

**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 ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) 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 ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) alakjában fordul elő, de kisebb mennyiségben arzenit ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) 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  $\text{As}_2\text{O}_3$ -ról nemrég mutatták ki, hogy akut promyelocytas leukaemiában (APL) szenvedő betegeknél 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  $\text{As}_2\text{O}_3$  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  $\text{As}^{\text{V}}$  szerkezete nagyon hasonló a szerves ortofoszfátéhoz ( $\text{P}_i$ ), ezért élő szervezetek és sejtek az  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot  $\text{P}_i$  transzport rendszereiken keresztül veszik fel (Csanaky és Gregus, 2001; Dixon, 1997; Rosen, 2002). A sejtekben az  $\text{As}^{\text{V}}$  enzimreakciókban helyettesítheti a  $\text{P}_i$ -ot, ami arzenát észterek és anhidridek képződéséhez vezet (Chan és mtsai, 1969; Dixon, 1997; Hughes, 2002). Míg azonban a  $\text{P}_i$  észterek és anhidridek megfelelően stabilak vizes környezetben, az  $\text{As}^{\text{V}}$  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  $\text{As}^{\text{V}}$  koncentráció (sok mM) mellett okoz mérgezési tüneteket. Az  $\text{As}^{\text{V}}$  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  $\text{As}^{\text{III}}$  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  $\mu\text{M}$ ) 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  $\text{As}^{\text{III}}$  és az  $\text{As}^{\text{V}}$  jól felszívódik a bélcsatornából mind emberben, mind a legtöbb emlős fajban (Vahter, 1983). A sejtek az  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot a szervesen foszfát ( $\text{P}_i$ ) felvételéért felelős transzportereken keresztül veszik fel (Csanaky és Gregus, 2001; Dixon, 1997), míg az  $\text{As}^{\text{III}}$  valószínűleg aquaporin csatornákon és ekvibratív glükóz transzportereken át jut be (Liu és mtsai, 2004a, 2004b).

A sejtekben a szervesen arzén erőteljesen metabolizálódik, amely redukciós és oxidatív metilációs lépések váltakozását foglalja magába (Aposhian, 1997; Ishinishi és mtsai, 1986; Vahter, 1999). Az  $\text{As}^{\text{V}}$  először  $\text{As}^{\text{III}}$ -té redukálódik glutation (GSH) és eddig nem azonosított enzimek közreműködésével (Thomas és mtsai, 2001). Az így képződött  $\text{As}^{\text{III}}$  monometilarzenáttá ( $\text{MMAs}^{\text{V}}$ ) metileződik. A  $\text{MMAs}^{\text{V}}$  monometilarzenitté ( $\text{MMAs}^{\text{III}}$ ) redukálódik, amely tovább metileződik dimetilarzenáttá ( $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ). Végül a  $\text{DMAs}^{\text{V}}$  dimetilarzenitté ( $\text{DMAs}^{\text{III}}$ ) 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). Szervesen arzén expozíció után az elsődleges kiválasztási út a vizelet. A szervesen alakok mellett ( $\text{As}^{\text{III}}$  és  $\text{As}^{\text{V}}$ )  $\text{MMAs}^{\text{V}}$  és  $\text{DMAs}^{\text{V}}$  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<sup>V</sup> 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-X<sub>5</sub>-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<sup>V</sup> és As<sup>III</sup>) szembeni rezisztenciáért. Az Acr1p a génsor regulátora, míg az Acr2p és Acr3p strukturális fehérjék As<sup>V</sup>-reduktáz illetve As<sup>III</sup> exporter feladattal (Bobrowicz és mtsai, 1997). Érdekes, hogy az Acr2p, az első azonosított eukarióta As<sup>V</sup>-reduktáz, egyfelől a *S. aureus* (pl258) ArsC As<sup>V</sup>-reduktázzal mutat szerkezeti hasonlóságot, hiszen e fehérje aktív centruma is tartalmazza a tirozin-foszfátázokra jellemző Cys-X<sub>5</sub>-Arg motívumot. Másfelől az Acr2p funkcionálisan az *E. coli* (R773) ArsC As<sup>V</sup>-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<sup>V</sup>-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 érkezhethet GSH és Grx formájában is (ahogy az *E. coli* ArsC vagy az élesztő Acr2p esetén).

Az arzénát redukciója emlősökben. Emlős szervezetekben az As<sup>V</sup> gyorsan redukálódik a sokkal toxikusabb As<sup>III</sup>-té, hiszen As<sup>V</sup> adagolást követően az As<sup>III</sup> 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<sup>V</sup>-ot (Delnomdedieu és mtsai, 1994a), bár a két reaktáns koncentrációja fiziológiailag nem releváns (300 mM illetve 150 mM). Az As<sup>V</sup> redukciója GSH-függő egér embrió sejtekben (Bertolero és mtsai, 1987), valamint GSH-függő az As<sup>V</sup> metabolizmusa és kiválasztása is patkányban *in vivo* (Gyurasics mtsai, 1991). Nemrégiben közvetlenül bizonyították, hogy az As<sup>V</sup> *in vivo* redukciója valóban a GSH ellátottságtól függ (Csanaky és Gregus, 2005).

Így tehát az As<sup>V</sup> redukciója, amely az élő szervezetben történő átalakulásának első lépése, nemcsak az As<sup>V</sup> 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 posztkondriális 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<sup>V</sup>-reduktáz aktivitásban mutatkozó 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<sup>V</sup> *in vivo* biotranszformációjára az előzőekben leírt módon előkészített patkányokon vizsgáltuk. 15 perccel a BCX-1777 adása után az állatok As<sup>V</sup>-ot kaptak (50 µmol/kg, iv). Néhány patkány 2 perccel az As<sup>V</sup> 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<sup>V</sup>-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 Kutatás-Értékelési 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.

### **Enzimatiszuszpenzió**

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-foszfogliceráttól (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  $\mu$ 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  $\text{As}^{\text{V}}$  élő szervezetbe kerülve metabolizálódik, amelynek első lépése redukciója  $\text{As}^{\text{III}}$ -té (Thomas és mtsai, 2001). E fontos toxikálási folyamatnak azonban sem a celluláris lokalizációja nem ismert, sem a benne közreműködő enzimek. Megfigyelték az  $\text{As}^{\text{V}}$  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  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot, majd GSH- és Grx-függő vagy tioredoxin-függő módon  $\text{As}^{\text{III}}$ -té redukálják. A képzett  $\text{As}^{\text{III}}$ -et azután aktív transzport (ATP vagy membránpotenciál energiájával) kipumpálják a sejtből

A mitokondriumok szintén felveszik az  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot a  $\text{P}_i$  felvételért felelős transzporterek – a foszfát-transzporter (Chan és mtsai, 1969; Wohlrab, 1986) és a dikarboxilát-transzporter (Indiveri és mtsai, 1989) – közvetítésével.  $\text{As}^{\text{V}}$ -tal injektált nyulak veséjében megfigyelték az arzen mitokondriális felhalmozódását (Vahter és Marafante, 1989). Az  $\text{As}^{\text{V}}$  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  $\text{As}^{\text{V}}$ -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  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot  $\text{As}^{\text{III}}$ -té redukálni. Ezt tesztelendő megvizsgáltuk, hogy patkánymájából izolált mitokondriumok redukálják-e az  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot, és ha igen, milyen jellemzői vannak a folyamatnak.

#### *Eredmények és következtetések*

Patkánymájából izolált mitokondriumok gyorsan redukálják az  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot  $\text{As}^{\text{III}}$ -té. A citrátkört tápláló szubsztrátok közül a glutamát támogatta az  $\text{As}^{\text{V}}$  redukcióját a legjobban, míg a malát és a szukcinát gátlónak bizonyult, amelynek oka, legalábbis részben, a kompetíció az  $\text{As}^{\text{V}}$  mitokondriális felvételében szereplő dikarboxilát transzporterén. E transzporter szervesen szubsztrátjai (pl. szulfát, szulfid, tioszulfát) szintén gátolták a mitokondriális  $\text{As}^{\text{V}}$  redukciót. Dikarboxilát vegyületek hiányában az  $\text{As}^{\text{V}}$  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)  $\text{As}^{\text{V}}$ -tal történt inkubációból kiderült, hogy a PMSN az  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot csak tiol jelenlétében redukálja  $\text{As}^{\text{III}}$ -té. GSH viszonylag gyengén támogatta a PMSN általi  $\text{As}^{\text{III}}$  képződést, míg ditiotreitol (DTT) jelentősen fokozta. Miután szétválasztottuk a mikroszóma és citoszól frakciókat és megvizsgáltuk  $\text{As}^{\text{V}}$  redukciós aktivitásukat, kiderült, hogy csak a citoszól katalizálja az  $\text{As}^{\text{V}}$  redukcióját  $\text{As}^{\text{III}}$ -té, a mikroszóma nem. A redukcióért felelős enzim(ek) tehát a citoszólban található(k). Az  $\text{As}^{\text{V}}$ -hoz szerkezetileg hasonló oxianionok (pl.  $\text{P}_i$  vagy *o*-vanadát), valamint higanytartalmú tiol reagensek gátolták az  $\text{As}^{\text{V}}$  redukcióját. Ezek az eredmények egy olyan SH-enzimre utaltak, amelynek van egy, az  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot is befogadni képes,  $\text{P}_i$  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 citoszólbéli  $\text{As}^{\text{V}}$  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  $\text{As}^{\text{V}}$ -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  $\text{As}^{\text{V}}$ -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  $\text{As}^{\text{V}}$  redukciójához. Ezt a 6-oxopurin nukleozidokkal stimulálható  $\text{As}^{\text{V}}$ -reduktáz aktivitást egér-, hörcsög-, tengerimalac- és nyúlmáj citoszóljában is kimutattuk.

Ezek az eredmények az alábbi következtetésekhez vezettek: (1) A citoszólbéli  $\text{As}^{\text{V}}$ -reduktáz megfelelő tiol jelenlétét igényli és tiol reagensekkel gátolható, tehát az enzim valószínűleg funkcionális szempontból kritikus tiol csoporttal bír. (2)  $\text{P}_i$  gátolja az enzim  $\text{As}^{\text{V}}$  redukáló aktivitását, tehát  $\text{P}_i$  kötőhelye van, és a  $\text{P}_i$ -ot vélhetően szubsztrátként hasznosítja. (3) 6-oxopurin nukleozidok igen erősen növelik az  $\text{As}^{\text{V}}$ -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-foszfóriláz (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-arszenátot 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  $1 \mu M$  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 tiolreagensek,  $P_i$  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  $\text{As}^{\text{V}}$ -reduktáz aktivitása független a PNP-tól. Másrészt megvizsgáltuk a PNP szerepét az  $\text{As}^{\text{V}}$  *in vivo* redukciójában úgy is, hogy teszteltük, milyen hatást gyakorol a specifikus és nagyon hatékony PNP gátló BCX-1777 az  $\text{As}^{\text{V}}$  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  $\text{As}^{\text{III}}$  és  $\text{MMAs}^{\text{III}}$  epével történő kiválasztását, sem az  $\text{As}^{\text{V}}$  és metabolitjainak szöveti koncentrációit. Így tehát jelentős *in vitro*  $\text{As}^{\text{V}}$  redukáló aktivitása ellenére a PNP sem intakt emberi vörösvértestekben, sem patkányban *in vivo* nem játszik lényeges szerepet az  $\text{As}^{\text{V}}$  redukciójában.

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

#### *Háttér*

Az eredmények, amelyek szerint a PNP redukálja  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot a sokkal mérgezőbb  $\text{As}^{\text{III}}$ -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  $\text{As}^{\text{V}}$  redukciójához. Intakt emberi RBC megőrizték  $\text{As}^{\text{V}}$  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  $\text{As}^{\text{V}}$  eliminációját, sem az  $\text{As}^{\text{V}}$  metabolitok képződését. Ezen felül az a megfigyelés, hogy GSH csak gyengén támogatja a PNP  $\text{As}^{\text{V}}$ -reduktáz aktivitását, noha az  $\text{As}^{\text{V}}$  redukció sejtekben (Bertolero és mtsai, 1987) és patkányokban (Csanaky és Gregus, 2005) nyilvánvalóan GSH-függő, szintén ellentmond a PNP szerepének, mint *in vivo* releváns  $\text{As}^{\text{V}}$ -reduktáz.

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

#### *Eredmények és következtetések*

A vörösvértestek az  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot (és a  $\text{P}_i$ -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  $\text{As}^{\text{V}}$  redukcióját  $\text{As}^{\text{III}}$ -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)- $\alpha$ -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  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot  $\text{As}^{\text{III}}$ -té redukálni, méghozzá tiol-függő módon. Az egyik citoszólbeli  $\text{As}^{\text{V}}$ -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  $\text{As}^{\text{V}}$  redukáló aktivitásért a purin-nukleozid-foszforiláz (PNP) a felelős. Ezt bizonyítja, hogy (1) az  $\text{As}^{\text{V}}$ -reduktáz és PNP aktivitások a citoszól fehérjék anioncserélő kromatográfiája során együtt eluálódnak; (2) az  $\text{As}^{\text{V}}$  redukáló aktivitás érzékenysége PNP gátlókra (BCX-1777 és CI-1000); valamint (3) tiszta PNP redukálja az  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot, ha megfelelő tiol (pl. DTT) és PNP szubsztrát (inozin vagy guanozin) együttesen jelen vannak. Ez a DTT-vel stimulálható és PNP gátlókkal gátolható  $\text{As}^{\text{V}}$ -reduktáz aktivitás nemcsak patkányok, hanem egerek, hörcsögök, tengerimalacok és nyulak májcitoszóljában is kimutatható. Az enzim gátlói nemcsak a klasszikus biokémiai aktivitását, hanem  $\text{As}^{\text{V}}$ -reduktáz aktivitását is gátolják.
  3. Annak ellenére, hogy a PNP *in vitro* megfelelő körülmények között gyorsan redukálja az  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot, *in vivo* nem vesz részt az  $\text{As}^{\text{V}}$  redukációjában. Ezt a következtetést az a megfigyelés támogatja, hogy BCX-1777 patkányoknak adagolva teljesen gátolja a májban a PNP aktivitását, de nem befolyásolja az  $\text{As}^{\text{V}}$  *in vivo* metabolizmusát és eliminációját még akkor sem, amikor az állat kapott DTT-t, amely aktiválja a PNP által katalizált  $\text{As}^{\text{V}}$  redukciót.
  4. Intakt emberi vörösvértestek a klorid-bikarbonát cseretranszporterén keresztül felveszik az  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot, és  $\text{As}^{\text{III}}$ -té redukálják. Az eritrociták  $\text{As}^{\text{V}}$ -reduktáz aktivitását inozin és/vagy DTT megnöveli. Ez a növekmény PNP-függő, mert a PNP gátló BCX-1777 kivédi. Ugyanakkor a vörösvértestek alap  $\text{As}^{\text{V}}$  redukációs aktivitása független a PNP-től, mivel az enzim gátlása nem befolyásolja.
  5. Az emberi vörösvértestek PNP-független  $\text{As}^{\text{V}}$ -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  $\text{As}^{\text{V}}$ -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 glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz redukálja az  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot  $\text{As}^{\text{III}}$ -té, amennyiben GSH, NAD és glikolitikus szubsztrát jelen van. Koninginsav mind a glikolitikus, mind pedig az  $\text{As}^{\text{V}}$ -reduktáz aktivitását gátolja a GAPDH-nak. A GAPDH-t gátló koninginsav alkalmazásával megállapítható, hogy a GAPDH kizárólagosan felelős az emberi vörösvértetek PNP-független  $\text{As}^{\text{V}}$ -reduktáz aktivitásáért, és jelentősen hozzájárul a patkánymáj citoszóléhoz.
7. A GAPDH valószínűleg részt vesz az  $\text{As}^{\text{V}}$  *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  $\text{As}^{\text{V}}$ -reduktáz aktivitásokat májcitoszólban, és csökkenti az  $\text{As}^{\text{V}}$  metabolitok arányát  $\text{As}^{\text{V}}$ -hoz képest  $\text{As}^{\text{V}}$ -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*, 6<sup>th</sup> 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* (2<sup>nd</sup> 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. *41<sup>st</sup> 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. *41<sup>st</sup> 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. *41<sup>st</sup> 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. *41<sup>st</sup> 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. *40<sup>th</sup> 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. *40<sup>th</sup> 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. *40<sup>th</sup> 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. *40<sup>th</sup> 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. *44<sup>th</sup> 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. *44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology*, New Orleans (LA), 5-10 of March.



---

## RÖVIDÍTÉSEK

As <sup>V</sup>	arzenát
As <sup>III</sup>	arzenit
MMAs <sup>III</sup>	monometilarzenit
MMAs <sup>V</sup>	monometilarzenát
DMAs <sup>V</sup>	dimetilarzenát (kakodilsav)
ACH	(S)- $\alpha$ -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 <sub>i</sub>	szervetlen ortofoszfát
PMSN	posztmitokondriális felülúszó
PNP	purin-nukleozid-foszforiláz
RBC	vörösvértetek
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.

**REDUCTION OF ARSENATE TO ARSENITE  
– BIOCHEMICAL BACKGROUND OF A TOXIFICATION  
PROCESS**

**Ph.D. THESIS**

**Balázs Németi, MD**

Accredited Ph.D. program: A-144, Toxicology  
Supervisor: Prof. Zoltán Gregus, MD, PhD, DSc, DABT



**University of Sciences of Pécs,  
Faculty of Medicine  
Department of Pharmacology and Pharmacotherapy**

**Pécs**

**2006**

---

## INTRODUCTION

### The toxicity of arsenicals and their fate in the body

Arsenic has been known as a chemical element since ancient times. It became notorious due to the high acute toxicity of its compound, arsenic trioxide ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ). Acute arsenic intoxication is very rare nowadays. However, besides cyanide, arsenic trioxide had been the most frequently used suicide and homicide agent from ancient times till the second half of the 19<sup>th</sup> century (Jolliffe, 1993). Chronic arsenic poisoning is seen more often. The primary source of arsenic exposure concerning large human populations is the contaminated drinking water, in which the predominant form of inorganic arsenic is arsenate ( $\text{As}^{\text{V}}$ ), though arsenite ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) may also be present. Chronic exposure can cause skin lesions, nervous system disorders, peripheral vascular disease (Chen *et al.*, 1985; Goyer and Clarkson, 2001). In addition, arsenic has been recognized as carcinogen in human (IARC, 2002; Gebel, 2001; Goering *et al.*, 1999). In medical therapy, arsenic compounds have been used since antiquity, too, although their use has greatly rolled back, owing to the carcinogenicity of arsenic. Interestingly, despite the definite carcinogenic effect of arsenic, arsenic trioxide has recently been shown to induce complete remission in acute promyelocytic leukemia (APL) patients (Soignet *et al.*, 1998).  $\text{As}^{\text{III}}$  has been found to induce apoptosis in human ovarian and cervical carcinoma, esophageal carcinoma, gastric cancer, neuroblastoma (Wang, 2001), and myeloma (Rousselot *et al.*, 1999) cells, suggesting that  $\text{As}^{\text{III}}$  may also be effective in the treatment of other malignancies (Bachleitner-Hofmann *et al.*, 2002). However,  $\text{As}_2\text{O}_3$  treatment of patients with APL causes many unwanted effects related to arsenic toxicity.

Chemical reactivity and mechanism of toxicity of arsenate and arsenite. The structure of  $\text{As}^{\text{V}}$  closely resembles to that of inorganic phosphate ( $\text{P}_i$ ). Due to this structural similarity,  $\text{As}^{\text{V}}$  is taken up by living organisms and cells via their  $\text{P}_i$  transport system (Csanaky and Gregus, 2001; Dixon, 1997; Rosen, 2002). In the cell,  $\text{As}^{\text{V}}$  may replace  $\text{P}_i$  in enzymatic reactions leading to the formation of arsenate esters and anhydrides (Chan *et al.*, 1969; Dixon, 1997; Hughes, 2002). However, while esters and anhydrides of  $\text{P}_i$  are aptly stable in aqueous environment, those of  $\text{As}^{\text{V}}$  are labile, because the longer As–O bond is more readily accessible to water molecules in order to hydrolyze this bond (Dixon, 1997). However, such mechanism could underlie the toxicity of  $\text{As}^{\text{V}}$  itself at very high  $\text{As}^{\text{V}}$  concentrations (several mM). Therefore, it is thought that biotransformation of  $\text{As}^{\text{V}}$  into much more toxic trivalent derivatives is responsible largely for the toxicity of  $\text{As}^{\text{V}}$ .

---

Trivalent arsenicals are much more toxic than their pentavalent counterparts, because they exhibit facile covalent reactivity with thiols. As<sup>III</sup> complexes formed with monothiols (e.g., glutathione, cysteine) are relatively labile, whereas those formed with dithiols (e.g., dihydrolipoic acid, dithiothreitol, dimercaprol) are fairly stable (Knowles, 1985; Knowles and Benson, 1983). The trivalent methylated metabolites of As<sup>III</sup> (see later) are also thiol-reactive but they form relatively stable complexes even with monothiols (Knowles and Benson, 1983). The high affinity of trivalent arsenicals to thiols makes many proteins targets, thereby impairing the cellular metabolism at many different points. Moreover, As<sup>III</sup> at higher concentrations (1-10  $\mu$ M) induces oxidative stress in the cells that may lead to the formation of DNA mutations. Below this range, it still can enhance the mutagenic and carcinogenic effects of other agents, such as ultraviolet radiation or alkylating compounds (Bernstam and Nriagu, 2000; Gebel, 2001; Rossman, 2003; Rossman *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2001).

Fate of arsenate and arsenite in the body. In human and most of the mammalian species, As<sup>III</sup> and As<sup>V</sup> are absorbed well from the gastrointestinal tract (Vahter, 1983). As<sup>V</sup> enters cells via their inorganic phosphate (P<sub>i</sub>) transport system (Csanaky and Gregus, 2001; Dixon, 1997), whereas As<sup>III</sup> likely through aquaporin channels or equilibrative glucose transporters (Liu *et al.*, 2004a, 2004b).

In the cells, inorganic arsenic undergoes extensive metabolism, which includes alternation of reduction and in many, but not all, mammalian species oxidative methylation (Aposhian, 1997; Ishinishi *et al.*, 1986; Vahter, 1999). First, As<sup>V</sup> is reduced by hitherto unidentified enzymes using glutathione (GSH) to As<sup>III</sup> (Thomas *et al.*, 2001). As<sup>III</sup> thus formed is methylated yielding monomethylarsonic acid (MMAs<sup>V</sup>). MMAs<sup>V</sup> is then reduced to monomethylarsonous acid (MMAs<sup>III</sup>), which is further methylated to dimethylarsinic acid (DMAs<sup>V</sup>). DMAs<sup>V</sup> may then be reduced to dimethylarsinous acid (DMAs<sup>III</sup>). Nevertheless, some researchers doubt the validity of this metabolic scheme. They claim that arsenic remains in its trivalent state during the methylation reactions, which are not oxidative, and the pentavalent methylated metabolites represent dead ends of arsenic metabolism (Hayakawa *et al.*, 2005).

The pentavalent arsenicals are exclusively excreted in the urine, whereas the trivalent ones can be excreted in either the bile or urine (Csanaky and Gregus, 2002; Gregus *et al.*, 2000). Following inorganic arsenic exposure, the primary elimination route is the urinary excretion. Besides the inorganic forms (i.e., As<sup>III</sup> and As<sup>V</sup>), MMAs<sup>V</sup> and DMAs<sup>V</sup> are the main urinary metabolites of As<sup>V</sup>. The fecal arsenic content originates partly from

---

the ingested and not absorbed amount, and partly from the biliary excretion of trivalent arsenicals. Despite its significant biliary excretion, however, the fecal elimination of arsenic is markedly limited, because trivalent arsenicals can be reabsorbed from the intestines, as their GSH conjugates are relatively labile and decompose (Klaassen, 1974).

Importantly, reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$  and the methylated pentavalent arsenicals to the corresponding trivalent species is considered toxification of high significance, because trivalent arsenic species are highly toxic, whereas the pentavalent ones are relatively atoxic (Thomas *et al.*, 2001). On the same token, oxidative methylation of trivalent arsenicals into pentavalent ones is considered detoxication. The primary step in the disposition of the environmentally often-prevalent  $\text{As}^{\text{V}}$  is its reduction to  $\text{As}^{\text{III}}$ . This is not only a major toxification process, but also must precede the formation of methylated metabolites. Despite the toxicological importance of  $\text{As}^{\text{V}}$  reduction, its biochemical background was explored only in microorganisms, and there was no mammalian enzyme identified possessing  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase activity prior to our work.

### **Reduction of arsenate**

Reduction of arsenate by microorganisms. In prokaryotes,  $\text{As}^{\text{V}}$  is reduced to  $\text{As}^{\text{III}}$ , which is then extruded from the cell. Several different enzymes have been identified in bacteria that carry out reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$ . The peculiar bacterium *Chrysiogenes arsenatis* is unique in that this species can use  $\text{As}^{\text{V}}$  during respiration instead of oxygen while producing  $\text{As}^{\text{III}}$  (Krafft and Macy, 1998). In the presence of  $\text{As}^{\text{V}}$ , *C. arsenatis* cells can grow under anoxic conditions.

The *Escherichia coli* plasmid R773 encodes a complete operon responsible for reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$  and extrusion of the formed  $\text{As}^{\text{III}}$ . The arsenic resistance operon called “ars operon” encodes four proteins, one regulatory (ArsR) and three structural (ArsA, ArsB, and ArsC). Of these proteins, ArsC is the  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase enzyme, whereas ArsA and ArsB work coupled as an ATP-dependent  $\text{As}^{\text{III}}$  exporter (Rosen *et al.*, 1991) that, besides  $\text{As}^{\text{III}}$ , can also export antimonite. The ArsC-catalyzed  $\text{As}^{\text{V}}$  reduction depends on the presence of glutathione (GSH) and glutaredoxin (Grx), and produces oxidized glutathione (GSSG) (Gladysheva *et al.*, 1994).

The *ars* operon of the *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 encodes a structurally different family of arsenic resistance proteins that consists of only three genes, namely *arsR*, *arsB*, and *arsC*. Similarly to *E. coli*, the ArsR is the regulatory protein, and ArsC is the reducing enzyme. However, ArsB is not an ATP-dependent but rather a membrane

---

potential-driven As<sup>III</sup> exporter (Guangyong *et al.*, 1994). The catalytic mechanism of pI258 ArsC is termed “dynamic disulfide cascade” (Messens *et al.*, 2002) and is essentially different from that observed in ArsC of *E. coli* plasmid R773. With the *S. aureus* enzyme, the three thiol groups contributing to the reduction of As<sup>V</sup> belong to the enzyme protein, and the disulfide formed in the protein during reduction of As<sup>V</sup> is reduced by thioredoxin. In addition, the enzyme contains a specific anion-binding signature motif (P-loop) consisting of Cys-X<sub>5</sub>-Arg, which is also the catalytic motif of low molecular weight tyrosine phosphatases.

In the genome of *Saccharomyces cerevisiae*, a gene cluster consisting of *acr1*, *acr2*, and *acr3*, has been shown to confer resistance to inorganic arsenic (i.e., As<sup>V</sup> and As<sup>III</sup>). Acr1p appears to be the regulator of this gene cluster, whereas Acr2p and Acr3p are structural proteins with As<sup>V</sup> reductase and As<sup>III</sup> exporter roles, respectively (Bobrowicz *et al.*, 1997). Interestingly, the Acr2p protein, the first identified eukaryotic As<sup>V</sup> reductase, exhibits structural similarity to the *S. aureus* (pI258) ArsC arsenate reductase, as it contains the tyrosine phosphatase Cys-X<sub>5</sub>-Arg motif at its active site. On the other hand, Acr2p is functionally analogous to the *E. coli* (R773) ArsC As<sup>V</sup> reductase, because it exhibits reductase activity only when both GSH and Grx are present as electron donors (Mukhopadhyay *et al.*, 2000).

It is important to note that all these microbial non-respiratory As<sup>V</sup> reductase enzymes require the contribution of three thiol groups for proper function. One such group always belongs to the enzyme, whereas the other two thiols may also belong to the enzyme (as seen with the *S. aureus* ArsC) or may be brought by GSH and Grx (as with the *E. coli* ArsC or the yeast Acr2p).

Reduction of arsenate in mammals. In mammalian organisms, As<sup>V</sup> is rapidly reduced to the much more toxic As<sup>III</sup>, as after administration of As<sup>V</sup> to laboratory animals, As<sup>III</sup> rapidly (within 5 min) appears in the blood, bile, urine, and tissues (Csanaky and Gregus, 2005; Thomas *et al.*, 2001). However, there had been no enzyme identified contributing to this process before our work. It has been shown that GSH is able to reduce As<sup>V</sup> chemically (Delnomdedieu *et al.*, 1994a), although the concentrations of the two reactants were physiologically irrelevant (300 mM and 150 mM, respectively). Reduction of As<sup>V</sup> is apparently GSH-dependent in mouse embryo cells (Bertolero *et al.*, 1987), and disposition of As<sup>V</sup> is GSH-dependent in rats *in vivo* (Gyurasics *et al.*, 1991). Direct evidence has recently been presented that As<sup>V</sup> reduction in rats indeed depends on GSH availability (Csanaky and Gregus, 2005).

---

Reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$ , the first step in its biotransformation, is of great toxicological importance not only in  $\text{As}^{\text{V}}$  metabolism but also in determining its toxicity and carcinogenicity, as the product of this biochemical reaction is  $\text{As}^{\text{III}}$  with high toxic potential. The importance of this process and its unclear mechanisms prompted us to initiate research on the biochemical background of  $\text{As}^{\text{V}}$  reduction with the final goal to identify subcellular fractions or even specific enzymes that can catalyze the conversion of  $\text{As}^{\text{V}}$  to  $\text{As}^{\text{III}}$ .

## RESEARCH OBJECTIVES

The primary goal of our research has been to find and identify mammalian enzymes that can catalyze the reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$ . For this purpose, we have determined what cell fractions can catalyze reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$ , and have characterized the observed  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase activities biochemically in order to draw conclusions on the properties of the contributing enzyme. Then we have attempted to directly prove the role of the implicated enzyme by using specific inhibitors and purified enzymes. Our questions have been as follows:

1. Do mitochondria isolated from rat liver and incubated with  $\text{As}^{\text{V}}$  reduce  $\text{As}^{\text{V}}$  to  $\text{As}^{\text{III}}$ ? Mitochondria take up  $\text{As}^{\text{V}}$  (Chan *et al.*, 1969; Wohlrab, 1986), and because they are similar to bacterial cells, which reduce  $\text{As}^{\text{V}}$  and export the formed  $\text{As}^{\text{III}}$ , these organelles may also carry out  $\text{As}^{\text{V}}$  reduction. If they do, how does the functional state of mitochondria (as influenced by respiratory substrates as well as anions structurally similar to  $\text{As}^{\text{V}}$ , GSH content, inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation) affect formation of  $\text{As}^{\text{III}}$  from  $\text{As}^{\text{V}}$ ? Do mitochondria export the formed  $\text{As}^{\text{III}}$ ? Can solubilized mitochondria preserve  $\text{As}^{\text{V}}$ -reducing activity, thereby permitting purification and identification of the mitochondrial  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase?
2. Are extramitochondrial enzymes involved in reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$ ? Do the postmitochondrial cell fractions (i.e., microsomes and cytosol) of the rat liver as well as human red blood cells (devoid of mitochondria) reduce  $\text{As}^{\text{V}}$  to  $\text{As}^{\text{III}}$ ? What are the biochemical characteristics (thiol dependence, effects of inorganic phosphate, nucleotides, thiol reactive compounds, substrates and inhibitors of enzymes and metabolic pathways) of the observed  $\text{As}^{\text{V}}$ -reducing activities? Based on these biochemical properties, what can the catalyzing enzyme be?
3. What is the significance of the enzymes, had they been found to carry out reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$  *in vitro*, in the disposition of  $\text{As}^{\text{V}}$  *in vivo*? This question is important to answer



---

because it is not sufficient to demonstrate that an enzyme can reduce As<sup>V</sup> to As<sup>III</sup> *in vitro* but its role in the *in vivo* As<sup>V</sup> reduction should also be assessed.

## METHODS

### Animals

Usually, male Wistar rats (*Rattus norvegicus Wistar*) weighing 250-300 g were used. However, when testing interspecies differences in As<sup>V</sup> reductase activities, we used CFLP mice (*Mus musculus CFLP*, 33-36 g), English shorthair guinea pigs (*Cavia porcellus*, 400-450 g), Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*, 80-100 g), and New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus N. Z. white*, 1.8-2.5 kg). The animals were kept at room temperature, at 55-65% relative air humidity, and on a 12-hour light/dark cycle and provided with tap water and rodent or rabbit lab chow *ad libitum*. All procedures were carried out according to the Hungarian Animals Act, and the studies were in agreement with the rules of the Ethics Committee on Animal Research of the University of Pécs, Center for Medical and Health Sciences.

### Treatments

Treatments with glutathione depletors. Some rats were injected intraperitoneally with GSH depletors, i.e., buthionine-sulfoximine (BSO, 5 mmol/kg), diethylmaleate (DEM, 6 mmol/kg), or phorone (2 mmol/kg) at 6, 3, and 3 hours before sacrifice, respectively. Mitochondria were isolated from the livers of the thus-pretreated rats.

Treatments with BCX-1777. In order to test the *in vivo* effectiveness of BCX-1777 as an inhibitor of purine nucleoside phosphorylase in liver, rats were anesthetized with urethane (1.2 g/kg) injected ip (5 ml/kg). Through a median abdominal incision, the renal pedicles were ligated to prevent the rapid urinary elimination of BCX-1777, and the animals were injected with BCX-1777 (50 µmol/kg, iv) in saline (2 ml/kg) through their left saphenous vein. 15 min after injection of BCX-1777, the liver was perfused through the portal vein with ice-cold isotonic saline then quickly removed and homogenized, and its cytosolic fraction was isolated.

To determine the *in vivo* effect of BCX-1777 on disposition of As<sup>V</sup>, rats were anesthetized with urethane and injected with BCX-1777, after ligation of their renal pedicles, as described above. 15 min after administration of BCX-1777, As<sup>V</sup> was injected (50 µmol/kg, iv). DTT (300 µmol/kg, iv) was given to some rats 2 min before As<sup>V</sup>.

---

Treatments with (S)- $\alpha$ -chlorohydrin. In order to test the effect of (S)- $\alpha$ -chlorohydrin (ACH) on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and As<sup>V</sup> reductase activities in tissues, rats were injected with ACH (100 or 200 mg/kg, ip) or saline (3 ml/kg, ip). Three hours later liver, kidney, and muscle samples were removed, and their cytosolic fractions were prepared.

In order to test the effect of ACH on reduction of As<sup>V</sup> *in vivo*, two different experiments were carried out. In both, the rats were pretreated ip with ACH (100 mg/kg or 200 mg/kg) or saline (3 ml/kg), 3 hours before As<sup>V</sup> administration. Immediately before injection of As<sup>V</sup>, the rats in the first experiment were subjected to bile duct ligation (BDL-rats), whereas the rats in the second experiment underwent both bile duct and renal pedicle ligation (BDRPL-rats).

### **Preparation of cell fractions and red blood cells for assaying As<sup>V</sup> reductase activity**

Isolation of subcellular fractions. Isolation of subcellular fractions (e.g., mitochondria, cytosol) was carried out using differential centrifugation, as described previously (Hobgeboom, 1955). All steps were carried out at 0-4 °C. The protein concentration of the thus prepared fractions was determined using the biuret method (Gornall *et al.*, 1949) or the bicinchoninic acid method (Brown *et al.*, 1989).

Preparation of human red blood cell suspension. These studies were approved by the Regional Scientific Research Ethics Committee of the University of Pécs, Center for Medical and Health Sciences. Blood (approximately 5 ml) was collected from healthy adult volunteers after informed consent. For experiments with red blood cells (RBC), the preparation and the incubations were carried out in a chloride- and phosphate-free buffer because chloride and phosphate inhibit the uptake of As<sup>V</sup> by the erythrocytes.

### **Enzymatic assays**

The prepared cell fractions or RBC were incubated at 37°C with As<sup>V</sup> in the presence of test compounds. The incubation was started with addition of As<sup>V</sup> and was stopped by protein precipitation.

In order to determine the respiratory control ratio, we measured mitochondrial oxygen consumption polarographically at 25 °C using a Clark-type oxygen electrode. Respiratory control ratio was calculated by dividing State III rate by State IV rate.

GSH levels in tissue samples and mitochondria were determined by the method of Tietze (1969), while non-protein thiol (NPSH) levels by Sedlak and Lindsay (1968).

---

Purine nucleoside phosphorylase was assayed by the spectrophotometric method of Kalckar (1947). The activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was assayed spectrophotometrically based on the decrease of NADH concentration (0.25 mM) during the GAPDH-limited conversion of 3-phosphoglycerate (5 mM) to glyceraldehyde-3-phosphate in the presence of excess phosphoglycerate kinase and ATP.

### **Studying the disposition of As<sup>V</sup> on rats**

In order to assess the contribution of enzymes to the *in vivo* reduction of As<sup>V</sup> that catalyzed this process effectively *in vitro*, we performed experiments on anesthetized rats. The anesthesia and surgical preparation of rats was adapted to the experimental objectives (specific details of these experiments are given in the Methods sections in the respective publications). Thereafter, the rats were injected with As<sup>V</sup> (50 μmol/kg body weight) intravenously (3 ml/kg b.w.), and bile and/or urine were collected in 20-min periods for 60 minutes then tissue samples were removed and immediately processed for arsenic analysis.

### **Arsenic analysis**

Sample preparation. The incubates originating from the As<sup>V</sup> reductase assays and subjected to protein precipitation were centrifuged. The resultant supernatant was used for speciation and quantification of arsenic. Bile, urine, and tissue samples from experiments on As<sup>V</sup>-injected rats were prepared for arsenic analysis immediately after collection. The bile and urine samples were deproteinized and diluted appropriately, and applied to the arsenic speciation. The blood samples from the *in vivo* experiments were mixed with Triton X-100 then aqueous HgCl<sub>2</sub> solution was added to displace thiol-bound arsenic. Finally, perchloric acid was added, mixed thoroughly, and centrifuged. The resultant supernatant was applied to arsenic speciation. The weighed tissue samples were homogenized in perchloric acid. Thereafter, 0.5 ml homogenate was mixed with HgCl<sub>2</sub>, and then centrifuged. The resultant supernatant was applied to arsenic speciation.

Speciation of arsenic by HPLC–HG–AFS. Arsenicals from the As<sup>V</sup> reductase assays and biological samples obtained from As<sup>V</sup> injected rats were separated and quantified by HPLC–hydride generation–atomic fluorescence spectrometry (HPLC–HG–AFS) based on the procedure of Gomez-Ariza *et al.* (1998), as described in detail by Gregus *et al.* (2000).

---

## RESULTS

### Mitochondrial reduction of arsenate

#### *Background*

The environmentally prevalent  $\text{As}^{\text{V}}$  undergoes reduction to  $\text{As}^{\text{III}}$  in living organisms as the first step of its metabolism (Thomas *et al.*, 2001). However, neither the contributing enzymes nor the cellular localization of this important toxification process has been known. Reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$  in cultured cells (Bertolero *et al.*, 1987; Huang and Lee, 1996), erythrocytes (Delnomdedieu *et al.*, 1995), and human liver cytosol (Radabaugh and Aposhian, 2000) has been observed, but the participating enzyme remained unknown. Bacterial or yeast cells can take up  $\text{As}^{\text{V}}$  from the environment, and then reduce it to  $\text{As}^{\text{III}}$  in a GSH- and Grx-dependent or thioredoxin-dependent manner. The formed  $\text{As}^{\text{III}}$  is then extruded from these cells via ATP-driven or membrane potential-dependent transporters.

Mitochondria also take up  $\text{As}^{\text{V}}$  through their  $\text{P}_i$ -moving transport proteins, i.e., the phosphate transporter (Chan *et al.*, 1969; Wohlrab, 1986) and the dicarboxylate carrier (Indiveri *et al.*, 1989). Mitochondrial accumulation of arsenic has been found in the kidneys of  $\text{As}^{\text{V}}$ -injected rabbits (Vahter and Marafante, 1989). At high concentrations,  $\text{As}^{\text{V}}$  uncouples the oxidative phosphorylation in a  $\text{P}_i$ -free medium (Crane and Lipmann, 1953), most likely because ATP synthase forms ADP-arsenate, which rapidly hydrolyses to ADP and  $\text{As}^{\text{V}}$ . This uncoupling mechanism could be prevented by oligomycin (Estabrook, 1961), which inhibits the ATP synthase. Mitochondria are believed to have arisen from aerobic bacteria and resemble bacterial cells in many aspects; therefore, they may be able to carry out reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$  to  $\text{As}^{\text{III}}$ . We tested this hypothesis to determine if mitochondria isolated from rat liver reduced  $\text{As}^{\text{V}}$  to  $\text{As}^{\text{III}}$ , and if they did so, what the characteristics of this process were.

#### *Results and Conclusions*

Isolated rat liver mitochondria rapidly reduced  $\text{As}^{\text{V}}$  to  $\text{As}^{\text{III}}$ . Among the respiratory substrates supporting the citric acid cycle, glutamate enhanced reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$  the most, whereas succinate and malate exerted inhibitory effect of on  $\text{As}^{\text{V}}$  reduction that may originate, at least partly, from countering the mitochondrial  $\text{As}^{\text{V}}$  uptake through the dicarboxylate carrier. Inorganic substrates of this transporter (e.g., sulfate, sulfite, thiosulfate) also decreased mitochondrial  $\text{As}^{\text{V}}$  reduction. In the absence of dicarboxylates, both the dicarboxylate carrier and the mitochondrial  $\text{P}_i$  transporter can mediate  $\text{As}^{\text{V}}$  uptake

---

(Chan *et al.*, 1969; Wohlrab, 1986). Inhibitors of these proteins (e.g., *N*-ethylmaleimide, mersalyl, and butylmalonate) abolished mitochondrial formation of As<sup>III</sup> most likely by preventing the entry of As<sup>V</sup>. P<sub>i</sub> inhibited As<sup>V</sup> reduction in a concentration-dependent manner most likely not only by competing with As<sup>V</sup> uptake but also by directly interfering with the reducing enzyme, owing to their structural similarity. ADP increased, whereas ATP and AMP decreased, As<sup>III</sup> formation, and their effects could be prevented by atractyloside. Electron transport inhibitors and uncouplers abolished As<sup>V</sup> reduction, whereas ATP-synthase inhibitors almost completely inhibited it. As<sup>III</sup> was recovered completely from the supernatant of the mitochondrial incubate, suggesting that mitochondria exported the formed As<sup>III</sup>. Testing the effects on As<sup>V</sup> reduction of chemicals that interfere with thioredoxin reductase failed to support the role of this enzyme in reduction of As<sup>V</sup>. Depletion of mitochondrial GSH impaired mitochondrial As<sup>V</sup>-reducing activity but also diminished the respiratory control ratio. Upon solubilization of mitochondria, their reducing activity was lost and was not recovered by addition of GSH and NADH or NADPH. In summary, we have demonstrated for the first time that mitochondria are capable of reducing As<sup>V</sup> to the more toxic As<sup>III</sup>. Like some microbial cells, mitochondria take up As<sup>V</sup>, reduce it, and export the formed As<sup>III</sup>. In this process, these organelles work as integrated units, like chemical reactors, requiring both structural and functional integrity. Further research is deemed necessary to clarify the molecular mechanisms of mitochondrial As<sup>V</sup> reduction as well as the role of mitochondria in the conversion of As<sup>V</sup> to As<sup>III</sup> *in vivo*.

## **Purine nucleoside phosphorylase as a cytosolic arsenate reductase**

### *Background*

After finding that mitochondria isolated from rat liver reduce As<sup>V</sup> to the much more toxic As<sup>III</sup>, it was of interest to know if other cell fractions could also carry out this important toxification reaction. It was found that the cytosolic fraction of the human liver exhibits As<sup>V</sup> reductase activity, which requires a heat-stable cofactor of less than 3000-dalton molecular mass (Radabaugh and Aposhian, 2000). Therefore, we intended to determine whether the postmitochondrial cell fractions of rat liver also possess As<sup>V</sup> reductase activity, and if they do, to characterize this activity with the ultimate goal of identifying the enzyme(s) involved.

---

## *Results and Conclusions*

Incubations of rat liver postmitochondrial supernatant (PMSN) with  $\text{As}^{\text{V}}$  revealed that PMSN reduced  $\text{As}^{\text{V}}$  to  $\text{As}^{\text{III}}$  only in the presence of a thiol. GSH supported the PMSN-catalyzed  $\text{As}^{\text{III}}$  formation poorly, whereas dithiothreitol (DTT) enhanced it markedly. After separating the microsomal and cytosolic fractions and testing their  $\text{As}^{\text{V}}$ -reducing activities, we demonstrated that the microsomes did not contain any  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase activity, but the cytosol catalyzed the formation of  $\text{As}^{\text{III}}$  from  $\text{As}^{\text{V}}$  effectively, indicating that the catalyzing enzyme resides in the cytosol. Oxyanions related to  $\text{As}^{\text{V}}$  structurally (such as  $\text{P}_i$  or *o*-vanadate) as well as mercurial thiol-reagents inhibited  $\text{As}^{\text{V}}$  reduction, indicating the involvement of an SH-enzyme, which possesses a  $\text{P}_i$ -binding site that can accommodate  $\text{As}^{\text{V}}$  too.

On searching for a reduction partner, we surprisingly found that oxidized pyridine nucleotides (i.e., NAD and NADP) but not their reduced counterparts, markedly enhanced the cytosolic reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$ . This observation prompted us to test a number of other nucleotides as well. These experiments revealed that some other purine nucleotide derivatives (e.g., AMP, GMP, S-adenosylhomocysteine), but not pyrimidine nucleotides, enhanced the conversion of  $\text{As}^{\text{V}}$  to  $\text{As}^{\text{III}}$ . Because these nucleotides can readily be transformed into purine nucleosides during the incubations, we tested the effect of nucleosides and nucleobases on cytosolic  $\text{As}^{\text{V}}$  reduction. Pyrimidine nucleosides did not affect  $\text{As}^{\text{III}}$  formation. In contrast, purine nucleosides, especially the 6-oxopurine ones (i.e., inosine and guanosine), increased it dramatically (80-100 fold). Adenosine (6-aminopurine nucleoside) was much less potent, suggesting that it may be converted into inosine by adenosine deaminase. In contrast, the 6-oxopurine bases strongly inhibited  $\text{As}^{\text{III}}$  formation from  $\text{As}^{\text{V}}$  by rat liver cytosol (by 80-90%). Moreover, ultrafiltration of rat liver cytosol yielded a retentate lacking  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase activity almost completely. The  $\text{As}^{\text{V}}$ -reducing activity of the retentate was restored by adding the filtrate, inosine, or guanosine to it, indicating that endogenous purine nucleosides are essential for the cytosolic  $\text{As}^{\text{V}}$  reduction. In addition, this 6-oxopurine nucleoside-stimulated  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase activity was demonstrated to be present in the hepatic cytosol of other common laboratory animals, such as mice, hamsters, guinea pigs, and rabbits.

These findings allowed us to make the following tentative conclusions: (1) The cytosolic  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase requires the presence of an appropriate thiol and is inhibited by thiol-reagents; therefore, the enzyme most likely possesses functionally critical SH-groups. (2)  $\text{P}_i$  inhibits the  $\text{As}^{\text{V}}$ -reducing activity of this enzyme; therefore, it possesses a  $\text{P}_i$ -binding

---

site and probably utilizes  $P_i$  as a substrate. (3) 6-oxopurine nucleosides strongly increase the  $As^V$  reductase activity; therefore, the enzyme may accept 6-oxopurine nucleosides as substrates. (4) 6-oxopurine nucleobases markedly decrease the reducing activity; therefore, the catalyzing enzyme may form 6-oxopurine nucleobases.

The enzyme that fits these deduced characteristics is known as purine nucleoside phosphorylase (PNP). PNP is soluble cytosolic enzyme with important thiol groups (Bzowska *et al.*, 2000; Parks and Agarwal, 1972). The enzyme, while utilizing  $P_i$ , catalyzes the phosphorolytic cleavage of 6-oxopurine nucleosides to the corresponding nucleobase and ribose-1-phosphate. Like many  $P_i$ -utilizing enzymes, PNP also accepts  $As^V$  instead of  $P_i$  and produces the purportedly unstable ribose-1-arsenate (Kline and Schramm, 1993). Therefore, we tested the hypothesis that PNP is responsible for the thiol- and purine nucleoside-dependent reduction of  $As^V$  by hepatic cytosol. The following pieces of evidence supporting this hypothesis that PNP can function as  $As^V$  reductase were obtained: (1) Specific and highly potent inhibitors of PNP (i.e., BCX-1777 and CI-1000) decreased the  $As^V$  reductase activity of rat liver cytosol in a concentration-dependent manner, causing complete inhibition at a concentration as low as 1  $\mu$ M in the hepatic cytosol. (2) The  $As^V$  reductase activity consistently and perfectly co-eluted with the PNP activity during the anion exchange chromatography of rat liver cytosol, representing circumstantial evidence that both activities belong to the same protein. (3) Purified PNP effectively catalyzed the reduction of  $As^V$ , provided its nucleoside substrate and appropriate thiol were present simultaneously, proving directly that PNP can indeed function as an  $As^V$  reductase. (4) Various chemicals similarly influenced the reduction of  $As^V$  by rat liver cytosol and by purified PNP, as both were activated by 6-oxopurine nucleosides and DTT, and both were inhibited by  $P_i$ , mercurial thiol reagents, and specific PNP inhibitors. These observations constitute compelling evidence that the DTT-supported  $As^V$  reductase activity in the hepatic cytosol of rats and other species can be ascribed to PNP. Our observations indicated that the PNP-catalyzed  $As^V$  reduction takes place during, or as a consequence of, the arsenolytic cleavage of 6-oxopurine nucleosides.

Our results presented so far clearly indicated that PNP is an efficient  $As^V$  reductase *in vitro*. It was therefore of high interest whether this ubiquitous enzyme contributes to the reduction of  $As^V$  *in vivo*. To assess such a role of PNP, we used two experimental approaches. First, we tested if compounds influenced  $As^V$  reduction by intact human red blood cells (RBC) similarly to that by purified PNP. The erythrocytes reduced  $As^V$  at a considerable rate, which could be enhanced by inosine or inosine plus DTT. These

---

stimulated As<sup>III</sup> formation rates were PNP-dependent, as PNP inhibitors strongly inhibited them. In contrast, PNP inhibitors had little if any inhibitory effect on As<sup>III</sup> formation in the absence of exogenous inosine, indicating that this basal rate of As<sup>V</sup> reduction is PNP-independent. Second, we assessed the role of PNP in reduction of As<sup>V</sup> *in vivo* by investigating the effect of the specific and potent PNP inhibitor BCX-1777 on the biotransformation of As<sup>V</sup> in control and DTT-treated rats. Although it abolished hepatic PNP activity, BCX-1777 influenced neither the biliary excretion of As<sup>III</sup> and MMAs<sup>III</sup> nor the tissue concentrations of As<sup>V</sup> and its metabolites in either group of As<sup>V</sup>-injected rats. Thus, despite its *in vitro* activity, PNP does not appear to play a significant role in As<sup>V</sup> reduction in human erythrocytes and in rats *in vivo*.

### **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a cytosolic arsenate reductase**

#### *Background*

Despite the promising findings that PNP reduces As<sup>V</sup> to the much more toxic As<sup>III</sup>, provided its nucleoside substrate and an appropriate dithiol are present simultaneously, we found that PNP does not contribute significantly to the reduction of As<sup>V</sup> either in intact human erythrocytes or in rats *in vivo*. Intact human RBC retained most of their As<sup>V</sup>-reducing activity even in the presence of high concentrations of BCX-1777. Moreover, complete inhibition of PNP in rats by administration of BCX-1777, a highly potent transition state analogue inhibitor of the enzyme, did not delay the elimination of As<sup>V</sup> and the formation of As<sup>V</sup> metabolites. In addition, the observation that the As<sup>V</sup> reductase activity of PNP is poorly supported by GSH, whereas As<sup>V</sup> reduction is apparently GSH-dependent in cells (Bertolero *et al.*, 1987) and in rats (Csanaky and Gregus, 2005), also contradicts to the role of PNP as an *in vivo* relevant As<sup>V</sup> reductase.

As demonstrated, intact human erythrocytes reduce As<sup>V</sup> to As<sup>III</sup> in a manner mostly independent of PNP. To characterize this PNP-independent As<sup>V</sup> reductase activity, we started another series of experiments with the final aim of identifying the enzyme responsible for the PNP-independent reduction of As<sup>V</sup>.

#### *Results and Conclusions*

Intact human red blood cells reduce As<sup>V</sup> to As<sup>III</sup> intracellularly, because both the natural substrate chloride and an irreversible inhibitor (diisothiocyanatostyrene-disulfonic acid) of the chloride-bicarbonate exchanger (which mediates erythrocytic P<sub>i</sub> and As<sup>V</sup> uptake) inhibited As<sup>V</sup> reduction by intact, but not lysed, RBC. The basal (i.e., PNP-



---

independent) As<sup>V</sup>-reducing activity of RBC requires GSH, because the GSH depletor diethylmaleate strongly diminished As<sup>III</sup> formation. The erythrocytic As<sup>V</sup> reduction apparently depends on NAD and/or NADP supply, because oxidants of NAD(P)H (e.g., pyruvate, ferricyanide, dehydroascobate, 4-dimethylaminophenol) enhanced As<sup>III</sup> formation. The oxidant-stimulated As<sup>V</sup> reduction is PNP-independent, because BCX-1777 failed to influence it, but is GSH-dependent because the GSH-depleting diethylmaleate impaired it. Pyruvate-induced glucose-depletion, which causes NAD enrichment at the expense of NADH, enhanced As<sup>V</sup> reduction. This suggests that the erythrocytic As<sup>V</sup> reduction requires both NAD supply and operation of the lower part of the glycolytic pathway starting from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) that, unlike the upper part, remains fed with substrates originating from the degradation of the RBC-specific compound 2,3-bisphosphoglycerate. These substrates cannot go above GAPDH because this would require NADH, which is depleted in RBC pretreated with pyruvate. Fluoride, which arrests glycolysis at enolase, inhibited As<sup>V</sup> reduction in glucose-sufficient RBC, but increased it in glucose-deficient (NAD-enriched) cells, suggesting that the section of glycolysis coupled to As<sup>V</sup> reduction lies between GAPDH and enolase (i.e., one or more of GAPDH, phosphoglycerate kinase, and phosphoglycerate mutase).

In order to characterize this PNP-independent As<sup>V</sup> reductase activity further, we examined the effects of GSH, inorganic phosphate, some inhibitors of glucose metabolism, glycolytic substrates, and pyridine as well as adenine nucleotides on As<sup>V</sup> reduction in lysed RBC and rat liver cytosol in the presence of BCX-1777, a PNP inhibitor. In hemolysate, GSH enhanced As<sup>V</sup> reduction in a concentration dependent manner, whereas phosphate inhibited it. Glycolytic substrates, especially fructose-1,6-bisphosphate and phosphoglyceric acids, improved As<sup>V</sup> reductase activity. NAD, especially together with these substrates, strongly increased As<sup>III</sup> formation, whereas NADH strongly inhibited it. NADP and adenine nucleotides diminished, while 2-phosphoglycollate, which increases the breakdown of the RBC-specific compound 2,3-bisphosphoglycerate to 3-phosphoglycerate, doubled the As<sup>V</sup> reductase activity. Although As<sup>V</sup> reduction by the liver cytosol responded similarly to GSH, NAD, and glycolytic substrates as in the hemolysate, it was barely influenced by NADH, was diminished by 2-phosphoglycollate and stimulated by NADP. Collectively, hemolysate and rat liver cytosol possess a PNP-independent As<sup>V</sup> reductase activity, which requires GSH, NAD, and glycolytic substrates. The need for GSH and the sensitivity to mercurial thiol reagents indicate the presence of critical thiol groups. The lack of such groups in phosphoglycerate mutase excludes this enzyme as a candidate

---

As<sup>V</sup> reductase. In contrast, the two functionally linked glycolytic enzymes, GAPDH and phosphoglycerate kinase (PGK) came into view, as possible As<sup>V</sup> reductases, because they contain functionally important thiol groups, and their substrates enhanced reduction of As<sup>V</sup> the most.

In testing the hypothesis that one or both of GAPDH and PGK can reduce As<sup>V</sup> to As<sup>III</sup>, we found that, if supplied with glutathione (GSH), NAD, and glycolytic substrate, the mixture of purified GAPDH and PGK indeed catalyzed the reduction of As<sup>V</sup>. Further analysis revealed that GAPDH is endowed with As<sup>V</sup> reductase activity, whereas PGK serves as an auxiliary enzyme, when 3-phosphoglycerate is the glycolytic substrate. The GAPDH-catalyzed As<sup>V</sup> reduction required GSH, NAD, and glyceraldehyde-3-phosphate. ADP and ATP moderately, whereas NADH strongly inhibited the As<sup>V</sup> reductase activity of the enzyme even in the presence of NAD. Koningic acid (KA), a specific and irreversible inhibitor of GAPDH, inhibited both the classical enzymatic and the As<sup>V</sup>-reducing activities of the enzyme in a concentration-dependent fashion. To assess the contribution of GAPDH to the reduction of As<sup>V</sup> carried out by hemolysate, rat liver cytosol, or intact erythrocytes, we determined the concentration-dependent effect of KA on As<sup>V</sup> reduction by these cells and extracts. Inactivation of GAPDH by KA abolished As<sup>V</sup> reduction in intact RBC as well as in the hemolysate and the liver cytosol, when GAPDH in the latter extracts was abundantly supplied with exogenous NAD and glycolytic substrate. However, despite complete inactivation of GAPDH by KA, the hepatic cytosol exhibited significant residual As<sup>V</sup>-reducing activity in the absence of exogenous NAD and glycolytic substrate, supporting our finding that besides GAPDH, other cytosolic enzyme(s) may contribute to As<sup>V</sup> reduction in the liver. In conclusion, the key glycolytic enzyme GAPDH can fortuitously catalyze the reduction of As<sup>V</sup> to As<sup>III</sup>, if GSH, NAD, and glycolytic substrate are available. As<sup>V</sup> reduction may take place during, or as a consequence of, the arsenolytic cleavage of the thioester bond formed between the enzyme's Cys149 and the 3-phosphoglyceroyl moiety of the substrate.

An important further question is whether or not GAPDH significantly contributes to reduction of As<sup>V</sup> *in vivo*. The relevance of this question can be appreciated by the example of PNP, which works very efficiently as an As<sup>V</sup> reductase *in vitro* but not *in vivo*. To test this hypothesis that GAPDH significantly contributes to the disposition of As<sup>V</sup> *in vivo*, we examined the effect of (S)- $\alpha$ -chlorohydrin (ACH) – which *in vivo* likely forms a GAPDH-inhibitory metabolite mainly in the liver – on the reduction of As<sup>V</sup> in rats. These studies confirmed the *in vitro* role of GAPDH as an As<sup>V</sup> reductase, inasmuch as 3 hours after

---

administration of ACH (100 or 200 mg/kg, ip) to rats both the cytosolic GAPDH activity and the As<sup>V</sup>-reducing activity dramatically fell in the liver, moderately decreased in the kidneys, and remained unchanged in the muscle. Moreover, the As<sup>V</sup>-reducing activity closely correlated with the GAPDH activity in the hepatic cytosols of control and ACH-treated rats. Two confounding effects of ACH (i.e., a slight fall in hepatic glutathione levels and a rise in urinary As<sup>V</sup> excretion) prompted us to examine its influence on the disposition of injected As<sup>V</sup> in rats with ligated bile duct as well as in rats with ligated bile duct and renal pedicles. These experiments demonstrated that the hepatic retention of As<sup>V</sup> significantly increased and the combined levels of As<sup>V</sup> metabolites (i.e., As<sup>III</sup> plus methylated arsenicals) in the liver decreased in response to ACH; however, ACH failed to delay the disappearance of As<sup>V</sup> from the blood of rats with blocked excretory routes. Thus, the GAPDH inactivator ACH inhibits As<sup>V</sup> reduction by the liver, but not by the whole body, probably because the impaired hepatic reduction is compensated for by hepatic and extrahepatic As<sup>V</sup>-reducing mechanisms spared by ACH. It is most likely that ACH inhibits hepatic As<sup>V</sup> reduction predominantly by inactivating GAPDH in the liver; however, a slight ACH-induced glutathione depletion may also contribute. While these results seem to support the conclusion that GAPDH in the liver is involved in As<sup>V</sup> reduction in rats, confirmation of the *in vivo* role of GAPDH as an As<sup>V</sup> reductase calls for further research.

## NEW RESULTS

1. We have demonstrated for the first time that mitochondria isolated from rat liver can take up As<sup>V</sup>, reduce it to the much more toxic As<sup>III</sup>, and export the formed As<sup>III</sup>. Mitochondrial reduction of As<sup>V</sup> requires both the structural and the functional integrity of these organelles. Inorganic phosphate at physiologically relevant concentrations markedly diminished mitochondrial As<sup>V</sup> reduction, suggesting that the contribution of these organelles to the reduction of As<sup>V</sup> *in vivo* might not be significant.
2. Not only hepatic mitochondria but also rat liver cytosol can reduce As<sup>V</sup> to As<sup>III</sup> in a thiol-dependent fashion. One cytosolic As<sup>V</sup> reductase activity is supported by the physiologically irrelevant thiol compound DTT as well as by purine nucleosides, especially the 6-oxopurine ones, and is inhibited 6-oxopurine bases and mercurial thiol reagents. We found that the purine nucleoside- and DTT-supported cytosolic As<sup>V</sup>-reducing activity is ascribable to purine nucleoside phosphorylase (PNP). It is indicated

- 
- by (1) coelution of  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase and PNP activities during anion exchange chromatography of cytosolic proteins, (2) sensitivity of the  $\text{As}^{\text{V}}$ -reducing activity to PNP inhibitors (i.e., BCX-1777 and CI-1000), and (3) the reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$  by purified PNP, provided an appropriate thiol (e.g., DTT, dimercaprol) and its substrate (inosine or guanosine) are present simultaneously. This DTT-stimulated  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase activity inhibitable by PNP inhibitors could be detected in the hepatic cytosol of rats, mice, hamsters, guinea pigs, and rabbits. Inhibitors of the enzyme inhibited not only its classical biochemical activity but also its  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase activity.
3. In spite of the fact that under appropriate conditions PNP rapidly reduces  $\text{As}^{\text{V}}$  to  $\text{As}^{\text{III}}$  *in vitro*, PNP is apparently not involved in the reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$  *in vivo*. This conclusion is supported by the observation that BCX-1777 administered to rats completely inhibited the hepatic PNP activity, but failed to alter the *in vivo* disposition of  $\text{As}^{\text{V}}$  either the animals were or were not injected with DTT, the activator of the PNP-catalyzed  $\text{As}^{\text{V}}$  reduction.
  4. Intact human red blood cells can take up  $\text{As}^{\text{V}}$  via the chloride-bicarbonate exchanger, and reduce  $\text{As}^{\text{V}}$  to  $\text{As}^{\text{III}}$ . The erythrocytic  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase activity is increased by inosine and/or DTT. This increment is PNP-dependent, as it is abolished by the PNP inhibitor BCX-1777. The basal erythrocytic  $\text{As}^{\text{V}}$  reduction, however, is PNP-independent, as it is not affected by PNP inhibition.
  5. The PNP-independent  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase activity of human RBC apparently depends on intraerythrocytic availabilities of GSH and NAD, as the GSH depletor DEM inhibits it, whereas chemicals that promote oxidation of NADH to NAD enhance the reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$  by intact RBC. This GSH- and NAD-dependent  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase activity is also present in RBC lysate and in rat liver cytosol. This activity is augmented by glycolytic substrates, especially together with NAD, suggesting involvement of a glycolytic enzyme.
  6. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reduces  $\text{As}^{\text{V}}$  to  $\text{As}^{\text{III}}$ , provided GSH, NAD, and glycolytic substrate are present. Koningic acid inhibits both the glycolytic activity and the  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase activity of GAPDH. Using the GAPDH-inhibiting koningic acid, it can be observed that GAPDH is exclusively

---

responsible for the PNP-independent  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase activity of human RBC and significantly contributes to that in rat liver cytosol.

7. Apparently, GAPDH contributes to the reduction of  $\text{As}^{\text{V}}$  *in vivo*, at least in the rat liver. This conclusion is supported by the observation that pretreatment of rats with ACH (which forms a GAPDH inhibitory metabolite) decreases both GAPDH and  $\text{As}^{\text{V}}$  reductase activities in hepatic cytosol and also decreases the  $\text{As}^{\text{V}}$  metabolite-to- $\text{As}^{\text{V}}$  ratio in the liver of  $\text{As}^{\text{V}}$ -injected rats.

---

## REFERENCES

- 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*, 6<sup>th</sup> 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* (2<sup>nd</sup> 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.

---

## OWN PUBLICATIONS

### Publications the dissertation is based on

- 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)

### Other publications

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)



---

## Oral presentations

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: citoszólbéli 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 citoszólbéli 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.

## Posters

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. *41<sup>st</sup> 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. *41<sup>st</sup> 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. *41<sup>st</sup> 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. *41<sup>st</sup> 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. *40<sup>th</sup> 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. *40<sup>th</sup> 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. *40<sup>th</sup> 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. *40<sup>th</sup> 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. *44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology*, New Orleans (LA), 5-10 of March.
  12. Gregus, Z., and Németi, B. (2005). Glyceraldehyde-3-phosphate as an arsenate reductase in human red blood cells and rat liver cytosol. *44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology*, New Orleans (LA), 5-10 of March.

---

## ABBREVIATIONS

As <sup>V</sup>	arsenate
As <sup>III</sup>	arsenite
MMAs <sup>III</sup>	monomethylarsonous acid
MMAs <sup>V</sup>	monomethylarsonic acid
DMAs <sup>V</sup>	dimethylarsinic acid (cacodylic acid)
ACH	(S)- $\alpha$ -chlorohydrin
ADP	adenosine diphosphate
AMP	adenosine monophosphate
ATP	adenosine triphosphate
BDL	bile duct-ligated (rat)
BDRPL	bile duct- and renal pedicle ligated (rat)
BSO	D,L-buthionine-S,R-sulfoximine
DEM	diethyl maleate
DTT	dithiothreitol
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Grx	glutaredoxin
GSH	reduced glutathione
GSSG	oxidized glutathione
HPLC-HG-AFS	high performance liquid chromatography – hydride generation – atomic fluorescence spectrometry
KA	koningic acid
NAD(P)	nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)
NAD(P)H	reduced nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)
NPSH	non-protein thiol
PGK	phosphoglycerate kinase
P <sub>i</sub>	inorganic orthophosphate
PMSN	postmitochondrial supernatant
PNP	purine nucleoside phosphorylase
RBC	red blood cell
Trx	thioredoxin
TRR	thioredoxin reuctase

---

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

I wish to thank my family first for their patience and incentive I have been given during the long hours preparing my dissertation.

I am particularly grateful to Professor Zoltán Gregus for tutoring me in my work, for his human, patient, and exemplary attitude, for his useful advice, and for making and ensuring the conditions for me to work successfully.

I am beholden to Mónika Agyaki and István Schweibert for their excellent assistance in the experimental work.

My dissertation is based on a work supported by the Hungarian National Research Fund (OTKA) and the Hungarian Ministry of Health (ETT).