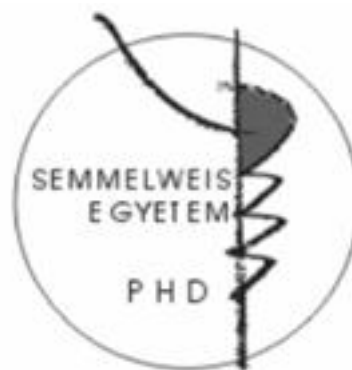


A Ca^{2+} -indukált mitokondriális permeábilis tranzíciós pórus és Bongrekát érzékenység vizsgálata távoli rokon fajok között

Doktori tézisek

Dr. Konrád Csaba

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Christos Chinopoulos, Egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Sőti Csaba, Egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Beáta Sperlág, Kutatócsoport vezető, Ds.C.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Mandl József, Intézetigazgató, Ds.C.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Zelles Tibor, Egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Ligeti Erzsébet, Intézetigazgató helyettes, DsC.
Dr. Drahos László, Tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2014

Bevezetés

A mitokondrium a celluláris Ca^{2+} koncentráció szabályozásának fontos szereplője. A mitokondriális Ca^{2+} felvételért elsősorban a belső mitokondriális membránban található kalcium uniporter felelős, mely a felvételt a magas elektromos potenciál rovására végzi. A felvett Ca^{2+} a mitokondriális mátrixban csapadék formájában kerül raktározásra. A kalcium sók kicsapódása lehetővé teszi, hogy a totál mátrix $[\text{Ca}^{2+}]$ akár az 1M-t is elérje. A felszabadulás ugyancsak egy membránpotenciál által meghajtott esemény, amelyért a mitokondriális $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, és a $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ cserélők felelősek.

A Ca^{2+} felvevőképesség maximális kapacitásának határt szabhat a belső mitokondriális membrán szabályozott permeabilizációja, mely jelenség a mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus (PTP) nevet kapta. A permeabilitás tranzíció során, mivel a mitokondriális mátrix hiperozmotikus citoszolhoz képest, annak víztartalma megnövekszik, ami a mátrix megduzzadásával jár. A belső mitokondriális membrán nagy felületű, és ennek köszönhetően ellenáll a térfogat növekedésnek, ám a külső membrán a tranzíció hatására felreped. Ez lehetővé teszi az intermembrán térben tartózkodó fehérjék kijutását a citoszolba, melyek közül több proapoptotikus faktor, mint a citokróm C, Smac / Diablo, endonukleáz G vagy az AIF. Amikor a sejtben található mitokondriumok nagy töredéke stresszre adott válaszként egyidejűleg tranzícion meggy keresztül, a létrejövő ATP-depléció lehetetlenné teszi, hogy az energiaigényes apoptotikus folyamatok koordináltan mehessenek végbe, ami végül nekrozishoz vezet.

Számos bizonyíték világít rá a PTP fontos szerepére különböző kezelhetetlen betegségek patológiájában. A PTP szerepe neurodegeneratív betegségekben, mint az Alzheimer-, Parkinson-, Huntington-kór vagy az amyotrophiás laterális szklerózis széles körben elfogadott. A PTP egy fontos esemény ischaemia/reperfúziós sérülés során. Transzgenikus egérmodelleken végzett kísérletek bizonyítják, hogy a tranzíciós pórus gátlása hatékony stratégia lehet az említett betegségek kezelésében.

PTP nyitási valószínűségét számos vegyi anyag valamint különböző mitokondriális paraméterek változása befolyásolja, amely hatások többségét már a jelenség első leírásakor

dokumentálták. Azonban a hatalmas erőfeszítések, melyek a PTP szerkezeti elemeit célozták azonosítani mindeztáig eredménytelenek voltak.

Számos különböző fajból származó izolált mitokondriumról leírták, hogy pórusképző tulajdonságokat mutatnak. Mikor kutatásunk megkezdte a témában, az egyetlen állatfaj, melyben ismert hogy hiányzik a Ca^{2+} - indukálható PTP a sórák, *Artemia franciscana* volt.

Az *Artemia* fajok mostoha körülmények között élő úgynevezett extremophilok, melyek figyelemre méltó ellenálló képességgel rendelkeznek különböző fizikai és kémiai stresszel szemben. A PTP jelenlétét eredetileg azért vizsgálták ezen állatokon, hogy magyarázatot találjanak ellenálló képességük biokémiai hátterére. Mivel a PTP-t különböző egymástól távoli evolúciós kapcsolatban álló eukariótákban, mint gombákban a növényekben és mási állatokban bizonyított, az eredeti szerzők feltételezték, hogy hiánya egyedülálló vonása *Artemia* embrióknak.

Célkitűzések

A jelen dolgozatban bemutatott, folyamatban lévő tanulmány elsődleges célja a PTP szerkezeti fehérjéinek azonosítása. Ez a cél ambiciózus, és jóval túlmutat egy PhD projekten. A munka melyben részt vettem, modern módszerek használatához szükséges alapokat fektet le, melyekkel talán lehetséges ezen cél elérése.

Kezdetben a sórák, *Artemia franciscana*, alapos biokémiai jellemzése koncentráltunk, annak érdekében, hogy mitokondriumaik egyedi tulajdonságaira magyarázatot találjunk. Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az *Artemiában* kifejezett adenin nukleotid transzlokáz izoformának köze lehet a tranzíciós pórus hiányához ebben a fajban.

Feltevésünk igazolása érdekében új modellállatokat kerestünk, melyekben a PTP jelen van ám filogenetikailag közel állnak az Artemiához. Meglepő módon eredmények (amit publikáltunk : [1, 2]) arra utaltak, hogy a rákokban általános Ca^{2+} - indukált permeabilitás tranzíciós pórus

hiánya. Kíváncsiak voltunk, ha a PTP jelenségének elvesztése egyedülálló vonás volt a rákok törzsfejlődése során, az milyen ponton történt meg?

Mivel a rákfélék elemzése összehasonlításához használható modellek helyett további PTP nélküli példákat eredményezett, különböző törzsekhez tartoznak fajokat kezdtük tanulmányozni, amelyekben a PTP jelenléte ismeretlen volt. Ezen a ponton célunk az összehasonlításához megfelelő modellek megtalálásán túl más törzsek lehetséges felfedezése is volt, amelyekben ugyancsak hiányzik a PTP.

Az *Artemián* végzett kísérleteink egyik eredményeként azt találtuk, hogy az *Artemia* embrióból izolált mitokondriumok adenin nukleotid transzlokáza érzéketlen az egyik ismert inhibitorára: bongkrekiksavra. A PTP vizsgálata mellett párhuzamos célunk volt a bongkrekát kötőhely azonosítása, amely a PTP gátlásnak potenciális molekuláris célpontja.

Úgy gondoljuk korszerű technikákkal, mint proteomikai és teljes genom szekvenálási módszerekkel nyert adatbázisok bioinformatikai vizsgálatával esélyünk van a PTP kulcsfontosságú fehérjéinek azonosítására. A projekt célja változatlanul a permeabilitás tranzíciós pórus szerkezeti elemeinek azonosítása, olyan organizmusok filogenetikai elemzése által, amelyek nem mutatják a Ca^{2+} - indukált permeabilitás tranzíciót.

Módszerek

Mitokondriális izoláció

Artemia franciscana

A dehidrált, betokozódott *A. franciscana* gastrulákat felhasználásukig 4 °C-on tároltuk. Az embtyokat (15 g) 0.25 M NaCl-ben hidráltuk legalább 24 órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezután 30 percen keresztül egy módosított antiformin oldatban dechorionáltuk őket, amit egy 5 perces áztatás követett 1% nátrium thioszulfát oldatban, majd többszöri átmosás jéghideg 0.25

M NaCl oldatban. ~ 10 g dechorionált embriót homogenizáltunk üveg-teflon homogenizátorral jéghideg izolációs pufferben (0.5 M szukróz, 150 mM KCl, 1 mM EGTA, 0.5 tömegszázalék zsírsav mentes BSA, és 20 mM K⁺-Hepes(pH 7.5)). A homogenizált mintát 4 °C-on 10 percen keresztül 300 G-vel centrifugáltuk, a felső zsírban gazdag felülúszót eltávolítottuk, majd a maradék felülúszó réteget 11 300 G-n, 10 percen keresztül centrifugáltuk. Ezt követően A reszuszpendált pelletet újra 11 300 G-n, 10 percen keresztül centrifugáltuk. A végső pelletet 0.4 ml jég hideg izolációs pufferben szuszpendáltuk újra (0.5 M szukróz, 150 mM KCl, 0.025 mM EGTA, 0.5 tömegszázalék zsírsav mentes BSA, és 20 mM K⁺-Hepes(pH 7.5)), amely ~ 80 mg ·ml⁻¹ proteint tartalmazott. A kísérleteket 27 °C-on végeztük.

Gerincesek (*Xenopus laevis*, egér és patkány)

Az izolált mitokondrium preparálása *Xenopus* patkány vagy C57Bl/6N egér májából a korábbi publikációinkban leírtakhoz hasonlóan történt. Az állatokon végzett eljárások a helyi előírásoknak (Egyetemi Állatkísérleti Bizottság) megfelelően zajlottak. A kísérletekhez használt inkubációs médium összetevői 8 mM KCl, 110 mM K-glukonát, 10 mM NaCl, 10 mM HEPES, 10 mM KH₂PO₄(ahol jelölve), 0.005 mM EGTA, 10 mM mannitol, 0.5 mM MgCl₂(vagy 1, ahol jelölve), 1 mM glutamát, 5 mM szukcinát (szubsztrátok, ahol jelölve), 0.5 mg/ml BSA (zsírsav mentes) voltak, pH 7.25. A kísérleteket a *Xenopus* esetén 30 °C-on, a rágcsálók esetén pedig 37 °C-on végeztük.

Drosophila melanogaster* és *Caenorhabditis elegans

A vad típusú *D. melanogaster*-eket Billes Viktor András (Genetikai Tanszék, ELTE) bocsátotta rendelkezésünkre. A preparálásokhoz 500-600 állatot használtunk fel. A módszer és a pufferek kevéssé térnek el a gerincesek alatt leírtaktól.

A *C. elegans* kolóniák Sőti Csabától (Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Semmelweis Egyetem) származtak.

A kísérleti médium amit ezeknél a fajoknál használtunk megegyezik a gerincesek alatt leírttal, a hőmérséklet pedig 28 °C volt.

Édesvizi rákfélék (*Cyclops vicinusvicinus* és *Daphnia pulex*)

Daphnia és *Cyclops* helyi tavakban gyűjthető. A begyűjtött plankton mindkét faj esetén 90-95%-osan volt tiszta. A mitokondriális izoláció hasonlóan történt a gerincesek alatt leirtakkal, de a használt pufferek különböztek. A puffer összetétele 225 mM mannitol, 125 mM szukróz, 5 mM HEPES, 1 mM EGTA és 1 mg/ml zsírsavmentes BSA volt, a pH 7.4-re állításához Trizmát használtunk. A homogenizátumokat egy réteg muslinon keresztül megszűrtük, majd 1,250 G-n centrifugáltuk 10 percen keresztül. Ezt követően a felülúszót 10 percen keresztül 10 000 G-n centrifugáltuk, majd a pelletet reszuszpendáltuk és ezt a lépést megismételtük. A végső centrifugálást követően a pelletet 0.15 ml 0.1 mM EGTA tartalmú izolációs pufferben reszuszpendáltuk. A kísérleti médium 225 mM mannitolt, 125 mM szukrózt, 5 mM HEPES-t, 0.1 mM EGTÁ-t, 10 mM KH₂PO₄-t, 1 mM MgCl₂-t, 5 mM glutamátot, 5 mM malátot, 5 mM szukcinátot, 0.5 mg/ml zsírsavmentes BSA-t tartalmazott, a pH = 7.25 volt. A kísérleteket 27 °C-on végeztük.

Tengeri fajok

A tanulmányban használt tengeri élőlényekhez (*Crangon crangon*, *Palaemon serratus*, *Carcinus maenas*, *Pagurus bernhardus*, *Asterias rubens*, *Paracentrotus lividus*, *Nephtys hombergii*, *Mytilus edule*, *Cerastoderma edule*, *Patella vulgata*, *Branchiostoma lanceolatum*) a Service d'Expédition de Modèles Biologiques - CNRS/FR2424 –es pályázaton keresztül jutottunk hozzá (Roscoff, Franciaország). Az állatokat felhasználásukig tengervízzel töltött akváriumokban tároltuk, 6–8°C-on, 12 órás megvilágítási ciklusokkal. Gerinctelen állatok kísérleti célra való felhasználása nem esik etikai szabályozás alá. Az izolációhoz felhasznált állatok száma és szövete fajonként változó volt: *C. crangon* és *P. serratus* esetén 10-15 állatot használtunk fel preparációnként. Az állatok cephalothoraxát eltávolítottuk, majd az utótesteket megszabadítottuk páncéljuktól. A *C. maenas* preparálásakor 4-5 állat hepatopankreaszából preparáltunk. A *P. bernhardus* felhasználásakor 8-10 állat utótestét használtuk. Az *A. rubens* és a *P. lividus* preparálásakor 3-4 állat gasztrointesztinális traktusa került felhasználásra. Az *N. hombergii* és a *B. lanceolatum* esetén 10-15 teljes állatot homogenizáltunk. *M. edule*-ből, *C. edule*-ből and *P. vulgata*-ból 9-12 teljes állatot használtunk miután vázukat eltávolítottuk. A kinyert szöveteket jég hideg pufferben felaprítottuk, homogenizáltuk és a *C. vicinusvicinus* és *D.*

pulex alatt leírtakkal azonos módon izoláltunk belőlük funkcionális mitokondriumot. A kísérleteket 27 °C-on végeztük a médium pedig megegyezett az édesvízi rákfélék alatt leírtakkal.

$\Delta\Psi_m$ meghatározás

A $\Delta\Psi_m$ becslése a Safranin O fluoreszcenciájának mérésén alapszik mely kation ha felhalmozódik az energizált mitokondriumokban, csökkent emissziót mutat. 2 ml inkubációs médiumhoz izolált mitokondriumot (a jelölt mennyiségben) és 5 μM Safranin O-t adtunk. A fluoreszcenciát egy Hitachi F-4500 spektrofluoriméterrel (Hitachi High Technologies, Maidenhead, Egyesült Királyság) rögzítettük, 2-Hz mintavételi sebességgel, 495-nm excitációs és 585-nm emissziós hullámhosszokon. Különböző szubsztrátokkal végzett pilot kísérletek alapján úgy találtuk, hogy a glutamát malát és szukcinát együttesen (mind 5 mM) eredményezte a legnegatívabb és legjobban reprodukálható $\Delta\Psi_m$ értékeket.

Extramitokondriális $[\text{Ca}^{2+}]$ meghatározás Ca-Gr 5N fluoreszcencia alapján

2 ml inkubációs médiumhoz izolált mitokondriumot (a jelölt mennyiségben) és 1 μM CaGr-5N-t adtunk. A fluoreszcenciát egy Hitachi F-4500 spektrofluoriméterrel (Hitachi High Technologies, Maidenhead, Egyesült Királyság) rögzítettük, 2-Hz mintavételi sebességgel, 506-nm excitációs és 530-nm emissziós hullámhosszokon.

Mitokondriális duzzadás

Az izolált mitokondriumok duzzadásának vizsgálata a minta fényszórásának mérésén keresztül történt, amit egy Hitachi F-4500 spektrofluoriméterrel (Hitachi High Technologies, Maidenhead, Egyesült Királyság) segítségével rögzítettük 660 nm-en. 2 ml inkubációs médiumhoz izolált mitokondriumot (a jelölt mennyiségben) adtunk. Kísérleteink végén kontrollként alamethicint adtunk a maximális duzzadás kiváltására, mely peptid pórusokat formál a membránon.

Az ADP-ATP kicserélődés sebességének mérése

Az ADP-ATP kicserélődés sebességét a laboratóriumunk által nemrégiben kidolgozott módszerrel határoztuk meg, mely az ADP és az ATP Mg^{2+} iránti affinitása közötti különbséget használja ki. ADP adását követően energizált mitokondriumokhoz, az inkubációs médiumban

megjelenő ATP mennyisége a $[Mg^{2+}]_f$ -ből standard reakcióegyenletek segítségével számolható. 2 ml inkubációs médiumhoz izolált mitokondriumot (a jelölt mennyiségben), 2 μ M Magnesium Green pentapotassium sótt és 50 μ M A_p5A-t adtunk. A fluoreszcenciát egy Hitachi F-4500 spektrofluoriméterrel (Hitachi High Technologies, Maidenhead, Egyesült Királyság) rögzítettük, 2-Hz mintavételi sebességgel, 506-nm excitációs és 530-nm emissziós hullámhosszokon. Az [ATP] és [ADP] kalkulációjához szükséges konstansok; K_{ADP} és K_{ATP} meghatározása a mérésekkel azonos körülmények között történt.

Transzmissziós elektron microscopia (TEM)

Az izolált mitokondriumot 10 000 G-n 10 percen át centrifugáltuk, majd a pelletet egy éjszakán keresztül fixáltuk 4%-os glutáraldehid és 175 mM nátrium-kakodilát oldatban (pH 7.5). Ezt követően a mintákat 1% ozmium tetroxidban 100 percen keresztül posztfixáltuk, majd alkohollal és propilén oxiddal dehidratáltuk végül Durcupanba ágyaztuk. Az ultramicrotommal készített metszeteket (76 nm) rézrácsokra illesztettük, 6%-os uranil-acetáttal (20 perc) és ólom-citráttal (5 perc) kontrasztoltuk végül egy JEOL 1200 EMX (Peabody, MA, USA) elektron mikroszkóppal vizsgáltuk. Az intramitokondriális Ca^{2+} -P_i csapadék térfogatfrakció meghatározása küszöbérték adaptációs algoritmussal történt az image analyst MKII szoftverrel (Image Analyst Software, Novato, CA, USA).

Mitokondriális légzés

Az oxigén fogyasztás meghatározása polarográfiásan történt egy Oxygraph-2k oxigráffal (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). 2 ml inkubációs médiumban 0.5 mg mitokondriumot szuszpendáltunk. Az oxigén koncentráció és a flux (pmol/(s*mg)); az oxigén koncentráció negatív időderiváltja / mitokondriális tömeg / térfogat) Az oxigén koncentráció és a flux rögzítése a DatLab software segítségével történt (Oroboros Instruments).

Egér máj és Artemia embrió mitokondriumok mátrix pH (pH_i) meghatározása

20 mg egér máj mitokondriumot 2 ml médiumban (mM-okban: 225 mannitol, 75 szukróz, 5 HEPES, 0.1 EGTA, pH 7.4 Trizmával beállítva) szuszpendáltunk és 50 μ M BCECF-AM-al 20 percen keresztül inkubáltuk (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 30°C-on. Ezt követően a mintát

kétszer egymást követően 3 percen keresztül centrifugáltuk 10 600 G-n, 4°C-on. Végül a pelletet 0.2 ml médiumban reszuszpendáltuk és felhasználásig jégen tartottuk. Az *Artemia* mitokondriummal hasonlóan jártunk el: a médium ekkor 500 mM szukrózt, 150 mM KCl-t, 1 mM EGTA-t, 0.5% zsírsavmentes BSA-t és 20 mM K⁺-HEPES-t (pH 7.5) tartalmazott, valamint a hőmérséklet 27°C volt. A mátrixban maradt, hidrolizált festék fluorescenciáját egy Hitachi F-4500 spektrofluoriméterrel (Hitachi High Technologies, Maidenhead, Egyesült Királyság) rögzítettük, 2-Hz mintavételi sebességgel, 450/490-nm excitációs és 531-nm emissziós hullámhosszokon.

Eredmények és megbeszélés

Az *Artemia* embriókon végzett kísérletekből kiderült, hogy mitokondriumuk potens Ca²⁺ felvevő gépezettel rendelkezik, mely mechanisztikusan hasonlít az emlősökben ismerthez, ám bizonyos tulajdonságait tekintve különbözik attól. A Ca²⁺ felvétel érzékeny volt Ru 360-ra, ami azt jelzi a folyamat végrehajtásáért valószínűleg ugyancsak a Ca²⁺ uniporter a felelős. A Ca²⁺-felvételhez szükséges ellenion a foszfát volt, amely tényt elektron energia-veszteség spektroszkópia segítségével is alátámasztottuk.

Az emlősökkel ellentétben, az ADP és az ATP egyaránt csökkenti a Ca²⁺-felvételi kapacitást az *Artemiából* származó mitokondriumokon. Emlősöknél ezen nukleotidok PTP gátló hatása jól ismert, ami egyben a megnövelt felvevőképességet is megmagyarázza. Az ADP *Artemián* megfigyelhető gátló hatása felfüggeszthető az ADP/ATP kicserélődés blokkolásával akár közvetlenül az ANT gátlása által (cATR) vagy közvetve, az F₀F₁ ATP-áz gátlása által (oligomycin), tehát az ADP-nek be kell kerülnie a mátrixba annak érdekében, hogy kifejtsen gátló hatását. A mátrix ADP két különböző mechanizmuson keresztül okozhatja ezt: i) membránpotenciál csökkentésével vagy ii) egy specifikus kötőhelyen keresztül. A két gátlószer, a cATR és az oligomycin különböző hatást gyakorolnak a mátrix ADP tartalmára. Elegendően

negatív membránpotenciál mellett (az ANT ATP-t pumpál ki a mátrixból és az FoF1 ATP -áz ATP-t termel) , amikor cATR gátolja az ANT-t az ADP koncentrációja kis mértékben csökken (eleve alacsony az FoF1 ATP -áz magasabb flux kontrol koeficiense miatt), mivel a mátrix ATP nem lehet ADP-re cserélni, azonban oligomicinnel való kezeléskor, a mátrix ADP- szint megnövekszik, mivel az ADP nem alakul ATP-vé oxidatív foszforiláción keresztül (sem szubsztrát szintű foszforiláción keresztül, mivel a kísérleteinkben használt szubsztrátok nem kedveznek a folyamatnak). Ennek fényében valószínűbb, hogy az ADP a membránpotenciál befolyásolásán keresztül hat a Ca^{2+} felvevőképességre *Artemia* mitokondriumokon.

Az ATP ugyancsak csökkenti a Ca^{2+} felvevőképességet, ám felvétele a mátrixba nem szükséges, valószínűleg az *Artemia* mitokondriumok külső felületén köt és fejt ki hatását. Ez a megfigyelés magyarázat lehet az ADP- gátló hatása is: az ADP gátlás közvetett, és valójában az mitokondrium által termelt ATP okozza, amely megszüntethető az ATP termelés gátlása által, cATR-al vagy oligomicinnel. Annak ellenére, hogy ezek az eredmények számos új érdekes kérdést vetnek fel az *Artemia* mitokondriális Ca^{2+} kezelésével kapcsolatban, ám fő célunk nem ezeknek a kérdéseknek a megválaszolása volt.

Az *Artemia* mitokondriális morfológiáját transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. Az *Artemia* mitokondriumok méretében és crista szerkezet tekintetében az emlősökhöz nagyon hasonló megjelenésűek, azonban amikor nagy mennyiségű Ca^{2+} -ot vesznek fel, a csapadék az emlősökben ismert gyűrű vagy pontozott alakú szerkezetek helyett tű alakú elektrondenz képződmények jelennek meg az *Artemia* mitokondriumok mátrixában. Elektron energia-veszteség spektroszkópiás mérésekkel megállapítottuk, hogy az elektrondenz struktúrák gazdagok Ca és P elemekben. Hasonló morfológia figyelhető meg emlősökben, ha az ADP és a Mg^{2+} koncentráció nagyon alacsony. ADP jelenlétében *Artemia* mitokondriumok mátrixában is

megfigyelhetőek a pontszerű elektrondenz képletek. Nem vizsgáltuk, hogy a morfológiai változás oka az ADP okozta csökkent Ca^{2+} felvétel, vagy az ADP közvetlenül hatással van a morfológiára, azonban annak a lehetősége, hogy a tű -szerű csapadékszerkezet fontos az *Artemia* mitokondriumok magas Ca^{2+} felvevőképességéhez.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a primitív ízeltlábú *Artemia franciscana*-ban a Ca^{2+} felvétel alapjaiban hasonló, mint az emlős konszenzus. Ugyanakkor megerősítettük, hogy a felvétel kapacitása nagyobb, hogy valóban nem lehet ebben a fajban tranzíciós pórust kiváltani, továbbá leírtuk az *Artemia* mitokondriumban történő Ca^{2+} felvétel és a csapadék morfológia egyedi vonásait. Mivel úgy gondoltuk ezek a megfigyelések kevésbé fontosak a PTP hiány szempontjából, figyelmünket más eredményeinkre fordítottuk.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a több klasszikus PTP inhibitor, amelyek hatékonyan növelik a Ca^{2+} felvevőképességet emlős mitokondriumok hatástalanok voltak az *Artemia* felvevőképességére. Egy jól ismert ANT gátló, a bongkrekiksav (BKA) egyben a PTP gátolja is. Megfigyeltük, hogy *Artemia* érzéketlen a BKA ANT gátló hatásával szemben: cATR-al ellentétben BKA-val nem sikerült megfordítani az ADP depolarizáló hatását a $\Delta\Psi_m$ kísérletek során valamint a BKA nem befolyásolja az ATP termelést. *Artemia* mitokondriumokon a BKA gátlás kizárólag jelentős pH csökkenéssel és a BKA koncentráció megnövelésével érhető el. Ez a felfedezés azért releváns, mert az ANT a PTP egy ismert szabályozója, de a folyamat számára nélkülözhető. Feltételeztük, hogy a két jelenség; a PTP hiánya és a BKA érzéketlenség valamilyen módon összefüggenek, és a továbbiakban meg kívántuk vizsgálni, hogy a hipotézis helyes -e?

Úgy gondoltuk, hogy ehhez az *Artemia*-hoz közeli rokonságban lévő élőlényeken végzett kísérletek adhatnak választ. Várakozásainkkal ellentétben, egyéb nem extrémofil , só - és édesvízi rákok vizsgálata során azt találtuk, hogy azokban kivétel nélkül hiányzott a PTP. Továbbá a korábbi hipotézis a két jelenséggel kapcsolatban hamisnak bizonyult, mivel nem tapasztaltunk ellenálló képességet BKA-val szemben egyetlen újonnan vizsgált fajban sem. Eredményeink azt sugallják, hogy a PTP jelensége a rákfélék evolúciója során valamiért elveszett. Úgy gondoltuk, hogy a rákfélék összehasonlítása más törzsekkel fényt deríthet a PTP szerkezeti elemeire, valamint bizakodtunk abban is, hogy esetleg új PTP-t nem mutató fajokat is találunk.

Dolgozatomban hat új fajról bizonyítjuk, hogy nem létezik bennük permeabilitási tranzíciós pórus, továbbá hat más törzsekhez tartozó fajban mutatjuk ki a PTP jelenlétét, melyekben a pórust még nem vizsgálták korábban. A PTP jelenlétét különböző elveken alapuló módszerekkel teszteltük, hogy eredményeink megbízhatóak legyenek. A dolgozatban leírtak alapján kijelentjük, hogy a PTP az állatvilágban egy univerzális mechanizmus, ami a rákfélék altörzsében hiányzik.

Annak ellenére, hogy a BKA elleni érzéketlenség nincs kapcsolatban a PTP hiányával, úgy gondoltuk, hogy további kísérletek segíthetnek megtalálni a BKA kötőhelyét. A BKA kötőhely egy ma még ismeretlen, PTP gátlás szempontjából potenciálisan értékes farmakológiai célpont, amit megpróbáltunk primer ANT szekvenciák összehasonlításával felderíteni. Az eddig sikeresen megszekvenált teljes *Artemia* valamint részleges *Crangon crangon* és *Palaemon serratus* szekvenciák alapján valószínűsíthető a kötőhely.

Egy kollaboráció keretein belül megpróbáltuk élesztőben expresszálni az *Artemia* ANT –t, ám sikertelenek voltunk a BKA érzéketlenség bizonyításában ezen a modellen. Bár ezek az eredmények nem biztatóak, bizonyos következtetések levonhatóak belőlük: az *Artemia* BKA érzéketlenségének lehet például az oka, hogy egy másik protein entitás hiányzik a mitokondriumukból, amely egyébként szükséges az érzékenységhez, vagy olyan fehérje lehet jelen, amely elfedi a kötőhelyet. Az érzéketlenséget az *Artemia* mitokondrium egyedülálló fizikai tulajdonságai is okozhatják, például különbségek a membrán jellemzőiben.

A tézishez kapcsolódó publikációk

1.) Konrad, C., G. Kiss, B. Torocsik, V. Adam-Vizi, and C. Chinopoulos, *Absence of Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition but presence of bongkrekate-sensitive nucleotide exchange in C. crangon and P. serratus*. PloS one, 2012. **7**(6): p. e39839.

2.) Konrad, C., G. Kiss, B. Torocsik, J.L. Labar, A.A. Gerencser, M. Mandi, V. Adam-Vizi, and C. Chinopoulos, *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 Ca²⁺ uptake and sequestration*. The FEBS journal, 2011. **278**(5): p. 822-36.

A t zist l f ggetlen publik ci k

Kiss, G., C. Konrad, I. Pour-Ghaz, J.J. Mansour, B. Nemeth, A.A. Starkov, V. Adam-Vizi, and C. Chinopoulos, *Mitochondrial diaphorases as NAD(+) donors to segments of the citric acid cycle that support substrate-level phosphorylation yielding ATP during respiratory inhibition*. *Faseb J*, 2014. 28(4): p. 1682-97.

Kiss, G., C. Konrad, J. Doczi, A.A. Starkov, H. Kawamata, G. Manfredi, S.F. Zhang, G.E. Gibson, M.F. Beal, V. Adam-Vizi, and C. Chinopoulos, *The negative impact of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex deficiency on matrix substrate-level phosphorylation*. *Faseb J*, 2013. 27(6): p. 2392-406.

Doczi, J., L. Turiak, S. Vajda, M. Mandi, B. Torocsik, A.A. Gerencser, G. Kiss, C. Konrad, V. Adam-Vizi, and C. Chinopoulos, *Complex contribution of cyclophilin D to Ca²⁺-induced permeability transition in brain mitochondria, with relation to the bioenergetic state*. *J Biol Chem*, 2011. 286(8): p. 6345-53.

Chinopoulos, C., C. Konrad, G. Kiss, E. Metelkin, B. Torocsik, S.F. Zhang, and A.A. Starkov, *Modulation of F₀F₁-ATP synthase activity by cyclophilin D regulates matrix adenine nucleotide levels*. *Febs J*, 2011. 278(7): p. 1112-25.

Chinopoulos, C., A.A. Gerencser, M. Mandi, K. Mathe, B. Torocsik, J. Doczi, L. Turiak, G. Kiss, C. Konrad, S. Vajda, V. Vereczki, R.J. Oh, and V. Adam-Vizi, *Forward operation of adenine nucleotide translocase during F₀F₁-ATPase reversal: critical role of matrix substrate-level phosphorylation*. *Faseb J*, 2010. 24(7): p. 2405-16.

Vajda, S., M. Mandi, C. Konrad, G. Kiss, A. Ambrus, V. Adam-Vizi, and C. Chinopoulos, *A re-evaluation of the role of matrix acidification in uncoupler-induced Ca²⁺ release from mitochondria*. *Febs J*, 2009. 276(10): p. 2713-24.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőm, Dr. Christos Chinopoulos felé szeretném kifejezni hálámat.

Christost egy energetikus, nyitott, lelkes és szkeptikus személyiség, aki az élettudományok széles területének irodalmáról és a technikáiról mély ismeretekkel rendelkezik. Kiváló tudósnak és mentornak tartom és hálás vagyok azért, hogy alatta dolgozhattam az Orvosi Biokémiai Intézetben.

Szeretnék köszönetet mondani Kiss Gergelynek is, akivel egyetemi éveink alatt kötöttünk barátságot. Mindketten érdeklődtünk a tudomány iránt, végül ő győzött meg arról, hogy együtt csatlakozzunk a laborhoz. Gergely precíz, kreatív és igen hamar képes új ismereteket befogadni, így iramot tartani vele nem könnyű feladat. Segítsége és ötletei nagyon értékesek voltak a munkám számára.

Hálás vagyok továbbá Professzor Ádám Veronika felé, aki lehetővé tette, hogy az Orvosi Biokémiai Intézetben tevékenykedhessek, továbbá az intézet többi dolgozójának, különös tekintettel Professzor Tretter Lászlóra és munkacsoportjára a segítő gondolatokért és Dr. Töröcsik Beátára, aki a tézisben szereplő molekuláris biológiai munkát végezte.

Végül köszönöm szüleimnek, akik szeretetben felneveltek és barátaimnak a PhD tanulmányaim alatti támogatásért.