

## Vélemény

dr. Csala Miklós *A 2-es típusú cukorbetegség és az endoplazmás retikulum c. MTA doktori értekezéséről (2015)*

### Az értekezés részei, témája és formai jellemzői

Dr. Csala Miklós disszertációja 43 angol nyelvű közleményén alapul. Átlagosan ezek impakt-faktor értéke 3,6, szerzőinek száma pedig 6.

Az értekezés 194 oldalas. Két fő része a 46 oldalas *Bevezetés* és a 74 oldalas *Eredmények és következtetések* c. fejezet. Ezeket rövid előszó, célkitűzések, módszer-leírás és összefoglalás, valamint egy terjedelmes hivatkozási jegyzék egészíti ki. Az olvasó tájékozódását segítik a tartalom-, a rövidítés-, valamint az ábra- és táblázat-jegyzékek. A disszertáció lényeges tartozékai még a bevezetésbe és a módszerekbe foglalt 10 magyarázó ábra, és az eredményeket bemutató 50 – többnyire összetett szerkezetű – ábra és 14 táblázat.

Az értekezés témája lényeges és időszerű. Az endoplazmás retikulumban folyó két fontos folyamat mechanizmusait kutatja. Ezek egyrészt az oxidatív fehérjeérést – a fehérjék diszulfid-hídjainak kialakulását – szolgáló mechanizmusok, másrészt pedig az endoplazmás retikulum lumenében a NADPH kínálatát fenntartó és – többek között – a kortizonnak aktív kortizollá történő átalakulását biztosító mechanizmusok. Eredményei valószínűsítik, hogy az oxidatív fehérjeérés zavara következtében kialakuló endoplazmás retikulum stressz (pl. C-vitamin hiányban), valamint a túltáplálás következtében fellépő NADPH és kortizol túlkínálat szerepet játszhat a metabolikus szindróma és a 2-es típusú diabetes kialakulásában, amelyek korunk népbetegségei a fejlett világban. Kísérleteiből az is körvonalazódik, hogy várhatóan milyen irányú farmakológiai beavatkozásokkal befolyásolhatjuk majd kedvezően ezeket a kórfolyamatokat az endoplazmás retikulum szintjén.

A dolgozat szerkezete világos és logikus, kivitele esztétikus. A mondanivaló megfogalmazása olvasmányos, érthető és szemléletes. Stílusa példás. A szerző a komplex jelenségeket és koncepciókat is árnyaltan, az esetleges ellentmondásait feltárva mutatja be. Törekszik az idegen kifejezések elkerülésére és a magyaros írásmódra. Az illusztrációk áttekinthetők, és a tömör ábramagyarázatok ellenére is érthetők. Ugyanakkor az a tény, hogy az értekezés minden eredményét publikálták, lehetővé teszi a módszerek, adatok és értelmezések bővebb megismerését az idézett eredeti közlemények elolvasásával.

### Tartalmi észrevételek és kérdések

1. A bevezetésben szereplő Biotranszformáció című alfejezet néhány állítása elnagyolt. Ilyen pl. hogy a biotranszformáció a xenobiotikumokat kiüríti (44. old. 1-2 sor). Helyesen a biotranszformáció a xenobiotikumokat átalakítva „kémiaiilag” eliminálja. Kiürítés alatt helyesebb exkréciót érteni (amely egy vegyület eliminációjának „fizikai” módja). Lejebb az olvasható, hogy szteroid hormonok hatástalanítása (többek között) glutationnal való konjugációval történik. Ez túlzott általánosításnak látszik, hiszen ez bizonyára csak az ösztrogének ún. katekol-metabolitjaiból képződő kinon-metabolitjaira vonatkozhat.

2. Az 55. oldalon írtakat kiegészítem: A dehidroaszorbátot redukáló enzimek között – a felsoroltakon kívül – megemlíthető még a glutation transzferáz-omega is (különösen a GSTO2-2), amely egy glutation-függő dehidroaszorbát-reduktáz [1].

3. A disszertációban leírt kísérletek aláhúzzák az ER lumenében található hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PD) szerepét a NADPH-kínálat és a kortizon-redukció fenntartásában. Felmerül ugyanakkor a szintén NADPH termelő izocitrát-dehidrogenáz (ICDH) hasonló szerepe is, hiszen éppen a jelölt kollégái mutatták ki, hogy az ICDH is megtalálható a patkány májából izolált ER lumenében [2]. Ezért kérdezem, hogy támogatja-e a mikroszómához adott izocitrát a kortizon kortizollá történő redukcióját – mint ahogy a mikroszómához adott G6P teszi (ld. 108. oldal, utolsó bekezdés). Ha igen, lehet-e a mikroszómális ICDH által támogatott kortizon-aktiválásnak is patobiokémiai jelentősége.

4. A disszertáció 131-141. oldalain a szerző bemutatja, hogy a metirapon és az epigallokatekin-gallát (EGCG) gátolják a kortizon mikroszómális redukcióját kortizollá in vitro. Csala dr. a következő meggyőző magyarázatot kínálja a metirapon gátló hatására: a metirapont a  $11\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (vagy más enzim) metirapollá redukálja; eközben NADPH használdik fel és NADP termelődik, a keletkező NADPH hiány és NADP többlet pedig nem a kortizon redukciójának, hanem a kortizol oxidációjának kedvez. A jelölt azonban (miközben bizonyos mechanizmusokat kizár) nem magyarázza meg az epigallokatekin-gallát kortizon-redukciót gátló hatásának módját. Ezért most erre tesztek kísérletet és azt kérem, hogy Csala dr. irodalmi ismeretei és a vegyülettel folytatott kísérletek tapasztalatai alapján értékelje a következő feltételezett mechanizmust. Az epigallokatekin-gallát egy polifenol, amely oldatban auto-oxidálódni képes, akár már a tesztoldat elkészítésétől kezdve. Az auto-oxidáció egyik terméke az epigallokatekin-gallát kinon formája [3-5]. Kinonokat NADPH-val működő enzimek (pl. az ER-ban lokalizált dehidrogenáz-reduktáz DHRS7 [6]) képesek hidrokinonokká redukálni. Ha az epigallokatekin-gallát oldat valóban tartalmaz kinont is (vagy kinon képződik az inkubáció során), amely az ER-ba jutva (talán az UDP-GA/glukuronid transzporterén át) enzimatikusan NADPH segítségével redukálható, akkor az EGCG alkalmazásakor ugyanaz a következhet be, mint amit a metirapon esetében a szerző joggal feltételez: az epigallokatekin-gallát kinonját egy enzim hidrokinonná redukálja, miközben NADPH használdik fel és NADP termelődik. A keletkező NADPH hiány és NADP többlet pedig nem a kortizon redukciójának, hanem a kortizol oxidációjának kedvez. Kérdésem: Mely érvek cáfolják és melyek támogatják ezt a feltételezett hatásmódot?

5. Az antidiabetikus gyógyszer metformin patkány inzulinóma sejteken csökkentette palmitát-indukált ER-stresszt, és a kapcsolt UPR-jelenségeket (57-60. ábra), valamint az apoptózist (56. ábra). Hiányolom azonban azt, hogy miután a szerző bemutatja a metformin ezen hatásait, nem kínál mechanisztikus magyarázatot (hipotézist), pedig ilyen található az irodalomban. A metformin ugyanis képes aktiválni az AMP-aktivált protein kinázt [7; és a benne lévő hivatkozások]. Ez magyarázza részben a metformin kedvező hatását cukorbetegségben, hiszen így a szer mérsékli a glukóztermelést – mégpedig egy represszor fehérje (az SHP) indukcióján át – fontos enzimek (PEPCK, G6Páz) expressziójának csökkentésével (lásd a hivatkozott cikket). Másrészt, az AMPK aktiválása az mTOR-kinázon keresztüli jelátvitel lassulásával jár, ami csökkenti fehérjék transzlációját az ER-ban és növeli az időlegesen tápanyagkínálatot biztosító autofágiát a sejtben. Feltehető, hogy az utóbbi effektusok – amennyiben metformin hatására bekövetkeznek a patkány inzulinóma sejtekben

is – magyarázhatnák a gyógyszernek az értekezésben bemutatott, ER-stresszt és apoptózist mérséklő hatásait. Kérem a jelöltet, hogy elemezze ezt a felvetést és azt szembesítse támogató, vagy éppen cáfoló kísérleti megfigyeléseivel, ha vannak ilyenek.

### **Formai észrevételek**

1. Az elírások és elütések száma minimális; ilyen csak a következő 7 helyen találtam.

- 34. old., 9. sor: „megtalálható” helyett megtalálhatók
- 109. old., 2. bek.: „glukóz-6-oszfatáz-β” helyett glukóz-6-foszfátáz-β
- 113. old., 3. sor: „glutation-dehidrogenáz” helyett „glutation-reduktáz”
- 118. old., 2. sor: „NAD<sup>+</sup>-specifikus glukóz-6-foszfátáz” helyett NAD<sup>+</sup>-specifikus glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz
- 140. old.: Az 55. ábra címe nem teljes; hiányzik belőle az EGCG említése
- 144. old.: Az 58. ábra alatti §§§ és \*\*\* jelek nem szerepelnek az ábrában
- 181. old.: a 331. hivatkozás címébe furcsa karakterek kerültek.

2. A 362 tételes irodalomjegyzékben a szerző egységes tipográfiát követ a folyóiratok rövidített címének formázásában egészen a 120. hivatkozásig. Azután azonban ezt a dicséretes fegyelmet feladja; nem néhányszor, hanem legalább 100-szor. Így például a Journal of Biological Chemistry nem csak szokásosan rövidítve fordul elő (mint pl. a 14. hivatkozásban), de teljes néven is, de úgy is két változatban (lásd pl. a 177. és 272. hivatkozásokat). Más esetekben a folyóirat hosszú alcíme is követi a címét (pl. a 196., a 218. és a 283. cikkekben). Kár volt az egyébként szép és a gyakorlatilag hibátlan kiállítású munkában ilyen könnyen elkerülhető éktelenségeket hagyni!

### **Az értekezés új tudományos eredményei**

Az értekezés számos új publikált eredményt mutat be. Ezek közül több megerősíti és kiegészíti a szakirodalomban olvasható teóriákat – pl. az oxidatív fehérjeérés mechanizmusáról, valamint a glukóz-6-foszfát transzporter – hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz – 11β-hidroxiszteroid-dehidrogenáz által alkotott triád összekapcsolt működéséről. Ezért itt csak a legfontosabb új eredményeket emelem ki.

1. Az értekezés bemutatja, hogy az ER lumenében a tiol-diszulfid redox rendszer viszonylag oxidált, a NADPH-NADP redox rendszer pedig döntően redukált állapotban van. Az oxidatív fehérjeérés és a NADPH-igényes kortizon-redukció folyamatai metabolikusan elkülönültek, egymást nem befolyásolják. A két rendszer funkcionális elválasztását az biztosítja, hogy az ER-ban nem található meg a glutation-reduktáz enzim.

2. Dr. Csala Miklós és munkatársai kísérleti eredményeik alapján kidolgoztak egy modellt az aszkorbát szerepéről az oxidatív fehérjeérésben. Eszerint az aszkorbát az ER-hoz kívülről kapcsolódó aszkorbát-oxidáz hatására dehidroaszkorbáttá oxidálódik, majd az ER-ba transzportálódva, a protein-diszulfid izomeráz (PDI) oxidálásával támogatja a fehérje-tiolok oxidációját diszulfidokká. Az ER külső felszínén végbemenő aszkorbát-oxidáció reaktív-oxigén intermedierek képződésével is jár. Ezek az intermedierek (ROS) az ER lipid-

membránjába oldott  $\alpha$ -tokoferol (E vitamin) közvetítésével hozzájárulnak a fehérjeterhelés aszkorbát által előidézett oxidálódásához az ER lumenében.

3. A jelölt bemutatja, hogy a skorbutossá tett (aszkorbihiányos) tengerimalacok májában ER-stressz alakul ki, feltehetően azért, mert aszkorbát hiányában az oxidatív fehérjeérés zavart szenved, az éretlen fehérjék pedig kiváltják az unfolded protein response (UPR) jelenségét, és ehhez kapcsolatosan a májsejtek apoptózisát. Klinikai vizsgálataik szerint 2-es típusú cukorbeteg aszkorbinsav kezelése mérsékelte a glikált hemoglobin arányát a vérben, ami a diabéteszes állapot javulásának egyik jelzője. Kérdés marad azonban, hogy ez a hatás netán az aszkorbátnak az inzulin-termelő  $\beta$ -sejtekben kifejtett, az ER-stresszt esetleg enyhítő effektusával hozható-e összefüggésbe.

5. A szerző demonstrálja, hogy patkányok éheztetése jelentősen csökkenti a májuktól preparált mikroszómában a NADPH koncentrációját, illetve a NADPH/NADP arányát, támogatva ezzel azt a következtetést, hogy a mikroszómális NADPH-kínálat a tápanyag-bevitel függvénye. Ezzel összhangban, éhezés hatására csökkent a kortizonnak a hormonálisan aktív kortizollá történő mikroszómális redukciója, amelyet a NADPH-igényes  $11\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz katalizál. Ez a fontos megfigyelés támogatja azt a nézetet, hogy az ER NADPH-képző rendszere – a glukóz-6-foszfát transzporter és a hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PD) – tápanyagszenzorként működik, amely szabályozza a kortizol képződését.

6. Csala dr. és társai azt is kimutatták, hogy a táplálékkal bevitt fruktóz is – fruktóz-6-foszfáttá alakulva – NADPH túlkínálatot okozhat az ER lumenében, ami különösen a zsírszövetben növelheti a kortizon redukcióját. A fruktóz-6-foszfát ugyanis nem csak glukóz-6-foszfáttá izomerizálódva, a glukóz-6-foszfát transzporter közvetítésével juthat az ER-ba, hanem egy – a jelölt és munkatársai által – igazolt (de eddig nem azonosított) saját fruktóz-6-foszfát transzporterrel is. Bár a fruktóz-6-foszfát transzporter a májmikroszómában lassan működik a glukóz-6-foszfát transzporterhez képest, a zsírszöveti mikroszómában sebessége megközelíti a glukóz-6-foszfát transzporterét. Azt is igazolták, hogy az ER lumenében a fruktóz-6-foszfát egy lumenális (de még nem azonosított) izomeráz hatására alakul át glukóz-6-foszfáttá. Ez aztán a hexóz-6-foszfát-dehidrogenázt működtetve NADPH képződést biztosít a  $11\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz által katalizált kortizol képzéshez, az így fokozódó glukokortikoid-hatás pedig hozzájárulhat az elhízás és az inzulinrezisztencia kialakulásához.

7. Két sejttípust tanulmányozva, a jelölt és szerzőtársai megállapították, hogy a sejtek zsírsejteké történő differenciálódása során megnő a kortizoltermelő kapacitásuk exogén kortizonból. Megállapították, hogy ez a  $11\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz gén fokozott transzkripciójával magyarázható, ami a kódolt enzimprotein nagyobb mértékű képződését eredményezi.

8. Megállapították, hogy a kortizon kortizollá történő mikroszómális redukciója (amely a 2-es típusú diabétesz és a metabolikus szindróma kialakulását és progresszióját előmozdító káros folyamat) gátolható két vegyülettel; ezek a metirapon és az epigallokatekin-gallát (EGCG). Egyidejűleg ezek a szerek fokozzák a kortizol oxidációját kortizonná. Kimutatták, hogy mindkét vegyület úgy hat, hogy növeli a NADP kínálatát a NADPH-kínálat rovására.

9. Egér inzulinóma sejteken a jelölt bemutatta, hogy a hosszú szénláncú telített zsírsav – a palmitát – ER-stresszt és ennek következtében UPR jelenséget és apoptózist kelt. Az így

előidézett (lipotoxicitásnak nevezett) sejtkárosodás legtöbb mutatóját az antidiabetikus gyógyszerként használt metformin mérsékelte vagy normalizálta.

### **Állásfoglalás**

Értékelésem szerint a doktori munka tudományos eredményei feltétlenül elegendőek az MTA doktori cím megszerzéséhez. Javaslom a nyilvános vita kitűzését, és amennyiben a vitában a jelölt kielégítő módon válaszol a felmerülő kérdésekre és kifogásokra, támogatom az MTA doktora cím odaítélését.

Pécs, 2016. január 28.



Dr. Gregus Zoltán  
egyetemi tanár  
az MTA doktora

### **Hivatkozások**

- [1] Board PG: The omega-class glutathione transferases: structure, function, and genetics. *Drug Metabol Rev* 43: 226–235, 2011.
- [2] Margittai E and Bánhegyi G: Isocitrate dehydrogenase: A NADPH-generating enzyme in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 471: 184-190, 2008.
- [3] Hou et al.: Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. *Cancer Res* 65: 8049-8056, 2005.
- [4] Sang et al.: Autoxidative quinone formation in vitro and metabolite formation in vivo from tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: studied by real-time mass spectrometry combined with tandem mass ion mapping. *Free Radic Biol Med* 43: 362-371, 2007.
- [5] Ishii et al.: Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate through autoxidation. *Free Radic Biol Med* 45: 1384-1394, 2008.
- [6] Stamberгова et al.: Biochemical properties of human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7. *Chem Biol Interact* 207: 52-57, 2014.
- [7] Kim et al.: Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes* 57: 306-314, 2008.