

Glukuronidtranszport az endoplazmás retikulumban

Doktori tézisek

Dr. Révész Katalin

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Csala Miklós egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók Dr. Monostory Katalin tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Dr. Ambrus Attila egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság

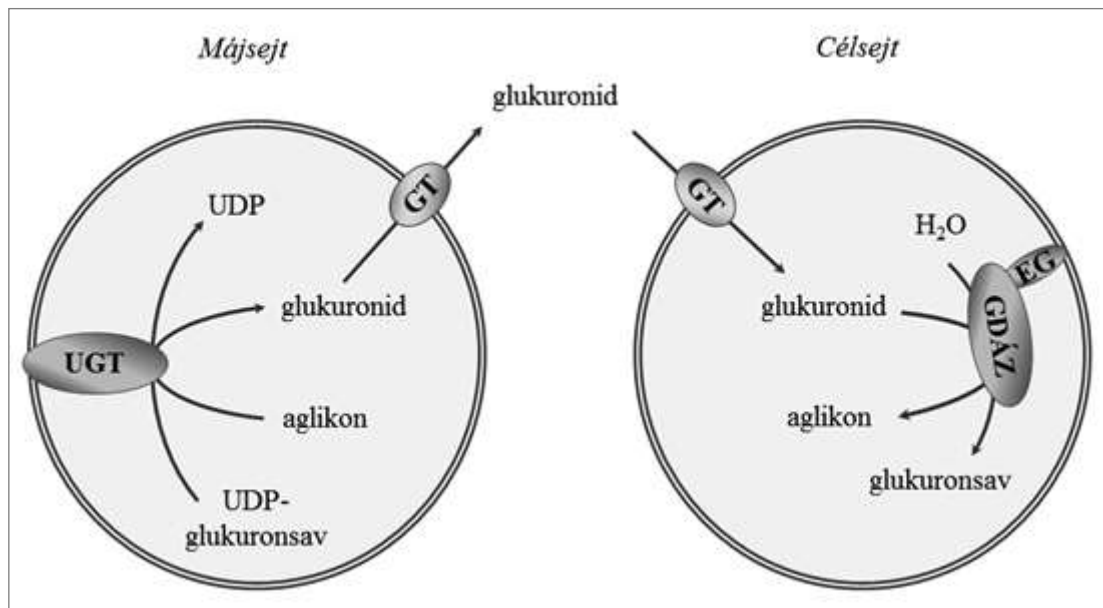
elnöke: Dr. Tretter László egyetemi tanár, Ph.D.

tagjai: Dr. Jemnitz Katalin tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Dr. Komorovicz Erzsébet egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest
2014

Bevezetés

A biotranszformáció során szervezetünk az endogén és exogén vegyületek széles skáláját képes átalakítani és kiválasztásra alkalmassá tenni. A második, konjugációs fázis mennyiségi szempontból legjelentősebb reakciója az endoplazmás retikulum (ER) lumenében zajló glukuronsavas konjugáció. Aluminális aktív centrummal rendelkező UDP-glukuronozil-transzferáz (UGT) enzimek az UDP-glukuronsavglukuronozilcsoportját az aglikon nukleofil funkciós csoportjára helyezik (1. ábra). A reakció terméke a töltéssel rendelkező, vízdékony β -D-glukuronid, melyet a szervezet ily módon előkészített az epe vagy a vizelet útján való kiválasztásra. Az esetek többségében a konjugáció a korábban aktív vagy toxikus vegyületek inaktiválását is eredményezi.



1. ábra: Glukuronidáció és deglukuronidáció

EG: egazin, GDÁZ: β-glukuronidáz, GT: glukuronid transzporter, UGT: UDP-glukuronozil-transzferáz

Az UGT enzimek szubsztrátjai között szerepelnek endogén vegyületek, mint például a bilirubin, a retinoidok, a pajzsmirigy hormonok, a szteroid hormonok és a katekolaminok. Emellett számos xenobiotikum, többek között gyógyszerek (például kemoterápiás szerek vagy a morfin) és a kémiai karcinogének jelentős része inaktiválódik glukuronsavas konjugáció segítségével. Ennek megfelelően az UGT-k alacsony aktivitása a rákkeltő vegyületek csökkent inaktiválásán keresztül fokozza a sejtek malignus transzformációjának kockázatát. Így az UGT-k működése a napjaink egyik legnagyobb egészségügyi problémáját jelentő daganatos megbetegedések megelőzésében is fontos szerepet játszik.

A biotranszformáció fő helyszínein, elsősorban a májban keletkező glukuronsavaskonjugátumok egy része a szisztémás keringéssel eljut távolabbi sejtekig, és itt a β -glukuronidáz által katalizált reakcióban enzimatikus hidrolízisen megy keresztül (1. ábra). A folyamat következtében felszabadul az eredeti, konjugátatlan – jellemzően biológiailag aktív vagy toxikus – aglikon, mely így lokálisan kifejtheti hatását. A β -glukuronidáz működése során reaktiválódnak a karcinogén vegyületek is. Ezzel magyarázható, hogy az enzim aktivitása és egyes tumorok előfordulása között korrelációt figyeltek meg. A daganatmegelőző hatású glukarátról pedig leírták, hogy jótékony hatását $\alpha\beta$ -glukuronidáz gátlása révén fejti ki.

Mind a glukuronidáció, mind a deglukuronidáció az ER lumenében megy végbe. A luminális lokalizáció következménye, hogy az enzimek működéséhez szükség van a szubsztrátok és a termékek transzportjára az ER membránján keresztül. Míg az UGT lipofil szubsztrátja számára az ER membránja nem képez barriert, addig a töltéssel rendelkező, nagyméretű UDP-glukuronsav és glukuronidok a lipid kettősrétegen egyszerű diffúzió segítségével nem jutnak át. Funkcionális vizsgálatok szerint transzportjuk fehérjemediált, kétirányú, passzív folyamat, a folyamatban résztvevő fehérjék azonosítása azonban mindeddig sikertelen volt.

A transzport folyamatok fontosságára hívja fel a figyelmet a luminális enzimek latenciája, vagyis az a jelenség, hogy intakt membrán mellett az enzim aktivitása csak töredéke annak, amit a membrán átjárhatóvá tétele, permeabilizálása során tapasztalunk. Utóbbi esetben ugyanis az enzim szabadon hozzáfér szubsztrátjához, míg ép membrán

mellett az enzimaktivitást a szubsztrát membránon keresztüli transzportja limitálja. Ha az aktivitásokban észlelt különbséget a permeabilizált membrán mellett mért érték százalékában fejezzük ki, a latencia értékét számszerűleg is megkapjuk. Az UGT-k mintegy 90 %-os latenciáját az UDP-glukuronsav felvételének tulajdonítjuk, míg a β -glukuronidáz 40 % körüli latenciáját a glukuronidtranszport magyarázza.

A glukuronidok felvétele az ER-betehát a deglukuronidáció sebességmeghatározó lépése. Ennek köszönhetően a folyamat lassítása feltételezhetően ugyanúgy kemopreventív hatású lehet, mint a β -glukuronidáz enzim közvetlen gátlása. Ismert, hogy az általános aniontranszport-gátló és tiol-alkiláló szerek a glukuronidbeáramlást akadályozzák, azonban a folyamat specifikus gátlószerét még nem írták le.

A különböző glukuronidok eltérő sebességgel lépik át az ER membránját, a transzport sebessége elsősorban a konjugátum méretével mutat – fordított irányú – összefüggést. A nagyméretű, rigid struktúrájú morfin-3-glukuronid (M3G) több nagyságrenddel lassabban jut át a membránon, mint más glukuronidok. Az igen lassú transzport felveti annak a gyanúját, hogy a morfin biotranszformációja során az M3G-kiáramlás nem tud lépést tartani a szintézissel, így a konjugátum az ER lumenében reked. Ezt a gyanút erősíti az a megfigyelés is, hogy az M3G a sejten belül elkülönült, a plazmamembrán szelektív elroncsolásával nem mobilizálható frakciót alkot. A major analgetikumként széles körben alkalmazott morfin mennyiségileg legjelentősebb metabolitjának, az M3G-nek az eliminációja többek között azért is érdekes, mert ezt a fájdalomcsillapító hatással nem rendelkező konjugátumot teszik felelőssé a

morfin kezelés során fellépő mellékhatások egy részéért (myoclonus, hyperalgesia, allodynia).

Célkitűzések

A biotranszformációban betöltött fontos szerepük ellenére a glukuronidtranszportot végző fehérjéket mindmáig nem azonosították, és működésükről igen keveset tudunk. Nem ismert specifikus gátlószerük sem.

Munkánk során a glukuronidtranszport funkcionális vizsgálatait végeztük. Megvizsgáltuk, hogy az M3G lassú transzportja az *in situ* keletkező konjugátum luminális felhalmozódásához vezet-e. Emellett kerestük a glukuronidtranszport lehetséges gátlószereit. Irodalmi adatok alapján az ilyen hatóanyagok a β -glukuronidáz közvetett gátlása révén a karcinogén vegyületek reaktiválódását csökkenthetik, tehát kemopreventív hatással bírhatnak. Ismert, hogy a zöld tea flavanoljai(katekinjei) számos daganat kialakulását megelőzik. Kíváncsiak voltunk tehát arra, vajon ehhez a jótékony hatáshoz a deglukuronidáció gátlása is hozzájárulhat-e. Megvizsgáltuk ezért, hogyan befolyásolják a zöld tea katekinjei a β -glukuronidáz enzim és a glukuronidtranszport aktivitását.

Módszerek

A – más sejtalkotóktól elkülönített – ER működésének *in vitro* vizsgálatához kiterjedten használják a frakcionált centrifugálás segítségével előállított mikroszóma frakciót. Kísérleteinket intakt és alameticinnel permeabilizált Wistar patkány máj mikroszómán és Hepa 1c1c7 egér hepatoma sejteken végeztük.

A morfin glukuronidáció vizsgálatakor feleslegben adott UDP-glukuronsav és morfin jelenlétében inkubáltuk a patkány máj mikroszómát, a keletkező M3G mennyiségét LC-MS segítségével mértük.

Patkány máj mikroszóma és egér hepatoma sejtek β -glukuronidáz aktivitásának méréséhez modell szubsztrátként metil-umbelliferil-glukuronidot (MUGA) használtunk, a keletkező metil-umbelliferon (MUMB) mennyiségét HPLC segítségével határoztuk meg. A zöld tea flavanolok hatásának vizsgálatához a katekineket egy perccel a szubsztrát hozzáadása előtt adtuk a mintához.

A glukuronidtranszport méréséhez a gyorszűrés (rapid filtráció) módszerét alkalmaztuk. Transzmembrán koncentrációgradiens létrehozása után a mikroszómát inkubáltuk, majd cellulóz-acetát/nitrát filteren leszűrtük és átmostuk. A glukuronidokat a filterről 50 %-os acetonitrillel leoldottuk, majd HPLC (MUGA esetében) és LC-MS (M3G esetében) segítségével detektáltuk. A membránhoz asszociált glukuronid mennyiséget permeabilizált mikroszómán végzett mérés segítségével határoztuk meg. Alumen glukuronid tartalmát az intakt és a permeabilizált

mikroszómánkapott eredmények különbsége adta. A transzportméréseket a glukuronidázgátlószacharolakton jelenlétében végeztük.

A MUGA felvétel időfüggését a legjelentősebb zöld tea flavanol, az epigallokatekin-gallát (EGCG) jelenlétében is megmértük, majd az EGCG hatásának koncentrációfüggését megvizsgáltuk 0 és 400 μM közötti koncentrációtartományban.

A MUMB és a MUGA mennyiségének meghatározásához az elválasztás WatersAlliance 2690 típusú HPLC segítségével, Nucleosil 100 C18-as oszlopon, gradiens elúcióval történt. A MUMB fluoreszcenciáját 325 nm-es excitációs hullámhossz és 455 nm-es emissziós hullámhossz mellett, a MUGA abszorbanciáját 317 nm-es hullámhosszon detektáltuk.

Az M3G méréséhez a minta komponenseit első lépésben HPLC (Aligent HP1100 LC system, Aligent Technologies) segítségével ODS2 oszlopon, gradiens elúcióval elválasztottuk, majd az eluátumottömegspektrométerbe (Micromass LC Quattro) injektáltuk és az M3G-t electrospray és multiplereaction monitoring alkalmazásával pozitív ionizációs módban detektáltuk.

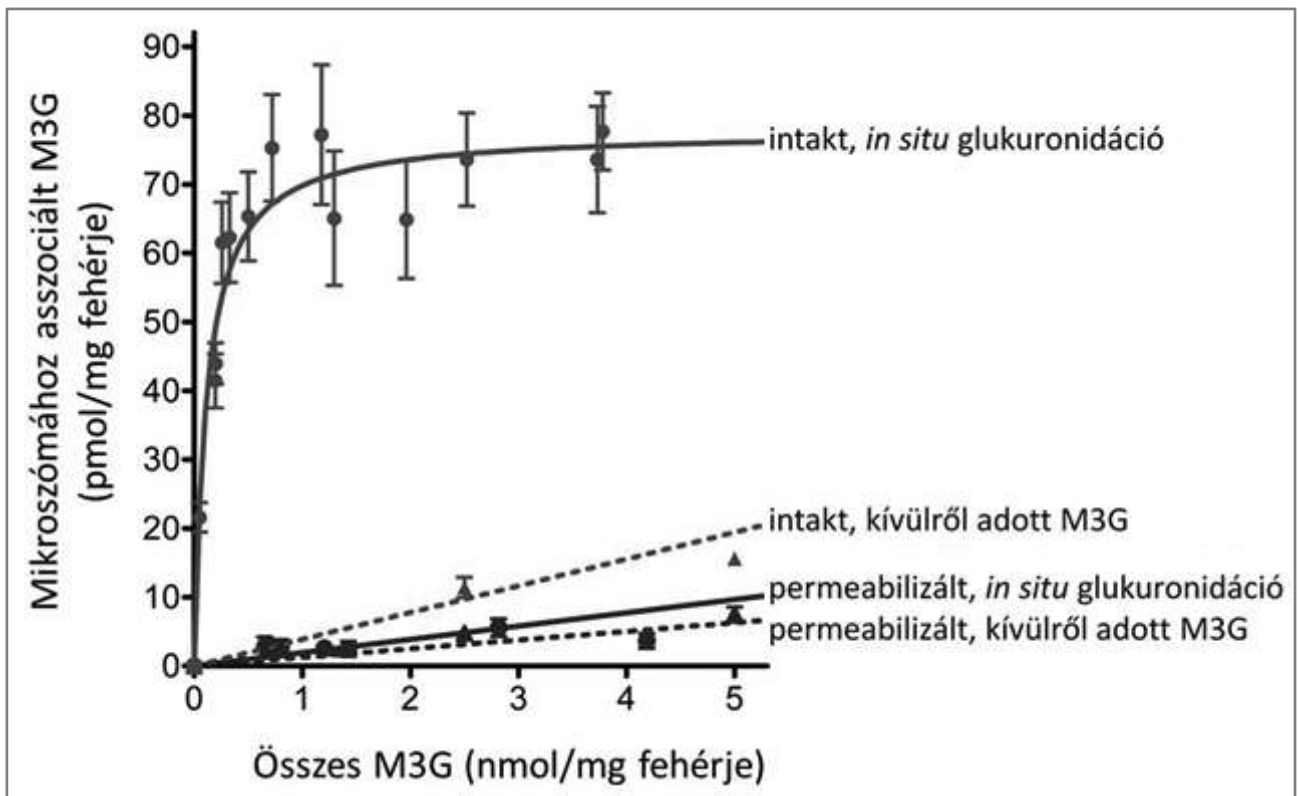
Az eredmények kiértékeléséhez, a lineáris és nemlineáris regresszióhoz, valamint a statisztikai analízishez GraphPadPrism® szoftvert használtunk. Minden vizsgálat során legkevesebb három párhuzamos mérést végeztünk, és a kísérleteket legalább három alkalommal végrehajtottuk. Az eredményekből átlagot számoltunk és meghatároztuk a szórás (standard deviation) értékét. A szignifikancia-szintet 0,01 p-értéknél állapítottuk meg.

Eredmények

Az *in situ* keletkező M3G luminális akkumulációjának vizsgálata

Az M3G be- és kiáramlásának vizsgálata során az irodalmi adatokkal összhangban kétirányú, kis affinitású transzport mechanizmusra utaló eredményeket kaptunk. A morfin UGT enzim latenciája vizsgálataink során az alkalmazott morfinkoncentrációtól függetlenül minden esetben 90%-nak bizonyult, ami szintén az irodalomban olvasható adatoknak megfelel.

Megvizsgáltuk, hogyan változik a mikroszóma M3G-tartalma a morfin *in situ* glukuronidációja során (2. ábra). Permeabilizált mikroszómában a glukuronidmennyiség az idővel és a keletkezett M3G-mennyiséggel lineárisan növekedett. Ezzel szemben intakt membrán mellett a vezikulumok glukuronidtartalma a mérés első perceiben jelentősen, mintegy harmincszor gyorsabban nőtt, mint permeabilizált mikroszómában; annak ellenére, hogy a glukuronidáció sebessége ép membrán mellett csak tizede annak, amit membránpermeabilizálás után mérhetünk. Az M3G mennyiségének kezdeti, gyors növekedése 8-10 perc után megállt és elért egy plató szakaszt. Ettől a ponttól kezdve a hosszabb inkubációs idők és magasabb teljes M3G-mennyiség ellenére a luminális M3G-tartalom nem nőtt tovább, hanem az elért magas koncentráción stagnált.



2. ábra: Az *in situ* keletkező M3G akkumulációja intakt mikroszómában

Az *in situ* morfológiai glukuronidáció során mért eredményeket összevetettük azokkal az értékekkel, amiket az extra- és intravezikuláris glukuronidkoncentráció kiegyenlítődése után mérhetünk. Ehhez a mikroszómák kívülről adott M3G jelenlétében hosszasan inkubáltuk, majd az egyensúlyi helyzet beállta után meghatároztuk a minta teljes M3G-tartalma és a mikroszómához asszociált M3G-mennyiség közötti összefüggést. Mind intakt, mind permeabilizált mikroszóma esetében lineáris összefüggést tapasztaltunk (2. ábra).

Eredményeink azt mutatják, hogy *in situ* glukuronidáció esetén, ép membrán mellett a vezikulumok M3G-koncentrációja az egyensúlyi

koncentrációnál jóval magasabb értéket ér el (2. ábra). A morfin glukuronidációja során az újonnan keletkező M3G felhalmozódik a lumenben arra a szintre, amely mellett a kifelé irányuló transzport már lépést tud tartani az UGT aktivitásával. Az általunk leírt jelenség egyben azt is jelenti, hogy a morfin eliminálását végző hepatocitákER-jében egy – a citoplazmától elhatárolt – dinamikus M3G-készlet épül fel, ami megmagyarázhatja azt a korábbi megfigyelést, mely szerint az M3G a patkány májban elkülönült intracellularis frakciót alkot.

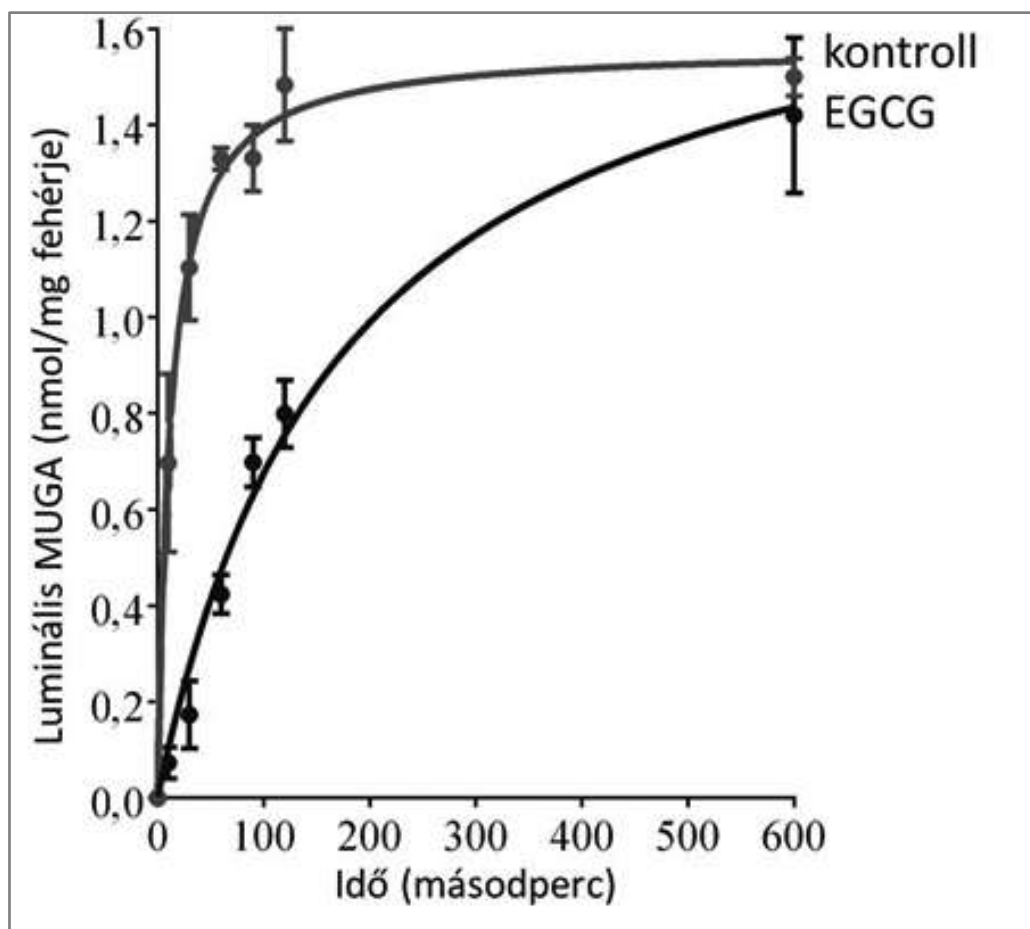
A zöld tea flavanokok glukuronidtranszportra kifejtett hatása

Patkány máj mikroszóma és egér hepatoma sejtek MUGA-hidroláz aktivitásának mérésekor 40% körüli latenciát észleltünk.

A vizsgált zöld tea flavanokok többsége a glukuronidáz aktivitását jelentősen csökkentette intakt mikroszómában, ugyanakkora flavanokok a gallokatekin-gallát (GCG) kivételével hatástalannak bizonyultak permeabilizált membrán mellett. Más megfogalmazásban a katekinek hatására az intakt és a permeabilizált mikroszómában mért aktivitások disszociációját láttuk: a leghatékonyabbnak bizonyuló EGCG és GCG a β -glukuronidáz latenciáját 80% fölé emelte. Az EGCG hatását egér hepatoma sejteken is megvizsgáltuk. A flavanol ebben az esetben sem fejtett ki hatást a membrán permeabilizálása után, míg intakt membránokkal rendelkező sejteken jelentős mértékű gátlást tapasztaltunk.

A flavanokok hatástalansága olyan kísérleti körülmények között, mikor az enzim szabadon hozzáfér szubsztrátjához, azt mutatja, hogy a katekinek a β -glukuronidáz enzimet közvetlenül nem gátolják. A latencia

növekedése arra utal, hogy a flavanolok jelenlétében a glukuronid nehezebben jut el a lúminálisan elhelyezkedő enzimhez, vagyis a katekinok az ER glukuronidtranszportját fékezik. Ezt a feltételezést közvetlen transzportvizsgálataink is alátámasztották. Gyorszűrés segítségével mértük a mikroszómaMUGA-felvételének sebességét kontroll mintákon (EGCG hozzáadása nélkül) és EGCG jelenlétében (3. ábra).



3. ábra: Az EGCG hatása a mikroszómaglukuronidfelvételére

A katekin a transzport kezdeti sebességét jelentősen csökkentette: már 50 μM -os koncentrációban 80% feletti gátlást figyelhettünk meg;

nagyobb koncentrációknál a gátlás a 90%-ot is megközelítette. A mikroszomálisglukuronidfelvétel vizsgálata során EGCG hiányában 2 perc alatt, míg EGCG jelenlétében csak 10 perc alatt állt be az egyensúlyi állapot (3. ábra). Kiemelendő, hogy a flavanol jelenléte nem változtatta meg az egyensúlyi glukuronidkoncentrációt; ezzel kizárhatjuk, hogy az ozmotikus viszonyok és a vezikulumok méretének a megváltozása okozná a transzport látszólagos csökkenését. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a zöld tea katekinek a deglukuronidációt közvetve, a glukuronidtranszport gátlásán keresztül fékezik.

Következtetések

1. Megállapítottuk, hogy intakt patkány máj mikroszómában az *in situ* morfin glukuronidáció során az egyensúlyi koncentrációnál jóval magasabb lúminális M3G-koncentráció épül fel, tehát az M3G, a lassú kiáramlás következtében, a lumenben felhalmozódik.
2. Az újonnan keletkező M3G lúminális felhalmozódása megmagyarázza azokat a korábbi eredményeket, melyek szerint a konjugátum a citoplazmától elkülönülten helyezkedik el a sejtben; egyben felveti annak lehetőségét, hogy a glukuronidtranszport bizonyos esetekben a glukuronidációsebességmeghatározó lépése lehet.
3. A gallo- és/vagy gallátcsoporttal rendelkező zöld tea flavanolk a mikroszomálisglukuronidáz aktivitást jelentősen csökkentették ép membrán mellett, míg membránpermeabilizálás után egyedül a GCG fejtett ki szignifikáns hatást. A glukuronidbontást gátló hatást EGCG esetében intakt hepatoma sejteken is bizonyítottuk. Az általunk leírt jelenség, a deglukuronidáció – ép membrán mellett megfigyelt – gátlása hozzájárulhat a zöld tea ismert kemopreventív hatásához.
4. Közvetlen transzportmérések segítségével igazoltuk, hogy az EGCG fenti hatását a mikroszomálisglukuronidtranszport gátlásán keresztül fejtik ki. Az általunk vizsgált glukuronid ER-membránon keresztüli mozgását a flavanol koncentrációfüggő módon gátolja. Azonosítottunk tehát egy, a korábban alkalmazott általános aniontranszport-gátló és tiol-alkiláló szereknél lényegesen specifikusabb, hatékony és nem toxikus gátlószert,

amely a mindeddig azonosítatlan glukuronid-transzporter(ek) további vizsgálata során hasznos segítséget nyújthat.

Saját közlemények jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Révész K**, Tüttö A, Margittai É, Bánhegyi G, Magyar JÉ, Mandl J, Csala M.(2007)
Glucuronidetransportacrosstheendoplasmicreticulummembrane is inhibitedbyepigallocatechingallate and othergreen tea polyphenols. International Journal of Biochemistry and CellBiology, 39: 922-930
IF: 4,009
2. **Révész K**, Tóth B, Staines AG, Coughtrie MW, Mandl J, Csala M.(2013) Luminalaccumulation of newlysynthesized morphine-3-glucuronide inratlivermicrosomalvesicles. Biofactors, 39(3): 271-278
IF: 3,088

A disszertációtól független közlemények

1. **Révész K**, TüttöA, Konta L.(2007) Zöldtea-flavanolok hatása az endoplazmás retikulum működésére. Orvosi Hetilap, 40: 1903-1907
2. **Révész K**, TüttöA, Szelényi P, Konta L. (2011) Tea flavan-3-ols asmodulatingfactorsinendoplasmicreticulumfunction. Nutrition Research, 31(10): 731-740 IF: 1,974
3. Konta L, Száraz P, Magyar JÉ, **Révész K**, Bánhegyi G, Mandl J, Csala M.(2011) Inhibition of glycoproteinsynthesisintheendoplasmicreticulumas a

novel anticancer mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate.
Biofactors, 37(6): 468-476 IF: 4,933

4. Szelényi P, **Révész K**, Konta L, TüttöA, Mandl J, Kereszturi É, Csala M.(2013) Inhibition of microsomal cortisol production by (-)-epigallocatechin-3-gallate through a redox shift in the endoplasmic reticulum - A potential new target for treating obesity-related diseases. Biofactors, 39(5): 534-541 IF: 3,088