

A cyclophilin-D és az NAADP szerepének vizsgálata a Ca^{2+} -mediált folyamatokban

Doktori tézisek

Dr. Mándi Miklós

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományok Doktori Iskola
Funkcionális Idegtudományok



Témavezető:

Prof. Dr. Ádám Veronika

Hivatalos bírálók:

Prof. Dr. Sümegi Balázs
Prof. Dr. Bánhegyi Gábor

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Ligeti Erzsébet

Szigorlati bizottság tagjai:

Prof. Dr. Liposits Zsolt
Dr. Sóti Csaba

Budapest, 2011

Bevezetés:

A calcium az egyik legfontosabb és legsokoldalúbb másodlagos hírvivő, mely számtalan sejten belüli és sejtközötti folyamat szabályozásában játszik alapvető szerepet. A calcium koncentrációjában bekövetkező változások mintázatát számos extracellularis faktor, valamint több intracellularis másodlagos hírvivő útvonal szorosan befolyásolja. A calcium-jelátvitel alapját a calcium extracellularis térbe, illetve a különböző intracellularis organellekbe (pl. endoplazmás/szarkoplazmás reticulum, lizoszóma, mitokondriumok, Golgi-membrán, sejtmag) történő kompartmentalizációja és szignál-vezérelt felszabadítása képezi. A nikotinsav-adenin dinukleotid foszfát (NAADP) egy olyan új intracellularis másodlagos hírvivő molekula, mely főként a savas Ca^{2+} raktárakból (pl. lizoszómákból és mikroszómákból) történő Ca^{2+} felszabadulásban vesz részt. Az NAADP-indukált Ca^{2+} -felszabadulás általában térben és időben körülhatárolt Ca^{2+} -szignált hoz létre, mely gyakran lokális folyamatok szabályozásában vesz részt (pl. pancreas β -sejtek insulin-szekréciója, neurit-növekedés, ill. neurotranszmitterek szekréciója), de sok esetben ryanodin- ill. inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP_3) receptorokon keresztül történő Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulással tovaterjesztett és generalizált Ca^{2+} -jelek kiváltására is szolgálhat (pl. petesejt megtermékenyítés esetén).

Az intracellularis Ca^{2+} -homeosztázisban a mitokondriumok sokkal összetettebb szerepet játszanak, mint egyszerű Ca^{2+} -elnyelők, és ezzel összhangban a mitokondriális matrix Ca^{2+} koncentrációjának változásai számos mitokondriális funkciót befolyásolnak (pl. a Szentgyörgyi-Krebs ciklus kulcsfontosságú enzimeinek szabályozása, illetve a mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus megnyitása). A mitokondriális tranzíciós pórus reverzibilis vagy irreverzibilis megnyílása akkor következik be, ha a különböző intra- és extracellularis jelátviteli utak, valamint a különböző metabolikus változások emelkedett ROS-termelést vagy kifejezetten emelkedett matrix Ca^{2+} , illetve szabad foszfátion szintet eredményeznek. A cyclophilin-D (CypD) a mitokondriális permeabilitás-tranzíciós pórus (mPTP) megnyitását elősegítő, calcium-függő szabályozó fehérje.

Célkitűzések:

#1 Munkánk elsődleges célja a cyclophilin-D-nek (CypD) a Ca^{2+} -indukált permeabilitás-tranzícióban betöltött szerepének tisztázása, illetve ezen funkciójának a sejt bioenergetikai állapotával mutatott összefüggéseinek vizsgálata. Először azt igazoljuk, hogy szubsztrát-hiányos állapotban a mitokondriumok valóban fokozott érzékenységet mutatnak a Ca^{2+} -indukált permeabilitás-tranzícióra és bemutatjuk, hogy a CypD genetikus deléciója hasonló fokú védelmet jelent, mint cyclosporin-A alkalmazása WT szubsztrát-hiányos mitokondriumokban. Ezt követően parallel követjük Ru360, illetve szétkapcsolószer jelenlétében a mitokondriumok Ca^{2+} felvételét és duzzadását. Eredményeink alapján felmerült az a kérdés, vajon a magas koncentrációjú Ca^{2+} a mitokondriumok felszínén kötődve hat, vagy egy RuRed/Ru360-tól független mechanizmussal belép a mitokondriumok belsejébe. A kérdés eldöntése céljából *in situ* mitokondriumok Ca^{2+} -felvevő képességét vizsgáljuk Ru360 és Ruthenium Red jelenlétében. Következő lépésben a különböző légzési láncot alkotó komplexek Ca^{2+} -indukált duzzadásban játszott szerepét vizsgáljuk Komplex I., III. és IV. gátlószereinek alkalmazásával. Végül megvizsgáljuk a CypD deléciójának eltérő hatását *in situ* neuronális és astrocyta mitokondriumok duzzadásában. Továbbá bemutatjuk, hogy a cyclophilin-D deléciója a neuronális mitokondriumok excitotoxikus (glutamate-glicin) hatásra bekövetkező kezdeti duzzadásának időben történő elhalasztása mellett a késői neuronális calcium deregulációval szemben is védelmet biztosít.

#2 Másfelől, a sejtplazmában történő Ca^{2+} -jelátvitelt tekintve fő célunk az NAADP-mediált folyamat önálló Ca^{2+} kiáramlási útvonalként való definiálása májsejt mikroszómákban. Elsőként meghatározzuk, hogy az aktívan töltött mikroszómális Ca^{2+} -raktár thapsigargin-, de nem bafilomycin A1-érzékeny. A következő lépésben igazoljuk, hogy az NAADP valóban képes Ca^{2+} -felszabadításra máj mikroszómákból és összehasonlítjuk az NAADP, az IP_3 és a cADPR Ca^{2+} mobilizáló képességét. Ezt követően bemutatjuk, hogy nincs kereszt-deszenzitizáció az NAADP, az IP_3 és a cADPR között, annak

bizonyítékaként, hogy mindhárom Ca^{2+} -mobilizáló másodlagos hírvivő külön-külön receptoron keresztül fejti ki hatását. Az NAADP-dependens Ca^{2+} -kiáramlás tulajdonságaira fókuszálva megadjuk az NAADP dózis-hatás görbéjét, továbbá bemutatjuk az NAADP-függő Ca^{2+} -kiáramlás Ca^{2+} koncentráció-függését és pH-függését máj mikroszómákban. Gerinces szövetben elsőként igazoljuk az NAADP-indukált Ca^{2+} -felszabadulás egyedülálló inaktivációs sémáját, mely során önmagában Ca^{2+} -kiáramlást nem okozó dózisban alkalmazott NAADP képes egy későbbi, telítő mennyiségben alkalmazott NAADP hatását meggátolni. Továbbiakban a feltöltött mikroszómákat thapsigarginnal és bafilomycin A1-gyel inkubáltunk, hogy alátámaszthassuk azt az elképzelést, mely szerint mikroszómális Ca^{2+} raktárakból történő Ca^{2+} felszabadulást a “one-pool” modellel lehet leírni. Végül, az NAADP mediált Ca^{2+} kiáramlás farmakológiai tulajdonságainak meghatározásával erős bizonyítékát adjuk annak, hogy az NAADP valóban önálló és az IP_3 -tól és a cADPR-től független utat képvisel máj mikroszómákban.

Módszerek:

Agyi mitokondriumok izolálása vad típusú (WT) és cyclophilin-D génkiütött (KO) - C57Bl/6 egerekből

Az azonos körülmények között tartott, cyclophilin-D-re nézve génkiütött (KO) és vad típusú (WT) egerek Dr. Nika Danial (Howard Hughes Medical Institute) és Dr. Anna Schinzel (Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School) szíves ajándékai voltak. Az egereket 8 nemzedéken át keresztezve tenyésztették mielőtt intézetünkben azonos életkorú, WT és KO állatokból agyszövetet nyertük ki mitokondriális izolálás, valamint astrocyták és neuronok sejttenyésztése céljából. A kísérleteink során használt non-szinaptikus agyi mitokondriumokat felnőtt (87-115 napos), hím, Cyp-D szempontjából WT és KO egerek agyából Percoll-grádiens segítségével preparáltuk Sims és társai (1990) leírása szerint, amit Chinopoulos C. és társai (2003) szerint kis mértékben módosítottunk. Minden állatkísérletet az Egyetemi Állatkísérleti Bizottság előírásai szerint végeztünk.

Patkány máj mikroszóma preparálása

A máj mikroszómaikat Fleishner és Kraus-Friedmann 1986-os cikkében leírtak szerint preparáltuk. Röviden, Sprague-Dawley patkányok máját jéghideg, 0,32 M szukrózt, 20 mM MOPS-puffert (pH 7,2), 0,5 mM EGTA-t, valamint proteáz-inhibitoroként 1mM ditio-treitolt (DTT) és 0,2 mM fenilmetilszulfonil-fluoridot (PMSF) tartalmazó oldatban homogenizáltuk, és 4 °C-on 2000 g-vel 15 percig centrifugáltuk. A felülúszót 15.000 g-n 45 percig, majd az így keletkezett felülúszót 100.000 g-n további 90 percig centrifugáltuk. Végül az összegyűjtött üledéket 0,32 M szukrózt, 20 mM MOPS-ot (pH=7,2), 1 mM DTT-t és 0,2 mM PMSF-et tartalmazó oldatban újra szuszpendáltuk. A fehérjekoncentrációt minden alkalommal Lowry-módszerrel határoztunk meg bovin szérum albumint használva sztenderdként, és a preparátum fehérje koncentrációját kb. 20 mg/ml-re állítottuk be. A mintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk le és a felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

A mitokondriális membrán-potenciál ($\Delta\Psi_m$) mérése

A $\Delta\Psi_m$ -et az energizált mitokondriumokban felhalmozódó, kationos safranin-O festék fluoreszcencia-csökkenése alapján becsültük meg Akerman és társai 1976-os közleménye nyomán. 2 ml-nyi, 120 mM KCl-t, 20 mM HEPES-savat, 10 mM kálium-foszfátot, 1 mM MgCl₂-ot, 0,005 mM EGTA-t, 5 mM kálium-glutamátot, 5 mM kálium-malátot, 0,001 mM cyclosporin A-t, 0,05 mM AP₅A-t, 0,5 mg/ml BSA-t és 5 μ M safranin O-t (pH 6,8 vagy pH 7,8) tartalmazó inkubáló médiumhoz 1 mg mitokondrium-preparátumot adtunk és a safranin O fluoreszcenciáját Hitachi F-4500 spektrofluoriméterben (Hitachi High Technologies, Maidenhead, UK), 5 Hz acquizíciós rátával, 495 nm-es excitációs és 585 nm-es emissziós hullámhosszon mértük. A méréseinket 37 °C-on végeztük. A safranin O fluoreszcencia millivoltra (mV) történő átváltásához feszültség-fluoreszcencia kalibrációs görbét vettünk fel. E célból safranin O fluoreszcenciát mértünk 2 nM valinomycin jelenlétében és a médium K⁺ koncentrációját 0,2 – 120 mM tartományban lépésenként emeltük. A matrix K⁺ koncentrációját 120 mM-nak véve (Akerman és társai, 1976) és a Nerst-egyenletet felhasználva kiszámíthatóvá vált a $\Delta\Psi_m$.

Izolált mitokondriumok Ca^{2+} -felvételének mérése

Az inkubáló médiumból történő mitokondrium-dependens Ca^{2+} -kivonást a Ca^{2+} -dependens, membrán-impermábilis fluoreszcens festék, a Calcium Green (CaGreen, Molecular Probes, Portland, OR, USA) $6K^+$ -sójával követtük. 2 ml-nyi, 0,125mg/ml mitokondriumot, 120 mM KCl-t, 10 mM Tris, 5 mM KH_2PO_4 -ot, 1 mM $MgCl_2$ -ot (pH 7,6) tartalmazó médiumhoz 500 nM CaGreen-t adtunk, a szubsztrátok és egyéb reagensek hozzáadása a jelölt időpontban történt és minden mérést 37 °C-on végeztünk. A festék fluoreszcencia-intenzitását Hitachi F-4500 fluoreszcencia spektrofotométerben (Tokyo, Japan) mértük 517 nm-es excitációs és 535 nm-es emissziós hullámhosszt használva.

Mitokondriális duzzadás mérése

Izolált mitokondriumok duzzadását GBC UV/VIS 920 spektrofotométerben, 520 nm hullámhosszú fény szórásának vizsgálatával követtük. 120 mM KCl-t, 10 mM Tris, 5 mM KH_2PO_4 -ot, 1 mM $MgCl_2$ -ot tartalmazó, 7,6-os pH-jú oldat 2 ml-éhez 0,125 mg/ml végső koncentrációban mitokondriumot adtunk, a szubsztrátok és egyéb reagensek hozzáadása a jelölt időpontban történt. Minden mérés végén a maximális duzzadás kalibrálása céljából nem szelektív, pórus-formáló peptidet, 40 μ g alameticint használtunk. Minden kísérletet 37 °C-on végeztünk.

Mikroszómák aktív töltése Ca^{2+} -mal és Ca^{2+} felszabadulás mérése

Ca^{2+} felvételt és kiáramlást $^{45}Ca^{2+}$ izotóp segítségével mértük. A mikroszómákat 150 mM KCl, 20 mM MOPS (pH 7,2), 0,5 mM $MgCl_2$, 10 μ M Ca^{2+} tartalmú oldatban hígítottuk, minden kísérlet során 20-40 nCi $^{45}CaCl_2$ -ot használtunk mérési pontonként. A Ca^{2+} felvételt 1 mM ATP hozzáadásával indítottuk szobahőmérsékleten. Ca^{2+} felszabadulást 100 μ M EGTA hozzáadásával idéztünk elő Ca^{2+} -mobilizáló ágensek (10 μ M IP_3 , 10 μ M cADPR and 10 μ M NAADP) jelenlétében, illetve hiányában. A vezikulákban bentmaradó $^{45}Ca^{2+}$ mennyiségét 0,5 ml mikroszómát tartalmazó oldat 0,45 μ m pórusnagyságú, nitrocellulóz Millipore filteren (HAWP) történő vákumfiltrálásával határoztuk meg. A filterekt 5 ml quench oldattal (150 mM KCl, 20 mM MOPS (pH 7,2), 10 mM $MgCl_2$ és 1 mM $LaCl_3$) mostuk a nem

specifikusan kötődő radioaktivitás csökkentése céljából. A filteren visszamaradt radioaktivitást sztenderd szcintillációs számlálással mértük meg.

Mikroszómák passzív töltése és Ca^{2+} felszabadulás mérése

Máj mikroszómák 5 mM $^{45}CaCl_2$ -mal (20-40 nCi mérési pontonként) való passzív töltéséhez 150 mM KCl, 20 mM MOPS (pH 7,2), $^{45}Ca^{2+}$ és 5 mM Ca^{2+} tartalmú, jéghideg médiumban történő, minimum 5 órán keresztüli inkubálást alkalmaztunk. A passzívan töltött vezikulákat szobahőmérsékleten 10-szeresre hígítottuk a 150 mM KCl-t, 20 mM MOPS-ot (pH 7,2) és 500 μ M EGTA-t tartalmazó Ca^{2+} -mobilizáló mediummal. Az alkalmazott EGTA mennyiséggel a pCa-t 6-ra állítottuk. A Ca^{2+} kiáramlást quench-oldattal történő 5-szörös hígítással állítottuk meg, ezt követően a mintákat Millipore-filtereken keresztül filtráltuk, 5 ml quench-oldattal mostuk és a filteren maradt radioaktivitást sztenderd szcintillációs számolással mértük meg.

Eredmények és megbeszélés:

#1 *A Cyclophilin-D komplex szerepe az agy-specifikus, Ca^{2+} -indukált mitokondriális permeabilitás tranzícióban*

Elsőként a $CaCl_2$ izolált agyi mitokondriumokra gyakorolt hatását teszteltük glutamát és malát jelenlétében, illetve hiányában és 520 nm-es hullámhosszon fényszóródást mértünk spektrofotométer segítségével. Ebben, és az ezt követő hasonló kísérletekben ugyanazt a három-lépéses $CaCl_2$ adagolási protokollt használtuk: a 100. másodpercben 20 μ M $CaCl_2$ -ot, majd ezt követően a 300. másodpercben és végül az 500. másodpercben 200-200 μ M $CaCl_2$ -ot adtunk a mintához. Az első, 20 μ M $CaCl_2$ hozzáadása nem okozott a vad típusú (WT) egerekből származó agyi mitokondriumokban fényszórás-csökkenést sem a szubsztrátok jelenlétében, sem azok hiányában, hanem ellenkezőleg, a fényszóródás alapvonalának fokozatos csökkenésének megszűnését észleltük. Viszont a következő, 200 μ M-os $CaCl_2$ lökés hatására a szubsztrát-hiányos mitokondriumok fényszórása nagymértékben csökkent, ellentétben a szubsztráttal ellátott mitokondriumokéval. Az 500. másodpercben adott következő 200 μ M $CaCl_2$ hatására a szubsztrát-hiányos

mitokondriumok fészórása nem változott, míg a szubsztráttal ellátott mitokondriumok fényszórásában kisfokú változást tapasztaltunk. Az első 200 μM -os CaCl_2 -lökés hatása cyclosporin A-érzékeységet mutatott, de a második 200 μM CaCl_2 adása a CysA védő hatását felülírta. A következő kísérletek során azt használtuk ki, hogy cyclophilin-D génkiütött egerek hozzáférhetőek voltak. A szubsztrát-hiányos CypD-KO egerekből származó mitokondriumok esetében mért adatok feltűnő hasonlóságot mutattak a WT egerekből származó és CysA-val kezelt mitokondriumokéihoz. A szubsztrátok jelenléte viszont nem jelent további védelmet CypD KO mitokondriumok esetében. Ezen eredményeink azt mutatják, hogy nagy dózisban adott Ca^{2+} szubsztrátok hiányában is képes PTP kiváltására. Kísérletes körülményeink között a szubsztrátok hiánya megakadályozza a mitokondriumokat abban, hogy -10 mV-nál nagyobb membránpotenciált építsenek fel, amely nem tesz lehetővé jelentős mitokondriális Ca^{2+} -felvételt. Ennek megfelelően az extramitokondriális Ca^{2+} -koncentráció CaGreen 5N-nel való követésekor azt tapasztaltuk, hogy szubsztrátok hiányában a mitokondriumok nem voltak képesek Ca^{2+} -ot szekvesztrálni, ellenben jelentős fényszórási változásokat mutattak. A fényszórási változást mutató mitokondriumok elektronmikroszkópos vizsgálatával megerősítettük, hogy a fényszórási változások hátterében mitokondriális duzzadás áll.

A célból, hogy a Ca^{2+} támadási pontjának helyét meghatározzuk a fényszórási változások kiváltásában, a mitokondriumokat az extramitokondriális Ca^{2+} -felvételt igazolt módon gátló koncentrációjú Ru360-nal inkubáltuk és kimutattuk, hogy Ru360-nal kezelt mitokondriumok továbbra is mutattak fényszórási változásokat nagy dózisban hozzáadott Ca^{2+} hatására. A Ru360 CysA jelenlétében sem okozott fényszóródás-változást és Ru360 mellett a Ca^{2+} WT és CypD KO mitokondriumokra gyakorolt hatása is azonos volt. A mitokondriumokat teljesen depolarizáló szétkapcsolószer nem jelentett védelmet a nagy dózisú Ca^{2+} okozta duzzadás ellen, sőt a WT mitokondriumokban még a szubsztrátok protektív hatását is ellensúlyozta. Azt a tényt, hogy az Ru360 nem nyújt védelmet a Ca^{2+} -indukált jelentős fényszórási változás ellen azzal magyarázzuk, hogy a Ca^{2+} extramitokondriális kötőhelyen hat. Viszont, a mitokondriális mátrixban bentmaradó Fura 2-vel töltött és széles mezejű epifluoreszcens mikroszkóppal

vizsgált izolált mitokondriumok meglepő módon hatalmas Fura 2 fluoreszcencia-növekedést mutattak 0,1 mM CaCl_2 tartalmú pufferrel történő perfúzió esetén. Ez a hatás csak részleges Ru360- (10 μM) és ruténium-vörös (10 μM) érzékenységet mutat, ami azon feltételezés ellen szól, hogy a Ca^{2+} kizárólag extramitokondriális támadásponttal rendelkezik a fényezés változások kiváltásában.

A következőkben a Komplex I. (rotenon és piericidin A), a Komplex III. (myxotiazol és stigmatellin) és a Komplex IV. (KCN) gátlószereinek hatását vizsgáltuk meghatározandó azt, hogy a légzési lánc mely elemei járulnak hozzá a szubsztrátok Ca^{2+} -indukált fényezés változásokra gyakorolt protektív hatásához. A méréseink alapján az a kép bontakozik ki, hogy míg a rotenon és a piericidin A a szubsztrátok jelenlététől, illetve hiányától függetlenül megvédik a mitokondriumokat a Ca^{2+} -indukált fényezés változásoktól, addig a védelmet nem nyújtó myxotiazol, stigmatellin és KCN még a szubsztrátok jótékony hatását is ellensúlyozzák. Viszont a Komplex I.-et a rotenonétól és a piericidin A-étől eltérő kötőhelyen blokkoló, magas koncentrációjú myxotiazol (10 μM) és stigmatellin (2 μM) sem jelent védelmet.

A Cyclophilin D *in situ*, agy-specifikus PTP megnyitásában játszott szerepét vizsgálandó, CypD-deficiens és WT mitokondriumok calcimycin (1 μM 4Br-A23187) okozta Ca^{2+} -túltöltés során észlelt duzzadását hasonlítottuk össze ugyanazon sejkultúrában található neuronokban és astrocytáiban mitokondriálisan targetált DsRed2 segítségével és széles mezejű epifluoreszcencia-mikroszkóp alatt vizsgálva. A neuronokat és az astrocytákat az eltérő mitokondriális morfológiájuk alapján különítettük el és a mitokondriális duzzadást az átlag mitokondriális átmérők "thinness ratio" (vékonyság-arány) technikával történő kiszámításával követtük. A duzzadás kezdetét az előbb említett "thinness ratio" hirtelen csökkenésével definiáltuk. Mind a WT, mind a CypD-KO neuronális mitokondriumok duzzadtak és fragmentálódtak a calcimycin hozzáadásával kiváltott Ca^{2+} túltöltődés kezdetétől számított 600-800 másodpercen belül. Amikor glükózmentes és 2 mM 2-deoxyglükóz tartalmú médiumban a calcimycinnel együtt NaCN-ot is alkalmaztunk, mind a WT, mind a CypD-KO mitokondriumok duzzadása szinte azonnal bekövetkezett. Viszont 1 μM SF 6847-tel történő szétkapcsolás

esetén a CypD-KO neuronális mitokondriumok duzzadása szignifikánsan korábbi időpontban kezdődik, mint a WT neuronokéi. Azonban a neuronokkal ellentétben a szétkapcsolt astrocyta-mitokondriumok Ca^{2+} túltöltésre bekövetkező duzzadása a WT astrocytákban jelentkezik szignifikánsan hamarabb, mint a CypD-KO esetén.

Végül a célból, hogy *in situ* neuronális mitokondriumokat egy másfajta módszerrel létrehozott magas Ca^{2+} terhelésnek kitéve vizsgálhassunk, a neuronokat Mg^{2+} -mentes környezetben excitotoxikus szintű glutamát és glicin hatásának vetettük alá. A glutamát bifázisos mitokondriális duzzadást váltott ki egy kezdeti elsődleges és egy jól elkülönülő, késői másodlagos “thinness ratio” eséssel. A “thinness ratio”-ban észlelt első esés következetesen egybeesett a glutamát hatására kialakult cytoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -válasszal és a második esés mindig megfelelt a másodlagos, irreverzibilis $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedésnek, amit “delayed calcium deregulation”-nek (DCD) nevezünk. A CypD-KO egér sejtkultúrákból származó minták mindössze 60%-ában alakult ki a neuronális mitokondriumok elsődleges duzzadása és DCD során csak a neuronok 40%-ában jelentkezett a másodlagos duzzadás. Továbbá a mitokondriumok elsődleges duzzadása szignifikánsan később jelentkezett a CypD-KO neuronokban, mint a WT neuronokban, míg a másodlagos mitokondriális duzzadás megjelenéséig eltelt időben nem volt statisztikailag értékelhető különbség.

#2 Az NAADP-indukált Ca^{2+} -felszabadulás hepatocyta mikroszómákban

A patkánymáj mikroszómális vezikulák ATP jelenlétében gyors ütemben szekvesztrálják a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -ot, a Ca^{2+} -akkumuláció mértéke $4,0 \pm 0,2$ nmol/mg fehérje (n=13). 5-10 perc elteltével maximális Ca^{2+} -felvételt detektáltunk és ionomycin ($5 \mu\text{M}$) hatására a mikroszómákban specifikusan felhalmozódott Ca^{2+} mennyiség 90%-a gyorsan kiürült. A szelektív SERCA-gátló thapsigargin ($1 \mu\text{M}$) a mikroszómák Ca^{2+} -felvételét majdnem teljesen megszüntette, míg a V-típusú ATP-áz blokkoló bafilomycin A1 csak minimálisan befolyásolja a máj mikroszómák Ca^{2+} -halmozását. Ezen eredmények fényében a SERCA játszik vezető szerepet a máj mikroszómák aktív töltésében.

Az NAADP (10 μM), az IP_3 (10 μM) és a cADPR (10 μM) gyors Ca^{2+} kiáramlást indukál máj mikroszómáktól, melyek szignifikánsan különböznek a kontrollként használt Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -kiáramlás (CICR) mennyiségétől. A Ca^{2+} kiáramlás 5. másodpercében a CICR során felszabadult Ca^{2+} mennyisége $0,165 \pm 0,06$ nmol/mg fehérje, az IP_3 $0,7 \pm 0,09$ nmol/mg fehérje mennyiségű Ca^{2+} -ot mobilizált, míg a cADPR hatására $0,821 \pm 0,1$ nmol/mg fehérje Ca^{2+} szabadult fel. Azonos körülmények között az NAADP-indukált Ca^{2+} -felszabadulás mértéke $0,42 \pm 0,08$ nmol Ca^{2+} /mg fehérje. Tehát az NAADP potens, de az IP_3 -nál és a cADPR-nál valamivel kevésbé hatásos Ca^{2+} -mobilizáló másodlagos hírvivő máj mikroszómákban. Az NAADP máj mikroszómákban dózis-függő módon, $0,93 \pm 0,1$ μM -os féltelítési koncentrációban (EC_{50}) hoz létre Ca^{2+} -kiáramlást. A következő lépésben ATP regeneráló rendszer jelenlétében vizsgáltuk az egymást követően alkalmazott IP_3 , cADPR és NAADP Ca^{2+} mobilizálását aktívan töltött máj mikroszómákban. Az NAADP a cADPR és az IP_3 megelőző alkalmazását követően is maximális mennyiségű Ca^{2+} kiáramlást indukált, tehát az IP_3 , a cADPR és az NAADP között nem jön létre kereszt-deszenzitizáció. Ezen eredmény megerősíti az a véleményt, hogy máj mikroszómákban az NAADP egy, az IP_3 -étől és a cADPR-étől eltérő és független Ca^{2+} -mobilizáló útvonalra hat. Az NAADP homológ deszenzitizációjának bemutatása céljából az aktív töltés 3. percében küszöb alatti (0,1 μM), önmagában jelentős Ca^{2+} kiáramlást nem okozó NAADP-vel inkubáltuk a mikroszómákat és 2 perccel később 10 μM NAADP hatására mindössze $0,14 \pm 0,04$ nmol/mg fehérje Ca^{2+} -kiáramlást detektáltunk, összehasonlítva a nem előkezelt mikroszómákból 10 μM NAADP adásakor felszabaduló $0,39 \pm 0,04$ nmol Ca^{2+} /mg fehérje mennyiséggel. Tehát, az NAADP önmagának a specifikus antagonistájaként viselkedik, 50%-os gátlási koncentrációja (IC_{50}) 30 nM. Az NAADP dózis-hatás görbéje és a változó koncentrációjú NAADP-vel történő előinkubálás utáni telítő dózisban alkalmazott NAADP indukálta reziduális Ca^{2+} felszabadulás görbéi egymást U alakban metszik, tekintettel arra, hogy az NAADP a saját receptorait a féltelítési koncentrációjánál egy nagyságrenddel kisebb 50%-os gátlási koncentrációval deszenzitizálja.

Amikor az aktívan töltött mikroszómákat bafilomycin A1-gyel legalább 5 percen át előinkubáltuk, azt találtuk, hogy mind az NAADP (10 μM), mind

a cADPR (10 μM) teljesen normális Ca^{2+} -kiáramlást eredményezett. Másfelől a mikroszómák thapsigarginnal (1 μM) történő előkezelése az NAADP-re és a cADPR-ra adott választ hasonló mértékben csökkentette. Eredményeink alapján a mikroszómákból történő Ca^{2+} kiáramlást a “one-pool” modellel lehet leírni, tehát a mikroszómák osztatlan Ca^{2+} raktárként foghatóak fel. A mikroszómák a lizoszómák és az endoplazmás retikulum keveredéséből származtathatóak, elsősorban SERCA-n keresztül töltődnek Ca^{2+} -mal és megtalálhatóak rajtuk az IP_3 , a cADPR és az NAADP receptorai.

Ezt követően bemutatjuk, hogy az IP_3 - és a cADPR-mediált Ca^{2+} kiáramlás külső Ca^{2+} koncentráció-függési görbéi harang-alakúak, $\text{pCa}=7$ -re és 6-ra esik a csúcuk, ezzel szemben az NAADP által mobilizált Ca^{2+} mennyisége jó közelítéssel független az extravezikális Ca^{2+} koncentrációtól. Továbbá azt találtuk, hogy az NAADP mediált folyamatot az inkubáló pufferoldat pH-jának 6,4 és 7,8 közötti tartományban való változtatása nem befolyásolja, ellentétben a cADPR hatásával, mely 7,2-es pH optimummal jelentős pH-függést mutat. Tehát az NAADP és a cADPR Ca^{2+} mobilizáló hatását a pH eltérő módon befolyásolta, további bizonyítékát adva annak, hogy ezen másodlagos hírvivők funkcionálisan eltérő jelátviteli útvonal részét képezik. Végül, az IP_3 receptor antagonistaként ismert heparin (100 $\mu\text{g/ml}$) csak az IP_3 -mediált Ca^{2+} -mobilizációt gátolja, a cADPR-éra és az NAADP-éra nem hat. A ryanodin-receptor antagonisták (ryanodin [5 μM] és ruthenium-vörös [5 μM]) csak a cADPR-indukált Ca^{2+} -felszabadulást csökkentették, az IP_3 és NAADP hatását nem változtatták meg. Ezzel szemben az L-típusú Ca^{2+} csatornablokkerként ismert verapamil (100 μM) és diltiazem (100 μM) specifikusan, de csak részlegesen gátolták az NAADP Ca^{2+} mobilizáló hatását, míg az IP_3 - és cADPR-mediált folyamatokat csak minimális mértékben módosították. Összességében elmondható, hogy sem a heparin, sem a ryanodin és ruthenium vörös nem gátolta az NAADP-indukált Ca^{2+} felszabadulást, viszont a verapamil és diltiazem az NAADP receptorok hatásos inhibitorai, ami tovább erősíti azt az elképzelést, hogy az NAADP-mediált Ca^{2+} -felszabadulás máj mikroszómákban is független és önálló jelátviteli útvonal.

Publikációs lista:

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Mándi M., Tóth B., Timár Gy. and Bak J. (2006): Ca²⁺ release triggered by NAADP in hepatocyte microsomes.

Biochem. J. **395**: 233-238.

[IF: 4.100 (2006)]

Mándi M. & Bak J. (2008): Nicotinic acid adenine nucleotide dipohosphate (NAADP) and Ca²⁺ mobilization.

J. Recept. Signal. Transduct. Res. **23 (3)**, 163-184.

[IF: 1.540 (2008)]

Chinopoulos, C., Vajda, S., Csanády, L., Mándi, M., Máthé, K., and Ádám-Vizi, V. (2009): A novel kinetic assay of mitochondrial ATP-ADP exchange rate mediated by the ANT.

Biophys.J. **96**, 2490-2504.

[IF: 4.683 (2009)]

Vajda, S., Mándi, M., Konrád, C., Kiss, G., Ambrus, A., Ádám-Vizi, V., and Chinopoulos, C. (2009): A re-evaluation of the role of matrix acidification in uncoupler-induced Ca²⁺ release from mitochondria. FEBS J. **276**, 2713-2724.

[IF: 3.139 (2009)]

Chinopoulos, C., Gerencsér, AA., Mándi, M., Máthé, K., Töröcsik, B., Dóczi, J., Turiák, L., Kiss, G., Konrád, Cs., Vajda, Sz., Vereczki, V., Oh, RJ. and Ádám-Vizi, V. (2010): Forward operation of adenine nucleotide translocase during F0F1-ATPase reversal: critical role of matrix substrate-level phosphorylation. FASEB J. **24 (7)**, 2405-2416.

[IF: 7.049 (2009)]

Dóczi, J., Turiák, L., Vajda Sz., Mándi, M., Törőcsik, B., Gerencsér, A.A., Kiss, G., Konrád, Cs., Ádám-Vizi, V., and Chinopoulos, C. (2011): Complex contribution of Cyclophilin-D to Ca^{2+} -induced permeability transition in brain mitochondria, with relation to the bioenergetic state.

J. Biol. Chem. **286** (8), 6345-6353.

[IF: 5.52 (2009)]

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Konrád, Cs.; Kiss, G.; Törőcsik, B.; Lábár, J.; Gerencsér, A.A.; Mándi, M.; Ádám-Vizi, V., and Chinopoulos, C. (2011): A distinct sequence in the adenine nucleotide translocase from *Artemia franciscana* embryos is associated with insensitivity to bongkrekate and atypical effects of adenine nucleotides on Ca^{2+} uptake and sequestration. FEBS J. **278** (5), 822-836.

[IF: 3.139 (2009)]