

Témavezető neve: Dr. Csala Miklós

A téma címe: Antioxidáns anyagcsere és transzportfolyamatok az endo/szarkoplazmás retikulumban

A kutatás időtartama: 4 év

Háttér

A glutation (GSH) és a glutation diszulfid (GSSG), illetve a fehérje tiol és diszulfid aránya a citoplazmában jóval magasabb, mint az endo/szarkoplazmás retikulum (ER/SR) lumenében. A máj ER membránban a GSH pedig nagyon lassan, a GSSG gyakorlatilag nem transzportálódik. Az ER külső felszínén egy aszkorbát oxidáz hatására aszkorbátból dehidroaszkorbát keletkezik, ami bejut a lumenbe, ahol tiol oxidációt vált ki, miközben visszaredukálódik. Az aszkorbát nem képes kijutni a lumenből, mert nincs transzportere. Az aszkorbát oxidáz reaktív oxigén vegyületet is termel, amely hozzájárul az intraluminális tiol oxidációhoz.

Az SR intraluminális Ca^{2+} koncentrációja tízezerszer magasabb, mint a citoplazmai. A legfontosabb SR kalciumcsatorna a rianodin receptor (RyR), amely más ionokat és kismolekulákat is transzportál. A szívizomra jellemző a RyR2 izoforma, a vázizomban elsősorban RyR1 található. A RyR fehérjéket megklónozták, szekvenciájuk ismert, specifikus antitestek és RyR izoformákat termelő transzfektált sejtek hozzáférhetőek. A RyR1 "redox potenciálkülönbség szenzor"-ként működik. A RyR kalciumcsatornával közös komplexben található egy feltételezett glutation transzporter, amely fenntartja a RyR szabályozásához szükséges lokális glutation grádienseket. Mind az oxidált, mind a redukált glutation átjut az SR membránon, de a transzport részletes jellemzését és összehasonlítását nem végezték el. Hipotézisünk szerint az SR-ben, a máj ER-hez hasonlóan, az aszkorbinsav szerepet játszik az intraluminális fehérje és glutation tiolok oxidációjában, vagyis befolyásolja a szív- és vázizomsejt kalcium-homeosztázisát, a Ca^{2+} -szignál erősségét és lefutását. Feltételezzük, hogy az SR-ben az ER-től eltérő glutation transzporter található, amely vagy azonos a RyR kalciumcsatornával vagy kapcsolatban áll vele és egymás működését kölcsönösen befolyásolhatják. Célunk az említett hatások jellemzése és a humán SR glutation-transzporterének azonosítása.

Az ER lumenében uralkodó tiol-oxidáló környezetben olyan biokémiai reakciók is zajlanak, amelyekhez redukáló erőre van szükség. Ilyen például a kortizon és kortizol egymásba alakulását katalizáló 11-béta-hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusa (11HSDH1).

Fiziológiai körülmények között a reakció mindig a kortizon redukciója irányában zajlik, amelyhez redukált NADPH-t fogyaszt. Ez tehát arra utal, hogy a lumenben a piridin nukleotidok – a tioloktól eltérően – redukált állapotban vannak. Mindez nem lenne lehetséges, ha a két redox rendszer egymással reagálhatna, amit a citoplazmában elsősorban a glutation reduktáz enzim biztosít.

Fontos kérdés az is, hogy milyen folyamat biztosítja a lumen redukált piridin nukleotid készletének fenntartását. Azt ugyanis nem feltételezhetjük, hogy a citoplazmai enzimek által előállított NADPH bejutva az ER lumenébe oxidálódik, majd a keletkezett NADP⁺ visszakerül a citoplazmába. Ehhez ugyanis a NADP⁺ és a NADPH intenzív transzportjára lenne szükség, míg korábbi megfigyelések azt valószínűsítik, hogy a membrán nem átjárható ezen vegyületek számára. Valamilyen luminális dehidrogenáznak kell tehát részt vennie a folyamatban. A legvalószínűbb erre a feladatra a glukóz-6-foszfát 6-foszfoglukonáttá alakulását katalizáló hexóz-6-foszfát dehidrogenáz (H6PDH).

Eredmények

1. Glutation-transzport a SR membránon keresztül

Két különböző módszerrel (gyors-szűrés és „light-scattering”) megmértük a máj mikroszóma (endoplazmás retikulum; ER), illetve a harántcsíktolt izom mikroszóma (szarkoplazmás retikulum; SR) membránján keresztüli glutation (GSH) transzport sebességét. Mindkét módszerrel mérve azt tapasztaltuk, hogy az SR membránban lényegesen gyorsabb a transzport: míg az ER membrán alig ereszt át a GSH-t, addig az SR membrán kifejezetten GSH-permeabilisnak mutatkozott, holott a két membrán általános (egyéb vegyületek iránti) áteresztőképessége nagyon hasonló.

A továbbiakban az egyszerűbb és kevésbé költséges fényszóráson alapuló technikát alkalmaztuk, és elsőként összehasonlítottuk a GSH-nak, valamint oxidált diszulfidjának (GSSG) transzportját öt különböző mikroszómában. Az agy és a szívizom mikroszóma a máj mikroszómához hasonlóan rosszul transzportálja mind a GSH-t, mind a GSSG-t. A harántcsíktolt izom mikroszóma gradiens centrifugálással megtisztított terminális ciszterna (TC) frakciója azonban gyakorlatilag akadálytalanul ereszt át mindkét vegyületet. A glutation transzport sebessége tehát jól korrelál a rianodin receptor kalcium csatorna (RyR) egyik izoformájával, a RyR1 mennyiségével; az ugyanis csak a harántcsíktolt izom SR-ban, azon belül is leginkább a TC frakcióban van jelen. Ezért ebben a két membránpreparátumban tovább tanulmányoztuk a glutation transzportját, hogy kimutassuk a RyR1 esetleges szerepét.

Először megvizsgáltuk különböző RyR gátlók (Mg²⁺, ruténium vörös, nagy koncentrációjú rianodin) hatását a transzportra, és azt találtuk, hogy azok hatékonyan gátolták mind az izom mikroszómában, mind a TC frakcióban. Mivel a kezeletlen vezikulákban a transzportot tovább fokozni már nem lehetett, megnéztük, hogy a Mg²⁺ ionnal gátolt transzportra hogyan hatnak a RyR agonisták (adenin nukleotidok: AMP, ADP, ATP és acil-KoA). Mind a négy vegyület aktiválta a glutation transzportot; az acil-KoA gyakorlatilag megszüntette a gátlást.

Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a RyR1 komplex – közvetve vagy akár közvetlenül – részt vesz az SR membránon keresztüli glutation transzportban, így a membrán Ca²⁺ ion és antioxidáns transzportja együttesen szabályozódik. A jelenség fiziológiai szerepét egyelőre nem ismerjük.

A kutatás folytatásaként arra törekedtünk, hogy ezt a megfigyelést közvetlen bizonyítékokkal támasszuk alá, és tisztázzuk, hogy a RyR1 szabályozóként vagy transzporterként vesz részt a folyamatban.

A gyorszűrésen alapuló glutation transzport mérés beállításához szükségünk volt egy olyan transzport gátlószerre, amely megakadályozza az intravezikuláris glutation kimosódását a mérés közben. Ha ugyanis a mikroszómát gátlószer nélkül szűrtük és mostuk, – a membrán nagymértékű permeabilitása miatt – a már felvett glutation teljesen eltűnt a vezikulumokból, így felvételt kimutatni nem lehetett. A korábban már vizsgált RyR1 gátlók (rianodin, ruténium vörös) mellett a kationcsatornák általános gátlószeréről, a La³⁺ ionról is kimutattuk, hogy gátolja az izom mikroszóma glutation felvételét. Amikor a három gátlószer hatását a glutation kiáramlás esetén vizsgáltuk, azt a meglepő eredményt kaptuk, hogy a rianodin és a ruténium vörös hatástalan volt, a LaCl₃ azonban hatékonyan gátolta a transzportot mindkét irányba. A gyorszűréses transzport méréseknél tehát LaCl₃ tartalmú pufferrel mostuk a mikroszómát, így sikerült a glutation felvételt közvetlenül detektálni. E módszer felhasználásával alátámasztottuk a korábban fényes módszerrel tett megfigyelésünket, hogy a RyR receptor gátlószerai a glutation transzportot is gátolják.

RyR1 csatornát expresszáló transzfektált, illetve vad típusú HEK293 sejtekből mikroszómát állítottunk elő, és összehasonlítottuk a glutation transzport sajátosságait a kétféle mintán. A RyR1 csatornát tartalmazó vezikulumok esetében éppúgy szükség volt a mosó oldatban a LaCl₃ jelenlétére, mint az izom mikroszóma tanulmányozásakor. A RyR1-et nem tartalmazó mikroszómáknál ezt a jelenséget nem észleltük. A RyR gátlók (rianodin, ruténium vörös) a transzfektált sejtekből származó mikroszóma glutation felvételét gátolták, míg a vad típusú sejtek mikroszómáin hatástalanok voltak. A RyR1-et tartalmazó membránban tehát a

glutation transzportja olyan volt, mint a harántcsíktolt izom szarkoplazmás retikulumából származó membránban. Eredményeink tehát azt bizonyítják, hogy a RyR1 közvetlenül transzporterként vesz részt a glutation áteresztésében.

Azt a fent említett jelenséget, hogy – szemben a lantán ionokkal – a rianodin és a ruténium vörös nem gátolta a glutation kifelé irányuló transzportját, tovább tanulmányoztuk, és megállapítottuk, hogy a RyR1 csatorna magas intraluminális GSH szint esetén rezisztenssé válik e két gátlószerre. Ca^{2+} ionokkal és glutationnal feltöltött mikroszómán a rianodin és a ruténium vörös a kalcium kiáramlást sem gátolta, míg LaCl_3 ilyenkor is hatékony volt.

2. Az ER lumen redox rendszerei

A máj ER lumenében a tiol-diszulfid redox rendszer oxidált állapotban van, mégis redukált NADPH-t felhasználó enzimek (pl. 11HSDH1) működnek. A két redox rendszer kapcsolatát patkány máj mikroszómákon tanulmányoztuk. Kimutattuk, hogy a natív mikroszóma fluoreszcens spektruma a redukált piridin nukleotidokéhoz hasonló. A fluoreszcencia valóban a redukált piridin nukleotidok jelenlétét jelzi, mivel különböző NADPH-t oxidáló vegyületek (pl. kortizon) adására mértéke csökkent. Ezt a csökkenést glukóz-6-foszfát (G6P) adása ellensúlyozta, amit az ER membránjában elhelyezkedő G6P transzporter gátlásával ki lehetett védeni. Ennek az a magyarázata, hogy a lumenben elhelyezkedő hexóz-6-foszfát dehidrogenáz NADPH-t termel. Fontos megjegyezni, hogy önmagában kortizol vagy G6P adása csak mérsékelt fluoreszcencia-növekedést eredményezett, ami arra utal, hogy a piridin nukleotidok eleve elsősorban redukált állapotban vannak. Megállapítottuk tehát, hogy a tiolok számára oxidatív környezetben valóban egy redukált piridin nukleotid pool található. Ez pedig csak úgy lehetséges, ha a két redox rendszer között nincs funkcionális kapcsolat. Western blot analízissel és aktivitásmérésekkel igazoltuk, hogy a glutation reduktáz enzim, amely a sejt egyéb részein a két rendszer közötti kapcsolatot biztosítja, nincs jelen az ER lumenben.

3. Endoplazmás retikulum stressz és apoptózis skorbutban

A munkacsoport korábban kimutatta, hogy az aszkorbát *in vitro* elősegíti a máj mikroszómában a diszulfidhidak kialakulását. A mechanizmus *in vivo* szerepét 4 hetes aszkorbátmentes diétával skorbutizált tengerimalacokon tanulmányoztuk. A skorbut kialakulásával párhuzamosan a Grp78 (BiP), a Grp94, illetve a protein diszulfid izomeráz indukcióját figyeltük meg, ami ER stresszre utal, melyet a károsodott fehérjeteher okozhat. A skorbutos állatok májában fokozódott az apoptózis, ami az elhúzódó ER stressz következménye lehet. A fehérjeindukciók és az apoptózis visszatért a kontroll szintre az

aszkorbát visszaadásakor. A kimutatott ER-stressz és apoptózis alátámasztja az aszkorbát szerepét a fehérje-foldingban.

4. Új módszer kidolgozása az ER membránon keresztüli transzport mérésére

A mikroszómális transzport mérésére leggyakrabban a gyorszúrésees módszert alkalmazzák, amely az intra- és extravezikuláris tér gyors elválasztásán alapul. Előfeltétele a ligand érzékeny és pontos detektálhatósága, amit rendszerint radioaktív izotópot tartalmazó analóg felhasználása biztosít. A jelzett analóg azonban gyakran nem vásárolható meg, előállítása pedig nehéz és költséges. Ezért kidolgoztunk egy új módszert, amely ötvözi a gyorszúrést a HPLC/MS-MS detektálással, így lehetővé teszi jelöletlen molekulák transzportjának tanulmányozását. Emellett az új módszer több vegyület egyidejű transzportjának mérésére és a ligand stabilitásának nyomonkövetésére is alkalmas, érzékenysége hasonló a radioaktív detektáláséhoz, viszont gazdaságosabb annál.