

# Ekspresja transferazy S-glutationowej pi w ośrodkowym układzie nerwowym myszy podczas starzenia

BEATA KAŻMIERCZAK, EWA USAREK, BEATA GAJEWSKA,  
MAGDALENA KUŻMA\*, ANNA BARAŃCZYK-KUŻMA

Katedra i Zakład Biochemii, \*Katedra i Klinika Neurologii Akademii Medycznej, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

Kaźmierczak B., Usarek E., Gajewska B., Kuźma M., Barańczyk-Kuźma A.

## Expression of glutathione S-transferase pi in the central nervous system during aging

### Summary

Glutathione S-transferases are a family of enzymes responsible for inactivation of toxic electrophilic compounds by binding them with reduced glutathione. Due to their peroxidase activity, they can also protect cells against oxidative stress, an important factor involved in aging. In the present work the expression of GST pi was studied in the brain frontal cortex, hippocampus, cerebellum and spinal cord of mice aged 70 and 140 days. The expression was studied on both mRNA (RT-PCR) and protein levels (Western blotting and immunohistochemistry assay). A decreased level of GST pi expression was found in all studied structures of older animals. The lowest expression, as well as its highest decrease with age, was observed in the cerebellum. Significant decrease of GST pi expression in the cerebellum of older subjects may increase this structure's susceptibility to toxic compounds.

**Keywords:** glutathione S-transferase pi, central nervous system, aging

Ośrodkowy układ nerwowy (OUN) ze względu na swój unikalny charakter jest szczególnie wrażliwy na działanie związków chemicznych. Skuteczną ochronę przed działaniem toksycznych związków chemicznych zapewniają zlokalizowane w komórkach OUN enzymy katalizujące reakcje biotransformacji, a w szczególności reakcje drugiej fazy, do których należą transferazy S-glutationowe (GST, EC 2.5.1.18).

Transferazy S-glutationowe stanowią rodzinę białek występujących w tkankach ssaków w formie licznych izoenzymów (9, 14). Unieczynniają one wiele toksycznych związków elektrofilowych przez sprzężenie ich ze zredukowanym glutationem (3, 12, 16, 21). Niektóre izoenzymy posiadają także aktywność peroksydazową, dzięki której zubożniają organiczne nadtlarki (10, 18). Transferazy S-glutationowe wykazują wyjątkową zdolność do niespecyficznego wiązania i przenoszenia wewnątrz komórki endo- i egzogennych związków chemicznych (stąd pierwotna nazwa wątrobowej GST – ligandyna) (1, 4, 17). Ponieważ wśród wiązanych przez transferazy glutationowe związków mogą znajdować się leki, uważa się, że enzymy te mogą być odpowiedzialne za lekooporność (5, 6, 22). Ze względu na możliwość katalitycznego i niekatalitycznego wiązania związków chemicznych, transferazy glutationowe pełnią szczególną rolę w tworzeniu bariery ochronnej tkanek. Izoenzymy transfe-

razy S-glutationowej są produktami ekspresji wielu genów. W tkankach ssaków występują cytozolowe transferazy S-glutationowe należące do klas alfa, mi, pi, theta, kappa i chi (8, 13, 15). W mózgu ssaków znajdują się izoenzymy pi, mi i alfa, z których główną jest izoforma pi (2, 20). Znaczne różnice indywidualne i tkankowe w ekspresji transferaz S-glutationowych skierowały uwagę wielu badaczy na te enzymy jako białka zaangażowane w powstawanie, a być może, zapobieganie i leczenie różnych procesów chorobowych (5, 7, 11). Ponieważ wiadomo, że skuteczność mechanizmów detoksykacyjnych zmienia się z wiekiem (19), w obecnej pracy badaliśmy ekspresję GST pi w różnych częściach ośrodkowego układu nerwowego myszy w dwóch przedziałach wiekowych (70 i 140 dni).

### Materiał i metody

Badania prowadzono na myszach samcach szczepu C57BL/6J. Myszy pochodziły ze zwierzętarni Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Materiał badawczy stanowiła kora płata czołowego, hipokamp, mózdzek i rdzeń kręgowy izolowane z 6 myszy młodszych (70 dni) i 6 myszy starszych (140 dni) izolowane natychmiast po dekapitacji zwierząt.

Całkowite RNA otrzymano przy użyciu zestawu NucleoSpin® (Macherey-Nagel). Poziom ekspresji genu GST pi badano metodą RT-PCR (Reverse Transcription - Poly-

merase Chain Reaction). Jako wewnętrzną kontrolę oznaczano ekspresję mRNA rybosomalnego białka S12 (housekeeping gene). Produkty reakcji PCR rozdzielano w żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Poziom ekspresji określano półilościowo jako stosunek gęstości optycznej (OD) prążka GST pi do gęstości optycznej prążka S12. Każde oznaczenie wykonywano w dwóch powtórzeniach.

Białko do analizy metodą Western blotting uzyskiwano homogenizując tkankę w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS). Poziom białka oznaczano metodą Western blottingu, według standardowych procedur. Stosowano królicze, poliklonalne przeciwciała anty-GST pi (Novocastra). Jako kontrolę stosowano oczyszczone białko GST pi z łożyska człowieka (Sigma). Każde oznaczenie wykonywano dwukrotnie w dwóch powtórzeniach.

Do badań immunohistochemicznych tkanki były cięte za pomocą kriostatatu na skrawki grubości 20  $\mu\text{m}$ . Stosowano pierwszorzędowe królicze przeciwciała poliklonalne anty-GST pi. Drugorzędowe przeciwciała anty-królicze sprzężone były z FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc). Jako kontrolę barwiono jądra komórkowe odczynnikami DAPI (Sigma). Preparaty analizowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego Microphot-S.A (Nikon, Japonia) z kamerą (Photometrix CH350A camera).

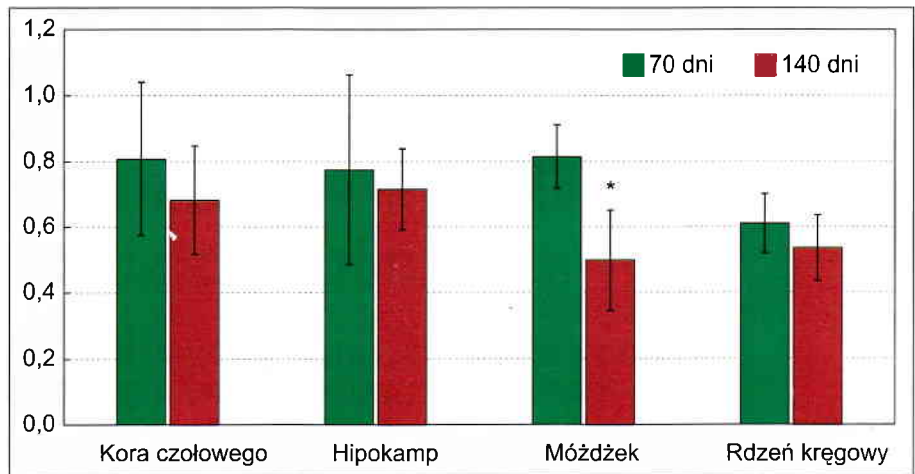
Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy pomocy testu istotności t-Studenta. Za poziom istotności różnic przyjęto  $p \leq 0,05$ .

Badania przeprowadzono za zgodą Komisji Etycznej Akademii Medycznej w Warszawie.

## Wyniki i omówienie

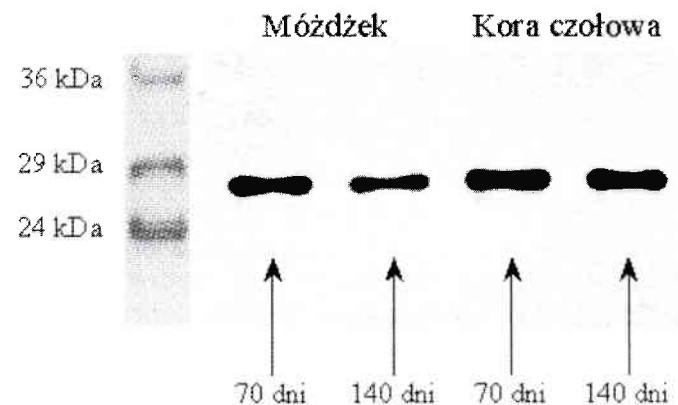
**Ekspresja GST pi na poziomie mRNA.** U młodych myszy (70 dni) ekspresja GST pi na poziomie mRNA w korze płata czołowego, hipokampie i mózdzku była podobna i wynosiła odpowiednio  $0,81 \pm 0,23$ ,  $0,77 \pm 0,29$  i  $0,81 \pm 0,10$ . W rdzeniu kręgowym ekspresja mRNA dla tego enzymu była niższa niż w innych badanych częściach oun i wynosiła  $0,61 \pm 0,09$  (ryc. 1).

U starszych myszy (140 dni) ekspresja mRNA dla GST pi była różna w badanych tkankach. Najniższy poziom ekspresji stwierdzono w mózdzku, gdzie wynosiła ona  $0,50 \pm 0,15$ . Niska była też w rdzeniu kręgowym ( $0,54 \pm 0,10$ ), natomiast w obu badanych częściach mózgu była podobna i wynosiła:  $0,68 \pm 0,17$  w korze płata czołowego i  $0,72 \pm 0,12$  w hipokampie (ryc. 1).

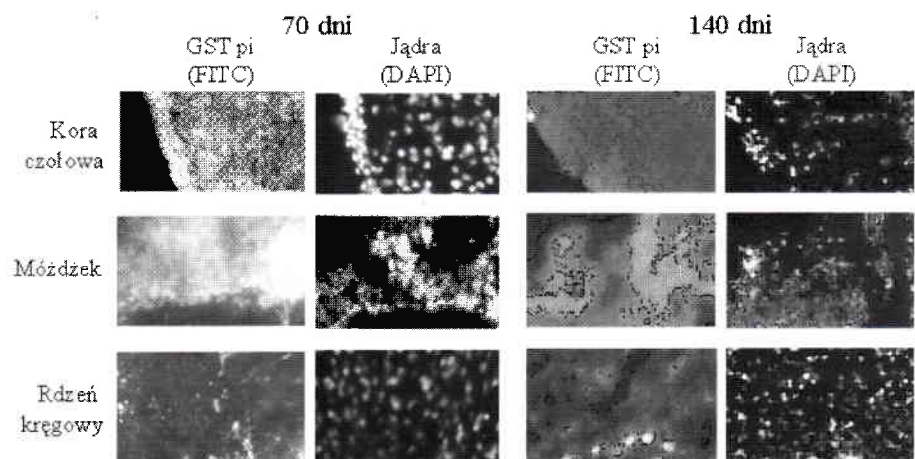


Ryc. 1. Ekspresja GST pi na poziomie mRNA. Ekspresję oznaczano metodą RT-PCR, jak podano w rozdziale Materiał i metody. Każdy wynik jest średnią  $\pm$  SD z oznaczeń wykonanych na 6 myszach, w dwóch powtórzeniach

Ekspresja mRNA dla GST pi we wszystkich badanych częściach oun była niższa u starszych myszy niż u zwierząt młodszych, jednak istotne statystycznie obniżenie ekspresji tego izoenzymu stwierdzono tylko w mózdzku ( $p \leq 0,05$ ).



Ryc. 2. Ekspresja GST pi na poziomie białka. Ekspresję oznaczano metodą Western blottingu, jak podano w rozdziale Materiał i metody



Ryc. 3. Lokalizacja GST pi w ośrodkowym układzie nerwowym myszy. Lokalizację badano immunohistochemicznie, jak podano w rozdziale Materiał i metody. Jako kontrolę barwiono jądra komórkowe (DAPI)

**Ekspresja GST pi na poziomie białka.** Wyniki ekspresji GST pi na poziomie mRNA zostały potwierdzone badaniami ekspresji tego enzymu na poziomie białka, zarówno metodą Western blottingu, jak i immunohistochemii (ryc. 2, 3). Ekspresja GST pi na poziomie białka w korze czołowej i w mózdzku myszy 70-dniowych była podobna i wynosiła odpowiednio 45,2 ng (OD 177,9) i 44,7 ng (OD 175,8), natomiast w tych samych tkankach myszy 140-dniowych wynosiła 42,1 ng (OD 165,5) i 29,7 ng (OD 116,8) (ryc. 2).

W obecnych badaniach wykazano spadek ekspresji GST pi we wszystkich częściach oun osobników starszych w porównaniu do młodszych, najsilniej wyrażoną w mózdzku. Istotne obniżenie ekspresji GST pi w mózdzku osobników starszych, wskazuje na upośledzenie tworzonej przez ten enzym bariery ochronnej, co w efekcie może zwiększać wrażliwość tej struktury na działanie toksycznych związków elektrofilowych oraz organicznych nadtlenuków.

### Piśmiennictwo

1. Abramovitz M. A., Homma H., Ishigaki S., Transey F., Cammer W., Listowsky I.: Characterization and localization of glutathione-S-transferases in rat brain and binding of hormones, neurotransmitters, and drugs. *J. Neurochem.* 1988, 50, 50-57.
2. Alin P., Mannervik B., Jornvall H.: Structural evidence for three different types of glutathione transferase in human tissues. *FEBS Letters* 1985, 182, 319-322.
3. Awasthi Y. C., Dao D. D., Saneto R. P.: Interrelationship between anionic and cationic forms of glutathione S-transferases of human liver. *Biochem. J.* 1980, 191, 1-10.
4. Barańczyk-Kuźma A., Sawicki J.: Biotransformation in monkey brain: coupling of sulfation to glutathione conjugation. *Life Sci.* 1997, 61, 1829-1841.
5. Clapper M. L., Szarka C. E.: Glutathione S-transferases – biomarkers of cancer risk and chemopreventive response. *Chem. Biol. Interact.* 1998, 377, 111-112.
6. Flatgaard J. E., Bauer K. E., Kauvar L. M.: Isozyme specificity of novel glutathione-S-transferase inhibitors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1993, 33, 63-70.
7. Ghalia A. A., Rabboh N. A., el Shalakani A., Seada L., Khalifa A.: Estimation of glutathione S-transferase and its Pi isoenzyme in tumor tissues and sera of patients with ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2000, 20, 1229-1235.
8. Islam M. Q., Platz A., Szpírer C., Szpírer C., Levan G., Mannervik B.: Chromosomal localization of human glutathione transferase genes of classes alpha, mu and pi. *Hum. Genet.* 1989, 82, 338-342.
9. Jakoby W. B.: The glutathione-S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol.* 1978, 46, 383-414.
10. Kamisaka K., Listowsky I., Gatmaitan Z., Arias I. M.: Interactions of bilirubin and other ligands with glutathione S-transferase. *Biochemistry* 1975, 14, 2175-2180.
11. Kantor R. R., Giardina S. L., Bartolazzi A., Townsend A. J., Myers C. E., Cowan K. H., Longo D. L., Natali P. G.: Monoclonal antibodies to glutathione S-transferase pi – immunohistochemical analysis of human tissues and cancers. *Int. J. Cancer.* 1991, 47, 193-201.
12. Kodera Y., Isobe K.-I., Yamaguchi M., Kondo M., Akiyama S., Ito K., Nkashima I., Takagi H.: Expression of glutathione S-transferases alpha and pi in gastric cancer: a correlation with cisplatin resistance. *Cancer Chemother.* 1994, 34, 203-208.
13. Mannervik B., Awasthi Y. C., Board P. G., Hayes J. D., Di Ilio C., Ketterer B., Listowsky L., Morgenstern R., Muramatsu M., Pearson W. R., Pickett C. B., Sato K., Wilderstein M., Wolf C. R.: Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.* 1992, 282, 305-306.
14. Mannervik B.: The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol.* 1985, 57, 357-417.
15. Pickett C. V., Lu A. Y.: Glutathione S-transferases, gene structure, regulations, biological function. *Annu. Rev. Biochem.* 1989, 58, 743-764.
16. Pierce S., Tappel A. L.: Glutathione peroxidase activities from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1978, 523, 27-36.
17. Sawicki J., Kuźma M., Maśliński S., Barańczyk-Kuźma A.: Effect of biogenic amines and their derivatives on glutathione conjugation in brain. *J. Physiol. Pharmacol.* 1997, 48, 100-109.
18. Smith G. J., Ohl V. S., Litwack G.: Purification and properties of hamster liver ligandins, glutathione S-transferases. *Cancer Res.* 1980, 40, 1787-1790.
19. Stohs S. J., Al-Turk W. A., Angle C. R., Heinicke R. J.: Glutathione S-transferase activity in liver, lung and intestinal mucosa of aging female mice. *Gen. Pharmacol.* 1982, 13, 519-522.
20. Strange R. C., Fryer A. A., Matharoo B., Zhao L., Broome J., Campbell D. A., Jones P., Pastor I. C., Singh R. V.: The human glutathione S-transferases: comparison of isoenzyme expression in normal and astrocytoma brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1992, 1139, 222-228.
21. Tew K. D.: Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.* 1994, 54, 4313-4320.
22. Welters M. J., Fichtinger-Schepman A. M., Baan R. A., Flens M. J., Scheper R. J., Braakhuis B. J.: Role of glutathione, glutathione S-transferases and multidrug resistance-related proteins in cisplatin sensitivity of head and neck cancer cell lines. *Br. J. Cancer.* 1998, 77, 556-561.

Adres autora: prof. dr hab. Anna Barańczyk-Kuźma, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: akuzma@amwaw.edu.pl

## STAN ZAKAŻNYCH CHOROBY ZWIERZĄT W POLSCE

według danych Głównego Inspektoratu Weterynarii w lutym 2005 r. \*)

1. **Wścieklizna zwierząt dzikich** – wystąpiła w 4 województwach: podkarpackim (1-2), podlaskim (1-1), warmińsko-mazurskim (1-2) i wielkopolskim (1-4). Zanotowano ją u 8 lisów i 1 jenota.
2. **BSE** – stwierdzono w województwie mazowieckim (1-1).

\*) W nawiasach podano liczbę powiatów i miejscowości, w których choroba została stwierdzona w okresie sprawozdawczym.