

AZ ARZENÁT REDUKCIÓJA ARZENITTÉ – EGY TOXIFIKÁLÁSI FOLYAMAT BIOKÉMIAI HÁTTERE

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Dr. Németi Balázs

Akkreditált Ph.D. program: A-144, Toxikológia

Program- és témavezető: Dr. Gregus Zoltán, egyetemi tanár, DABT



**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet**

Pécs

2006

BEVEZETÉS

Az arzénvegyületek toxicitása és sorsuk a szervezetben

Az arzén az ókor óta ismert elemek közé tartozik. Hírhedtté vegyületének, az arzén trioxidnak (As_2O_3) a nagyfokú akut toxicitása tette. Noha az akut arzénmérgezés ma már nagyon ritka, az ókortól egészen a XIX. század közepéig a cianid mellett a legjelentősebb gyilkossági és öngyilkossági mérgező volt (Jolliffe, 1993). A krónikus arzénmérgezés sajnos sokkal gyakoribb. A legjelentősebb, nagy népességeket érintő expozíciós forrás a szennyezett ivóvíz, amelyben főleg arzenát (As^{V}) alakjában fordul elő, de kisebb mennyiségben arzenit (As^{III}) is jelen lehet. Krónikus expozíció következtében bőrelváltozások, központi idegrendszeri rendellenességek, perifériás érbetegség alakulhat ki (Chen és mtsai, 1985; Goyer és Clarkson, 2001), sőt, emberi szervezetben az arzénvegyületek daganatkeltők (IARC, 2002; Gebel, 2001; Goering és mtsai, 1999). Az arzénvegyületek gyógyszerként történő felhasználása szintén az ókorig nyúlik vissza, bár napjainkra az arzén daganatkeltő hatása miatt jelentősen visszaszorult. Érdekes módon, kifejezett karcinogenitása ellenére, az As_2O_3 -ról nemrég mutatták ki, hogy akut promyelocytas leukaemiában (APL) szenvedő betegekben teljes gyógyulás érhető el vele. További kísérletek során más daganatos sejtekben (pl. petefészek, méhnyak, nyelőcső, gyomor eredetű rákok, neuroblastoma, myeloma) is képes apoptosist kiváltani, ezért hatásos lehet más rosszindulatú megbetegedésekben is. Az As_2O_3 kezelésnek azonban sok és jelentős mellékhatása van, amelyek az arzén mérgező tulajdonságának a következményei.

Az arzenát és arzenit kémiai reaktivitása és mérgező hatásának mechanizmusa. Az As^{V} szerkezete nagyon hasonló a szerves ortofoszfátéhoz (P_i), ezért élő szervezetek és sejtek az As^{V} -ot P_i transzport rendszereiken keresztül veszik fel (Csanaky és Gregus, 2001; Dixon, 1997; Rosen, 2002). A sejtekben az As^{V} enzimreakciókban helyettesítheti a P_i -ot, ami arzenát észterek és anhidridek képződéséhez vezet (Chan és mtsai, 1969; Dixon, 1997; Hughes, 2002). Míg azonban a P_i észterek és anhidridek megfelelően stabilak vizes környezetben, az As^{V} észterei és anhidridjei meglehetősen bomlékonyak, mert a hosszabb As–O kötés vízmolekulák számára jól hozzáférhető, így a kötés hidrolizál (Dixon, 1997). Ez a mechanizmus azonban csak nagyon magas As^{V} koncentráció (sok mM) mellett okoz mérgezési tüneteket. Az As^{V} mérgező hatásáért főleg a szervezetben belőle képződő három vegyértékű és sokkal mérgezőbb metabolitok a felelősek.

A háromvegyértékű arzénvegyületek sokkal mérgezőbbek, mint ötvegyértékű megfelelőik, ugyanis jelentős kovalens reaktivitást mutatnak tiol csoportok iránt. Az As^{III} monotiolokkal (pl. cisztein, glutation) viszonylag labilis, míg ditiolokkal (pl. dihidroliponsav, ditiotretiol, dimerkapto-propanol) meglehetősen stabil komplexet képez (Knowles, 1985; Knowles és Benson, 1983). A metilezett háromvegyértékű arzén metabolitok szintén tiol-reaktívak, de ezek már monotiolokkal is stabilabb komplexet alkotnak (Knowles és Benson, 1983). Erős tiol-reaktivitásuk miatt sok fehérje működését gátolják, ezáltal a sejtek anyagcseréjét számos különböző ponton képesek megzavarni. Ráadásul magasabb koncentrációban (1-10 μM) oxidatív stresszt okoznak, ami mutációk kialakulásához vezethet, de már alacsonyabb koncentrációban is elősegíthetik más ágensek (pl. UV sugárzás, alkilező szerek) mutagén és karcinogén hatásait (Bernstam és Nriagu, 2000; Gebel, 2001; Rossman, 2003; Rossman és mtsai, 2002; Shi és mtsai, 2004; Wang és mtsai, 2001).

Az arzenát és az arzenit sorsa a szervezetben. Az As^{III} és az As^{V} jól felszívódik a bélcsatornából mind emberben, mind a legtöbb emlős fajban (Vahter, 1983). A sejtek az As^{V} -ot a szervetlen foszfát (P_i) felvételéért felelős transzportereken keresztül veszik fel (Csanaky és Gregus, 2001; Dixon, 1997), míg az As^{III} valószínűleg aquaporin csatornákon és ekvibratív glükóz transzportereken át jut be (Liu és mtsai, 2004a, 2004b).

A sejtekben a szervetlen arzén erőteljesen metabolizálódik, amely redukciós és oxidatív metilációs lépések váltakozását foglalja magába (Aposhian, 1997; Ishinishi és mtsai, 1986; Vahter, 1999). Az As^{V} először As^{III} -té redukálódik glutation (GSH) és eddig nem azonosított enzimek közreműködésével (Thomas és mtsai, 2001). Az így képződött As^{III} monometilarzenáttá (MMAs^{V}) metileződik. A MMAs^{V} monometilarzenitté (MMAs^{III}) redukálódik, amely tovább metileződik dimetilarzenáttá (DMAs^{V}). Végül a DMAs^{V} dimetilarzenitté (DMAs^{III}) redukálódik. Mások szerint azonban mindez a valóságban nem így történik. Szerintük a metilációs lépések alatt az arzén végig háromvegyértékű marad, a metiláció nem oxidatív, és az ötvegyértékű metabolitok az arzén metabolizmus zsákutcáinak tekinthetők (Hayakawa és mtsai, 2005).

A háromvegyértékű arzénvegyületek kiválasztódhatnak mind az epébe mind a vizeletbe, míg az ötvegyértékűek kizárólag a vizelettel ürülnek (Csanaky és Gregus, 2002; Gregus és mtsai, 2000). Szervetlen arzén expozíció után az elsődleges kiválasztási út a vizelet. A szervetlen alakok mellett (As^{III} és As^{V}) MMAs^{V} és DMAs^{V} a fő metabolitok a vizeletben. A széklet arzéntartalma részben a bélcsatornába került és fel nem szívódott részben pedig az epével ürített mennyiségből származik. Az arzén széklettel történő

ürítése azonban erősen korlátozott, mert noha az epével jelentős mennyiség választódik ki, a kiválasztott GSH-komplexek labilisak, és bomlásuk után a háromvegyértékű arzén ismét felszívódhat (Klaassen, 1974).

Fontos megjegyezni, hogy az ötvegyértékű arzénvegyületek redukciója háromvegyértékűvé jelentős toxikálási lépés, mert az utóbbiak nagyon toxikusak, míg az előbbiek viszonylag mentesek ilyen hatástól (Thomas és mtsai, 2001). Ugyanezen az alapon a háromvegyértékű vegyületek oxidatív metilációja detoxikálásnak tekinthető. A leggyakoribb környezeti szennyező As^V szerkezetbeli sorsában az első lépés As^{III} -té történő redukciója. Ez nemcsak egy jelentős toxikálási folyamat, hanem egyúttal mindenképpen megelőzi a metilezett metabolitok képződését is. Méregtani jelentősége ellenére az As^V redukciójának biokémiai mechanizmusait eddig csak mikroorganizmusokban tisztázták, és munkánk előtt As^V -reduktáz aktivitással bíró emlős enzimet nem azonosítottak.

Az arzenát redukciója

Az arzenát redukciója mikroorganizmusokban. Prokariótákban az As^V As^{III} -té redukálódik, amelyet azután a sejt kijuttat a külső környezetébe. Baktériumokban több olyan enzimet is azonosítottak, amely As^V redukciót katalizál. Egy különös baktériumfaj, a *Chrysiogenes arsenatis*, az As^V -ot oxigén helyett képes használni a légzéséhez, miközben As^{III} -et termel (Krafft és Macy, 1998). Oxigénmentes környezetben de As^V jelenlétében a *C. arsenatis* sejtek jól nőnek.

Az *Escherichia coli* R773 plazmidja egy operont tartalmaz, amely az As^V redukciójáért és az As^{III} exportjáért felelős. Az arzénrezisztenciát okozó génsorozatot "ars operon"-nak nevezik, amely négy fehérjét kódol. Ezek közül egy regulatórikus (ArsR), a másik három strukturális (ArsA, ArsB és ArsC). Az ArsC az As^V -reduktáz, míg az ArsA és ArsB kapcsolt ATP-függő As^{III} exporterként működik (Rosen és mtsai, 1991), amely az As^{III} mellett antimonitot is exportál. Az ArsC által katalizált As^V redukció glutation (GSH) és glutaredoxin (Grx) jelenlététől függ, és oxidált glutationt (GSSG) termel (Gladysheva és mtsai, 1994).

A *Staphylococcus aureus* pl258-as plazmid ars operonja az arzén rezisztencia fehérjék egy szerkezetileg eltérő családját kódolja, amely csak három tagból áll, nevezetesen az arsR, arsB és arsC-ből. Az *E. coli*-hoz hasonlóan az ArsR regulatórikus fehérje, az ArsC pedig a redukáló enzim. Az ArsB azonban nem ATP-, hanem membrán potenciál-függő As^{III} exporter (Guangyong és mtsai, 1994). A pl258 ArsC katalitikus

mechanizmusát “dynamic disulfide cascade”-nak nevezik (Messens és mtsai, 2002). Alapvetően eltér az *E. coli* R773 plazmid ArsC mechanizmusától, ugyanis a *S. aureus* enzim esetében a három, As^V redukcióban közreműködő tiol csoport az enzim fehérjéhez tartozik, és a redukció során keletkező enzimen belüli diszulfidot tioredoxin regenerálja. Ráadásul az enzim tartalmaz egy specifikus anion-kötő motívumot (P-loop), amelynek a szekvenciája Cys-X₅-Arg. Ez a motívum az alacsony móltömegű tirozin-foszfátázok katalitikus centrumára jellemző.

A *Saccharomyces cerevisiae* genomjában az *acr1*, *acr2* és *acr3* génsorozat felelős a szerves arzénal (azaz As^V és As^{III}) szembeni rezisztenciáért. Az Acr1p a génsor regulátora, míg az Acr2p és Acr3p strukturális fehérjék As^V-reduktáz illetve As^{III} exporter feladattal (Bobrowicz és mtsai, 1997). Érdekes, hogy az Acr2p, az első azonosított eukarióta As^V-reduktáz, egyfelől a *S. aureus* (pl258) ArsC As^V-reduktázzal mutat szerkezeti hasonlóságot, hiszen e fehérje aktív centruma is tartalmazza a tirozin-foszfátázokra jellemző Cys-X₅-Arg motívumot. Másfelől az Acr2p funkcionálisan az *E. coli* (R773) ArsC As^V-reduktáz analógja, mert csak akkor mutat redukáló aktivitást, amikor mind GSH mind Grx jelen vannak mint elektron donorok (Mukhopadhyay és mtsai, 2000).

Fontos kiemelni, hogy ezekben a mikrobiális eredetű nem-respiratórikus As^V-reduktáz enzimekben három tiol csoport közreműködése szükséges a megfelelő funkcióhoz. Közülük egy mindig az enzimhez tartozik, míg a másik két tiol tartozhat az enzimhez (ahogy a *S. aureus* ArsC esetén), de érkezhetsz GSH és Grx formájában is (ahogy az *E. coli* ArsC vagy az élesztő Acr2p esetén).

Az arzénát redukciója emlősökben. Emlős szervezetekben az As^V gyorsan redukálódik a sokkal toxikusabb As^{III}-té, hiszen As^V adagolást követően az As^{III} hamar (5 percen belül) megjelenik laboratóriumi állatok vérében, epéjében, vizeletében és szöveteiben (Csanaky és Gregus, 2005; Thomas és mtsai, 2001). Ennek ellenére a mi munkáink előtt nem azonosítottak olyan enzimet, amely közreműködik ebben a folyamatban. Kimutatták, hogy GSH képes kémiai redukálni az As^V-ot (Delnomdedieu és mtsai, 1994a), bár a két reaktáns koncentrációja fiziológiailag nem releváns (300 mM illetve 150 mM). Az As^V redukciója GSH-függő egér embrió sejtekben (Bertolero és mtsai, 1987), valamint GSH-függő az As^V metabolizmusa és kiválasztása is patkányban *in vivo* (Gyurasics mtsai, 1991). Nemrégiben közvetlenül bizonyították, hogy az As^V *in vivo* redukciója valóban a GSH ellátottságtól függ (Csanaky és Gregus, 2005).

Így tehát az As^V redukciója, amely az élő szervezetben történő átalakulásának első lépése, nemcsak az As^V metabolizmusában, hanem mérgező és daganatkeltő

tulajdonságaiban is meghatározó jelentőségű, hiszen e biokémiai reakció terméke az igen erősen mérgező As^{III} . A folyamat fontossága és mechanizmusának tisztázatlansága indította el kutatásainkat, amelyeknek célja az As^V redukció biokémiai hátterének jobb megértése volt abban a reményben, hogy sikerül azonosítani olyan sejten belüli frakciót esetleg konkrét enzimet, amely képes katalizálni az As^V átalakulását As^{III} -té.

KUTATÁSI CÉLOK

Fő célunk volt olyan enzimek azonosítása, amelyek képesek katalizálni az As^V redukcióját. Meghatároztuk, hogy mely sejtfrakció redukálja az As^V -ot. A megfigyelt aktivitást biokémiailag jellemeztük, hogy következtetni tudjunk a közreműködő enzim sajátosságaira. Ezt követően specifikus gátlószerek és tiszta enzimek felhasználásával megpróbáltuk közvetlenül is bizonyítani a kérdéses enzim szerepét. Kérdéseink a következők voltak:

1. Vajon patkánymájából izolált és As^V -tal inkubált mitokondriumok redukálják-e az As^V -ot As^{III} -té? A mitokondriumok felveszik az As^V -ot (Chan és mtsai, 1969; Wohlrab, 1986), és mivel hasonlítanak a baktériumokhoz, amelyek redukálják az As^V -ot, és exportálják a képzett As^{III} -et, ezek az organellek szintén képesek lehetnek az As^V redukciójára. Ha valóban, hogyan befolyásolja a mitokondriumok funkcionális állapota (amelyre respiratorikus szubsztrátok, az As^V -hoz szerkezetileg hasonló anionok, GSH tartalom, valamint az oxidatív foszforiláció gátlói és szétkapcsolói hatnak) az As^{III} képződését As^V -ból? Exportálják-e a mitokondriumok a képzett As^{III} -et? Megőrzik-e a szolubilizált mitokondriumok As^V redukáló aktivitásukat ezáltal lehetővé téve a mitokondriális As^V -reduktáz tisztítását és azonosítását?
2. Szerepelnek-e mitokondriumon kívüli enzimek az As^V redukciójában? Vajon a patkánymáj posztmitokondriális sejtfrakciói (vagyis a mikroszóma és a citoszól) és emberi vörösvértetek (amelyekben nincs mitokondrium) redukálják az As^V -ot As^{III} -té? Milyen biokémiai jellemzői (tiol függés, valamint szerves foszfát, nukleotidok, tiol reaktív vegyületek, enzimek és anyagcsereutak szubsztrátjainak és gátlóinak a hatása) vannak a megfigyelt As^V redukáló aktivitásnak? E biokémiai jellemzők alapján melyik lehet a katalizáló enzim?
3. Ha találunk egy enzimet, amely képes redukálni az As^V -ot *in vitro*, mi a jelentősége az As^V anyagcseréjében *in vivo*? Ez egy fontos kérdés, mert nem elég kimutatni, hogy egy enzim *in vitro* redukálja az As^V -ot, az élő szervezetben játszott szerepét is meg kell vizsgálni.

MÓDSZEREK

Állatok

Általában 250-300 g közötti hím Wistar patkányokat (*Rattus norvegicus Wistar*) használtunk. Amikor azonban az As^V-reduktáz aktivitásban mutató fajok közötti különbségeket hasonlítottuk össze, dolgoztunk még CFLP egerekkel (*Mus musculus CFLP*, 33-36 g), angol rövidszőrű tengerimalacokkal (*Cavia porcellus*, 400-450 g), szíriai aranyhörcsögökkel (*Mesocricetus auratus*, 80-100 g) és New Zealand fehér nyulakkal (*Oryctolagus cuniculus N. Z. white*, 1.8-2.5 kg). Az állatokat 12 órás világos/sötét ciklusban szobahőmérsékleten tartottuk 55-65% relatív levegő páratartalom mellett. Rágcsáló illetve nyúl eledelt és csapvizet a szükségleteik szerint kaptak. Valamennyi kísérletünket a Magyar Állatvédelmi Törvény előírásainak betartásával és a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérleti Etikai Bizottsága által hozott szabályoknak megfelelően végeztük.

Kezelések

Kezelések glutation depletorokkal. Néhány patkányt intraperitoneális injekció formájában a következő GSH depletor szerekekkel kezeltünk: butionin-szulfoximin (BSO, 5 mmol/kg, 6 órával a mitokondriumok izolálása előtt), dietilmaleát (DEM, 6 mmol/kg, 3 óra), foron (2 mmol/kg, 3 óra). Az így előkezelt patkányok májából mitokondriumot izoláltunk.

Kezelések BCX-1777-tel. A BCX-1777 a purin-nukleozid-foszforiláz gátlója. Hogy meggyőződjünk az *in vivo* hatékonyságáról, patkányokat uretánnal (1.2 g/kg, ip) érzéstelenítettünk (5 ml/kg), majd egy medián hasi bemetszésen át a vesegyököket lekötöttük, hogy megakadályozzuk a szer gyors vizelettel történő kiválasztását. Az állatok ezután BCX-1777-et kaptak (50 µmol/kg, iv) fiziológiás sóoldatban (2 ml/kg) a bal *vena saphena*-n át. 15 perccel a BCX-1777 adása után a májat a *vena portae*-n át jéghideg fiziológiás sóoldattal perfundáltuk, gyorsan eltávolítottuk és homogenizáltuk, végül a citoszól frakciót izoláltuk.

A BCX-1777 hatását az As^V *in vivo* biotranszformációjára az előzőekben leírt módon előkészített patkányokon vizsgáltuk. 15 perccel a BCX-1777 adása után az állatok As^V-ot kaptak (50 µmol/kg, iv). Néhány patkány 2 perccel az As^V adása előtt DTT-t is kapott (300 µmol/kg, iv).

Kezelések (S)-α-klorohidrinrel. Hogy megállapítsuk az (S)-α-klorohidrin (ACH) hatását szövetek glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz és As^V-reduktáz aktivitására, patkányoknak ACH-t (100 vagy 200 mg/kg, ip) vagy fiziológiás sóoldatot (3 ml/kg, ip)

injektáltunk. Három órával később máj, vese és izom szövetmintákat vettünk, és belőlük citoszól frakciót izoláltunk.

Az ACH hatását az As^V *in vivo* redukciójára két külön kísérletben vizsgáltuk. A patkányokat, 3 órával az As^V adása előtt, mindkét kísérletben előkezeltük ACH-nel (100 mg/kg vagy 200 mg/kg) vagy fiziológiás sóoldattal (3 ml/kg). Az As^V adását közvetlenül megelőzően az első kísérlet állatai epevezeték lekötésen estek át (BDL-patkányok), míg a második kísérlet állatainak mind az epevezetékét, mind a vesegyökét leköttük (BDRPL-patkányok).

Sejtfrakciók és vörösvértestek preparálása As^V -reduktáz aktivitás méréséhez

Sejtfrakciók izolálása. Sejtfrakciókat (pl. mitokondriumok, citoszól) korábbi leírások alapján differenciál centrifugálás módszerével izoláltuk patkányok májából (Hobgeboom, 1955). A preparálás minden lépése 0-4 °C közötti hőmérsékleten zajlott. Az egyes izolált frakciók fehérje koncentrációját biuret (Gornall és mtsai, 1949) vagy bicinkoninsav (Brown és mtsai, 1989) módszerrel határoztuk meg.

Emberi vörösvértest szuszpenzió preparálása. Kísérleteinket a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával végeztük. Vért (körülbelül 5 ml) egészséges felnőtt önkéntesektől vettünk megfelelő tájékoztatás és hozzájárulás után. Vörösvértestekkel (RBC) végzett kísérleteink során mind a sejtsuszpenzió mosása, mind pedig az inkubáció klorid és foszfát ionoktól mentes pufferben történt, mert ezek az anionok gátolják az As^V bejutását a RBC-be.

Enzimatiszus esszék

Az izolált sejtfrakciókat As^V -tal inkubáltuk 37°C-on különböző teszt vegyületek jelenlétében. Az inkubációkat As^V hozzáadásával indítottuk, és fehérjekicsapó szerrel állítottuk le.

A respirációs hányados meghatározásához a mitokondriumok oxigén fogyasztását Clark-elektrod segítségével mértük szobahőmérsékleten. A respirációs hányados kiszámításához a State III oxigénfogyasztás sebességét elosztottuk a State IV sebességével.

Szövetminták és mitokondriumok GSH koncentrációját Tietze (1969), míg a nem-protein tiol (NPSH) tartalmat Sedlak és Lindsay (1968) módszere szerint mértük meg.

A purin-nukleozid-foszforiláz aktivitást Kalckar spektrofotometriás eljárása (1947) alapján határoztuk meg. A gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) aktivitását a

NADH koncentráció (0,25 mM) csökkenése alapján mértük meg, amelynek során a küvettában zajló gliceraldehid-3-foszfát képződést követtük 3-foszfoglicerátból (5 mM) feleslegben levő ATP és foszfoglicerát-kináz jelenlétében.

Az arzenát biotranszformáció vizsgálata patkányokon

Az As^V *in vivo* redukciójában megvizsgáltuk azon enzimek szerepét, amelyekről *in vitro* körülmények között azt találtuk, hogy képesek katalizálni az As^V átalakulását As^{III} -té. Ezen kísérleteinket élő, altatott patkányokon végeztük. A patkányok altatása és sebészi előkészítése az adott kísérlet célkitűzéseinek megfelelően változott (az egyes kísérletek részletei a megfelelő közlemények Módszer részében található). Ezt követően a patkányoknak intravénásan As^V -ot adtunk (50 μ mol/ttkg), és 20 perces szakaszokban epe és/vagy vizeletmintákat gyűjtöttünk 60 percig, majd szövetmintákat vettünk azzal a céllal, hogy bennük az As^V és az As^V -ből képződött metabolitok (As^{III} , $MMAs^V$, $MMAs^{III}$, $DMAs^V$) mennyiségét megmérjük.

Az arzénvegyületek mérése

Mintaelőkészítés. Az As^V -reduktáz esszéből származó inkubátumokban a fehérjét kicsaptuk, majd a mintákat lecentrifugáltuk. Az így kapott felülúszóban mértük az arzénvegyületek koncentrációját. Az élő patkányokon végzett kísérletekből származó epe-, vizelet- és szövetmintákat azonnal feldolgoztuk. Az epe és vizeletmintákat fehérjementesítettük, megfelelően hígítottuk, majd ebből mértük az arzénvegyületek koncentrációit. Az *in vivo* kísérletekből származó vérmintákat előbb Triton X-100-zal kevertük össze, majd vizes $HgCl_2$ oldatot adtunk hozzá, hogy leszorítsuk a tiol-kötött arzénvegyületeket, végül perklórsavval fehérjementesítettük és lecentrifugáltuk. Az így nyert felülúszóban megmértük az egyes arzénvegyületek koncentrációját. A lemert szövetmintákat perklórsavban homogenizáltuk, $HgCl_2$ oldatot adtunk hozzá, végül lecentrifugáltuk. A felülúszóban mértük az arzénvegyületek koncentrációját.

Arzénvegyületek mérése HPLC–HG–AFS eljárással. Az As^V -tal injektált patkányokból származó biológiai mintákban és az As^V -reduktáz esszé inkubátumaiban az egyes arzénvegyületeket HPLC-vel szeparáltuk, majd hidridképzést követően atomfluoreszcenciás spektrométerrel (HPLC–HG–AFS) mértük. A módszer alapjait Gomez-Ariza és mtsai (1998), míg részleteit Gregus és mtsai (2000) dolgozták ki.

EREDMÉNYEK

Az arzenát mitokondriális redukciója

Háttér

A környezetben gyakori As^{V} élő szervezetbe kerülve metabolizálódik, amelynek első lépése redukciója As^{III} -té (Thomas és mtsai, 2001). E fontos toxikálási folyamatnak azonban sem a celluláris lokalizációja nem ismert, sem a benne közreműködő enzimek. Megfigyelték az As^{V} redukcióját sejt kultúrákban (Bertolero és mtsai, 1987; Huang és Lee, 1996), nyúl vörösvértestekben (Delnomdedieu és mtsai, 1995) és emberi máj citoszóljában (Radabaugh és Aposhian, 2000), de a résztvevő enzimet nem azonosították. Baktérium és élesztő sejtek felveszik környezetükből az As^{V} -ot, majd GSH- és Grx-függő vagy tioredoxin-függő módon As^{III} -té redukálják. A képzett As^{III} -et azután aktív transzport (ATP vagy membránpotenciál energiájával) kipumpálják a sejtből

A mitokondriumok szintén felveszik az As^{V} -ot a P_i felvételért felelős transzporterek – a foszfát-transzporter (Chan és mtsai, 1969; Wohlrab, 1986) és a dikarboxilát-transzporter (Indiveri és mtsai, 1989) – közvetítésével. As^{V} -tal injektált nyulak veséjében megfigyelték az arzén mitokondriális felhalmozódását (Vahter és Marafante, 1989). Az As^{V} magas koncentrációban, foszfátmentes közegben szétkapcsolja az oxidatív foszforilációt (Crane és Lipmann, 1953), mert az ATP-szintáz ATP helyett ADP-arzenátot termel, amely vizes közegben gyorsan hidrolizál ADP-re és As^{V} -ra. Ez a szétkapcsoló mechanizmus kivédhető oligomicinnel (Estabrook, 1961), amely gátolja az ATP-szintázt. A mitokondriumokról azt tartják, hogy aerob baktériumokból származnak, és sok tekintetben hasonlítanak a mai baktériumokra. Ezek alapján feltételeztük, hogy képesek lehetnek az As^{V} -ot As^{III} -té redukálni. Ezt tesztelendő megvizsgáltuk, hogy patkánymájából izolált mitokondriumok redukálják-e az As^{V} -ot, és ha igen, milyen jellemzői vannak a folyamatnak.

Eredmények és következtetések

Patkánymájából izolált mitokondriumok gyorsan redukálják az As^{V} -ot As^{III} -té. A citrátkört tápláló szubsztrátok közül a glutamát támogatta az As^{V} redukcióját a legjobban, míg a malát és a szukcinát gátlónak bizonyult, amelynek oka, legalábbis részben, a kompetíció az As^{V} mitokondriális felvételében szereplő dikarboxilát transzporterén. E transzporter szervesen szubsztrátjai (pl. szulfát, szulfid, tioszulfát) szintén gátolták a mitokondriális As^{V} redukciót. Dikarboxilát vegyületek hiányában az As^{V} bejuthat a mitokondriumba mind a foszfát, mind a dikarboxilát transzporterén keresztül (Chan és

mtsai, 1969; Wohlrab, 1986). E fehérjék gátlószerei (pl. *N*-etilmaleimid, merzalil és butilmalonát) teljesen gátolták a mitokondriális As^{III} képzést, amelynek legvalószínűbb oka az As^V bejutásának gátlása. A P_i koncentráció-függő gátló hatása az As^V redukcióra azonban nemcsak a felvétel gátlásán keresztül jöhet létre, hanem a redukáló enzimen is, hiszen a két oxianion szerkezete nagyon hasonló. ADP fokozta, míg ATP és AMP csökkentette az As^{III} képződését. Hatásukat atraktilozid kivédte. Az elektron transzport gátlói és szétkapcsoló szerek teljesen, míg az ATP-szintáz inhibitorai csaknem teljesen gátolták az As^V redukcióját. A képzett As^{III} visszanyertük a mitokondriális inkubátum felülúszójában, ami arra utal, hogy a mitokondriumok exportálják az As^{III} -et. A tioredoxin-reduktáz gátlói és szubsztrátjai As^V redukcióra gyakorolt hatásának vizsgálata azt mutatta, hogy ez az enzim nem játszik szerepet az As^V mitokondriális redukciójában. Ugyanakkor a mitokondriális GSH depléciója jelentősen gátolta az As^V redukciós aktivitást, noha csökkentette a respirációs hányadost is. A mitokondriumok szolubilizálása teljesen elmosta redukciós aktivitásukat, amely nem volt helyreállítható GSH és NADH vagy NADPH hozzáadásával sem. Összefoglalva: elsőként mutattuk ki, hogy a mitokondriumok képesek az As^V -ot a sokkal mérgezőbb As^{III} -té redukálni. Mikroorganizmusokhoz hasonlóan a mitokondriumok felveszik az As^V -ot, redukálják, majd a képzett As^{III} -et exportálják. E folyamat közben ezek az organellek szorosan szervezett egységként, egyfajta kémiai reaktorként működnek, amely megköveteli mind a strukturális, mind a funkcionális integritásukat. További kísérletek szükségesek a mitokondriális As^V redukció molekuláris mechanizmusaink, valamint a mitokondriumoknak az As^V *in vivo* átalakításában játszott szerepének a tisztázásához.

A purin-nukleozid-foszforiláz mint citoszólbeli arzenát-reduktáz

Háttér

Miután kiderült, hogy patkánymájából izolált mitokondriumok redukálják az As^V -ot a sokkal mérgezőbb As^{III} -té, kérdés volt, hogy vajon más sejtfrakciók is képesek-e erre a fontos toxikálási reakcióra. Emberi máj citoszóljában már találtak As^V -reduktáz aktivitást, amely egy 3000 daltonnál kisebb molekulatömegű hőstabil kofaktor jelenlétét igényelte (Radabaugh és Aposhian, 2000). Mi tehát arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon a patkánymáj posztmitokondriális sejtfrakciói redukálják-e az As^V -ot, és ha igen, milyen jellemzői vannak az aktivitásnak. Végző célunk a közreműködő enzim(ek) azonosítása volt.

Eredmények és következtetések

Patkánymáj posztmitokondriális felülúszójának (PMSN) As^V -tal történt inkubációból kiderült, hogy a PMSN az As^V -ot csak tiol jelenlétében redukálja As^{III} -té. GSH viszonylag gyengén támogatta a PMSN általi As^{III} képződést, míg ditiotreitól (DTT) jelentősen fokozta. Miután szétválasztottuk a mikroszóma és citoszól frakciókat és megvizsgáltuk As^V redukciós aktivitásukat, kiderült, hogy csak a citoszól katalizálja az As^V redukcióját As^{III} -té, a mikroszóma nem. A redukcióért felelős enzim(ek) tehát a citoszólban található(k). Az As^V -hoz szerkezetileg hasonló oxianionok (pl. P_i vagy *o*-vanadát), valamint higanytartalmú tiol reagensek gátolták az As^V redukcióját. Ezek az eredmények egy olyan SH-enzimre utaltak, amelynek van egy, az As^V -ot is befogadni képes, P_i kötőhelye.

Miközben redukciós partnert kerestünk, meglepődve vettük észre, hogy az oxidált piridin nukleotidok (azaz NAD és NADP) jelentősen fokozták a redukció sebességét, a redukáltak azonban nem. E megfigyelések nyomán kipróbáltuk sok más nukleotid hatását is a citoszólbeli As^V redukcióra. Kísérleteink kimutatták, hogy néhány purin nukleotid származék (pl. AMP, GMP, S-adenozilhomocisztein) szintén fokozza a redukciós aktivitást, míg pirimidin nukleotidok nem. Mivel az inkubációk alatt ezek a nukleotidok könnyedén átalakulhatnak nukleozidokká, megvizsgáltuk, hogy a nukleozidok és nukleobázisok milyen hatást fejtenek ki a citoszól As^V -reduktáz aktivitására. A pirimidin nukleozidoknak nem volt hatása, ezzel szemben a purin nukleozidok, különösen a 6-oxopurinok (azaz inozin és guanozin), drámai mértékben növelték azt (80-100-szorosára). Az adenzin (6-aminopurin nukleozid) ennél jóval gyengébbnek bizonyult, ami arra utalt, hogy először az adenzin-dezamináz inozinná kell, hogy alakítsa. A nukleozidokkal ellentétben a 6-oxopurin bázisok igen erős gátló hatást mutattak (80-90%). Mindezen túl, a patkánymáj citoszól ultrafiltrációja egy olyan retentátot eredményezett, amelyből az As^V -reduktáz aktivitás csaknem teljesen hiányzott. A retentát aktivitását teljesen helyre lehetett állítani, ha hozzáadtuk a szűrletet, inozint vagy guanozint. Ezek egyértelműen mutatták, hogy az endogén purin nukleozidok nélkülözhetetlenek a citoszól As^V redukciójához. Ezt a 6-oxopurin nukleozidokkal stimulálható As^V -reduktáz aktivitást egér-, hörcsög-, tengerimalac- és nyúlmáj citoszóljában is kimutattuk.

Ezek az eredmények az alábbi következtetésekhez vezettek: (1) A citoszólbeli As^V -reduktáz megfelelő tiol jelenlétét igényli és tiol reagensekkel gátolható, tehát az enzim valószínűleg funkcionális szempontból kritikus tiol csoporttal bír. (2) P_i gátolja az enzim As^V redukáló aktivitását, tehát P_i kötőhelye van, és a P_i -ot vélhetően szubsztrátként hasznosítja. (3) 6-oxopurin nukleozidok igen erősen növelik az As^V -reduktáz aktivitást,

tehát az enzim a 6-oxopurin nukleozidokat szubsztrátként használhatja. (4) 6-oxopurin nukleobázisok jelentősen csökkentik a redukáló aktivitást, tehát a katalizáló enzim 6-oxopurin nukleobázisokat képezhet.

Az ezeknek a következtetéseknek megfelelő enzim úgy ismert, mint purin-nukleozid-foszforiláz (PNP). A PNP szabad citoszólbeli enzim, amelynek fontos tiol csoportjai vannak (Bzowska és mtsai, 2000; Parks és Agarwal, 1972). Az enzim P_i felhasználásával katalizálja a 6-oxopurin nukleozidok foszforolitikus hasítását a megfelelő nukleobázisra és ribóz-1-foszfátra. Mint sok szervesen P_i -ot használó enzim, a PNP is elfogadja az As^V -ot P_i helyett, és a feltehetően instabil ribóz-1-arsenátot képezi (Kline és Schramm, 1993). Ezért volt érdemes megvizsgálni, hogy vajon a PNP felelős-e a májcitoszól tiol- és purin nukleozid-függő As^V -reduktáz aktivitásáért. A következő kísérleti eredmények igazolják, hogy a PNP működhet As^V -reduktázként: (1) A PNP specifikus és nagyon hatékony gátlói (azaz a BCX-1777 és a CI-1000) koncentráció-függő módon csökkentették a patkánymáj citoszól As^V -reduktáz aktivitását, és már 1 μM koncentrációban is teljes gátlást idéztek elő. (2) A patkánymáj citoszól anioncserélő kromatográfiája során az As^V -reduktáz és a PNP aktivitás együtt eluálódott, erősen valószínűsítve, hogy két aktivitás egyazon fehérjéhez tartozik. (3) Tiszta PNP hatékonyan katalizálta az As^V redukcióját feltéve, hogy nukleozid szubsztrátja és egy megfelelő tiol egyidejűleg jelen voltak. Ez direkt módon is bizonyítja, hogy a PNP valóban működhet As^V -reduktázként. (4) Sok reagens hasonlóan befolyásolta a citoszólbeli és a tiszta PNP által katalizált As^V redukciót. Mindkettőt 6-oxopurin nukleozidok és DTT aktiválta, és mindkettőt gátolták higanytartalmú tiolareagensek, P_i és specifikus PNP gátlók. Ezek a megfigyelések együttesen meggyőzően igazolták, a patkány és más fajok májcitoszóljában kimutatott, DTT által támogatott As^V -reduktáz aktivitás a PNP-hoz köthető. Megfigyeléseink egyben arra is utaltak, hogy az As^V redukciója a 6-oxopurin nukleozidok arsenolitikus hasítása alatt vagy következtében történik.

Eddigi eredményeink egyértelműen bizonyították, hogy a PNP hatékony *in vitro* As^V -reduktáz, így nagyon fontos volt kideríteni, hogy ez a mindenütt előforduló enzim vajon részt vesz-e az As^V *in vivo* redukciójában. Ennek meghatározására két kísérleti megközelítést használtunk. Egyrészt azt vizsgáltuk, hogy különböző vegyületek hasonlóan befolyásolják-e az As^V redukciót intakt emberi vörösvértestekben (RBC), mint amikor tiszta PNP katalizálta a reakciót. A RBC számottevő mértékben redukálták az As^V -ot, amelyet inozinnal vagy inozin plusz DTT-vel fokozni lehetett. Ezek a stimulált As^{III} képződési sebességek PNP-függőek voltak, mert PNP gátlók kivédtek. Kívülről hozzáadott inozin

nélkül azonban a PNP gátlók gyakorlatilag nem befolyásolták a redukció sebességét. Mindez azt jelentette, hogy a RBC alap As^{V} -reduktáz aktivitása független a PNP-tól. Másrészt megvizsgáltuk a PNP szerepét az As^{V} *in vivo* redukciójában úgy is, hogy teszteltük, milyen hatást gyakorol a specifikus és nagyon hatékony PNP gátló BCX-1777 az As^{V} biotranszformációjára kontroll és DTT-vel kezelt patkányokban. Annak ellenére, hogy a májban a PNP aktivitása teljesen megszűnt BCX-1777 hatására, ez a PNP gátló nem befolyásolta sem az As^{III} és MMAs^{III} epével történő kiválasztását, sem az As^{V} és metabolitjainak szöveti koncentrációit. Így tehát jelentős *in vitro* As^{V} redukáló aktivitása ellenére a PNP sem intakt emberi vörösvértestekben, sem patkányban *in vivo* nem játszik lényeges szerepet az As^{V} redukciójában.

A gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz mint citoszólbeli arzenát-reduktáz

Háttér

Az eredmények, amelyek szerint a PNP redukálja As^{V} -ot a sokkal mérgezőbb As^{III} -té, feltéve, hogy nukleozid szubsztrátja és egy megfelelő ditiol együttesen jelen vannak, ígéretesek voltak. Mindazonáltal kiderült, hogy a PNP sem intakt emberi vörösvértestekben, sem patkányban *in vivo* nem járul hozzá számottevően az As^{V} redukációjához. Intakt emberi RBC megőrizték As^{V} redukáló aktivitásuk legnagyobb részét magas koncentrációjú BCX-1777 jelenlétében is. Ráadásul a BCX-1777, amely a PNP nagyon hatékony tranzíciós állapotbeli gátlója, teljesen gátolta az enzimet patkányban, de nem befolyásolta sem az As^{V} eliminációját, sem az As^{V} metabolitok képződését. Ezen felül az a megfigyelés, hogy GSH csak gyengén támogatja a PNP As^{V} -reduktáz aktivitását, noha az As^{V} redukció sejtekben (Bertolero és mtsai, 1987) és patkányokban (Csanaky és Gregus, 2005) nyilvánvalóan GSH-függő, szintén ellentmond a PNP szerepének, mint *in vivo* releváns As^{V} -reduktáz.

Ahogy eddig már kiderült, intakt emberi vörösvértestek redukálják az As^{V} -ot As^{III} -té, amely folyamat döntően független a PNP-tól. Így tehát újabb kísérletsorozatba fogtunk, hogy jellemezzük ezt a PNP-független As^{V} -reduktáz aktivitást azzal a céllal, hogy azonosítsuk az enzimet, amely ezért felelős.

Eredmények és következtetések

A vörösvértestek az As^{V} -ot (és a P_i -ot) a klorid-bikarbonát cseretranszporterrel keresztül veszik fel. Mind a fehérje természetes szubsztrátja (a klorid), mind pedig egy irreverzibilis gátlója (a diizotiocianatostilbén-diszulfonát) gátolta az As^{V} redukcióját As^{III} -té

intakt RBC-ben, de nem hemolizátumban, ami jelezte, hogy a folyamat a sejtek belsejében zajlik. Megállapítottuk, hogy az RBC alap (vagyis PNP-független) As^V redukáló aktivitáshoz GSH szükséges, mert a sejtek GSH tartalmát depletáló dietilmaleát erősen csökkentette az As^{III} képződést. Azt is kimutattuk, hogy az RBC-ben zajló As^V redukció a NAD és/vagy NADP ellátástól függ, mivel a NAD(P)H-t oxidáló vegyületek (pl. piruvát, ferricianid, dehidroaszorbát, 4-dimetilaminofenol) fokozták az As^{III} képződést. Az oxidánsokkal stimulált As^V redukció függetlennek bizonyult a PNP-től (BCX-1777 nem befolyásolta), ugyanakkor GSH-függő, mert a GSH-t depletáló dietilmaleát gátolta. Piruvát előinkubáció, amely a NAD koncentrációját emeli a NADH rovására, fokozta az As^V redukcióját. Ez arra utalt, hogy a vörösvértetekben zajló As^V redukció egyrészt NAD ellátást igényel, másrészt pedig a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáztól (GAPDH) kezdődően az alsó glikolitikus apparátus működését. Ez a rész, a GAPDH-t megelőző szakasztól eltérően, továbbra is ellátott marad szubsztráttal, köszönhetően a vörösvértetekben nagy mennyiségben levő 2,3-biszfoszoglicerát lebontásának. A szubsztrátok azonban nem juthatnak a GAPDH fölé, hiszen ehhez NADH lenne szükséges, amely azonban a piruvátos előkezelés következtében nem áll rendelkezésre. Fluorid az enoláz gátlásával leállítja a glikolízist. Glükózzal kellően ellátott RBC-ben gátolta az As^V redukciót, míg glükóz hiányos (NAD-ban gazdag) sejtekben fokozta azt. Ez alapján feltételeztük, hogy a glikolízis As^V redukcióhoz kötött szakasza valószínűleg a GAPDH és az enoláz között van.

A PNP-független As^V -reduktáz aktivitás további jellemzése érdekében kísérleteinket RBC lizátumon és patkánymáj citoszólón folytattuk, megvizsgálva a GSH, szervetlen foszfát, néhány glükóz metabolizmust gátló vegyület, számos glikolitikus szubsztrát, valamint piridin és adenin nukleotidok hatását az As^V redukcióra a PNP gátló BCX-1777 jelenlétében. Hemolizátumban a GSH koncentrációtól függően segítette az As^V redukcióját, míg foszfát gátolta azt. Glikolitikus szubsztrátok, főleg a fruktóz-1,6-biszfoszfát és a foszfoglicerátok, támogatták az As^V -reduktáz aktivitást. NAD, különösen ezekkel a szubsztrátokkal együtt nagyon megnövelte az As^{III} képződést, míg NADH erősen gátolta. NADP és az adenin nukleotidok csökkentették, míg a 2-foszfoglikolát, amely gyorsítja a RBC-specifikus 2,3-biszfoszoglicerát lebomlását a glikolízisbe belépő 3-foszfoglicerátra, megduplázta az As^V -reduktáz aktivitást. A patkánymáj citoszólóban zajló As^V redukció hasonlóan változott GSH, NAD és glikolitikus szubsztrátok hatására, mint a hemolizátumban. A NADH azonban csak alig befolyásolta, a 2-foszfoglikolát gátolta, míg a NADP nemhogy nem gátolt, hanem még stimulált is. Az eddigieket összefoglalva:

hemolizátumban és patkánymáj citoszólban jelen van egy PNP-független As^V -reduktáz aktivitás, amely GSH-t, NAD-ot és glikolitikus szubsztrátot igényel. A GSH igény és a higanytartalmú tiolreagensek iránti érzékenység kritikus tiol csoportok jelenlétére utal. A foszfoglicerát-mutázban ilyen csoportok nincsenek, amely kizárja ezt az enzimet, mint jelölt As^V -reduktáz. Ezzel szemben a funkcionálisan összekapcsolt két glikolitikus enzim, a GAPDH és a foszfoglicerát-kináz (PGK) tartalmaz ilyen csoportokat. Ezért és mivel szubsztrátjaik fokozták az As^V redukciót a leginkább, a GAPDH és a PGK érdeklődésünk középpontjába kerültek, mint lehetséges As^V redukáló enzimek.

Feltevésünket tesztelve, amely szerint a GAPDH és a PGK közül egyik vagy másik, esetleg mindkettő redukálja az As^V -ot As^{III} -té, azt találtuk, hogy a két tiszta enzim keveréke valóban katalizálta az As^V redukcióját, amikor GSH, NAD és glikolitikus szubsztrát is jelen volt. További elemzés kimutatta, hogy az As^V -reduktáz aktivitás a GAPDH-hoz kötődik, míg a PGK csupán segédenzimként működik, amikor 3-foszfoglicerát a glikolitikus szubsztrát. A GAPDH egyedül katalizálta As^V redukciót feltéve, hogy GSH, NAD és gliceraldehid-3-foszfát együttesen jelenvoltak. ADP és ATP viszonylag gyengén, míg NADH még NAD jelenlétében is erősen gátolta az enzim As^V -reduktáz aktivitását. Koninginsav (KA), a GAPDH egy specifikus irreverzibilis gátlója, nemcsak az enzim klasszikus aktivitását, hanem As^V -reduktáz aktivitását is gátolta koncentrációja függvényében. Hogy felmérjük a GAPDH részeseését a hemolizátumban, patkánymáj citoszólban és intakt vörösvértestekben zajló As^V redukcióban, meghatároztuk a KA koncentráció-függő hatását e sejtextaktumok As^V -reduktáz aktivitására. A GAPDH inaktiválása KA által az As^V redukciós aktivitás megszűnését eredményezte intakt RBC-ben, valamint a két sejtextaktumban is, amikor a GAPDH ez utóbbiakban bőséges exogén szubsztrát és NAD ellátással bírt. Amikor azonban sem kívülről hozzáadott glikolitikus szubsztrát, sem NAD nem volt jelen, a májcitoszólban jelentős As^V redukáló aktivitás maradt a GAPDH teljes inaktiválása ellenére is, ami arra utal, hogy a GAPDH-n kívül más citoszólbéli enzim(ek) is hozzájárulhatnak az As^V redukációjához a májban. Összefoglalva: a glikolízis egyik kulcsenzimje, a GAPDH, „véletlen módon” képes katalizálni az As^V redukcióját, ha GSH, NAD és glikolitikus szubsztrátok rendelkezésre állnak. Az As^V redukciója valószínűleg annak a tioészter kötésnek az arzenolitikus hasítása során vagy következtében történik, amely az enzim Cys149 és a szubsztrát 3-foszfogliceroil csoportja között jön létre.

A következő nagyon fontos kérdés az volt, hogy vajon a GAPDH szignifikáns mértékben működik-e közre az As^V redukációjában *in vivo*. A kérdés indokoltságát

legjobban a PNP példázza, amely *in vitro* nagyon hatékony As^V -reduktáz, de *in vivo* nem. Feltételeztük, hogy a GAPDH jelentősen hozzájárul az As^V biotranszformációjához *in vivo*. Ezt tesztelendő megvizsgáltuk, hogy milyen hatást fejt ki a patkányban zajló As^V redukcióra az (S)- α -klorohidrin (ACH), amely *in vivo* – feltehetően leginkább a májban – átalakul a GAPDH-t inaktiváló metabolittá. Ezek a kísérletek megerősítették a GAPDH *in vitro* szerepét, mint As^V -reduktáz. Három órával patkányoknak történt beadását követően az ACH (100 vagy 200 mg/kg, ip) mind a GAPDH mind az As^V redukáló aktivitást drámaian csökkentette a májcitoszolban, míg a vese citoszolban csak mérsékelten, az izom citoszolban pedig egyáltalán nem befolyásolta. Ezenfelül mind kontroll, mind ACH-kezelt patkányokból származó citoszolban az As^V redukáló aktivitás szoros korrelációt mutatott a GAPDH aktivitással. Két zavaró hatás (egy kismértékű csökkenés a máj glutation szintjében és emelkedés az As^V vizelettel történő ürítésében) miatt az ACH hatását az injektált As^V sorsára olyan patkányokban vizsgáltuk, amelyeknek az epevezetékét, vagy pedig az epevezetékét és vesegyökét is lekötöttük. Kísérleteink kimutatták, hogy az As^V retenciója a májban szignifikáns mértékben emelkedett, míg az As^V metabolitok együttes szintje csökkent. Az ACH azonban nem késleltette lekötött kiválasztási utakkal bíró patkányok vérben az As^V koncentrációjának csökkenését. A GAPDH-t inaktiváló ACH tehát a májban gátolja az As^V redukcióját, de a teljes testben nem. Ennek valószínű oka, hogy a májban megzavart redukciót olyan más májbeli és májon kívüli As^V redukciós mechanizmusok egyenlítik ki, amelyeket az ACH hatása nem érint. Az a legvalószínűbb, hogy az ACH elsősorban a GAPDH inaktiválása miatt gátolja a májban az As^V redukcióját, noha ehhez az ACH kismértékű GSH depletáló hatása is hozzájárulhat. Eredményeink támogatják ugyan azt a következtetést, hogy a GAPDH a májban részt vesz az As^V redukációjában, de további kutatás szükséges a GAPDH szerepének megerősítéséhez az As^V *in vivo* redukációjában.

ÚJ EREDMÉNYEK

1. Elsőként mutattuk ki, hogy patkánymájából izolált mitokondriumok felveszik az As^V -ot, redukálják azt, majd a képzett As^{III} -et exportálják. Az As^V mitokondriális redukciója az organellumok strukturális és funkcionális integritását egyaránt megkívánja. Mivel szervesen foszfát élettani koncentrációkban igen erősen csökkenti a mitokondriális As^V redukciót, a mitokondriumok hozzájárulása az As^V *in vivo* redukációjához valószínűleg jelentéktelen.

-
2. Nemcsak máj mitokondriumok, hanem májcitoszól is képes As^{V} -ot As^{III} -té redukálni, méghozzá tiol-függő módon. Az egyik citoszólbéli As^{V} -reduktáz aktivitást az élettani szempontból irreleváns tiol vegyület, a DTT valamint purin nukleozidok (különösen 6-oxopurinok) támogatják, míg 6-oxopurin bázisok és higanytartalmú tiol reagensek gátolják. Megfigyeltük, hogy a purin nukleozidok és DTT által támogatott As^{V} redukáló aktivitásért a purin-nukleozid-foszforiláz (PNP) a felelős. Ezt bizonyítja, hogy (1) az As^{V} -reduktáz és PNP aktivitások a citoszól fehérjék anioncserélő kromatográfiája során együtt eluálódnak; (2) az As^{V} redukáló aktivitás érzékenysége PNP gátlókra (BCX-1777 és CI-1000); valamint (3) tiszta PNP redukálja az As^{V} -ot, ha megfelelő tiol (pl. DTT) és PNP szubsztrát (inozin vagy guanozin) együttesen jelen vannak. Ez a DTT-vel stimulálható és PNP gátlókkal gátolható As^{V} -reduktáz aktivitás nemcsak patkányok, hanem egerek, hörcsögök, tengerimalacok és nyulak májcitoszóljában is kimutatható. Az enzim gátlói nemcsak a klasszikus biokémiai aktivitását, hanem As^{V} -reduktáz aktivitását is gátolják.
 3. Annak ellenére, hogy a PNP *in vitro* megfelelő körülmények között gyorsan redukálja az As^{V} -ot, *in vivo* nem vesz részt az As^{V} redukációjában. Ezt a következtetést az a megfigyelés támogatja, hogy BCX-1777 patkányoknak adagolva teljesen gátolja a májban a PNP aktivitását, de nem befolyásolja az As^{V} *in vivo* metabolizmusát és eliminációját még akkor sem, amikor az állat kapott DTT-t, amely aktiválja a PNP által katalizált As^{V} redukciót.
 4. Intakt emberi vörösvértestek a klorid-bikarbonát cseretranszporterén keresztül felveszik az As^{V} -ot, és As^{III} -té redukálják. Az eritrociták As^{V} -reduktáz aktivitását inozin és/vagy DTT megnöveli. Ez a növekmény PNP-függő, mert a PNP gátló BCX-1777 kivédi. Ugyanakkor a vörösvértestek alap As^{V} redukációs aktivitása független a PNP-től, mivel az enzim gátlása nem befolyásolja.
 5. Az emberi vörösvértestek PNP-független As^{V} -reduktáz aktivitása függ egyrészt a sejteken belüli GSH mennyiségétől, hiszen a GSH-t depletáló DEM gátol, másrészt a NAD koncentrációjától, mert NADH-t NAD-dá oxidáló vegyületek stimulálják azt. Ez a GSH- és NAD-függő As^{V} -reduktáz aktivitás szintén kimutatható hemolizátumban és patkánymáj citoszólban. Ezt az aktivitást glikolitikus szubsztrátok, különösen NAD-dal együtt, erősen emelik, ami egy glikolitikus enzim szerepét valószínűsíti.

-
6. A glikolízis enzimek közül a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz redukálja az As^V -ot As^{III} -té, amennyiben GSH, NAD és glikolitikus szubsztrát jelen van. Koninginsav mind a glikolitikus, mind pedig az As^V -reduktáz aktivitását gátolja a GAPDH-nak. A GAPDH-t gátló koninginsav alkalmazásával megállapítható, hogy a GAPDH kizárólagosan felelős az emberi vörösvértetek PNP-független As^V -reduktáz aktivitásáért, és jelentősen hozzájárul a patkánymáj citoszóléhoz.
7. A GAPDH valószínűleg részt vesz az As^V *in vivo* redukciójában, legalább a patkánymájban. Ezt a következtetést azok a megfigyelések támogatják, hogy patkányok ACH (amely a GAPDH-t gátló metabolitot képez) előkezelése csökkenti a GAPDH és As^V -reduktáz aktivitásokat májcitoszólban, és csökkenti az As^V metabolitok arányát As^V -hoz képest As^V -tal injektált patkányok májában.

IRODALOMJEGYZÉK

- Aposhian (1997). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 397-419.
- Bachleitner-Hofmann *et al.* (2002). *Leuk. Lymphoma* **43**, 1535-1540.
- Bernstam and Nriagu (2000). *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **3**, 293-322.
- Bertolero *et al.* (1987). *Carcinogenesis* **8**, 803-808.
- Bobrowicz *et al.* (1997). *Yeast* **13**, 819-828.
- Brown *et al.* (1989). *Anal. Biochem.* **180**, 136-139.
- Bzowska *et al.* (2000). *Pharmacol. Ther.* **88**, 349-425.
- Chan *et al.* (1969). *J. Biol. Chem.* **244**, 2883-2890.
- Chen *et al.* (1985). *Cancer Res.* **45**, 5895-5899.
- Crane and Lipmann (1953). *J. Biol. Chem.* **201**, 235-243.
- Csanaky and Gregus (2001). *Toxicol. Sci.* **63**, 29-36.
- Csanaky and Gregus (2002). *Comp. Biochem. Physiol. C* **131**, 355-365.
- Csanaky and Gregus (2005). *Toxicology* **207**, 91-104.
- Delnomdedieu *et al.* (1994a). *Chem. Biol. Interact.* **90**, 139-155.
- Delnomdedieu *et al.* (1995). *Chem. Biol. Interact.* **98**, 69-83.
- Dixon (1997). *Adv. Inorg. Chem.* **44**, 191-227.
- Estabrook (1961). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**, 89-91.
- Gebel (2001). *Int. J. Hyg. Environ. Health* **203**, 249-262.
- Gladysheva *et al.* (1994). *Biochemistry* **33**, 7288-7293.
- Goering *et al.* (1999). *Toxicol. Sci.* **49**, 5-14.
- Gomez-Ariza *et al.* (1998). *Appl. Organomet. Chem.* **12**, 439-447.
- Gornall *et al.* (1949). *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766.
- Goyer and Clarkson (2001). In *Casarett and Doull's Toxicology*, 6th ed., (C. D. Klaassen, Ed.) pp. 811-867. McGraw-Hill, New York.
- Gregus *et al.* (2000). *Toxicol. Sci.* **56**, 18-25.
- Guangyong *et al.* (1994). *Biochemistry* **33**, 7294-7299.
- Gyurasics *et al.* (1991). *Biochem. Pharmacol.* **42**, 465-468.
- Hayakawa *et al.* (2005). *Arch. Toxicol.* **79**, 183-191.
- Hobgeboom (1955). *Methods Enzymol.* **1**, 16-19.
- Huang and Lee (1996). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **136**, 243-249.
- Hughes (2002). *Toxicol. Lett.* **133**, 1-16.
- Indiveri *et al.* (1989). *Biochim. Biophys. Acta* **977**, 194-199.
- Ishinishi *et al.* (1986). In *Handbook on the Toxicology of Metals* (2nd ed., L Friberg, G. F. Nordberg, and V. Vouk, Eds.), pp. 43-83. Elsevier Science Publishers, New York.
- Jolliffe (1993). *J. Royal Soc. Med.* **86**, 287-289.
- Kalckar (1947). *J. Biol. Chem.* **167**, 429-443.
- Klaassen (1974). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **29**, 447-457.
- Kline and Schramm (1993). *Biochemistry* **32**, 13212-13219.
- Knowles (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* **242**, 1-10.
- Knowles and Benson (1983). *Trends Biochem. Sci.* **8**, 178-180.
- Krafft and Macy (1998). *Eur. J. Biochem.* **255**, 647-653.
- Liu *et al.* (2004a). *J. Biol. Chem.* **279**, 17312-17318.
- Liu *et al.* (2004b). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 1178-1185.
- Liu *et al.* (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 6053-6058.
- Messens *et al.* (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 8506-8511.
- Mukhopadhyay *et al.* (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 21149-21157.
- Parks and Agarwal (1972). *Enzymes* **7**, 483-514.
- Radabaugh and Aposhian (2000). *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 26-30.
- Rosen (2002). *FEBS Lett.* **529**, 86-92.
- Rosen *et al.* (1991). *Arch. Biochem. Biophys.* **284**, 381-385.
- Rossman (2003). *Mutat. Res.* **533**, 37-65.
- Rossman *et al.* (2002). *Environ. Health Perspect.* **110** (suppl. 5), 749-752.
- Rousselot *et al.* (1999). *Cancer Res.* **59**, 1041-1048.
- Sedlak and Lindsay (1968). *Anal. Biochem.* **25**, 192-205.
- Shi *et al.* (2004). *Chem Res. Toxicol.* **17**, 871-878.
- Soignet *et al.* (1998). *New Eng. J. Med.* **339**, 1341-1348.
- Thomas *et al.* (2001). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **176**, 127-144.
- Tietze (1969). *Anal. Biochem.* **27**, 502-522.

-
- Vahter (1983). In *Biological and environmental effects of arsenic* (B. A. Fowler, Ed.) pp. 170-197. Elsevier Science Publishers, New York.
- Vahter (1999). *Sci. Prog.* **82**, 69-88.
- Vahter and Marafante (1989). *Biol. Trace Elem. Res.* **21**, 233-239.
- Wang *et al.* (2001). *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 321-330.
- Wang (2001). *Cancer Chemother. Pharmacol.* **48(Suppl. 1)**, S72-S76.
- Wohlrab (1986). *Biochim. Biophys. Acta* **853**, 115134.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- I. Németi, B., and Gregus, Z. (2002). Mitochondria work as reactors in reducing arsenate to arsenite. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **182**, 208-218. (IF: 2.993 – 2002)
- II. Németi, B., and Gregus, Z. (2002). Reduction of arsenate to arsenite in hepatic cytosol. *Toxicol. Sci.* **70**, 4-12. (IF: 3.367 – 2002)
- III. Gregus, Z., and Németi, B. (2002). Purine nucleoside phosphorylase as a cytosolic arsenate reductase. *Toxicol. Sci.* **70**, 13-19. (IF: 3.367 – 2002)
- IV. Németi, B., and Gregus, Z. (2003). Arsenate reduction in human erythrocytes and rats – Testing the role of purine nucleoside phosphorylase. *Toxicol. Sci.* **74**, 22-31. (IF: 3.067 – 2003)
- V. Németi, B., and Gregus, Z. (2004). Glutathione-dependent reduction of arsenate in human erythrocytes – A process independent of purine nucleoside phosphorylase. *Toxicol. Sci.* **82**, 419-428. (IF: 3.391 – 2004)
- VI. Németi, B., and Gregus, Z. (2005). Reduction of arsenate to arsenite by human erythrocyte lysate and rat liver cytosol - characterization of a glutathione- and NAD-dependent arsenate reduction linked to glycolysis. *Toxicol. Sci.* **85**, 847-858. (IF: 3.391 – 2004)
- VII. Gregus, Z., and Németi, B. (2005). The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase works as an arsenate reductase in human red blood cells and rat liver cytosol. *Toxicol. Sci.* **85**, 859-869. (IF: 3.391 – 2004)
- VIII. Németi, B., Csanaky, I., and Gregus, Z. (2006). Effect of an inactivator of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a fortuitous arsenate reductase, on disposition of arsenate in rats. *Toxicol. Sci.* **90**, 49-60. (IF: 3.391 – 2004)

Egyéb közlemények

1. Szabados, E., Fischer, G. M., Tóth, K., Csete, B., Németi, B., Trombitás, K., Habon, T., Endrei, D., and Sümegi, B. (1999). Role of reactive oxygen species and poly-ADP-ribose polymerase in the development of AZT-induced cardiomyopathy in rat. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 309-317. (IF: 4.348 – 1999)
2. Fischer, G. M., Németi, B., Farkas, V., Debreceni, B., László, A., Schaffer, Z., Somogyi, C., and Sándor, A. (2000). Metabolism of carnitine in phenylacetic acid-treated rats and in patients with phenylketonuria. *Biochim. Biophys. Acta* **1501**, 200-210. (IF: 2.590 – 2000)
3. Csanaky, I., Németi, B., and Gregus, Z. (2003). Dose-dependent biotransformation of arsenite in rats – not S-adenosylmethionine depletion impairs arsenic methylation at high dose. *Toxicology* **183**, 77-91. (IF: 2.061 – 2003)

Előadások

1. Németi, B., and Gregus, Z. (2000). Májmitokondriumok, mint az arzenátot arzenitté redukáló reaktorok. A Magyar Toxikológusok Társasága Konferenciája, Balatonkenese, szeptember 17-19.
2. Németi, B., and Gregus, Z. (2001). Az arzenát redukciója patkánymáj posztmitokondriális sejtfrakcióiban: citoszólbeli enzimet, tiolt és purin nukleozidot igénylő folyamat. A Magyar Toxikológusok Társasága Konferenciája, Eger, október 25-27.
3. Gregus, Z., and Németi, B. (2001). Purin-nukleozid-foszforiláz, mint citoszólbeli arzenát-reduktáz. A Magyar Toxikológusok Társasága Konferenciája, Eger, október 25-27.
4. Csanaky, I., Németi, B., and Gregus, Z. (2001). Az arzenit dóziszfüggő biotranszformációja – nem az S-adenozil-metionin depléció okozza a metiláció csökkenését. A Magyar Toxikológusok Társasága Konferenciája, Eger, október 25-27.
5. Németi, B., and Gregus, Z. (2003). Az arzenát redukciója emberi vörösvértestekben és patkányban – A purin-nukleozid-foszforiláz szerepe. A Magyar Toxikológusok Társasága Konferenciája, Zalakaros, november 6-8.
6. Németi, B., and Gregus, Z. (2004). Az arzenát redukciója emberi vörösvértestekben. A Magyar Toxikológusok Társasága Konferenciája, Harkány, október 14-16.

Poszterek

1. Németi, B., Csete, B., and Sümegi, B. (1995). Zidovudine (AZT) induced myopathy and cardiomyopathy in rats: Molecular mechanisms. *II. International Conference of the Hungarian Biochemical Society*, Szeged, 1-5 of September.
2. Csanaky, I., Németi, B., and Gregus, Z. (2002). Dose-dependent biotransformation of arsenite in rats – not S-adenosylmethionine (SAM) depletion impairs arsenic methylation at high dose. *41st Annual Meeting of Society of Toxicology*, Nashville (TN), 16-22 of March.
3. Schweibert, I., Németi, B., and Gregus, Z. (2002). Mitochondria work as reactors in reducing arsenate to arsenite. *41st Annual Meeting of Society of Toxicology*, Nashville (TN), 16-22 of March.
4. Németi, B., and Gregus, Z. (2002). Rat liver cytosol reduces arsenate to arsenite in thiol- and purine nucleoside-dependent manner. *41st Annual Meeting of Society of Toxicology*, Nashville (TN), 16-22 of March.
5. Gregus, Z., and Németi, B. (2002). Purine nucleoside phosphorylase (PNP) as a cytosolic arsenate reductase. *41st Annual Meeting of Society of Toxicology*, Nashville (TN), 16-22 of March.
6. Csanaky, I., Németi, B., and Gregus, Z. (2002). Dose-dependent biotransformation of arsenite in rats – not S-adenosylmethionine (SAM) depletion impairs arsenic

-
- methylation at high dose. *40th Congress of the European Societies of Toxicology*, Budapest, 15-18 of September.
7. Schweibert, I., Németi, B., and Gregus, Z. (2002). Mitochondria work as reactors in reducing arsenate to arsenite. *40th Congress of the European Societies of Toxicology*, Budapest, 15-18 of September.
 8. Németi, B., and Gregus, Z. (2002). Rat liver cytosol reduces arsenate to arsenite in thiol- and purine nucleoside-dependent manner. *40th Congress of the European Societies of Toxicology*, Budapest, 15-18 of September.
 9. Gregus, Z., and Németi, B. (2002). Purine nucleoside phosphorylase (PNP) as a cytosolic arsenate reductase. *40th Congress of the European Societies of Toxicology*, Budapest, 15-18 of September.
 10. Németi, B., and Gregus, Z. (2004). Arsenate reduction in human erythrocytes. *International Congress of Toxicology X.*, Tampere (Finland), 10-15 of July.
 11. Németi, B., and Gregus, Z. (2005). Reduction of arsenate by human erythrocyte lysate and rat liver cytosol is linked to glycolysis. *44th Annual Meeting of the Society of Toxicology*, New Orleans (LA), 5-10 of March.
 12. Gregus, Z., and Németi, B. (2005). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an arsenate reductase in human red blood cells and rat liver cytosol. *44th Annual Meeting of the Society of Toxicology*, New Orleans (LA), 5-10 of March.

RÖVIDÍTÉSEK

As ^V	arzenát
As ^{III}	arzenit
MMAs ^{III}	monometilarzenit
MMAs ^V	monometilarzenát
DMAs ^V	dimetilarzenát (kakodilsav)
ACH	(S)- α -klorohidrin
ADP	adenozin difoszfát
AMP	adenozin monofoszfát
ATP	adenozin trifoszfát
BDL	epevezeték lekötött (patkány)
BDRPL	epevezeték és vesegyök lekötött (patkány)
BSO	D,L-butionin-S,R-szulfoximin
DEM	dietilmaleát
DTT	ditiotreitól
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
Grx	glutaredoxin
GSH	redukált glutation
GSSG	oxidált glutation
HPLC-HG-AFS	magasnyomású folyadék-kromatográfia – hidrid generáció – atomfluoreszcenciás spektrometria
KA	koninginsav
NAD(P)	nikotinamid adenin dinukleotid (foszfát)
NAD(P)H	redukált nikotinamid adenin dinukleotid (foszfát)
NPSH	nem-protein tiol
PGK	foszfoglicerát-kináz
P _i	szervetlen ortofoszfát
PMSN	posztmitokondriális felülúszó
PNP	purin-nukleozid-foszforiláz
RBC	vörösvértestek
Trx	tioredoxin
TRR	tioredoxin-reduktáz

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt a családomnak szeretnék köszönetet mondani a türelmükért és a bátorításért, amit a disszertáció összeállítása során tőlük kaptam.

Különösen hálás vagyok tanítómesteremnek, Dr. Gregus Zoltán professzor úrnak, aki türelemmel és példás emberi magatartásával, hasznos tanácsaival segítette a kutatásaimat, megteremtette és biztosította a feltételeket a sikeres munkához.

Külön köszönetet kívánok mondani Agyaki Mónika és Schweibert István kollégáimnak a kísérletek során kapott nélkülözhetetlen segítségért.

Értekezésemnek az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA) és az Egészségügyi Minisztérium (ETT) által támogatott munka képezi az alapját.