

# A nehézfém stressz és stresszválasz pontyban

## Heavy metal stress and stress responses in carp

Ábrahám Magdolna, Hermeszt Edit, K. Deér Aranka, Banka Lajos és Nemcsók János

József Attila Tudományegyetem, Biokémiai Tanszék, 6726 Szeged, Középfasor 52.

### Összefoglalás

Alacsony kadmium expozíció esetén a ponty citokróm P450-függő EROD és ECOD enzimeinek aktivitását fokozza, míg a CYP1A gének indukciójának látszólagos gátlását eredményezi. Feltételezhetően a nehézfém és az ER membrán kölcsönhatásán kívül a lipidperoxidáció következtében változik a citokróm P450 enzimek mikrokörnyezete, amely a fehérjék konformációjának változását és ennek megfelelően a katalitikus aktivitás növekedését okozza. A vizsgált biotranszformációs enzimek denaturálódással szembeni védelméhez hozzájárulhatnak a stresszfehérjék. A metallotionein szint enyhe növekedése a kadmium toxicitással szemben nem, vagy csak korlátozott védelmet nyújt. Az alacsony dózisú kadmium hatás potenciálja a kész CYP1A enzimek biotranszformációs aktivitásának fokozódását, de növekvő expozíció esetén várható, hogy érzékenyebbé teszi a halakat a poliaromás vegyületekkel szemben, mivel gátolhatja az adaptív stresszválaszt.

M. Ábrahám, E. Hermeszt, A. K. Deér, L. Banka, J. Nemcsók

József Attila Tudományegyetem, Biokémiai Tanszék, 6726 Szeged, Középfasor 52.

### Summary

The complex biochemical stress responses to cadmium exposure were studied in liver of carp (*Cyprinus carpio*). Cd<sup>2+</sup> injection in sublethal concentration resulted in increased hepatic microsomal activities of EROD and ECOD, two CYP1A enzymes. Oxidative stress caused by the heavy metal was supposed to modify the ER membrane structure surrounding the cytochrome P450 enzymes, however the interactions existing between the proteins and membrane lipids preserved the enzymes from denaturation. The induction of hsp70 and hsp90 genes by Cd<sup>2+</sup> was found and the stress proteins may contribute to the protection of the cytochrome enzymes. The induction of CYP1A genes seems to be inhibited by metal ions and it could be related to the free ions interacting with cell proteins.

### A környezeti stressz és a celluláris stresszválasz

A vízi környezet stresszhatásai az élőlényekben komplex celluláris reakciókat váltanak ki. A halak bőrrükkel, kopoltyújukkal állandó és szoros kapcsolatban vannak a vízzel, illetve a vízben lévő toxikus vegyületekkel, s ezáltal közvetlenül, illetve közvetve, a táplálkozásuk révén felhalmozhatják testükben az idegen anyagokat. Minden élőlény, így a halak szervezete is rendelkezik olyan, meglehetősen konzervált, molekuláris védelmet szolgáló fehérje rendszerekkel, amelyek metabolizálják vagy eliminálják az idegen vegyületeket. Közülük a nehézfémeket kötő metallotioneinek és a xenobiotikumokat átalakító citokróm P450-függő monooxigenázokat kell kiemelnünk. A különböző halfajok-

ban végbemenő specifikus reakciókról, a részt vevő enzimek és fehérjék szerkezetéről és működéséről számos irodalmi adat áll rendelkezésre, azonban kevésbé ismert egy-egy vegyület komplex biokémiai hatása, amely végső soron az élőlények adaptációs képességét befolyásolja. Ezen alapkérdésből kiindulva vizsgáltuk, hogy a szubletális koncentrációban jelen lévő kadmium hogyan befolyásolja a ponty stresszhatásokkal szembeni védelmét ellátó enzimek és fehérjék működését.

### A kadmium és citokróm P4501A izoenzimek kölcsönhatása

A kadmium az egyik legtoxikusabb hatású nehézfém, amely a sejtekben a fehérjék aminosav oldaláncaín, szulfhidril- és anionos csoportokhoz kötődve denaturációt okoz, vagy metallotioneinekhez

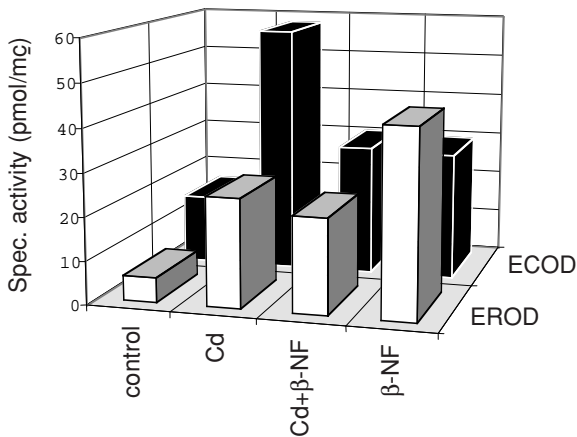
kapcsolódva felhalmozódik, s lassan ürül a szervezetből. Természetes úton a Cd(II) ionok a vízi környezetbe csak adott geológiai feltételek következtében kerülnek, s koncentrációjuk viszonylag alacsony. A folyamatos expozíció vagy a környezeti feltételek változása következtében az élőlényekben a fém akkumulálódik. A kadmium-fehérje kölcsönhatást a pontymáj citokróm P450-függő monooxigenáz rendszerén vizsgáltuk, mivel a xenobiotikumok biotranszformációját katalizáló enzimek részei a szervezet molekuláris védelelmét szolgáló és adaptációjában szerepet játszó rendszereknek. A citokróm P450 enzimek az ER membránjában lokalizálódó monooxigenázok, amelyek a lipofil szubsztátokat alakítják vízoldékonyabb formává, majd közvetlenül vagy további átalakítás után kiválasztásra kerülnek. A széles, átfedő szubsztát specifikussal rendelkező citokróm P450-függő monooxigenázok emlősökben a génjeik specifikus induktorokkal való indukálhatósága alapján öt géncsaládba sorolhatók. A halak máj- és veseszövetekben egyértelműen a poliaromás vegyületek biotranszformációját katalizáló CYP1A géncsalád izoenzimeit indukálhatók. Újabban pisztrángban kimutatták, hogy  $\beta$ -naftoflavonnal (BNF) – amely egyébként specifikus CYP1A induktor – a CYP2K géncsalád is indukálódik [1]. A CYP1A géneket a specifikus induktorokon kívül maguk a szubsztátok is aktiválják. A citokróm P450 enzimeket kódoló gének expressziójának szabályozása receptorhoz kötött, az inaktív receptor a hsp90 stresszfehérjével asszociál, amely a ligand megkötésekor leválik a komplexről [2]. Az Ah (*aryl hydrocarbon*) receptorfehérje a citoplazmában megköti a lipofil szubsztátot, s a ligand-aktivált receptor komplex az Arnt transzlokátor fehérje segítségével kerül a magba, ahol a CYP1A géneket szabályozva transzkripció enhancerként működik [3,4].

A kadmium *in vivo* hatását a pontymáj mikroszóma citokróm P450A enzimek aktivitására és indukálhatóságára 2 mg/testtömeg kg dózisu Cd<sup>2+</sup>-kezelés után vizsgáltuk. A fémkezelést követő 6. napon a CYP1A géneket BNF adagolásával indukáltuk. A kadmium citokróm P450A enzimekre gyakorolt közvetlen hatását az etoxirezorufin O-deetiláz (EROD) és az etoxikumarin O-deetiláz (ECOD) enzimaktivitások mérésével követtük, a CYP1A indukciót a kontroll, a kizárólag BNF-kezelésben részesült, valamint a Cd<sup>2+</sup>- és BNF-kezelést egyaránt kapott minták EROD aktivitásváltozásai alapján vizsgáltuk (1. ábra).

A kadmium az alkalmazott kezelési koncentrációban a várakozással ellentétben az EROD és az ECOD enzimek aktivitásnövekedését eredményezte, de a BNF-kezelést nem követte további EROD aktivitásnövekedés. Egyes szerzők szerint a nehézfém hosszú távú expozíció esetén kötődik a fosfolipid membránokhoz, megváltoztatja a felület töltését és a lipid molekulák konformációját, a szabad fémionok pedig a sejtekben a fehérjemolekulákkal kölcsönhatásban fejtik ki toxikus hatásukat [5,6]. Tekintettel arra, hogy a citokróm P450 enzimek az ER membránban lokalizálódnak, az enzimaktivitás növekedésének egyik lehetséges okaként nem zárható ki a mikrokörnyezet változása, ugyanakkor a lipid-fehérje kölcsönhatás védi a fehérjéket a további denaturálódástól. Ezzel szemben a kadmium az EROD indukálhatóságának látszólagos gátlását eredményezte, további vizsgálatok szükségesek azonban annak az eldöntésére, hogy a gátlás transzkripciósi vagy /és transzlációs szinten történt-e. A következőkben a kadmium által indukált oxidációs hatásokat, illetve a védekezőrendszer néhány elemének, az antioxidáns enzimek, a stresszfehérjék, valamint a metalloproteinek lehetséges szerepét vizsgáltuk a sejtekben.



**A József Attila Tudományegyetem Biokémiai Tanszékének környezetbiokémiai munkacsoportja** a peszticidek és a nehézfémek biokémiai hatásait kutatja a halak szervezetében. Újabban az érdeklődés középpontjába ugyanazok hatások által indukált stresszreakciók, valamint különböző halfajok molekuláris adaptációs mechanizmusának kutatása került. A halak specifikus stresszreakciói a vízi környezet állapotváltozásainak érzékeny bioindikátorai, s elemeit képezik az élővizek toxikológiai felmérésére alkalmazott biológiai módszereknek.



1. ábra A kadmium hatása a pontymáj mikroszóma citokróm P4501A enzimeinek aktivitására

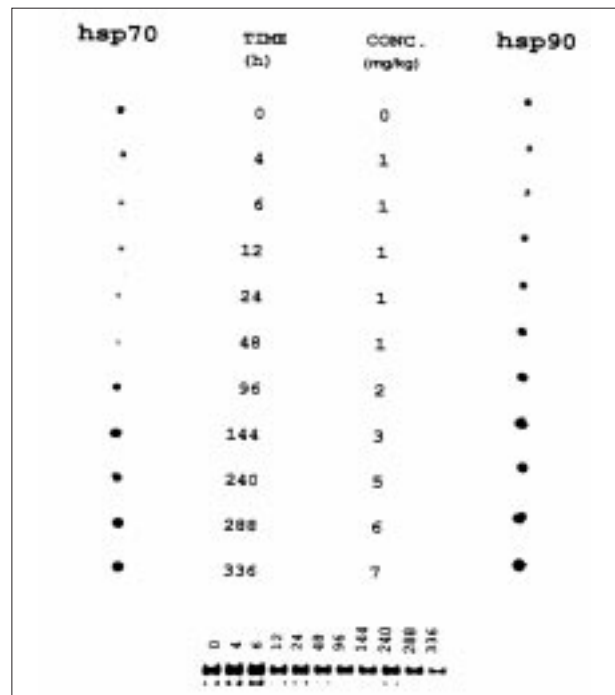
### Oxidatív stresszhatás és antioxidatív stresszválasz

Az aerob metabolizmus esszenciális szubsztrátja az oxigén, amely egyszersmind reaktív oxigén szabadgyökök és peroxidok forrása is. Ezek elsődleges célpontjai a sejtekben a makromolekulák. Szabadgyökök és peroxidok keletkezhetnek többek között a fémionok által katalizált Fenton és Haber-Weiss reakciók során, továbbá a xenobiotikumok elektrontranszporttal kapcsolt metabolizmusa során is. Az antioxidáns adaptáció eredményeként indukálódik a szuperoxid anion scavenger szuperoxid dizmutáz (SOD), a hidrogénperoxidot bontó kataláz (CAT), valamint a szerves peroxidokat bontó glutation peroxidáz (GPx). Fontos antioxidáns molekula a glutation (GSH), amely elsősorban a sejtmembránokat védi a lipid peroxidációval szemben és szubsztrátja a GPx-nak. Az antioxidációs enzimek génjei redox szenzitív transzkripció faktorok segítségével aktiválódnak [7]. A halak antioxidáns enzimeinek működése jelentős faji eltérést mutat, és függ attól, hogy milyen külső tényező váltja ki a szabadgyökök keletkezését [8]. Kadmiumkezelést követően a pontymáj citoplazmatikus frakciójából a kontrollhoz képest nyhe SOD aktivitásnövekedés mérhető, míg a CAT és GPx enzimek aktivitása 15%-kal illetve 20%-kal nő. A kontroll értékeknél 30%-kal magasabb lipidperoxidáció arra utal, hogy az antioxidáns rendszer nem nyújt teljes védelmet a sejtmembránokat károsító hatásokkal szemben.

### Stresszfehérje indukció

Az intracelluláris fémkoncentráció emelkedése és az oxidatív stressz a fehérjemolekulák denaturációjához vezet. A sejtekben ez stresszfehérjék indukálódását eredményezi, melyek védik az enzimeket, fehérjéket a denaturálódástól, illetve chaperonként viselkedve segítik a fehérje foldingot. A hsp gének expressziója a stressz intenzitásától és a fehérjeszintézis sebességétől függően autoregulált, a szabad hsp szint emelkedése a HSF transzkripció faktor aktivitásának gátlását, csökkenése pedig az aktiválódását okozza [9,10]. Néhány halfajban *in vivo* illetve *in vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy hőstressz hatására a hsp70 és hsp90 stresszfehérjék szintje megnövekedett [11,12], azonban a nehézfémek indukálta transzkripció szintű változásokról halakban kevés adat áll rendelkezésre.

A kadmiumstresszt követő hsp70 és hsp90 gének indukcióját a pontymájban transzkripció szinten, specifikus próbákkal detektáltuk. Mindkét gén indukciója erősen koncentráció- és időfüggőnek bizonyult (2. ábra). A fémkoncentráció fokozatos, lassú emelésekor a hsp70 mRNS szint növekedése a negyedik naptól kezdődően, 2 mg/kg Cd-kezelést követően figyelhető meg, és a kezelés ideje alatt nő. A hsp90 mRNS alapszintje magasabb, mint a hsp70 transzkriptumé, s az indukció kissé korábban detektálható.



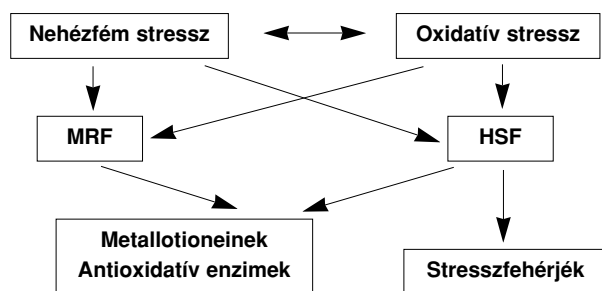
2. ábra Kadmiumstressz által kiváltott hsp70 és hsp90 indukció ponty májszövetben.

## Metallotionein indukció

A metallotioneinek kis molekulatömegű, sok ciszteint tartalmazó fémkötő fehérjék, amelyek a nehézfémek toxikus hatásaival szemben védik a sejteket. A metallotionein gének nehézfém-regulált transzkripció faktorok segítségével indukálódnak [13], s a gének működését a nehézfémeken kívül citokinek és hormonok is szabályozzák [14]. A kadmium a ponty májszövetben közel háromszoros Cd-metallotionein szintnövekedést okoz: a kontroll mintákban mért 176 µg Ag ekv./g szövet MT koncentrációhoz képest a kezelt mintákban 482 µg Ag ekv./g szövet MT szint detektálható [15], és stabil Cd-MT-komplex alakul ki.

## A kadmium okozta celluláris stresszválasz mechanizmusa és következménye

A nehézfémek hatásának és eliminációjának elsődleges célpontja a gerincesek szervezetében a máj. Az alacsony, szubletális dózisú kadmiumkezelés a ponty májsejtjeiben MT szintnövekedést okoz, továbbá oxidáns hatású szabadgyök-katalizálta láncreakciókat, lipid-peroxidok illetve hidrogén-peroxid keletkezését indítja be. A védekezőrendszer – a kataláz és glutation peroxidáz – a létrejött peroxidoknak csak egy részét képes lebontani, s így a membránok integritásának lazulásával kell számolnunk, s nem zárható ki a fehérjék, esetleg nukleinsavak oxidációja sem. A nehézfémek szabadgyök-generáló hatása miatt várt szignifikáns SOD aktivitásnövekedés nem mérhető. Élesztőben, mint eukarióta modell szervezetben Liu és Thiele [16] a réz, illetve az oxidatív stressz hatását vizsgálva kimutatták, hogy a CuZn-SOD és CUP1 metallotionein génexpresszióját ugyanazon fém-specifikus transzkripció faktor szabályozza. Annak ellenére, hogy a kadmium nem okozott SOD aktivitásnövekedést, a továbbiakban kérdés az, hogy indukálódik-e a gén, valamint hogy a Cd okoz-e közvetlen, *in vivo* gátlást.



3. ábra A nehézfém stresszválasz élesztőben: regulációs modell [16].

A kadmium a ponty májsejtjeiben a hsp70 és a hsp90 stresszfehérje géneket indukálja. A gének expressziójának szabályzásáért felelős HSF transzkripció faktor az élesztőben a Cu okozta oxidatív stressz következtében a CUP1 metallotionein gén expresszióját is indukálja (3. ábra) [16]. Emlőssejtben ezzel szemben az oxidatív stresszt előidéző kémiai anyagok nem indukálják hsp70 gént, mivel nem teszik lehetővé a HSF kötődését a HSE megfelelő konszenzus szekvenciáihoz. Ezért emlősökben valószínűleg eltérő a hő sokk és a reaktív oxigén gyökök által kiváltott HSF mediált stresszválasz [17,18]. Hogy a halak szervezetében lejátszódó regulációs folyamat az élesztő- vagy emlőssejtéhez áll-e közelebb, a rendelkezésre álló hiányos adatok alapján nem ismert.

## Köszönetnyilvánítás

A szerzők ezúton mondanak köszönetet az Országos Kutatási Alapnak és a MEH Balatoni Titkárságának a kutatás pályázatok formájában történt támogatásáért (OTKA T20353, MEH 14/97).

## Irodalomjegyzék

- [1] Stegeman, J.J. (1995) In: Cell Biology, Vol. 90: Molecular aspects of oxidative drug metabolizing enzymes. (Arine, E., Schenkman, J.B., Hodgson, E., Eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 135-158.
- [2] Denis, M., Cuthill, S., Wilkstrom, A.-C., Poellinger, L., Gustafsson, J.-A. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**: 801-807.
- [3] Wilhelmsson, A., Cuthill, S., Denis, M., Wikstrom, A.-C., Gustafsson, J.-A., Poellinger, L. (1990) *EMBO J.*, **9**: 69-76.
- [4] Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O. (1992) *Science*, **256**: 1193-1195.
- [5] Cvec, G. (1990) *Biochem. Biophys. Acta*, **1031**: 311-382.
- [6] Toccane, J.F., Teissie, J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1031**: 111-142.
- [7] Storz, G., Polla, B.S. (1996) In: Stress-inducible cellular responses. (Feigwe, U., Morimoto, R.I., Yahara, I., Polla, B., Eds.) Birkhauser Verlag, Basel. pp. 239-254.
- [8] Winston, G.W., Di Giulio, R.T. (1991) *Aquat. Toxicol.*, **19**: 137-161.
- [9] Morimoto, R.I. (1993) *Science*, **259**: 1409-1410.
- [10] Mizuno, S., Ishii, A., Murakami, Y., Akagawa, H. (1997) *Cell Struct. Funct.*, **22**: 7-13.
- [11] Ryan, J.A., Hightower, L.E. (1994) *Environ. Toxicol. Chem.*, **13**: 1231-1240.
- [12] Williams, J.H., Farag, A.M., Stansbury, M.A., Young, P.A., Bergman, H.L., Petersen, N.S. (1996) *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**: 1324-1328.
- [13] Roesijadi, G. (1992) *Aquat. Toxicol.*, **22**: 81-114.
- [14] Olsson, P.-E., Zafarullah, M., Foster, R., Hamor, T., Gedamu, L. (1990) *Eur. J. Biochem.*, **193**: 229-235.
- [15] Ábrahám, M., Tóth, M., Juhász, M. (1995) In: Mengen and Spurenelemente (Anke, M., Ed.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, pp.238-244.
- [16] Liu, X.-D., Thiele, D.J. (1997) *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, **11**: 289-299.
- [17] Jacquier-Sarlin, M.J., Polla, B.S. (1996) *Biochem. J.*, **318**: 187-193.
- [18] Tacchini, L., Pogliaghi, G., Radice, L., Anzon, E., Bernelli-Zazzere, A. (1995) *Biochem. J.*, **309**: 453-459.