

A mitokondriális mátrixbeli szubsztrátszintű foszforiláció szerepe oxigénhiányban

Doktori tézisek

Dr. Kiss Gergely

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola
Funkcionális Idegtudományok



- Témavezető: Dr. Christos Chinopoulos
egyetemi docens, PhD
- Hivatalos bírálók: Ifj. Dr. Gallyas Ferenc
egyetemi tanár, a MTA doktora
Dr. Kardon Tamás
egyetemi adjunktus, PhD
- A szigorlati bizottság elnöke: Dr. Mandl József
egyetemi tanár, a MTA rendes tagja
- A szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ligeti Erzsébet
egyetemi tanár, a MTA rendes tagja
Dr. Ozohanics Olivér
tudományos munkatárs, PhD

Budapest, 2014

“Az ember megismerő vágyának határa a végtelen, s a filozófia azzal próbálkozik, hogy egyetlen lendülettel elérje ezt a határt, egy csapásra megszerezze a tökéletes és megingathatatlan tudás bizonyosságát. A tudomány viszont apró léptekkel halad előre, olykor csak kúszik, sőt némelykor egy helyben topog, de végül eljut különféle végső sáncokig, amelyeket a filozófia emelt, és mit sem törődve azzal, hogy itt kellett volna húzódnia az értelem végső határának, továbbhalad.”

Stanisław Lem: Az Úr Hangja (1968)

BEVEZETÉS

A mitokondriumok kóros működése kimutatható a trauma, neurodegeneráció, iszkémia/reperfúzió és az excitotoxicitás kóroktanában is. Általánosan elfogadott, hogy a depolarizált mitokondriumok a citoszolikus ATP-készlet kiürítése által sejthalált okozhatnak. A mitokondriumok bizonyos betegségek esetén valóban ATP-t fogyasztanak, súlyosbítva ezzel az adott kórállapotot. Ellenben mindaddig, amíg belső membránjuk ép, és a mátrixbeli SUCL-katalizálta szubsztrátszintű foszforiláció az oxidatív foszforiláció hiányában is termel ATP-t, a mitokondriumok nem fogyasztanak ATP-t a citoszolból. Az KGDHC szukcinil-KoA-val látja el a SUCL-t, ezáltal támogatva a mátrixbeli szubsztrátszintű foszforilációt. Az irodalomban ugyan megállapították, hogy kapcsolat van az KGDHC aktivitásának csökkenése és a kóros agyi folyamatok között, de neurodegenerációra irányuló hajlamot alátámasztó molekuláris mechanizmusról mindeztidáig nem jelent meg közlemény. Feltevésünk szerint az KGDHC elégtelenségéből fakadó mérsékelt szukcinil-KoA ellátás csökkent szubsztrátszintű foszforilációt eredményez, ami a citoszolikus ATP-készlet kóros mitokondriális hidrolíziséhez vezet, amennyiben a teljes mitokondriális ATP-hozam kritikus szint alá süllyed. Tekintetbe véve az KGDHC-katalizálta reakciót, melyben α -ketoglutarát, KoASH és NAD^+ szukcinil-KoA-vá, NADH-dá és CO_2 -dá alakul, felvetődik a kérdés: vajon mi a NAD^+ forrása, amikor a légzési lánc nem működik? Tankönyvi definíció szerint a citrátkörben képződő NADH-t a komplex I oxidálja, NAD^+ -dal ellátva a ciklust. Oxigénhiányban vagy diszfunkcionális légzési lánc estén ennek megfelelően NADH

többletre számítunk a mátrixban. Mégis, korábbi eredményeink azt mutatják, hogy az első légzési komplex NADH oxidációja nélkül is folyik szubsztrátszintű foszforiláció, és szukcinil-KoA ellátása zavartalan marad, igazolva az KGDHC működését. Mindezekből kiindulva olyan alternatív NADH oxidációs útvonalakat vizsgáltunk oxigén hiányában, ill. amikor a komplex I farmakológiai gátlás alatt áll, melyek képesek NAD^+ -t regenerálni az KGDHC működéséhez, amely így szukcinil-KoA-t termelve biztosítani képes a szubsztrátszintű foszforilációt.

A légzési lánc leállása esetén, részben vagy egészében a megfordult F_0F_1 -ATP szintáz-katalizálta, a mátrixból kifelé irányuló, ATP hidrolízis árán megvalósuló protontranszportnak tulajdonítható a $\Delta\Psi_m$ fenntartása. Egy nemrégiben megjelent közlemény szerint a CYPD hozzákapcsolódva az F_0F_1 -ATP szintázhoz csökkenti az ATP szintézis és hidrolízis sebességét is. A CYPD genetikai deléciónja, ill. ciklosporin A-val történő gátlása az F_0F_1 -ATP szintáz diszinhibíciójával járt, felgyorsítva az ATP szintézis és hidrolízis sebességét is. Viszont ezeket a hatásokat szubmitokondriális részecskéken és alameticinnel permeabilizált mitokondriumokon demonstrálták, mely esetekben az F_0F_1 -ATP szintáz közvetlenül hozzáférhető. Ép mitokondriumokban az F_0F_1 -ATP szintáz-katalizálta ATP szintézis, vagy hidrolízis sebességbeli változásai az ANT jelenlétéből fakadóan nem feltétlenül befolyásolják az ATP-hozamot, ill. -fogyasztást. Erre alapozva a CYPD extra-mitokondriális térbe irányuló ATP és ADP fluxusokra kifejtett esetleges hatását kívántuk felmérni ép mitokondriumokban, igazolva, ill. kiterjesztve a legutóbbi irodalmi eredményeket.

CÉLKITŰZÉSEK

Az alábbiakban részletezett kísérleteink elvégzésével elsősorban a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Ép mitokondriumokban is kötődik-e a CYPD az F_0F_1 -ATP szintázhoz, befolyásolva ezzel a komplex aktivitását?
2. Vajon befolyásolja-e az ANT-mediálta ADP-ATP csere-sebességet ép mitokondriumokban a CYPD F_0F_1 -ATP szintáz moduláló hatása?
3. Szubsztrátszintű foszforilációt támogató szubsztrátokkal energetizált, ép mitokondriumokban az elégtelenül működő KGDHC mérsékelt szukcinil-KoA termelése csökkenti-e az ANT-mediálta ADP-ATP csere-sebességet?
4. Az elégtelenül működő KGDHC mérsékelt szukcinil-KoA termelése lecsökkenti-e annyira a mátrix ATP/ADP arányt a légzési lánc leállása esetén, hogy az ANT megforduljon?
5. Akkor is működik-e a citrátkör KGDHC-SUCL tengelye, ha az első légzési komplex képtelen NAD^+ -dal ellátni az KGDHC-t?
6. Részt vállalnak-e a mátrixbeli mitokondriális diaforázok az alternatív NAD^+ regenerációban az KGDHC számára, amikor a légzési lánc nem működik?
7. Milyen további NADH oxidációs útvonalak léteznek a légzési lánc leállása esetén a mitokondriális mátrixban?
8. A sejtlégzés leállása esetén hogyan befolyásolja a komplex III gátlása az KGDHC diaforáz-mediálta NAD^+ -ellátását?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

Kísérleteink során CYPD^{-/-}, DLD^{+/-}, DLST^{+/-}, DLD^{+/-}/DLST^{+/-} és szuperoxid-diszmutáz 2 enzimet szívspecifikusan túl-expresszáló transzgenikus egerekből (*Mus musculus*), ill. vad típusú alomtársaiból vagy galambokból (*Columba livia domestica*) származó mitokondriumokat hasonlítottunk össze.

Izolált mitokondriumok preparálása

A mitokondriumokat az egerek és galambok agyából, szívéből és májából differenciál centrifugálással izoláltuk; ezt követően a nem szinaptikus eredetű egér agyi mitokondriumokat Percoll gradiensen frakcionálva nyertük ki. A mitokondriális fehérjetartalmat „Tecan Infinite[®] 200 PRO series” *microplate* olvasóban, bicinchoninsavas módszerrel határoztuk meg. A kalibrációt szarvasmarha-albumin referencia oldatokkal végeztük.

Szinaptoszómák izolálása egéragyból

A szinaptoszómákat differenciál centrifugálással, Percoll gradiensen frakcionálva preparáltuk. A fehérjetartalmat bicinchoninsavas módszerrel, a fentiek szerint határoztuk meg.

A mitokondriális membránpotenciál meghatározása

Az izolált mitokondriumok membránpotenciálját ($\Delta\Psi_m$) safranin O fluoreszcens festékkel állapítottuk meg, mely pozitív töltésénél fogva akkumulálódik az energetizált mitokondriumok negatív töltésű mátrixában. A fluoreszcenciát „PTI Deltascan”, „Hitachi F-4500” vagy „F-7000”

fluoreszcencia spektrofotométerekkel detektáltuk. Egy feszültség-fényintenzitás kalibrációs görbe felvételét követően a festék fluoreszcens jelét mV-ra konvertáltuk.

A szafranin O fluoreszcenciáját emellett – az oxigénfogyasztással párhuzamosan – az „OROBOROS Oxygraph-2k” Clark-típusú oxigráf fluoreszcencia moduljával is megmértük.

A tetrafenilfoszfónium (TPP^+) ion eloszlásán alapuló $\Delta\Psi\text{m}$ meghatározást rendelkezésre készült TPP^+ -szelektív elektróddal végeztük. Az elektród kalibrálása ismert mennyiségű TPP^+Cl^- lépcsőzetes adagolásával történt.

A szinaptoszómabeli *in situ* mitokondriumok kvalitatív $\Delta\Psi\text{m}$ becslését a potenciometrikus fluoreszcens tetrametil-rodamin-metil-észter (TMRM) festék alkalmazásával oldottuk meg. A fluoreszcenciát „Hitachi F-4500” fluoreszcencia spektrofotométerrel detektáltuk.

A neuronális *in situ* mitokondriumok kvalitatív $\Delta\Psi\text{m}$ meghatározása fluoreszcens *wide-field* képalkotó technika vagy konfokális pásztázó mikroszkópia segítségével, TMRM fluoreszcencia kioltással történt. Az izolált, *in situ* szinaptikus és neuronális szóma mitokondriumok $\Delta\Psi\text{m}$ mérését is 37°C -on végeztük el.

$[\text{Mg}^{2+}]_{\text{szabad}}$ mérése Magnesium GreenTM fluoreszcencia segítségével és átszámítása ADP-ATP cseresebességre

Az izolált mitokondriumokat Magnesium GreenTM (MgG) nevű Mg^{2+} -szenzitív fluoreszcens indikátort és magnéziumot tartalmazó, citoszolt utánzó inkubációs közegben szuszpendáltuk. A közeg $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{szabad}}$ változásait a MgG fluoreszcenciájának mérésével követtük nyomon „PTI

Deltascan” fluoreszcencia spektrofotométerben 37°C-on. A kísérletek végén felvettük a minimum és maximum fluoreszcencia értékeit, majd ezeket a Grynkiewicz-egyenletbe helyettesítve a fényintenzitást $[Mg^{2+}]_{szabad}$ -ra váltottuk át. Az ADP-ATP cseresebességet egy, a kutatócsoportunk által leírt módszer segítségével határoztuk meg, kihasználva az ADP és az ATP eltérő Mg^{2+} -kötési affinitásait. A közegben az ADP hozzáadást követő ATP megjelenés sebességét energetizált mitokondriumok estén (vagy *vice versa* “de-energetizált” mitokondriumok estén) az extramitokondriális $[Mg^{2+}]_{szabad}$ -változás sebességének méréseiből számítottuk ki, általános kötési egyenletet használva, melyek egy *exe* fájlban egyesítve az alábbi linkről szabadon letölthetők: <http://www.tinyurl.com/ANT-calculator>.

Mitokondriális légzés

Az oxigénfogyasztás monitorozását polarográfiás úton, „OROBOROS Oxygraph-2k” nevű, Clark-típusú oxigén-elektóddal szerelt készülékben, 37°C-on végeztük. Az oxigénkoncentráció és fluxus rögzítésére, ill. kalkulációjára a „DatLab” szoftvert használtuk.

Az extramitokondriális pH-változás mérése

Az izolált egér máj mitokondriumok inkubációs médiumának kémhatását 37°C-on, kombinált pH-érzékeny üvegelektrod segítségével határoztuk meg, melyet az „OROBOROS Oxygraph-2k” készülék BCN bemenetéhez csatlakoztattunk. Az inkubációs közeg összetételét úgy módosítottuk, hogy puffer kapacitása minimális legyen; így a mitokondriális CO₂-termelés okozta gyenge savasodás detektálhatóvá vált. A

kimenő feszültségjel pH-értékre történő átváltásához az elektródot ismert kémhatású, MeterLab[®] hitelesített alapoldatokkal kalibráltuk. A feszültség-kémhatás kalibráció során hőmérséklet kompenzációra volt szükség, melyet az oldatok gyártója által biztosított adatok alapján végeztünk.

A mitokondriális mátrix pH (pH_i) változásának mérése

A WT és CYPD KO egerek májából izolált mitokondriumok mátrixának kémhatását fluorimetriával állapítottuk meg. Ehhez a mitokondriumokat a ratiometrikus, fluoreszcens BCECF-AM festékkel töltöttük fel. A hidrolizált, és így a mátrixban csapdába eset protonált és deprotonált BCECF eltérő hullámhosszú fényintenzitásainak arányát „Hitachi F-4500” fluoreszcencia spektrofotométerben mértük 37°C-on. A BCECF jelét ismert kémhatású oldatokkal kalibráltuk oly módon, hogy a mátrix pH-ját szétkapcsolószer és nigericin segítségével kiegyenlítettük a közegével. A BCECF fluoreszcencia hányados kémhatásra történő konverziójához exponenciális illesztést alkalmaztunk.

NADH fluoreszcencia mérése

A redukált mitokondriális piridin nukleotidok autofluoreszcenciáját „Hitachi F-7000” fluoreszcencia spektrofotométerben detektáltuk 37°C-on.

KGDHC aktivitás meghatározása

A KGDHC aktivitást fluorimetriás módszerrel állapítottuk meg: a komplex NAD^+ -redukáló hatására a mérési közegben megjelenő NADH autofluoreszcenciáját detektáltuk 30°C-on. A méréseket „Hitachi F-4500” fluoreszcencia spektrofotométerben végeztük.

SUCL aktivitás meghatározása

Az ATP- és GTP-specifikus SUCL aktivitást a szukcinil-KoA → szukcinát átalakulás irányába határoztuk meg 30°C-on. A szukcinil-KoA-ból eredő KoASH felszabadulást annak DTNB-vel végbemenő reakcióján keresztül, spektrofotometriával követtük „GBC UV/VIS 920” típusú spektrofotométerben.

Keresztkötés, koprecipitáció és western blotolás

A CYPD és az F_0F_1 -ATP szintáz közötti kölcsönhatás szemléltetésére az ép mitokondriumokat a membránpermeábilis keresztkötő DSP-tal inkubáltuk ciklosporin A jelenlétében, ill. a nélkül. A mitokondriális fehérjéket digitoninnal tettük hozzáférhetővé, anti-komplex V szérummal immunoprecipitáltuk, majd SDS-PAGE segítségével szétválasztottuk azokat, metanol-aktivált polivinilidén-difluorid membránra transzferáltuk őket és végül az immunkötött fehérjéken ellenőriztük a CYPD jelenlétét, az F_0F_1 -ATP szintáz β -alegységét használva töltési kontrollnak.

A SUCL alegységek immunoreaktivitásait fagyasztott mitokondriális és szinaptoszómális üledék felhasználásával szemléltettük. A minták jégen történő kíméletes kiolvasztása után a fehérjéket SDS-PAGE segítségével választottuk szét, majd metanol-aktivált polivinilidén-difluorid membránra transzferáltuk azokat. Az immunoblottolást az antitestek gyártóinak előírásai alapján végeztük el. Az immunoreaktivásokat minden esetben a megfelelő torna-peroxidázhoz kötött másodlagos antitestek alkalmazásával és megnövelt kemilumineszcenciás előhívással tettük láthatóvá.

EREDMÉNYEK

A CYPD az F_0F_1 -ATP szintáz aktivitásának modulációján keresztül szabályozza a mátrix adenin nukleotidok szintjét

WT és CYPD KO egerek májából izolált ép mitokondriumok ANT-mediálta ADP-ATP cseresebességét mértük ciklosporin A jelenlétében és a nélkül, és összehasonlítottuk azokat alameticinnel permeabilizált mitokondriumok F_0F_1 -ATP szintáz-katalizálta direkt ATP hidrolízisének sebességével. Normál irányú ANT működés esetén nem láttunk különbséget a WT és CYPD KO egerek ATP kiáramlás- $\Delta\Psi_m$ profiljai között. Hasonlóképpen, teljes depolarizáció kiváltotta ATP beáramlást nézve sem tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns eltérést WT és CYPD KO egerekből izolált mitokondriumok között, akár adtunk ciklosporin A-t a közeghez, akár nem. Ellenben ha a mitokondriumokat a fentieket követően alameticinnel permeabilizáltuk, a vad típusú alomtársaikkal összehasonlítva a CYPD KO egerek izolált mitokondriumai $30,9 \pm 1,3\%$ -kal gyorsabb ATP hidrolízist produkáltak.

Ép, izolált mitokondriumokban a CYPD- F_0F_1 -ATP szintáz interakciót a membránpermeabilis keresztkötő DSP-t használva, F_0F_1 -ATP szintáz specifikus antitesttel végzett koprecipitáció alkalmazásával demonstráltuk. A ciklosporin A megakadályozta a CYPD kötődését az F_0F_1 -ATP szintázhoz.

Matematikai modellen végzett számítások alapján az F_0F_1 -ATP szintáz 30%-os aktivitásnövekedése az ANT-mediálta ADP-ATP cseresebesség jelentéktelen, csupán 1,38–1,7%-os növekedését vonná maga után maximálisan polarizált (az ANT és az F_0F_1 -ATP szintáz is normál irányban működik) és

maximálisan depolarizált (megfordul az ANT és az F_0F_1 -ATP szintáz is) mitokondriumokban egyaránt.

Ép eger máj mitokondriumokat szubsztrátmegvonással „de-energetizáltunk” komplex I specifikus gátlószer: rotenon jelenlétében, amit ATP hozzáadása követett. Az így mért $\Delta\Psi_m$ értékek alapján összehasonlítottuk a WT \pm ciklosporin A vs. CYPD KO egereket. Ilyen körülmények között és a kellően alacsony $\Delta\Psi_m$ miatt az ATP adását megelőzően az ANT és az F_0F_1 -ATP szintáz is fordított irányban működött. Az ATP hozzáadását előbb annak a mitokondriumokba történő beáramlása, majd a megfordult F_0F_1 -ATP szintáz általi hidrolízise követte, ami az ebből nyert energiát a protonok extramitokondriális térbe szállítására fordította, így generálva $\Delta\Psi_m$ -t. Ebben a felállásban a szétkapcsolószer hatásának ellensúlyozására az egyetlen módot az F_0F_1 -ATP szintáz azon képessége jelentette, hogy az protonokat tudott kipumpálni a mátrixból. Azt tapasztaltuk, hogy a CYPD KO egerek májából izolált mitokondriumok a WT alomtársaikból kinyertekkel összehasonlítva jobban ellenálltak a szétkapcsolószer indukálta lépcsőzetes depolarizációnak. A ciklosporin A hasonlóan hatott WT mitokondriumokra; KO egerekben nem okozott változást.

A KGDHC-elégtelenség negatív hatása a mátrixbeli szubsztrátszintű foszforilációra

Hogy egy gátolt légzésű mitokondriumról megállapíthassuk, vajon termeli vagy fogyasztja az extramitokondriális ATP-t, ANT inhibitorok $\Delta\Psi_m$ -re gyakorolt hatását vizsgáltuk, ADP hozzáadását követően. Az ANT-n keresztül elektrogén adenin nukleotid transzport folyik, hiszen 1 ATP^{4-} molekula cserélődik ki 1 ADP^{3-} molekulára. Emiatt normál ANT működés esetén,

annak gátlószerrel – mint a karboxiatraktilozid (cATR) vagy a bongkrekát – történő blokkolásakor $\Delta\Psi_m$ nyereség tapasztalható, ellentétben az ANT fordított irányú működésével, amikor is az inhibitor kiváltotta gátlás hatására $\Delta\Psi_m$ csökkenés következik be. Ezzel az ún. *bioszenzor teszttel* (azaz a cATR hatása WT, $DLD^{+/-}$, $DLST^{+/-}$ és $DLD^{+/-}/DLST^{+/-}$ egerekből izolált, vagy a bongkrekát hatása ugyanezekből az állatokból származó *in situ* mitokondriumokon) állapítottuk meg az ANT működési irányát akkor, amikor a légzési lánc nem működött.

Ha biztosítottuk a mátrixbeli szubsztrátszintű foszforilációt támogató légzési szubsztrátok jelenlétét a közegben, cATR adása légzésükben gátolt, WT egerekből izolált agy vagy máj mitokondriumokhoz $\Delta\Psi_m$ nyereséget eredményezett, igazolva az ANT normál irányú működését. Ezzel ellentétben cATR adása légzésükben gátolt, $DLD^{+/-}$, $DLST^{+/-}$ és $DLD^{+/-}/DLST^{+/-}$ egerekből izolált agy vagy máj mitokondriumokhoz $\Delta\Psi_m$ csökkenéssel járt, bizonyítva az ANT megfordulását a szubsztrátszintű foszforilációt támogató légzési szubsztrátok jelenlétének ellenére is.

Megmértük és összehasonlítottuk a WT, $DLD^{+/-}$, $DLST^{+/-}$ és $DLD^{+/-}/DLST^{+/-}$ egerekből izolált máj és Percoll-tisztított agy mitokondriumok ATP kiáramlási sebességeit is. Szubsztrátszintű foszforilációt támogató légzési szubsztrátokkal hajtott KGDHC-deficiens mitokondriumok vad típusú alomtársaikhoz képest szerényebb ATP kiáramlási sebességeket produkáltak; ellenben, ha a légzési szubsztrátok csak gyengén vagy egyáltalán nem támogatták a szubsztrátszintű foszforilációt, nem tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns eltérést a törzsek ATP kiáramlási sebességei között.

WT, DLD^{+/-}, DLST^{+/-} és DLD^{+/-}/DLST^{+/-} egerek agyából izolált idegvégződéseket (szinaptoszómákat) és agykérgi idegsejtenyészeteket preparáltunk. Itt bongkrekátot használtunk az ANT gátlására cATR helyett, mert az előbbi membránpermeábilis, míg az utóbbi nem az. A bioszenzor tesztet alkalmazva arra kerestük a választ: vajon részlegesen polarizált *in situ* szinaptikus mitokondriumok – ahol a szubsztrát nem általunk kontrollált faktor – fogyasztanak-e extramitokondriális ATP-t? A bongkrekát adását erőteljes repolarizáció követte WT, DLD^{+/-} és DLST^{+/-} egerekben, alátámasztva, hogy az ANT működési iránya változatlan maradt. Csupán a DLD^{+/-}/DLST^{+/-} egerek szinaptoszómáiban okozott szinte alig észlelhető repolarizációt a bongkrekát, amit enyhe depolarizáció követett.

WT, DLD^{+/-} és DLST^{+/-} egerek agykérgi idegsejtenyészetein végzett kísérleteink során, ha az *in situ* mitokondriumokat rotenonnal gátoltuk, majd bongkrekátot adtunk, az a WT tenyészeteken repolarizációt okozott a DLD^{+/-} és DLST^{+/-} sejtkultúrákkal szemben, ahol ugyanez depolarizációt váltott ki. Ebből arra következtettünk, hogy DLD^{+/-} és DLST^{+/-} egerek légzésükben gátolt *in situ* idegsejt-testbeli mitokondriumai extramitokondriális ATP-t fogyasztottak.

A genetikai manipuláció okozta KGDHC-beli változások hatással lehetnek a SUCL-ra is. Ebből kiindulva mértük a KGDHC-aktivitást, ill. az ATP- és GTP-formáló aktivitásait a két SUCL izoformának, WT és transzgenikus egerekből nyert izolált agy és máj mitokondriumokban és szinaptoszómákban. Emellett mindhárom SUCL alegység immunoreaktivitását is megvizsgáltuk. DLD^{+/-} és DLST^{+/-} agy és máj mitokondriumok KGDHC aktivitásai a WT értékekhez viszonyítva 20-48%-kal

alacsonyabbak voltak. A DLD^{+/-}/DLST^{+/-} agy és máj mitokondriumok KGDHC aktivitása pedig 50, ill. 62%-os csökkenést mutatott. Ezzel szemben a WT és transzgenikus egerek két SUCL izoformájának maximális ATP- és GTP-formáló aktivitásait összehasonlítva nem láttunk különbséget.

A mitokondriális diaforázok, mint a citrátköri szegmensek NAD⁺ donorai a szubsztrátszintű foszforilációt támogatva hozzájárulnak az ATP-termeléshez a sejtlégzés leállításakor

A nemrégiben kifejlesztett „OROBOROS Oxygraph-2k” fluoreszcencia moduljában lehetőségünk nyílt a $\Delta\Psi_m$ és az oxigénkoncentráció párhuzamos mérésére egyazon mintában. Mivel ez a technológia az előző fejezet méréseinek elvégzésekor nem volt elérhető, a koncepció alapját képező kísérleteinket megismételtük. Megállapítottuk, hogy valóban oxigénmentes körülmények között is fenntartható maradt az ANT működési iránya. Ez aktív szubsztrátszintű foszforilációra utalt izolált mitokondriumokban, ahogyan azt korábban gátolt légzési lánc estén is megfigyeltük.

A PDHC- és KGDHC-gátló arzenit gyengén puffert mérési közeg savasodási sebességére gyakorolt hatását is vizsgáltuk. E kísérletnek az volt az alapja, hogy a mitokondriumok nettó CO₂ termelők, így a beoldódó CO₂ szénsavvá válásakor savanyítják a közegüket. Az alkalmazott szubsztrát(ok)tól, ill. a célzottan gátolt enzimektől függően az arzenittel gátolható célpontok szerepére tudtunk következtetni. PDHC-et kikerülő szubsztrát-kombinációk esetén az arzenit a savanyodás statisztikailag szignifikáns csökkenését okozta a rotenonnal, cATR-dal és oligomicinnel előkezelt mitokondriumokban. Ebből arra következtettünk, hogy olyan mitokondriumokban, ahol a

rotenon a komplex I-et, a cATR az ANT-t, az oligomicin pedig az F_0F_1 -ATP szintázt blokkolta, az arzenittel gátolható savasodás csakis a KGDHC CO_2 -termeléséből eredhetett. Légzésükben gátolt mitokondriumokban a KGDHC CO_2 -produkcója így arra utalt, hogy az ehhez szükséges NAD^+ rendelkezésre állt. Fenti megfigyeléseinket szem előtt tartva, komplex I-en kívüli, mátrixbeli NAD^+ -forrásokat kerestünk.

Hogy kiderítsük, anoxiában hozzájárulnak-e a mitokondriális diaforázok a NAD^+ -termeléshez a KGDHC reakció számára, 4 gátlószerüket teszteltünk. Először is meghatároztuk azt a koncentráció tartományt, ahol a diaforázgátlók szétkapcsoló hatása elhanyagolható volt. Következő lépésként a *bioszenzor teszt* során vizsgáltuk, hogy légzésükben gátolt, izolált máj mitokondriumokban hogyan befolyásolják az ANT működési irányát, amire $\Delta\Psi_m$ mérések alapján, a cATR kiváltotta változásokból következtettünk. Diaforázgátlók jelenlétében a cATR depolarizációt okozott anélkül, hogy az oxigénfogyás mértékét befolyásolta volna. Ez az ANT megfordulására utalt. Ugyanígy, diaforázgátlók jelenlétében, rotenonnal gátolt mitokondriumok depolarizációval reagáltak a cATR kezelésre, ellentétben a kontrollal, ill. ha az inhibitorok oldószereit adtuk, amikor is a cATR repolarizációt váltott ki.

A *bioszenzor tesztet* ismert diaforáz szubsztrátok jelenlétében is elvégeztük légzésükben rotenonnal, ill. anoxia miatt gátolt mitokondriumokon. 14 szubsztrát hatását vizsgáltuk olyan koncentrációkban, ahol szétkapcsoló és egyéb mellékhatásaik nem befolyásolták a $\Delta\Psi_m$ és légzési sebesség értékeket. Egér máj mitokondriumokat glutamát, malát és β -hidroxibutirát kombinációjával energetizáltunk, mert ez a szubsztrátkeverék

oxigén hiányában limitálta az elérhető NAD^+ mennyiségét. Ilyen körülmények között, anoxiában, a durokinon alkalmazása dóziszfüggő cATR kiváltotta repolarizációval járt. Ha a légzési lánc gátlását nem az oxigén megvonásával, hanem rotenont adva értük el, a durokinonon kívül a menadion és a mitoQ is erős, cATR kiváltotta repolarizációt idézett elő. Egyértelműen különbözött egymástól az oxigénhiányos és a rotenon-indukálta sejtlégzés-leállás; anoxiában a menadion és mitoQ nem voltak képesek elősegíteni a cATR adását követő $\Delta\Psi_m$ nyereséget. Ennek okait tovább vizsgáltuk.

A fenti ellentmondás feloldásához a mitokondriális légzést a komplex III specifikus gátlószer: stigmatellin segítségével blokkoltuk. Azon felvetéseket teszteltük ily módon, melyek szerint a komplex III *b* komplexe képes újraoxidálni a mitokondriális diaforázok által redukált szubsztrátokat. A stigmatellin valóban negálta a diaforáz szubsztrátok jótékony hatását a cATR kiváltotta repolarizáció elősegítését illetően.

A rágcsáló és emberi szövetekben leírt diaforáz aktivitás nincs jelen a galambok májában és mellizmában sem. Izolált galamb máj mitokondriumokat ADP és rotenon adását követően a cATR repolarizálta. Ezen hatás kiváltásában a diaforázok közreműködésének hiányát igazolta, hogy a menadion nem fokozta a cATR kiváltotta repolarizáció mértékét, ill. egyik diaforázgátló jelenlétében sem okozott $\Delta\Psi_m$ veszteséget a cATR. Ennek megfelelően anoxiában a durokinon hatástalan volt a cATR kiváltotta mitokondriális $\Delta\Psi_m$ változásokra. Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a diaforáz szubsztrátok és gátlószeres egér máj mitokondriumokban megfigyelt hatásait minden bizonnyal valódi diaforáz aktivitás közvetítette.

Nyilvánvaló azonban, hogy a galamb máj mitokondriumok diaforázok hiányában is képesek működtetni a KGDHC-SUCL tengelyt, fenntartva ezzel a szubsztrátszintű foszforilációt.

Adataink igazolják tehát, hogy a mitokondriális diaforázok nem az egyedüli NAD^+ -termelők a légzési lánc leállása esetén; ezért alternatív NAD^+ -forrásokat is kerestünk. WT vs. szuperoxid-diszmutáz 2 enzimet szívspecifikusan túl-expresszálok egereket hasonlítottunk össze a *bioszenzor teszttel*. Ezekben az egerekben – WT alomtársaikhoz viszonyítva – nagyon kevés reaktív oxigénszármazékot termelnek a szív mitokondriumok, melyekben a cATR lényegesen szerényebb repolarizációt, vagy akár depolarizációt is okozott. Ezen eredményeink arra engednek következtetni, hogy rotenon jelenlétében a reaktív oxigénszármazékok hozzájárulhatnak a NAD^+ újratermelődéséhez a mitokondriális mátrixban.

Lehetséges, hogy a mitokondriális IDH izoformák is képesek regenerálni a NAD^+ -t sejtlégzés-leállás esetén: az IDH2 az α -ketoglutarátot és NAD(P)H -t izocitráttá és NAD(P)^+ -t alakítja, majd az IDH3 oxidatív dekarboxiláción keresztül az izocitrátot és NAD(P)^+ -t visszaalakítja α -ketoglutaráttá és NAD(P)H -tá. Hogy felmérjük, ez az IDH-mediálta „rövidzárlat” mennyiben járul hozzá a mitokondriális NAD^+ -ellátáshoz, megkíséreltük a szubsztrát koncentrációk manipulálásával eltolni a reakciót a NADH keletkezés irányába. Arra számítottunk, hogy a citrát bőséges jelenléte közömbösíti majd a többi szubsztrát jótékony, szubsztrátszintű foszforilációt támogató hatását, súlyosbítva a cATR kiváltotta $\Delta\Psi_m$ változásokat a sejtlégzés leállásakor. Ha citrátot adtunk glutamáthoz vagy α -ketoglutaráthoz, az valóban depolarizációra váltotta az addigi cATR okozta repolarizációt.

KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink alapján megállapítható, hogy részlegesen szétkapcsolt vagy légzésükben gátolt mitokondriumokban lehetséges az F_0F_1 -ATP szintáz fordított irányú működése az ANT egyidejű megfordulása nélkül is. Ilyen körülmények között a mátrixbeli szubsztrátszintű foszforiláció kulcsszerepet játszik a megfordult F_0F_1 -ATP szintáz ATP-ellátásában, mely így kellőképpen polarizálni képes a belső membránt az ANT megfordulásának megakadályozásához. Ekképpen megelőzhető, hogy a sérült mitokondriumok elhasználják a citoszolikus ATP-készletet, így javítva a sejt túlélési esélyeit.

A SUCL ATP-termelése oxigén hiányában sem áll le, sőt, fokozódik. Tehát, ha KGDHC-mediálta szukcinil-KoA ellátásuk megfelelő, a légzésükben gátolt mitokondriumok működése nem igényel külső ATP-forrást. Ide kapcsolódóan, oxigén hiányában gyorsul az α -ketoglutarát átalakulása szukcináttá, igazolva az KGDHC-működést. Az KGDHC NAD^+ -ellátásának tehát kell, hogy létezzen alternatív módja a sejtlegzés leállása esetére, hiszen ilyenkor a NADH komplex I általi oxidációja nem lehetséges. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy ez más folyamatok mellett, elsősorban a mitokondriális diaforázok közreműködésével valósul meg.

A CYPD az F_0F_1 -ATP szintázhoz kapcsolódva csökkenti az ATP szintézis és hidrolízis sebességét is. Azonban az ANT közvetítő szerepéből adódóan ennek hatása nem jelenik meg az extramitokondriális térben. Az F_0F_1 -ATP szintáz CYPD általi befolyása a mátrix ATP/ADP hányadosát hivatott inkább szabályozni, így modulálva az F_0F_1 -ATP szintázt és az ANT-t.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

$\Delta\Psi_m$:	mitokondriális membránpotenciál
ADP:	adenozin-5'-(tetrahidrogén-difoszfát)
ANT:	adenin nukleotid transzlokáz
ATP:	adenozin-5'-(tetrahidrogén-trifoszfát)
BCECF-AM:	2',7'-bisz-(2-karboxietil)-5-(és-6)- karboxifluoreszcein-acetoximetil-észter
cATR:	karboxiatraktilozid
CO ₂ :	szén-dioxid
CYPD:	ciklofilin D
DLD:	dihidrolipoil-dehidrogenáz
DLST:	dihidrolipoil-szukcinil-transzferáz
DSP:	3,3'-ditio-bisz-(szulfoszukcinimidil-propionát)
DTNB:	5,5'-ditio-bisz-(2-nitrobenzoesav)
GTP:	guanozin-5'-(tetrahidrogén-trifoszfát)
IDH(2 v. 3):	izocitrát-dehidrogenáz, 2. v. 3. izoformája
KGDH(C):	α -ketoglutarát-dehidrogenáz (komplex)
KoASH:	koenzim A
MgG:	Magnesium Green TM , pentakálium só
NAD(P) ⁺ :	nikotinamid-adenin-dinukleotid(-foszfát)
PDH(C):	piruvát-dehidrogenáz (komplex)
SDS-PAGE:	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SUCL:	szukcinát-KoA ligáz
TMRM:	tetrametil-rodamin-metil-észter
TPP:	tetrafenilfoszfónium
WT v. KO:	vad típusú v. génkiütött

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés anyagát képező közlemények

1. Chinopoulos C, Gerencsér AÁ, Mándi M, Máthé K, Törőcsik B, Dóczy J, Turiák L, Kiss G, Konrád C, Vajda S, Vereczki V, Oh RJ, Ádám-Vizi V. (2010) Forward operation of adenine nucleotide translocase during F_0F_1 -ATPase reversal: critical role of matrix substrate-level phosphorylation. *FASEB J*, 24: 2405-2416.

I.F.: 6.515

2. Chinopoulos C, Konrád C, Kiss G, Metelkin E, Törőcsik B, Zhang SF, Starkov AA. (2011) Modulation of F_0F_1 -ATP synthase activity by cyclophilin D regulates matrix adenine nucleotide levels. *FEBS J*, 278: 1112-1125.

I.F.: 3.790

3. Kiss G, Konrád C, Dóczy J, Starkov AA, Kawamata H, Manfredi G, Zhang SF, Gibson GE, Beal MF, Ádám-Vizi V, Chinopoulos C. (2013) The negative impact of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex deficiency on matrix substrate-level phosphorylation. *FASEB J*, 27: 2392-2406.

I.F.: 5.704 (2012)

4. Kiss G, Konrád C, Pour-Ghaz I, Mansour JJ, Németh B, Starkov AA, Ádám-Vizi V, Chinopoulos C. (2014) Mitochondrial diaphorases as NAD^+ donors to segments of the citric acid cycle that support substrate-level phosphorylation yielding ATP during respiratory inhibition. *FASEB J*, 28: 1682-1697.

I.F.: 5.704 (2012)

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények

5. Vajda S, Mándi M, Konrád C, Kiss G, Ambrus A, Ádám-Vizi V, Chinopoulos C. (2009) A re-evaluation of the role of matrix acidification in uncoupler-induced Ca^{2+} release from mitochondria. FEBS J, 276: 2713-2724. **I.F.: 3.042**
6. Dóczy J, Turiák L, Vajda S, Mándi M, Törőcsik B, Gerencsér AÁ, Kiss G, Konrád C, Ádám-Vizi V, 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: 6345-6353. **I.F.: 4.773**
7. Konrád C, Kiss G, Törőcsik B, Lábár JL, Gerencsér AÁ, Mándi M, Ádám-Vizi V, 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: 822-836. **I.F.: 3.790**
8. Konrád C, Kiss G, Törőcsik B, Ádám-Vizi V, Chinopoulos C. (2012) Absence of Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition but presence of bongkrekate-sensitive nucleotide exchange in *C. crangon* and *P. serratus*. PLoS One, 7: e39839. **I.F.: 3.730**
9. Chinopoulos C, Kiss G, Kawamata H, Starkov AA. Measurement of ADP-ATP exchange in relation to mitochondrial transmembrane potential and oxygen consumption. In: Galluzzi L, Kroemer G. (szerk.), *Methods in Enzymology Vol. 542. Conceptual Background and Bioenergetic/Mitochondrial Aspects of Oncometabolism*. Academic Press, Burlington, 2014: 333-348. **I.F.: 2.002 (2012)**