű redukciójára utal. Ha rendszerünkhöz nagy koncentrációjú kortizolt ( $10 \mu\text{M}$ ) adtunk, a glukóz-6-foszfát adásakor tapasztalhoz hasonló jelenséget láttunk: kis koncentrációjú kortizon ( $1 \mu\text{M}$ ) hatását vissza tudtuk fordítani (*12. ábra D rész*).



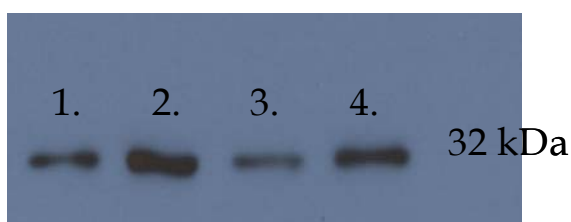
12. ábra: A  $11\beta$ hidroxiszteroid dehidrogenáz és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz szubsztrátjai az intraluminális  $NAD(P)H$  pool redox állapotát befolyásolják. A mikroszómákat (2 mg/ml fehérjekoncentráció) fluoriméter küvettában inkubáltuk, a redukált piridinnukleotid tartalmat fluorimetriás módszerrel detektáltuk. Az ábra A részén  $50\ \mu\text{M}$  glukóz-6-foszfát, C részén  $10\ \mu\text{M}$  kortizol hatása látható.  $1\ \mu\text{M}$  kortizon oxidáló hatása  $50\ \mu\text{M}$  glukóz-6-foszfáttal (12B ábra, a rész) és  $10\ \mu\text{M}$  kortizollal visszafordítható volt (11D ábra). A mikroszomális glukóz-6-foszfát transzporter gátló S3483-mal való inkubálás ( $30\ \mu\text{M}$ ) azonban a glukóz-6-foszfát ilyen hatását kivédi (12B ábra, b rész). Az elvégzett 4-6 mérésből reprezentatív kísérletek láthatók.

***1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitás és fehérjeszintű expresszió két 2-es típusú diabétesz modell patkánytörzsön***

*Zucker patkány*

Fluorimetriás NADPH mérés segítségével vizsgáltuk a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusának aktivitását kövér és sovány Zucker patkány májából és zsírszövetéből készített mikroszomális vezikulákon. Az irodalmi adatokkal egybevetően a sovány kontroll állattal összehasonlítva a májbeli 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitás a kövér állatban szignifikánsan alacsonyabb volt ( $2,10 \pm 0,25$  és  $2,57 \pm 0,39$  nmol/perc/mg fehérje, átlag  $\pm$  S.D., n = 6, sorrendben). Western blot eredményeink ugyanezt támasztották alá: 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz ellenes antitestet használva 32 kDa-nál kaptunk csíkot, ami a patkány 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus molekulatömegének felel meg. A kövér Zucker patkány májából származó mikroszómán a fehérjeszintű expresszió is csökkent volt a sovány állattal összehasonlítva (13. ábra).

A kövér Zucker patkány epididimális zsírszövetéből készített mikroszomális vezikulákon mind a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának fehérjeszintű expressziója, mind enzimaktivitása emelkedett volt a kontroll sovány állaton kapott eredményekhez képest (3,3 illetve 1,94 nmol/perc/mg fehérje).

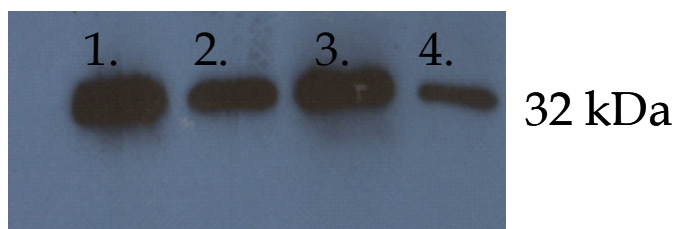


13. ábra: 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus fehérjeszintű expresszió Zucker máj mikroszómán. A kövér állatban az enzim fehérjeszintű expressziója a soványhoz képest jelentősen csökkent. 1: kövér, 2: sovány, 3: kövér, 4: sovány.

### *Goto-Kakizaki patkány*

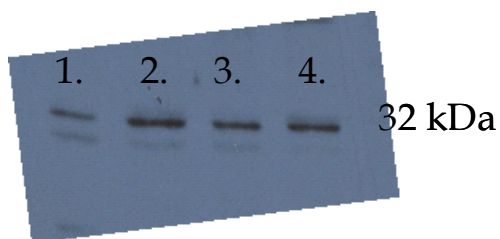
A Goto-Kakizaki 2-es típusú diabétesz modell patkány a Zucker kövér patkánnyal szemben sovány. Kísérleteink során a Goto-Kakizaki patkány esetén is fluorimetriás módszerrel, a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának működése során termelt NADPH mérésén keresztül detektáltuk az enzim aktivitását. A fehérjeszintű expressziót Western blot segítségével néztük. A kövér Zucker patkányon tapasztalt csökkent májbeli, illetve emelkedett zsírszöveti  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus expresszióval és enzimaktivitással szemben egészen más eredményt kaptunk.

A Goto-Kakizaki sovány diabéteszes állat májában a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitása jelentősen emelkedett volt a kontroll állathoz képest ( $5,11 \pm 0,75$  és  $1,70 \pm 0,37$  nmol/perc/mg protein, átlag  $\pm$  S.D.,  $n = 10$ , sorrendben). Western blot eredményeink is ugyanezt támasztották alá (14. ábra). Ugyanakkor sem a zsírszöveti 1-es típusú  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzimaktivitás ( $1,57 \pm 0,41$  és  $1,22 \pm 0,33$  nmol/perc/mg fehérje, átlag  $\pm$  S.D.,  $n = 6$ , sorrendben), sem a fehérjeszintű expresszió tekintetében a diabéteszes és a kontroll állat között nem volt szignifikáns különbség (15. ábra).



13. ábra:  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus fehérjeszintű expresszió Goto-Kakizaki máj mikroszómán. A diabéteszes állatban az enzim fehérjeszintű expressziója a kontrollhoz képest jelentősen emelkedett. 1: diabéteszes, 2: kontroll, 3: diabéteszes, 4: kontroll.





14. ábra:  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus fehérjeszintű expresszió Goto-Kakizaki zsír mikroszómán. A diabéteszes állatban az enzim fehérjeszintű expressziója a kontrollhoz képest enyhén csökkent. 1: diabéteszes, 2: kontroll, 3: diabéteszes, 4: kontroll.

3. táblázat: A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitása Zucker és Goto-Kakizaki patkányok májából és epididimális zsírszövetéből készült mikroszomális vezikulákon (átlag vagy átlag  $\pm$  S.D.,  $n=2-6$  mérés készült)

Kísérleti állat		11 $\beta$ HSD1 aktivitás	
		Máj	Zsírszövet
Zucker	Fat	2,10 $\pm$ 0,25	3,3
	Lean	2,57 $\pm$ 0,39	1,94
Goto- Kakizaki	Diabétesz	5,11 $\pm$ 0,75	1,57 $\pm$ 0,41
	Kontroll	1,70 $\pm$ 0,37	1,22 $\pm$ 0,37

## VI. *Megbeszélés*

Munkánk során igazoltuk, hogy az endoplazmás retikulum lumenében leírt oxidáló környezet ellenére található egy főleg redukált állapotú izolált intraluminális piridinnukleotid pool, ami az endoplazmás retikulum lumenében intraluminális aktív centrummal rendelkező 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz és hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimek együttműködésének újabb biokémiai alapját jelenti. Ennek az intraluminális NADPH pool-nak kiemelt jelentősége van, hiszen befolyásolása az előbbi két enzim kofaktorellátottságának változtatásán keresztül szerepet játszhat a metabolikus szindróma patogenezisében.

*Az endoplazmás retikulum membránja piridinnukleotidokra nézve nem permeábilis*

Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az endoplazmás retikulum membránja sem a piridinnukleotidok oxidált formájára, azaz NADP<sup>+</sup>-re és NAD<sup>+</sup>-ra, sem pedig a redukált alakokra, azaz NADH-ra és NADP-ra nézve nem permeábilis. Annak ellenére, hogy az endoplazmás retikulum membránjában eddig piridinnukleotid transzportert nem azonosítottak, és a lumenben sem írtak le piridinnukleotid szintézist, az irodalomból számos indirekt adat utalt egy intraluminális piridinnukleotid pool létezésére.

A mikroszomális membrán impermeabilitását piridinnukleotidokra nézve két úton, belülről és kívülről is alátámasztottuk. Egyrészt az intakt mikroszómához kortizont adva gyors kortizoltermelődést tapasztaltunk, ami a membránpermeabilizálás hatására megszűnt. A jelenség arra utal, hogy az endoplazmás retikulum lumenében létezik egy piridinnukleotid pool, ami a kortizon redukciójához elegendő piridinnukleotidot tartalmaz ugyan, de ha a mikroszomális membránt permeabilizáljuk, ez a piridinnukleotid tartalom a mikroszóma felszínének NADPH oxidáz aktivitása számára elérhetővé válik. Így a redukált piridinnukleotidok koncentrációja annyira lecsökken, hogy a kortizonredukciót többé nem teszi lehetővé. A luminális piridinnukleotidok tehát a mikroszóma-frakció preparálása során nem szöknek meg, a membrán belülről átjárhatatlan számukra.

A mikroszomális membrán impermeabilitását nagy és kis (fiziológias) piridinnukleotid koncentrációk esetén is igazoltuk light scattering, illetve rapid szedimentációs méréseink során.

#### *Piridinnukleotid pool az endoplazmás retikulum mikroszómában*

Az endoplazmás retikulum mikroszóma piridinnukleotid poolt tartalmaz, ennek jelenlétét számos bizonyítékkal alátámasztottuk.

Igazoltuk, hogy a mikroszomális vezikula belsejében található piridinnukleotid pool nem a citoszól piridinnukleotidjaiból kerül a mikroszóma-preparálás során a vezikula belsejébe. A mikroszóma-preparálás során viszont az endoplazmás retikulum piridinnukleotid tartalmát megőrzi.

Ha ugyanis a mikroszóma-preparálás során a patkány májhoz a homogenizálás előtt és után radioaktívan jelzett  $\text{NAD}^+$ -t adtunk, a mikroszóma piridinnukleotid tartalmában nem tapasztaltunk különbséget. Ha a mikroszóma-készítés során a citoszólból piridinnukleotidok kerülnének az endoplazmás retikulum lumenébe, akkor a két különböző módon kezelt mikroszóma radioaktívan jelzett piridinnukleotid-felvétele között is tapasztalnánk különbséget. Mivel azonban a homogenizálás előtt és után  $\text{NAD}^+$ -dal kezelt mikroszómák piridinnukleotid felvétele ugyanakkora volt, igazoltuk, hogy a vezikula belsejébe a mikroszóma-preparálás során kívülről piridinnukleotidok nem kerülhetnek be.

Továbbá ahelyett, hogy a mikroszóma-preparálás során a citoszólból jutnának piridinnukleotidok az mikroszóma belsejébe, az intraluminális piridinnukleotid pool és a homogenizáló médium piridinnukleotid koncentrációja alapján inkább annak a veszélye áll fenn, hogy intraluminális piridinnukleotidok kerülnek az inkubáló médiumba. Az intraluminális piridinnukleotid pool koncentrációjának eredményeink szerint 0,4 mM-nak adódik, míg az inkubáló médiumé ennél jóval alacsonyabb. Ezt a májszövet eredeti 0,9 mM-os piridinnukleotid koncentrációjából és a mikroszóma preparálás során a máj citoszól 10-szeres hígulásából következtethető.

### *Az endoplazmás retikulum piridinnukleotid pooljának redox állapota*

Az endoplazmás retikulum piridinukleotid poolja főleg redukált állapotú piridinnukleotidokat tartalmaz. Ezt két módszerrel igazoltuk: vizsgáltuk egyrészt, hogy a membránpermeabilizálás hatására hogyan változik az intraluminális piridinukleotidok redox állapota. Fluorimetriás NADPH méréseink során a membránpermeabilizálás az intraluminális redukált piridinnukleotid koncentráció csökkenését eredményezte. A membránpermeabilizálás előtti és utáni mikroszomális spektrumok különbsége pedig éppen a redukált piridinnukleotidok spektrumát adta.

Vizsgáltuk továbbá egyes oxidáló anyagok hatását az intraluminális piridinnukleotid pool redox állapotára. Ehhez olyan enzimek szubsztrátjait használtuk, amelye bizonyítottan NADPH-t, illetve NADP<sup>+</sup>-t használnak. Ilyen enzimek a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz is.

Kortizon adása fluorimetriás NADPH méréseink során szintén a mikroszóma redukált piridinnukleotid tartalmának csökkenését eredményezte. A kortizon hozzáadása előtti és utáni mikroszomális spektrum különbsége pedig szintén a redukált piridinnukleotidok (NADPH) spektrumát adta. A kortizon, illetve a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának mesterséges szubsztrátja, a metirapon az intraluminális piridinnukleotidokat koncentrációfüggő módon oxidálta.

Redukáló környezetre utal az is, ahogyan az ER lumenében található piridinnukleotidok redox állapotát a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimek szubsztrátjai befolyásolták: redukáló hatású anyagok, úgymint kortizol és glukóz-6-foszfát, az intraluminális piridinnukleotidokat tovább már csak minimális mértékben redukálták. Ugyanakkor az oxidáló hatású kortizon az intraluminális piridinnukleotidok redox állapotát jelentős mértékben oxidált irányba tolta el. Ez a hatás glukóz-6-foszfát, illetve kortizol adásával visszafordítható volt.

### *Az intraluminális piridinnukleotidok koncentrációja*

Feltételezve, hogy az általunk alkalmazott oxidáló, illetve redukáló ágensek a piridinnukleotid pool nagyrészét redukálták, illetve oxidálták, az intraluminális redukált

piridinnukleotid koncentrációt 0,4 mM-nak, míg az oxidált piridinnukleotidok koncentrációját 0,05 mM-nak kalkuláltuk. Ezek alapján az endoplazmás retikulum lumenében a redukált és oxidált piridinnukleotidok aránya kb. 8:1, ami -376 mV számított redoxpotenciálnak felel meg.

*Biokémiai bizonyítékok a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimek együttműködésére*

*A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz együttműködése-kolokalizáció az endoplazmás retikulum lumenében*

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint, illetve irodalmi adatok alapján a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim együttműködése azon alapul, hogy mindkét enzim aktív centruma az endoplazmás retikulum lumenében intraluminálisan helyezkedik el.

Méréseink során igazoltuk, hogy mind a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa, mind a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim aktivitása látens. A latenciát mindkét enzim esetében 90% felettinek kalkuláltuk, ami arra utal, hogy munkacsoportunk korábbi eredményeivel, illetve irodalmi adatokkal (konfokális mikroszkóppal végzett kísérletek az aktív centrumok lokalizációjának meghatározására) egybehangzóan mind a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus, mind a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim aktív centruma az endoplazmás retikulum lumenében intraluminálisan helyezkedik el, ami együttműködésük egyik alapja.

*A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz együttműködése egy közös intraluminális piridinnukleotid poolon alapul*

Eredményeink alapján a glukóz-6-foszfát, a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz szubsztrátja a mikroszomális kortizon reduktáz aktivitást, azaz a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának működését stimulálta, ami mérhető kortizoltermelődést eredményezett. Ugyanígy a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szubsztrátja, a kortizon méréseink alapján a mikroszomális hexóz-6-foszfát

dehidrogenáz enzimet stimulálta, azaz feltételezhetjük, hogy a két enzim egy közös piridinnukleotid poolt használ működéséhez az endoplazmás retikulum lumenében.

Közösen használt piridinnukleotid poolra utal az a jelenség is, amit fluorimetriás NADPH méréseink során tapasztalhattunk: a mikroszómához adott kortizon az intraluminális piridinnukleotid poolt oxidáló hatását glukóz-6-foszfát adása visszafordította. Az endoplazmás retikulum glukóz-6-foszfát transzporterének gátlása a glukóz-6-foszfát hatását kivédte, ami az 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusú enzim működésének befolyásolására nyújt lehetőséget.

*A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának szerepe a metabolikus szindróma különböző fenotípusainak kialakításában*

*A 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitása és expressziója Zucker és Goto Kakizaki patkány májban és zsírszövetben*

Kísérleteink során tisztázni szeretnénk volna a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus máj –és zsírszöveti enzimének részvételét a metabolikus szindróma különböző fenotípusainak kialakításában. Irodalmi adatokból ismert, hogy a kövér Zucker metabolikus szindróma modell patkányban a májbeli 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitása csökkent, míg a zsírszöveti enzim aktivitása emelkedett. Méréseink során mind az enzimaktivitás, mind pedig a fehérjeszintű expresszió tekintetében ugyanerre az eredményre jutottunk. A májbeli 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus aktivitáscsökkenése a kövér állatban a kontroll sovány állathoz képest lehet egy a már kialakult metabolikus szindróma miatti kompenzatorikus mechanizmus, ami a májbeli kortizolkoncentráció csökkenése révén a májbeli glukózprodukción, így a keringő vércukorszintet csökkenti. A kövér Zucker patkány zsírszövetében a sovány állathoz képest emelkedett 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus expressziót és enzimaktivitást találtunk. A zsírszöveti 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus aktivitásnövekedés a Cushing szindrómához vagy más okból kialakult emelkedett kortizolszinttel járó állapotokhoz hasonlóan abdominális-viscerális zsírfelhalmozódást okoz.

Irodalmi adatok szerint a Zucker patkányban tapasztalt 1-es típusú  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzimaktivitás és expresszió szöveti szintű változásainak kialakulásában a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely túlműködése is szerepet játszhat. A túlműködést alátámasztó adat, hogy a Zucker fat állatok mellékveséjének tömege, valamint a vizelettel ürített szabad kortikoszteron koncentráció a sovány (Zucker lean) állatokéhoz képest emelkedett. Adrenalektomizált Zucker fat állatokban pedig a májbeli 1-es típusú  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitáscsökkenés, illetve a zsírszöveti aktivitásnövekedés normalizálódott (Livingstone és mtsai, 2000). Az állatok adrenalektomizálása testsúlycsökkenést is okozott, illetve ennek hatására számos metabolikus paraméterük (pl. hiperinzulinémia) is rendeződött (Yukimura és mtsai, 1978, Castonguay és mtsai, 1986).

A Goto-Kakizaki 2-es típusú diabétesz modell patkányban az előbbivel ellentétes irányú változásokat tapasztaltunk. Az állat májában a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitása a kontrollhoz képest jelentősen emelkedett volt. Ugyanezt tapasztaltuk a fehérjeszintű expresszió vizsgálatokor is. A diabéteszes állat zsírszövetében viszont a kontrollhoz képest némileg csökkent 1-es típusú  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitást és expressziót találtunk. A Goto-Kakizaki patkány sovány 2-es típusú diabétesz modell, fenotípusának kialakulásában a csökkent zsírszöveti  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának aktivitása szerepet játszhat, hiszen zsírszövetben az enzim a lokális kortizolkoncentráció emelésén keresztül a preadipociták differenciációját adipocitává fokozza. A májbeli fokozott 1-es típusú  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitás a lokális kortizolkoncentráció emelésével a glukoneogenezis és glikogénolízis enzimeinek expresszióját fokozza, így a vércukorkoncentráció, valamint a szérum kortizolkoncentráció emelésével vesz részt az inzulinrezisztencia, így a 2-es típusú diabétesz mellitus kialakulásában.

Eredményeinkkel egybevágóan eltér a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusát csak a zsírszövetben, illetve csak a májban overexpresszáló transzgén egér fenotípusa is. A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz zsírszövetben overexpresszáló transzgén egér ugyanis a metabolikus szindróma összes tünetét mutatja: vizcerális obezitás, hiperlipidémia, inzulinrezisztencia, glukóz intolerancia, hipertónia jellemzi (Masuzaki és mtsai, 2001). Ezzel szemben csak a hepatikus  $11\beta$ -hidroxiszetroid dehidrogenáz 1-es típust overexpresszáló transzgén egér a metabolikus szindróma

anyagcsereeltérései és tünetei kialakulnak, kivéve az obezitást (Paterson és mtsai, 2004).

Kövér embereken készült tanulmányok is ugyanezt támasztják alá. A vizelettel ürülő kortizolmetabolitok alapján meghatározott hepatikus 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitás kövér embereken csökkent, míg szubkután zsírszövetükben az enzim aktivitása emelkedett a normál testtömegű emberekkel összehasonlítva (Rask és mtsai, 2001). Kövér nőkben a BMI növekedése a szubkután zsírszöveti 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitással pozitív korrelációt mutat (Rask és mtsai, 2002).



## ***VII. Következtetések***

1. A metabolikus szindróma patogenezisében szerepet játszó 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típus és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim együtműködése egy közösen használt intraluminális piridinnukleotid poolon alapul.

2. Ez a piridinnukleotid pool izolált, a mikroszóma felszínén működő NADPH oxidáz aktivitás számára nem elérhető.

3. A mikroszomális piridinnukleotid pool főleg NADP<sup>+</sup>-t, illetve NADPH-t tartalmaz, mivel két, bizonyítottan NADPH-t használó intraluminális enzim, a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa és a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz szubsztrátjai a redox állapotát befolyásolták. Méréseink alapján a NADPH/NADP<sup>+</sup> arány az endoplazmás retikulum lumenében 8:1-nek adódott, amiből kb. -376 mV-os redoxpotenciál kalkulálható..

4. Oxidáló hatású anyagok, a kortizon és a metirapon (a 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusának mesterséges szubsztrátja) az intraluminális NADPH poolt oxidálja. Redukáló anyagok, kortizol és glukóz-6-foszfát adása a piridinnukleotid pool redox állapotát alig befolyásolta, azonban a kortizon oxidáló hatását visszafordították.

5. A piridinnukleotid pool közös használatát bizonyítja, hogy kísérleti rendszerünkben a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz szubsztrát glukóz-6-foszfát adásakor kortizolprodukción, valamint az 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz-szubsztrát kortizon adásakor hexóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitást tapasztaltunk.

6. 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusa a metabolikus szindróma anyagcsereeltéréseinek kialakításán túl a betegség fenotípusos megjelenését is befolyásolja. Kövér fenotípusú metabolikus szindrómás Zucker patkányokon az enzim aktivitása és fehérjeszintű expressziója májban csökkent, míg zsírszövetben emelkedett volt. A zsírszöveti fokozott expresszió és enzimaktivitás az állatok kövér fenotípusának kialakításáért felelős.

7. Sovány fenotípusú 2-es típusú diabétesz modell Goto-Kakizaki patkányon a hepatikus 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitás és fehérjeszintű expresszió jelentős emelkedését, míg a zsírszöveti enzim aktivitásának és fehérjeszintű expressziójának csökkenését tapasztaltuk a kontroll állathoz képest. A sovány fenotípus oka feltehetően a zsírszöveti enzim csökkent aktivitása és fehérjeszintű expressziója,

míg a hepatikus  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus aktivitásának növekedése feltehetően a 2-es típusú diabétesz kialakulásához járul hozzá.

### ***VIII. Összefoglalás***

A metabolikus szindróma inzulinrezisztenciával, obezitással, hipertóniával, diszlipidémiával jellemezhető kórkép. Patogenezisének kutatásában az utóbbi évtizedben előtérbe került a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa.

A  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusa a szervezetben számos helyen expresszálódik, különösen a máj-és zsírszöveti enzim bír kiemelkedő jelentőséggel a betegség kialakulásában. Működése a kortikoszteroid hatás szöveti szintű szabályozásában fontos. Kofaktorként NADPH-t használ. Az 1-es típusú  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktív centruma az endoplazmás retikulumban helyezkedik el, működésének poszttranszlációs szabályozása kofaktorellátásának változtatásán keresztül is lehetséges. Biokémiai és genetikai úton egyaránt bizonyított, hogy az endoplazmás retikulum hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimével együttműködnek, kölcsönösen biztosítva egymás kofaktorellátását. Számos más, redukált piridinnukleotidokat használó reakció is ismert az endoplazmás retikulum lumenében, ami a többi redox rendszerből kalkulált oxidatív redoxpotenciál mellett feltételezte egy redukált állapotú piridinnukleotid pool jelenlétét.

Igazoltuk, hogy a két enzim együttműködése az endoplazmás retikulum lumenében egy izolált, közös piridinnukleotid poolon alapul. Mind a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típus, mind a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim szubsztrátjai befolyásolják ugyanis a piridinnukleotid pool redox állapotát. A NADPH/NADP<sup>+</sup> redox rendszer redoxpotenciálja -376 mV-nak adódott.

Vizsgáltuk továbbá, hogy az 1-es típusú  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz milyen szerepet játszik a metabolikus szindróma különböző fenotípusainak kialakulásában. Kővér Zucker patkányon, illetve sovány 2-es típusú diabétesz modell patkányon igazoltuk a zsírszöveti enzim fokozott, illetve csökkent aktivitását és fehérjeszintű expresszióját a metabolikus szindróma kővér, illetve sovány fenotípusának kialakulásában. A hepatikus enzim fokozott expressziója feltehetően a 2-es típusú diabétesz patomechanizmusában fontos. Kővér fenotípusú metabolikus szindrómás patkányon a hepatikus 1-es típusú  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz csökkent aktivitása és fehérjeszintű expressziója a már kialakult metabolikus szindróma miatti kompenzatorikus jelenség lehet.

## ***IX. Summary***

Metabolic syndrome is one of the most common diseases with a prevalence about 20-25 %. Its main symptoms are insulin resistance, obesity, hypertension and dyslipidemia. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 plays an important role in the pathogenesis of the disease.

11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is expressed in many tissues: in the pathogenesis of the metabolic syndrome enzyme in the liver and adipose tissue is the most important. Its role is the local regulation of corticosteroid effect. The active site of the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is located in the lumen of the endoplasmic reticulum. The enzyme uses NADPH as a cofactor, the activity can be regulated via its cofactor supply. The cooperation between 11 $\beta$ -hydroxsteroid type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase has been proved in a biochemical, as well as in a genetical way. The basis of their cooperation is the mutual cofactor generation for each other. Many other reactions are also known that use NADPH in the lumen of the endoplasmic reticulum, which suppose the existence of a reduced-state pyridine nucleotide pool.

We have proved that the cooperation of the two enzymes is based on an isolated, common pyridine nucleotide pool. Both the substrates of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase can influence the redox state of this intraluminal pyridine nucleotide pool. The calculated redox potential of the luminal NADPH/NADP<sup>+</sup> system is -376 mV.

We have also examined the role of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the phenotype of the metabolic syndrome. We have proved in obese Zucker rat and lean Goto-Kakizaki type 2 diabetes model rat the increased and decreased protein expression and activity of the adipose tissue enzyme, respectively. The increased expression and activity of the hepatic 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the lean Goto-Kakizaki rat may be important in the pathogenesis of type 2 diabetes, while the decreased expression and activity of the enzyme in the liver of the obese Zucker rat may be a compensatoric effect to the developed metabolic syndrome.

## ***X. Irodalomjegyzék***

Abeijon C, Mandon EC, Hirschberg CB. (1997) Transporters of nucleotide sugars, nucleotide sulfate and ATP in the Golgi apparatus. *Trends Biochem Sci*, 22 (6): 203-7. Review.

Agarwal AK, Mune T, Monder C, White PC. (1994) NAD<sup>+</sup>-dependent isoform of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Cloning and characterization of cDNA from sheep kidney. *J Biol Chem*, 69 (42): 25959-62.

Alberts P, Engblom L, Edling N, Forsgren M, Klingstrom G, Larsson C, Ronquist-Nii Y, Ohman B, Abrahmsen L (2002) Selective inhibition of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 decreases blood glucose concentrations in hyperglycaemic mice. *Diabetologia*, 45: 1528–1532

Alberts P, Nilsson C, Selen G, Engblom LO, Edling NH, Norling S, Klingstrom G, Larsson C, Forsgren M, Ashkzari M, Nilsson CE, Fiedler M, Bergqvist E, Eva BB, Abrahmsen LB (2003) Selective inhibition of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves hepatic insulin sensitivity in hyperglycemic mice strains. *Endocrinology*, 144 (11): 4755-62

Albiston AL, Obeyesekere VR, Smith RE, Krozowski ZS. (1994) Cloning and tissue distribution of the human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Mol Cell Endocrinol*, 105 (2): 11-7.

Amelung D, Hubener HJ, Roka L, Meyerheim G. (1953) Conversion of cortisone to compound F. *J Clin Endocrinol Metab*, 13 (9): 1125-6.

Andrew R, Phillips DI, Walker BR. (1998) Obesity and gender influence cortisol secretion and metabolism in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 1806–1809

Andrews RC, Herlihy O, Livingstone DE, Andrew R, Walker BR. (2002) Abnormal cortisol metabolism and tissue sensitivity to cortisol in patients with glucose intolerance. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 5587–5593

Andrews RC, Herlihy O, Livingstone DE, Andrew R, Walker BR. (2002) Abnormal cortisol metabolism and tissue sensitivity to cortisol in patients with glucose intolerance. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 5587–5593

Andrews RC, Rooyackers O, Walker BR. (2003) Effects of the 11 $\beta$ - hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone on insulin sensitivity in men with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 285–291

Atanasov AG, Nashev LG, Schweizer RA, Frick C, Odermatt A. (2004) Hexose-6-phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as an oxoreductase. *FEBS Lett*, 571 (1-3): 129-33.

Banhegyi G, Benedetti A, Fulceri R, Senesi S. (2004) Cooperativity between 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 279 (26): 27017-21

Banhegyi G, Lusini L, Puskas F, Rossi R, Fulceri R, Braun L, Mile V, di Simplicio P, Mandl J, Benedetti A. (1999) Preferential transport of glutathione versus glutathione disulfide in rat liver microsomal vesicles. *J Biol Chem*, 274 (18): 12213-6.

Banhegyi G, Marcolongo P, Fulceri R, Hinds C, Burchell A, Benedetti A.(1997) Demonstration of a metabolically active glucose-6-phosphate pool in the lumen of liver microsomal vesicles. *J Biol Chem*, 272(21):13584-90.

Banhegyi G, Marcolongo P, Puskas F, Fulceri R, Mandl J, Benedetti A.(1998) Dehydroascorbate and ascorbate transport in rat liver microsomal vesicles. *J Biol Chem*, 273 (5): 2758-62.

BannenberG G, Martin HJ, Belai I, Maser E. (2003) 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: tissue-specific expression and reductive metabolism of some anti-insect agent azole analogues of metirapone. *Chem Biol Interact*, 143-144: 449-57.

Barash V, Erlich T, Bashan N (1990) Microsomal hexose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases in extrahepatic tissues: human placenta and pig kidney cortex. *Biochem Int*, 20: 267–274

Bardwell JC. (2002) Disulfide bond formation, a race between FAD and oxygen. *Dev Cell*, 3 (6): 758-60. Review.

Barf T, Vallgarda J, Emond R, Haggstrom C, Kurz G, Nygren A, Larwood V, Mosialou E, Axelsson K, Olsson R, Engblom L, Edling N, Ronquist-Nii Y, Ohman B, Alberts P, Abrahmsen L. (2002) Arylsulfonamidothiazoles as a new class of potential antidiabetic drugs. Discovery of potent and selective inhibitors of the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Med Chem*, 45 (18): 3813-5.

Bass R, Ruddock LW, Klappa P, Freedman RB. (2004) A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J Biol Chem*, 279 (7): 5257-62.

Beaufay H, de Duve C. (1954) The hexosephosphatase system. VI. Attempted fractionation of microsomes containing glucose-6-phosphatase. *Bull Soc Chim Biol (Paris)*, 36 (11-12): 1551-68.

Benedetti A, Fulceri R, Romani A, Comporti M. (1988) MgATP-dependent glucose 6-phosphate-stimulated Ca<sup>2+</sup> accumulation in liver microsomal fractions. Effects of inositol 1, 4, 5-trisphosphate and GTP. *J Biol Chem*, 263 (7): 3466-73.

Benedetti A. (1996) Evidence for an UDP-glucuronic acid/phenol glucuronide antiport in rat liver microsomal vesicles. *Biochem. J*, 315: 171–176

Benedetti A., Bánhegyi G., Burchell, A. Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment. IOS Press, Amsterdam. 2005.

Bengtsson BA, Brummer RJ, Eden S, Bosaeus I, Lindstedt G. (1989) Body composition in acromegaly: the effect of treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 31 (4): 481-90.

Berger J, Tanen M, Elbrecht A, Hermanowski-Vosatka A, Moller DE, Wright SD, Thieringer R. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit adipocyte 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. *J Biol Chem*, 276 (16): 12629-35.

Beutler E, Morrison M. (1967) Localization and characteristics of hexose 6-phosphate dehydrogenase (glucose dehydrogenase). *J Biol Chem* 242: 5289–5293

Bjorntorp P, Holm G, Rosmond R. Hypothalamic arousal, insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. (1999) *Diabet Med*, 16: 373-383

Blum A, Martin HJ, Maser E. (2000) Human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is enzymatically active in its nonglycosylated form. *Biochem Biophys Res Commun*, 276 (2): 428-34.

Brands R, Snider MD, Hino Y, Park SS, Gelboin HV, Rothman JE (1985) Retention of membrane proteins by the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 101: 1724–1732

Bublitz C, Steavenson S. (1988) The pentose phosphate pathway in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 263: 12849–12853

Bujalska IJ, Draper N, Michailidou Z, Tomlinson JW, White PC, Chapman KE, Walker EA, Stewart PM. (2005) Hexose-6-phosphate dehydrogenase confers oxo-reductase activity upon 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Mol Endocrinol*, 34 (3): 675-84.



Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Stewart PM. (1999) Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 140: 3188–3196

Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM. (1997) Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet*, 349 (9060): 1210-3.

Bujalska IJ, Walker EA, Hewison M, Stewart PM. (2002) A switch in dehydrogenase to reductase activity of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 upon differentiation of human omental adipose stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1205–1210

Bush IE. (1969) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: contrast between studies in vivo and studies in vitro. *Adv Biosci*, 3: 23-39

Castonguay TW, Dallman MF, Stern JS. Some metabolic and behavioral effects of adrenalectomy on obese Zucker rats. (1986) *Am J Physiol*, 251: 923-33.

Chew, GT, Gan SK, Watts GF. Revisiting the metabolic syndrome. (2006) *Med J Australia*, 185 (8): 445-449

Chou JY, Matern D, Mansfield BC, Chen YT. (2002) Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex. *Curr Mol Med*, 2: 121–143

Clarke JL, Mason PJ (2003) Murine hexose-6-phosphate dehydrogenase: a bifunctional enzyme with broad substrate specificity and 6-phosphogluconolactonase activity. *Arch Biochem Biophys*, 415: 229–234

Collard F, Collet JF, Gerin I, Veiga-da-Cunha M, Van Schaftingen E (1999) Identification of the cDNA encoding human 6-phosphogluconolactonase, the enzyme catalyzing the second step of the pentose phosphate pathway (1). *FEBS Letters*, 459 (2): 223-6.

Cope CL. Metabolic breakdown. In: Cope CL et al: Adrenal steroids and disease. Pitman medical, London, 1972: 80-104

Cope CL, Black E. (1958) The production rate of cortisol in man. *Br Med J*, 1 (5078): 1020-4.

Corbett EF, Michalak M. (2000) Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem Sci*, 25 (7): 307-11. Review.

Csabi GY, Juricskay S, Molnar D. (2000) Urinary cortisol to cortisone metabolites in hypertensive obese children. *J Endocrinol Invest*, 23: 435–439

Csala M, Braun L, Mile V, Kardon T, Szarka A, Kupcsulik P, Mandl J, Banhegyi G. (1999) Ascorbate-mediated electron transfer in protein thiol oxidation in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett*, 460 (3): 539-43.

Csala M, Staines AG, Banhegyi G, Mandl J, Coughtrie MW, Burchell B. (2004) Evidence for multiple glucuronide transporters in rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 68 (7):1353-62.

Debarbieux L, Beckwith J. (1999) Electron avenue: pathways of disulfide bond formation and isomerization. *Cell*, 99 (2): 117-9. Review.

Diedrich S, Grossmann B, Hanke B, Quinkler M, Hermann M, Bahr V, Oelkers W. (2000) In the search for specific inhibitors of human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases (11 $\beta$ HSDs): chenodeoxycholic acid selectively inhibits 11 $\beta$ HSD1. *Eur J Endocrin*, 142: 200-207.

Draper N, Walker EA, Bujalska IJ, Tomlinson JW, Chalder SM, Arlt W, Lavery GG, Bedendo O, Ray DW, Laing I, Malunowicz E, White PC, Hewison M, Mason PJ, Connell JM, Shackleton CH, Stewart PM. (2003) Mutations in the genes encoding 11 $\beta$ -

hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nat Genet*, 34 (4): 434-9.

Duax WL, Ghosh D, Pletnev V. (2000) Steroid dehydrogenase structures, mechanism of action, and disease. *Vitam Horm*, 58: 121-48. Review.

Duperrex H, Kenouch S, Gaeggeler HP, Seckl JR, Edwards CR, Farman N, Rossier BC. (1993) Rat liver 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase complementary deoxyribonucleic acid encodes oxoreductase activity in a mineralocorticoid-responsive toad bladder cell line. *Endocrinology*, 132 (2): 612-9.

Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, de Kloet ER, Monder C. (1988) Localisation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet*, 2 (8618): 986-9.

Esteban NV, Loughlin T, Yergey AL, Zawadzki JK, Booth JD, Winterer JC, Loriaux DL. (1991) Daily cortisol production rate in man determined by stable isotope dilution/mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab*, 72 (1): 39-45.

Fassio A, Sitia R. (2002) Formation, isomerisation and reduction of disulphide bonds during protein quality control in the endoplasmic reticulum. *Histochem Cell Biol*.117 (2):151-7. Review.

Frاند AR, Cuzzo JW, Kaiser CA (2000). Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol*, 10 (5): 203-10. Review.

Fraser R, Ingram MC, Anderson NH, Morrison C, Davies E, Connell JM. (1999) Cortisol effects on body mass, blood pressure, and cholesterol in the general population. *Hypertension*, 33: 1364–1368

Frick C, Atanasov AG, Arnold P, Ozols J, Odermatt A. (2004) Appropriate function of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the endoplasmic reticulum lumen is

dependent on its N-terminal region sharing similar topological determinants with 50-kDa esterase. *J Biol Chem*, 279 (30): 31131-8.

Fukushima DK, Bradlow HL, Hellman L, Zumoff B, Gallagher TF. (1960) Metabolic transformation of hydrocortisone-4-C14 in normal men. *J Biol Chem*, 235: 2246-52.

Fulceri R, Banhegyi G, Gamberucci A, Giunti R, Mandl J, Benedetti A. (1994) Evidence for the intraluminal positioning of p-nitrophenol UDP-glucuronosyltransferase activity in rat liver microsomal vesicles. *Arch Biochem Biophys*, 309 (1): 43-6.

Funder JW. (1990) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and the meaning of life. *Mol Cell Endocrinol*, 68 (1): C3-5.

Gao HB, Ge RS, Lakshmi V, Marandici A, Hardy MP (1997) Hormonal regulation of oxidative and reductive activities of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Endocrinology* 138: 156–161

Grundy WN, Bailey TL, Elkan CP, Baker ME. (1997) Hidden Markov model analysis of motifs in steroid dehydrogenases and their homologs. *Biochem Biophys Res Commun*. 231 (3): 760-6.

Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. (2004) Definition of metabolic syndrome. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/ American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation*, 109: 433-438

Hammami MM, Siiteri PK. (1991) Regulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in human skin fibroblasts: enzymatic modulation of glucocorticoid action. *J Clin Endocrinol Metab*, 73 (2): 326-34.

Harris HJ, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR, Holmes MC. (2001) Intracellular regeneration of glucocorticoids by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD)-1

plays a key role in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: analysis of 11 $\beta$ -HSD-1-deficient mice. *Endocrinology*, 142 (1): 114-20.

Hauer H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF. (1989) Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*, 84 (5): 1663-70.

Hellman L, Nakada F, Zumoff B, Fukushima D, Bradlow HL, Gallagher TF. (1971) Renal capture and oxidation of cortisol in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 33 (1): 52-62.

Henne V, Soling HD. (1986) Guanosine 5'-triphosphate releases calcium from rat liver and guinea pig parotid gland endoplasmic reticulum independently of inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *FEBS Lett*, 202 (2):267-73.

Hermanowski-Vosatka A, Gerhold D, Mundt SS, Loving VA, Lu M, Chen Y, Elbrecht A, Wu M, Doebber T, Kelly L, Milot D, Guo Q, Wang PR, Ippolito M, Chao YS, Wright SD, Thieringer R. (2000) PPAR $\alpha$  agonists reduce 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 279 (2): 330-6.

Hewitt KN, Walker EA, Stewart PM. (2005) Minireview: Hexose-6-phosphate dehydrogenase and redox control of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *Endocrinology*, 146 (6): 2539-43.

Hirschberg CB, Robbins PW, Abeijon C. (1998) Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem*, 67: 49-69. Review.

Hori SH, Takahashi T. (1974) Phenobarbital-induced increase of the hexose 6-phosphate dehydrogenase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 61: 1064–1070

Horigome H, Hirano T, Oka K. (2001) Therapeutic effect of glycyrrhetic acid in MRL lpr/lpr mice: implications of alteration of corticosteroid metabolism. *Life Sci*, 69 (20): 2429-38.

Hult M, Jornvall H, Oppermann UC. (1998) Selective inhibition of human type 1 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase by synthetic steroids and xenobiotics. *FEBS Lett*, 441 (1): 25-8.

Hundertmark S, Buhler H, Ragosch V, Dinkelborg L, Arabin B, Weitzel HK. (1995) Correlation of surfactant phosphatidylcholine synthesis and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in fetal lung. *Endocrinology*, 136: 2573–2578

Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF.(1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, 257 (5076): 1496-502.

Isaacs J, Binkley F. (1977) Glutathione dependent control of protein disulfide-sulfhydryl content by subcellular fractions of hepatic tissue. *Biochim Biophys Acta*, 497 (1): 192-204.

Jamieson PM, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR (1995) 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11 $\beta$ -reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physicochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology*, 136: 4754–4761.

Jamieson PM, Walker BR, Chapman KE, Andrew R, Rossiter S, Seckl JR (2000) 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is a predominant 11 $\beta$ -reductase in the intact perfused rat liver. *J Endocrinol*, 165: 685–692.

Janolino VG, Swaisgood HE. (1987) Sulfhydryl oxidase-catalyzed formation of disulfide bonds in reduced ribonuclease. *Arch Biochem Biophys*, 258 (1): 265-71.

Jellinck PH, Pavlides C, Sakai RR, McEwen BS (1999)  $11\beta$ - Hydroxysteroid dehydrogenase functions reversibly as an oxidoreductase in the rat hippocampus in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 71: 139–144

Jenkins JS. (1966) The metabolism of cortisol by human extra-hepatic tissues. *J Endocrinol*, 34 (1): 51-6.

Jessen BA, Stevens GJ. (2002) Expression profiling during adipocyte differentiation of 3T3–L1 fibroblasts. *Gene*, 299: 95–100

Jessop DS, Dallmann MF, Fleming D, Lightman SL. (2001) Resistance to glucocorticoid feedback in obesity. *J Clin Endocrin Metab*, 84: 3570-3574.

Jornvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, Gonzalez-Duarte R, Jeffery J, Ghosh D. (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 34 (18): 6003-13. Review.

Kendall EC. Arthritis. In: Charles Scribner's Sons ed. *Cortisone*. New York, 1971: 121-137

Kerstens MN, Riemens SC, Sluiter WJ, Pratt JJ, Wolthers BG, Dullaart RP (2000) Lack of relationship between  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase setpoint and insulin sensitivity in the basal state and after 24 h of insulin infusion in healthy subjects and type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 52: 403–411

Kimura K, Endou H, Sudo J, Sakai F. (1979) Glucose dehydrogenase (hexose 6-phosphate dehydrogenase) and the microsomal electron transport system. Evidence supporting their possible functional relationship. *J Biochem (Tokyo)*, 85: 319–326

Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmoll D, Jamieson P, Best R, Brown R, Edwards CR, Seckl JR, Mullins JJ. (1997)  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible

responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26):14924-9.

Lakshmi V, Monder C. (1988) Purification and characterization of the corticosteroid 11 $\beta$ -dehydrogenase component of the rat liver 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase complex. *Endocrinology*, 123 (5): 2390-8.

Lavery GG, Walker EA, Draper N, Jeyasuria P, Marcos J, Shackleton CH, Parker KL, White PC, Stewart PM. (2006) Hexose-6-phosphate dehydrogenase knock-out mice lack 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1-mediated glucocorticoid generation. *J Biol Chem*, 281 (10): 6546-51.

Lin B, Pan CJ, Chou JY. (2000) Human variant glucose-6-phosphate transporter is active in microsomal transport. *Hum Genet*, 107 (5): 526-9.

Liu Y, Nakagawa Y, Wang Y, Li R, Li X, Ohzeki T, Friedman TC. (2003) Leptin activation of corticosterone production in hepatocytes may contribute to the reversal of obesity and hyperglycemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Diabetes*, 52: 1409–1416

Liu Y, Nakagawa Y, Wang Y, Sakurai R, Tripathi PV, Lutfy K, Friedman TC. (2005) Increased glucocorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in hepatocytes may contribute to the phenotype of type 2 diabetes in db/db mice. *Diabetes*, 54 (1): 32-40.

Livingstone DE, Jones GC, Smith K, Jamieson PM, Andrew R, Kenyon CJ, Walker BR (2000) Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. *Endocrinology*, 141: 560–563

Livingstone DE, Kenyon CJ, Walker BR. (2000) Mechanisms of dysregulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obese Zucker rats. *J Endocrinol*, 167: 533–539



Livingstone DE, Walker BR. (2003) Is 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 a Therapeutic Target? Effects of Carbenoxolon in Lean and Obese Zucker Rats. *J Pharm Exp Ther*, 305: 167-172

Ljung T, Andersson B, Bengtsson BA, Bjorntorp P, Marin P. (1996) Inhibition of cortisol secretion by dexamethasone in relation to body fat distribution: a dose-response study. *Obes Res*, 4 (3): 277-82.

Ljung T, Ottoson M, Ahlberg AC, Eden S, Oden B, Okret S, Bronnegard M, Stiernä P, Bjorntorp P. (2002) Central and peripheral glucocorticoid receptor function in abdominal obesity. *J Endocrinol Invest* 25, 229-235

Low SC, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR. (1994) 'Liver-type' 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase cDNA encodes reductase but not dehydrogenase activity in intact mammalian COS-7 cells. *J Mol Endocrinol*, 13 (2): 167-74.

Low SC, Chapman KE, Edwards CR, Wells T, Robinson IC, Seckl JR. (1994) Sexual dimorphism of hepatic 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat: the role of growth hormone patterns. *J Endocrinol*, 143 (3): 541-8.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 (1): 265-75.

Mandula B, Srivastava SK, Beutler E. (1970) Hexose-6-phosphate dehydrogenase: distribution in rat tissues and effect of diet, age and steroids. *Arch Biochem Biophys*, 141 (1): 155-61.

Marcolongo P, Banhegyi G, Benedetti A, Hinds CJ, Burchell A. (1998) Liver microsomal transport of glucose-6-phosphate, glucose, and phosphate in type 1 glycogen storage disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 83 (1): 224-9.

Marcolongo P, Fulceri R, Giunti R, Burchell A, Benedetti A. (1996) Permeability of liver microsomal membranes to glucose. *Biochem Biophys Res Commun*, 219 (3): 916-22.

Mariniello B, Ronconi V, Rilli S, Bernante P, Boscaro M, Mantero F, Giacchetti G. (2006) Adipose tissue 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in obesity and Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*, 155 (3): 435-41.

Marver D. (1984) Evidence of corticosteroid action along the nephron. *Am J Physiol*, 246: 111-23. Review.

Mason PJ, Stevens D, Diez A, Knight SW, Scopes DA, Vulliamy TJ. (1999) Human hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase) encoded at 1p36: coding sequence and expression. *Blood Cells Mol Dis*, 25: 30–37.

Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. (2001) A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*, 294: 2166–2170.

Masuzaki H, Yamamoto H, Kenyon CJ, Elmquist JK, Morton NM, Paterson JM, Shinyama H, Sharp MG, Fleming S, Mullins JJ, JR, Flier JS. (2003) Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. *J Clin Invest*, 112: 83–90.

Mattsson C, Lai M, Noble J, McKinney E, Yau JL, Seckl JR, Walker BR. (2003) Obese Zucker rats have reduced mineralocorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in hippocampus—implications for dysregulation of the hypothalamic- pituitary-adrenal axis in obesity. *Endocrinology* 144: 2997–3003.

McGuire JS, Tomkins GM. (1959) The multiplicity and specificity of delta 4-3-ketosteroid hydrogenases (5 alpha). *Arch Biochem Biophys*, 82 (2): 476-7.

Meissner G. (1988) Ionic permeability of isolated muscle sarcoplasmic reticulum and liver endoplasmic reticulum vesicles. *Methods Enzymol*, 157: 417-37.

Mercer W, Obeyesekere V, Smith R, Krosowski Z. (1993) Characterisation of 11 $\beta$ -HSD1B gene expression and enzymatic activity. *Mol Cell Endocrinol* 92: 247-251

Meldolesi J, Pozzan T. (1998) The endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci*, 23 (1): 10-4. Review.

Minotti G, Ikeda-Saito M. (1992) Fe (II) oxidation and Fe (III) incorporation by the M(r) 66,000 microsomal iron protein that stimulates NADPH oxidation. *J Biol Chem*, 267 (11): 7611-4.

Molteni SN, Fassio A, Ciriolo MR, Filomeni G, Pasqualetto E, Fagioli C, Sitia R. (2004) Glutathione limits Ero1-dependent oxidation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 279 (31): 32667-73.

Monder C, Bradlow HR. (1980) Corticoid acids: exploration at the frontier of corticosteroid metabolism. *Recent Prog Horm Res*, 36: 345-400

Monder C, Shackleton CH. (1984) 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase: fact or fancy? *Steroids*, 44 (5): 383-417. Review.

Monder C, White PC. (1993) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm*, 47: 187-271. Review.

Moore CC, Mellon SH, Murai J, Siiteri PK, Miller WL. (1993) Structure and function of the hepatic form of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the squirrel monkey, an animal model of glucocorticoid resistance. *Endocrinology*, 133: 368–375

Moore JS, Monson JP, Kaltsas G, Putignano P, Wood PJ, Sheppard MC, Besser GM, Taylor NF, Stewart PM. (1999) Modulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase

isozymes by growth hormone and insulin-like growth factor: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab*, 84 (11): 4172-7.

Morton NM, Densmore V, Wamil M, Ramage L, Nichol K, Bungler L, Seckl JR, Kenyon CJ. (2005) A polygenic model of the metabolic syndrome with reduced circulating and intra-adipose glucocorticoid action. *Diabetes*, 54 (12): 3371-8.

Morton NM, Holmes MC, Fievet C, Staels B, Tailleux A, Mullins JJ, Seckl JR. (2001) Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. *J Biol Chem*, 276: 41293-41300

Munck A, Naray-Fejes-Toth A. (1992) The ups and downs of glucocorticoid physiology. Permissive and suppressive effects revisited. *Mol Cell Endocrinol*. 90 (1): 1-4.

Napolitano A, Voice MW, Edwards CR, Seckl JR, Chapman KE. (1998) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in adipocytes: expression is differentiation-dependent and hormonally regulated. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 64: 251–260.

Nardai G, Braun L, Csala M, Mile V, Csermely P, Benedetti A, Mandl J, Banhegyi G. (2001) Protein-disulfide isomerase- and protein thiol-dependent dehydroascorbate reduction and ascorbate accumulation in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 276 (12): 8825-8.

Obeid J, White PC. (1992) Tyr-179 and Lys 183 are essential for enzymatic activity of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Comm*, 188: 222-227.

Odermatt A, Arnold P, Stauffer A, Frey BM, Frey FJ. (1999) The N-terminal anchor sequences of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases determine their orientation in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, 274 (40): 28762-70.

Osinski PA. (1960) Steroid 11 $\beta$ -ol dehydrogenase in human placenta. *Nature*, 187: 777.

Ozols J. (1993) Isolation and the complete amino acid sequence of luminal endoplasmic reticulum glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 5302–5306.

Ozols J. (1995) Luminal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem*, 270 (17): 10360

Palade GE. (1956) The endoplasmic reticulum. *J Biophys Biochem Cytol.* 2 (4, Suppl): 85-98.

Pasquali R. (2003) Is the hypothalamic-pituitary-adrenal axis really hyperactivated in human obesity? *J Endocrin Invest* 21, 268-71

Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, Seckl JR, Mullins JJ. (2004) Metabolic syndrome without obesity: hepatic overexpression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 7088 –7093.

Peterson RE, Pierce CE. (1960) The metabolism of corticosterone in man. *J Clin Invest*, 39: 741-57.

Phillips DM, Lakshmi V, Monder C. (1989) Corticosteroid 11 $\beta$ - dehydrogenase in rat testis. *Endocrinology*, 125: 209–216.

Pu X, Yang K. (2000) Guinea pig 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: primary structure and catalytic properties. *Steroids*, 65: 148–156.

Puskás, F., Braun, L., Csala, M., Kardon, T., Marcolongo, P., Benedetti, A., Mandl, J., and Bánhegyi, G. (1998) Gulonolactone oxidase activity-dependent intravesicular glutathione oxidation in rat liver microsomes. *FEBS Lett.* 430: 293–296

Rajan V, Chapman KE, Lyons V, Jamieson P, Mullins JJ, Edwards CR, Seckl JR. (1995) Cloning, sequencing and tissue-distribution of mouse 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 cDNA. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 52: 141–147

Rajan V, Edwards CR, Seckl JR (1996) 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase in cultured hippocampal cells reactivates inert 11-dehydrocorticosterone, potentiating neurotoxicity. *J Neurosci*, 16: 65–70

Rask E, Olsson T, Soderberg S, Andrew R, Livingstone DE, Johnson O, Walker BR. (2001) Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 1418–1421

Rask E, Walker BR, Soderberg S, Livingstone DE, Eliasson M, Johnson O, Andrew R, Olsson T. (2002) Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 3330–3336.

Reynolds RM, Walker BR, Philips DIW, Sydall HE, Andrew R, Wood PJ, Whorwood CB. (2001) Altered control of cortisol secretion in adult man with low birthweight and cardiovascular risk factors. *J Clin Endocrin Metab* 83, 1853-1859.

Ricketts ML, Shoesmith KJ, Hewison M, Strain A, Eggo MC, Stewart PM. (1998) Regulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in primary cultures of rat and human hepatocytes. *J Endocrinol* 156: 159–168.

Ricketts ML, Verhaeg JM, Bujalska I, Howie AJ, Rainey WE, Stewart PM. (1998) Immunohistochemical localization of type 1 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1325–1335.

Ringold GM, Chapman AB, Knight DM.(1986) Glucocorticoid control of developmentally regulated adipose genes. *J Steroid Biochem*, 24 (1): 69-75.

- Romanelli A, St Denis JF, Vidal H, Tchu S, van de WG. (1994) Absence of glucose uptake by liver microsomes: an explanation for the complete latency of glucose dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 200: 1491–1497.
- Rosmond R, Chagnon YC, Chagnon M, Perusse L, Bouchard C, Bjortorp P.(2000) A polymorphism of the 5'-flanking region of the glucocorticoid receptor gene locus is associated with basal cortisol secretion in men. *Metabolism*, 49: 1197-99.
- Sacca L, Cittadini A, Fazio S. (1994) Growth hormone and the heart. *Endocr Rev*, 15 (5): 555-73. Review.
- Sampath-Kumar R, Yu M, Khalil MW, Yang K. (1997) Metyrapone is a competitive inhibitor of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 reductase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 62: 195–199.
- Sawada H, Hara A, Hayashibara M, Nakayama T, Usui S, Saeki T (1981) Microsomal reductase for aromatic aldehydes and ketones in guinea pig liver. Purification, characterization, and functional relationship to hexose-6-phosphate dehydrogenase. *J Biochem (Tokyo)* 90: 1077–1085.
- Sawada H, Hayashibara M, Hara A, Nakayama T (1980) A possible functional relationship between microsomal aromatic aldehyde-ketone reductase and hexose-6-phosphate dehydrogenase. *J Biochem (Tokyo)* 87: 985–988.
- Seckl JR, Walker BR. (2001) Minireview: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1—a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology*, 142: 1371–1376.
- Seckl JR.(2004) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. *Curr Opin Pharmacol*, 4 (6): 597-602. Review.
- Shackleton CH. (1993) Mass spectrometry in the diagnosis of steroid-related disorders and in hypertension research. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 45 (1-3): 127-40.

Shafqat N, Elleby B, Svensson S, Shafqat J, Jornvall H, Abrahmsen L, Oppermann U. (2003) Comparative enzymology of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from glucocorticoid resistant (Guinea pig) versus sensitive (human) species. *J Biol Chem* 278: 2030–2035.

Shaw CR, Koen AL. (1968) Glucose 6-phosphate dehydrogenase and hexose 6-phosphate dehydrogenase of mammalian tissues. *Ann NY Acad Sci* 151: 149–156.

Simpson IA, Yver DR, Hissin PJ, Wardzala LJ, Karnieli E, Salans LB, Cushman SW. (1983) Insulin-stimulated translocation of glucose transporters in the isolated rat adipose cells: characterization of subcellular fractions. *Biochim Biophys Acta.* 763 (4): 393-407.

Soute BA, Groenen-van Dooren MM, Holmgren A, Lundstrom J, Vermeer C. (1992) Stimulation of the dithiol-dependent reductases in the vitamin K cycle by the thioredoxin system. Strong synergistic effects with protein disulphide-isomerase. *Biochem J*, 281: 255-9.

Srivastava LS, Werk EE Jr, Thrasher K, Sholiton LJ, Kozera R, Nolten W, Knowles HC Jr. (1973) Plasma cortisone concentration as measured by radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab*, 36 (5): 937-43.

Stewart PM, Boulton A, Kumar S, Clark PM, Shackleton CH. (1999) Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone- cortisol conversion in subjects with central adiposity. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 1022–1027.

Stewart PM, Burra P, Shackleton CHL, Sheppard MC, Elias E (1993) 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase deficiency and glucocorticoid status in patients with alcoholic and non-alcoholic chronic liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 748–751.



Stewart PM, Krozowski ZS. (1999) 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm*, 57: 249-324. Review.

Stewart PM, Murry BA, Mason JI (1994) Human kidney 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase is a high affinity nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme and differs from the cloned type I isoform. *J Clin Endocrinol Metab*, 79: 480–484.

Szarka A, Stadler K, Jenei V, Margittai E, Csala M, Jakus J, Mandl J, Banhegyi G. (2002) Ascorbyl free radical and dehydroascorbate formation in rat liver endoplasmic reticulum. *J Bioenerg Biomembr*, 34 (4): 317-23.

Tanahashi K, Hori SH. (1980) Immunohistochemical localization of hexose 6-phosphate dehydrogenase in various organs of the rat. *J Histochem Cytochem*, 28: 1175–1182

Tannin GM, Agarwal AK, Monder C, New MI, White PC. (1991) The human gene for 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization. *J Biol Chem*, 266: 16653–16658.

Tiosano D, Eisentein I, Militianu D, Chrousos GP, Hochberg Z. (2003) 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase activity in hypothalamic obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 379–384

Tomlinson JW, Moore J, Cooper MS, Bujalska I, Shahmanesh M, Burt C, Strain A, Hewison M, Stewart PM. (2001) Regulation of expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines. *Endocrinology*, 142: 1982–1989.

Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM. (2004) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev*, 25 (5): 831-66. Review.

Trainer PJ, Drake WM, Perry LA, Taylor NF, Besser GM, Monson JP. (2001) Modulation of cortisol metabolism by the growth hormone receptor antagonist pegvisomant in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*, 86 (7): 2989-92.

Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ, Weissman JS.(2000) Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science*, 290 (5496): 1571-4.

Valentino R, Tommaseli AP, Savastano S, Stewart PM, Ghiggi MR, Galetti F, Mariniello P, Lombardi G, Edwards CR. (2003) Alcohol inhibits 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat kidney and liver. *Horm Res*, 43: 176-180

van Schaftingen E, Gerin I. (2002) The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J*, 362: 513-32. Review.

Varsanyi M, Szarka A, Papp E, Makai D, Nardai G, Fulceri R, Csermely P, Mandl J, Benedetti A, Banhegyi G. (2004) FAD transport and FAD-dependent protein thiol oxidation in rat liver microsomes. *J Biol Chem*, 279 (5): 3370-4.

Vermeer C.(1990) Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem J*, 266 (3): 625-36.

Vicenatti V, Ceroni L, Gagliardi L, Gambineri A, Pasquali R. (2002) Response of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis to high protein/fat and high carbohydrate meals in women with different obesity phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3984-3988.

Voice MW, Seckl JR, Edwards CR, Chapman KE. (1996) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in 2S FAZA hepatoma cells is hormonally regulated: a model system for the study of hepatic glucocorticoid metabolism. *Biochem J*, 317: 621-5.

Wake DJ, Walker BR. (2004) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity and the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 215 (1-2): 45-54. Review.

Walker BR, Connacher AA, Lindsay RM, Webb DJ, Edwards CR. (1995) Carbenoxolone increases hepatic insulin sensitivity in man: a novel role for 11-oxosteroid reductase in enhancing glucocorticoid receptor activation. *J Clin Endocrinol Metab*, 80: 3155–3159.

Walker BR, Connacher AA, Webb DJ, Edwards CRW. (1992) Glucocorticoids and blood pressure: a role for the cortisol/cortisone shuttle in the control of vascular control in men. *Clinical Sciences*, 83: 171-178.

Walker BR, Soderberg S, Lindahl B, Olsson T. (2000) Independent effects of obesity and cortisol in predicting cardiovascular risk factors in men and women. *J Intern Med*, 247: 198-204

Walker EA, Clark AM, Hewison M, Ride JP, Stewart PM. (2001) Functional expression, characterization, and purification of the catalytic domain of human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Biol Chem*, 276 (24): 21343-50.

Wang GM, Ge RS, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP (2002) Expression of 11 $\beta$ -hydroxylase in rat Leydig cells. *Endocrinology*, 143: 621–626

Wells WW, Xu DP. (1994) Dehydroascorbate reduction. *J Bioenerg Biomembr*, 26 (4): 369-77. Review.

White PC. (2005) Genotypes at 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 11B1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase loci are not risk factors for apparent cortisone reductase deficiency in a large population based sample. *J Clin Endocrin Metab*, 90: 5880-5883.

White PC, Rogoff D, McMillan R, Lavery GG. (2007). Hexose-6-phosphate dehydrogenase and corticosteroid metabolism. *Mol Cell Endocrin*, 265-266: 89-92

Whitworth JA, Stewart PM, Burt D, Atherden SM, Edwards CR. (1989) The kidney is the major site of cortisone production in man. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 31 (3): 355-61.

Whorwood CB, Sheppard MC, Stewart PM. (1993) Tissue specific effects of thyroid hormone on 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 46: 539–547.

Williams LJ, Lyons V, MacLeod I, Rajan V, Darlington GJ, Poli V, Seckl JR, Chapman KE. (2000) C/EBP regulates hepatic transcription of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. A novel mechanism for cross-talk between the C/EBP and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem*, 275: 30232–30239.

Yang K, Smith CL, Dales D, Hammond GL, Challis JR. (1992) Cloning of an ovine 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase complementary deoxyribonucleic acid: tissue and temporal distribution of its messenger ribonucleic acid during fetal and neonatal development. *Endocrinology*, 131: 2120–2126.

Yau JL, Noble J, Kenyon CJ, Hibberd C, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR. (2001) Lack of tissue glucocorticoid reactivation in 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice ameliorates age-related learning impairments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98 (8): 4716-21.

Yukimura Y, Bray GA, Wolfsen AR. (1978) Some effects of adrenalectomy in the fatty rat. *Endocrinology*, 103 (5): 1924-8.

Zhang YD, Wang MS.(1997) Inhibition of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase obtained from guinea pig kidney by some bioflavonoids and triterpenoids. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 18 (3): 240-4.

Ziegler, DM., Poulsen, LL. (1977) Protein disulfide bond synthesis: a possible intracellular mechanism. *Trends Biochem. Sci.* 2: 79-82

Zumoff B, Bradlow HL, Levin J, Fukushima DK. (1983) Influence of thyroid function on the in vivo cortisol in equilibrium cortisone equilibrium in man. *J Steroid Biochem* 18: 437–440

## ***XI. Saját publikációk jegyzéke***

*Az értekezéshez kapcsolódó közlemények*

Czegle I, Piccirella S, Senesi S, Csala M, Mandl J, Banhegyi G, Fulceri R, Benedetti A. (2006) Cooperativity between 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase is based on a common pyridine nucleotide pool in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Endocrinol*, 248(1-2):24-5. (IF= 2,786)

Piccirella S, Czegle I, Lizak B, Margittai E, Senesi S, Papp E, Csala M, Fulceri R, Csermely P, Mandl J, Benedetti A, Banhegyi G. (2006) Uncoupled redox systems in the lumen of the endoplasmic reticulum. Pyridine nucleotides stay reduced in an oxidative environment. *J Biol Chem*, 281(8):4671-7. **(ennek a közleménynek Czegle Ibolya megosztott első szerzője)** (IF=5,854)

*Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemény*

Lizak B, Czegle I, Csala M, Benedetti A, Mandl J, Banhegyi G. (2006) Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to small anions. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291(3):511-7 (IF=3,942)