

Témavezető neve: Dr. Kardon Tamás Zoltán

A téma címe: Mikroszómális glukóz-6-foszfát szerepe granulocita apoptózisában

A kutatás időtartama: 2004 - 2007

Tudományos háttér

A glukóz-6-foszfát multienzim-komplex a máj endoplazmás retikulumában található. Eddigi ismereteink szerint a komplexet négy fehérje alkotja. Ezekből két génnek a mutációi ismertek, amelyek az 1-es típusú, ún. von Gierke kórt hozzák létre. Az egyik a glukóz-6-foszfát enzim génje, a másik a glukóz-6-foszfát transzporter génje, amely lehetővé teszi az enzimaktivitást. A von Gierke kór ritka autoszómális recesszíven öröklődő anyagcsere-betegség, amely a máj glukóz-6-foszfát rendszerének zavara miatt alakul ki.

Glukóz-6-foszfát transzporter hiányos betegekben nemcsak máj és veseérintettség figyelhető meg, mint az enzimhiányos esetekben, hanem ehhez még leukocita defektusok is társulnak. A kutatás előzményeként kimutattuk, hogy granulocita mikroszómákban megtalálható a májban jelenlevő glukóz-6-foszfát transzporttal megegyező folyamat. Kísérleti eredményeink szerint a transzportnak antiapoptotikus szerepe van leukocitákban és differenciálódott humán HL60-as sejtekben, amely antioxidánsokkal gátolható. A transzportot funkcionálisan jellemeztük, azonban a transzporter jelenlétére közvetlen bizonyítékunk nem volt. Az irodalomban a transzporter molekulásúlya szintén kérdéses, hiszen a feltételezett fehérjeszekvenciából számolt és a transzportert túltermelő sejtekből izolált fehérje migrációjából kapott eredmények nem támasztják egymást alá.

Kérdés, hogy a granulocitákban, ahol nem folyik glukoneogenezis, a glukóz-6-foszfát milyen más folyamatokhoz kellhet, hogyan metabolizálódik tovább, milyen metabolikus utakban vesz részt? Máj endoplazmás retikulumában a glukóz-6-foszfáton kívül jelen van egy másik enzim a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz, amelyik szubsztrátként szintén glukóz-6-foszfátot használ fel. Ez az enzim NADPH-t termel glukóz-6-foszfát jelenlétében. NADPH-t a máj endoplazmás retikulumában a 11-béta-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es típusa használhatja fel, oly módon, hogy az inaktív kortizont kortizollá redukálja. Fiziológiásan az enzim folyamatosan redukálja az oxidált kortizont. Granulocitákban nem ismert ezeknek az enzimeknek a jelenléte.

Az, hogy az apoptózis létrejöttében milyen mechanizmusok játszanak szerepet, és hogy a transzporter hiánya milyen apoptotikus utakat indít be, eddig nem volt ismert. Mivel apoptózist kiváltó jelek az endoplazmás retikulumból is kiindulhatnak, kérdés, hogy a granulociták endoplazmás retikulumában jelen lévő glukóz-6-foszfát transzporter befolyásolja-e az endoplazmás retikulum lumenének redox státuszát, illetve hiányában létrejön-e olyan változás, ami apoptózishoz vezet. Amennyiben az apoptózist kiváltó, illetve az apoptózisban szerepet játszó folyamatokat megismerjük, úgy ezeknek a befolyásolásával csökkenthető pl. a fokozott fertőzésveszély azokban a von Gierke kóros betegekben, akiknél a transzporter hiánya csökkent granulocita funkciót okoz.

Eredmények

A glukóz-6-foszfát transzporter kimutatása granulocitában

Eddigi kísérleteink funkcionálisan igazolták májban és humán granulocitákban egy máj típusú glukóz-6-foszfát transzporter jelenlétét. A transzporter közvetlen kimutatására antitestet termeltettünk, és először olyan szövetben kerestünk egyértelmű választ, ahol a transzporter nagy mennyiségben jelen van és így könnyebben kimutatható. Nyulakat immunizáltunk a transzporter citoplazmába nyúló kacsainak szintetizált polipeptidjeivel. 3 különböző peptid ellen termeltettünk antitesteket, ezek közül kettő aminosavszekvencia elleni antitest volt specifikus. Western blottal és immunhisztokémiai módszerekkel bizonyítottuk, hogy az antitestek felismerik a humán máj, a patkány máj és vese mikroszómákban a glukóz-6-foszfátot. A transzportert túltermeltettük HEK293 és COS sejtekben, amelyekben szintén immunreaktívnak bizonyult az antitest. Immunhisztokémiai készítményen a Kupffer sejtek, endotheliális sejtek és a vese glomerulusai nem adtak immunreaktivitást. Az azonosított fehérje molekulatömege kisebbnek mutatkozott a számítottnál. A transzporter számos transzmembrán régióval rendelkezik, amelyek megváltoztatják a fehérje migrációját denaturáló gélben és ebből adódhatott az eltérés. A transzporterrel túltermeltetett sejtekben magasabb glukóz-6-foszfát transzportot tudunk mérni, mint a kontrollokban, ami alátámasztja az immunreaktivitással kapott eredményeket. Immunoblottal agyból, és harántcsíkt izomszövetből származó mikroszómák valamennyivel magasabb molekuláris tömegű fehérjére utaló reaktív csíkot adtak. Ennek feltehetőleg az a magyarázata, hogy ezekben a szövetekben a glukóz-6-foszfát transzporter mRNS-nek egy izoformája kódolja a transzportert, amit „agy” típusú formának is hívják. Ebben az mRNS-ben egy járulékos exon -

a 7-es exon - is megtalálható, ami a máj típusában nem. Ez az mRNS forma 66 bázispárral hosszabb, ezért az általa kódolt fehérje molekulásúlya ennek megfelelően nagyobb. Miután májban és granulocitákban hasonló tulajdonságú glukóz-6-foszfát transzportot mutattunk ki, ezért a májon elért pozitív eredményeket felhasználva az előbbieken ismertett antitesteket használtuk arra, hogy humán granulocitákban és HL-60-as sejtekben is kimutassuk a transzportert. Eredményeink szerint granulocitákban és differenciált HL-60-as sejtekben jelen van a glukóz-6-foszfát transzporter, viszont hiányzik Jurkat sejtekből és a differenciálatlan HL60-as sejtekből. Ezzel direkt módon sikerült igazolnunk a fehérje expresszióját granulocitákban és differenciált HL-60-as sejtekben is.

A glukóz-6-foszfát intraluminális metabolizmusa granulocita mikroszómában

Granulociták nagyon kevés mikroszómális membránt tartalmaznak, ezért kísérleteinket először máj mikroszómákon végeztük el, és kerestük a glukóz-6-foszfát metabolizmusának eddig kevésbé ismert útjait. Laboratóriumunkban megállapítottuk, hogy a máj endoplazmás retikulumában található 11- β hidroxiszteroid dehidrogenáz I-es típusú izoenzime (11 β HSDH-I) a glukóz-6-foszfát oxidációjából keletkező NADPH-t használja fel a kortizon hidrokortizonná való redukálásához. Ehhez a lépéshez szükség van hexóz-6-foszfát dehidrogenázhoz is. Ez utóbbi intraluminális enzim az ER-ben, működése majdnem analógja a citoplazmában is fellelhető glukóz-6-foszfát dehidrogenáznak. Az enzim bifunkcionális: dehidrogenáz és laktonáz aktivitással rendelkezik, működéséhez NADPH-ra van szükség és a glukóz-6-foszfátot alakítja 6-foszfoglukonáttá. Munkacsoportunk kimutatta, hogy máj mikroszómában ugyanazt a NADP(H)-t használja fel mind a két enzim. Amennyiben a májban található enzimek megtalálhatóak humán granulocitákban is, úgy a granulocita ER-ben is feltételezhető a glukóz-6-foszfát hasonló metabolizmusa. Granulocitákról nem rendelkezünk adatokkal ezeknek az enzimeknek a jelenlétére. RT-PCR-ral kimutattuk, hogy a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz és a 11 β HSDH-I mRNS-e expresszálódik granulocitákban. A glukóz-6-foszfát transzporter jelenlétére már volt előzőleg adatunk. Western-blot analízissel fehérje szinten is kimutattuk mind humán granulocitákon, mind pedig differenciált HL-60-as sejteken a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz és a 11 β HSDH-I fehérjéjét. Ezzel egyrészt kiindulópontot kaptunk a glukóz-6-foszfát további metabolizmusára, másrészt viszont egyértelmű bizonyítékot kaptunk arra, hogy a granulociták rendelkeznek kortikoszteroid hormont - kortizont/hidrokortizont – metabolizálni képes enzimmel.

Máj mikroszómákban mérhető hexóz-6-foszfát dehidrogenáz és 11 β HSDH-I enzimaktivitás. A mérés a NADPH koncentráció változásának követésén alapul és fluoriméterrel detektálható. Ezt a módszert adaptáltuk granulocitákra. Granulocita mikroszómákon mérhető enzimaktivitást mutattunk ki mind hexóz-6-foszfát dehidrogenáz, mind 11 β HSDH-I esetében. Hexóz-6-foszfát dehidrogenáz esetében glukóz-6-foszfát függő NADPH képződés volt mérhető, miután a mikroszómális membránt permeabilizáltuk. NADP/NADPH-ra az endoplazmatikus membrán nem permeábilis, így a mikroszómális preparációnk intaktságára ezt a jelenséget mintegy belső kontrollként is használtuk. A latencia jelensége endoplazmás retikulum esetében ismert jelenség, azt mutatja, hogy az enzim katalitikus centruma intraluminálisan helyezkedik el. 6-foszfoglukonát dehidrogenáz a rendszerhez adva további NADPH generálást figyeltünk meg. Ez egyrészt igazolja a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitását, mivel a végtermék 6-foszfoglukonát, másrészt azt is sugallja, hogy granulocita mikroszómákban nem található meg a pentóz foszfát út többi enzime mivel a 6-foszfoglukonát nem metabolizálódott tovább. Az intraluminálisan termelődött 6-foszfoglukonát metabolizmusát, esetleges transzporter jelenlétét a közeljövőben tervezzük megvizsgálni.

A 11 β HSDH-I enzim aktivitását kortizol képződésével a klinikumban használatos módon RIA segítségével próbáltuk mérni. Méréseink nem adtak értékelhető eredményt sem granulocitákkal, sem a differenciált és dedifferenciált HL-60-as sejtekkel történő kísérletek esetében. Feltehetőleg ennek a sejtek alacsony 11 β HSDH-I aktivitása az oka. A sejtek által termelt kis mennyiségű kortizolt végül HPLC-s mérésekkel detektáltuk. Miután ez a módszer bonyolult és költséges, így áttértünk a fluoriméteres mérésekre. Igazoltuk, hogy a membránok permeabilizálását követően kortizon hozzáadásával NADPH fogyást, illetve kortizol és NADP jelenlétében NADPH képződést figyeltünk meg. Ez alátámasztja azt a megfigyelést, amely szerint a 11 β HSDH-I *in vitro* oxoreduktázként viselkedik. Méréseink a májhoz hasonló glukóz-6-foszfát transzporter/hexóz-6-foszfát dehidrogenáz/11 β HSDH-I rendszer létezését erősítik meg granulocitákban is.

Kortizol antiapoptotikus hatása granulocitákon

Korábbi eredményeink szerint a glukóz-6-foszfát transzportot klorogénsavszármazékkal - S3483 - gátolva apoptózist tudunk létrehozni granulocitákban és differenciálódott HL60-as sejtekben.

Kortizolt adva glukóz-6-foszfát transzporter gátolt granulocitákhoz a fokozott apoptózis nem volt megfigyelhető, a kortizol önmagában viszont nem befolyásolta a nem kezelt granulociták apoptózisát. Amennyiben a granulocitákat glukóz-6-foszfát transzporter gátlószerrel, kortizollal, és karbenoxolonnal - 11 β HSDH-I gátlószerrel - kezeltük egyszerre, úgy szintén fokozott apoptózist figyeltünk meg granulocitákban. Ez utóbbi alátámasztja elképzelésünket, miszerint az apoptózist a NADPH/NADP arány megváltozása indíthatja el. Kortizol hozzáadásával a 11 β HSDH-I kortizol reduktázként viselkedik, és NADPH-t termel. Ezzel *in vivo* is igazoltuk a 11HSDH-I enzim aktivitását, illetve a glukóz-6-foszfát transzporter/hexóz-6-foszfát dehidrogenáz/11 β HSDH-I fehérjehármas funkcionális kapcsolatát granulocitában. Korábbi kísérleteink szerint antioxidánsokkal is csökkenthető a glukóz-6-foszfát transzporter kiváltotta apoptózis. Összevetve ezeket az eredményeket feltételezzük, hogy a glukóz-6-foszfát transzporter gátlásával létrehozott apoptózisban az endoplazmás retikulum megváltozott intraluminális redox állapotának, ezen belül is a NADPH/NADP aránynak van szerepe.

Apoptotikus utak vizsgálata

A tervzet szerint vizsgáltunk egyes kezdeti intra és extraluminális jelpályákat/utakat is, amelyek apoptózishoz vezethetnek a glukóz-6-foszfát transzporter gátlása kiváltotta fokozott sejthalál során. Feltételezéseink szerint amennyiben a kiváltott apoptózist specifikus kaspázok aktiválásával, mennyiségének változásával meg tudjuk mérni, úgy azokból az apoptózis jellegére következtethetünk. Ha a májban található és mérhető intramikroszomális oxidoreduktázokat tudjuk detektálni granulocitákban is, úgy azoknak a változása utalhat az intraluminális megváltozott redox viszonyokra. Humán granulocitákon, és differenciált, illetve nem differenciált HL-60-as sejteken a kiváltott apoptózis jellegének meghatározására kaspázokat (Casp3, Casp8, Casp12), proapoptotikus fehérjéket (GADD153/CHOP, Bcl-x1) és az endoplazmás retikulum egyes rezidens oxidoreduktázainak (ERP72, PDI), mennyiségi változását is vizsgáltuk. Ezek a kísérleteink egyelőre folyamatban vannak, mivel nem adtak értékelhető eredményt a beinduló apoptózis jellegére. Egyértelmű eredmények érdekében a

kísérleteket még pontosítani kell, illetve specifikálni granulocitákra, amit a közeljövőben tervezünk elvégezni.

Eredményeinket összefoglaló kézirat formájában elkészítettük, elbírálásra elküldtük (Kardon T. és mtsi.: Maintenance of luminal NADPH in the endoplasmic reticulum promotes the survival of human neutrophil granulocytes).