

Mindazon tényezők, melyek károsan befolyásolják a szekréciós fehérjék posztranszlációs 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 posztranszlációs módosításokért felelős enzimek és az intraluminális dajkafehérjék. Huzamosan fennálló stressz esetén beindulnak a programozott sejthalál mechanizmusai. Az experimentális ágensekkel (fehérjeglikoziláció gátlószerek, intraluminális kalciumot csökkentő szerek, intraluminális redoxpotenciált befolyásoló redukálószerek) 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 aktiválásában? 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 lumenális NADPH redox állapota hogyan befolyásolja a sejtek életképességét? Van-e piridin nukleotid-függő ER stressz?

Ezen utóbbi kérdéskört az OTKA IN pályázat támogatásával, a Sienai Egyetem Kóréletani Intézetével kooperációban vizsgáltuk.

Az ER lumen redox rendszereit tanulmányozva 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 (glutathion, fehérje tiolok) túlnyomórészt oxidált állapotával. A két rendszer szétkapcsolását az okozza, hogy a glutathion redukáz nincs jelen a lumenben. Az intraluminális piridin nukleotid pool jelenléte magyarázatot ad a korábban leírt szoros kooperációra a H6PDH és a 11 β -hidroxisteroid dehidrogenáz között: a kapcsolat a kolokalizáción és a közös kofaktoron alapul. A kooperációt korábban igazoltuk máj mikroszómákon; a jelenséget ki tudtuk mutatni zsírszövet (1), és granulocita (7) mikroszómákon is. Megállapítottuk, hogy a lumenális piridin nukleotidok redukált állapota elengedhetetlen a preadipocita differenciálódáshoz (8). A NADPH pool redox állapota viszont nem a H6PDH indukció következménye; a H6PDH expressziója állandó a preadipociták differenciációja során (9).

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. A transzlokon kalcium csatornaként is funkcionálhat (4). A transzlokon szerepét a kis molekulák transzportjában reviewban foglaltuk össze (6).

Megállapítottuk, hogy az aszkorbinsav szintézis melléktermékeként az ER lumenben keletkező hidrogén-peroxid az ER membrán aspecifikus permeabilitásváltozását okozza, mely lehetővé teszi az antioxidáns hatások érvényesülését az ER lumenben (11).

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. Ennek megfelelően megállapítottuk, hogy a minőségellenőrzés gátlása ER stresszt okoz, valamint fokozza az apoptózis gyakoriságát hepatóma sejtvonalon (12). 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 (3).

Új és korábbi eredményeinket több reviewban foglaltuk össze, melyek az ER lumen mint önálló metabolikus kompartmentum létét hangsúlyozzák, az ER lumen redox homeosztázisának szerepét hangsúlyozzák az ER stressz patomechanizmusában (5), valamint kiemelik az ER transzporterek jelentőségét az ER lumen mint önálló metabolikus kompartmentum homeosztázisának fenntartásában (2).

A pályázat keretében végzett munkát egy review foglalja össze, melyekben kísérletet teszünk az ER mint szenzor organelum szerepének bemutatására. Az ER számos extra- és intracelluláris stimulus szenzora, eredményeink az intraluminális redox mint jelátvivő szerepét valószínűsítik (13).

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. Bánhegyi G., Benedetti A., Csala M., Mandl J.: Stress on redox. *FEBS Lett.* 581, 3634-3640, 2007

6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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)
13. 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>.