

Pro- és antioxidáns hatások szerepe az endoplazmás retikulum eredetű stresszben és apoptózisban

Az endoplazmás retikulum (ER) számos környezeti és metabolikus hatás szenzora. Mindazon tényezők, melyek károsan befolyásolják a szekréciónak fehérjék poszttranszlációs módosítását és foldingját az ER lumenében, a fehérjék felhalmozódásához vezetnek, és kiváltják az ER stressz jelenségét. A stresszben jelpályák (*unfolded protein response, endoplasmic reticulum overload response*) indulnak be az ER és a sejtmag között, melyeknek hatására a fehérjeszintézis csökken, viszont szelektíven indukálódnak a poszttranszlációs módosításokért felelős enzimek és az intraluminális dajkafehérjék. Huzamosan fennálló stressz esetén beindulnak a programozott sejthalál mechanizmusai. Az experimentális ágensekkel (fehérjeglikoziláció gátlószer, intraluminális kalciumot csökkentő szerek, intraluminális redoxpotenciált befolyásoló redukálószer) kiváltható ER stressz és apoptózis mellett a folyamat számos humán kórkép (cisztikus fibrózis, Alzheimer kór, diabetes, vírusfertőzések stb.) patomechanizmusában is szerepel.

A pályázat eredeti célja kettős volt. Egyrészt tanulmányozni kívántuk redox aktív vegyületek, antioxidánsok és hepatotoxinok szerepét az ER eredetű stresszben és apoptózisban, másrészt egy új lehetséges stresszmechanizmust, a redox hatásokra bekövetkező ER membrán permeabilitásváltozást akartuk vizsgálni. Az első kérdéskört három kísérleti rendszerben tanulmányoztuk:

- *In vivo* aszkorbáthiányos állapotban (skorbutban) vizsgáltuk az ER stressz kialakulását. Előzetes eredményeink szerint az aszkorbinsav fontos szerepet játszik a diszulfid kötések kialakításához szükséges elektrontranszferben, tehát feltehetően kiválthatja az ER stresszt.
- A neutrofil granulocita ER membrán glukóz-6-foszfát transzporterének genetikai hiánya, illetve a transzport gátlása apoptózishoz vezet; a folyamatban szerepet tulajdonítanak az intraluminális redox státusz változásának. Vizsgálni kívántuk az apoptózis eredetét, az ER szerepét, illetve a folyamat patomechanizmusát.
- A hepatotoxinok nagy része az ER-ban aktiválódik, illetve metabolizálódik. A folyamat befolyásolhatja a lokális redoxpotenciált. Feltételeztük, hogy ezen vegyületek toxikus, illetve apoptotikus hatásárt – a korábbi hipotézisekkel szemben – az ER stressz legalább részben felelős.

A pályázat beadása után láttak napvilágot olyan eredmények, melyek az ER intraluminális dehidrogenázainak, elsősorban a hexóz-6-foszfát dehidrogenáznak (H6PDH) szerepét jelezték

a lumen redox viszonyainak alakításában. Vizsgálatainkat ezért kiterjesztettük ebbe az irányba, az alábbi kérdésköröket tanulmányozandó:

- Mi a szerepe a H6PDH-nak a glukokortikoidok prereceptorális aktiválódásában? Mely sejtekben található meg ez az összefüggés?
- Mi a szerepe a H6PDH-nak az intraluminális NADPH pool redox állapotának fenntartásában? Más dehidrogenázok részt vesznek-e a folyamatban?
- A luminális NADPH redox állapota hogyan befolyásolja a sejtek életképességét? Van-e piridin nukleotid-függő ER stressz?

A vizsgálatokat in vivo, valamint sejt kultúrákon és ER/SR eredetű mikroszómális vezikulákon végeztük.

Kimutattuk, hogy korábbi hipotézisünknek megfelelően az aszkorbinsav hiánya endoplazmás retikulum stresszt okoz, mely a legfontosabb intraluminális chaperonok indukciójával jár, illetve későbbi fázisban apoptózisba torkollik (1). Megállapítottuk, hogy az aszkorbinsav szintézis melléktermékeként az ER lumenben keletkező hidrogén-peroxid az ER membrán specifikus permeabilitásváltozását okozza, mely lehetővé teszi az antioxidáns hatások érvényesülését az ER lumenben (22).

Megállapítottuk, hogy a hepatotoxikus acetaminofen ER eredetű apoptózist indukál a májban. In vivo acetaminofen alkalmazás után az ER stresszhez kötődő jelpályák aktiválódnak, és az apoptózis kezdeti jelei is észlelhetők (8).

Kimutattuk, hogy az intraluminális piridin nukleotidok túlnyomórészt redukált állapotban vannak, és (a citoszólban tapasztaltaktól eltérően) nem kommunikálnak a tiol-diszulfid redox rendszerrel (4). Igazoltuk, hogy a FAD emlős sejtekben is oxidálja az ERO1p-PDI elektronátvivő láncot. Az oxidatív hatáshoz az endoplazmás retikulum membrán épsége elengedhetetlen (2).

Megállapítottuk, hogy az ER-ből származó mikroszómális vezikulák megtartják piridin nukleotid tartalmukat. A piridin nukleotidok döntően redukált formában vannak jelen, mely látszólagos ellentétben áll a tiolok (glutation, fehérje tiolok) túlnyomórészt oxidált állapotával. A két rendszer szétkapcsolását az okozza, hogy a glutation reduktáz nincs jelen a lumenben (3,4). Az intraluminális piridin nukleotid pool jelenléte magyarázatot ad a korábban leírt szoros kooperációra a H6PDH és a 11 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz között: a kapcsolat a kolokalizáción és a közös kofaktoron alapul (3,4). A kooperációt igazoltuk máj (4), zsírszövet (10), és granulocita (17) mikroszómákon egyaránt. Megállapítottuk, hogy a luminális piridin nukleotidok redukált állapota elengedhetetlen a preadipocita differenciálódáshoz (18). A

NADPH pool redox állapota viszont nem a H6PDH indukció következménye; a H6PDH expressziója állandó a preadipociták differenciációja során (19). A H6PDH mellett az izocitrát dehidrogenáz részvételét is valószínűsítettük a NADPH redox állapotának fenntartásában (16).

Kimutattuk, hogy az ER transzlokon peptid csatornája aspecifikus módon nemcsak kationok és töltéssel nem rendelkező kis molekulák, hanem szerves anionok (UDP-glukuronsav, mannóz-6-foszfát stb) membrántranszportját is elősegítheti. A jelenségnek szerepe lehet az intraluminális aktív centrummal rendelkező enzimek szubsztrátellátásában (6). A transzlokon kalcium csatornaként is funkcionálhat (13). A transzlokon szerepét a kis molekulák transzportjában reviewban foglaltuk össze (15).

Kimutattuk, hogy a zöldtea fitofarmakonjai, köztük a legnagyobb mennyiségben jelenlevő epigallokatechin-gallát (EGCG) gátolják az ER lumenben a glukozidáz II aktivitását. A gátlás lassíthatja a glikoproteinek minőségellenőrzését (7). Ennek megfelelően megállapítottuk, hogy a minőségellenőrzés gátlása ER stresszt okoz, valamint fokozza az apoptózis gyakoriságát hepatóma sejtvonalon (23).

A zöldtea fitofarmakonok erőteljes transzportgátló hatással is rendelkeznek az ER-ban. Az EGCG gátolja az ER membránon keresztüli glukuronidtranszportot is, mely hatás csökkentheti a xenobiotikumok reaktivációját (9). Az EGCG korábban megfigyelt számos hatása mellett az általunk leírt új támadáspontok további magyarázatot adhatnak a zöldtea in vivo megfigyelt jótékony hatásaira. A zöldtea fitofarmakonjai gátolják a glukóz-6-foszfát rendszer aktivitását is. A gátlásért a glukóz efflux gátlása felelős, a glukóz-6-foszfát transzport és a glukóz-6-foszfát hidrolízis sebessége változatlan (12). Az EGCG korábban megfigyelt számos hatása mellett az általunk leírt új támadáspontok további magyarázatot adhatnak a zöldtea in vivo megfigyelt jótékony hatásaira.

Új és korábbi eredményeinket több reviewban foglaltuk össze, melyek az ER lumen mint önálló metabolikus kompartmentum létét hangsúlyozzák, valamint kiemelik a redox változások jelentőségét az ER eredetű stresszben és apoptózisban (5); az ER lumen redox homeosztázisának szerepét hangsúlyozzák az ER stressz patomechanizmusában (14), kiemelik az ER transzporterek jelentőségét az ER lumen mint önálló metabolikus kompartmentum homeosztázisának fenntartásában (11), valamint leírják eme folyamatok jelentőségét a neurodegenerációban és más idegrendszeri folyamatokban (21).

A pályázat keretében végzett munkát két review foglalja össze, melyekben kísérletet teszünk az ER mint szenzor organellum szerepének bemutatására. Az ER számos extra- és

intracelluláris stimulus szenzora, eredményeink az intraluminális redox mint jelátvivő szerepét valószínűsítik (24,25).

1. Margittai É., Bánhegyi G., Nagy G., Kiss A., Mandl J., Schaff Z., Csala M.: Scurvy leads to endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the liver of guinea pigs. *J. Nutr.* 135, 2530-2534, 2005
2. Papp E., Nardai G., Mandl J., Bánhegyi G., Csermely P.: FAD oxidizes the Ero1-PDI electron transfer chain. The role of membrane integrity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 938-945, 2005
3. Czegle I., Piccirella S., Senesi S., Csala M., Mandl J., Bánhegyi G., Fulceri R., Benedetti A.: Cooperativity between 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase is based on a common pyridine nucleotide pool in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Endocrinol.* 248, 24-25, 2006
4. Piccirella S., Czegle I., Lizák B., Margittai É., Senesi S., Papp E., Csala M., Fulceri R., Csermely P., Mandl J., Benedetti A., Bánhegyi G.: Uncoupled redox systems in the lumen of the endoplasmic reticulum: pyridine nucleotides stay reduced in an oxidative environment. *J. Biol. Chem.* 281, 4671-4677, 2006
5. Csala M., Bánhegyi G., Benedetti A.: Endoplasmic reticulum: A metabolic compartment. (review) *FEBS Lett.* 580, 2160-2165, 2006
6. Lizák B., Czegle I., Csala M., Benedetti A., Mandl J., Bánhegyi G.: Translocon Pores in the Endoplasmic Reticulum Are Permeable to Small Anions. *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.* 291, C511-517, 2006
7. Gamberucci A., Konta L., Colucci A., Giunti R., Magyar É.J., Mandl J., Bánhegyi G., Benedetti A., Csala M.: Green tea flavonols inhibit glucosidase II. *Biochem. Pharmacol.* 72, 640-646, 2006

8. Nagy G., Kardon T., Wunderlich L., Szarka A., Kiss A., Schaff Zs., Bánhegyi G., Mandl J.: Acetaminophen induces ER dependent signaling in mouse liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 459, 273–279, 2007
9. Révész K., Túttó A., Margittai É., Bánhegyi G., Mandl J., Csala M.: Glucuronide transport across the endoplasmic reticulum membrane is inhibited by epigallocatechin gallate and other green tea polyphenols. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 922-930, 2007
10. Marcolongo P., Piccirella S., Senesi S., Wunderlich L., Gerin I., Mandl J., Fulceri R., Bánhegyi G., Benedetti A.: The glucose-6-phosphate transporter - hexose-6-phosphate dehydrogenase - 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 system of the adipose tissue. *Endocrinology* 148, 2487-2495, 2007
11. Csala M., Marcolongo P., Lizák B., Senesi S., Margittai É., Fulceri R., Magyar É.J., Benedetti A., Bánhegyi G.: Transport and transporters in the endoplasmic reticulum (review). *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 1768, 1325-1341, 2007
12. Csala M., Margittai É., Senesi S., Gamberucci A., Bánhegyi G., Mandl J., Benedetti A.: Inhibition of hepatic glucose 6-phosphatase system by the green tea flavanol epigallocatechin gallate. *FEBS Lett.* 581, 1693-1698, 2007
13. Giunti R., Gamberucci A., Fulceri R., Bánhegyi G., Benedetti A.: Both translocon and a cation channel are involved in the passive Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum: a mechanistic study on rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 115-121, 2007
14. Bánhegyi G., Benedetti A., Csala M., Mandl J.: Stress on redox. *FEBS Lett.* 581, 3634-3640, 2007
15. Lizák B., Csala M., Benedetti A., Bánhegyi G.: The translocon and the non-specific transport of small molecules in the endoplasmic reticulum. *Mol. Membr. Biol.* 25, 95-101, 2008

16. Margittai É., Bánhegyi G.: Isocitrate dehydrogenase: a NADPH generating enzyme in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* 471, 184–190, 2008
17. Kardon T., Senesi S., Marcolongo P., Legeza B., Bánhegyi G., Mandl J., Fulceri R., Benedetti A.: Maintenance of luminal NADPH in the endoplasmic reticulum promotes the survival of human neutrophil granulocytes. *FEBS Lett.* 582, 1809-1815, 2008
18. Senesi S., Marcolongo P., Gava B., Fulceri R., Sorrentino V., Margittai É., Lizák B., Csala M., Bánhegyi G., Benedetti A.: Metyrapone prevents cortisone-induced preadipocyte differentiation by depleting luminal NADPH of the endoplasmic reticulum. *Biochem. Pharmacol.* 76, 382-390, 2008
19. Senesi S., Marcolongo P., Manini I., Fulceri R., Sorrentino V., Csala M., Bánhegyi G., Benedetti A.: Constant Expression of Hexose-6-Phosphate Dehydrogenase during Differentiation of Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells. *J. Mol. Endocrinol.* 41, 125–133, 2008
20. Czegle I., Margittai É., Senesi S., Benedetti A., Bánhegyi G.: Different expression and distribution of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obese and lean animal models of type 2 diabetes. *Acta Physiol. Hung.* 95, 419-424, 2008
21. Bánhegyi G., Mandl J., Csala M.: Role of endoplasmic reticulum redox imbalance in neuronal cell death. *J. Neurochem.* 107, 20-34, 2008
22. Margittai É., Löw P., Szarka A., Csala M., Benedetti A., Bánhegyi G.: Intraluminal hydrogen peroxide induces a permeability change of the endoplasmic reticulum membrane. *FEBS Lett.* 582, 4131-4136, 2008
23. Magyar J.É., Gamberucci A., Konta L., Margittai É., Benedetti A., Bánhegyi G., Mandl J., Csala M.: Endoplasmic reticulum stress underlying the pro-apoptotic effect of epigallocatechin gallate in mouse hepatoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 694-700 (2009)

24. Bánhegyi G., Csala M., Benedetti A.: Hexose-6-phosphate dehydrogenase: linking endocrinology and metabolism in the endoplasmic reticulum. *J. Mol. Endocrinol.* (in press) <http://dx.doi.org/10.1677/JME-08-0156>.
25. Mandl J., Mészáros T., Bánhegyi G., Hunyady L., Csala M.: Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. *Trends Endocrinol. Metab.* (accepted)