

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Az obezitás patomechanizmusa során
megváltozott koleszterin- és kalciumháztartás
vizsgálata monocitákban**

Padra János Tamás

Témavezető: Dr. Paragh György



DEBRECENI EGYETEM
Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2012

Az obezitás patomechanizmusa során megváltozott koleszterin- és kalciumháztartás vizsgálata monocitákban

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az egészségtudományok tudományágban

Írta: Padra János Tamás okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok doktori iskolája
(Anyagcsere és endokrin betegségek programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Paragh György, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Ilyés István, az MTA doktora
Dr. Reiber István, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2012.11.12 11 óra
DEOEC I.sz. Belgyógyászati Klinika könyvtár.

Az értekezés bírálói:

Dr. Bay Péter, Ph.D.
Dr. Márk László, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Ilyés István, az MTA doktora
Dr. Reiber István, Ph.D.
Dr. Bay Péter, Ph.D.
Dr. Márk László, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2012.11.12. 12:30
DEOEC I.sz. Belgyógyászati Klinika tanterme.

BEVEZETÉS

Jelenlegi ismereteink szerint az elhízás a metabolikus szindróma kialakulásának egyik mérföldköve. Emellett az elhízás egyike a kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás legelterjedtebb kockázati tényezőinek, köszönhetően a magas vérnyomással, II-es típusú diabétesz mellitusszal és hiperkoleszterinémiával való szoros összefüggésének. Az obezitás általában hosszú idő alatt, sok esetben az évtizedek során fejlődik ki. Ennek ellenére néhány, az elhízásra jellemző, metabolikus abnormalitás már a betegség korai szakaszában kimutatható és jelei láthatók a mérsékelt súlytöbblettel rendelkező betegeken is. Ennek hatására számos tanulmány foglalkozott a túlsúlyos betegek emelkedett kardiovaszkuláris kockázatának vizsgálatával. Az obezitás központi szerepe a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában részben az adipocita eredetű adipokineknek tulajdonítható, amelyek részt vesznek az elhízással összefüggő metabolikus szindróma kialakulásában. Az adipokinek a citokin szupercsalád tagjai, közöttük a leptin, képesek a mevalonát ciklus működésének intenzitását fokozni, ami emelheti a koleszterin bioszintézisének mértékét. Az emelkedett leptin koncentrációnak azonban nem egyedüli következménye a mevalonát ciklus és vele együtt a koleszterinszintézis fokozódása. Párhuzamosan a sejtmembrán összetétele is változik, amely befolyásolja a membráncsatornák működését. Neutrofilekben, szabad koleszterin hatására a kalcium sejtbe áramlásának csökkenését találták. Adipocitákban, a sérült ATP- és kalmodulin-dependens H^+/Ca^{2+} antiport hatására az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ szintje folyamatosan emelkedett lesz. Ez az állapot a lipogenezis fokozódásának és a lipolízis csökkenésének kedvez. Ezek a folyamatok a zsírszövet jelentős növekedéséhez vezetnek, tükrözve az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ szerepét az obezitás patomechanizmusában. Másfelől a szabadgyök képződés károsítja a membránon keresztüli

iontranszportot a Na^+/K^+ -ATPáz, a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ csere protein és az ATP-függő $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiport proteinek közvetlen károsításával. Obezitásban a leptin overexpressziója, a hosszú transzmembrán doménnel rendelkező leptin receptorokon keresztül, stimulálja a NADPH oxidázt és számos sejt szuperoxid termelését fokozza. In vitro kísérleteikben Franzoni és mtsai bemutatták, hogy a sztatinoknak saját antioxidáns aktivitásuk van. Ezen kívül feltételezték, hogy a fluvasztatin hiperkoleszterinémiás betegekben gátolhatja a NADPH oxidázt az adiponektin fokozott termelésén keresztül. A NADPH oxidáz gátlása a szuperoxid anion csökkent képződését okozza.

Vizsgálatainkat a kutatócsoportunk által hiperkoleszterinémiás betegek monocitáinak felhasználásával elért korábbi kutatási eredményeknek folytatásaként végeztük, Doktori Értekezésem e munkákon alapul. Korábbi kísérleteink a cPKC fontosságát emelik ki a koleszterin bioszintézisét reguláló tényezők közül és rámutatnak az egészséges és hiperkoleszterinémiás egyének véréből szeparált monociták kalcium homeosztázisának különbségeire. Feltételezésünk szerint a leptin azon faktorok egyike, amely túlsúlyos személyek monocitáiban a Ca^{2+} szintjének emelkedéséért felelős. Elméletünk alátámasztásához tanulmányoztuk a leptin hatását humán monocitákon, vizsgáltuk a leptin-indukált bifázikus koleszterin szintézist, valamint a szuperoxid anion képződés és a sejten belüli szabad Ca^{2+} kapcsolatát normál testsúlyú és túlsúlyos egyénekből származó monociták (K és TS monociták) leptin kezelését követően. Továbbá elemeztük mindkét monocita csoportban a Ca^{2+} szignálok eredetét. Végül, hogy tisztázzuk a szuperoxid anion képződésének szerepét a sejten belüli szabad Ca^{2+} egyensúlyának felborulásában, a sejtszuspenzióhoz fluvasztatint adva így gátoltuk a NADPH oxidáz aktivitását.

A koleszterinszintézis regulációjában résztvevő molekulák és gátlószerek

MAPK és PD98059

A leptin által kiváltott jelátviteli útvonalak között található a kanonikus MAPK/ERK1/2 útvonal és a nem kanonikus p38 MAP kináz útvonal. A kanonikus MAPK-kaszkádnak a Ras-ERK-MAPK útvonalon aktiválódik és a sejtmagba jutva a génexpresszió regulációjával számos biológiai folyamatot szabályoz. A legújabb kutatások a MAPK kaszkád szerepét bizonyították az egér preadipociták kalcium-indukált lipid metabolizmusában és a makrofágok koleszterin-észter felhalmozásában, mellyel az atheroszklerózis kezdeti lépéseként habos sejtekké alakulnak. Calleros és mtsai a nukleáris faktor- κ -B (NF κ B) transzkripció aktivitásának intracelluláris koleszterinfüggő változásában a p38 MAPK/MSK1 mediátor szerepét mutatták ki. A p38 MAPK útvonal NF κ B aktiváló hatása, köszönhetően részben a mevalonát bioszintézis gátlásának, fluvasztatinnal csökkenthetőnek bizonyult. A MAPK kaszkád tehát fontos szerepet játszik a koleszterin homeosztázis fenntartásában és a gyulladásos folyamatokban.

A MAPK fehérjéknek, az ERK1-nek és ERK2-nek, aktivációjáért a mitogén-aktivált protein-kináz kináz (MEK) foszforiláló hatása felelős. A PD98059 egy flavonoid molekula, amely a MEK-et specifikusan gátolja. Ez a tulajdonsága a növekedési faktor útvonalak és az ER mediált események közötti kapcsolatok feltárásában nyújt segítséget. Továbbá széles körben alkalmazzák a MAPK kaszkád tagjai biológiai folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatára. Rendkívüli hasznossága oldhatóságából, (MEK-vel szembeni) specifitásából és abból a képességéből fakad, hogy a sejtmembránon keresztül szabadon képes átmenni.

SCAP és 25-HC

A koleszterinháztartás fenntartása a koleszterinszintézisért és felvételért felelős gének transzkripciószabályozásán keresztül valósul meg. Ennek egyik központi eleme a „sterol regulatory element binding protein” (SREBP) család. Az SREBPk az ER-ben szintetizálódnak és aktivációjukért a SREBP cleavage activating protein (SCAP) a felelős. A SCAP-nak kettős szerepe van: szterol szenzorként működik és az SREBP szállításáért felel. Az SREBP-t a Golgi apparátusba szállítja, ahol az aktiválódik és a magba jutva befolyásolja a koleszterinszintézisben és felvételben szerepet játszó gének transzkripcióját.

Ha a sejtben a koleszterin mennyisége nő, akkor az a SCAP-SREBP-komplexhez kapcsolódik, a komplex konformációja megváltozik melyet az Insig-1 vagy Insig-2 protein további bekötődése követ. Ebben az esetben a koleszterin feed-back regulátor hatása miatt az SREBP regulátor feladatát nem tudja ellátni.

A koleszterinszintézis transzkripciószabályozásának gátlása történhet 25-hidroxikoleszterinnel (25-HC), ami a koleszterinnel ellentétben a SCAP-ban nem okoz konformációváltozást, de a 25-HC szenzor proteinen keresztül elősegíti a SCAP-Insig protein kapcsolat kialakulását.

A kalcium homeosztázis fenntartása

A monociták a Ca^{2+} -t az ER specifikus raktározó fehérjeihez kötve tárolják, amit szükség esetén a citoplazmába juttatnak. Az ER-ből a Ca^{2+} ionok receptor- Ca^{2+} csatornákon kerteszüln lépnék ki a citoplazmába. A citoplazma Ca^{2+} koncentrációjának ezt követő emelkedése pozitív visszacsatolási folyamatként kiváltja az organellel Ca^{2+} csatornáinak további megnyílását: „ Ca^{2+} indukálta

Ca²⁺ felszabadulás” jön létre. Az ER-ban fellépő kalciumhiány megszüntetésére a sejt kalciumcsatornáinak megnyitásával és az extracelluláris Ca²⁺ beengedésével törekszik. Ezt a kiegyenlítő folyamatot „raktár által vezérelt kalcium belépés”-nek (SOCE) nevezzük.

A citoplazmából a feleslegben jelen lévő kalcium útja az extracelluláris tér vagy az ER felé vezet. A Ca²⁺ kipumpálásáért a citoplazmából az extracelluláris térbe egy Na⁺/ Ca²⁺ antiporter és egy kalmodulin függő Ca²⁺ ATP-áz pumpa felel. Ez utóbbi aktivitását az intracelluláris Ca²⁺ szint egy citoplazmatikus fehérje, a kalmodulin közvetítésével szabályozza. A Ca²⁺-kalmodulin komplex a Ca²⁺ pumpa citoplazmatikus szabályozó régiójához kapcsolódik, és az enzim működési sebességét növeli, ezáltal kipumpálva a citoplazmában „feleslegben” jelen lévő kalciumot. Ezen kívül a citoplazmába kiáramlott Ca²⁺-ból a kiürült intracelluláris Ca²⁺ raktárak az organellum membránban lokalizált Ca²⁺ pumpa révén töltődnek fel újra.

A kalcium jelátvitelben szerepet játszó molekulák és gátlószerek

Membráncsatornák és verapamil

A verapamil egy fenilalkilamin, melyet a gyógyászatban többek között a hipertónia és a szívritmuszavar kezelésére használnak. A verapamil a feszültségfüggő Ca²⁺- csatornák inhibitora, melyek közül az „L-típusú” nagyobb hatékonysággal blokkolja, mint a „T-típusú”. Az előbbi esetében az „L” a csatorna hosszan tartó – „long-lasting” – aktivációjára utal, az utóbbinál pedig a „T” a tranziens aktivációt jelenti. A depolarizált ioncsatornákat a nyugvó csatornához képest nagyobb aktivitással blokkolja. Ez a jelenség kifejezettebb az L-típusba tartozó csatornáknál, ahol a

depolarizált csatornák gátlása tízszeresen meghaladja a nyugalmi csatornákét. Gátló hatását feltételezhetően a csatorna pórusához feszültség-függetlenül kötődve, annak elzárásával fejt ki. Így az ioncsatorna membránpotenciál változásaira nem hat és a normál kapuzási folyamatokat nem.

Gi protein és pertusszis toxin

A G protein kapcsolt receptorok (GPCR) egy 7-transzmembrán szakaszból álló monomer fehérjéből és a hozzá kapcsolódó valamelyik heterotrimer (α -, β - és γ - alegységből álló) G fehérjéből felépülő receptorok. A receptorok G fehérje alegysége a sejtmembrán citoplazma felőli oldalán található. A G proteinek a jelátviteli rendszerek szabályozásában fontos szerepet játszó guanin nukleotid regulátor proteinek, amiket α -alegységeik alapján különböző családokba sorolunk. A Gi/o protein családba tartozó G proteinek az adenilát-cikláz gátlása révén csökkentik a cAMP képződését és annak következményeként a kalcium felszabadulását az endoplazmatikus retikulumból.

A Gi/o proteint és a kalcium jelátvitelre gyakorolt hatását pertusszis toxin (PTX) kezeléssel kíséreltük meg gátolni. A PTX egy ADP-ribozil-transzferáz aktivitással rendelkező molekula, ami a Gi/o fehérjecsalád α alegységének ciszteinjét irreverzibilisen ADP-ribozilálja és az adenilát-cikláz (AC) gátlását akadályozza meg. A PTX kezelés tehát a cAMP képződését hivatott serkenteni. Az Epac (exchange protein directly activated by cAMP) molekulacsalád közvetlen módon köti a cAMP-t, ami calmodulin kinase II (CaMKII)-függő jelátviteli útvonalakat indít be, közöttük a Ca^{2+} felszabadulását az endoplazmatikus retikulumból. Annak bizonyítása, hogy a PTX aktiválja az Epac-mediált CaMKII jelátviteli útvonalat, még további vizsgálatokat igényel. PTX kezeléssel a Gi/o protein szerepvállalását vizsgáltuk monociták kalcium viszonyainak és koleszterin szintézisének regulációjában.

Foszfatidilinozitol-3-kináz és wortmannin

A PI3K-ok regulátor/adapter és katalitikus alegység szoros kapcsolatából álló heterodimer komplexek, melyek foszfatidilinozitolok 3-hidroxilcsoportjának foszforilációján keresztül a sejtek számos funkcióját szabályozzák, mint pl. a glükóz- és fehérjeszintézist. A PI3K-hoz kötődő jelátvitelt több hormon és növekedési faktor indukálja így pl. a leptin és az inzulin jelátvitel egyik közös pontját képviseli. Az inzulin receptorának aktivációját az inzulin receptor szubsztrát -1 és -2 (IRS-1 és IRS-2) foszforilációja, majd a PI3K-kal történő gyors asszociációja követi. A kapcsolat következménye a PI3K komplex aktivációja, amely lehetővé teszi a foszfatidilinozitolok foszforilációját: fő szubsztrátja a PIP2, amelyet foszfatidilinozitol (3,4,5)-triszfószfáttá (PIP3) alakít. A leptin receptor aktiváció hatására létrejövő jelátvitel a JAK2/STAT3-on keresztül megy végbe. A PIP3 másodlagos hírvivőként az intracelluláris folyamatokra olyan szignál molekulák közreműködésével hat, mint pl. az Akt vagy a foszfoinozitid-dependens kináz-1 (PDK-1). Inzulin, leptin és növekedési faktorok hatására nem-receptor tirozin-kinázok, mint a Janus tirozin-kináz család, és adapter fehérjék, mint a GRB-2 (growth factor receptor-bound protein 2) is PI3K jelátvitelt indukálnak. Az aktiválás lehetőségeinek nagy száma és a más jelátviteli útvonalakkal (pl. Ras/MAPK útvonal) való kereszteződéseknek köszönhetően a PI3K sok biológiai folyamat szabályozásában vesz részt.

A PI3K gátlásához az egyik széles körben alkalmazott vegyület egy wortmannin (WMN) nevű gomba eredetű toxin, amely az enzim katalitikus alegységéhez kovalensen kötődik és meggátolja a PIP2 és az ATP enzimhez kötődését.

Fosfolipáz C és neomycin

A foszfoinozítid specifikus PLC izoenzimek több doménből felépülő 85-150 kDa molekulatömegű fehérjemolekulák, melyek az inozitol foszfolipidek poláris feji részét hasítják le. Sejtfelszíni receptorok irányító hatására a lipid kettősrétegben helyet foglaló PIP2 hidrolízisével Ins (1,4,5)P3-t és diacilglicerolt (DAG) képeznek. G-fehérjéken keresztül a PLC- β izoforma aktiválódik, tirozin-kináz receptorok közreműködésével pedig a PLC- γ . A PLC izoenzimek foszforilációjukat követően a membránba vándorolnak, ahol a szubsztrátjuk található és Ins (1,4,5)P3-t és DAG-ot állítanak elő. Az Ins (1,4,5)P3 a Ca^{2+} mobilizálásában részt vevő másodlagos hírvívó molekula a DAG pedig a PKC.

A neomycin egy aminoglikozid antibiotikum, ami az inozitol foszfolipidekkel kötődve képes a PLC-t gátolni. A PIP2-hoz nagy affinitással kötődik ezért a PLC-t akadályozza az Ins(1,4,5)P3 és a DAG előállításában.

Inozitol triszfoszfát

A PLC hatására képződő Ins(1,4,5)P3 szabályozó szerepet játszik az intracelluláris kalcium homeosztázis fenntartásában. Receptorai a sejten belüli kalcium raktárak (endoplazmatikus retikulum, kiválasztó vezikulumok) felszínén találhatóak. Az Ins(1,4,5)P3 kötődése az ER felületén található klaszterekbe rendeződött receptorokhoz az intracelluláris kalcium raktárak gyors kiürülését eredményezi, majd disszociációja a csatornáról a Ca^{2+} szignál terminációját hozza létre. Az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak ürülése a citoplazma Ca^{2+} koncentrációjának emelkedésével jár, ami a plazmamembrán Ca^{2+} ATPáz-át aktiválja. Az aktivációt követően a Ca^{2+} ATPáz a citoplazmában feleslegben lévő Ca^{2+} -t az extracelluláris térbe pumpálja. Ezzel ellentétesen hatva a raktárban fellépő kalcium koncentrációcsökkenést a sejtmembránon keresztül történő Ca^{2+} beáramlás pótolja. Az ER-ben található Stim1 protein érzékeli az ER kalcium raktárának ürülését és a sejtmembránhoz vándorolva a raktár által vezérelt kalcium csatornák pórúsát kialakító

Orai proteinek aktiválják, ami szükséges a csatorna kinyílásához és a kalcium belépéséhez. Ezt raktárak által vezérelt Ca^{2+} belépésnek nevezzük. Néhány, az utóbbi időben megjelent tanulmány azonban nagyobb jelentőséget tulajdonít a raktár által vezérelt csatornákon keresztül történő Ca^{2+} belépésének az azt követő kalcium jelátviteli folyamatok aktiválásában.

Intracelluláris kalcium transzlokáció és thapsigargin

A thapsigargin (TG) egy szeszkviterpén lakton, amelyet az ernyősvirágzatú *Thapsia garganica* növény gyökeréből nyernek. A TG nagyon hatékony és specifikus gátlója az intracelluláris Ca^{2+} ATPázoknak, azokkal egy ún. „dead-end” komplexet, zsákutca komplexet alkot, lehetetlenné téve a további katalízist. Ennek következménye az intracelluláris Ca^{2+} raktárak kiürülése és a citoszolikus Ca^{2+} szint megnövekedése.

A TG felfedezése és alkalmazása a kutatásban jelentősen megkönnyítette a kalciummal kapcsolatba hozható celluláris folyamatok vizsgálatát, így például a Ca^{2+} citoszolba kerülésének módját. Alkalmazásával lehetővé vált a PLC látható hatásának kizárása a Ca^{2+} belépésére a citoszolba. Továbbá az a tény, hogy a TG a kalcium beáramlását ugyanolyan mértékben aktiválta, mint a PLC (az inozitol triszfoszfát emelése nélkül), azt támasztotta alá, hogy az endoplazmatikus retikulum nem az egyedüli forrása a citoszolikus Ca^{2+} -nak: a sejtmembránon keresztüli beáramlás ugyanolyan fontos szerepet játszik.

A TG fontossága a Ca^{2+} raktár által vezérelt belépésének vizsgálata során az egyéb befolyásoló tényezők hatásának minimalizálása (receptorok, G-proteinek, PLC stb.).

Proteinkináz C

A PKC izoenzim családba szerin/treonin kinázok tartoznak. Az enzimes család tagjai a klasszikus (α , β I, β II, γ), az új típusú (ϵ , δ , θ ,

η) és az atípusos (ζ, λ/ι) izoformák. Az első csoport tagjai mind a kalcium mind a DAG hatására aktiválódnak, az új típusú PKC-k csak a DAG-ra érzékenyek, az atípusosak pedig ezek közül egyikre sem.

A PLC hatására a PIP₂ hidrolizálódik, aminek következménye a DAG képződése és az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedése. Az inaktív, citoszolban található klasszikus PKC molekulák ezeknek a másodlagos hírvivőknek a hatására a sejtmembránhoz transzlokálódnak, kihorgonyozódnak és konformációjuk megváltozik. A membrán foszfatidilszerinjéhez kötődő aktív PKC a fehérjék szerin és treonin oldalláncait széles szubsztrátspecifitással foszforilálja. A monociták több PKC izoformát is expresszálnak, ezek között van a PKCα, PKCβI, PKCβII, PKCδ, PKCε, és a PKCζ.

NADPH oxidáz (Nox)

A NADPH oxidázok többkomponensű enzimek, melyek a NADPH-ról származó elektronokat használják szuperoxid anion termeléséhez. A képződő szuperoxid anionból ezt követően különböző enzimek katalizáló hatásának eredményeként számos reaktív oxigén gyök (ROS) jön létre, melyek elsődleges szerepe az immunvédekezésben van.

Nyugvó monocitákban a Nox rendszer inaktív: komponensei a citoszolban és a membránban elkülönülten helyezkednek el. Aktiváló hatásra a citoszolban található elemek a membránba vándorolnak és összeszerelődnek a membránban található alkotórészekkel. A létrejött asszociátum az aktív enzim, amely a szuperoxid anion képződését katalizálja.

Korábbi tanulmányokban bizonyították, hogy a monociták lipid oxidáló képességére – amely egy szuperoxid anion-függő esemény – a kalcium sejtbe áramlása és az intracelluláris kalcium mobilizációja nagy hatással van. Az intracelluláris Ca²⁺ szint változása más jelátviteli útvonalakat is nagymértékben befolyásol,

pl. a kalciumfüggő PKC és a citoszolikus foszfolipáz A2 (cPLA2) útvonalakat. Az emelkedő intracelluláris $[Ca^{2+}]$ által aktivált cPLA arachidonsav (AA) képzésén keresztül képes a monociták és makrofágok Nox aktivitásának regulációjára. A cPLA és a PKC-k egymástól nem független módon hatnak a NADPH oxidázra. A cPLA működését a kalciumon kívül a PKC foszforiláló hatása is szabályozza. A PKC-k a MAPK család tagjait képesek aktiválni, melyek szerepe bizonyított a Nox-ból származó ROS indukált jelátviteli útvonalakban. A ROS és a MAPK szoros kapcsolata annak is köszönhető, hogy a MAPK közvetlen módon tudja befolyásolni a Nox ROS-termelését. A ROS szintjének emelkedése egy önerősítő kaszkádfolyamatot indíthat be, amely magas ROS koncentrációt eredményezhet.

A kalcium és Nox kapcsolata nem egyoldalú: nem csak az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ emelkedése hat a Nox aktivitására, hanem ennek fordítottja is igaz: a Nox hatására keletkező ROS aktiválja a rianodin receptorokat (RyRs), melyek az Ca^{2+}_i mobilizációjának fő aktivátorai közé tartoznak.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatócsoportunk a korábbi kísérletei során granulociták és monociták jelátviteli folyamatait tanulmányozta. Monociták in vitro LDL-kezelésével sikerült az endogén koleszterin szintézis PKC aktivációtól függő regulációját bemutatni. Hiperkoleszterinémiás betegek neutrofiljeinek Angiotenzin-II indukált O_2^- képzésére és a jelátviteli folyamatok elváltozásaira a fluvasztatinnal történő kezelés jótékonyan hatott. Monociták in vitro leptin kezelése emelte azok endogén koleszterol szintézisének mértékét; az emelkedés nagyobb volt hiperkoleszterinémiás (HC) betegek monocitáin. A leptin stimulált monociták koleszterin szintézisét a fluvasztatin és a 25-HC csökkentette. Hiperkoleszterinémiás betegek neutrofiljeiben a PTX-

szenzitív Ins(1,4,5)P3 jelátvitel hibásan működött és a Ca^{2+} szignál lecsökkent. Emellett a betegek sejtjeiben a Ca^{2+} szignálok az extracelluláris médiumból, nem pedig intracelluláris raktárakból származtak, mint ahogy azt a kontroll neutrofilekben láttuk. Továbbá lecsökkent Ca^{2+} szignálok és azok késleltetett visszatérését figyeltük meg idős egyének monocitáiban FMLP (N-formil-metionil-leucil-phenilalanin) és κ -elastin kezelést követően. Ezen kívül azt találtuk, hogy az öregedés megemelte a monociták $^{45}\text{Ca}^{2+}$ izotóp felvételét, de a Ca^{2+} kiáramlása a sejtekből lassabb volt, mint kontroll monocitákban.

A dolgozat elsődleges célja a túlsúlyos állapotban megváltozott működésű monociták jeltovábbítási rendszerének átfogó megismerése volt. Munkám során, a kutatócsoportunk korábbi eredményeire alapozva, az alábbi vizsgálatok elvégzését tűztem ki célul:

- eddigi kísérleteinktől eltérően a leptin kezelés, és annak hatására bekövetkező jelátviteli folyamatban tapasztalt változásokat túlsúlyos, de egészséges férfiakon is vizsgálni akartuk;
- különböző leptin koncentrációkat használtunk, feltételezve az azokhoz tartozó koleszterinszintézist szabályozó jelátvitelbeli eltéréseket, a leptinhez kapcsolódó szabályozás részletesebb megismeréséhez gátoltuk a SCAP-ot és a MAPK-t;
- feltételeztük a membránhoz kötött PKC (mPKC) szerepét a leptinkezelést követő koleszterinszintézis szabályozásában, ezért a $[^{14}\text{C}]$ acetát beépülése mellett annak szintjét is mértük;
- az intracelluláris kalciumnak, mint a leptinhez kötődő jelátvitel kulcsfontosságú hírvivőjének, szintjét és transzlokációját az ER felé tartó kaszkád egyes tagjainak és a membrán kalciumcsatornáinak gátlásával térképeztük fel;

- a NADPH oxidáz aktivitását a O_2^- kalcium pumpák működésére gyakorolt hatása és az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ Nox-ra gyakorolt hatása miatt vizsgáltuk;
- fluvasztatinnal a O_2^- -képződés csökkentését céloztuk meg, amitől a membráncsatornák és a jelátvitel normalizálódását vártuk.

A VIZSGÁLATBA BEVONT SZEMÉLYEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgált személyek

A kísérleteket 16 normál testsúlyú és 18 túlsúlyos, egészséges férfin végeztük. Kizárólag férfiak bevonása a kísérletekbe lehetővé tette a nemek közötti különbségek hatásának kizárását.

Laboratóriumi paraméterek meghatározása

A vérmintákat (10–15 ml) a méréseinkhez 4-5 naponta 6-8 túlsúlyos és 3-4 kontroll önkéntes vénájából vettük. Az érdeklődő variációs koefficiens nem haladta meg a 15%-ot. A szérumban a koleszterin és triglicerid szintek mérését enzimatikus úton, kolorimetriás tesztekkel végeztük (GPO-PAP, Modular P-800 Analyzer, Roche/Hitachi), míg a HDL-koleszterint homogén, enzimatikus, kolorimetriás méréssel határoztuk meg (Roche HDL-C plus 3rd generation). Az LDL-koleszterint homogén, enzimatikus, kolorimetriás módszerrel mértük (Roche LDL-C plus 2nd

generation). Az apolipoprotein vizsgálata immuno-turbidimetriás méréssel történt (Roche Tina-Quant APO A (Version 2), Tina-Quant APO B (Version 2), Roche Ltd). A leptin koncentrációját a szérumban kompetitív enzim immunoassay-vel mértük (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA)

Monociták izolációja

A monocitákat vénás vérből izoláltuk Boyum módszere szerint. A mononukleáris sejt szuszpenziókat (90 mm átmérőjű) Nunc petricsészékbe helyeztük, fetal calf serum-mal kezeltük elő, majd ezt követően Kumagai és mtsai módszere szerint tovább szeparáltuk. Végül, a kapott sejtsuszpenzió 93-96%-os tisztaságban tartalmazott monocitákat, és az élő sejtek aránya 90-95 % volt.

Kísérleti körülmények

A monocitákat HBSS-ben szuszpendáltuk fel. A monociták stimulációja az endogén koleszterinszintézis és PKC vizsgálata során 1–500 ng/ml végkoncentrációjú leptin (Sigma) adagolásával történt. A monociták intracelluláris kalcium homeosztázisának és NADPH-oxidáz aktivitásának vizsgálatához 50 ng/ml végkoncentrációjú leptint használtunk. Korábbi tanulmányokat alapul véve különböző inhibitorokat alkalmaztunk a jelátviteli folyamatok egyes lépéseinek gátlásához.

A különböző monocita csoportokat a leptin kezelést megelőzően 120 percen át HBSS-ben inkubáltuk, mivel ez az időtartam volt a leghosszabb az inhibitorok használatával történő inkubációs idők közül. A különböző gátlószereket a gátláshoz szükséges inkubációs hosszak megfelelően eltérő időpontokban adtuk. A leptint a gátlószert tartalmazó sejtsuszpenziókhoz a szükséges előinkubációt követően adtuk hozzá. A leptinnel történő

stimuláció időtartama a vizsgált paraméterek típusától függött: az Ins(1,4,5)P3 meghatározás 20 másodperc, az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ mérés 6 perc, és a szuperoxid anion meghatározás 30 perc hosszú stimuláció után következett. Az inkubáció 37 °C-on CO₂ inkubátorban történt (CO₂ 5%, levegő 95%, páratartalom 95%). A kísérleteket a monociták izolációját követő 6 órán belül elvégeztük.

A membránhoz kapcsolt protein kináz C meghatározása

A módszert a Bell és mtsai által leírt Gopalakrishna és mtsai által módosított módon végeztük. A leptin stimulációt követő 0–45 perc időtartamban a monocita szuszpenziót (10^5 sejt/ml) 4 °C-on centrifugáltuk. A pelletet jéghideg Hepessel beállított pH-jú HBSS-t tartalmazó EDTA-ban, 0,5 mmol/l EGTA-ban, fenil-metil-szulfonil-fluoridban (Sigma), és leupeptinben (Sigma) vettük fel újra. A sejteket ultrahangos eljárással tártuk fel (Branson Sonifier 450), majd 100000 g-vel centrifugáltuk 4 °C-on 45 percen át (Beckman L5- 65B). A pelletet Chaps-al (Sigma) és 1%-os Nonidet P-40 (Sigma)-el oldottuk fel. A pelletet a fentiek szerint még egyszer homogenizáltuk és centrifugáltuk. A membránfrakciók PKC aktivitásának meghatározásához mértük a ^{32}P , 100-200 cpm/mg [^{32}P]-ATP-ből, 100µg/ml hiszton III-S-be (Sigma) épülését 10 mmol/l MgCl₂, 1,5 mmol/l CaCl₂, 96µg/ml l-foszfadil-L-szerin (Sigma), 6,5µg/ml 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol (Sigma), 50µmol/l adenzin 5-trifoszfátNa₂ (ATP, Sigma), és 100–200 cpm/mg [^{32}P]ATP jelenlétében. A reakciót 10 perc eltelte után jéghideg triklór-ecetsavval és bovine serum albuminnal (BSA) állítottuk le. Ezután a csapadékot 0,45µm Millipore HA szűrőn szűrtük át és 5× 2ml jéghideg triklór-ecetsavval mostuk. A radioaktivitást Packard 2200 CA liquid szcintillációs számlálóval határoztuk meg. A

szűrőket toluol koktéllal oldottuk. A PKC aktivitást a beépült ^{32}P (pmol/min/mg fehérje) mennyiségével fejeztük ki.

Az endogén koleszterin szintézis mérése

A mérést McNamara és mtsai módszere szerint végeztük el. A monocitákat (10^6 sejt), melyeket 1 ml 2,5 nmol/l [$2\text{-}^{14}\text{C}$]-acetátot (1,8 GBq/mmol specifikus aktivitás [Isotope Institute of the Hungarian Academy of Sciences]) tartalmazó HBSS-ben szuszpendáltunk fel 1–500 ng/ml leptinnel és gátlószerekkel inkubáltuk. A reakciót a 4h inkubáció végén 0,5ml 1,0 M KOH-dal állítottuk le és a mintákat $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 90 percig szaponifikáltuk. Belső standardként [$1,2\text{-}^3\text{H}$]-koleszterint (1480 GBq/mmol) használtunk. Az el nem szappanosított lipideket hexánnal vontuk ki. Az extraktumokat alumínium-oxid oszlopokra vittük fel és a szteroid frakciót aceton és dietil-éter 1:1 arányú keverékével eluáltuk. Az eluátumok szárítását követően mértük radioaktivitásukat. Az értékeket a szintetizált koleszterin pmol/h/ 10^7 monocita mennyiségével fejeztük ki.

Szuperoxid anion képződés

A szuperoxid anion termelés mérése a leptin stimulációt követően 30 percen keresztül, a ferricitokróom C (Sigma) szuperoxid dizmutáz gátlható redukciójával történt. Minden mérés triplikátumban történt. Az eredményeket a képződött O_2^- nmol//30 perc/ 10^6 monocita-ban fejeztük ki.

Az Ins(1,4,5)P3 meghatározása

Az Ins(1,4,5)P3 meghatározását Patthy módszere szerint végeztük. A HBSS-el készített monocita szuszpenziókat (10^7 sejt/ml) 4 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on 100-200 μ Ci myo-[3 H]inositol (Amersham) és 10 nmol/l LiCl jelenlétében egy rázatható CO₂ inkubátorban. A gátlószerek megfelelő koncentrációit a myo-[3 H]-inositol előinkubáció vége előtt 30-120 perccel adtuk a keverék alikvotjaihoz. Alapos mosást követően meghatároztuk a sejtekhez tartozó radioaktivitást. A mintában a beépült myo-[3 H]-inositol a gátlószerek jelenlétében is meghaladta az alkalmazott teljes radioaktivitás ötven százalékát. A gátlószereket – a mosást követően – újra hozzáadtuk a monocitákhoz és a sejteket 50 ng/ml koncentrációjú leptinnel kezeltük. 20 másodperc elteltével a reakciót jéghideg perklórsavval állítottuk le, melyet telített kálium-hidrogén-karbonáttal semlegesítettünk. Az Ins(1,4,5)P3-ot reverz fázisú ionpár kromatográfia használatával izoláltuk. Belső standardként Ins(1,4,5)P3-ot (Amersham) használtunk. A képződött Ins(1,4,5)P3 mennyiségét az Ins(1,4,5)P3 pmol /mg összfehérje hányadossal fejeztük ki.

[Ca²⁺]_i meghatározása

5×10^6 monocitát 1 ml térfogatban 20 μ l Indo 1/AM (Calbiochem) hozzáadása után 30 percen át 37°C-on rázattunk. A sejteket ezt követően alaposan mostuk, és az alikvotokat újra felvettük HBSS-ben. A sejtekhez a gátlószereket a leptin stimulációt megelőzően a korábban meghatározott időben adtuk. Az intracelluláris [Ca²⁺]_i meghatározása spektrofлуoriméterben (Hitachi, F-4500) 405 és 485 nm-en, 37°C-on, folyamatos kevertetés mellett történt. A méréshez használt sejtuszpenziót, amely 2 ml HBSS-ben 10^6 monocitát tartalmazott, küvettába helyeztük, majd a sejteket 50

ng/ml végkoncentrációjú leptinnel stimuláltuk a 6 perc hosszú mérés nulladik percében. Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ szinteket megadott egyenlet szerint számoltuk. A Ca^{2+} szignálokat a bazális (nyugalmi) $[Ca^{2+}]_i$ -t a leptin stimulált intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -ból kivonva kaptuk meg. A görbe alatti területet (areas under curves [AUC]) a hat perc időtartamhoz tartozó Ca^{2+} szignálok görbéiből számoltuk.

Statisztikai analízis

A dolgozatban vizsgált paraméterek elemzésére leíró statisztikát alkalmaztunk (esetszám, átlag, szórás). A monociták mPKC szintjeit és intracelluláris kalcium koncentrációit görbe alatti terület (AUC) számolásával adtuk meg amit egyutas ANOVA-val elemeztünk. A csoportok közötti különbségek vizsgálatára a Newman-Keuls kiegészítő tesztet használtuk. Az elemzéseink során a $p \leq 0,05$ valószínűségi szintet tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Az első kísérletsorozat során a leptin endogén koleszterin szintézisre gyakorolt hatását különböző leptin koncentrációk alkalmazása mellett vizsgáltuk.

A TS csoportba tartozó nyugalmi állapotú monociták koleszterin szintézisének alap szintje magasabb volt, mint a kontroll csoportba tartozó monociták esetén. Kontroll sejtekben 10–100 ng/ml leptin stimulálta a koleszterin szintézist, míg magasabb, 250–500 ng/ml leptin koncentráció csökkentette azt. Ezzel szemben, 10–500 ng/ml leptin koncentráció az TS monociták endogén koleszterin szintézisének jelentős növekedéséhez vezetett.

Ezen kívül tanulmányoztuk az 50 és 500 ng/ml leptinnel stimulált endogén koleszterin szintézis downstream regulációját a két monocita csoportban. 50 ng/ml leptin koncentráció mindkét monocita típusban növelte a koleszterinszintézist bár a reakció kifejezettebb volt TS sejtekben. A koleszterin szintézis emelkedését a PI3K inhibitor WMN, a MAPK inhibitor PD98059, a HMGCoA reduktáz inhibitor fluvasztatin és a SCAP inhibitor 25-HC mindkét monocita csoportban gátolta. K sejtekben a leptin-indukált koleszterin szintézist a PLC inhibitor neomycin és az intracelluláris Ca^{2+} raktárak szupresszora a thapsigargin (TG) is csökkentette. Ezzel szemben TS monocitákban a verapamil tartalmazó medium V gátolni tudta a leptin-indukált koleszterin szintézist.

Ezen kívül mindkét monocita csoportban tanulmányoztuk a jelátviteli útvonalak működését 500 ng/ml leptin hozzáadását követően. K monocitákban a koleszterin szintézis csökkenését a TG, a H-7 és a WMN előkezelés megszüntette, amely a Ca^{2+} -jelátvitel, a cPKC és a PI3K aktivációjának szerepére utal a leptin-indukált koleszterin szintézis regulációjában. Azonban a TS monocita csoportban a Ca^{2+} beáramlásának gátlása Medium V-vel, WMN-nal, 25-HC-vel és fluvasztatinnal csökkentette a leptin hatására fokozódott koleszterin szintézist.

A PKC aktivitást a K és az TS monocitákban az 50 és 500 ng/ml koncentrációjú leptin-stimulációt követően mértük. A kontroll csoportban alacsony leptin koncentrációval történő stimulációt követően 5 perccel egy korai csúcsot, míg 500 ng/ml stimulációt követően 30-35 perccel egy második csúcsot is megfigyeltünk. A leptin-indukált PKC idő görbék a TS monocitákban azt mutatták, hogy a PKC aktivitása nyugvó TS sejtekben a kontroll sejteknél megfigyelt aktivitás hétszerese. Ezen felül 50 ng/ml leptin TS monocitákban két csúccsal rendelkező idő görbét eredményezett, míg 500 ng/ml-es koncentrációnál egyetlen nagy csúcsot láttunk, melynek maximuma 30 percnél volt. Az időgörbe alatti területek számolásakor (AUC) a kontroll csoportban az 50 és 500 ng/ml leptin-indukció esetén az első csúcsok közel azonos értéknél voltak,

és a második nagy csúcs kizárólag az 500 ng/ml leptin hozzáadása után jelent meg.

A TS csoportokban a leptin-indukált membránhoz kötött PKC (mPKC) aktiváció kifejezettebb volt, mint a K sejtekben, és az 500 ng/ml stimulációt követő nagy csúcs magasabb volt, mint az 50 ng/ml-es leptin koncentráció hozzáadása után képződött két csúcs összege. Mindkét K monocita csoportban a mPKC aktivitás csúcsokat a WMN előinkubáció gátolta, amíg az 500 ng/ml leptin kezelést követő második csúcs esetén a PKC aktivitást a WMN és a H-7 is csökkentette. TS monocitákban a PKC aktivitás rezisztenciája a H-7-re független az alkalmazott leptin koncentrációtól, és a PKC aktivitást csak a PI3K inhibitor WMN gátolja.

A következő kísérletsorozatban a TS és K monociták leptin-indukált intracelluláris $[Ca^{2+}]$ változásait hasonlítottuk össze. TS monocitáknál a nyugalmi intracelluláris $[Ca^{2+}]$ szintek a K sejtekhez képest magasabbak voltak, míg a Ca^{2+} - idő görbék csúcsai alacsonyabbak voltak és időben később jelentek meg. A TS monociták AUC értékei szignifikánsan magasabbak voltak, mint a K monociták értékei, aminek oka, az alacsony csúcs ellenére, az alapvonalhoz történő elhúzódó, lassabb visszatérés lehet.

A Ca^{2+} szignálok eredetének felkutatásához a monocitákat pertusszis toxinnal (PTX), neomycinnel, TG-nal, WMN-nal és medium V-vel inkubáltuk elő.

A PTX nem volt hatással a leptin-indukált Ca^{2+} szignálokra. A neomycin, TG és WMN a K monocitákban nagyobb mértékben gátolta a Ca^{2+} szignálokat, mint a TS monocitákban. Legkifejezettebb gátló hatása a TS sejtek Medium V-ben történő inkubációjának volt, míg K monocitákban a Ca^{2+} szignálokat az extracelluláris Ca^{2+} hiánya nem befolyásolta. Ezzel ellentétben azt találtuk, hogy a Ca^{2+} transzlokációja TG szenzitív intracelluláris raktárakból nagyobb kontroll sejtekben, míg szerepe a TS monocitákban kevésbé kifejezett.

Az Ins(1,4,5)P3 szintjét K sejtekben a leptin kezelést követően a neomycin és a WMN jelentősen gátolta. TS

monocitákban a leptin kezelés kisebb $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ szintemelkedést eredményezett, de a nyugvó TS sejtek alapszintje magasabb volt a K monocitáknál.

A továbbiakban tisztázni akartuk a O_2^- képződés szerepét a megváltozott Ca^{2+} homeosztázisban. Először meghatároztuk a leptin-indukált O_2^- képződést a két monocita csoportban. Eredményeink alapján a leptin intenzívebb szuperoxid anion képződést idézett elő TS monocitákban, mint a K-ban, és ez a O_2^- képződés PTX rezisztens volt. A neomycin, TG és WMN szignifikánsan gátolta a Nox aktivációját K monocitákban ($p < 0,001$), míg a médium V hatására az O_2^- képződés változatlan maradt. Legkifejezettebb gátlást a TG váltotta ki. Ezzel szemben a szuperoxid anion képződést TS monocitákban a Médium V gátolta szignifikánsan, a neomycin, TG és WMN pedig csak mérsékelten. Ezen eredmények alapján a Ca^{2+} szignál fontos összetevője a leptin-indukált NADPH oxidáz aktivációjának, és ezek a jelátviteli útvonalak különböznek a K és a TS személyekből származó monocitákban. A továbbiakban fluvasztatinnal történő előinkubáció mindkét monocita csoportban a leptin-indukált O_2^- képződés szignifikáns csökkenését eredményezte, ahol a TS csoportban a gátlás erőteljesebb volt.

A TG a Ca^{2+} szignálokat csak K sejtekben gátolta, míg a Médium V csak a TS monocitákra volt hatással. A fluvasztatin kezelés hatástalan volt kontroll sejtekben; TS sejtekben helyreállította a sérült intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ egyensúlyt, tehát meggátolta a citoszolikus szabad Ca^{2+} csökkenését. TS monociták fluvasztatin előkezelésekor vizsgáltuk a TG és a Médium V hatását. Ebben az esetben a leptin indukált intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ csúcs magasságát csak a TG csökkentette. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a HMG CoA reduktáz inhibitor fluvasztatin képes volt helyreállítani TS monocitákban az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ homeosztázist.

Végül vizsgáltuk a leptin által indukált O_2^- képződés és Ca^{2+} szignálok közötti összefüggéseket. TS monocitákban pozitív korrelációt figyeltünk meg a leptin által indukált szuperoxid anion

képződés és Ca^{2+} szignálok között. Ezt az összefüggést K sejtekben nem találtuk meg.

MEGBESZÉLÉS

Az obezitás kialakulása során kulcsszerepet játszó leptin hatását vizsgáltuk túlsúlyos és normál testsúlyú egészséges férfiak véréből izolált monocitákon. A leptinnek éhség- és energiabevitel szabályozó szerepe mellett az intracelluláris folyamatok regulációjában is kiemelt szerepe van. Fontosságát a hozzá kötődő jelátviteli folyamatok bonyolult kapcsolatrendszere is hangsúlyozza. Korábbi tanulmányainkban bizonyítottuk, hogy a 2-es típusú diabetes mellitusban és hiperkoleszterinémiában szenvedő betegek neutrofiljeiben a formil-Met-Leu-Phe (FMLP) és angiotenzin II indukált jelátvitel eltér az egészséges kontrollokétól.

Jelen kísérleteink során a leptin eltérő módon befolyásolta a K és TS monociták koleszterinszintézisét, kalcium viszonyait és a Nox aktivitást. A monocitákat különböző koncentrációjú leptinnel kezeltük és K monocitákban a leptin koleszterin szintézisre gyakorolt bifázikus hatását láttuk. Ez a jelenség TS monocitákban hiányzott: a leptin koncentráció emelésével a koleszterin szintézis folyamatosan emelkedett. A kapott eredmények alapján a monocita csoportok közötti feltételezett jelátvitelbeli különbségeket 50 és 500 ng/ml leptin stimulációt követően vizsgáltuk. Ebben a folyamatban különböző eredetű Ca^{2+} jel, PI3K, MAPK és HMG-CoA reduktáz játszanak szerepet. A leptinhez kötődő jelátvitel során az inozitol foszfolipidek számos celluláris folyamat regulátorai. A leptinhez kötődő jelátviteli folyamat monocitákban összeolvadhat más citokin útvonalakkal, és a leptin-jelátvitel összetarthat egy közös citokin célgén felé a nukleuszba. Az obezitás során a zsírszövetben emelkedett számban jelen lévő makrofágok felelősek a citokin termelés nagy részéért. Juge-Aubry és Meier bemutatta, hogy leptin

hatására a monociták interleukin-1 receptor antagonista szekréciója fokozódik, amely hozzájárulhat obezitásban a leptin rezisztencia kialakulásához. A leptin a humán monociták citokin termelésének, így pl. a TNF- α , IL-6, és IL-12 termelésének modulálásában is részt vesz. Obezitásban a humán zsírszövet egy enyhe fokú, folyamatos gyulladásos állapotot hoz létre, melynek hatására az SREBP és a SCAP expressziója fokozódik, és ennek következtében a koleszterinszintézis hatásfoka is emelkedik. Kísérleteink során, a monocitákat leptin mellett 25-HC-vel és fluvasztatinnal kezelve, a koleszterin szintézis gátlását figyeltük meg. Ez is arra engedett következtetni, hogy a monocitákban a leptin indukálta metabolikus változások kialakulásában a SREBP2–SCAP rendszer is szerepet kaphat. Kutatócsoportunk korábbi kísérleteiben a hiperkoleszterinémiában szenvedő betegek nyugvó és leptinnel kezelt monocitáinak eltérő koleszterin homeosztázisát találta. Jelenlegi vizsgálatainkban a koleszterin szintézis regulációjának a K és TS monocitákban tapasztalt eltérő mivolta két kérdést vetett fel: K monocitákban mi az oka a magas (500 ng/ml) leptin koncentrációval történő kezelést követő koleszterinszintézis csökkenésének, és ez miért nem tapasztalható TS monociták esetén is? Az 500 ng/ml leptin által előidézett koleszterin szintézis csökkenés mérséklődött az intracelluláris forrásból származó Ca^{2+} szignálok H-7-el történő gátlásakor és a WMN előkezelést követően. A H-7 használata során tehát világossá vált a Ca^{2+} -függő cPKC jelentős szerepe a koleszterinszintézis mértékének csökkentésében magas leptin koncentrációval történő stimuláció esetén. Emellett a SOCS3 képes a hosszú izoformájú leptin receptor aktivitását csökkenteni: a SOCS3 molekulák dokkolási helye a Tyr985, melyen keresztül a Tyr1138-mediált STAT3 aktiváció antagonistájaként működnek. Ezért a SOCS3-at, mint a leptin rezisztencia kialakulásának egy meghatározó szereplőjét írták le. A SOCS3 expressziója idős/obez egerek nucleus arcuatusában fokozott, de egészséges emberek leptin jelátvitelében betöltött szerepe még további vizsgálódás tárgya. Makrofágok PIM2 antigén kezelését követő emelkedett SOCS3 és

ERK1/2 expressziójában mind a PKC, mind a PI3K jelátvitel szerepét bizonyították. A PKC és a SOCS család működése tehát egymástól nem független, ami tovább erősíti a PKC feltételezett szerepét a leptin rezisztens koleszterinszintézisben. Kutatócsoportunk korábbi kísérletei során monocitákban megfigyelte a már korábban leírt leptinhez köthető jelátviteli útvonalat, amelynek egyik eleme a DAG által előidézett PKC-aktiváció. Az 50 ng/ml leptinnel történt stimuláció a K és a TS monocita csoportban is emelkedett koleszterin szintézishez vezetett. Ez az emelkedett koleszterin szintézis rendkívül érzékeny volt a wortmannin előkezelésre, amely arra utal, hogy a PI3K aktivációjának és a termelődött Ins(3,4,5)P3-nak szerepe van a koleszterin szintézis fokozódásában alacsony leptin dózis alkalmazását követően. Az Ins(3,4,5)P3 továbbá emeli a PKC ζ autofoszforilációjának aktivációját és ez által az NF κ B expresszióját. A mPKC görbe alatti terület értékek alapján elmondhatjuk, hogy kontroll monocitákban a WMN szenzitív PKC aktivitás mindkét leptinkoncentráció alkalmazása után megjelent. A K sejteknél megfigyelhető második csúcs H-7 szenzitívnek bizonyult. TS monocitáknál azonban a WMN gátlás hatásossága mellett a PKC szintézis H-7 rezisztens volt. A koleszterin szintézis a PKC szinttel összhangban, párhuzamosan változott: a WMN K és TS monocitákban is gátolta a koleszterinszintézist, míg a H-7-re csak a K monociták voltak érzékenyek. A PKC aktivitás és a koleszterinszintézis aktivitása közötti hidat eredményeink alapján a PKC ζ képezi, amely az inhibitor- κ B (I- κ B) foszforilációján keresztül aktiválja az NF κ B-t, amely a magba jutva transzkripciók aktivátorként működik. Az NF κ B és a koleszterinszintézis szoros kapcsolatát az NF κ B sztatinnal és a koleszterinszintézis fokozódásával szemben tanúsított érzékenysége támasztja alá. A PKC mellett a K és a TS monociták koleszterin szintézis szabályozásának megfigyelt különbségeihez a PI3K különböző regulációja, a megváltozott membránösszetétel és membrán rigiditás és a TS monociták membrán raftjainak koleszterin akkumulációja is hozzájárulhat.

Kísérleteinkben a TS monociták kalciumháztartásában is változásokat tapasztaltunk. Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ szignifikánsan magasabb volt nyugvó TS monocitákban és a leptin stimulációt követő Ca^{2+} szignálok csúcsai kisebbek voltak, mint a kontroll monocitákéi. Emellett az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ visszatérése az alapszintre késleltetett volt, amelyet a Ca^{2+} lassabb kiáramlása okozott a citoplazmából. Mindezek a TS monociták jelentősen felborult Ca^{2+} homeosztázisára utalnak. Az eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy TS monocitákban a leptin részt vesz az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ emelésében, ezen sejtek erős szabadyökképző képessége miatt. Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ homeosztázis kibillenését az intracelluláris készletekből történő Ca^{2+} transzlokáció sérülésével és a Ca^{2+} citoszolból történő lassabb kiáramlásával jellemezhetjük.

A jelenség hátterében több dolog állhat: 1. A „kanonikus” „receptor - Ins(1,4,5)P3 - intracelluláris Ca^{2+} készletek - Ca^{2+} szignál” jelátviteli út vonal sérülése. 2. A kalcium szignálok eredetének a Ca^{2+} verapamil-érzékeny Ca^{2+} csatornákon keresztül történő beáramlása felé eltolódása. 3. Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ késleltetett visszatérése a nyugalmi szintre, ahogyan azt a leptin stimulációt követő Ca^{2+} idő-görbéken láthatjuk.

Amikor a Ca^{2+} szignálok idő-görbéit vizsgáltuk a görbe alatti terület koncepció alkalmazásával a teljes Ca^{2+} szignálok (AUC) jelentős emelkedését találtuk TS monocitákban a K-hoz képest. Az AUC leptin által kiváltott emelkedését TS monocitákban a Ca^{2+} szignálok lassabb normalizálódása okozta. A monociták mindkét csoportjában a TG gátló hatása a WMN-szenzitív PI3 kináz hosszú típusú leptin receptorok szignalizációjában való részvételének tudható be. A PI3 kináz képes a foszfatidilinozitol DAG-ra és Ins(3,4,5)P3-ra hasítani, amely aktiválja az Ins(1,4,5)P3 képzését indukáló PLC enzimet. Ennek következtében, a TG lecsökkent gátló hatása TS monocitákban arra utal, hogy ezekben a sejtekben a leptin-indukált Ca^{2+} szignált a Ca^{2+} extracelluláris térből történő beáramlása okozza, ellenben az irodalomban arra is található bizonyíték, hogy a

PTX-rezisztens Ins(1,4,5)P3 is részt vesz a szignálban. A TG Kontroll és TS sejtekben is gátolta a O_2^- képződést, amely szerint a Ca^{2+} szignál indukálta Nox aktiváció részben az intracellulárisan mobilizált szabad Ca^{2+} -tól függ. Az Ins(1,4,5)P3 leptin hatására bekövetkező emelkedés WMN előinkubáció hatására történő szignifikáns csökkenése támogatja feltevésünket, mely szerint a PI3 kináz a PLC szabályozásával szerepet játszik a leptin indukált Ca^{2+} szignál kialakulásában. Monocitákban az Ins(1,4,5)P3 előidézte raktárürítés következménye a Ca^{2+} extracelluláris térből történő beáramlása, amely segíti a készlet pótlását. Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ emelkedése pedig szükséges a Nox, a O_2^- termelésért felelős enzim, aktivációjához. Az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis és a szabadgyökképződés közötti kapcsolat Kontroll és TS monocitákban további vizsgálatot igényel. Korábban közöltük, hogy az angiotensin II és a leptin a K-hoz képest emelte a szuperoxid anion és leukotrién képződést hiperkoleszterinémiás betegek neutrofiljeiben és a szabadgyökképződést mind az *in vivo* és az *in vitro* sztatinkezelés is részlegesen gátolta. A plazmamembránban található kalcium/kalmodulin dependens ATPáz az egyetlen rendszer nem-ingerelhető sejtekben a kalcium kipumpálására. Így, az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ szabályozásában ez a legmeghatározóbb enzimatikus Ca^{2+} pumpa. Ebben a tanulmányban TS monocitákban a leptin-generált O_2^- képződésének szignifikáns emelkedését találtuk. TS monociták esetében a szuperoxid anion képződésének csökkenése Medium V és fluvasztatin előkezelés hatására nem pusztán megváltozott jelátvitelre, hanem egyfelől a O_2^- képződés mevalonát ciklus függésére, másfelől a sztatinek endogén antioxidáns aktivitására utal. A sztatinek a HMG CoA reduktáznak, a mevalonát ciklus kulcsenzimének inhibitorai. Továbbá a sztatineknek pleiotropikus hatásuk is van, így nem csak a koleszterin szintézist gátolják, hanem a Rho szupercsalád tagjait is, melyek a sejt proliferációért, tumorképződésért és a Rac1 kis GTPáz aktivációjáért felelnek. Ez utóbbi szerepet játszik a monociták NADPH oxidáz aktivitásának regulációjában, tehát a fluvasztatin képes, *in vivo* és *in vitro*, az

AngII és a leptin stimulált O_2^- képzést részben csökkenteni. A mevalonát ciklus-függő (fluvasztatinnal gátolható) része a leptin-indukált szuperoxid anion képződésnek kifejezettebb TS monocitákban, mint K monocitákban. Ez a felfedezés azt a feltevést támasztja alá, hogy az endogén antioxidáns aktivitás nem az egyedüli jellemzője a sztatinoknak a ROS képződés gátlásában. A fluvasztatin képes a TS sejtekben megszüntetni az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ késleltetett alapszintre kerülését, feltehetően a fokozott O_2^- képződés gátlásával, mellyel jelentősen csökkenti a Ca^{2+} szignált. A fluvasztatin kezelés eredményeképpen a sejtekben a Ca^{2+} szignál a TG érzékeny készletből származott, a Ca^{2+} beáramlása a Ca^{2+} csatornákon keresztül megállt, és a szabad Ca^{2+} eltűnése a citoszolból helyreállt. Ezen kívül TS monocitákban szignifikáns, erős pozitív korrelációt találtunk a leptin-indukált szuperoxid anion képződés és a Ca^{2+} szignálok AUC értékei között.

Eredményeink összegzéseként azt a következtetést vonjuk le, hogy a TS monocitákban egy H-7-el szemben érzéketlen, de wortmanninra érzékeny PKC aktivitás van jelen, amely valószínűleg egy atípusos Ca^{2+} szignál független PKC aktiválásának köszönhető, és amely felelőssé tehető a leptin-mediált koleszterin szintézis fokozásában. TS monocitákban a Ca^{2+} szignálok emelkedését részben a leptin indukált szuperoxid anion képződés membrántranszport károsító hatásának következményeként a Ca^{2+} sérült effluxa okozza. A Ca^{2+} homeosztázis felborulása kulcsszerepet játszik számos betegség, pl. obezitás, inzulin rezisztencia, hipertenzió és atheroszklerózis tünetében. Tehát a Ca^{2+} szignalizáció terápiás beavatkozási pontot jelent az obezitásban. A sztatinok, köszönhetően azon képességüknek, hogy a szabadgyökképződés gátlásán keresztül csökkentik az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ szintjét és csökkentik a koleszterinszintézist, fontos szerepet játszanak az obezitással kapcsolatos betegségek, pl. inzulin rezisztencia, hiperkoleszterinémia és atheroszklerózis kezelésében.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az obezitás fontos szerepet játszik számos betegség kialakulásában. A leptin egy zsírszövet eredetű hormon, melynek szintje túlsúly esetén emelkedett. A leptin monocitákban a gyulladásos folyamatok és a koleszterin bioszintézis regulációért felelős.

Kísérleteinkben célul tűztük ki a leptin koncentrációfüggő hatásának vizsgálatát túlsúlyos férfiak monocitáiban (TS) és az alacsony és magas leptin koncentrációhoz tartozó koleszterinszintézist reguláló jelátviteli rendszerek feltérképezését. Vizsgáltuk ezen kívül a kontroll és TS monociták Ca^{2+} szignáljait, NADPH oxidáz aktivációját, és a közöttük feltételezett összefüggéseket. A leptin által kiváltott Ca^{2+} és koleszterin jelátvitel vizsgálata során a monocitákat leptinnel és különböző gátlószerekkel kezeltük elő.

Eredményeink szerint kontroll (K) monociták koleszterinszintézisét a leptin koncentrációfüggő bifázikus módon befolyásolta, míg a TS monocitáknál a koleszterinszintézis magas leptin koncentráció hatására nem csökkent. 50 ng/ml leptin kezelés a Ca^{2+} szignált, a PI3K-t, a MAPK-t és a HMG CoA reduktázt stimulálta. K monocitákban az 500 ng/ml leptin kezelést követő koleszterinszintézis csökkenés a Ca^{2+} jeltől, a PI3K aktivációtól és a H-7 szenzitív cPKC-től függött. TS monocitákban a koleszterinszintézis szabályozásában egyedül a PI3K játszott szerepet. A TS monociták nyugalmi intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -ja magasabb volt, mint a K sejtekben. A leptin indukált Ca^{2+} változáshoz egy K-hoz képest alacsonyabb csúcs és a nyugalmi szinthez történő csökkent visszatérés tartozott. Az intracelluláris jelátvitel különböző gátlószereit használva azt találtuk, hogy K sejtekben a Ca^{2+} szignálok intracelluláris forrásból származtak, míg TS monocitákba a Ca^{2+} az extracelluláris térből áramlott be. A leptin-indukált O_2^- képződés TS monocitákban szignifikáns pozitív

korrelációt mutatott a Ca^{2+} szignálokkal. A fluvasztatin a TS monociták intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ homeosztázisát teljesen helyreállította, amely pleiotropikus hatásának, a szabadgyökképződést gátló hatásának köszönhető. A sztatinok ezért nem csak koleszterinszintézist gátló hatásuk miatt, hanem antioxidáns hatásuknak köszönhetően is hasznosnak bizonyulhatnak az obezitás kezelésében.

Eredményeink a TS monociták sérült H-7 szenzitív cPKC aktivációját, PI3K mediált PKC aktivációját és a sérült kalciumcsatornák következtében emelkedett Ca^{2+} szintjeit mutatják be leptin kezelést követően.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Paragh György Professzor Úrnak témavezetői munkájáért, szellemi iránymutatásáért és kutató munkám feltételeinek biztosításáért. Külön köszönöm, hogy lehetővé tette részvételemet egy kínai tanulmányúton és a göteborgi konferencián, amellyel szakmai fejlődésemet tovább segítette. Köszönöm Dr. Seres Ildikó Tudományos Főmunkatárs munkáját, akihez az I. Belgyógyászati Klinikán eltöltött évek során bármikor fordulhattam segítségért, és akivel a közös munka nem csak hasznosan, hanem kellemesen is telt. Hálával tartozom Dr. Balogh Zoltánnak a koleszterinszintézis vizsgálata kapcsán nyújtott segítségért. Köszönet illeti továbbá Fóris Gabriella Professzor Asszonyt és Kertai Pál Professzor Urat a közösen elért eredményekért, hasznos szakmai tanácsaikért és segítőkészségükért. Köszönöm az I. sz. Belgyógyászati Klinika minden olyan dolgozójának segítségét, akik munkámat könnyebbé tették.

Külön köszönetet érdemel feleségem, aki rengeteg segítséggel és támogatással tette könnyebbé és szebbé „Ph.D.-s” éveimet. Köszönettel tartozom szüleimnek, hogy biztos hátteret

teremtettek számomra a tanulmányaim elvégzéséhez és hogy mindig mindenben támogattak.

Vizsgálatainkat az OTKA (K63025), a TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007 és a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 projektek támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.



Iktatószám: DEENKÉTK/259/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Padra János Tamás

Neptun kód: TNBUFO

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Padra, J.T.**, Seres, I., Fóris, G., jr. Paragh, G., Kónya, G., Paragh, G.: Leptin triggers Ca(2+) imbalance in monocytes of overweight subjects.
Neuropeptides. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2012.07.002>
IF:1.553 (2011)
2. Balogh, Z., Fóris, G., Kónya, G., jr. Paragh, G., Köbling, T., **Padra, J.T.**, Sarang, Z., Paragh, G.: Obesity abrogates the concentration-dependent effect of leptin on endogenous cholesterol synthesis in human monocytes.
Immunobiology. 216 (3), 431-435, 2011.
IF:3.205



További Közlemények

3. Sztanek, F., Seres, I., Harangi, M., Lőcsey, L., **Padra, J.T.**, jr. Paragh, G., Asztalos, L., Paragh, G.:
Decreased human paraoxonase-1 (PON1) lactonase activity in hemodialyzed and renal
transplanted patients. A novel cardiovascular biomarker in end-stage renal disease.
Nephrol. Dial. Transplant. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfr753>
IF:3.396 (2011)
4. Fekete, E., **Padra, J.T.**, Szentirmai, A., Karáffa, L.: Lactose and D-galactose catabolism in the
filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 55 (2), 119-124, 2008.

Összesített impakt faktor: 8.154

Összesített impakt faktor: (érkekezés alapján szolgáló közlemények esetén): 4.758

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok
bibliográfiai és tudásmetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports
Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.08.21

