

# **A kalcium hatása az izolált mitokondriumok reaktív oxigénszármazék képzésére**

Doktori értekezés

**Dr. Komáromy Zsófia**

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezetők:

Dr. Ádám Veronika tanszékvezető egyetemi tanár, a MTA rendes tagja

Dr. Tretter László egyetemi tanár, a MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Sümegei Balázs tanszékvezető egyetemi tanár, a MTA doktora

Dr. Kardon Tamás egyetemi adjunktus, PhD

A szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Mandl József tanszékvezető egyetemi tanár, a MTA rendes tagja

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Zelles Tibor kutatócsoport-vezető, PhD

Dr. Gallyas Ferenc egyetemi tanár, PhD

Budapest, 2012.

# 1. Tartalomjegyzék

2.	Rövidítések jegyzéke.....	4
3.	Bevezetés.....	8
3.1.	A kalcium és az oxidatív stressz szerepe a neuronális károsodásban.....	8
3.2.	A mitokondriális ROS metabolizmus.....	11
3.2.1.	A reaktív oxigénszármazék fogalma.....	11
3.2.2.	A mitokondrium ROS képzése.....	12
3.2.3.	A mitokondriális ROS elimináló mechanizmusok.....	23
3.2.4.	Oxidatív stressz okozta károsodás a mitokondriumban.....	28
3.2.5.	A mitokondriális ROS termelés detektálása fluoreszcens módszerrel.....	31
3.3.	A mitokondriális kalcium homeosztázis.....	37
3.4.	A mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus.....	41
4.	Célkitűzések.....	48
5.	Módszerek.....	50
5.1.	Mitokondrium preparálás.....	50
5.2.	Mérési médium.....	51
5.3.	A mitokondriális H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> termelés mérése.....	51
5.4.	NAD(P)H+H <sup>+</sup> autofluoreszcencia mérés.....	52
5.5.	A mitokondriális NAD <sup>+</sup> + NADH+H <sup>+</sup> mennyiség meghatározása.....	52
5.6.	Membránpotenciál meghatározás.....	52
5.7.	A mitokondriális duzzadás mérése.....	53
5.8.	A mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus meghatározása kalcein fluoreszcenciával.....	54

5.9.	A mitokondriális permeabilitási pórus meghatározása transzmissziós elektron mikroszkóppal.....	54
5.10.	A mitokondriális kalcium felvétel.....	55
5.11.	Statisztika.....	55
5.12.	Vegyszerek.....	55
6.	Eredmények.....	56
6.1.	A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a mitokondriális $\text{H}_2\text{O}_2$ termelésre adenin nukleotid mentes médiumban.....	56
6.2.	A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a mitokondriális $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$ szintre.....	58
6.3.	A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a membránpotenciálra, a fényszórásra és a mPTP nyílásra.....	60
6.4.	A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a mitokondriális $\text{H}_2\text{O}_2$ termelésre ADP jelenlétében.....	65
6.5.	A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a mitokondriális $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$ autofluoreszcenciára ADP jelenlétében.....	67
6.6.	A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a membránpotenciálra és a duzzadásra ADP jelenlétében.....	68
6.7.	A mitokondriális $\text{Ca}^{2+}$ felvétel ADP jelenlétében.....	71
6.8.	A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a mitokondriális $\text{H}_2\text{O}_2$ termelésre magas $\Delta\Psi_m$ esetén.....	73
6.9.	A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a $\text{H}_2\text{O}_2$ termelésre, a $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$ autofluoreszcenciára, a membránpotenciálra és a fényszórásra szukcináttal energetizált mitokondriumokban adenin nukleotid mentes és ADP-t tartalmazó médiumban.....	75
7.	Diszkusszió.....	80
7.1.	A kalcium ROS termelésre gyakorolt hatásának membránpotenciál-függése.	81
7.2.	A légzési szubsztrátok befolyása a kalcium ROS termelésre gyakorolt hatására.....	85
7.3.	A kalcium hatása a ROS képzésre mPTP nyílás esetén.....	88
7.4.	A módszer kritikája.....	90
8.	Következtetések.....	92
9.	Összefoglalás.....	93

10.	Summary.....	95
11.	Köszönetnyilvánítás .....	97
12.	Irodalomjegyzék .....	98
13.	Saját publikációk jegyzéke .....	143

## 2. Rövidítések jegyzéke

$\alpha$ -GPDH: alfa-glicerofoszfát-dehidrogenáz

AIF: apoptózis indukáló faktor

$\alpha$ -KGDH: alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz

ALS: amiotrófiás laterálszklerózis

ANT: adenin-nukleotid transzlokátor

Apaf 1: apoptózis proteáz aktiváló faktor

BSA: bovine serum albumin (marha szérum albumin)

CM-H<sub>2</sub>DCFDA: 5,6-kloro-metil-2,7-diklorodihidrofluoreszcein-diacetát

cpYFP: circularily permuted yellow fluorescent protein (cirkulárisan átrendezett sárga fluoreszcens fehérje)

CsA: ciklosporin-A

CuZnSOD: réz-cink szuperoxid-dizmutáz

CypD: ciklofilin D

Cyt.c: citokróóm c

DCD: delayed calcium deregulation (késői kálcium dereguláció)

DCF: 2,7-diklorofluoreszcein

DHODH: dihidroorotát-dehidrogenáz

$\Delta p$ : protonmotoros erő

$\Delta\Psi_m$ : mitokondriális membránpotenciál

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

EGTA: etilén-glikol-tetraecetsav

ER: endoplazmatikus retikulum

ETF: elektrontranszfer-flavoprotein

ETF-QOR: elektrontranszfer-flavoprotein-kinon-oxidoreduktáz

FCCP: karbonilcianid-p-trifluorometoxifenilhidrazon

Gpx: glutation-peroxidáz

Gpx 4: glutation-peroxidáz 4, foszfolipid-hidroperoxid-glutation-peroxidáz

GR: glutation-reduktáz

Grx: glutaredoxin

GSH: redukált glutation

GSSG: oxidált glutation

GST: glutation-S-transzferáz

H<sub>2</sub>DCF: 2,7-diklorodihidrofluoreszcein

H<sub>2</sub>DCFDA: 2,7-diklorodihidrofluoreszcein-diacetát

H<sub>2</sub>DFFDA: 2,7-difluorodihidrofluoreszcein-diacetát

HE: hidroetidin

HEDTA: hidroxietil-etiléndiamin-triecetsav

HEPES: 4-(2-hydroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav

HRP: horseradish peroxidase (tormaperoxidáz)

IAP: inhibitor of apoptosis (apoptózis inhibitor)

ICDH: izocitrát-dehidrogenáz

IP<sub>3</sub>: inozitol-trifoszfát

ISP: iron-sulfur protein (Rieske-protein)

kalcein-AM: kalcein acetoxi-metil-észter

KoA: koenzim-A

MAO: monoamin-oxidáz

MDH: malát-dehidrogenáz

MnSOD: mangán-szuperoxid-dizmutáz

MPP<sup>+</sup>: 1-metil-4-fenilpiridínium

mPTP: mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium-bromid

NMDA: N-metil-D-aszpartát

PDH: piruvát-dehidrogenáz

PES: fenazin etosulfát

P<sub>i</sub>: inorganikus foszfát

Prx: peroxiredoxin

Q: koenzim Q

Q<sup>•</sup>: szemikinon gyök

QH<sub>2</sub>: ubikinol

R: alkil csoport

RaM: rapid uptake mode (gyors kalciumfelvételi mód)

RCR: respiratory controll ratio (respirációs kontroll hányados)

RET: reverz elektron transzport

roGFP: redox-sensitive green fluorescent protein (redox-érzékeny zöld fluoreszcens  
protein)

ROS: reaktív oxigénszármazék

Ru 360: Ruthenium 360

SDH: szukcinát-dehidrogenáz

SOD: szuperoxid-dizmutáz

TMRM: tetrametil-rodamin-metil-észter

TPP<sup>+</sup>: tetrafenil-foszfónium kation

Tris-HCl: trisz(hidroximetil)-aminometán hidroklorid

Trx: tioredoxin

TrxR: tioredoxin-reduktáz

VDAC: voltage dependent anion channel (feszültségfüggő anioncsatorna)

V/V%: térfogat százalék



## 3. Bevezetés

### 3.1. A kalcium és az oxidatív stressz szerepe a neuronális károsodásban

A glutamát excitotoxicitás számos akut és krónikus neurológiai betegség kialakulásában a patomechanizmus meghatározó eleme. A glutamát excitotoxicitás jelentős mértékben hozzájárul az akut neuronális károsodáshoz agyi iszkémia- reperfüzió esetén, szerepe emellett felmerül a krónikus neurodegeneratív betegségek: az Alzheimer-kór, a Parkinson-kór, az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) és a Huntington-kór patomechanizmusában is (Beal, 1992b; Blandini et al, 1997; Henneberry, 1997).

Glutamát excitotoxicitás során a központi idegrendszer glutamát receptorainak tartós stimulációja neuronális károsodáshoz vezet. Akut idegrendszeri kórképekben az iszkémia hatására kialakuló szöveti oxigén és glükóz hiány csökkent celluláris energiatermelést eredményez, ami a neuronok depolarizációja következtében fokozott neurotranszmitter felszabadulást, csökkent preszinaptikus glutamát felvételt és az NMDA típusú glutamát receptorok aktivációját okozza. A glutamát excitotoxicitás kialakulása a krónikus lefolyású neurodegeneratív betegségekben a csökkenő celluláris ATP termelő kapacitás miatt létrejövő tartós, részleges neuronális depolarizációval és a glutamát receptorok diszfunkciójával magyarázható (Albin & Greenamyre, 1992; Beal, 1992a; Beal, 1992b; Novelli et al, 1988; Zeevalk & Nicklas, 1990). Glutamát excitotoxicitásban a glutamát receptorok kóros stimulációja az intracelluláris kalcium koncentráció megemelkedéséhez vezet. Kísérleti modellben a kalcium koncentráció emelkedés két fázisú: a glutamát expozíció után a kezdeti emelkedést követően a citoszolikus kalcium koncentráció a kiindulási értékre csökken, majd különböző hosszúságú látencia idő elteltével tartósan megemelkedik. Az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedés második fázisa az ún. késői kalcium dereguláció (DCD: delayed calcium deregulation), ami a neuronok irreverzibilis károsodását jelzi (Randall & Thayer, 1992). A glutamát excitotoxicitás során bekövetkező neuronális károsodás

folyamatában a kalcium koncentráció emelkedés mellett a patomechanizmus másik meghatározó tényezője a fokozott celluláris reaktív oxigénszármazék (ROS) képzés. Lafon-Cazal és munkatársai elektron paramágneses rezonanciával glutamát terhelést követően fokozott neuronális szuperoxid anion képzést detektáltak (Lafon-Cazal et al, 1993). A glutamát expozíció hatására bekövetkező celluláris ROS termelés fokozódás fluoreszcens módszerrel is kimutatható neuronális sejt kultúrán (Bindokas et al, 1996; Dugan et al, 1995; Kahlert et al, 2005; Reynolds & Hastings, 1995; Sengpiel et al, 1998; Vesce et al, 2004). A reaktív oxigénszármazékok szintje a késői kalcium dereguláció kialakulását követően emelkedik meg a citoplazmában (Nicholls, 2008; Vesce et al, 2004). A glutamát receptorok patológiás ingerlése folytán kialakuló fokozott celluláris ROS termelés különböző forrásokból eredhet (Coyle & Puttfarcken, 1993). Az NMDA típusú glutamát receptor aktiválása a receptor ionsatornán beáramló kalcium közvetítésével a foszfolipáz A<sub>2</sub> enzim aktiválásához vezet, az enzim aktivitása következtében felszabaduló arachidonsav további metabolizmusa során szuperoxid aniont képez (Dumuis et al, 1988; Lafon-Cazal et al, 1993; Lazarewicz et al, 1988). A kalcium hatására aktiválódó nitrogén-monoxid szintáz nitrogén-monoxidot termel, ami szuperoxid anionnal reagálva peroxinitritet képez, ez utóbbi metabolit hidroxilgyökre bomlik. A nitrogén-monoxid szintáz aktivitása ugyancsak fokozódik az NMDA receptorok ingerlését követően (Dawson et al, 1992) és oxigén-glükóz megvonás esetén (Abramov et al, 2007). Mindezek mellett iszkémiában a kalcium hatására xantin-oxidázzá alakuló xantin-dehidrogenáz szuperoxid aniont generál (McCord, 1985). Reoxigenációkor a neuronokon is megtalálható NADPH –oxidáz kalcium hatására szintén szuperoxid aniont termel (Abramov et al, 2007). A glutamát excitotoxicitás esetén megfigyelhető fokozott celluláris ROS képzésben a mitokondriumok szerepe is felmerül. A mitokondriumok hozzájárulását a sejt reaktív oxigénszármazék termeléséhez azok a neuronális sejt kultúrán végzett vizsgálatok mutatják, melyekben a glutamát expozíciót követő ROS képzés mértéke mitokondriális légzési komplex gátlókkal és szétkapcsolószerekkel befolyásolható (Abramov et al, 2007; Bindokas et al, 1996; Dugan et al, 1995; Reynolds & Hastings, 1995; Sengpiel et al, 1998; Vesce et al, 2004).

Krónikus neurodegeneratív betegségekben a mitokondriális eredetű oxidatív stressz a glutamát excitotoxicitástól függetlenül önmagában is patofiziológiai tényező lehet (Beal, 2005; Fiskum et al, 1999).

Parkinson-kór kísérletes modellben az I. mitokondriális légzési komplex 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinnel (MPTP) történő gátlásával indukálható. A MPTP-t a monoamin-oxidáz B enzim aktív metabolittá, 1-metil-4-fenilpiridíniummá (MPP<sup>+</sup>) alakítja, ami a dopaminerg neuronok mitokondriumaiban akkumulálódik és az I. komplex gátlását okozza (Bloem et al, 1990). Humán posztmortem vizsgálatok kimutatták, hogy Parkinson-kórban a substantia nigra dopaminerg neuronjainak mitokondriumaiban az I. légzési komplex működése 20-40%-kal csökkent (Schapira et al, 1990). Transzgénikus egerekben, melyek fokozott mértékben expresszálnak CuZn szuperoxid-dizmutáz (CuZnSOS) enzimet, a MPP<sup>+</sup> nem okoz károsodást a dopaminerg neuronokban (Przedborski et al, 1992), ez a kísérlet az oxidatív stressz szerepét mutatja a betegség patomechanizmusában. A MPP<sup>+</sup> a citrátköri  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz ( $\alpha$ -KGDH) enzimet is gátolja, Parkinson kórban a nigrostriatális neuronok  $\alpha$ -KGDH enzime csökkent immunreaktivitást mutatott a kontrollhoz képest (Mizuno et al, 1994). Parkinson-kórban a substantia nigra dopaminerg neuronjainak szelektív károsodása a dopamint katabolizáló, a mitokondriális külső membránon elhelyezkedő monoamin-oxidáz (MAO) enzim aktivitásával is összefüggésbe hozható: az enzim katalízis közben hidrogén-peroxidot termel. A dopamint bontó monoamin-oxidáz B aktivitása a korrallal fokozódik (Fowler et al, 1980; Saura et al, 1994).

Alzheimer-kórban a mitokondriális légzési lánc IV. komplexének aktivitása alacsonyabb az egészséges mintához viszonyítva (Parker et al, 1994). Az  $\alpha$ -KGDH és a piruvát-dehidrogenáz (PDH) enzim ugyancsak csökkent aktivitású (Gibson et al, 1998). Az Alzheimer-kór patogenezisében a peroxiredoxin 3 (Prx 3) szerepe is felmerül: posztmortem mintavételből származó humán frontális kortexben és kisagyban a Prx 3 mennyisége alacsonyabb volt Alzheimer-kór esetén az egészségeshez képest (Krapfenbauer et al, 2003). Emellett az Alzheimer-kóros betegek posztmortem mintáiban a mitokondriális DNS-ben az oxidatív károsodás mértéke többszöröse a kontrollnak (Mecocci et al, 1994).

Az amiotrófiás laterálszklerózis familiáris típusának egy része a citoszolban és a mitokondriális intermembrán térben található CuZn szuperoxid-dizmutáz mutációját okozza (Rosen, 1993).

Huntington-kórban az elektron transzport lánc II., III. és IV. komplexe, valamint a citrátköri akonitáz és az  $\alpha$ -KGDH enzim is csökkent aktivitású (Browne et al, 1997; Halliwell, 2006).

A fenti neurodegeneratív betegségekben a légzési komplexek gátlása, a ROS termelő enzimek aktivitása és a csökkent ROS detoxifikáció önmagában is fokozott mitokondriális ROS termeléshez vezethet. Ugyanakkor az oxidatív foszforiláció és a citrátkör enzimeinek alacsony aktivitása az energiatermelés csökkenését vonja maga után, ami a neuronális plazmamembrán depolarizációján keresztül a glutamáthoz kötött patofiziológiai folyamatok kialakulásának kedvez.

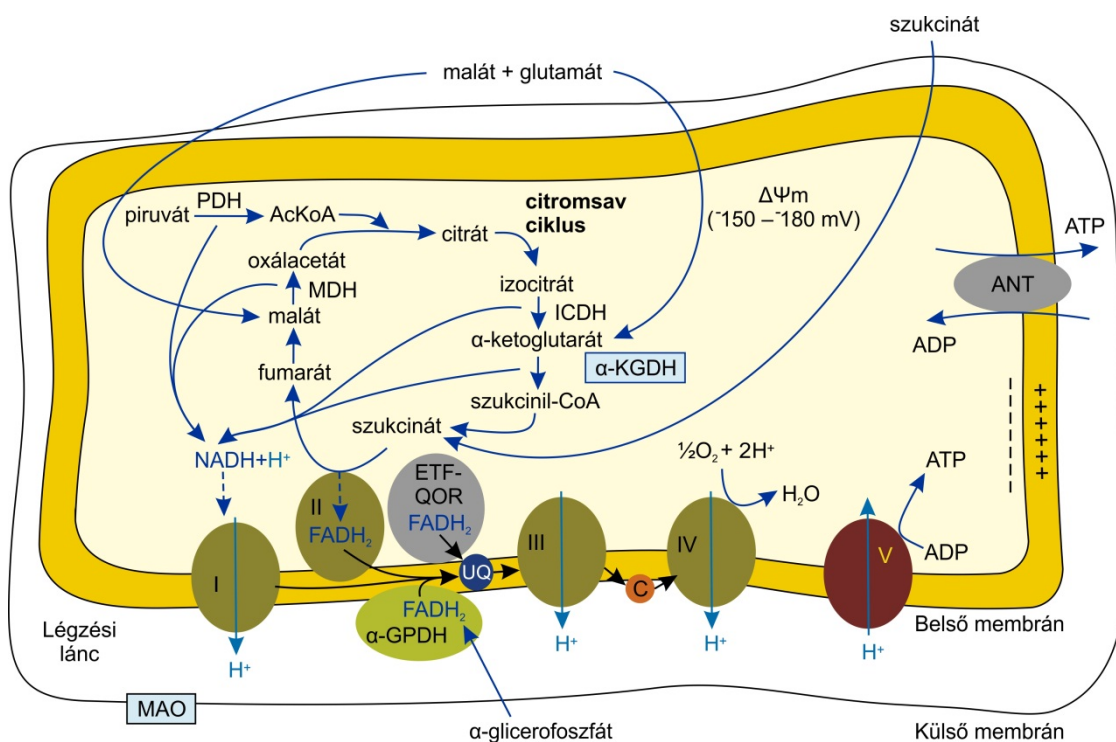
## **3.2. A mitokondriális ROS metabolizmus**

### **3.2.1. A reaktív oxigénszármazék fogalma**

A mitokondriális reaktív oxigén származék metabolizmus tárgyalása előtt a reaktív oxigén származék definíciója tisztázandó. A reaktív oxigénszármazékok közé soroljuk az oxigéntartalmú szabadgyököket, valamint a nem szabadgyök oxigéntartalmú vegyületeket, amelyek fokozott reakciókészséggel rendelkeznek (Halliwell & Gutteridge, 1999, pp. 22-27). A szabadgyök olyan elem vagy vegyület, amely egy vagy több párosítatlan elektronnal rendelkezik. Az *in vivo* megtalálható oxigén tartalmú szabadgyökök közé tartozik a szuperoxid anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), a hidroxilgyök ( $OH^{\cdot}$ ), a peroxilgyök ( $RO_2^{\cdot}$ ), az alkoxilgyök ( $RO^{\cdot}$ ), a hidroperoxilgyök ( $HO_2^{\cdot}$ ) és a definíció szerint az oxigén molekula is ( $O_2$ ), amely két azonos spinű párosítatlan elektront is tartalmaz. Reaktív oxigénszármazék még a fentebb felsorolt szabadgyökökön kívül a hidrogénperoxid ( $H_2O_2$ ).

### 3.2.2. A mitokondrium ROS képzése

A mitokondrium ROS képzése szorosan kapcsolt az organelum metabolikus funkcióihoz : a citrátkörben történő oxidációhoz, ill. az ATP szintézishez (1. ábra). Az ATP szintézist a mitokondrium belső membránjában elhelyezkedő  $F_0F_1$  ATP-áz végzi a mitokondriális protonmotoros erő ( $\Delta p$ ) terhére (Mitchell, 1961). A protonmotoros erőt a légzési láncban elektronokat szállító légzési komplexek redox potenciál különbsége generálja: az elektronok transzportja során az egyes komplexek redox potenciál különbsége protonok kipumpálását teszi lehetővé az I., III. és IV. komplexen keresztül a mátrixból az intermembrán térbe. A millivoltban kifejezett protonmotoros erőnek két komponense van: a mitokondriális membránpotenciál ( $\Delta\Psi_m$ ), melynek becült értéke  $\sim 150 - \sim 180$  mV, valamint a protonmotoros erő kialakításához lényegesen kisebb mértékben hozzájáruló pH különbség ( $\Delta$  pH) a mitokondrium belső membránjának két oldala között.



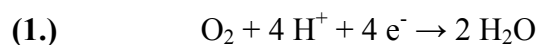
1. ábra

### A Szent-Györgyi-Krebs-ciklus és a mitokondriális oxidatív foszforiláció

Az ábra magyarázatát lásd a szövegben. Rövidítések: PDH: piruvát-dehidrogenáz; ICDH: izocitrát-dehidrogenáz;  $\alpha$ -KGDH:  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz; SDH:

*szukcinát-dehidrogenáz; MDH: malát-dehidrogenáz;  $\alpha$ -GPDH:  $\alpha$ -glicerofoszfát-dehidrogenáz; ETF-QOR: elektron-transzfer-flavoprotein-kinon-oxidoreduktáz; AcKoA: acetil-koenzim A; MAO: monoamin-oxidáz; ANT: adenin-nukleotid transzlokátor; I,II,III,IV: I-IV. légzési komplexek; V:  $F_0F_1$  ATP-áz; UQ: ubikinon; c: citokróm c; ANT: adenin-nukleotid-transzlokáz;  $\Delta\Psi_m$ : mitokondriális membrán potenciál /(*Adam-Vizi & Chinopoulos, 2006*) alapján/*

A légzési láncot redukáló ekvivalensek táplálják elektronokkal. Az I. komplex elektron donorja a  $\text{NADH}+\text{H}^+$ , melynek fő mitokondriális forrása a piruvát-dehidrogenáz enzimkomplex ill. a citromsav-ciklus dehidrogenázai: az izocitrát-dehidrogenáz (ICDH), az  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz és a malát-dehidrogenáz (MDH). Izolált mitokondriumok  $\text{NADH}+\text{H}^+$  -t generáló szubsztrátjai a glutamát, a malát és a piruvát. Az ubikinonra az I. komplexről származó elektronok mellett a következő, prosztetikus csoportként  $\text{FADH}_2$ -t tartalmazó enzimekről konvergálnak elektronok: szukcinát-dehidrogenáz (SDH), a belső membrán külső oldalán található  $\alpha$ -glicerofoszfát-dehidrogenáz ( $\alpha$ -GPDH), ill. a belső membrán mátrix felőli részén elhelyezkedő elektron-transzfer-flavoprotein (ETF), amely a zsírsavak  $\beta$ -oxidációjából közvetíti az elektronokat a légzési lánchoz. Izolált mitokondriumban  $\text{FADH}_2$ -t generáló respirációs szubsztrát a szukcinát és az  $\alpha$ -glicerofoszfát. A mitokondriális légzési láncban a terminális elektron akceptor az  $\text{O}_2$ , mely a négy elektron átvitelét katalizáló IV. respirációs komplexen redukálódik vízzé (1. egyenlet).



Az  $\text{O}_2$  részleges, egy elektronnal történő redukciója azonban szuperoxid anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) keletkezéséhez vezet (2. egyenlet).



A szuperoxid képződésének standard redox potenciálja  $-160$  mV (Wood 1987). Tekintetbe véve a mitokondriális oxido-reduktázok standard redox potenciálját (Wilson et al, 1974), az elektrontranszport láncban található, egy elektron transzportját lehetővé tevő vas-kén centrumokat, a parciálisan redukálható flavin-mononukleotidot és

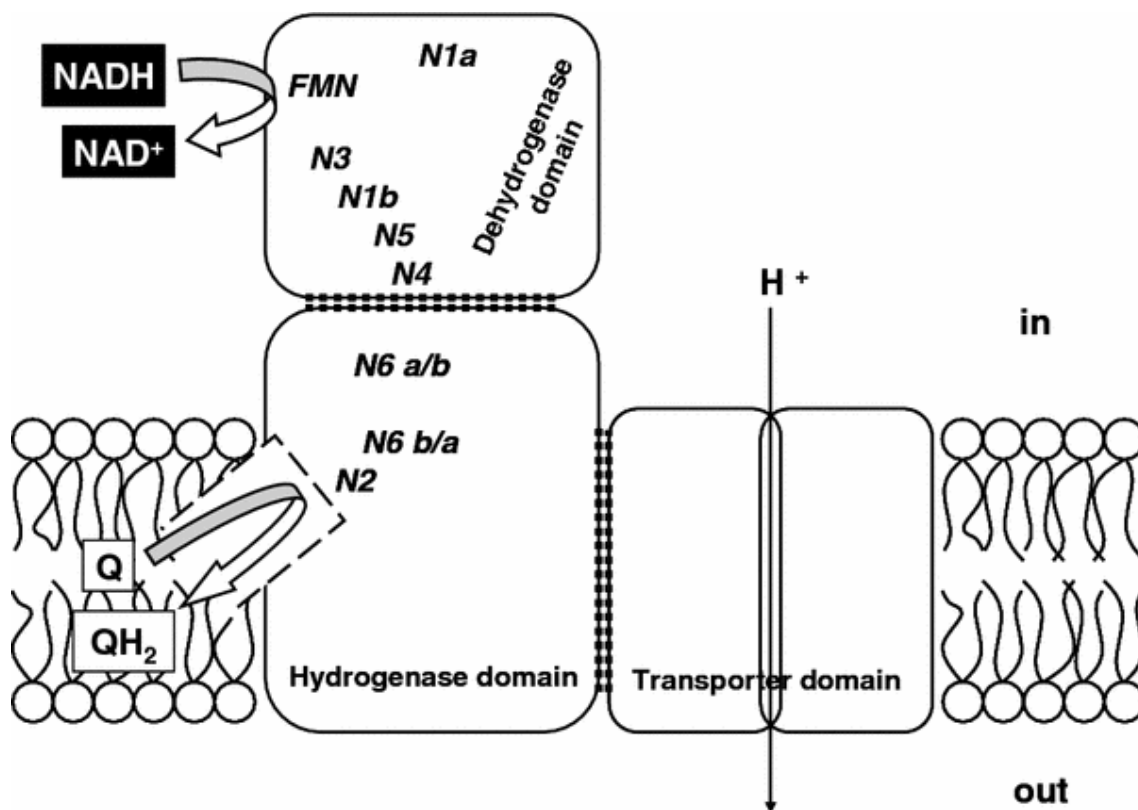
ubikinont, a szuperoxid képződése a mitokondriális légzési láncban termodinamikailag kedvező (Murphy, 2009).

A mitokondrium hidrogén-peroxid termelését már az 1960-as években megfigyelték (Jensen, 1966). Ezt követően az 1970-es években végzett, a mitokondrium ROS képzését vizsgáló kezdeti kísérletek meghatározták, hogy a mitokondriumban termelődő hidrogén-peroxid prekuzora a szuperoxid anion (Boveris & Cadenas, 1975; Loschen et al, 1974; Sorgato et al, 1974). A mitokondriális elektrontranszport lánc ROS képző mechanizmusát először szívizomból izolált mitokondriumokon vizsgálták, és szuperoxid forrásként a III. (Boveris et al, 1976; Cadenas et al, 1977; Turrens et al, 1985) és az I. légzési komplexet (Cadenas et al, 1977; Takeshige & Minakami, 1979; Turrens & Boveris, 1980) jelölték meg. A főként izolált mitokondriumokon végzett további kísérletek egyéb, összesen 11 mitokondriális ROS képző helyet azonosítottak (Adam-Vizi, 2005; Andreyev et al, 2005; Murphy, 2009).

A mitokondriális I. légzési komplex szuperoxid képző helye pontosan nem ismert (2. ábra). Intakt izolált mitokondriumon, szubmitokondriális partikulán – szubmitokondriális partikulák: mitokondriumok szonikációjával nyert vezikulák, melyeket fordított orientációjú belső membrán fragmensek határolnak (Tzagoloff, 1982, p. 14) – és izolált I. komplexen végzett vizsgálatok a következő potenciális szuperoxid képző helyeket feltételezik: az I. komplex N1a (Kushnareva et al, 2002), N2 (Genova et al, 2001) vas-kén centruma, ill. a vas-kén centrumok bármelyike (Herrero & Barja, 2000), az I. komplex flavin komponense (Kudin et al, 2004; Kussmaul & Hirst, 2006; Liu et al, 2002), az enzimhez kötődő, parciálisan redukált NAD<sup>•</sup> gyök (Krishnamoorthy & Hinkle, 1988), Kang és munkatársai pedig egyszerre két szuperoxid képző helyet vetnek fel (Kang et al, 1983). Az I. komplex ROS képző helye az elektron transzfer irányától függően az I. komplex flavin komponense, ill. az I. komplex vas-kén centrumai lehetnek (Gyulkhandanyan & Pennefather, 2004) kísérletei szerint. Az I. komplex a szuperoxidot a mitokondriális belső membrán mátrix felőli oldalán képi (Muller et al, 2004; St-Pierre et al, 2002; Turrens, 2003).

A mitokondriális I. légzési komplex háromféle módon képes ROS-t termelni: (1.) NADH+H<sup>+</sup>-t generáló szubsztrátok jelenlétében, (2.) I. légzési komplex gátlók hatására, ill. az ún. reverz elektrontranszport (RET) mechanizmusával (3.).

(1.) A mitokondriális légzési láncot  $\text{NADH}+\text{H}^+$ -t generáló szubsztrátokkal táplálva az I. komplex  $\text{H}_2\text{O}_2$  képzése meglehetősen alacsony: agy mitokondriumban 150-250 pmol/min/mg (Komary et al, 2008; Kwong & Sohal, 1998). Az I. komplex ROS-lépzése ilyen körülmények között függ a mátrix  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  arányától, ill. a mitokondriális membránpotenciáltól. Az I. komplexen történő ROS-képzést a magas mitokondriális  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  arány serkenti (Starkov & Fiskum, 2003). A magas membránpotenciál ugyancsak nagyobb mértékű ROS-képzést eredményez: a  $\Delta\Psi_m$  20%-os csökkentése a ROS termelést 60%-kal redukálja (Starkov & Fiskum, 2003). Szétkapcsoló szerek és a depolarizáló hatású ADP jelenlétében ennek megfelelően alacsonyabb ROS képzés figyelhető meg.



2. ábra

### Az I. légzési komplex sematikus ábrája

Az I. légzési komplex dehidrogenáz doménje oxidálja a  $\text{NADH}+\text{H}^+$ -t, flavin mononukleotidot (FMN) és vas-kén centrumokat (N1a, N1b, N3, N4, N5) tartalmaz. A



*hidrogenáz doménezen redukálódik a Q koenzim (Q, QH<sub>2</sub>), ezen a doménezen helyezkedik el az N6a, N6b és az N2 vas-kén centrum. A transzporter domén hidrogén protonokat (H<sup>+</sup>) transzlokál. (Fato et al, 2008)*

(2.) A rotenon, az I légzési komplex gátlószere az ubikinon egy elektronnal történő redukcióját gátolja ubiszemikinonná az I. komplex N2 vas-kén centrumán (Degli Esposti, 1998). A rotenon a NADH+H<sup>+</sup>-t képző szubsztrátokkal energetizált mitokondriumok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelését akár nyolcszorosára is növelheti (Kwong & Sohal, 1998). Az I. légzési komplex parciális, akár 10- 15%-os gátlása is szignifikáns ROS termelés fokozódást eredményez (Sipos et al, 2003). Az I. komplex gátlása egyben a NADH+H<sup>+</sup>/ NAD<sup>+</sup> arány nagymértékű megemelkedésével jár. A rotenon indukálta ROS képzés nem membránpotenciál függő: a rotenon 100%-os komplexgátlás esetén teljes depolarizációt és légzésgátlást okoz (Votyakova & Reynolds, 2001). Az I. komplex H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelésének pH optimuma szubmitokondriális partikulán, NADH+H<sup>+</sup>-t képző szubsztrátokkal, rotenon jelenlétében és anélkül pH 8.5, ill. pH 9 (Takeshige & Minakami, 1979).

(3.) A FADH<sub>2</sub>-t képző respirációs szubsztrátokról az elektronok nagy része a III., ill. a IV. komplexen keresztül az oxigénre mint végső elektronakceptorra kerül, az elektronok egy kisebb hányada azonban az I. komplexre áramlik és a NAD<sup>+</sup>-ot redukálja. Ez a fordított irányú elektronáramlás az ún. reverz elektron transzport (Hinkle et al, 1967). A reverz elektron transzport nagy mértékű ROS képzéssel jár, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keletkezés mértéke meghaladja a NADH+H<sup>+</sup>-t generáló szubsztrátok rotenon jelenlétében történő ROS képzését is (Komary et al, 2008; Votyakova & Reynolds, 2001). A RET-on keresztüli ROS képzés rotenonnal gátolható. Izolált mitokondriumon I. és II. légzési komplex szubsztrátokkal és az I. komplex gátló rotenonnal végzett kísérletek azt mutatják, hogy az I. komplex szuperoxid képző helye a rotenon kötő hely előtt található, hiszen a reverz elektron transzporttal generált ROS képzést a rotenon gátolja, az I. komplex szubsztrátok jelenlétében történő alacsony ROS termelést ugyanakkor a rotenon jelentősen fokozza (Votyakova & Reynolds, 2001). A szukcinát légzési szubsztrát a RET-on keresztül magasabb NAD(P)H+H<sup>+</sup> szintet generál, mint a NADH+H<sup>+</sup>-t képző szubsztrátok: a glutamát és a malát; a magas NADH+H<sup>+</sup>/ NAD<sup>+</sup> arány RET esetén

hozzájárulhat a magas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képzéshez (Kushnareva et al, 2002). A termodinamikailag kedvezőtlen reverz elektron transzportoz az energiát az előre irányuló elektronáramlás során keletkező protonmotoros erő szolgáltatja. A reverz elektron transzport ROS termelése erősen membránpotenciál függő, a RET ROS képzése nagyobb mértékű membránpotenciál függést mutat, mint a NADH+H<sup>+</sup>-ról eredő, előre irányuló elektron áramlásé: a  $\Delta\Psi_m$  10%-kal való csökkentése a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés 90%-os redukcióját eredményezi (Korshunov et al, 1997). Ez azt jelenti, hogy szukcinát légzési szubsztrát jelenlétében csak nagyon magas membránpotenciál esetén történik jelentős ROS képzés; a membránpotenciál csökkenése 180 mV-ról 170 mV-ra megszünteti a ROS termelés membránpotenciál függését (Tretter et al, 2007a). A reverz elektron transzportot csökkentik a komplex gátlók, a depolarizáló hatású ADP és a szétkapcsoló szerek (Korshunov et al, 1997). A RET-on keresztül történő ROS képzés pH függést is mutat, a mátrix savasodása csökkenti a ROS képzést. A RET-on keresztül történő ROS termelés háromszor annyira szenzitív a  $\Delta pH$ -ra, mint a membránpotenciál változásra (Lambert & Brand, 2004). A szukcinát RET-on keresztül történő ROS képzésének szerepe *in vivo* körülmények között kérdéses. A szukcinát ROS képzése a RET-on keresztül erős szukcinát koncentráció függést is mutat (Hansford et al, 1997). Az a szukcinát koncentráció, ami kísérleti körülmények között izolált mitokondriumokon RET-on keresztül magas ROS képzést generál, kb. egy nagyságrenddel magasabb a 0.2-0.5 mM-os szöveti szukcinát koncentrációnál (Lewandowski et al, 1996; Williamson & Corkey, 1979). Zoccarato és munkatársai azonban alacsony, tized mM-os szukcinát koncentrációnál is magas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képzést detektálnak: kísérleteikben 0.5 mM-os szukcinát koncentráció 900 pmol/min/mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t generál (Zoccarato et al, 2007). A szukcinát alacsony szöveti koncentrációja azonban patológias körülmények között mM-os tartományba emelkedhet: patkány agyban 5 perces iszkémiát követően a szukcinát koncentráció mintegy 2.5-szeresére nőtt, az 5 perces iszkémia utáni reperfüzió 15. percében mért szukcinát koncentráció a kiindulási koncentrációnak 140%-a maradt (Benzi et al, 1979; Benzi et al, 1982; Folbergrova et al, 1974). A szöveti szukcinát koncentráció iszkémia esetén szívműködésben is megemelkedik (Kakinuma et al, 1994; Wiesner et al, 1988). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a szukcinát szerepe a respirációs lánc működtetésében iszkémia-reperfüzió esetén számottevő lehet. A szukcinát magas ROS képzését a NADH+H<sup>+</sup>-t termelő szubsztrátok egyidejű oxidációja

lényegesen nem befolyásolja, glutamát és malát légzési szubsztrátok jelenlétében azonban magasabb szukcinát koncentráció szükséges a kizárólag szukcinát jelenlétében mérhető  $H_2O_2$  termelési sebesség eléréséhez (Zoccarato et al, 2007). A RET erős membránpotenciál függése viszont valószínűleg limitáló tényező a szukcinát magas, I. komplexen történő ROS képzésében *in vivo* körülmények között, amikor az ADP jelenléte csökkenti a mitokondriális membránpotenciált. Izolált kortikális axonterminálison: szinaptoszómán végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy a szinaptoszómális mitokondriumok membránpotenciálja nincs abban a tartományban, ahol a ROS képzés membránpotenciál függést mutatna: szétkapcsoló szerek nem befolyásolják az *in situ* mitokondriumok  $H_2O_2$  képzését (Tretter & Adam-Vizi, 2007).

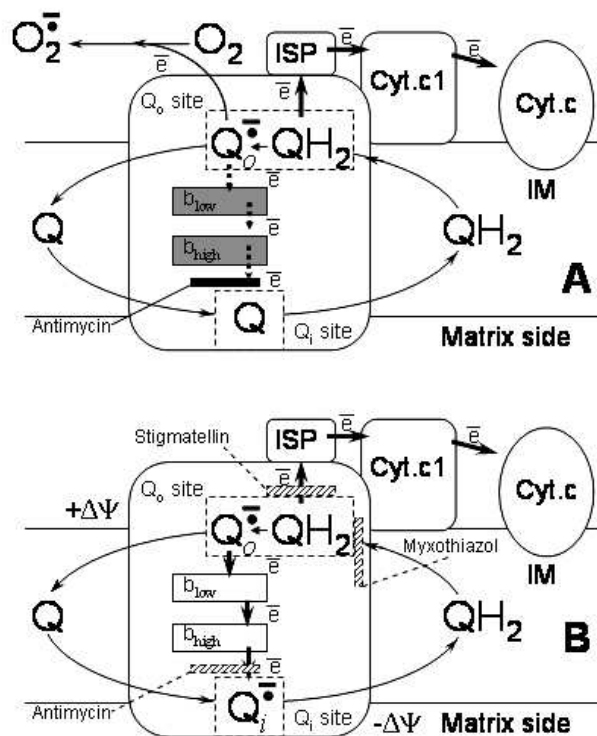
A respirációs lánc II. komplexéről leírták, hogy a liposzómába ágyazott szukcinát dehidrogenáz elektron akceptor hiányában szuperoxidot generál (Zhang et al, 1998). Az *in situ* II. légzési komplex ROS produkáló képessége azonban kétséges.

Az alfa-glicerofoszfát-dehidrogenáz a mitokondriális belső membrán intermembrán tér felőli oldalán helyezkedik el, legnagyobb aktivitást egér barna zsírszövetben és izomban mutat, agyszövetben az enzim aktivitása az előzőekhez képest jelentősen alacsonyabb (Kozsa et al, 1996). Az  $\alpha$ -GPDH részt vesz a triglicerid metabolizmusban ill. a mitokondriumba irányuló redukáló ekvivalens transzportban is. Alfa-glicerofoszfátot oxidáló tengerimalac agy alfa-glicerofoszfát-dehidrogenáz enzime ROS-t termel az I. komplexen történő, RET-ből származó szuperoxid képzésén kívül is (Tretter et al, 2007b; Zoccarato et al, 1988). Az alfa-glicerofoszfát-dehidrogenáz ROS-képzését a kalcium stimulálja (Tretter et al, 2007c).

St-Pierre *et al.* eredményei szerint az elektron-transzfer flavoprotein és az elektron-transzfer flavoprotein kinon oxidoreduktáz (ETF-QOR) szintén termel szuperoxidot a belső membrán mátrix felőli oldalán palmitoil-karnitin mint respirációs szubsztrát jelenlétében, a RET-ből származó ROS termelés mellett is (St-Pierre et al, 2002).

A belső membrán külső oldalán elhelyezkedő dihidroorotát-dehidrogenáz (DHODH) a pirimidin nukleotid szintézisben vesz részt, elektron akceptora a mitokondrium belső membránjában lévő ubikinon. *In vitro* körülmények között koenzim-Q hiányában a DHODH hidrogén-peroxidot termel (Loffler et al, 1996).

A mitokondriális légzési lánc III. komplexe gátlószere: az antimicin jelenlétében generál szuperoxid aniont. A légzési lánc III. komplexének ubikinolt oxidáló mechanizmusát Q-ciklusnak nevezzük (Andreyev et al, 2005; Trumpower, 1990) (3. ábra). A ciklus az ubikinol (QH<sub>2</sub>) oxidációjával kezdődik a III. komplex Q<sub>o</sub> oldalán. Az ubikinol egyik elektronja a vas-kén centrumot tartalmazó Rieske-proteinre kerül (ISP), majd a citokróm c1-en keresztül (Cyt.c1) a citokróm c-re jut (Cyt.c). A megmaradó szemikion gyök (Q<sup>•</sup>) a második elektront a két citokróm b-nek adja (b<sub>low</sub>, b<sub>high</sub>), ahonnan az elektront az ubikinon (Q) veszi fel a komplex Q<sub>i</sub> oldalán. Az ubikinon Q<sub>i</sub> oldalon történő teljes redukciójához szükséges két elektront két QH<sub>2</sub> oxidációja biztosítja. Az 3. ábra B része a III. komplex inhibitorait tünteti fel. Az antimicin meggátolja a szemikion kialakulását a komplex Q<sub>i</sub> oldalán, ennek következményeként a Q<sub>o</sub> oldalon a felhalmozódó szemikion O<sub>2</sub>-nek adva az elektront szuperoxid gyököt képez (Cadenas et al, 1977; Rich & Bonner, 1978; Turrens et al, 1985; Zhang et al, 1998). A mixotiazol meggátolja a QH<sub>2</sub> kötődését a komplexhez, a stigmatellin pedig az ubikinol első elektronjának a Rieske-proteinre történő transzferét akadályozza meg, így az instabil szemikiongyök nem alakul ki a Q<sub>o</sub> oldalon. Mind a mixotiazol (Turrens et al, 1985), mind a stigmatellin gátolja az antimicin által stimulált ROS képzést. Starkov és Fiskum ugyanakkor a mixotiazol ROS fokozó hatásáról számol be, feltételezve egy, az antimicinétől különböző szuperoxid képző helyet, a III. komplex Q<sub>o</sub> oldalán (Starkov & Fiskum, 2001). A III. komplex a belső membrán külső (Han et al, 2003a; Han et al, 2001; St-Pierre et al, 2002) és belső (Boveris et al, 1976) oldalán is képez szuperoxidot antimicin hatására (Muller et al, 2004; Turrens, 2003). Tekintve azonban, hogy a III. légzési komplex antimicin jelenlétében több, mint 70%-os komplexgátlás esetén képez csak ROS-t, kétséges, hogy a III. komplex ROS képzésének *in vivo* jelentősége lenne (Sipos et al, 2003).



### 3. ábra

#### Az ubikinon redox ciklusa a III. légzési komplexen (A) és a ciklus inhibitorai (B)

Az ábra magyarázatát lásd a szövegben. Rövidítések:  $Q$ : ubikinon;  $Q^{\bullet\bullet}$ : szemikinon gyök;  $QH_2$ : ubikinol; ISP: iron-sulfur protein (Rieske protein); Cyt.c1: citokróm c1; Cyt.c: citokróm c;  $b_{low}$ ,  $b_{high}$ : citokróm b;  $\pm \Delta\Psi$ : membrán potenciál; IM: inner membrane (belső membrán);  $e^-$ : elektron (Andreyev et al, 2005)

Az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz enzim a Szent-Györgyi-Krebs-ciklus része, az alfa-ketoglutarát-szukcinil-koenzim A átalakulást katalizálja miközben  $NADH+H^+$ -t termel. Az enzimkomplex három alegysége: az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz (E1), a dihidrolipoamid-szukcinil-transzferáz (E2) és a dihidrolipoamid-dehidrogenáz (E3). Az enzim flavin tartalmú dihidrolipoamid-dehidrogenáz alegysége képes ROS-t generálni az enzim katalitikus működése közben (Bunik & Sievers, 2002). Az  $\alpha$ -KGDH ROS képzése izolált enzimen (Tretter & Adam-Vizi, 2004), izolált (Starkov et al, 2004) és *in situ* (Tretter & Adam-Vizi, 2004) agyi mitokondriumokon is kimutatható. Az enzim

mind szuperoxid mind hidrogén-peroxid képzésre képes (Bunik & Sievers, 2002; Starkov et al, 2004). Az izolált  $\alpha$ -KGDH enzim szubsztrátja, az  $\alpha$ -ketoglutarát, ill. acetyl-KoA jelenlétében, ha  $\text{NAD}^+$  nincs jelen az inkubáló médiumban  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t termel (Tretter & Adam-Vizi, 2004). Emellett az  $\alpha$ -KGDH képes ROS-t termelni forward üzemmódban, amikor az E3 alegységen a  $\text{FADH}_2$ -ről jövő elektronok nemcsak a  $\text{NAD}^+$ -ot, hanem az oxigént is redukálják, és magas  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  arány esetén reverz üzemmódban is, ilyenkor a  $\text{NADH}+\text{H}^+$ -ról származó, visszafele áramló elektronok az E3 alegység  $\text{FADH}_2$ -jén keresztül redukálják az oxigént (Tretter & Adam-Vizi, 2005). Az  $\alpha$ -KGDH ROS képzését így a  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  arány befolyásolja: ha ez az arány emelkedett, az enzim fiziológias katalitikus funkciója allosztérikusan gátlódik, a ROS képzés pedig fokozódik (Tretter & Adam-Vizi, 2004). A fokozott mitokondriális ROS képzéshez emelkedett  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  arány esetén, ami vagy I. légzési komplex szubsztrátok és rotenon jelenlétében, vagy a reverz elektron transzport következtében alakul ki, tehát feltehetően nemcsak az I. komplex, hanem az  $\alpha$ -KGDH ROS képzése is hozzájárul. Neuronális sejt kultúrában a glutamáttal indukálható celluláris ROS képzés az  $\alpha$ -KGDH enzim gátlása esetén alacsonyabb, ami arra utal, hogy az  $\alpha$ -KGDH enzim ROS képzése hozzájárul a glutamát jelenlétében mérhető ROS termeléshez (Zundorf et al, 2009). A kalcium az  $\alpha$ -KGDH-t aktiváló koncentráció tartományban az enzim forward üzemmódban észlelhető, alacsony ROS képzését fokozza (Tretter & Adam-Vizi, 2004). Az enzim szerepét a mitokondriális ROS-képzésben az is alátámasztja, hogy dihidrolipoamid-dehidrogenáz deficiens heterozigóta knock-out ( $\text{Dld}^{+/-}$ ) egerekből izolált, alfa-ketoglutaráttal energetizált mitokondriumok hidrogén-peroxid képzése szignifikánsan kevesebb a vad típusénál (Starkov et al, 2004).

Az  $\alpha$ -KGDH enzimen kívül a piruvát-dehidrogenáz enzimkomplexről is kimutatható, hogy szuperoxidot és hidrogén-peroxidot termel (Starkov et al, 2004).

A citrátkörben található, citrát- izocitrát átalakulást katalizáló, vas-kén centrumot tartalmazó akonitázról is leírták, hogy az enzim izolált formája szuperoxiddal történő inaktiválást követően hidroxilgyököt képez (Vasquez-Vivar et al, 2000).

A citokróm b5 reduktáz a mitokondrium külső membránján helyezkedik el. Az enzim a citoplazmatikus  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  -t oxidálja, a külső membránon lévő citokróm b5-t pedig

redukálja. Whatley *et al.* a citokróm b5 magas, 300 nmol/min/mg protein sebességű szuperoxid képzését mérte (Whatley et al, 1998).

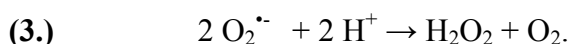
A monoamin-oxidáz szintén a mitokondrium külső membránján található enzim, biogén aminok oxidálása közben hidrogén-peroxidot termel. Patkány agy mitokondrium monoamin-oxidáza tiramin oxidálásakor közel ötvenszer több hidrogén-peroxidot generál, mint az antimicinnel gátolt III. légzési komplex szukcinát oxidálása közben (Hauptmann et al, 1996). A MAO emelkedett hidrogén-peroxid termelése iszkémiát követő reoxigenizációkor hozzájárulhat a neuronális reperfüziós károsodáshoz (Simonson et al, 1993). A monoamin-oxidáz A aktivitását, egyben ROS képzését a kalcium fokozza (Cao et al, 2007). A MAO B enzim aktivitása (Fowler et al, 1980; Saura et al, 1994) a korrallal emelkedik.

A mitokondriális ROS képzést a respirációs szubsztrátok, a membránpotenciál, a  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  arány, a légzési lánc inhibitorok és a pH mellett az oxigén tenzió is befolyásolja. Izolált mitokondriumokon végzett kísérletek azt mutatják, hogy az oxigénkoncentráció csökkenése alacsony mikromólos oxigén koncentráció tartományban ROS termelés csökkenést eredményez. A  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés csökkenése izolált patkány máj mitokondriumban kb. 10  $\mu\text{M}$  oxigén koncentráció alatt figyelhető meg (intracelluláris  $[\text{O}_2]$  tartomány) (Jones, 1986), e felett az érték felett mintegy 250  $\mu\text{M}$  oxigén koncentrációig (telítési  $[\text{O}_2]$  *in vitro* körülmények között) a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés nem változik (Hoffman et al, 2007). Az az oxigénmennyiség, ami a teljes oxigénfogyasztásból  $\text{H}_2\text{O}_2$  képzésre fordítódik species- és szövetspecifitást mutat a ROS termelő enzimek eltérő expressziója miatt (Johnson et al, 2007). Izolált patkány agy mitokondriumban, ha a mitokondrium nem foszforilál ADP-t, glutamát és malát szubsztrát esetén az oxigén 0.8%-a, szukcinát alkalmazásakor az oxigén fogyasztás ~ 3%-a fordítódik  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelésre; ADP jelenlétében ez az érték 0.08, ill. 0.04% (Starkov, 2008). A  $\text{H}_2\text{O}_2$  képzésre felhasználódó elektronok aránya a teljes elektronfluxhoz képest az oxigénkoncentráció csökkenésével emelkedik: szukcinát szubsztrát esetén nem foszforiláló üzemmódban az oxigén koncentráció 50  $\mu\text{M}$ -ról 0.1  $\mu\text{M}$ -ra való csökkenésekor a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelésre fordítódó elektronok aránya 0.5 %-ról 1.5%-ra nő (Hoffman et al, 2007).

### 3.2.3. A mitokondriális ROS elimináló mechanizmusok

A mitokondriumban keletkező reaktív oxigénszármazékok eliminációját enzimek és nem enzim antioxidánsok végzik (Andreyev et al, 2005).

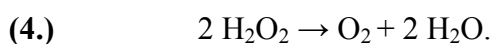
A mitokondriális légzési láncban keletkező szuperoxid aniont a mátrixban található mangán tartalmú szuperoxid dizmutáz (MnSOD) alakítja hidrogén-peroxiddá (3. egyenlet).



Az enzim jelentőségét a szabadgyökök elleni védelemben az mutatja, hogy a genetikailag módosított, homozigóta MnSOD knock out egerek életképtelennek bizonyultak (Li et al, 1995). A mitokondriális intermembrán térben az enzim citoszolikus izoformája, a CuZnSOD működik (Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001).

A SOD által katalizált reakcióban keletkező hidrogén-peroxidot több enzim is képes eliminálni: a kataláz, a glutation-peroxidáz és a peroxiredoxin-tioredoxin rendszer.

A szív (Radi et al, 1991) és máj (Salvi et al, 2007) mitokondriumokban megtalálható mitokondriális kataláz a hidrogén-peroxidot oxigénné és vízzé alakítja (4. egyenlet).



A mátrixban és az intermembrán térben lokalizálódó (Panfili et al, 1991) glutation-peroxidáz 1 (Gpx 1) szelenocisztein tartalmú enzim, amely a mitokondriumon kívül a citoplazmában is megtalálható. A Gpx 1 mitokondriális formája legnagyobb mennyiségben máj és vese mitokondriumokban expresszálódik, szintje alacsonyabb szív, agy és harántcsíktolt izom mitokondriumokban (Esposito et al, 2000). A glutation-peroxidáz a hidrogén-peroxidot glutation terhére redukálja vízzé (4. ábra). A glutation peroxidáz működését a kalcium izolált agy mitokondriumban gátolja (Zoccarato et al, 2004).

A glutation peroxidáz egy másik izoformája, a Gpx 4 (foszfolipid-hidroperoxid-glutation-peroxidáz) szintén megtalálható a mitokondriumban, de egyéb celluláris kompartmentekben: a sejtmagban, az endoplazmatikus retikulumban és a citoplazmában



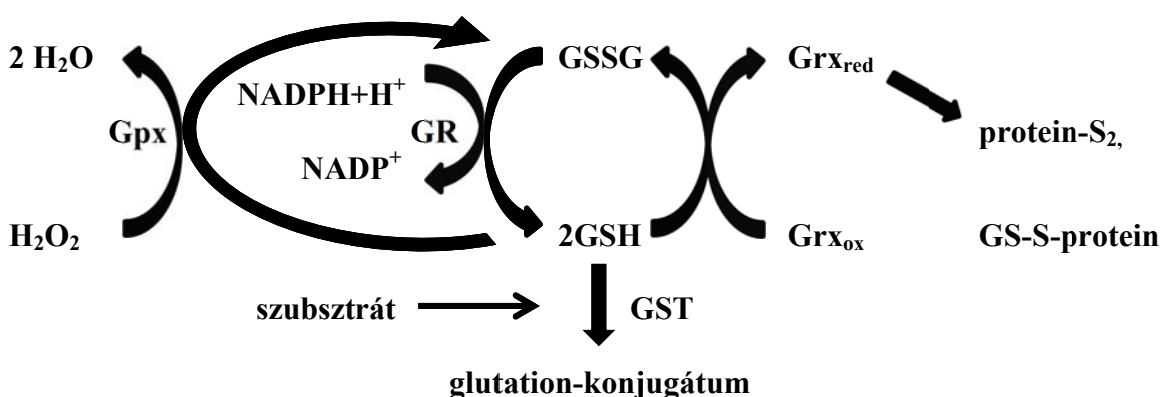
is jelen van (Imai & Nakagawa, 2003). Elsődleges feladata a lipid-hidroperoxidok redukciója, de képes  $\text{H}_2\text{O}_2$  eliminációra is. Homozigóta Gpx 4 knock-out egerek *in utero* elpusztulnak (Yant et al, 2003). A Gpx 4 mitokondriumban megtalálható típusa elsősorban patkány here szövetben mutatható ki (Pushpa-Rekha et al, 1995), ez a speciális szöveti előfordulás megkérdőjelezi azt, hogy a Gpx 4 kiemelt jelentőséggel bírna a mitokondriális antioxidáns védelemben.

Ugyancsak a glutationhoz kapcsolt antioxidáns enzim a glutaredoxin (Grx) (4. ábra). A glutaredoxin mitokondriális izoformája a Grx 2. A glutaredoxin protein diszulfid hidakat, ill. protein-glutation vegyes diszulfidokat képes redukálni (Johansson et al, 2004). A proteinek, ill. a lipidperoxidáció során keletkező 4-hidroxi-nonenál glutationnal való konjugációját a glutation-S-transzferáz (GST) enzim végzi, melynek egyes izoformái a mitokondriumban is megtalálhatók (Raza et al, 2002).

A glutationhoz kötött ROS detoxifikáló enzimek katalízise során keletkező oxidált glutationt a glutation-reduktáz (GR) flavoenzim redukálja  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  mint végső elektrondonor terhére (4. ábra). A glutation reduktáz a mitokondriális mátrixban is megtalálható (Panfili et al, 1991). A mitokondriális glutation-reduktáz működését a glutation-peroxidázhoz hasonlóan a kalcium gátolja (Zoccarato et al, 2004). A GR által katalizált reakcióhoz szükséges  $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -t három enzim képezi a mitokondriumban: a  $\text{NADP}^+$ -dependens izocitrát-dehidrogenáz, az almasav enzim, ill. a mitokondrium belső membránjához kötött transzshidrogenáz, amely a  $\text{NADP}^+$  redukálásához  $\text{NADH}+\text{H}^+$ -t használ, és működéséhez magas membránpotenciált igényel (Vogel et al, 1999). Az intramitokondriális  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  mennyisége a 3-5 mM koncentráció tartományba esik (Tischler et al, 1977).

A glutation (GSH) elsősorban ROS detoxifikáló enzimatis reakciókban szerepel elektrondonorként, de képes a szuperoxid anion és a hidroxilgyök direkt redukálására nem enzimatis úton is (Winterbourn & Metodiewa, 1994). A mitokondrium nem képes glutationt szintetizálni, a glutation magas, ill. alacsony affinitású, ATP által stimulált glutation transzporterrel (Martensson et al, 1990), ill. dikarboxilsav és alfa-ketoglutarát transzporterekkel keresztül jut be a mitokondriumba (Chen & Lash, 1998). Agy mitokondriumokban elsősorban a dikarboxilsav transzporter aktív, a dikarboxilsav transzporter gátlása egyben fokozott mitokondriális  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelést eredményez (Kamga

et al, 2010). Az intramitokondriális glutation koncentráció 2-14 mM, a mitokondrium a sejt összes glutation mennyiségének 10- 12% -át tartalmazza (Wahllander et al, 1979). Bár a mitokondriális antioxidáns védelem nagy mértékben a glutationtól függ, a glutation magas intramitokondriális koncentrációja miatt a glutation rezerv mintegy 50%-os csökkenése vezet csak fokozott hidrogén-peroxid képzéshez izolált patkány szív mitokondriumában (Han et al, 2003b).



#### 4. ábra

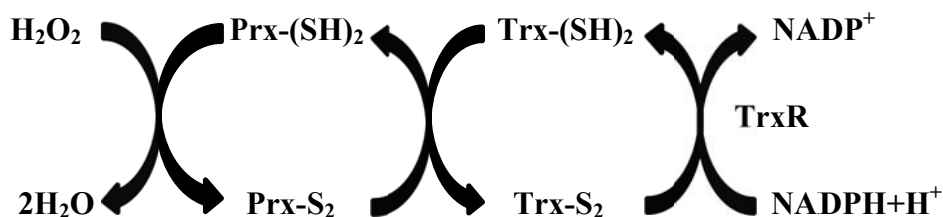
##### Glutationhoz kapcsolt antioxidáns enzimek

Az ábra magyarázatát lásd a szövegben. Rövidítések: Gpx: glutation-peroxidáz; GR: glutation-reduktáz; GSH: redukált glutation; GSSG: oxidált glutation; Grx: glutaredoxin; GST: glutation-S-transzferáz;  $\text{protein-S}_2$ : protein diszulfid híd; GS-S-protein: protein-glutation konjugátum

A peroxiredoxinok nagy mennyiségben expresszált, főleg a citoszolban lokalizálódó, hidrogén-peroxidot és alkil hidroperoxidot (ROOH) redukáló enzimek. Az enzimsaládnak két mitokondriális izoformája ismert: a Prx 3 és a Prx 5 (Wood et al, 2003). Mindkét mitokondriális izoforma ubikviter, a Prx 3 elsősorban patkány szívben,

mellékvesében, májban és agyban található meg (Chae et al, 1999), a Prx 5 legnagyobb mennyiségben here szövetben fordul elő (Leyens et al, 2003). A peroxiredoxinok katalitikus centrumukban tiol csoportot tartalmaznak, katalízis során a szulfhidril csoportok diszulfid hidat képeznek, melyet a tioredoxin enzimes család redukál (5. ábra). A Prx 3 szerepe felmerül az Alzheimer-kór patogenezisében: posztmortem mintavételből származó humán frontális kortextben és kisagyban a Prx 3 mennyisége alacsonyabb volt Alzheimer-kór esetén az egészséges mintához képest (Krapfenbauer et al, 2003). A Prx 3 *in vivo* adenovirális géntranszfere patkány hippocampális neuronokba neuroprotektívnek bizonyult a glutamáterg agonista ibotenát indukálta excitotoxicitás ellen (Hattori et al, 2003). Szisztémásan adott rekombináns Prx 5 ugyancsak neuroprotektív ibotenát okozta excitotoxicitás esetén újszülött egerekben (Plaisant et al, 2003).

A tioredoxin enzim család tagjai a peroxiredoxinokhoz hasonlóan tiol csoportot tartalmaznak, amellyel a peroxiredoxinok diszulfid hídját redukálják (Nordberg & Arner, 2001). A tioredoxin diszulfid hídját a tioredoxin-reduktáz (TrxR) redukálja, az enzim elektrondonorja a NADPH+H<sup>+</sup> (5. ábra). A tioredoxin (Trx) enzimes család mitokondriumban megtalálható izoformája a Trx 2. A Trx 2 patkány agyban legmagasabb expressziót a bulbus olfactoriusban, a frontális kortextben, a hipotalamikus és talamikus magvakban, a kisagyban és az agytörzsi magvakban mutat (Rybnikova et al, 2000). A mitokondriális tioredoxin 2 hiánya az étellel összeegyeztethetetlen: homozigóta Trx 2 knock out egerek *in utero* elpusztulnak (Nonn et al, 2003). A tioredoxin-reduktáz szelenocisztein tartalmú flavoenzim, a tioredoxinon kívül lipid-peroxidok redukálására is képes. A tioredoxin-reduktáz mitokondriális izoformája a TrxR 2. Izolált agyi mitokondriumok exogén H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t elimináló kapacitását vizsgálva (Drechsel & Patel, 2010) azt állapították meg, hogy a peroxiredoxin-tioredoxin rendszer nagyobb mértékben járul hozzá a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lebontásához, mint a glutationhoz kapcsolt mitokondriális ROS detoxifikáló enzimek.



5. ábra

### A peroxiredoxin-tioredoxin rendszer működése

Az ábra magyarázatát lásd a szövegben. Rövidítések: Prx: peroxiredoxin; Trx: tioredoxin; TrxR: tioredoxin-reduktáz

A szuperoxid aniont a mitokondriális légzési lánc eleme, a citokróm c is képes eliminálni, a  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a citokróm c-t redukálja (Butler et al, 1975). A citokróm c-t ezután a citokróm c oxidáz oxidálja, proton motoros erő képzése mellett (Mailer, 1990), így a citokróm c a szabadgyök eliminációval egyben metabolikus energiát is generál. A citokróm c izolált mitokondriumban antioxidáns hatású (Korshunov et al, 1999), a citokróm c szerepe a szuperoxid eliminálásban *in vivo* azonban nem bizonyított.

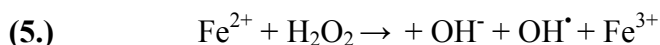
A lipid-peroxidáció elleni védelemben fontos szerepe van a lipid oldékony E vitaminnak, ami a mitokondriális membránokban is megtalálható (Bjorneboe et al, 1991). Az E vitamint a C-vitamin és az ubikinol is képes redukálni (Packer et al, 2001).

Az izolált mitokondriumok jelentékeny  $\text{H}_2\text{O}_2$  elimináló kapacitással bírnak: az exogén, bólusban adott, alacsony mikromólos koncentrációjú  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t glutamát és malát szubsztrát esetén ~6.5- 12 nmol/min/mg sebességgel képesek eltávolítani az inkubációs médiumból (Drechsel & Patel, 2010; Zoccarato et al, 2004). Ez az érték többszöröse az izolált mitokondriumok maximális ROS képzési sebességének. Izolált mitokondriumok komplexgátlók jelenlétében mérhető magas ROS képzés mellett sem akumulálnak  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t (Andreyev et al, 2005; Hansson et al, 2008). Az izolált mitokondriumok hatékony  $\text{H}_2\text{O}_2$  eliminációs képességét figyelembe véve feltehető, hogy a mitokondriumoknak a citoszolikus ROS eliminációban is szerepük lehet (Sandri et al, 1990).

### 3.2.4. Oxidatív stressz okozta károsodás a mitokondriumban

A reaktív oxigénszármazékok fokozott képződése protein károsodáshoz, lipid peroxidációhoz és DNS károsodáshoz vezethet. A mitokondriumban található enzimek, a légzési lánc fehérjéi, a mitokondrium membrán és a mitokondriális DNS fokozottan ki vannak téve a mitokondriumban keletkező reaktív oxigénszármazékok károsító hatásának.

A Szent-Györgyi-Krebs-ciklus egyik enzime, az izocitrát keletkezését katalizáló akonitáz szuperoxid ion hatására reverzibilisen gátlódik (Gardner et al, 1995). A vas-kén komplexet tartalmazó akonitáz a szuperoxid hatására hidrogén-peroxidot termel, a hidrogén-peroxid a vassal reagálva hidroxil gyököt generál a Fenton-reakció szerint (Vasquez-Vivar et al, 2000) (5. egyenlet):



Az akonitáz működését a hidrogén-peroxid is gátolja (Tretter & Adam-Vizi, 2000). Az akonitáz enzim így az oxidatív stressz indikátoraként is használható (Gardner, 2002; Gardner & Fridovich, 1992; Sipos et al, 2003; Tretter & Adam-Vizi, 2004). Bár az akonitáz a legérzékenyebb enzim a citromsav-ciklusban a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ra, az enzim közel teljes gátlása sem vezet a  $\text{NADH}+\text{H}^+$  termelés csökkenéséhez szinaptoszomális *in situ* mitokondriumokban (Tretter & Adam-Vizi, 2000).

Izolált mitokondriumban a hidrogén-peroxid a  $\text{NADP}^+$ -dependens izocitrát-dehidrogenáz aktivitását csökkenti, az enzim az oxidatív stressz következtében reverzibilisen konjugálódik glutationnal (Kil & Park, 2005).

A citromsav ciklus  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz enzime is érzékeny a reaktív oxigénszármazékok okozta károsodásra. Az  $\alpha$ -KGDH enzim működését a hidrogén-peroxid gátolja, az enzim gátlása  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$  autofluoreszcencia csökkenéshez is vezet, amelyet nagyrészt a  $\text{NADH}+\text{H}^+$ -t termelő  $\alpha$ -KGDH funkció károsodás, kisebb mértékben pedig a  $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -t felhasználó ROS elimináló mechanizmusok okoznak. (Chinopoulos et al, 1999; Tretter & Adam-Vizi, 2000). A citromsav-ciklus enzimeit közül az  $\alpha$ -KGDH enzim ROS károsodása a legkritikusabb: az enzim  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal történő, akár 20-30%-os gátlása szignifikánsan csökkenti a mitokondriális  $\text{NADH}+\text{H}^+$  termelést,

ami egyben nagy mértékben befolyásolja a mitokondrium energiatermelő kapacitását (Tretter & Adam-Vizi, 2000). MAO B enzimet fokozott mértékben expresszáló sejt kultúrában az  $\alpha$ -KGDH enzim aktivitása csökken, ez a jelenség a MAO által termelt  $H_2O_2$  károsító hatásának tulajdonítható (Kumar et al, 2003). McLain és munkatársai kísérleteiben  $H_2O_2$  terhelésnek kitett izolált mitokondriumokban az  $\alpha$ -KGDH enzim működése reverzibilisen gátlódott, a  $H_2O_2$  az enzim liponsav prosztetikus csoportjának glutationilációját okozta (McLain et al, 2011). A lipid-peroxidáció egyik intermedierje, a 4-hidroxi-nonenal ugyancsak inaktiválja az  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenázt (Humphries et al, 1998).

A szukcinát dehidrogenáz működése szintén szenzitív hidrogén-peroxidra, bár kisebb mértékben, mint az  $\alpha$ -KGDH (Tretter & Adam-Vizi, 2000). Az enzimet a hidrogén-peroxid mellett effektíven gátolja a hidroxilgyök is (Zhang et al, 1990).

A légzési lánc I. komplexének működése mintegy 35%-kal csökken alacsony mikromólos kalcium koncentráció hatására  $NADH+H^+$  jelenlétében, a kalcium hatását feltehetően a szuperoxid anion mediálja (Sadek et al, 2004). Kalcium és ROS-ok együttes hatására az I. légzési komplex (Malis & Bonventre, 1986) kísérleteiben is inaktiválódik. Az I. komplexet a szuperoxid anionon kívül a hidroxilgyök (Dykens, 1994) és a hidrogén-peroxid is inaktiválja (Zhang et al, 1990). MAO B enzimet fokozottan expresszáló, így  $H_2O_2$  –t is fokozottan termelő neuronokban az I. komplex aktivitása ugyancsak csökken (Kumar et al, 2003). Mindezek mellett a mitokondriális glutation rezerv oxidációja az I. légzési komplex reverzibilis glutationilációját okozza, ami fokozott szuperoxidképződéshez vezet (Taylor et al, 2003).

A légzési lánc III. komplexén található tiol csoport reverzibilisen oxidálódhat, az oxidációt exogén hidrogén-peroxid nem váltja ki, a módosulás antimicin hatására következik be, a hatás feltehetőleg a képződő szuperoxid anionnak tulajdonítható (Hurd et al, 2007).

A citokróm-oxidáz ugyancsak gátlódik ROS-ok: szuperoxid anion és hidrogén-peroxid hatására, a legnagyobb mértékű inhibíciót az enzimen a hidroxilgyök okozza (Zhang et al, 1990).

Az  $F_0F_1$  ATP-áz működését mind a szuperoxid anion, mind a hidroxilgyök hatékonyan csökkenti (Zhang et al, 1990). A kalcium potenciózza a reaktív oxigénszármazékok  $F_0F_1$  ATP-ázt, ill. adenin-nukleotid transzlokátort (ANT) gátló hatását is (Malis & Bonventre, 1986).

A mitokondriális fehérjék közül nemcsak a citromsav ciklus és a légzési lánc enzimei módosulhatnak oxidatív stressz hatására, hanem a ROS elimináló enzimek is, úm. a mitokondriális peroxiredoxin 3, melynek katalitikus tiol csoportja oxidatív hatásra reverzibilisen szulfinsavvá (R-SOOH) hiperoxidálódik (Hurd et al, 2007; Woo et al, 2003).

A mitokondriumban található tápanyag metabolizmusban részt vevő enzimek: a  $\beta$ -oxidáció számos enzime, ill. a piruvát-dehidrogenázt reguláló piruvát-dehidrogenáz-kináz enzimek tiol csoportjai oxidatív stressz hatására ugyancsak oxidálódnak: diszulfid hidat képeznek, szulfénsavvá (R-SOH) oxidálódnak vagy glutationnal konjugálódnak. Az oxidáció a propionil-koenzim A-karboxiláz és a piruvát-dehidrogenáz-kináz esetén enzimgátlást okoz. A mitokondriális fehérjék oxidatív módosulása nem csak az oxidatív károsodást jelzi, a specifikus tiol csoportok reverzibilis oxidációja eszköze lehet a mitokondriális enzimek regulációjának is (Hurd et al, 2007).

A mitokondriális membránok is ki vannak téve a reaktív oxigénszármazékok károsító hatásának (Bindoli, 1988). A mitokondriális belső membránban megfigyelhető, a korral fokozódó mértékű lipid peroxidáció csökkenti a mitokondriális belső membrán fluiditását (Nohl et al, 1978), a belső membránban a lipid peroxidáció egyben az elektrontranszport lánc aktivitását is gátolja (Narabayashi et al, 1982; Paradies et al, 2001). A mitokondriális belső membránban elhelyezkedő kardiolipin oxidációja gyengíti a kardiolipin és a hozzá kapcsolódó citokróm c közti kötést, ami fokozott citokróm c kiáramláshoz vezet mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus (mPTP) nyílás vagy apoptózis során (Gogvadze et al, 2001).

Az oxidáló ágensek a mitokondriális permeabilitási pórus nyílását is elősegítik (Novgorodov et al, 1991; Szabo & Zoratti, 1993), köztük a lipid peroxidáció fő intermediere, a 4-hidroxi-nonenal, ami a mPTP hatékony induktora (Kristal et al, 1996).

A reaktív oxigénszármazékok a nukleinsavakat is képesek módosítani, a DNS károsodás mutációk kialakulásához vezethet. A DNS-t elsősorban a hidroxilgyök károsítja, a hidroxilgyök hatására oxidált purin és pirimidin bázisok, ribóz-peroxil gyökök, nukleinsav-protein keresztkötések, egyes és kettős szálú lánc törések alakulnak ki a DNS-ben. A mitokondriális, jellegében bakteriális DNS fokozottan érzékeny a szabadgyökök károsító hatására, egyfelől a mitokondriális DNS és a légzési lánc közelsége miatt, másfelől a mitokondriális DNS repair mechanizmusok korlátozott kapacitása folytán (Halliwell & Gutteridge, 1999, pp. 262-284). A megfigyelés, mely szerint a mitokondrium ROS termelése a kor előrehaladtával fokozódik (Sohal et al, 1994), az öregedés mitokondriális eredetének teóriájához vezetett: e szerint a feltételezés szerint az öregedéssel fokozódó ROS termelés a mitokondriális DNS-ben jelentősen megnöveli a mutációk számát (Hamilton et al, 2001), ami a kor előrehaladtával csökkenti a mitokondrium energia termelő mechanizmusainak hatékonyságát (Linnane et al, 1989). Ezt a teóriát nem támasztja alá az a vizsgálat, melynek során Vermulst *et al.* egyfelől meghatározták, hogy az öregedéssel a mitokondriális DNS-ben a pontmutációk száma kb. 11-szeresére nő, ugyanebben a tanulmányban ugyanakkor a mitokondriális DNS pontmutációs rátájának 500-szoros megemelkedése sem vezetett a kísérleti egerek élettartamának csökkenéséhez és korai öregedéshez (Vermulst et al, 2007).

### 3.2.5. A mitokondriális ROS termelés detektálása fluoreszcens módszerrel

A mitokondriumok ROS képzésének fluoreszcens festékekkel történő detektálására több módszer használatos.

Az Amplex Red izolált mitokondriumok hidrogén-peroxid képzését extramitokondriálisan detektáló fluoreszcens festék. Az Amplex Red (N-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin) redukált állapotban nem fluoreszkáló dihidrorezorufin-származék, ami 1:1 sztöchiometriával reagál hidrogén-peroxiddal tormaperoxidáz (HRP: horseradish peroxidase) jelenlétében, fluoreszcens rezorufint képezve (Zhou et al, 1997). Az Amplex Red  $H_2O_2$  specifikus, szuperoxid anionnal nem reagál (Mohanty et al, 1997). A fluoreszcens festék rendkívül érzékeny hidrogén-peroxidra: 2 pmol  $H_2O_2$ -t



is érzékel (Mohanty et al, 1997), 50 nM- 20  $\mu$ M koncentráció tartományban képes  $H_2O_2$ -t detektálni. Az ugyancsak ROS mérésre használt szkopoletinnél mintegy hússzor érzékenyebb (Zhou et al, 1997). Az Amplex Red oxidációja nem reverzibilis, a rezorufin fluoreszcenciájának intenzitása additív. Az Amplex Red hidrogén-peroxiddal kalibrálható, a fluoreszcens szignál erőssége és a  $H_2O_2$  koncentrációja lineáris összefüggést mutat, amennyiben a fluoreszcens festék/  $H_2O_2$  moláris aránya nagyobb 5-nél, ennél alacsonyabb arány esetén a hidrogén-peroxid tovább oxidálja a rezorufint nem fluoreszkáló rezorufin-származékokra (Mohanty et al, 1997). Az Amplex Red kedvező kémiai tulajdonságokkal rendelkezik: spontán nem oxidálódik. A fluorofór magas excitációs és emissziós hullámhossza miatt (570, ill. 585 nm) a háttérfluoreszcencia alacsony. Az Amplex Red ugyanakkor fiziológiásan releváns koncentrációjú redukált piridin nukleotidok és redukált glutation hatására HRP jelenlétében -feltehetően  $H_2O_2$  képződés hatására- rezorufinná oxidálódik, többlet fluoreszcens szignált eredményezve. (Votyakova & Reynolds, 2004).

A szkopoletin az Amplex Redhez hasonlóan izolált mitokondriumokból emittált hidrogén-peroxidot képes detektálni extramitokondriálisan. A fluoreszcens szkopoletint (6-metil-7-hidroxi-1:2-benzopiron) a hidrogén-peroxid HRP jelenlétében nem fluoreszkáló vegyületté oxidálja, a  $H_2O_2$  mérés során tehát a fluoreszcencia szignál csökken (Boveris et al, 1977). A rezorofinhoz képest a szkopoletin fluoreszcenciájának intenzitása alacsonyabb. Hátrányos tulajdonsága a szkopoletinnek, hogy fluoreszcenciája idővel spontán csökken (De la Harpe & Nathan, 1985). A szkopoletin  $H_2O_2$  érzékenyége az Amplex Redhez képest alacsonyabb (Zhou et al, 1997). A szkopoletin alacsony excitációs és emissziós hullámhossza miatt (360, ill. 460 nm) a háttérfluoreszcencia magas (Haugland 2002). A  $NADH+H^+$  HRP jelenlétében  $H_2O_2$ -t képez, ami csökkenti a szkopoletin fluoreszcenciáját (Votyakova & Reynolds, 2004). Egyéb redukáló ágensek, mint amilyen az aszkorbinsav vagy a glutation azonban csökkentik a szkopoletin oxidációját HRP jelenlétében (Andreae, 1955).

A dihidrofluorescein fluoreszcens festéknek több származéka ismert: a 2,7-diklorodihidrofluorescein-diacetát ( $H_2DCFDA$ ), a karboxi-  $H_2DCFDA$ , a 5,6-klorometil-2,7-diklorodihidrofluorescein-diacetát (CM- $H_2DCFDA$ ), valamint a 5,6-karboxi-2,7-difluorodihidrofluorescein-diacetát (karboxi- $H_2DFFDA$ ) (Haugland, 2002, pp.

611-612). Az észterifikált származékok lipidoldékonyak, a citoplazmatikus észterázok a fluorofórt hidrophil vegyületté alakítják, a H<sub>2</sub>DCFDA esetében 2,7-diklorodihidrofluoreszceinné (H<sub>2</sub>DCF), majd a nem fluoreszcens alapvegyület oxidatív hatásra 2,7-diklorofluoreszceinné (DCF) alakul és fluoreszkálni kezd. Hátrányos tulajdonsága a dihidrofluoreszcein típusú festékeknek, hogy intracelluláris retenciós féleletidejük rövid, intracelluláris lokalizációjuk bizonytalan: vaszkuláris endotél sejtekben a DCF retenciós ideje percekben mérhető, a fluorofór a citoplazmában lokalizálódik (Keller et al, 2004; Royall & Ischiropoulos, 1993), szívizomsejtben azonban a festék ennél hosszabb ideig, mintegy 1.5 óráig kimutatható intracellulárisan, a DCF itt elsősorban a mitokondriumokban szekvesztrálódik (Swift & Sarvazyán, 2000). Specifikus ROS mérésre alkalmatlanok, a peroxinitrit, a hidroxilgyök (Keller et al, 2004), peroxidáz jelenlétében a hidrogén-peroxid (Crow, 1997; Vowells et al, 1995) a nitrogén-dioxid szabadgyök (Wrona et al, 2005) valamint a nitrogén-monoxid (Rao et al, 1992) egyaránt oxidálja őket. Ezen kívül az apoptózis során felszabaduló citokróom c ugyancsak oxidálja a H<sub>2</sub>DCF-t (Burkitt & Wardman, 2001). A 2,7-diklorodihidrofluoreszceint a HRP (Rota et al, 1999a) és a xantin oxidáz (Zhu et al, 1994) ugyancsak oxidálja. A DCF excitációs és emissziós hullámhossza a látható fény tartományba esik. A DCF pH szenzitív: a savasodás csökkenti a fluoreszcencia intenzitást (Reynolds & Hastings, 1995). A DCF emellett fotoszenzitivitást is mutat (Marchesi et al, 1999). A DCF fénykárosodása következtében (Marchesi et al, 1999), valamint HRP jelenlétében (Rota et al, 1999b) szabadgyököket generál. Fotoszenzitivitásuk miatt a fluoreszcein típusú fluorofórok alacsony intenzitású fluoreszcenciát generálnak (Vowells et al, 1995). A diklorodihidrofluoreszceint HRP jelenlétében extramitokondriális hidrogén-peroxid mérésre is használják izolált mitokondrium kísérleti modellben (Schild & Reiser, 2005), az izolált mitokondriumok a lipidszolúbilis H<sub>2</sub>DCFDA-t képesek felvenni, ez lehetővé teszi az intramitokondriális ROS mérést is (Maciel et al, 2001).

A dihidrokalcein a fluoreszcein származéka. A dihidrokalcein acetoxi-metil-észter formában (kalcein-AM) (4',5'-bisz(N,N-bisz(carboximetil)aminometil)fluoreszcein acetoximetil-észter) lipidoldékony, a citoszolikus észterázok hatására hidrophillé válik, ennek következtében nem tud visszadiffundálni a plazmamembránon keresztül, így citoszolikus ROS detektálásra alkalmazható. A dihidrokalcein oxidálódva zölden

fluoreszkáló kalceinné alakul (Haugland, 2002, pp. 604-605). A kalcein lényegesen hosszabb ideig képes a sejten belül maradni, mint a diklorodihidrofluoreszcein, intracellulárisan a mitokondriumban lokalizálódik. A dihidrokalcein peroxinitrittel és hidroxilgyökkel reagál. Szubmitokondriális partikulán a kalcein gátolja az I. légzési komplex aktivitását. (Keller et al, 2004).

A dihidrorodamin 123 (2-(3,6-diamino-9H-xantén-9-il)-benzoesav, metil-észter) a diklorodihidrofluoreszcein szerkezeti analógja, nem fluoreszcens lipidoldékony vegyület, amely oxidáció hatására fluoreszkálni kezd, egyben pozitív töltésűvé válik és akkumulálódik a mitokondriumban (Haugland, 2002, pp. 479-480). A dihidrorodamin 123 a reaktív oxigén- és nitrogénszármazékok citoszolikus detektálására alkalmas, így a mitokondriumból származó hidrogén-peroxidot is méri. A dihidrorodamin peroxidáz jelenlétében reagál hidrogén-peroxiddal (Crow, 1997; Henderson & Chappell, 1993). A dihidrorodamin 123 fluoreszcenciájának intenzitása mintegy 50-szer magasabb a karboxi-diklorofluoreszceinénél és mintegy 7-szer magasabb a diklorofluoreszceinénél (Vowells et al, 1995). A dihidrorodamin 123 emellett neutrofil granulocitában érzékenyebb ROS szenzornak mutatkozott a H<sub>2</sub>DCFDA-nál (Rothe et al, 1988). A dihidrorodamin 123 nem specifikus hidrogén-peroxidra: a hidroxilgyök, a nitrogén-dioxid szabadgyök (Wrona et al, 2005), és a peroxinitrit (Crow, 1997) is képes a festéket oxidálni.

Az citoszolikus ROS detektáló módszerek egyik legnagyobb hátránya, hogy a festékek nem specifikusak, többféle reaktív oxigén-, és nitrogénszármazékkal képesek reagálni fluoreszcens szignált eredményezve. A bór tartalmú fluorofórok: a peroxirezorufin (3,7-bisz (pinakolatoboron) fenoxazin), a peroxifluor (3,6-bisz (pinakolatoboron) fluoran) és a peroxixanton (3,6-bisz (pinakolatoboron) xanton) ezzel szemben hidrogén-peroxidra specifiikus, intracelluláris mérésre alkalmas fluoreszcens festékek (Miller et al, 2005). A peroxifluor és a peroxirezorufin nem fluoreszkálnak, a peroxixanton enyhén fluoreszkál 400 nm-es emissziós hullámhosszal, mindhárom fluorofór fluoreszcenciáját a hidrogén-peroxid jelentősen megnöveli zölden fluoreszkáló fluoreszcein, vörösén fluoreszkáló rezorufin és kéken fluoreszkáló 3,6-dihidroxixanton képződése közben. Mindhárom fluorofór excitációs és emissziós hullámhossza a látható fény tartományba esik, így az UV fény okozta szöveti károsodás és a nem specifikus

háttérfluoreszcencia mértéke elhanyagolható. A festékek  $\text{H}_2\text{O}_2$  érzékenysége magas: 100-200 nM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t képesek detektálni *in vitro*, élő sejtben mikromólos nagyságrendű hidrogén-peroxidot érzékelnek (Chang et al, 2004). A fluorofórok hidrogén-peroxiddal kalibrálhatók: 5  $\mu\text{M}$  festék jelenlétében 0-50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentráció tartományban a fluoreszcencia intenzitása lineáris összefüggést mutat a hidrogén-peroxid koncentrációval (Miller et al, 2005).

A hidroetidin (HE) (3,8-diamino-5,6-dihidro-5-etil-6-fenilfenantridinium) szuperoxid aniont detektáló fluoreszcens festék (Wardman, 2007). A kéken fluoreszkáló hidroetidin 2-hidroetidinné oxidálódva vörösen fluoreszkál, a fluoreszcencia intenzitását a fluorofór DNS-hez való kötődése erősíti (Zhao et al, 2003). A hidroetidin egy származéka, a tetrafenil-foszfónium ( $\text{TPP}^+$ ) kation szubsztituenst tartalmazó Mito-HE / MitoSOX Red mitokondriumba targetálható; a  $\text{TPP}^+$  kationban a pozitív töltés lipofil fenil-csoportokkal van körülvéve, így a fluorofór a negatív membránpotenciállal rendelkező mitokondriális belső membránon könnyen átdiffundál, a mitokondriális membránpotenciál csökkenése azonban a festék citoplazmatikus relokizációjához vezet. A MitoSOX Red festék izolált és *in situ* mitokondriumok szuperoxid anion termelésének mérésére használható. A mérési módszer szemikvantitatívnak minősíthető a fluorofór és a szuperoxid-dizmutáz szuperoxid anionért történő kompetíciója miatt. Emellett a fluorofór fotoszenzitivitása miatti autooxidáció következtében a fluoreszcencia szignál magasabb szuperoxid képzést mutathat a valóságosnál (Robinson et al, 2006). A citokróm c ugyancsak oxidálhatja a MitoSox Red fluorofórt, nem fluoreszkáló terméket eredményezve (Zielonka et al, 2008). A hidroetidin ezeken kívül képes a szuperoxid aniont hidrogén-peroxiddá alakítani, így a szuperoxid valós mennyisége ezzel a mérési módszerrel alábecsülhető (Benov et al, 1998).

A mitokondriális mátrixban expresszált fehérje, a cp YFP (circularly permuted yellow fluorescent protein) ugyancsak szelektív ROS detektálásra alkalmas szenzor, *in vitro* körülmények között specifikusnak mutatkozott szuperoxid anion érzékelésére (Wang et al, 2008). A fluoreszcens fehérje excitációs és emissziós hullámhossza a látható fény tartományba esik, a fluoreszcencia intenzitása szuperoxid ion hatására mintegy négyszeresére nő. A fluoreszcencia szignál nem additív, így a fehérje alkalmas a szuperoxid képzés dinamikus monitorozására élő sejtekben.

A citoszolban expresszált roGFP1 (redox-sensitive green fluorescent protein) az intracelluláris hidrogén-peroxid, szuperoxid anion és hidroxil gyök detektálására alkalmas protein. A festék ratiometrikus, azaz különböző excitációs hullámhosszal rendelkezik oxidált, ill. redukált állapotban, így lehetővé válik a két hullámhossz arányának meghatározása. A festék oxidálódása reverzibilis. Segítségével perimitokondriális ROS mikrodomének is vizualizálhatók (Funke et al, 2011).

Összességében a reaktív oxigénszármazékokat detektáló fluoreszcens festékek alkalmazásakor az eredmények értékelésénél több faktort figyelembe kell venni (Soh, 2006; Tarpey & Fridovich, 2001): a fluorofórok kompetálnak a reaktív oxigénszármazékokért a citoszolikus és a mitokondriális ROS elimináló enzimekkel, ez vagy a ROS valós mennyiségének az alábecsléséhez, vagy amennyiben a festéknek nagyobb az affinitása a ROS-hoz, mint amekkora a ROS detoxifikáló enzimeké, az elimináló mechanizmusok kiesése következtében a ROS termelés túlbecsléséhez vezethet. Emellett a dihidro-típusú fluoreszcens festékek kisebb vagy nagyobb mértékben fotoszenzitívek, az excitációs fény hatására oxidálódnak. Mind a HRP, mind a fluorofórok nem specifikus reakcióik következtében a reaktív oxigénszármazékok mennyiségének túlbecslését okozhatják. Citoszolikus ROS detektáláskor a fluoreszcens festékek intracelluláris retenciója és sejten belüli disztribúciója bizonytalan. Mindezek mellett problémát jelent a dihidro-típusú fluorofórok alacsony szelektivitása: többféle reaktív oxigénszármazékkal, és reaktív nitrogénszármazékkal is képesek fluoreszcencia szignált generálni. A saját méréseinkben használt Amplex Red fluoreszcens festéknek a fentiekkel szemben számos előnye van:  $H_2O_2$  specifikus; a  $H_2O_2$  iránti érzékenysége magas; a fluoreszcencia szignál kialakulása inkubációs időt nem igényel; a fluorofór oxidációja nem reverzibilis, így fluoreszcenciájának intenzitása additív; ezeknek következtében a festék a  $H_2O_2$  koncentráció változásának szoros időbeli monitorozására alkalmas; egyben kalibrálható; nem autooxidábilis; háttérfluoreszcenciája alacsony.

### 3.3. A mitokondriális kalcium homeosztázis

A mitokondriumok legjelentősebb élettani szerepük, az ATP termelés mellett a celluláris kalcium homeosztázis fenntartásában és regulációjában is részt vesznek.

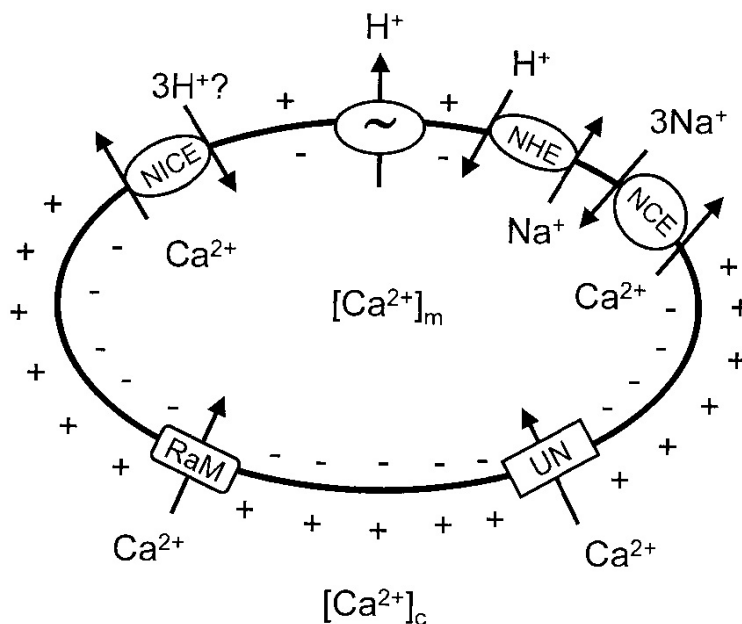
A mitokondriális kalcium transzporterek molekuláris felépítése sokáig ismeretlen volt, a mitokondriális kalcium homeosztázis működése így kinetikai, patch clamp és kalcium mérési módszerekkel volt vizsgálható. A mitokondrium fő kalcium transzporterét, a kalcium uniportert azonban De Stefani és munkatársai a közelmúltban azonosították (De Stefani et al, 2011).

A mitokondriális kalcium felvétel a mitokondriális kalcium uniporterén keresztül történik, a transzport hajtóereje a  $\text{Ca}^{2+}$  elektrokémiai grádiense (6. ábra). Az uniporter patch clamp módszerrel történő vizsgálata igazolta, hogy a kalcium uniporter szelektív divalens kation csatorna (Kirichok et al, 2004). A mitokondrium nyugalmi, 100 nM-os intracelluláris  $[\text{Ca}^{2+}]$  esetén nem vesz fel kalciumot, az uniporter működésének küszöbértéke 0.5-1  $\mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$ . A küszöbértéket meghaladó kalcium expozíció esetén izolált agy és máj mitokondriumokban az uniporter együttműködésben a mitokondriális kalcium efflux mechanizmusokkal: a  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ , ill. a  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  antiporterrel 0.5-1  $\mu\text{M}$  extramitokondriális kalcium koncentrációt tart fenn adenin nukleotidok és foszfát ( $\text{P}_i$ ) jelenlétében (Nicholls, 2005), amennyiben a kalcium terhelés nem haladja meg az 500 nmol  $\text{Ca}^{2+}/\text{mg}$  protein  $[\text{Ca}^{2+}]$ -t, ez a kalcium koncentráció ugyanis mitokondriális permeabilitási tranzíciós póruson keresztül történő kalcium effluxot indukál (Chalmers & Nicholls, 2003; Nicholls, 2009). A kalcium uniporter gátlószerei a Ruthenium Red (Reed & Bygrave, 1974) és a Ruthenium 360 (Ru 360) (Ying et al, 1991). A  $\text{Mg}^{2+}$  az uniporter regulátora, transzporttól független kötőhelyén fejt ki kalcium transzportot gátló hatását (Akerman et al, 1977).

A mitokondriális kalcium importnak egy másik útja is ismert, ez az ún. gyors kalcium felvétel (RaM: rapid uptake mode), amit az uniporterhez hasonlóan a  $\text{Ca}^{2+}$  elektrokémiai grádiense működtet (Gunter & Gunter, 2001; Sparagna et al, 1995). Megfigyelhető, hogy a mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  felvétel gyorsabb tranziens  $\text{Ca}^{2+}$  pulzusok, mint állandó  $\text{Ca}^{2+}$  expozíció esetén. A tranziens  $\text{Ca}^{2+}$  pulzusok felvétele a RaM-on keresztül történik. A RaM karakterizálása elsősorban máj és szív mitokondriumokon történt. Az egyes

pulzusok között máj mitokondriumoknál kevesebb, mint 1 s, szív mitokondriumoknál 60-90 s időtartamra az extramitokondriális  $[Ca^{2+}]$ -nak 100-150 nM alá kell esnie ahhoz, hogy a következő  $Ca^{2+}$  pulzust a mitokondrium fel tudja venni (Buntinas et al, 2001). A RaM-ot az uniporterrel ellentétben a  $Mg^{2+}$  nem befolyásolja. 600 nM-os  $Ca^{2+}$  pulzus esetén máj mitokondriumok 7-8, szív mitokondriumok 0.75-1 nmol/mg protein  $Ca^{2+}$ -ot képesek maximálisan felvenni RaM-on keresztül (Buntinas et al, 2001; Sparagna et al, 1995).

A mitokondriális  $Ca^{2+}$  effluxot a mPTP-on kívül két transzporter mediálhatja: a máj mitokondriumban található  $Ca^{2+}/H^+$  transzporter és a szív és az agy mitokondrium  $Ca^{2+}/Na^+$ , ill.  $Na^+/H^+$  antiportere (Crompton & Heid, 1978; Crompton et al, 1978). Gunter *et al.* eredményei szerint a  $Ca^{2+}/H^+$  antiporter a kalcium elektrokémiai grádiense ellenében is képes kalciumot exportálni a mátrixból, így a transzporter feltehetőleg vagy elektroforetikus vagy aktív transzporter (Gunter et al, 1991). A  $Ca^{2+}/Na^+$  antiporter elektrogén (Jung et al, 1995), működését számos farmakológiai ágens (pl. verapamil, amilorid) gátolja (Schellenberg et al, 1985; Wolkowicz et al, 1983). Marha szív mitokondriumból sikerült izolálni  $Ca^{2+}/Na^+$  cserét mediáló fehérjét (Li et al, 1992), így a mitokondriális kalcium transzporterek közül jelenleg az uniporternek, és a  $Ca^{2+}/Na^+$  antiporternek ismert a molekuláris felépítése.



6. ábra

### A mitokondrium kalcium transzporterei

UN:  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter; RaM- rapid uptake mode (gyors  $\text{Ca}^{2+}$  felvétel); NICE:  $\text{Na}^+$  independent  $\text{Ca}^{2+}$  exchanger ( $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  antiporter); NCE:  $\text{Na}^+$  dependent  $\text{Ca}^{2+}$  exchanger ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  antiporter); NHE:  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter); ~ : a respirációs komplexek  $\text{H}^+$  pumpája;  $[\text{Ca}^{2+}]_m$ : intramitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció;  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ : citoszolikus  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció (Bernardi, 1999)

A mitokondrium inorganikus foszfát jelenlétében akár 1  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein  $\text{Ca}^{2+}$ -ot is képes szekvesztrálni, ami 1 M intramitokondriális  $[\text{Ca}^{2+}]$ -nak felel meg (Nicholls & Akerman, 1982). Az intramitokondriális szabad  $[\text{Ca}^{2+}]$  10 nmol/mg protein kalcium terhelésig lineárisan nő, e felett az érték felett a kialakuló, ozmotikusan inaktív kalcium-foszfát precipitátum a szabad  $[\text{Ca}^{2+}]$ -t a mátrixban 0.2-2  $\mu\text{M}$  érték között maximálja (Chalmers & Nicholls, 2003). A 10 nmol/mg protein alatti  $\text{Ca}^{2+}$  terhelés regulációs  $[\text{Ca}^{2+}]$  intervallumnak tekinthető, amely a mitokondrium  $\text{Ca}^{2+}$ -függő mechanizmusait, mint például a citromsav ciklus dehidrogenázait befolyásolja, az ezen érték feletti



kalcium terhelés már a szekvesztrációs  $[Ca^{2+}]$  intervallumba esik, a keletkező kalcium-foszfát komplex a mitokondriumok  $Ca^{2+}$  tároló funkcióját teszi lehetővé (Nicholls & Chalmers, 2004).

A kalcium a mitokondriális metabolizmusban regulációs szereppel bír. A kalcium három dehidrogenázt aktivál a mátrixban: a piruvát- dehidrogenázt, az izocitrát-dehidrogenázt és az alfa-ketoglutarát-dehidrogenázt alacsony mikromoláris koncentráció intervallumban ( $0.1-10 \mu M [Ca^{2+}]$ ) (Denton et al, 1972; Denton et al, 1978; McCormack & Denton, 1979). Izolált, agy mitokondriumból származó  $\alpha$ -KGDH enzim aktivitását azonban  $100 \mu M$ -nál magasabb  $[Ca^{2+}]$  csökkenti (Lai & Cooper, 1986), nagy mértékű mitokondriális kalcium akkumuláció esetén a PDH enzimkomplex működése ugyancsak gátolt (Lai et al, 1988). A kalcium az alfa-glicerofoszfát-dehidrogenáz (Tretter et al, 2007c; Wernette et al, 1981) és a monoamin-oxidáz A (Cao et al, 2007) aktivitását is növeli fokozott ROS képzés mellett. A mitokondriális reaktív oxigénszármazékokat elimináló enzimek közül a Mn-szuperoxid- dizmutáz működését aktiválja (Hopper et al, 2006), a glutation-peroxidázét és a glutation- reduktázét gátolja (Zoccarato et al, 2004). A kalcium feltehetően stimulálja a respirációs lánc működését (Halestrap, 1989), a kalcium szenzitív helyet (Murphy et al, 1990) a légzési lánc ubikinon- citokróm c közti szakaszán határozta meg. Ugyanakkor alacsony mikromólos kalcium koncentráció  $NADH+H^+$  jelenlétében az I. légzési komplexet mintegy 35 %-kal gátolja, a komplex gátlásért feltehetően a képződő szuperoxid anion felelős (Sadek et al, 2004). A kalcium aktiválja az adenin nukleotid transzlokátort (Moreno-Sanchez, 1985), és egy gátló fehérje (calcium binding inhibitor) inaktiválásán keresztül az  $F_0F_1$  ATP szintáz működését is serkenti (Das & Harris, 1990; Yamada et al, 1981). A kalcium ezekkel ellentétes, az ANT-t (Gomez-Puyou et al, 1979), ill. az  $F_0F_1$  ATP-ázt gátló hatásáról is van irodalmi adat (De Gomez-Puyou et al, 1980). A mitokondrium transzporterei közül a kalcium stimulálja a malát-aszpartát inga aszpartát/glutamát antiporterét (agy mitokondriumban  $K_{0.5} = 324 \pm 114 \text{ nM}$  extramitokondriális  $[Ca^{2+}]$ ) (Pardo et al, 2006), és az  $ATP-Mg^{2+} / P_i$  transzportert alacsony mikromólos extramitokondriális kalcium koncentráció ( $1-4 \mu M$ ) tartományban (Nosek et al, 1990). A kalcium allostérikus aktivátora a kalcium uniporternek (Kroner, 1986), emellett a külső membránban elhelyezkedő feszültségfüggő anioncsatorna (VDAC: voltage dependent anion channel) működését is serkenti (Bathori et al, 2006).

A mitokondriumok nagy mértékű kalcium szekvesztrációs kapacitása arra utal, hogy a mitokondriumoknak jelentős szerepe van a citoszolikus kalcium homeosztázis fenntartásában, az intracelluláris kalcium szignál modulálásában, egyben hozzájárulnak a citoplazma kalcium mikrodoménjeinek kialakításához. A mitokondriumok szoros kapcsolatban állnak a sejt fő kalcium raktárával, az endoplazmatikus retikulummal (ER), az onnan felszabaduló kalcium az ER mikro környezetében található mitokondriumokban  $[Ca^{2+}]$  emelkedést okoz (Rizzuto et al, 1993). Neuronális szubplazmalemmális mitokondriumok depolarizáció hatására ugyancsak kalciumot szekvesztrálnak (Pivovarova et al, 1999).

### **3.4. A mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórús**

A mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórús a mitokondrium belső membránján képződő, feszültségfüggő, gyors vezetőségű, 3 nm átmérőjű nyílás, amely 1500 dalton tömegű molekulák nem specifikus transzportját teszi lehetővé (Massari & Azzone, 1972; Petronilli et al, 1989; Szabo & Zoratti, 1993).

A mitokondriumok kalcium indukálta nem specifikus permeabilizációját Hunter és Haworth írta le először a hetvenes években (Hunter et al, 1976), munkájuk a mPTP meghatározásában és karakterizálásában alapvető (Haworth & Hunter, 1979; Hunter & Haworth, 1979a; Hunter & Haworth, 1979b).

A mPTP molekuláris felépítése azonban a mai napig nem meghatározható. A pórús alkotásában feltételezhető a mitokondriális külső membránban található feszültségfüggő anion csatorna; az adenin nukleotid transzlokátor; a mátrixban lokalizálódó peptidil-prolil cisz-transz izomeráz, a ciklofilin D (Cyp-D) (Crompton et al, 1998); a külső membránhoz asszociált hexokináz; az intermembrán térben elhelyezkedő mitokondriális kreatin kináz (Beutner et al, 1996), a külső membránhoz kötött perifériás benzodiazepin receptor (McEnery et al, 1992), valamint a Bcl-2 fehérjecsald pro- és antiapoptotikus tagjainak szerepe (Sharpe et al, 2004). Ugyanakkor genetikailag módosított, VDAC (Baines et al, 2007), ANT (Kokoszka et al, 2004) és Cyp-D (Basso et al, 2005) knock-out állatokból izolált mitokondriumok mutatnak permeabilitási

tranzíciót, ami kizárja, hogy a fenti komponensek elengedhetetlenek lennének a mPTP alkotásában.

A mPTP nyílás elsődleges következménye a belső membrán depolarizációja (Huser et al, 1998), ill. az ionok, valamint az 1500 daltonnál kisebb molekulák, pl. az adenin és piridin nukleotidok ekvibrációja a belső membrán két oldalán elektromos, ill. koncentráció grádiensüknek megfelelően (Di Lisa et al, 2001). A mPTP kialakulását követő mitokondriális duzzadás ozmotikus kiegyenlítődés következménye (Vercesi, 1984). A mitokondriumok duzzadása a külső membrán ruptúrájához és citokróm c vesztéshez vezet. A citokróm c disszociációja a belső membránról légzésgátlást okozhat (Kantrow & Piantadosi, 1997). A respiráció leállása a piridin nukleotidok mátrixból történő kiáramlása miatt jellemzőbb I. légzési komplex szubsztrátokkal energetizált mitokondriumokban, szukcinát szubsztrát esetén inkább szétkapcsolás figyelhető meg. A protongradiens kiegyenlítődése mitokondriális ATP termelés felfüggesztését jelenti. A mátrix ATP koncentrációjának csökkenését az  $F_0F_1$  ATP-áz reverz működése is súlyosbítja, amennyiben a membránpotenciál visszaállítása érdekében protonokat pumpál ki az intermembrán térbe ATP egyidejű hidrolízise mellett. A mPTP nyílása és ennek következményei azonban reverzibilisek, még nagy amplitúdójú duzzadás sem vezet a mitokondriumok visszafordíthatatlan károsodásához, citokróm c pótlást követően a mitokondriumok teljes morfológiai és funkcionális regenerációra képesek (Petronilli et al, 1994).

A mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus legfőbb induktora a kalcium. A kalcium uniporter gátlószere, a Ruthenium Red mPTP-t gátló hatása azt mutatja, hogy a kalcium a mátrix felől triggereli a permeabilitási tranzíciót (Hunter & Haworth, 1979a). A kalcium permeabilitási tranzíciót kiváltó hatása kompetitíven gátolható divalens és trivalens kationokkal:  $Mg^{2+}$ -mal,  $Sr^{2+}$ -mal,  $Mn^{2+}$ -nal és  $La^{3+}$ -nal (Haworth & Hunter, 1979). Az a kalcium mennyiség, ami mPTP-t képes indukálni, speciesenként és szövetenként különböző (Coelho & Vercesi, 1980). Egyedülálló módon az ízeltlábú *Artemia franciscana* mitokondriumaiban kalciummal nem lehet mPTP-t kiváltani (Menze et al, 2005). A kalcium önállóan is tud mPTP-t indukálni, ugyanakkor egyéb mPTP-t aktiváló ágensek permisszív faktoraként is szerepel.

A kalcium és az inorganikus foszfát szinergisztikusan hatnak a mPTP kiváltásában. A mátrixban a két komponens kalcium-foszfát precipitátumot képez, elősegítve a kalcium mátrixban történő akkumulációját (Kristian et al, 2007). A foszfát mint sav emellett pufferelem a kalcium felvételt követő, a fokozott légzés eredményeként kialakuló mátrix pH emelkedést (Nicholls & Chalmers, 2004). A  $P_i$  mPTP-t indukáló hatásának másik lehetséges oka, hogy a mátrixban megnöveli az  $[ATP]/[ADP]$  arányt, így csökkenti a mPTP gátló ADP mennyiségét (Hutson et al, 1989). Nagy mennyiségű extramitokondriális  $[P_i]$  ugyanakkor csökkentheti a mátrixban az adenin nukleotid szintet a  $P_i/ATP-Mg^{2+}$  és a  $P_i/HADP^{2-}$  transzportereken keresztül (Lapidus & Sokolove, 1994). Mindezek mellett a foszfát megköti a kalcium hatását antagonizáló  $Mg^{2+}$ -t (Bernardi et al, 1992).

A mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus nyílását befolyásolja a redox státusz is. Két egymástól elkülöníthető redox szenzitív tényező van hatással a mPTP nyílására: a piridin nukleotidok, valamint kritikus dithiol csoportok oxidációs állapota. A  $NAD(P)H+H^+/NAD(P)^+$  arány csökkenése ill. a diszulfid hidak kialakulása a mPTP nyílásnak kedvez. A szulfhidril csoportok oxidációs állapota a glutation redox státuszával korrelál (Costantini et al, 1996). Ugyanakkor kritikus hisztidinek naszcens oxigén hatására történő degradációja gátolja a kalcium indukálta mPTP kialakulását (Salet et al, 1997).

A mPTP feszültség-függő. Depolarizáló hatású vegyszerek: szétkapcsoló szerek, légzési komplex gátlók elősegítik a mPTP kinyílását. A mPTP feszültség érzékenységét feltehetőleg arginin tartalmú domének regulálják (Eriksson et al, 1998). A tranzíciós pórus feszültség érzékenységének nemcsak transzmembrán komponense figyelhető meg, a belső membrán felületi feszültségét befolyásoló polianionok, ill. polikationok a mPTP nyílást elősegítik, ill. gátolják (Bernardi et al, 1994).

A mPTP nyílás mátrix pH optimuma nem energetizált mitokondriumokban 7.4. Ez alatt az érték alatt a mPTP nyílás valószínűsége kritikus, mátrixban található hisztidin tartalmú domének reverzibilis protonációja következtében csökken. Az alacsony mátrix pH a mPTP-t csukott konformációban tartja membránpotenciál csökkenés esetén is: a szétkapcsoló szer hatására bekövetkező mátrix savasodás megakadályozza a mPTP kinyílását a szétkapcsoló szer  $\Delta\Psi_m$ -t csökkentő hatása ellenére is (Petronilli et al,

1993). A pH optimum felett a mPTP nyílás gátlásának mechanizmusa nem ismert (Nicolli et al, 1993).

A mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórust az I. légzési komplexen keresztül történő elektronflux szintén regulálja, a fokozott elektronáramlás a pórusnyílának kedvez (Fontaine et al, 1998). Ez a megfigyelés vezetett a kinonok szabályozó szerepének a felismeréséhez: az ubikinon 0 és a decilubikinon gátolja, az ubikinon 5 elősegíti a kalcium indukálta mPTP kialakulását (Walter et al, 2002).

Az adenin nukleotid transzlokátor szerepe a permeabilitási tranzíciós pórus strukturális felépítésében modulátorainak mPTP-re gyakorolt hatása kapcsán merült fel. Az atraktilozid, ill. a karboxi-atraktilozid az adenin nukleotid transzlokátort a „C”, azaz citoszol felé néző konformációban stabilizálja, egyben mPTP-t indukál, a bongkregát, ami az ANT „M” úm. mátrix konformációját segíti elő, az előzőekkel ellentétes hatású (Schultheiss & Klingenberg, 1984).

A mPTP egyik fő inhibitora az immunosuppresszáns ciklosporin A (CsA). A ciklosporin a mátrixban található ciklofilin-D chaperon fehérjéhez kötődik nagy affinitással ( $K_d = 5-8$  nM) (Halestrap & Davidson, 1990). A ciklosporin a mPTP kalcium érzékenységét csökkenti, valójában nem gátlószer, inkább deszenzitizátor, ciklosporin jelenlétében nagyobb  $[Ca^{2+}]$  vált ki permeabilitási tranzíciót (Szabo et al, 1992). A ciklofilin-D szerepét a permeabilitási tranzíció modulálásában az a kísérlet mutatja, melyben a ciklofilin-D-t kódoló *Ppif* gént inaktiválták, ennek következtében az eger mitokondriumok  $Ca^{2+}$  retenciós kapacitása mintegy megkétszereződött, a ciklosporinnak ugyanakkor ezekre a *Ppif*<sup>-/-</sup> mitokondriumokra nem volt hatása (Basso et al, 2005). A ciklosporin befolyása a mPTP nyílásra szövetspecifikus: agyi mitokondriumokban a CsA mPTP-t gátló hatása csak meghatározott körülmények között érvényesül (Brustovetsky & Dubinsky, 2000; Chinopoulos et al, 2003).

A mPTP-t effektíven gátolják az adenin nukleotidok: az ADP és az ATP. Az ATP kevésbé hatékony inhibitornak bizonyult, mint az ADP. Az ADP mPTP-t gátló hatásának jellegét Haworth és Hunter határozta meg: az ADP csökkenti a mPTP-t aktiváló  $Ca^{2+}$  kötő hely affinitását a kalciumhoz (Haworth & Hunter, 1980).

A respirációs szubsztrátok jelenléte szintén protektív, védő hatásuk feltehetően a  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  arány megnövelésén és a membránpotenciál felépítésén alapul.

A tranziens, duzzadással nem járó mitokondriális permeabilitási pórus nyílás fiziológias funkciója hipotetikus (Rasola & Bernardi, 2007): szerepe lehet a mitokondriális mátrix pH-jának és redox-státuszának regulálásában, gyors kalcium effluxot mediálhat, a póruson keresztüli piridin-nukleotid kicserélődés a mátrix és a citoplazma között kofaktort és szubsztrátot biztosíthat a mátrixban a 11- $\beta$ -hidroxiláznak a mellékvese kéregben szteroid szintézis során (Pfeiffer & Tchen, 1975), ill. a nukleuszban a poli-ADP-ribóz-polimeráznak a DNS hibajavításhoz (Dodoni et al, 2004).

A mPTP szerepét egyes betegségek patogenezisében a ciklosporin A protektív szerepe vetette fel (Norenberg & Rao, 2007; Rasola & Bernardi, 2007). A CsA protektív hatásának bizonyult hepatotoxicitás (Soriano et al, 2004), hepatokarcinogenezis (Klohn et al, 2003), izomdisztrófia (Irwin et al, 2003), valamint a szívizom reperfüziós károsodása (Griffiths & Halestrap, 1993) esetén. Idős egerek májából és agyából izolált mitokondriumokban szignifikánsan alacsonyabb kalcium koncentráció okoz mPTP-t, mint fiatal egyedekben, ami felveti a mPTP szerepét degeneratív betegségek patogenezisében (Mather & Rottenberg, 2000). A ciklosporin iszkémia (Uchino et al, 1998), trauma (Scheff & Sullivan, 1999), hiper- és hipoglikémia okozta neuronális károsodás (Friberg et al, 1998; Li et al, 1997), kainát indukálta excitotoxicitás (Santos & Schauwecker, 2003), valamint amiotrófiás laterálszklerózis (Keep et al, 2001) esetén is neuroprotektív hatású. Huntington kórban a mutáns huntingtin protein izolált egér máj mitokondriumokban mPTP-t indukál, ami ciklosporinnal meggátolható (Choo et al, 2004). Az Alzheimer-kór patogenezisében szerepet játszó amiloid- $\beta$  peptid ugyancsak ciklosporin-szenzitív citokróm c felszabadulást okoz izolált mitokondriumokból (Kim et al, 2002). Ciklofilin-D-t nem tartalmazó kortikális mitokondriumok egyben ellenállóak a kalcium és az amiloid- $\beta$  indukálta mPTP nyílással szemben (Du et al, 2008). Ugyancsak ciklofilin-D-t nem tartalmazó *Ppif*<sup>-/-</sup> egerekben az arteria cerebri media okklúzióját követő neuronális sejtárosodás lényegesen kisebb mértékű, mint a vad típusban (Schinzel et al, 2005).

A mPTP szerepe az apoptózis és a nekrozis patogenezisében is felmerült. Az apoptózis egyik intrinszik útvonala a mitokondriális útvonal, melynek során apoptogén faktorok: a

citokróm c és az apoptózis proteáz aktiváló faktor (Apaf 1) szabadulnak fel a mitokondriumból és a 9-es prokaspázzal együtt létrehozzák az apoptozóma komplexet, melynek funkciója a prokaspáz 9 aktiválása. A mitokondriumból apoptózis során egyéb apoptogén faktorok: az apoptózis indukáló faktor (AIF), az endonukleáz G, valamint az apoptózis inhibitor (IAP) proteineket antagonizáló DIABLO és Omi fehérjék is felszabadulnak. A Bcl<sub>2</sub> fehérjecsald pro-apoptotikus Bax és Bak fehérjéje a mitokondrium külső membránjába épülve pórust képez, elősegítve a mitokondriális apoptogén faktorok kiáramlását (Rasola & Bernardi, 2007). A mPTP szerepét az apoptózis kiváltásában alapvetően az mPTP-t kísérő citokróm c felszabadulás vetette fel. Zamzami *et al.* kísérleteiben izolált mitokondriumok permeabilitási tranzíciója a mitokondriumokkal együtt inkubált izolált sejtmagokban kromatin kondenzációt és DNS-fragmentációt okoz (Zamzami et al, 1996b). Mindezek mellett mPTP-t gátló faktorok: a ciklosporin A és a bongkregát gátolják a citokróm c kiáramlást és egyben az apoptózis kialakulását (Zamzami et al, 1996a). A pro-apoptotikus Bax protein izolált mitokondriumokon mPTP-t indukál (Narita et al, 1998). A Bax protein sejtvonalon létrehozott fokozott expressziója (Pastorino et al, 1998), ill. a tumor nekrozis faktor-  $\alpha$  receptor stimulációja hepatocitákon ugyancsak permeabilitási tranzíciós pórus nyílást eredményez (Bradham et al, 1998). A Bax protein ko-immunprecipitálódik a mPTP feltételezett regulátoraival, az adenin nukleotid transzlokázzal (Marzo et al, 1998a), ill. a külső membrán feszültségfüggő anion csatornájával (Shimizu et al, 1999). A Bcl<sub>2</sub> fehérjecsald antiapoptotikus tagjai ugyanakkor gátolják a mPTP nyílást (Marzo et al, 1998b). A mPTP szerepét az apoptózisban a mitokondriális citokróm c kompartmentalizációja is felveti. A citokróm c mintegy 85%-ban az interkrisztális térben található, a maradék 15 % az intermembrán térben lokalizálódik (Bernardi & Azzone, 1981). A mitokondriális külső membránon pórust képező Bax és Bak proapoptotikus proteinek így a citokróm c-nek csak elenyésző hányadát tudják felszabadítani, a citokróm c nagyobb arányú kiáramlásához mPTP szükséges, ami az interkrisztális tér átrendeződésével jár (Bernardi et al, 2001). A mPTP apoptózisban betöltött szerepét a fentiekkel ellentétben Brustovetsky *et al.* izolált agy mitokondriumokon végzett kísérletei megkérdőjelezzik: a Bid pro-apoptotikus protein indukálta, Bax, ill. Bak proteineken keresztül történő citokróm c felszabadulást a mPTP gátló ciklosporin és ADP nem akadályozza meg (Brustovetsky et al, 2003b). Eskes *et*

*al.* hasonló eredményre jutottak: izolált mitokondriumokból a Bax protein hatására történő citokróm c kiáramlás inszenzitívnek bizonyult ciklosporinra és bongkregátra (Eskes et al, 1998). Az apoptotikus sejthalál mellett a mPTP a nekrosis patomechanizmusában is szerepet játszhat: ciklofilin-D knock-out egerekben különböző apoptogén faktorok képesek voltak apoptózist indukálni, ellenben reaktív oxigénszármazékok és kalcium terhelés nem tudtak kiváltani nekrozist (Nakagawa et al, 2005).



## 4. Célkitűzések

Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a kalcium az izolált agyi mitokondriumok reaktív oxigénszármazék termelését.

Munkánkkal a glutamát excitotoxicitás patomechanizmusának azt a folyamatát kívántuk tisztázni, melynek során az intracelluláris kalcium koncentráció tartós megemelkedését követően fokozott celluláris ROS képzés tapasztalható. Izolált mitokondrium kísérleti modellen végzett vizsgálatainkkal azt a kérdést kívántuk megválaszolni, hogy a glutamát excitotoxicitás következtében megnövekedő intracelluláris kalcium koncentráció fokozza-e a mitokondriumok ROS képzését.

A tudományos közvélekedésben általánosan elfogadott tézis, hogy a patológiás körülmények között magas kalcium expozíciónak kitett mitokondriumok reaktív oxigén származékokat termelnek.

Neuronális sejt kultúrán végzett vizsgálatok, melyekben a glutamát receptorok tartós ingerlését követő fokozott celluláris ROS képzés modulálható mitokondriális légzési komplex gátlókkal, ill. szétkapcsoló szerekkel, alátámasztják azt a hipotézist, mely szerint a mitokondriumok glutamát toxicitás esetén hozzájárulnak a sejt fokozott ROS képzéséhez (Abramov et al, 2007; Bindokas et al, 1996; Dugan et al, 1995; Reynolds & Hastings, 1995; Sengpiel et al, 1998; Vesce et al, 2004).

Izolált mitokondriumok esetén azonban a kalcium ROS termelésre gyakorolt hatását illetően az irodalmi adatok messze nem egybehangzóak. Izolált mitokondriumon a kalcium ROS termelést csökkentő hatásáról számol be (Brustovetsky et al, 2003a; Chalmers & Nicholls, 2003; Panov et al, 2007; Starkov et al, 2002; Zoccarato et al, 2004). Ezzel ellentétben (Brustovetsky et al, 2003a; Dykens, 1994; Hansson et al, 2008; Kanno et al, 2004; Kowaltowski et al, 1995; Kowaltowski et al, 1996; Kowaltowski et al, 1998; Maciel et al, 2001; Petrosillo et al, 2004; Starkov et al, 2002; Votyakova & Reynolds, 2005) kalcium hatására fokozott ROS képzést mért. (Panov et al, 2007)

kísérleteiben a kalcium nem változtatta meg a mitokondriális ROS képzést. A szakirodalmi adatok a kalcium ROS termelést befolyásoló hatására vonatkozólag nehezen egyeztethetőek, ill. összehasonlíthatóak az egyes kísérleti kondíciók különbözősége miatt. A különböző légzési szubsztrátok, a légzési komplex gátlók, az adenin nukleotidok és a kalcium hatására bekövetkező mPTP nyílás nagy mértékben befolyásolják a mitokondriális ROS termelést, egyben a kalcium ROS termelésre gyakorolt hatását is, így az eltérő kísérleti körülmények eltérő eredményekhez is vezetnek (Adam-Vizi & Starkov, 2010).

Munkánkban arra törekedtünk, hogy tisztázzuk a kalcium mitokondriális ROS termelésre gyakorolt hatását, egyben meghatározzuk azokat a mechanizmusokat, melyek szerint a kalcium befolyásolja a mitokondriális ROS termelést. Eredményeinkkel reményeink szerint a megoszló szakirodalmi adatok értelmezéhez is hozzá tudunk járulni.

Kísérleteink során tehát a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Megváltoztatja-e a kalcium az izolált mitokondrium ROS termelését?
- 1.1. Hogyan befolyásolja a mitokondriális membránpotenciál a kalcium ROS termelésre gyakorolt hatását?
- 1.2. A kalcium hatása a mitokondriális ROS termelésre hogyan függ a légzési szubsztrátok típusától?
- 1.3. Hogyan hat a kalcium indukálta mPTP nyílás a mitokondrium ROS termelésére?
- 1.4. A piridin nukleotidok mennyisége és oxidációs státusza hogyan változik kalcium és kalcium indukálta mPTP nyílás hatására?

## 5. Módszerek

### 5.1. Mitokondrium preparálás

A mitokondriumok izolálása tengeri malac agykéregből történt Percoll grádiens alkalmazásával. Az izolációs puffer a következőket tartalmazta (mM-ban): 225 mannitol, 75 szukróz, 5 4-(2-hydroxietyl)-1-piperazinétánszulfonsav (HEPES), 1 etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), pH 7.4 (KOH). Két tengerimalac dekapitálását követően a szeparált agykérget jégbe hűtött izolációs pufferbe helyeztük, ollóval feldaraboltuk és az izolációs pufferrel többször átmostuk. Az agyszövetet izolációs pufferben teflon homogenizátorral homogenizáltuk. A mintát 2 centrifugacsőben 4 °C-on 3 percig 4000 fordulat/ perc sebességgel lecentrifugáltuk. Ezt követően a felülúszót 10 percig centrifugáltuk 16000 fordulat/perc fordulatszámom. A második centrifugálás alatt a Percoll grádiens a következőképpen készítettük elő: 4 kémcsőbe egyenként 3.5 ml 23 V/V %-os Percoll oldatot pipettáztunk, ez alá rétegeztünk 1.5 ml 40 V/V %-os Percoll oldatot. A centrifugálás után a csapadékot reszuszpendáltuk egyenként 3.4 ml 15 V/V %-os Percoll oldatban, amit a 4 kémcsőbe a grádiens fölé rétegeztünk. A 4 kémcsövet lecentrifugáltuk 8 percig 19800 fordulat/perc fordulatszámom. A felső két frakciót aspiráltuk, a legalsó, mitokondriumokat tartalmazó frakcióból 1.5 ml mintát vettünk, reszuszpendáltuk az izolációs pufferben és lecentrifugáltuk 10 percig 14500 fordulat/perc fordulatszámom. A csapadékot reszuszpendáltuk 5 ml izolációs pufferben és 10 percig centrifugáltuk 9200 fordulat/perc sebességgel (Sims, 1990). Az utolsó centrifugálás után a mitokondriumot tartalmazó csapadékot 60 µl, fenti összetételű, de EGTA mentes izolációs pufferben oldottuk fel, majd a mitokondrium szuszpenziót jégbe tettük és hűtőszekrényben (4 °C) tároltuk. A végső mitokondrium szuszpenzió átlagosan 35 mg/ml fehérjét tartalmazott. A méréseket megelőzően Clark-típusú oxigén elektróddal (Hansatech Oxygraph Measurement System, Hansatech, Norfolk, United Kingdom; ill. Oxygraph-2k, Ororboros Instruments, Innsbruck, Austria) meghatároztuk a mitokondriumok respirációs kontroll hányadosát (RCR: respiratory controll ratio). A kísérletekhez glutamát és malát respirációs szubsztrátok esetén 12, szukcinát

alkalmazásakor 4.5, ill. ezeknél magasabb RCR értékű mitokondriumokat használtunk fel. Az állatkísérletek megfeleltek a Semmelweis Egyetem állatkísérletekre vonatkozó előírásainak.

## 5.2. Mérési médium

A kísérletekhez használt mérő puffer összetétele a következő volt (mM-ban): 125 KCl, 20 HEPES, 2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 EGTA, 0.1 hidroxietil-etiléndiamin-triacetsav (HEDTA), 0.025% marha szérum albumin (BSA: bovine serum albumin), pH 7.0 (KOH). Adenin nukleotidokat alkalmazó mérések esetén a mérőpuffer 1 mM MgCl<sub>2</sub> helyett 2.86 mM MgCl<sub>2</sub>-t tartalmazott, hogy az ADP, ill. az ATP magnéziumot kötő kapacitása miatt a szabad MgCl<sub>2</sub> koncentráció 1 mM maradjon. ADP-t tartalmazó mérő pufferben az ADP koncentrációja 2 mM volt, ebben az esetben a puffer nem tartalmazott sem EGTA-t, sem HEDTA-t, az ADP kalcium kötő kapacitása miatt azonban a szabad [Ca<sup>2+</sup>] kevesebb volt, mint 1 μM. A szövegben, ill. az ábrákon jelölt kalcium koncentráció szabad kalcium koncentrációként értendő. A hozzáadott összes kalcium koncentrációjának meghatározása a Chelator szoftverrel történt (Schoenmakers et al, 1992). A szabad [Ca<sup>2+</sup>]-t Fura-6F-fel ellenőriztük.

## 5.3. A mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés mérése

A mitokondrium H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelését extramitokondriálisan detektáltuk Amplex Red fluoreszcens festékkel, amely tormaperoxidáz jelenlétében 1:1 sztöchiometriával reagál H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal fluoreszcens rezorufint eredményezve. 2 ml mérési médiumhoz 1 μM Amplex Red reagenst, 5 U/ 2 ml HRP-t, ezt követően 0.1 mg/ml mitokondriumot adtunk. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést glutamát és malát (5-5 mM), ill. szukcinát (5 mM) légzési szubsztrátokkal iniciáltuk. A fluoreszcenciát 37 °C-on mértük Deltascan fluoreszcencia spektrofotométer (Photon Technology International, PTI, Lawrenceville, New Jersey, USA) segítségével 550 és 585 nm excitációs, ill. emissziós hullámhosszon. A mérések végén a kalibrációt 100 pmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hozzáadásával végeztük.

#### 5.4. NAD(P)H+H<sup>+</sup> autofluoreszcencia mérés

A mitokondriális mátrix NAD(P)H+H<sup>+</sup> autofluoreszcenciáját a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> méréssel szimultán detektáltuk Deltascan fluoreszcencia spektrofotométeren (Photon Technology International, PTI, Lawrenceville, New Jersey, USA) két excitációs és emissziós hullámhosszat alkalmazva. A NAD(P)H+H<sup>+</sup> autofluoreszcenciát 344 és 460 nm excitációs, ill. emissziós hullámhosszon mértük. A NADPH+H<sup>+</sup> és a NADH+H<sup>+</sup> autofluoreszcenciája ezzel a mérési módszerrel nem megkülönböztethető, így kísérleteinkben a két nukleotid (NAD(P)H+H<sup>+</sup>) együttes fluoreszcenciáját mértük.

#### 5.5. A mitokondriális NAD<sup>+</sup>+ NADH+H<sup>+</sup> mennyiség meghatározása

A mitokondrium NAD<sup>+</sup>+ NADH+H<sup>+</sup> tartalmát (Bernofsky & Swan, 1973) szerint határoztuk meg. A mitokondriumokat Triton X-100 detergenssel permeabilizáltuk, majd 200 µg fehérjét tartalmazó mitokondrium szuszpenziót a következő összetételű médiumba helyeztünk: 0.2 mg alkohol-dehidrogenáz, 0.5 mM 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium-bromid (MTT), 0.2 mM fenazin etoszulfát (PES), 0.6 M etanol, 50 mM trisz(hidroximetil)-aminometán hidroklorid (Tris-HCl), 0.5 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), pH 7.8. A sorozatos oxido-redukciók folyamán az alkohol-dehidrogenáz redukálja a NAD<sup>+</sup>-t, a keletkező NADH+H<sup>+</sup>-ról az elektronok a PES-on keresztül a MTT-ra kerülnek. A MTT optikai denzitását 37 °C-on mértük 570 nm hullámhosszon GBC UV/VIS 920 spektrofotométeren. A mérés folyamán az oxidálódó NADH+H<sup>+</sup> reciklálódik, így az optikai denzitás növekedésének a sebessége arányos a NAD<sup>+</sup>+ NADH+H<sup>+</sup> koncentrációjával. A kalibrációhoz ismert mennyiségű NAD<sup>+</sup>-ot használtunk.

#### 5.6. Membránpotenciál meghatározás

A mitokondriális membránpotenciál meghatározását a Safranine O fluoreszcens festékkel végeztük, amely pozitív töltésénél fogva akkumulálódik a mátrixban (Akerman & Wikstrom, 1976). A mitokondriális membránpotenciál kiépülésével

párhuzamosan a Safranin O a mitokondriális mátrixba diffundál, ott oligomerizálódik, a festék oligomerizált formája elnyeli a fluorofór által emittált fényt, így az emissziós hullámhosszon mért fluoreszcencia intenzitás a belső membrán polarizációjával csökken. A fluoreszcencia detektálása 37 °C-on, 495 és 586 nm-es excitációs és emissziós hullámhosszon történt Deltascan fluoreszcencia spektrofotométerrel (Photon Technology International, PTI, Lawrenceville, New Jersey, USA) vagy Hitachi F-450 spektrofluoriméterrel (Hitachi High Technologies, Maidenhead, United Kingdom). 2 ml mérési térfogatban 2 µM festéket és 0.1 mg/ml proteint alkalmaztunk. A safranin fluoreszcenciát Akerman és Wikstrom kalibrálta izolált máj mitokondriumon (Akerman & Wikstrom, 1976), izolált agyi mitokondriumon az Akerman és Wikstrom szerint meghatározott kalibráció saját kísérleteinkben nem volt reprodukálható.

A mitokondrium membránpotenciálját tetrametilrodamin-metil-észterrel (TMRM) is meghatároztuk (Scaduto & Grotyohann, 1999) szerint. 2 ml inkubációs médiumban 100 nM TMRM-t oldottunk fel, ezt követte a 0.1 mg/ml mitokondriális fehérje, és az 5 mM koncentrációjú légzési szubsztrátok hozzáadása. A fluoreszcencia méréséhez két excitációs: 546, ill. 573 nm-es hullámhosszat használtunk, az emissziós hullámhossz 590 nm volt. Az 546-590, ill. a 573-590 nm-es hullámhossz arányát detektáltuk Deltascan fluoreszcencia spektrofotométer (Photon Technology International, PTI, Lawrenceville, New Jersey, USA) segítségével. Tekintve, hogy a méréseinkben használt fehérje koncentráció a TMRM kalibrációjához szükséges fehérje koncentrációnál (Scaduto & Grotyohann, 1999) alacsonyabb volt, TMRM kalibrációt nem végeztünk. A kalibráció a membránpotenciál más módszerrel történő szimultán meghatározásával is lehetséges, a TPP<sup>+</sup> elektróddal történő membránpotenciál méréshez ugyancsak magasabb fehérje koncentráció szükséges, mint a kísérleteinkben alkalmazott fehérje koncentráció (Kamo et al, 1979), így méréseinkben a membránpotenciál változást csak kvalitatíve érzékeltük.

## **5.7. A mitokondriális duzzadás mérése**

A mitokondriumok duzzadását fényszórás segítségével határoztuk meg Deltascan fluoreszcencia spektrofotométerrel (Photon Technology International, PTI,

Lawrenceville, New Jersey, USA) vagy Hitachi F-450 spektrofluoriméterrel (Hitachi High Technologies, Maidenhead, United Kingdom) 660 nm excitációs és emissziós hullámhosszon. A mitokondriális duzzadás mérése a  $\Delta\Psi_m$  Safranin O fluoreszcens festékkel történő meghatározásával párhuzamosan történt, ugyanazon a spektrofluoriméteren.

### **5.8. A mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus meghatározása kalcein fluoreszcenciával**

100  $\mu$ l 35 mg/ml protein koncentrációjú mitokondriumot 100  $\mu$ M ADP-t és a kalcein acetoximetilészter formáját (kalcein-AM) 2  $\mu$ M koncentrációban tartalmazó izoláló pufferben inkubáltunk 10 percig 25 °C-on. A membrán-permeábilis kalcein-AM-ből a mitokondriális észterázok hatására szabad, fluoreszkáló kalcein szabadul fel a mátrixban, ez utóbbi hidrofíl tulajdonságánál fogva nem jut ki a mitokondriumból. Az inkubációt követően a mitokondriumokat háromszor átmostuk ADP nélküli izolációs pufferben (10 000 g, 2 min) a nem hidrolizált kalcein-AM-t eltávolítandó. Az utolsó centrifugálás után a mitokondriumokat 13  $\mu$ l izolációs médiumban feloldottuk és jég közé téve, fénytől elzárva hűtőben (4 °C) tároltuk. A méréshez 2.5  $\mu$ l mitokondriumot használtunk 2 ml mérő pufferben. A mérési médium 20  $\mu$ M  $\text{CoCl}_2$ -t tartalmazott, amely elnyeli a kalcein fluoreszcenciáját mPTP nyílás esetén. A fluoreszcenciát 494 és 525 nm-es excitációs és emissziós hullámhosszon detektáltuk. A kalcein fluoreszcencia mérést (Petronilli et al, 1999) szerint végeztük.

### **5.9. A mitokondriális permeabilitási pórus meghatározása transzmissziós elektron mikroszkóppal**

A mérőpufferben lévő izolált mitokondriumokat lecentrifugáltuk (10 000 g, 10 perc), a csapadékot 4%-os glutáraldehydben és 175 mM-os nátrium kakodilát pufferben (pH 7.5) egy éjszakán át 4 °C -on fixáltuk, ezt követően 1%-os osmium tetroxidban 100 percig utófixáltuk, majd etilalkohollal és propilén oxiddal dehidráltuk, végül Durcupanba

ágyasztuk. A szeleteket JEOL 1200 EMX (Peabody, MA, USA) transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

### **5.10. A mitokondriális kalcium felvétel**

A mitokondriális kalcium felvétel meghatározása 2 mM ADP-t tartalmazó mérőpufferben történt. A mérőpuffer nem tartalmazott sem EGTA-t, sem HEDTA-t, az ADP kalcium kötő kapacitása következtében a puffer szabad  $[Ca^{2+}]$ -ja azonban kevesebb volt 1  $\mu$ M-nál. A kalcium felvétel mérést 50  $\mu$ M szabad  $[Ca^{2+}]$  esetén calcium green-5N-nel (2 ml mérőpufferben 100 nM festék), 300  $\mu$ M szabad  $[Ca^{2+}]$  esetén Rhod-5N-nel (2 ml mérőpufferben 1  $\mu$ M festék) végeztük. A hozzáadott összes kalcium koncentrációjának meghatározása a Chelator szoftverrel történt (Schoenmakers et al, 1992). A calcium green-5N fluoreszcenciáját 506 és 532 nm, a Rhod-5N fluoreszcenciáját 551 és 577 nm excitációs, ill. emissziós hullámhosszon mértük 37 °C-on Deltascan fluoreszcencia spektrofotométer (Photon Technology International, PTI, Lawrenceville, New Jersey, USA) segítségével. A fluoreszcencia intenzitást ismert mennyiségű kalcium pulzusokkal létrehozott kalibrációs skálával kalibráltuk.

### **5.11. Statisztika**

A statisztikai számításokhoz többszörös összehasonlítás esetén variancia analízist (ANOVA, SIGMASTAT, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA), az egyszerű összehasonlításhoz Student-féle t-próbát használtunk.

### **5.12. Vegyszerek**

Az összes standard laboratóriumi vegyszer a Sigma (St Louis, MO, USA), az Amplex Red reagens, a Calcium Green-5N és a Rhod-5N az Invitrogen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) terméke.

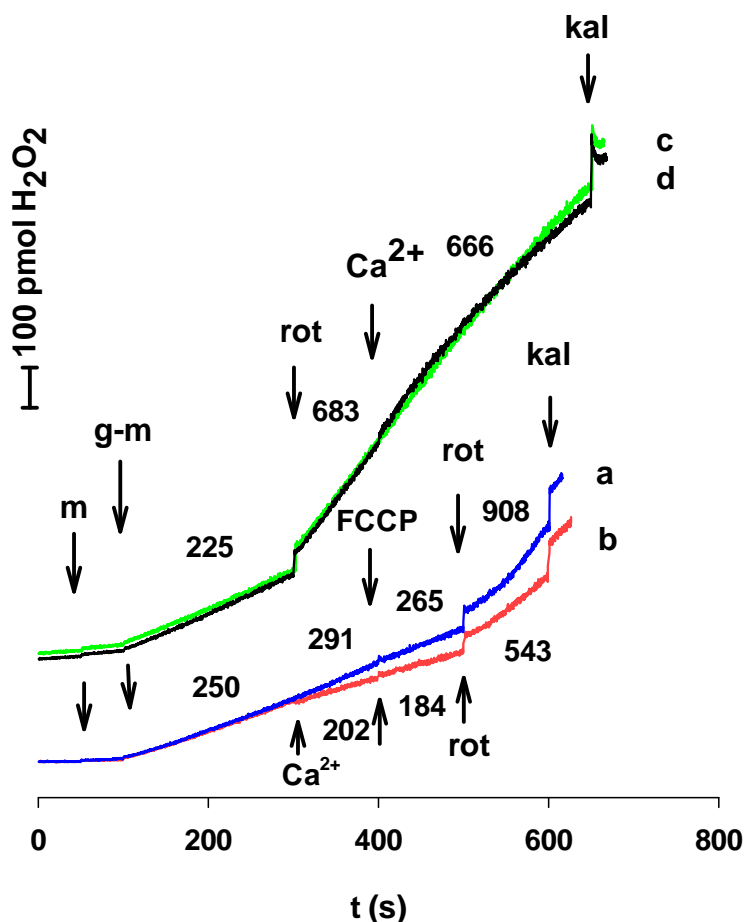


## 6. Eredmények

### 6.1. A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a mitokondriális $\text{H}_2\text{O}_2$ termelésre adenin nukleotid mentes médiumban

A glutamáttal és maláttal mint I. légzési komplex szubsztrátokkal energetizált mitokondriumok alap  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelése  $257 \pm 9$  pmol/min/mg protein volt a Módszerek c. fejezetben bemutatott Amplex Red fluoreszcens mérés szerint. Az alap  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés az inkubációs idő előrehaladtával valamelyest emelkedett (250-ről 291 pmol/min/mg-ra 200 szekundumon belül; 7. ábra, *a* görbe), ezt a növekvő tendenciát figyelembe vettük a  $\text{Ca}^{2+}$  ROS termelésre gyakorolt hatásának értékelésénél. A mérés kezdete után 300 szekundummal hozzáadott  $10 \mu\text{M}$  [ $\text{Ca}^{2+}$ ] (7. ábra, *b* görbe) szignifikánsan csökkentette a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelést (202 *versus* 291 pmol/min/mg protein; 7. ábra, *b versus a* görbe), 17 mérés átlaga alapján  $21.8 \pm 1.6\%$ -kal.  $10 \mu\text{M}$  [ $\text{Ca}^{2+}$ ] a ROS termelést maximálisan csökkentette, e felett az érték felett, a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt  $100 \mu\text{M}$ -ig emelve a  $\text{Ca}^{2+}$  hatása nem mutatott koncentrációfüggést. A  $\text{Ca}^{2+}$  után adott szétkapcsolószer karbonilcianid-p-trifluorometoxifenilhidrazon (FCCP) a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelést csökkentette, az 500 szekundumkor adott  $1 \mu\text{M}$  rotenon, az I. légzési komplex gátlószere a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelést nagy mértékben felgyorsította. A rotenon nagyobb mértékben fokozta a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelést kontroll körülmények között, mint  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében (7. ábra, *a, b* görbe).

Az I. respirációs komplex  $1 \mu\text{M}$  rotenonnal való teljes blokkolását követően a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés jelentősen fokozódott (7. ábra, *c, d* görbe), azonban a rotenon után adott  $\text{Ca}^{2+}$  nem változtatott a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés sebességén (7. ábra *d* görbe). A  $\text{Ca}^{2+}$  -nak ugyanígy nem volt hatása a ROS termelésre az I. komplex parciális,  $20 \text{ nM}$  rotenonnal történő blokkolása esetén (nincs ábrázolva). Ezek a kísérleteink nem erősítik meg (Sousa et al, 2003; Votyakova & Reynolds, 2005) eredményeit, akik rotenon jelenlétében a kalcium ROS fokozó hatásáról számoltak be.



7. ábra

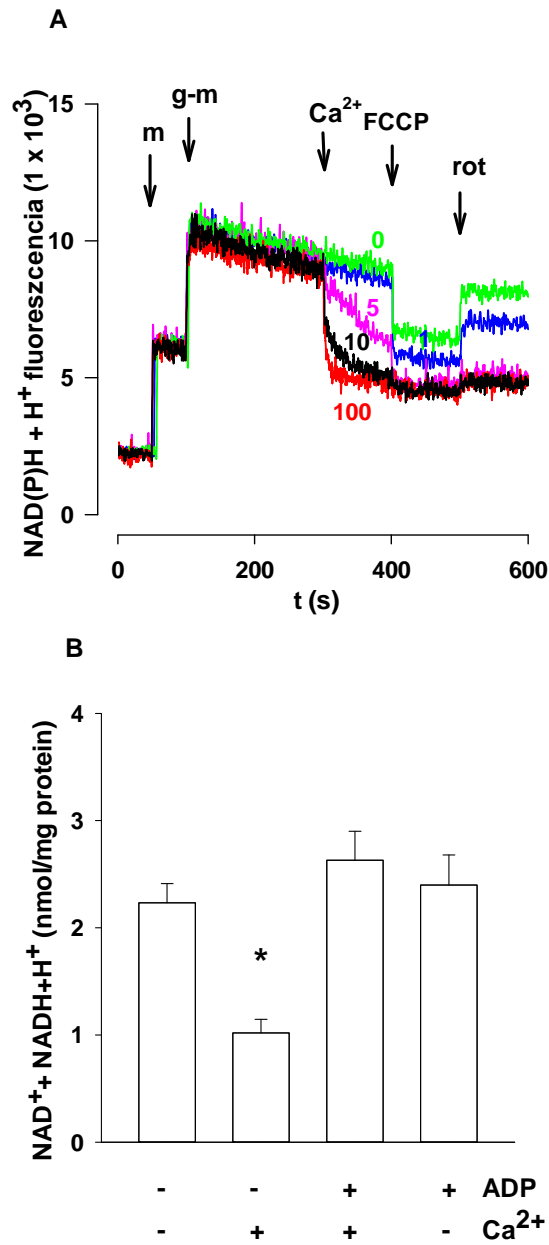
### A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a $\text{H}_2\text{O}_2$ képzésre glutamáttal és maláttal energetizált mitokondriumokban

A 300 s-kor adott  $10 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  hatását (b görbe) hasonlítottuk össze a kontroll görbével (a görbe), ahol nem történt  $\text{Ca}^{2+}$  adás. 250 nM FCCCP-t és  $1 \mu\text{M}$  rotenont (rot) a megjelölt időpontokban adtunk hozzá az a és b görbékhez. A d görbén  $1 \mu\text{M}$  rotenon után adtunk  $10 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$ -t, a c görbe a kontroll, ahol a rotenon hozzáadását nem követte  $\text{Ca}^{2+}$  adás. A mitokondrium (m; 0.1 mg/ml) 50, a glutamát és a malát (g-m; 5-5 mM) hozzáadása 100 s-kor történt. A c és a d görbét eltoltuk a jobb átláthatóság kedvéért. A mérések végén a kalibráció (kal) ismert mennyiségű  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal történt. A görbék fölött a számok a  $\text{H}_2\text{O}_2$  képzés sebességét mutatják pmol/min/mg egységben.

## 6.2. A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a mitokondriális $\text{NAD(P)H+H}^+$ szintre

A  $\text{NAD(P)H+H}^+$  autofluoreszcenciát a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termeléssel párhuzamosan mértük. A  $\text{Ca}^{2+}$  hozzáadása a  $\text{NAD(P)H+H}^+$  fluoreszcenciájában azonnali esést okozott (8/A ábra), a  $\text{Ca}^{2+}$  hatása a  $\text{NAD(P)H+H}^+$  szintre koncentrációfüggőnek mutatkozott:  $5 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  részlegesen,  $10 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  maximálisan csökkentette a  $\text{NAD(P)H+H}^+$  szignált.  $10 \mu\text{M}$  vagy annál magasabb  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció esetén a depolarizáló hatású FCCP nem volt képes lényegesen tovább csökkenteni a  $\text{NAD(P)H+H}^+$  szintet. Az FCCP után alkalmazott rotenon  $\geq 5 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  esetén nem tudta a  $\text{NAD(P)H+H}^+$  szintet jelentős mértékben emelni. Mind az FCCP, mind a rotenon hatása arra utal, hogy  $\geq 5 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  a mitokondriumban  $\text{NAD(P)}^+$  veszteséget indukál.

A mitokondriális  $\text{NAD}^+$  +  $\text{NADH+H}^+$  Módszerek c. fejezetben részletezett, kvantitatív meghatározása azt mutatta, hogy ADP mentes médiumban a mitokondrium teljes  $\text{NAD}^+$  +  $\text{NADH+H}^+$  mennyiségének  $56 \pm 5.6\%$ -a veszett el  $10 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  hatására (8/B ábra).



### 8. ábra

A  $\text{Ca}^{2+}$  hatása a  $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$  autofluoreszcenciára (A) és a  $\text{NAD}^+ + \text{NADH} + \text{H}^+$  mennyiségre (B)

A) Az alkalmazott  $[\text{Ca}^{2+}]$ -t a görbék feletti számok jelölik  $\mu\text{M}$ -ban. A mitokondrium (m; 0.1 mg/ml), a glutamát és malát (g-m; 5-5 mM), az FCCP (250 nM) és a rotenon (rot; 1  $\mu\text{M}$ ) hozzáadását nyilak jelölik. B) A mitokondriumokat (0.1 mg/ml) glutamát és malát

(5-5 mM) jelenlétében inkubáltuk a mérési médiumban. Ahol a + jelek mutatják, ADP-t (2 mM) és/ vagy  $Ca^{2+}$ -ot (10  $\mu$ M) adtunk 200, ill. 400 s-kor, az inkubációt 10 percig folytattuk. A mintákat lecentrifugáltuk és a  $NAD^{+} + NADH+H^{+}$  mennyiségét a Módszerek c. fejezetben leírtak szerint meghatároztuk. Az eredmények 4 mérés átlagát  $\pm$  az átlag standard hibáját mutatják. A \* a szignifikáns különbséget jelöli a kontrollhoz képest ( $p < 0.05$ ).

### 6.3. A $Ca^{2+}$ hatása a membránpotenciálra, a fényezésre és a mPTP nyílásra

A kalcium ROS termelésre és piridin nukleotidokra gyakorolt hatása mellett megvizsgáltuk, hogy adenin nukleotid mentes médiumban kalcium hatására hogyan változik a mitokondriális membránpotenciál, valamint hogy a kalcium az alkalmazott koncentrációkban okoz-e mitokondriális duzzadást és mPTP nyílást.

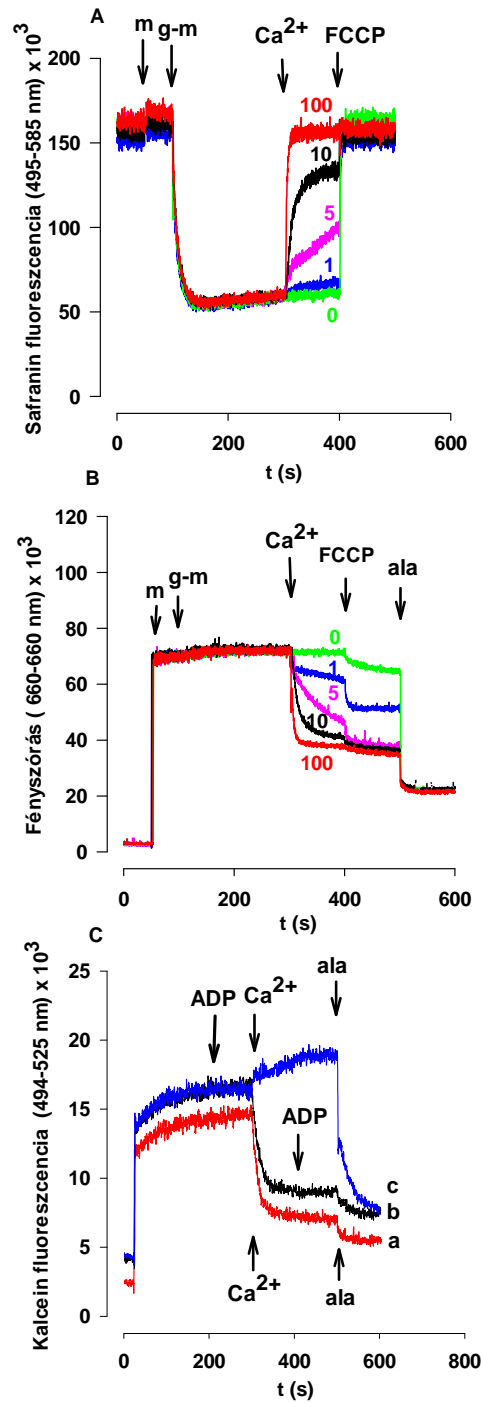
A mitokondriális membránpotenciált Safararin fluoreszcenciával mértük (9/A ábra). Az I. respirációs komplex szubsztrátok hozzáadását követően felépült membránpotenciált a  $Ca^{2+}$  mind az öt alkalmazott koncentrációban (1, 5, 10, 100  $\mu$ M) csökkentette, maximális depolarizációt a szétkapcsolószer FCCP eredményezett.

A kalcium a mitokondriumok duzzadását jelző fényezésre szignált (9/B ábra) is csökkentette a felhasznált koncentrációkban (1, 5, 10, 100  $\mu$ M). A mérések végén a pórust formáló antibiotikum, az alameticin hatása mutatja a fényezésre maximális csökkenését, ami a mitokondriális belső membrán teljes átjárhatósága következtében kialakuló maximális duzzadást jelöli.

A 10  $\mu$ M [ $Ca^{2+}$ ] hatására bekövetkező  $NAD^{+} + NADH+H^{+}$  veszteség, a mitokondriális belső membrán depolarizációja valamint a duzzadás a mPTP nyílására utalnak. A belső membrán permeabilizációját 10  $\mu$ M [ $Ca^{2+}$ ] hatására a kalcein fluoreszcenciájának mérésével bizonyítottuk a Módszerek c. fejezetben részletezettek szerint. A kalceinnel töltött mitokondriumokat  $CoCl_2$ -t tartalmazó mérési médiumba helyeztük. A  $CoCl_2$

csökkenti a kalcein fluoreszcenciáját, amennyiben a mitokondrium belső membránja átjárhatóvá válik. 10  $\mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  hatására csökkent a kalcein fluoreszcenciája (9/C ábra, *a* görbe), ezt a csökkenést a  $\text{Ca}^{2+}$  után adott, pórusformáló alameticin elenyésző mértékben volt képes tovább fokozni. A 10  $\mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  után, 400 szekundumkor adott ADP nem zárta vissza a permeabilitási tranzíciós pórust (9/C ábra, *b* görbe). A mPTP gátló ADP jelenlétében 10  $\mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  nem okozott permeabilitási tranzíciót, a kalcein fluoreszcenciája nem csökkent  $\text{Ca}^{2+}$  hatására (9/C ábra, *c* görbe).

A mitokondriális permeabilitási pórus nyílást transzmissziós elektron mikroszkópos felvételekkel is detektáltuk (10. ábra). Kalcium inzultus nélkül a mitokondriumok alakja szabályos, külső és belső membránjaik integritása megtartott, mátrixukban a kriszták szabályos elrendeződést mutatnak (10/A ábra). A 10  $\mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$ -nak kitett mitokondriumok a mPTP nyílás jeleit mutatják: duzzadtak, külső és belső membránjuk szakadozott, kriszta szerkezetük szabálytalan (10/B ábra).



9. ábra

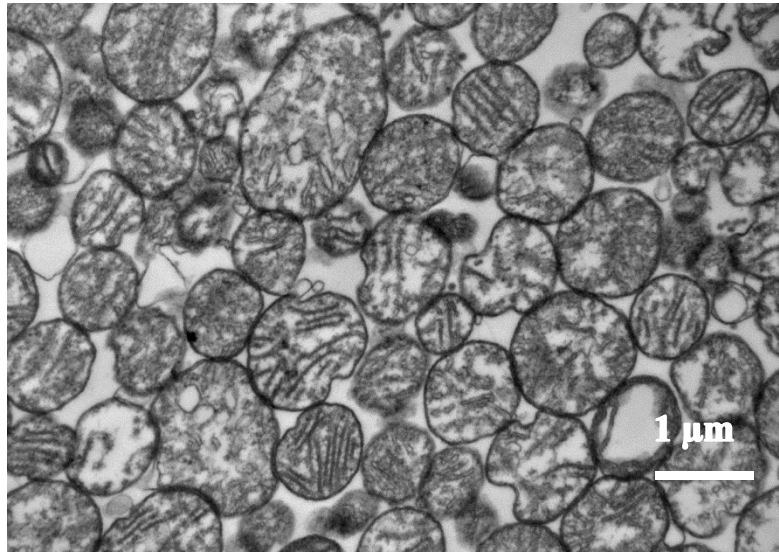
A  $\text{Ca}^{2+}$  hatása a membránpotenciálra (A), a fényszórásra (B) és a kalcein fluoreszcenciára (C)

*A,B)* A  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációkat a görbék feletti számok mutatják  $\mu\text{M}$ -ban. A mitokondrium ( $m$ ; 0.1 mg/ml), a glutamát és malát ( $g-m$ ; 5-5 mM), az FCCCP (250 nM), és az

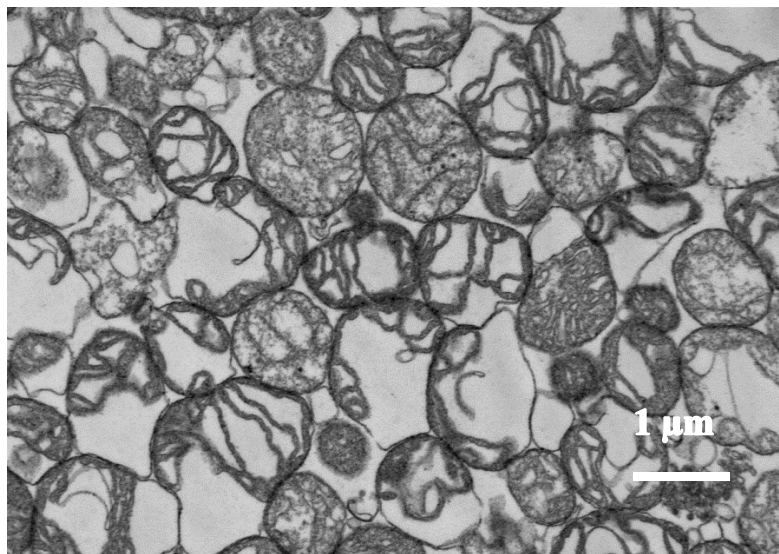
*alameticin (ala; 0.04 mg/ml) addíciót a nyilak jelölik. C) A mitokondriumokat kalceinnel töltöttük a Módszerek c. fejezetben leírtak szerint, majd a mitokondriumokat glutamátot és malátot (5-5 mM), valamint CoCl<sub>2</sub>-t (20 μM) tartalmazó mérési médiumba helyeztük. A reagensek a következők voltak: **a** görbe: 300 s-kor 10 μM [Ca<sup>2+</sup>]; **b** görbe: 300 s-kor 10 μM [Ca<sup>2+</sup>], 400 s-kor 2 mM ADP, **c** görbe: 200 s-kor 2 mM ADP, 300 s-kor 10 μM [Ca<sup>2+</sup>]. Mindhárom mérés végén alameticint (ala; 0.04 mg/ml) adtunk a médiumba. A **b** és a **c** görbét eltoltuk az átláthatóság kedvéért.*



**A**



**B**



**10. ábra**

**A mitokondriumok morfológiája transzmissziós elektron mikroszkópos felvételen kalcium inzultus nélkül (A) és kalcium hatására (B) adenin nukleotid mentes médiumban**

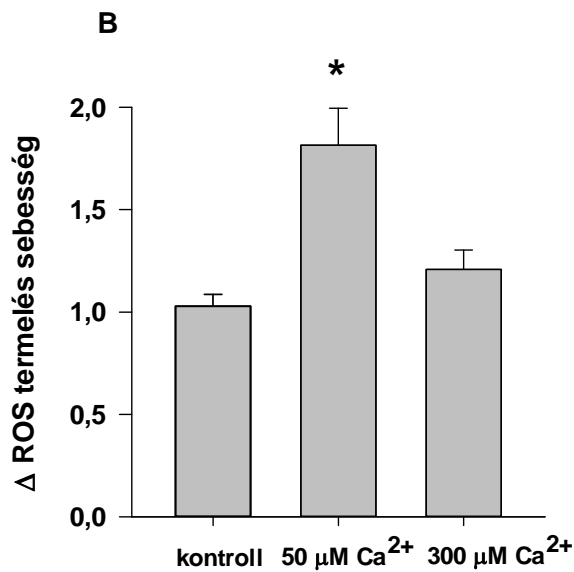
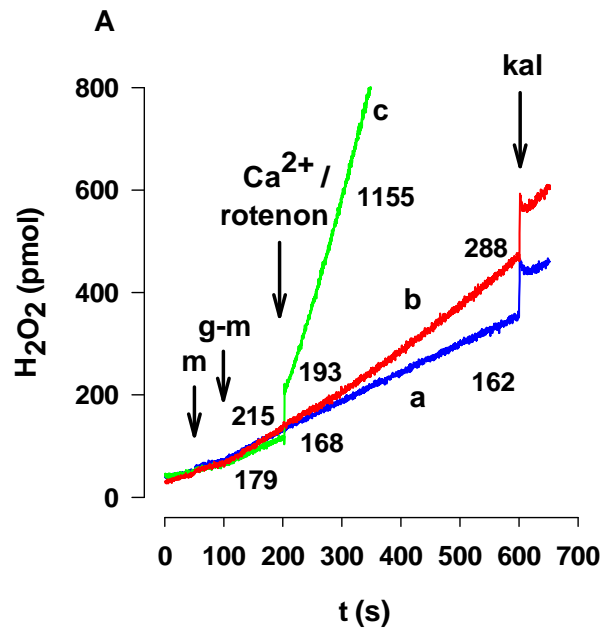
*A) 2 ml mérőpufferbe a mitokondriumok (0.1 mg/ml) hozzáadása után 50 s-kor glutamátot és malátot adtunk (5-5 mM) B) 2 ml mérőpufferbe a mitokondriumok (0.1*

*mg/ml) hozzáadása után 50 s-kor glutamátot és malátot (5-5 mM), 250 s-kor 10  $\mu$ M  $[Ca^{2+}]$ -t adtunk **A,B**) az utolsó hozzáadást követő 5 perces inkubáció után a mitokondriumokat a Módszerek c. fejezetben leírtaknak megfelelően kezeltük*

#### **6.4. A $Ca^{2+}$ hatása a mitokondriális $H_2O_2$ termelésre ADP jelenlétében**

A kalcium ROS termelést befolyásoló hatását a mPTP gátló ADP jelenlétében is megvizsgáltuk.

Glutamáttal és maláttal energetizált mitokondriumok  $H_2O_2$  termelését 2 mM ADP-t tartalmazó médiumban mértük Amplex Red fluoreszcens festékkel. Kétféle: 50 és 300  $\mu$ M kalcium koncentráció ROS termelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk. ADP jelenlétében az alap  $H_2O_2$  termelés  $188.6 \pm 10.1$  pmol/min/mg protein volt 25 mérés átlagát tekintve. Ez az érték az ADP depolarizáló hatása miatt alacsonyabb, mint az ADP mentes médiumban mért alap  $H_2O_2$  termelés ( $257 \pm 9$  pmol/min/mg). 50  $\mu$ M  $[Ca^{2+}]$  a  $H_2O_2$  termelést a  $Ca^{2+}$  addíciót követő 100-150 s után elkezdte növelni (11/A ábra, *b* görbe), összesen 7 perc inkubáció alatt a  $H_2O_2$  képződés sebessége  $181.4 \pm 18\%$ -ra változott 8 mérés alapján. Ez szignifikáns különbséget jelent a kontrollhoz képest (11/B ábra). 10, ill. 100  $\mu$ M  $[Ca^{2+}]$  ADP jelenlétében hasonló hatást eredményezett, így ebben a koncentrációtartományban a  $Ca^{2+}$  ROS termelésre gyakorolt hatása nem mutatott szignifikáns koncentrációfüggést. A 11/A ábra azt is bemutatja, hogyan viszonyul ez a  $Ca^{2+}$  okozta  $H_2O_2$  termelés növekedés 1  $\mu$ M rotenon hatásához (11/A ábra *b versus c* görbe). 300  $\mu$ M  $[Ca^{2+}]$  hatása a  $H_2O_2$  termelésre nem volt szignifikáns (11/B ábra).



### 11. ábra

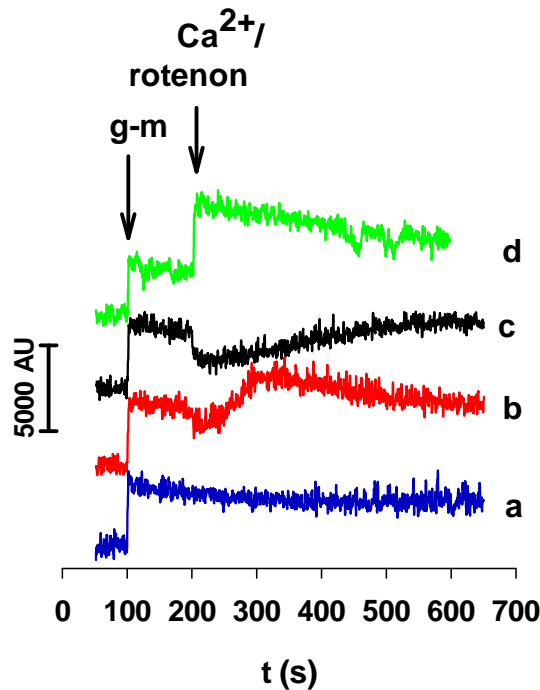
**A** Ca<sup>2+</sup> hatása a mitokondrium H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelésére 2 mM ADP-t tartalmazó médiumban

*A) 50 μM Ca<sup>2+</sup> (b görbe) és 1 μM rotenon (c görbe) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelésre gyakorolt hatását hasonlítottuk a kontroll görbéhez (a görbe). A mitokondrium (m; 0.1 mg/ml), a glutamát*

és malát (g-m; 5-5 mM) a  $\text{Ca}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ ) és a rotenon (1  $\mu\text{M}$ ) hozzáadását a nyilak jelölik. A mérések végén a kalibrációt (kal) ismert mennyiségű  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal végeztük. A görbék feletti számok a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés sebességét mutatják pmol/min/mg-ban. **B)** A statisztikai számításokat az A) panelben bemutatott kísérletek adatai alapján végeztük. A ROS produkciót a következők szerint számítottuk: a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés sebessége 500 és 600 s között/ a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés sebessége 100 és 200 s között. A kontroll esetén nem történt  $\text{Ca}^{2+}$  addíció (megfelel a 11/A ábra a görbéjének). A \* a szignifikáns különbséget jelöli a kontrollhoz képest ( $p < 0.05$ ;  $n=8$ ).

### **6.5. A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a mitokondriális NAD(P)H+H<sup>+</sup> autofluoreszcenciára ADP jelenlétében**

A NAD(P)H+H<sup>+</sup> autofluoreszcencia mérést a  $\text{H}_2\text{O}_2$  detektálással szimultán végeztük. 50  $\mu\text{M}$  [ $\text{Ca}^{2+}$ ] a NAD(P)H+H<sup>+</sup> fluoreszcencia növekedését okozta (12. ábra, b görbe). Az emelkedés mértéke megegyezett az 1  $\mu\text{M}$  rotenon által okozott NAD(P)H+H<sup>+</sup> fluoreszcencia növekedéssel (12. ábra, d görbe). 300  $\mu\text{M}$  [ $\text{Ca}^{2+}$ ] először NAD(P)H+H<sup>+</sup> autofluoreszcencia csökkenést okozott, majd a kezdeti esés után a 7 perces inkubáció alatt a NAD(P)H+H<sup>+</sup> szint fokozatosan emelkedve visszatért a  $\text{Ca}^{2+}$  adás előtti értékre (12. ábra, c görbe).



## 12. ábra

### A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$ autofluoreszcenciára 2 mM ADP-t tartalmazó médiumban

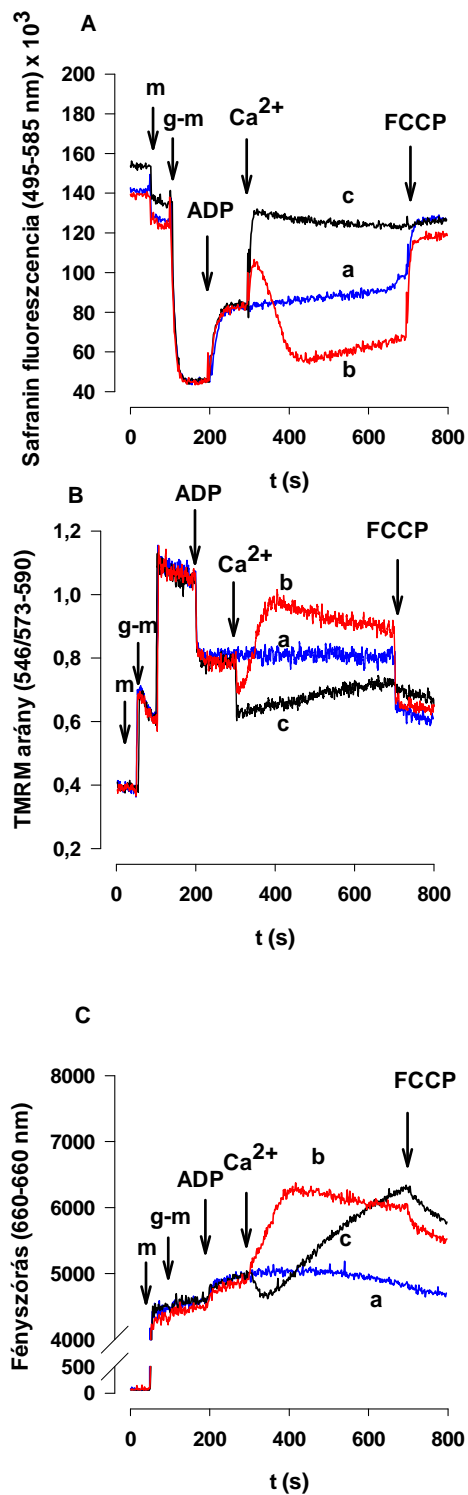
*A mitokondriumot (0.1 mg/ml) 50 s-kor adtuk a mérési médiumba. A glutamát és malát (g-m; 5-5 mM), a  $\text{Ca}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ , **b** görbe; 300  $\mu\text{M}$ , **c** görbe) és a rotenon (1  $\mu\text{M}$ , **d** görbe) hozzáadását a nyilak jelölik. Az **a** görbén sem  $\text{Ca}^{2+}$ , sem rotenon hozzáadás nem történt 200 s-kor. A görbéket függőlegesen elcsúsztattuk a jobb áttekinthetőség céljából.*

## 6.6. A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a membránpotenciálra és a duzzadásra ADP jelenlétében

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy 50, ill. 300  $\mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  ADP jelenlétében hogyan hat a membránpotenciálra és a mitokondriumok fényezésére.

A membránpotenciált a Safranine O fluoreszcens festékkel mértük, párhuzamosan a duzzadás fényszórással történő detektálásával. A glutamát és malát hatására kiépülő membránpotenciált az ADP csökkentette. A 2 mM ADP depolarizáló hatása a mérés egész időtartamáig kitartott (13/A ábra, *a* görbe). Az ADP után adott 50  $\mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  (13/A ábra, *b* görbe) további depolarizációt okozott, az átmeneti depolarizációt kb. 100 s elteltével azonban hiperpolarizáció követte. 300  $\mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  (13/A ábra *c* görbe) ezzel szemben teljesen és a mérés időtartamára véglegesen depolarizálta a mitokondriális belső membránt, a mérés végén adott FCCP a depolarizációt nem tudta fokozni. A két  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció membránpotenciálra gyakorolt hatását TMRM fluoreszcens festékkel is megvizsgáltuk (13/B ábra) a Módszerek c. fejezetben leírtak szerint, hasonló eredményre jutva.

A mitokondriumok duzzadását jelző fényszórási szignált mind az 50 mind a 300  $\mu\text{M}$ -os  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció jelentős mértékben emelte (13/C ábra, *b*, *c* görbe). Az ADP jelenlétében  $\text{Ca}^{2+}$  hatására megnövekedő fényszórási szignál nem specifikus jel, feltehetően a kalcium-foszfát precipitátumok kialakulásának tulajdonítható (Chalmers & Nicholls, 2003). A 300  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció kezdetben átmenetileg csökkentette a fényszórást (13/C ábra, *c* görbe), hasonló módon, mint ahogy a NAD(P)H+ $\text{H}^+$  autofluoreszcenciában is kétfázisú jelet hozott létre (12. ábra, *c* görbe), ezt feltehetőleg a mitokondriumok egy szubpopulációjának tranziens permeabilizálódása okozta.



13. ábra

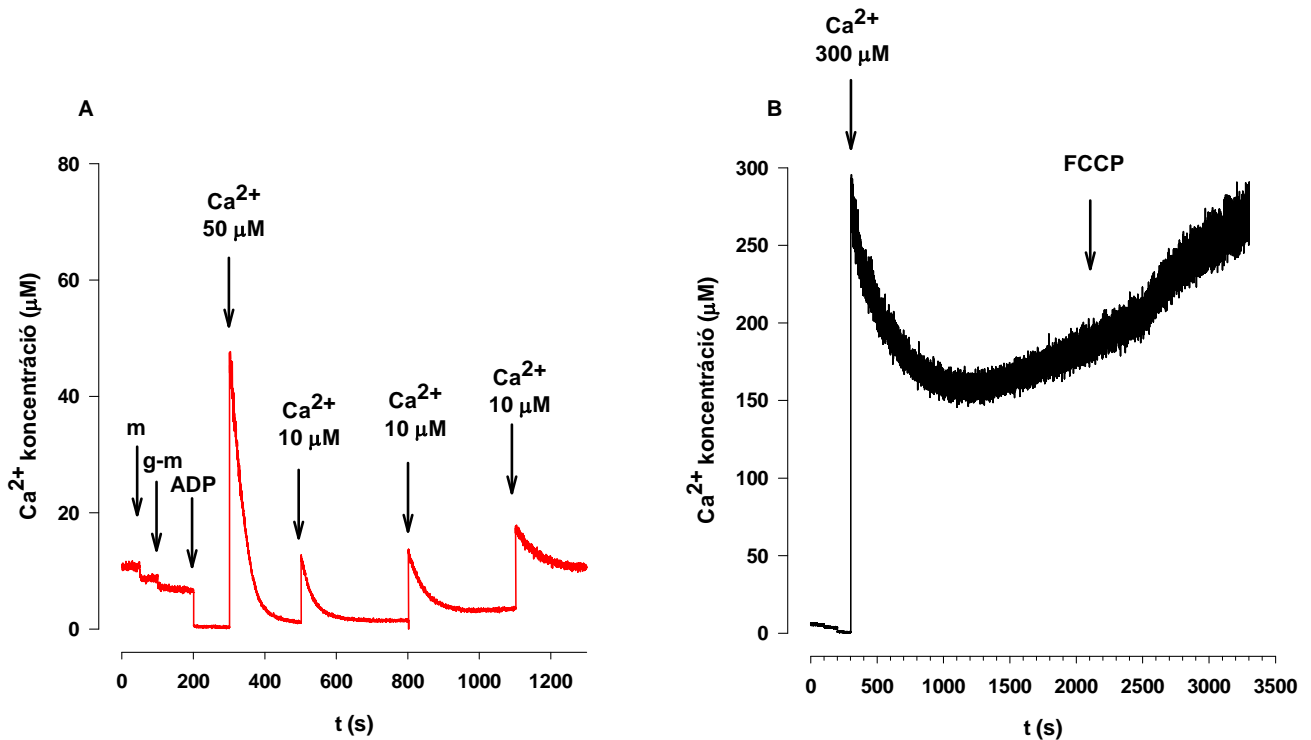
A  $\text{Ca}^{2+}$  hatása a membránpotenciálra Safranin O (A) vagy TMRM (B) fluoreszcenciával mérve, ill. a  $\text{Ca}^{2+}$  hatása a fényszórásra (C) 2 mM ADP-t tartalmazó médiumban

*A mitokondrium (m; 0.1 mg/ml protein), a glutamát és malát (g-m; 5-5 mM), az ADP (2 mM) a  $Ca^{2+}$  (0: a görbe, 50  $\mu$ M: b görbe, 300  $\mu$ M: c görbe) és az FCCP (250 nM) hozzáadását az ábrákon nyilak jelölik.*

## **6.7. A mitokondriális $Ca^{2+}$ felvétel ADP jelenlétében**

A mitokondriumok kalcium felvételét 50  $\mu$ M [ $Ca^{2+}$ ] esetén calcium green-5N, 300  $\mu$ M [ $Ca^{2+}$ ] hozzáadáskor Rhod 5-N fluoreszcenciával mértük. A glutamáttal és maláttal energetizált mitokondriumok az 50  $\mu$ M [ $Ca^{2+}$ ]-t mintegy 100 s alatt maradéktalanul felvették (14/A ábra). A 14/A ábrán a 2mM ADP hozzáadását követő fluoreszcencia csökkenés az ADP kalcium kötő kapacitását jelzi, az ADP a mérőpufferben a szabad [ $Ca^{2+}$ ]-t 1  $\mu$ M alá csökkentette. A bólusban adott 300  $\mu$ M [ $Ca^{2+}$ ]-t (14/B ábra) a mitokondriumok nem voltak képesek felvenni: a kalcium hozzáadása után kb. 700 s elteltével a részlegesen felvett kalciumot a mitokondriumok elkezdték visszaengedni az inkubációs médiumba. A mérés végén adott szétkapcsolószert FCCP tovább gyorsította a kalcium felszabadulást, a mérés végére a 300  $\mu$ M [ $Ca^{2+}$ ] teljes egészében a fluorofórhoz kötődött. A 300  $\mu$ M [ $Ca^{2+}$ ] jelenlétében mért mitokondriális kalcium felvétel azt mutatja, hogy a ROS mérési idő intervallumunk alatt, azaz a kalcium hozzáadását követő 400 s időtartamban nem történik kalcium indukálta kalcium felszabadulás.





14. ábra

**A mitokondrium kalcium felvétele 2mM ADP-t tartalmazó médiumban 50  $\mu\text{M}$  (A) és 300  $\mu\text{M}$  (B)  $[\text{Ca}^{2+}]$  hozzáadáskor**

*A) A mitokondrium (m; 0.1 mg/ml protein), a glutamát és malát (g-m; 5-5 mM), az ADP (2 mM) és a  $\text{Ca}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$  300 s-kor; 10  $\mu\text{M}$  500, 800, 1100 s-kor) hozzáadását az ábrán nyilak jelölik. B) A mitokondrium (0.1 mg/ml protein 50 s-kor), a glutamát és malát (5-5 mM 100 s-kor), az ADP (2 mM 200 s-kor) hozzáadást az ábrán nem jelöltük. A  $\text{Ca}^{2+}$  (300  $\mu\text{M}$  300 s-kor) és az FCCP (250 nM 2200 s-kor) hozzáadását az ábrán nyilak mutatják.*

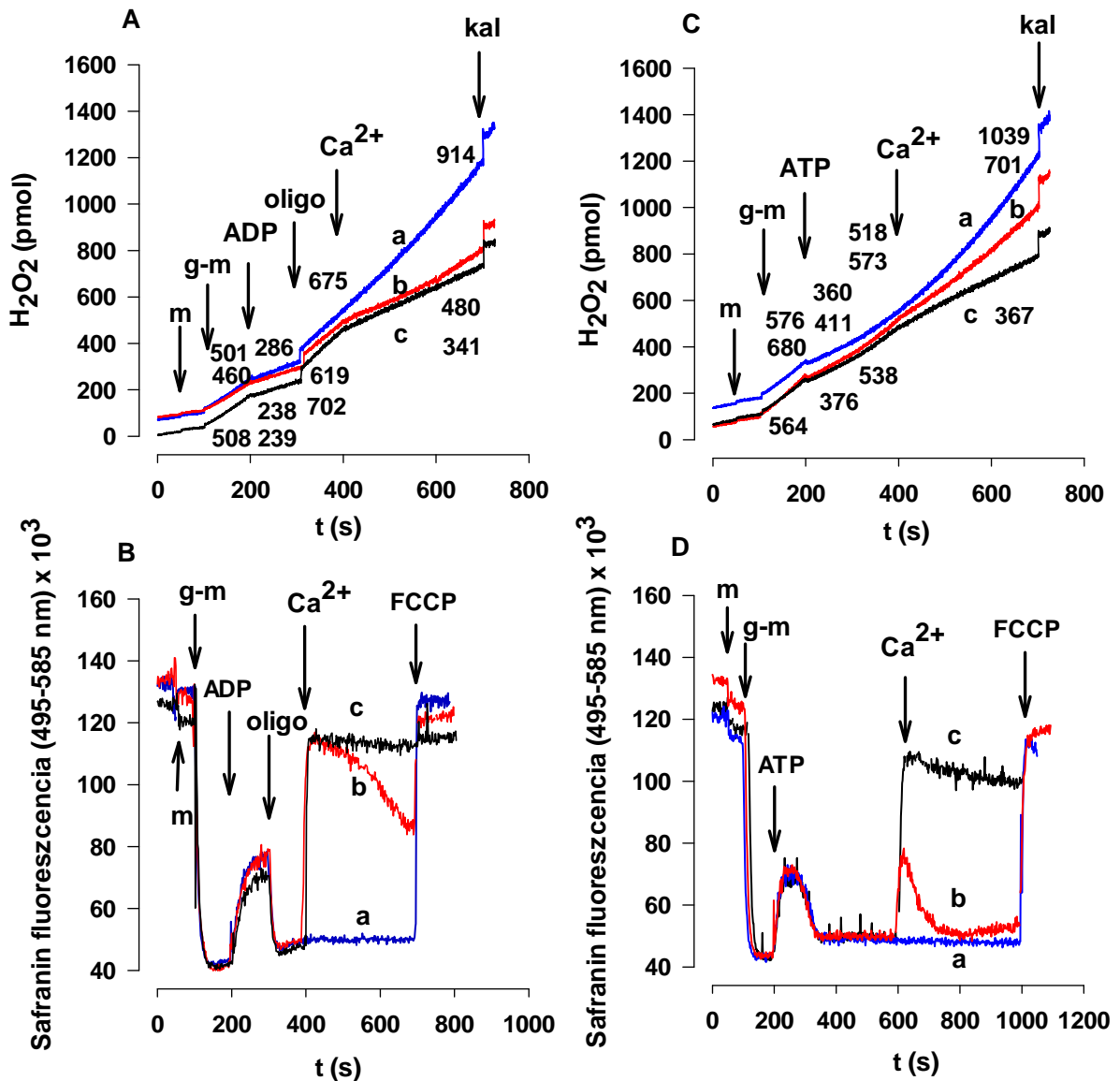
## 6.8. A $\text{Ca}^{2+}$ hatása a mitokondriális $\text{H}_2\text{O}_2$ termelésre magas $\Delta\Psi_m$ esetén

50 és 300  $\mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  ROS termelésre gyakorolt hatásását magas membránpotenciál értéknél: ATP, ill. ADP+ oligomicin jelenlétében is megmértük.

ATP jelenlétében a glutamáttal és maláttal energetizált mitokondriumok membránpotenciálja magasabb, mint ADP-t tartalmazó médiumban (15/D *versus* 13/A ábra). Az ATP adást követő tranziens depolarizációt a kontamináló ADP hatása okozta (15/D ábra). ATP jelenlétében, polarizált mitokondriumokban a  $\text{H}_2\text{O}_2$  képzés gyorsabb, mint ADP-t tartalmazó médiumban, az ATP adást követő csökkenés a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelésben ugyancsak az ATP-ben lévő szennyező ADP-nek tulajdonítható (15/C ábra). Az ATP után adott  $\text{Ca}^{2+}$  mind 50  $\mu\text{M}$  (15/C ábra, *b* görbe), mind 300  $\mu\text{M}$  (15/C ábra, *c* görbe) koncentrációban csökkentette a ROS képzést 5 min inkubációs idő alatt.

Az ADP után adott  $\text{F}_0\text{F}_1$  ATP-áz gátló oligomicin az ADP depolarizáló hatását megszüntette és az ATP-hez hasonlóan ugyancsak magas membránpotenciált eredményezett (15/B ábra). Ennek megfelelően a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés az ADP hatására csökkent, az oligomicin adást követően pedig nőtt (15/A ábra). Az ATP jelenlétében történt mérések eredményeihez hasonlóan az ADP és oligomicin után adott 50  $\mu\text{M}$  (15/A ábra, *b* görbe), ill. 300  $\mu\text{M}$  (15/A ábra, *c* görbe)  $[\text{Ca}^{2+}]$  csökkentette a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelést.

Magas membránpotenciállal rendelkező mitokondriumokban, adenin nukleotidok jelenlétében tehát a  $\text{Ca}^{2+}$  mindkét alkalmazott (50, ill. 300  $\mu\text{M}$ ) koncentrációban csökkentette a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelést, egyben depolarizációt okozott (15/B,D ábra, *b*, *c* görbék). ADP és oligomicin jelenlétében 50  $\mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  jelentősebb depolarizációt okozott (15/B ábra, *b* görbe), mint ATP-t tartalmazó médiumban (15/D ábra, *b* görbe). 300  $\mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  mindkét kísérleti kondícióban teljes és tartós depolarizációt eredményezett (15/B, D ábra, *c* görbe).



15. ábra

A  $\text{Ca}^{2+}$  hatása a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelésre (A, C) és a membránpotenciálra (B, D) ATP (C, D) vagy ADP és oligomicin (A, B) jelenlétében

A mitokondrium (m; 0.1 mg/ml protein), a glutamát és malát (g-m; 5-5 mM) és a  $\text{Ca}^{2+}$  (0: a görbe, 50  $\mu\text{M}$ : b görbe, 300  $\mu\text{M}$ : c görbe) hozzáadását a nyilak jelölik. C, D) Az ATP ( $\text{Mg}^{2+}$ -ATP, 4 mM) addíció 200 s-kor; A, B) az ADP (2mM) és az oligomicin (oligo; 5  $\mu\text{M}$ ) hozzáadása 200, ill. 300 s-kor történt. Az FCCP-t 250 nM

*koncentrációban alkalmaztuk. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mérések végén a kalibrációt (kal) ismert mennyiségű H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal végeztük. A görbék feletti számok a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés sebességét mutatják pmol/min/mg protein mértékegységben.*

### **6.9. A Ca<sup>2+</sup> hatása a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelésre, a NAD(P)H+H<sup>+</sup> autofluoreszcenciára, a membránpotenciálra és a fényszórásra szukcináttal energetizált mitokondriumokban adenin nukleotid mentes és ADP-t tartalmazó médiumban**

Azt, hogy a légzési szubsztrátok típusa befolyásolja-e a kalcium ROS termelésre gyakorolt hatását, a II. légzési komplex szubsztrát szukcinát jelenlétében vizsgáltuk.

Szukcináttal energetizált mitokondriumok esetén (16. ábra) a mitokondriumok alap H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelése többszöröse volt a glutamáttal és maláttal energetizált mitokondriumok alap ROS képzésének (1516 pmol/min/mg protein; 16. ábra, *a, b, c* görbe). A magas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés kapcsolt, magas membránpotenciálú mitokondriumokban a reverz elektrontranszportnak tulajdonítható, melynek során az elektronok a II. légzési komplexről az I. komplexre jutnak, ott redukálják a NAD<sup>+</sup>-ot, egyben szuperoxid aniont képeznek. Szukcinát szubsztrát esetén a Ca<sup>2+</sup> már 3 μM koncentrációban is jelentősen csökkentette a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képzést (16. ábra, *a* görbe), a Ca<sup>2+</sup> ROS csökkentő hatása 10 μM koncentrációnál maximalizálódott (16. ábra, *c* görbe). 11 mérés átlaga alapján 10 μM Ca<sup>2+</sup> koncentráció 86.5 ± 1.8%-os gátlást okozott. Ennél magasabb gátló hatása 100 μM [Ca<sup>2+</sup>]-nak sem volt (nincs ábrázolva).

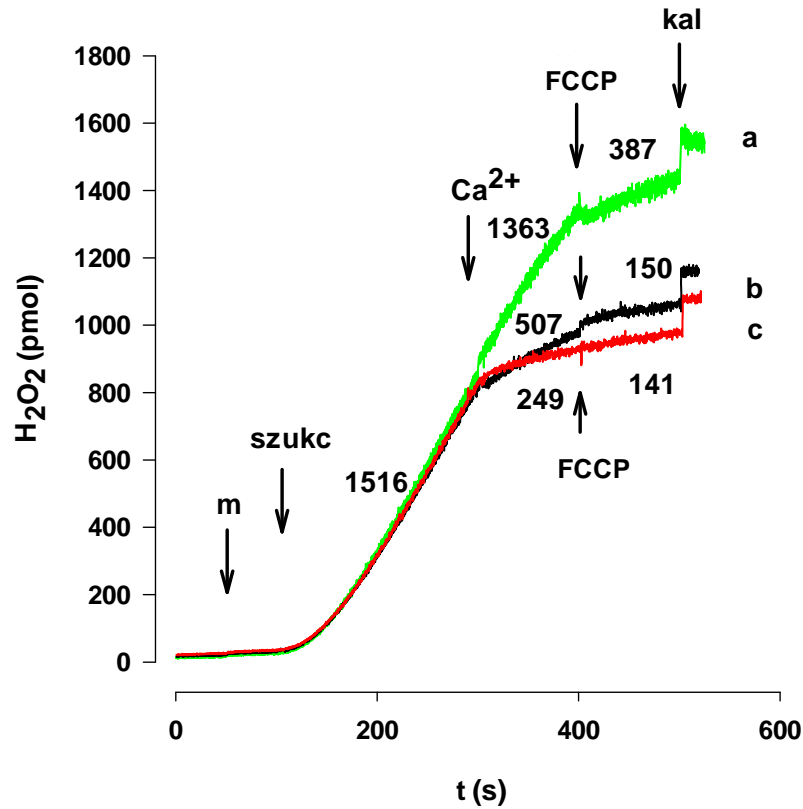
A szukcináttal energetizált mitokondriumok RET-en keresztül történő magas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelését az ADP jelentősen csökkentette depolarizáló hatása miatt (17/A ábra, *b* görbe). A 300 s-kor adott 10 μM kalcium az ADP hatására kialakuló alacsony ROS képzést nem csökkentette tovább. A szétkapcsolószer FCCP a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produkciót csökkentette. A mérés végén adott I. légzési komplex gátló rotenon fokozta a mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képzést.

Az ADP mentes médiumban  $10 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  jelentős mértékű  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$  fluoreszcencia szignál esést okozott (17/B ábra, *a* görbe), a csökkenést az FCCP csak kis mértékben fokozta. Az FCCP után adott rotenon hatására a  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$  autofluoreszcencia nem emelkedett.

Az ADP a  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$  autofluoreszcenciát csökkentette (17/B ábra, *b* görbe), mivel depolarizáló hatása következtében megszüntette a reverz elektron transzportot. Az ADP után adott  $10 \mu\text{M}$  kalcium nem csökkentette tovább a  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$  autofluoreszcenciát, az FCCP a fluoreszcencia szignálban csak kis mértékű csökkenést okozott. A mérés végén adott rotenon a redukált piridin nukleotidok mennyiségét jelentősen növelte.

Az ADP-t tartalmazó médiumban a szukcinát hatására kiépülő membránpotenciál az ADP depolarizáló hatása miatt alacsonyabb (17/C ábra, *b* görbe), mint adenin nukleotid mentes médiumban (17/C ábra, *a* görbe). Mind ADP jelenlétében, mind anélkül  $10 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  teljes depolarizációt okozott. ADP mentes mérési médiumban az FCCP nem változtatott a membránpotenciálon, ADP jelenlétében a membránpotenciál repolarizációs tendenciát mutatott, így az FCCP a membránpotenciált ADP-t tartalmazó médiumban csökkentette.

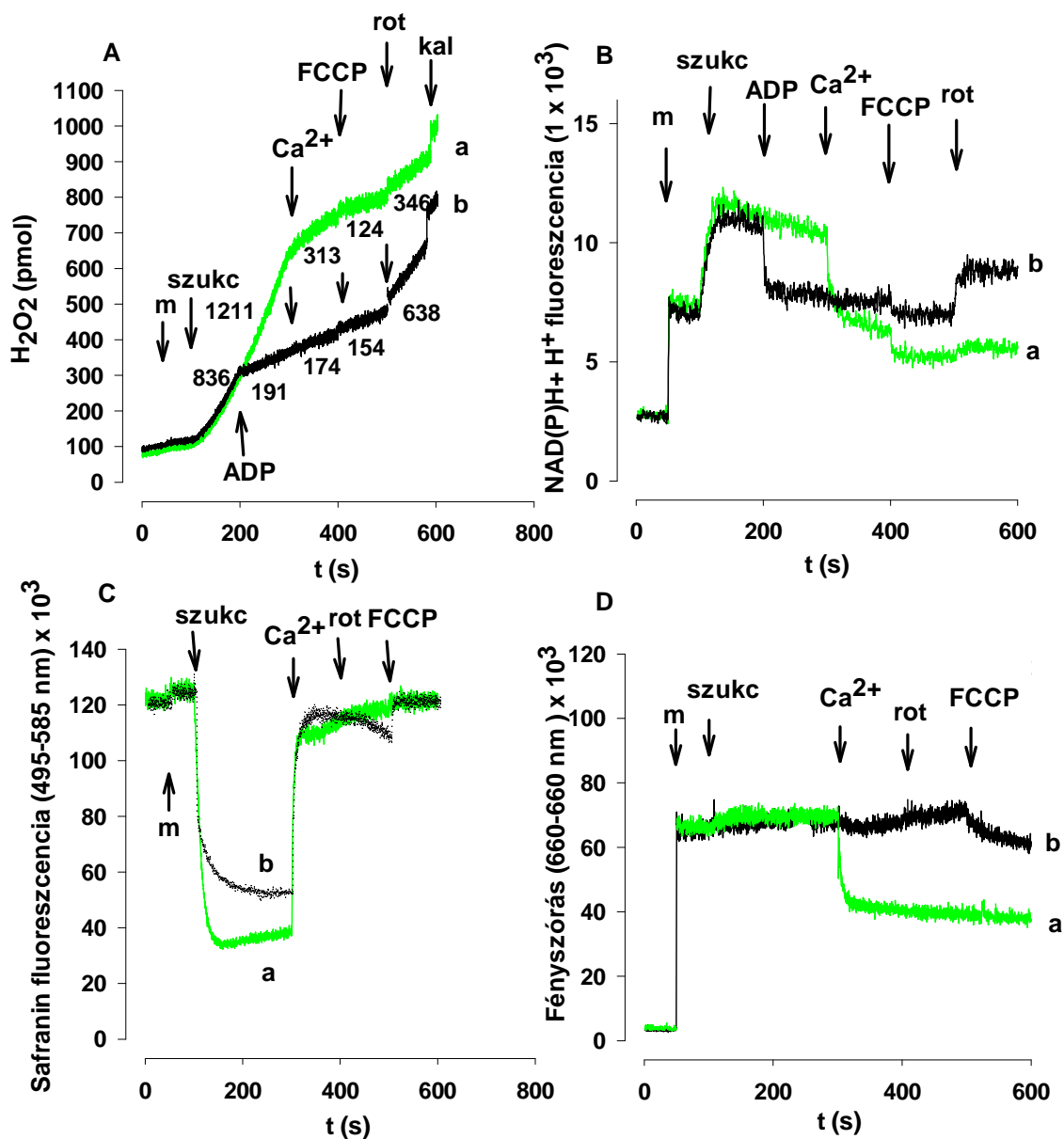
Az ADP-t nem tartalmazó mérőoldatban a kalcium jelentősen csökkentette a fényszórási szignált, a mPTP gátló ADP jelenlétében  $10 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  azonban nem befolyásolta a 660 nm-en mért fényszórást (17/D ábra).



### 16. ábra

**A  $\text{Ca}^{2+}$  hatása a  $\text{H}_2\text{O}_2$  képzésre szukcináttal energetizált mitokondriumokban adenin nukleotid mentes médiumban**

*A kalciumot 3 (a görbe), 6 (b görbe) és 10 (c görbe)  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmaztuk. A mitokondrium (m; 0.1 mg/ml), a szukcinát (szukc; 5 mM), a  $\text{Ca}^{2+}$  és az FCCP (250 nM) hozzáadását a nyilak jelölik. A mérések végén a kalibráció (kal) ismert mennyiségű  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal történt. A görbék fölött a számok a  $\text{H}_2\text{O}_2$  képzés sebességét mutatják pmol/min/mg egységben.*



17. ábra

A  $\text{Ca}^{2+}$  hatása a  $\text{H}_2\text{O}_2$  képzésre (A), a NADPH+ $\text{H}^+$  autofluoreszcenciára (B), a membránpotenciálra (C) és a fényszórásra (D) ADP jelenlétében és ADP mentes médiumban szukcináttal energetizált mitokondriumokban

A paneleken az *a* görbe ADP mentes médiumot jelöl. A *b* görbe 2 mM ADP jelenlétében regisztrált görbe, az ADP vagy jelen volt a médiumban (C, D) vagy 200 s-kor történt az

*ADP hozzáadás (A, B). A mitokondrium (m; 0.1 mg/ml), a szukcinát (szukc; 5 mM), a  $\text{Ca}^{2+}$  (10  $\mu\text{M}$ ), a rotenon (rot; 1  $\mu\text{M}$ ) és az FCCP (250 nM) hozzáadását az ábrákon nyilak jelölik. Az A panelen a görbéken lévő számok a  $\text{H}_2\text{O}_2$  képzés sebességét jelölik pmol/min/mg protein mértékegységben. A mérések végén a kalibráció (kal) ismert mennyiségű  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal történt.*



## 7. Diszkusszió

Kísérleteinkben a kalcium hatását vizsgáltuk az izolált mitokondriumok reaktív oxigénszármazék képzésére.

A mitokondriumok kalcium expozíció következtében fokozódó ROS képzése elsősorban a kalcium és az oxidatív stressz szerepe a neuronális károsodásban c. fejezetben bemutatott glutamát excitotoxicitás folyamatában merül fel mint a patomechanizmus kritikus eleme. Vizsgálatainkkal azt a kérdést kívántuk megválaszolni, hogy a glutamát excitotoxicitás vezethet-e fokozott mitokondriális ROS képzéshez a megemelkedő intracelluláris kalcium koncentráció következtében. Tartós agyi iszkémia ugyanakkor glutamáttól függetlenül is citoszolikus  $[Ca^{2+}]$  emelkedéssel jár. Másrészt a szubplazmalemmális és az endoplazmatikus retikulumhoz kapcsolt mitokondriumok a patofiziológiai történések mellett fokozott kalcium terhelésnek lehetnek kitéve fiziológias körülmények között is, mint amilyen a plazmamembrán ionotróp receptorainak és feszültségfüggő kalcium csatornáinak aktivációja, a neurotranszmisszió, ill. a kalcium által mediált intracelluláris jelátvitel, így releváns annak vizsgálata, hogy különböző kalcium koncentrációk hogyan befolyásolják a mitokondriumok ROS képzését.

Kísérleteinkben a mitokondriumokat érő kalcium inzultusok az alacsony mikromólos kalcium koncentrációtól 300  $\mu\text{M}$   $[Ca^{2+}]$ -ig terjedtek. A mintegy 100 nM-os nyugalmi intracelluláris kalcium koncentráció patológias folyamatokban a magas mikromólos koncentráció tartományba emelkedhet. Glutamát excitotoxicitás esetén az NMDA receptorok tartós stimulálása először alacsony  $\mu\text{M}$ -os citoszolikus  $[Ca^{2+}]$  emelkedést okoz az NMDA receptoron keresztül történő  $Ca^{2+}$  beáramlás következtében, majd a nyugalmi  $[Ca^{2+}]$  visszaállása után, variábilis látencia periódus elteltével a citoplazmatikus  $[Ca^{2+}]$  akár 30  $\mu\text{M}$ -ra emelkedik tartósan (Chinopoulos et al, 2004; Kiedrowski, 2007; Randall & Thayer, 1992). Intracelluláris kalcium mikrodoménekben a  $[Ca^{2+}]$  ennél lényegesen magasabba is emelkedhet: a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornák közelében, ill. az axonterminálisban akár 100-300  $\mu\text{M}$ -ra (Llinas et al, 1992; Neher,

1998; Rizzuto & Pozzan, 2006); a szarkoplazmatikus retikulumhoz vagy az endoplazmatikus retikulumhoz asszociálódó mitokondriumok ugyancsak 100  $\mu\text{M}$  nál magasabb  $[\text{Ca}^{2+}]$  –nak lehetnek kitéve, amennyiben a rianodin receptor, ill. az inozitol-trifoszfát ( $\text{IP}_3$ ) receptor a két organelum összefekvő felületénél helyezkedik el (Csordas & Hajnoczky, 2009).

A jelen dizertációban bemutatott munka alapján összefoglalóan azt lehet megállapítani, hogy nem azonosítható olyan mitokondriális target, ill. mechanizmus, ami univerzálisan meghatározná a kalcium hatását a mitokondriális ROS termelésre. A kalciumnak van hatása a mitokondriumok ROS termelésére, azonban az eltérő kísérleti kondíciók: az alkalmazott légzési szubsztrátok típusa, az adenin nukleotidok és légzési komplexgátlók jelenléte nagyban befolyásolják az izolált mitokondriumok ROS képzését, egyben a kalcium ROS termelésre gyakorolt hatását is. Munkánkban bemutatjuk, hogy a kalcium hatása a mitokondriális ROS termelésre i) a mitokondriális membránpotenciál megváltoztatásán, ii) a II. légzési komplex szubsztrát ROS képző mechanizmusának, a reverz elektron transzportnak a modulálásán, iii) a  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  arány befolyásolásán, iv) illetve a mPTP indukcióján keresztül valósul meg. Így a kalcium hatása a mitokondriumokra több változótól függ: a mitokondrium metabolikus állapotától, a kalcium inzultus nagyságától és a rendelkezésre álló légzési szubsztrátok típusától. A fenti mechanizmusok tisztázásával munkánk segíti az e téren ellentmondó szakirodalmi adatokban való eligazodást is.

## **7.1. A kalcium ROS termelésre gyakorolt hatásának membránpotenciál-függése**

A mitokondriális membránpotenciál értékét adenin nukleotidokkal befolyásoltuk. A mitokondrium ADP jelenlétében alacsony; ATP, ill. ADP és oligomicin együttes jelenlétében magas membránpotenciált generál. A mitokondriális ROS termelés membránpotenciál-függő: I. légzési komplex szubsztrátokkal energetizált mitokondriumokban a ROS képzés szélesebb tartományban érzékeny a membránpotenciál változásra, mint II. komplex szubsztrátok alkalmazásával: glutamáttal és maláttal a membránpotenciál 20% -os csökkenése (180-150 mV-ra, ami

megfelel az ADP által okozott depolarizációnak) 60%-kal (Starkov & Fiskum, 2003), szukcináttal a membránpotenciál 10 %-os csökkenése (180-170 mV-ra) 90%-kal csökkenti a mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést (Korshunov et al, 1997).

Az ADP mintegy 20%-kal (Starkov & Fiskum, 2003) depolarizálja a mitokondriális belső membránt az F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-ázon keresztül történő H<sup>+</sup> visszaáramlás miatt. ADP-t tartalmazó médiumban az ADP depolarizáló hatása miatt a mitokondriális ROS termelés alacsonyabb, mint magas membránpotenciál esetén. Kísérleteinkben glutamáttal és maláttal energetizált mitokondriumokban, ADP jelenlétében 50 μM [Ca<sup>2+</sup>] 80%-kal növelte a mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést (11/A, B ábra). A kalcium a ROS termelést a Ca<sup>2+</sup> addíció után mintegy 100-150 s-mal kezdte emelni. A mitokondriumok az 50 μM [Ca<sup>2+</sup>]-t kb. 100 s alatt vették fel (14/A ábra). A kalcium ez alatt a 100 s alatt depolarizálta a mitokondriális belső membránt (13/A, B ábra), ezt követően pedig a membránpotenciál hiperpolarizációját okozta: az ADP hatására kialakuló alacsonyabb membránpotenciál értéknél magasabb membránpotenciált generált (13/A, B ábra), azaz olyan értéktartományba emelte a ΔΨ<sub>m</sub>-t, ami már befolyásolja a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés sebességét.

A belső membrán hiperpolarizációjának okát munkánkban nem vizsgáltuk. A magasabb membránpotenciál kialakításért felelős lehet a kalcium által stimulált mátrix dehidrogenázok, elsősorban az α-KGDH fokozott NADH+H<sup>+</sup> termelése; a kalcium a NAD(P)H+H<sup>+</sup> autofluoreszcenciáját növelte (12. ábra, *b* görbe). 50 μM [Ca<sup>2+</sup>], ami 500 nmol/mg [Ca<sup>2+</sup>]-val ekvivalens, a mátrixban mintegy 2 μM szabad [Ca<sup>2+</sup>]-nak felel meg a 10 nmol/mg [Ca<sup>2+</sup>] terhelés felett a mátrixban kialakuló kalcium-foszfát precipitátum pufferelő hatása következtében (Chalmers & Nicholls, 2003). Ez a szabad [Ca<sup>2+</sup>] tartomány megfelel annak a [Ca<sup>2+</sup>] tartománynak, amelyben a mátrix dehidrogenázok aktiválódnak (Denton et al, 1972; Denton et al, 1978; McCormack & Denton, 1979). A kalcium az α-KGDH-t aktiváló koncentráció tartományban az enzim forward üzemmódban észlelhető, alacsony ROS képzését is fokozza (Tretter & Adam-Vizi, 2004), így a kalcium hatására bekövetkező fokozott mitokondriális ROS képzés a kalcium ezen hatásával is magyarázható. A kalcium serkentheti a malát-aszpartát inga működését is (Pardo et al, 2006), ami a glutamát és malát fokozott importjához és citrátköri oxidációjához vezet, ugyancsak növelve a NADH+H<sup>+</sup> mennyiségét. A

kalcium hatására kialakult hiperpolarizációt a kalcium esetleges  $F_0F_1$  ATP-ázt (De Gomez-Puyou et al, 1980), ill. ANT-t (Gomez-Puyou et al, 1979) gátló hatása is okozhatta.

Az ADP a mPTP hatékony inhibitora, így ADP jelenlétében  $50 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  kísérleteinkben nem indukált mPTP nyílást:  $50 \mu\text{M}$  kalcium nem okozott esést a  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$  autofluoreszcenciában (12. ábra, *b* görbe), nem eredményezett tartós depolarizációt (13/A, B ábra, *b* görbe), nem okozott kalcium indukálta kalcium felszabadulást (14/A ábra) és a mitokondriumok fényezését növelte (13/C ábra, *b* görbe). A fényezés szignál emelkedése kalcium hatására nem specifikus jel, feltehetőleg a mátrixban képződő kalcium-foszfát precipitátum okozza (Chalmers & Nicholls, 2003).

Ugyanilyen körülmények között magasabb,  $300 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  tarósan depolarizálta a mitokondrium belső membránját (13/A, B ábra, *c* görbe), ez a kalcium koncentráció hiperpolarizációt nem okozott. Az ADP által okozott depolarizációnál alacsonyabb membránpotenciál nincs hatással a mitokondrium ROS termelésére, így  $300 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  nem változtatta meg a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés sebességét (11/B ábra).

A kalcium  $300 \mu\text{M}$  koncentrációban mPTP nyílást indukált. A ROS detektálás ideje alatt (7 perc) a kalcium feltehetően a mitokondriumoknak csak egy szubpopulációjában okozott mPTP-t. Ezt az aszinkron mPTP nyílást a kalcium adást követő tranzienst esés jelzi a fényezés szignálban (13/C ábra, *c* görbe), ami nagyon hasonló a  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$  autofluoreszcenciában látható jelenséghez: kalcium hatására a  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$  autofluoreszcencia csökken, majd lassan visszaáll a kiindulási szintre (12. ábra, *c* görbe). A teljes mitokondrium populációt érintő mPTP nyílás a  $\text{H}_2\text{O}_2$  mérési intervallumon kívül, a kalcium hozzáadása után mintegy 10-12 perccel következett be. A szinkron mPTP nyílást a Rhod-5N fluoreszcenciával detektált kalcium indukálta kalcium felszabadulás jelezte (14/B ábra).

A két alkalmazott kalcium koncentráció ROS termelésre gyakorolt hatásának membránpotenciál-függését a magas membránpotenciállal rendelkező mitokondriumokon végzett kísérletek is szemléltetik. ATP jelenlétében a mitokondriumok magas membránpotenciált generálnak foszforiláció híján, ill. az  $F_0F_1$

ATP-áz reverz működése, azaz az ATP hidrolízishez kötött  $H^+$  kipumpálás az  $F_0$  alegységen keresztül szintén hozzájárulhat a magas membránpotenciál kialakításához. Az ATP membránpotenciálra gyakorolt hatását az ATP-ben jelen lévő szennyező ADP átmenetileg magváltoztatta (15/D ábra, *a,b,c* görbe). A szennyező ADP depolarizáló hatása folytán ATP adást követően átmenetileg a ROS képzés is csökkent (15/C ábra, *a,b,c* görbe). ADP és oligomicin együttes jelenlétében szintén magas membránpotenciál mérhető: az ADP az oligomicin hatása következtében nem depolarizálja a belső membránt, ugyanis a gátlószer megakadályozza az ATP-ázon keresztül történő  $H^+$  influxot (15/B ábra, *a,b,c* görbe). A membránpotenciál változás ADP és oligomicin hatására a ROS termelés sebességében is leképeződik: az ADP hatására csökkenő  $H_2O_2$  képzés oligomicin adást követően felgyorsul (15/A ábra, *a,b,c* görbe).

50 és 300  $\mu M$   $[Ca^{2+}]$  mindkét kísérleti kondícióban csökkentette a membránpotenciált (15/B ábra, *b,c* görbe, 15/D ábra, *b,c* görbe), ez a mitokondriális  $H_2O_2$  termelés sebességének csökkenését okozta (15/A ábra, *b,c* görbe, 15/C ábra, *b,c* görbe). 300  $\mu M$   $[Ca^{2+}]$  mind ATP, mind ADP+oligomicin jelenlétében teljes és tartós depolarizációt okozott. 50  $\mu M$   $[Ca^{2+}]$  ATP-t tartalmazó médiumban kisebb mértékben depolarizálta a belső membránt (15/D ábra, *b* görbe), mint ADP és oligomicin jelenlétében (15/B ábra, *b* görbe) egyben a membránpotenciál gyorsabban repolarizálódott a kiindulási értékre. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy ATP-t tartalmazó médiumban a membránpotenciál restitúciójához feltehetőleg az ATP-áz reverz működése is hozzájárult.

ATP, ill. ADP+oligomicin jelenlétében a két kalcium koncentráció nem okozott mPTP nyílást a safranine O fluoreszcencia (50  $\mu M$   $[Ca^{2+}]$ ), ill. fényszórási jel (50, 300  $\mu M$   $[Ca^{2+}]$ ) alapján (nincs bemutatva).

Összefoglalva: glutamáttal és maláttal energetizált mitokondriumokban, alacsony membránpotenciál esetén 50  $\mu M$   $[Ca^{2+}]$  fokozta a ROS képzést, ez azzal magyarázható, hogy ez a kalcium koncentráció hiperpolarizálta a mitokondriumokat, ennek következtében a membránpotenciál abba a tartományba került, ahol a ROS képzés  $\Delta\Psi_m$ -függő. A fokozott ROS képzéshez ilyen körülmények között a kalcium hatására megnövekedett redukált piridin nukleotid szint, illetve az  $\alpha$ -KGDH enzim kalcium által stimulált fokozott ROS képzése is hozzájárulhat. 300  $\mu M$   $[Ca^{2+}]$  ezzel szemben

kizárólag depolarizáló hatású, olyan tartományba csökkentette a mitokondriális membránpotenciált, ahol a  $\text{H}_2\text{O}_2$  képzés sebessége már nem függ a membránpotenciál értékétől, ez a kalcium koncentráció ennek megfelelően nem befolyásolta a mitokondrium ROS képzését. Magas membránpotenciál esetén a kalcium mind alacsony, mind magas koncentrációban lassította a mitokondriális ROS képzés sebességét a membránpotenciál csökkentése következtében.

Kísérleteinkben a kalcium az ADP jelenlétében mérhető alacsony alap ROS termelést kevesebb, mint kétszeresére fokozta (11/B ábra), a ROS termelés sebességének növekedése messze elmarad a mitokondrium magas ROS termelő kapacitásától (11/A ábra, *c* görbe – rotenon jelenlétében mérhető ROS termelés). Így izolált mitokondrium kísérleti modellen eredményeink nem támasztják alá azt a hipotézist, hogy patológias körülmények között, glutamát excitotoxicitás során a magas kalcium koncentrációnak kitett mitokondriumok jelentős mértékben hozzájárulnának a fokozott celluláris ROS képzéshez.

## **7.2. A légzési szubsztrátok befolyása a kalcium ROS termelésre gyakorolt hatására**

A szukcináttal energetizált mitokondriumok ROS képzése és a kalcium ROS képzésre gyakorolt hatása szukcinát jelenlétében külön fejezetben tárgyalandó a II. légzési komplex szubsztrátok speciális ROS képzési mechanizmusa folytán.

Izolált mitokondriumokban, magas membránpotenciál esetén a szukcinát légzési szubsztrát képes a legnagyobb mennyiségű  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t generálni, szukcináttal energetizált mitokondriumokban a ROS képzés sebessége meghaladja a  $\text{NADH}+\text{H}^+$ -t generáló szubsztrátok komplexgátlók jelenlétében mért  $\text{H}_2\text{O}_2$  képzését is (Votyakova & Reynolds, 2001). Szukcináttal energetizált mitokondriumokban magas  $\Delta\Psi_m$  esetén a ROS képzés az I. komplexen történik: a II. légzési komplexről az elektronok egy hányada az I. légzési komplexre áramlik, redukálja a  $\text{NAD}^+$ -ot és az I. komplexen szuperoxid aniont képez. Az elektronoknak ez a fordított irányú áramlása a reverz elektron transzport (Hinkle et al, 1967). A termodinamikailag kedvezőtlen irányú

elektron transzporthoz a magas membránpotenciál szolgáltatja az energiát, így RET csak magas membránpotenciál értékeknél lehetséges. A reverz elektron transzport ennek megfelelően erősen membránpotenciál függő, magas membránpotenciállal rendelkező mitokondriumokban a  $\Delta\Psi_m$  10%-os csökkenése (190-180 mV-ra) a  $H_2O_2$  termelést 90%-kal csökkenti (Korshunov et al, 1997). A szukcinát magas ROS képzése a szukcinát koncentrációjától is függ. A szukcinát szöveti koncentrációja a tized mM-os koncentráció tartományban van (Lewandowski et al, 1996; Williamson & Corkey, 1979), ez az érték azonban kb. a tizedrésze annak a szukcinát koncentrációnak, ami izolált mitokondriumokban magas  $H_2O_2$  képzésre képes (Hansford et al, 1997). A szukcinát szöveti koncentrációja ugyanakkor iszkémia és reperfúzió esetén a mM-os koncentráció tartományba emelkedhet (Benzi et al, 1979; Folbergrova et al, 1974), ami azt mutatja, hogy a szukcinát iszkémia-reperfúzió esetén számottevően hozzájárulhat a légzési lánc működtetéséhez. Így a szukcinát mint légzési szubsztrát alkalmazása a mitokondriális ROS termelés vizsgálatakor patológiai relevanciával bírhat.

A reverz elektron transzport nagy mértékű membránpotenciál függése miatt a kalcium a depolarizáció következtében gátolja a RET-t és a reverz elektrontranszporttal összefüggő magas ROS képzést is (16. ábra, *a,b* görbe). A kalcium a RET felfüggesztése következtében egyben leállítja a  $NAD^+$  I. komplexen történő redukcióját, a csökkent redukált piridin nukleotid szint ugyancsak hozzájárulhat a csökkent mitokondriális ROS termeléshez.

Iszkémia-reperfúzió esetén a magas szöveti szukcinát koncentráció ugyan lehetővé teszi a mitokondriumok nagy mértékű ROS képzését, azonban az ilyen körülmények között fennálló energiahiány, a jelen lévő depolarizáló hatású ADP feltehetőleg a RET-on keresztüli magas ROS képzés limitáló tényezője.

Kísérleteinkben az ADP depolarizáló hatását méréseinkben a safranin fluoreszcenciája mutatja: ADP jelenlétében a fluoreszcencia szignál magasabb, mint az ADP-t nem tartalmazó mérőpufferben (17/C ábra, *b versus a* görbe). Méréseinkben ADP hatására a szukcináttal energetizált mitokondriumok  $H_2O_2$  képzése csökkent (17/A ábra, *b* görbe). Ez egyrészt a depolarizációnak és a következményes RET megszűnésnek köszönhető, másrészt annak, hogy a gátolt RET leállította az I. komplexen a  $NAD^+$  redukcióját is (17/B ábra, *b* görbe), így az alacsony redukált piridin nukleotid szint ugyancsak

csökkent ROS képzéshez vezethet. ADP jelenlétében  $10 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  bár depolarizációt okozott (17/C ábra, *b* görbe), de nem befolyásolta a csökkent ROS termelést, az ADP jelenlétében mért membránpotenciál érték alatt a szukcináttal generált  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés sebessége már nem membránpotenciál-függő. A kalcium ADP adás után nem volt hatással a  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$  autofluoreszcenciára sem (17/B ábra, *b* görbe). ADP jelenlétében a szukcináttal energetizált mitokondriumok termelnek  $\text{NADH}+\text{H}^+$ -t is, az ADP miatt felgyorsult citrátköri metabolizmus következtében, a malát-dehidrogenáz által katalizált reakcióban. ADP-t tartalmazó médiumban a szukcinát jelenlétében képződő  $\text{NADH}+\text{H}^+$ -t egyébként a rotenon hatására megnövekvő  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$  autofluoreszcencia is jelzi (17/B ábra, *b* görbe), a rotenon ADP jelenlétében (17/A ábra, *b* görbe) a ROS képzést is felgyorsítja a megemelkedett  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  arány miatt. A kalcium azonban a malát-dehidrogenáz aktivitását az egyéb mátrix dehidrogenázokkal ellentétben (PDH, ICDH,  $\alpha$ -KGDH) nem befolyásolja (Denton et al, 1972; Denton et al, 1978; McCormack & Denton, 1979), így nem növeli a  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$  autofluoreszcenciát sem (17/B ábra, *b* görbe).

ADP-t tartalmazó mérőpufferben  $10 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  nem okozott mPTP nyílást: kalcium hatására nem csökkent a fényszórási szignál (17/D ábra, *b* görbe), a kalcium által okozott depolarizáció repolarizációs tendenciát mutatott (17/C ábra, *b* görbe), valamint ADP jelenlétében a rotenon képes volt növelni a  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$  autofluoreszcenciát (17/B ábra, *b* görbe).

Összefoglalva: szukcináttal energetizált mitokondriumok RET-on keresztüli magas ROS képzését a kalcium depolarizáló hatása következtében csökkentette. Foszforiláló üzemmódban a kalcium a mitokondriumok ROS termelését nem változtatta meg, mivel olyan tartományba süllyesztette a  $\Delta\Psi\text{m}$ -t, ami már nem befolyásolja a mitokondrium ROS képzését, a kalcium emellett a  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  arányra sem volt hatással. Szukcinát légzési szubsztrát esetén, ha nincs mPTP nyílás, a kalcium ROS termelést befolyásoló hatása végső soron ugyancsak a kalcium  $\Delta\Psi\text{m}$ -ra gyakorolt hatásán keresztül valósul meg.



### 7.3. A kalcium hatása a ROS képzésre mPTP nyílás esetén

A mPTP nyílás redox függése ismert tulajdonsága a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórusnak (Szabo & Zoratti, 1993): az oxidatív stressz elősegíti a kalcium terhelés hatására kialakuló belső membrán permeabilizációt (Crompton et al, 1987). A mPTP nyílását két redox szenzitív tényező befolyásolja: a  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+/\text{NAD(P)}^+$  arány, ill. kritikus ditiol csoportok oxidációs állapota. A mitokondriális redox homeosztázis oxidatív irányba történő eltolódása a mPTP kialakulásának kedvez (Costantini et al, 1996). A kalcium indukálta mPTP nyílás mitokondriális ROS termelésre gyakorolt hatása azonban jelenleg nem tisztázott.

Kísérleteinkben a kalcium a ROS detektálási intervallumban adenin nukleotid mentes médiumban indukált nagy amplitúdójú mPTP nyílást.

A glutamáttal és maláttal energetizált mitokondriumokban a mPTP nyílását kísérleteinkben legnagyobb valószínűséggel a kalcein fluoreszcens festék fluoreszcenciájának csökkenése jelezte (9/C ábra, *a* görbe). A kalcein fluoreszcenciája  $\text{CoCl}_2$ -dal történő érintkezés hatására csökken, ami akkor következik be, ha az intramitokondriális kalcein membránpermeabilizálódás következtében a  $\text{CoCl}_2$ -t tartalmazó mérési médiumba diffundál. A mPTP nyílásra utal ezen kívül a kalcium piridin nukleotidokra gyakorolt hatása is.  $10\ \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  hirtelen esést okozott a redukált piridin nukleotidok szintjében, a  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$  autofluoreszcenciáját a rotenon nem tudta megemelni (8/A ábra). A rotenon hatásának elmaradása a mitokondriumból kiáramló oxidált és redukált piridin nukleotidok mPTP-on keresztül történő kiáramlásának következménye. A mitokondriális  $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$  mennyiségének abszolút meghatározása kalcium hatására és kalcium inzultus nélkül ugyancsak a mPTP nyílás eredményeképpen kialakuló piridin nukleotid vesztést igazolja (8/B ábra). Mindezek mellett  $10\ \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  jelentősen depolarizálta a mitokondrium belső membránját és a mitokondriumok duzzadását okozta (9/A, B ábra). A transzmissziós elektron mikroszkópos felvételen a mitokondriumok morfológiája ugyancsak mPTP nyílásra utal kalcium inzultust követően (10/B ábra).

Mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus nyílás esetén  $10\ \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  mintegy 20 %-kal csökkentette a glutamáttal és maláttal lélegeztetett mitokondriumok ROS

termelését (7. ábra, *b* görbe). A kalcium  $H_2O_2$  termelést csökkentő hatása egyfelől a kalcium indukálta mPTP nyílás belső membránt depolarizáló hatásának, másfelől a mPTP nyílás miatt bekövetkező mitokondriális piridin nukleotid vesztésnek tulajdonítható.

Kísérleteinkben  $10 \mu M [Ca^{2+}]$  a szukcináttal energetizált mitokondriumokban is nagy valószínűséggel mPTP-t indukált adenin nukleotid mentes médiumban: csökkentette a fényszórási szignált (17/D ábra, *a* görbe) és tartós depolarizációt okozott (17/C ábra, *a* görbe). Permeabilitási tranzíciós pórus nyílás esetén a mintegy 85%-kal csökkenő ROS képzés (16. ábra, *c* görbe) a mPTP-t kísérő depolarizáció RET-ot felfüggesztő hatásának, ill. mPTP-on keresztüli mitokondriális piridin nukleotid vesztésnek tulajdonítható.

Az irodalmi adatok a mPTP nyílás ROS termelést serkentő hatására vonatkozólag nem egybehangzóak. (Kowaltowski et al, 1996) kísérleteiben a kalcium hatására létrejövő mPTP inorganikus foszfát vagy szétkapcsolószer jelenlétében mitokondriális ROS termelés fokozódáshoz vezetett. Emellett a kalcium indukálta mPTP kialakulását ROS detoxifikáló enzimek gátolták (Kowaltowski et al, 1998; Maciel et al, 2001), ami ugyancsak a ROS mPTP nyílás folyamatában betöltött szerepét támasztja alá. (Votyakova & Reynolds, 2005) kísérleteiben az I. komplex parciális gátlásakor a kalcium nagyobb mennyiségű  $H_2O_2$  termelést okoz, mint abban az esetben, ha ugyanilyen kísérleti körülmények között a mPTP nyílás gátolt. Fokozott mitokondriális ROS termelésről számol be kalcium által triggerelt mPTP nyílás esetén (Hansson et al, 2008; Kanno et al, 2004) és (Petrosillo et al, 2004). (Kowaltowski et al, 1996) eredményeivel szemben (Scorrano et al, 1997) kísérleteiben a kalcium és FCCP együttes hatására kialakuló mPTP anaerob körülmények között is létrejön. (Chalmers & Nicholls, 2003) kísérletei szerint a kalcium indukálta mPTP nyílás alacsonyabb ROS képzéssel jár a kontrollhoz képest. (Panov et al, 2007) eredményei alapján a kalcium hatására kialakuló mPTP nyílás glutamát és malát szubsztrát esetén nem befolyásolja, szukcinát szubsztráttal csökkenti a mitokondriális ROS termelés sebességét. Spontán tranziens mPTP nyílást, és ezzel egyidejű fokozott mitokondriális ROS képzést detektáltak (Wang et al, 2008) intramitokondriálisan expresszált, szuperoxid anionra szenzitív fluoreszcens protein segítségével. Ezzel a módszerrel az egyes

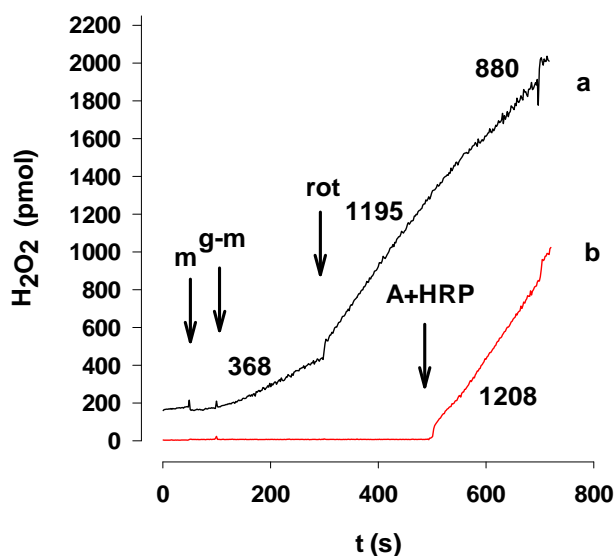
mitokondriumok szuperoxid képző aktivitása dinamikusan vizsgálható élő sejtekben. Szívizomsejtek és hippokampális neuronok mitokondriumainak szuperoxid képzése a mitokondriumok TMRM-rel vizsgált depolarizációjával és a mitokondriumokban akkumulálódott rhodamin-származék mitokondriumból való részleges kiáramlásával járt együtt, ami azt bizonyítja, hogy a mPTP nyílás és a mitokondriális szuperoxid képzés egy időben zajlik. A szuperoxid anion termelést jelző fluoreszcens szignált a mPTP-t gátló bongkregát és a ciklosoprin A gátolta (Wang et al, 2008).

A mPTP nyílás hatására kialakuló fokozott mitokondriális ROS képzéshez többféle mechanizmus is hozzájárulhat. A mPTP-n keresztül történő glutation és NADPH+H<sup>+</sup> kiáramlás a végső soron ezektől a redukáló ágensektől függő mitokondriális ROS elimináló mechanizmusok működését megakadályozza. A piridin nukleotidok kiáramlása a mitokondriális mátrixból elektron donor híján egyfelől gátolja a respirációs láncban történő szuperoxid képzést, ugyanakkor a Szent-Györgyi-Krebs-ciklusban fokozódhat a ROS termelés: izolált enzimen végzett kísérletek azt mutatják, hogy az  $\alpha$ -KGDH enzim NAD<sup>+</sup> hiányában H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t termel (Tretter & Adam-Vizi, 2004). Mindezek mellett a mPTP nyílásakor felszabaduló citokróm c a légzési lánc gátlását okozhatja, ami ugyancsak fokozott ROS képzéshez vezethet (Kantrow & Piantadosi, 1997; Petrosillo et al, 2004). Mindazonáltal saját eredményeink nem támasztják alá azt, hogy a mPTP nyílás fokozott mitokondriális ROS képzéssel járna.

#### **7.4. A módszer kritikája**

A mitokondriális és a celluláris ROS képzés mérésére használt fluoreszcens festékek kompetálnak a reaktív oxigénszármazékokért a mitokondriális és a citoszolikus ROS elimináló enzimekkel. Kísérleteinkben a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ra specifikus Amplex Red fluorofórt használtuk a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extramitokondriális detektálására. A torma peroxidáz jelenlétében akár 2 pmolnyi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t is érzékelő (Mohanty et al, 1997) Amplex Rednek feltehetően nagyobb az affinitása a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-hoz, mint a mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t elimináló enzimeknek, a glutation-peroxidáznak, és a peroxiredoxinnak. Az Amplex Red + HRP mérési módszer ezen tulajdonságát az a kísérlet mutatja (18. ábra), melyben a mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés detektálása során az Amplex Redet és a HRP-t a mérés különböző

időpontjaiban pipettázzuk a küvettába. A glutamáttal és maláttal energetizált mitokondriumok  $H_2O_2$  termelése rotenon hatására nagy mértékben fokozódik (18. ábra, *a* görbe). A mitokondriumok azonban ilyen nagy sebességű ROS termelésnél sem akumulálnak  $H_2O_2$ -t, az Amplex Red és a HRP rotenont követő hozzáadásakor (18. ábra, *b* görbe) a rezorufin fluoreszcenciája nem mutat függőleges emelkedést. Ez azt jelenti, hogy az Amplex Red+ HRP mintegy kivonja a mitokondriumokból a termelődő  $H_2O_2$ -t, a mitokondriális  $H_2O_2$ -t elimináló enzimek ROS mérés közben nem tudják kifejteni hatásukat, kísérleteinkben tehát nem a mitokondriumokból emittált, hanem a képződő ROS mennyiségét mértük.



**18. ábra**

### A mitokondriális $H_2O_2$ elimináció

*Adenin nukleotid mentes mérőpufferben mértük a mitokondriális  $H_2O_2$  termelést, az Amplex Red és a tormaperoxidáz (A+ HRP) hozzáadása 0 s-kor: a görbe, ill. 500 s-kor: b görbe történt. A mitokondrium (m; 0.1 mg/ml), a glutamát és malát (g-m; 5-5 mM), a rotenon (rot; 1  $\mu$ M) hozzáadását az ábrán nyilak jelölik. A görbék feletti számok a  $H_2O_2$  termelés sebességét mutatják pmol/min/mg egységben.*

## 8. Következtetések

Eredményeink alapján megállapítható, hogy nem létezik olyan mitokondriális target, ill. mechanizmus, ami univerzálisan meghatározná a kalcium hatását a mitokondriális ROS termelésre. Ehelyett a kalcium indirekt módon: i) a mitokondriális membránpotenciál megváltoztatásán, ii) a mitokondriális  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  arány befolyásolásán, ill. iii) a mPTP nyílás indukcióján keresztül modulálja a mitokondriumok ROS képzését.

Így a kalcium mitokondriális ROS képzésre gyakorolt hatása a mitokondrium metabolikus állapotától, a rendelkezésre álló légzési szubsztrátok típusától, ill. a kalcium inzultus nagyságától függ.

Izolált mitokondrium kísérleti modellen kapott eredményeink nem támasztják alá azt az általánosan elfogadott hipotézist, mely szerint a patológiás körülmények között kalcium terhelésnek kitett mitokondriumok ROS termelése jelentősen fokozódik.

## 9. Összefoglalás

Kísérleteinkben a kalcium hatását vizsgáltuk tengerimalacból származó, izolált agyi mitokondriumok reaktív oxigénszármazék (ROS) képzésére. A mitokondriumok  $H_2O_2$  termelését Amplex Red fluoreszcens festékkel mértük. A  $H_2O_2$  termelés detektálásával párhuzamosan  $NAD(P)H+H^+$  autofluoreszcenciát mértünk, a  $NAD^+ + NADH+H^+$  mennyiségét fotometriás módszerrel határoztuk meg. A mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus nyílást fényszórással, Safranine O fluorofórral, kalcein fluoreszcenciával, mitokondriális kalcium felvétel méréssel, valamint transzmissziós elektron mikroszkóppal vizsgáltuk. Munkánk során meghatároztuk, hogy a kalcium ROS termelésre gyakorolt hatása sok változótól függ: a kalcium inzultus nagyságától, a rendelkezésre álló légzési szubsztrátok típusától, az adenin nukleotidok jelenlététől, ill. a kalcium által indukált mitokondriális permeabilitási pórus (mPTP) nyílástól. 1.) A kalcium membránpotenciál ( $\Delta\Psi_m$ ) függő módon modulálja a mitokondriumok ROS termelését: i) alacsony energetikai állapotban, azaz alacsony mitokondriális membránpotenciál esetén a kalcium abban a koncentráció tartományban, melyben az átmeneti depolarizációt követően hiperpolarizálja a mitokondriumokat, növeli a glutamáttal és maláttal energetizált mitokondriumok  $H_2O_2$  termelését. Ilyen körülmények között a ROS termelés fokozódásához a kalcium hatására megemelkedő  $NADH+H^+/NAD^+$  arány is hozzájárulhat. Foszforiláló üzemmódban a kalcium hatása a mitokondriumot érő kalcium expozíció nagyságától is függ: extrém magas  $[Ca^{2+}]$  tartósan depolarizálja a belső membránt, ezzel olyan tartományba süllyeszti a  $\Delta\Psi_m$ -t, ahol a ROS képzés már nem függ a  $\Delta\Psi_m$ -tól. ii) Magas energetikai állapotban, magas  $\Delta\Psi_m$  esetén a kalcium depolarizáló hatása következtében csökkenti a  $H_2O_2$  termelést. iii) Szukcinát légzési szubsztrát jelenlétében a kalcium ugyancsak depolarizáló hatása következtében megszünteti az erősen  $\Delta\Psi_m$  függő reverz elektron transzportot (RET), egyben a RET-tal együtt járó magas mitokondriális ROS képzést. iv) ADP-vel létrehozott alacsony membránpotenciál esetén a kalcium nem befolyásolja a szukcináttal energetizált mitokondriumok ROS képzését, ugyanis az ADP hatására kialakuló alacsony  $\Delta\Psi_m$  alatt a kalcium okozta további depolarizáció már nincs hatással

a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képzés sebességére. 2.) Amennyiben a kalcium adenin nukleotidok hiányában mPTP nyílást indukál, mind I. mind II. légzési komplex szubsztrátok jelenlétében csökkenti a mitokondriális ROS képzést. Eredményeink alapján nem igazolható a tudományos közvélekedés, mely szerint a patológiás körülmények között kalciumot akkumuláló mitokondriumok ROS képzése jelentősen fokozódik. Munkánkkal inkább arra kívánjuk felhívni a figyelmet, hogy a kalcium ROS termelésre gyakorolt hatása alapvetően a mitokondrium metabolikus állapotától és a kalcium terhelés nagyságától függ.

## 10. Summary

In our experiments we examined the effect of calcium on reactive oxygen species (ROS) generation of isolated guinea pig brain mitochondria. We measured mitochondrial  $\text{H}_2\text{O}_2$  production with Amplex Red fluorescent dye. In parallel with ROS measurement  $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$  autofluorescence and the concentration of  $\text{NAD}^+$ + $\text{NADH}+\text{H}^+$  were also monitored. We examined the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) with light scattering, Safranin O and calcein fluorescence, mitochondrial calcium uptake measurements and transmission electron microscopy. It was determined in this work that the effect of calcium on ROS production depends on many factors, namely: the concentration of calcium, the type of respiratory substrates, the presence of adenine nucleotides and the opening of the mitochondrial permeability transition pore. 1) Calcium modulates mitochondrial ROS production in a membrane potential ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) -dependent manner: i) in low energy state, at low  $\Delta\Psi\text{m}$ , ROS generation in mitochondria respiring on glutamate and malate is elevated by calcium, if  $[\text{Ca}^{2+}]$  is in the range where it causes hyperpolarization of the inner membrane after transient depolarization. In this case the calcium induced increased  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  ratio can also contribute to the elevated ROS production. In phosphorylating mode the effect of calcium depends also on the magnitude of calcium exposition: extreme high  $[\text{Ca}^{2+}]$  causes sustained depolarization of the inner membrane and reduces the  $\Delta\Psi\text{m}$  into a range where mitochondrial ROS production no longer depends on  $\Delta\Psi\text{m}$ . ii) At high energy state, at high  $\Delta\Psi\text{m}$ , calcium reduces ROS production due to its depolarizing effect. iii) In the presence of succinate as respiratory substrate calcium also causes depolarization, therefore it inhibits the highly  $\Delta\Psi\text{m}$ -dependent reverse electron transport (RET) and the high ROS production by RET. iv) In the presence of ADP, at low  $\Delta\Psi\text{m}$ , calcium does not influence ROS production of mitochondria respiring on succinate, since under the low  $\Delta\Psi\text{m}$  caused by ADP, the calcium induced further depolarization does not influence the velocity of mitochondrial  $\text{H}_2\text{O}_2$  production. 2) If calcium induces mPTP opening in the absence of adenine nucleotides, calcium reduces ROS production also in the presence of complex I and



complex II respiratory substrates. Our results do not support the generally accepted hypothesis that ROS generation by calcium-accumulating mitochondria is elevated under pathological circumstances. Instead we emphasize that the effect of calcium on mitochondrial ROS generation depends on the energetic state of mitochondria and on the extent of the calcium insult.

## 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindenekelőtt Ádám Veronikának, aki PhD munkámat intézetében lehetővé tette és megvalósította; Christos Chinopoulosnak, aki betekintést adott abba, hogy hogyan kell eredményesen tudományos munkát végezni, és aki képes volt inspirálni a tudományos kutatás terén; Tretter Lászlónak, aki mindig kész volt arra, hogy megbeszéljük a mitokondriumok viselt dolgait, aki sok mindent megtanított a biokémiáról, aki sok szeretettel rávett, hogy végre megírjam a disszertációm és nem utolsó sorban akivel másról is lehetett beszélgetni; Takács Katalinnak és Várnagy Andreának, akik a kutatás munka részét elvégezték; Csanády Lászlónak, aki elolvasta és észrevételeivel javította az értekezésemet, valamint kollégáimnak, akiknek személyében sok esetben nem mindennapi embereket ismerhettem meg, és akik kezdettől fogva támogató légkört teremtettek a munkámhoz. Ezen kívül köszönöm szüleimnek és nagyszüleimnek.

## 12. Irodalomjegyzék

Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR (2007) Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**: 1129-1138

Adam-Vizi V (2005) Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants & redox signaling* **7**: 1140-1149

Adam-Vizi V, Chinopoulos C (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in pharmacological sciences* **27**: 639-645

Adam-Vizi V, Starkov AA (2010) Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **20 Suppl 2**: S413-426

Akerman KE, Wikstrom MK (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS letters* **68**: 191-197

Akerman KE, Wikstrom MK, Saris NE (1977) Effect of inhibitors on the sigmoidicity of the calcium ion transport kinetics in rat liver mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* **464**: 287-294

Albin RL, Greenamyre JT (1992) Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* **42**: 733-738

Andreae WA (1955) A sensitive method for the estimation of hydrogen peroxide in biological materials. *Nature* **175**: 859-860

Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry Biokhimiia* **70**: 200-214

Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkenin JD (2007) Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature cell biology* **9**: 550-555

Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *The Journal of biological chemistry* **280**: 18558-18561

Bathori G, Csordas G, Garcia-Perez C, Davies E, Hajnoczky G (2006) Ca<sup>2+</sup>-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). *The Journal of biological chemistry* **281**: 17347-17358

Beal MF (1992a) Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Annals of neurology* **31**: 119-130

Beal MF (1992b) Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **6**: 3338-3344

Beal MF (2005) Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Annals of neurology* **58**: 495-505

Benov L, Sztejnberg L, Fridovich I (1998) Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free radical biology & medicine* **25**: 826-831

Benzi G, Arrigoni E, Marzatico F, Villa RF (1979) Influence of some biological pyrimidines on the succinate cycle during and after cerebral ischemia. *Biochemical pharmacology* **28**: 2545-2550

Benzi G, Pastoris O, Dossena M (1982) Relationships between gamma-aminobutyrate and succinate cycles during and after cerebral ischemia. *Journal of neuroscience research* **7**: 193-201

Bernardi P (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiological reviews* **79**: 1127-1155

Bernardi P, Azzone GF (1981) Cytochrome c as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes. *The Journal of biological chemistry* **256**: 7187-7192

Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR (1994) Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **26**: 509-517

Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F, Forte M (2001) A mitochondrial perspective on cell death. *Trends in biochemical sciences* **26**: 112-117

Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabo I, Zoratti M (1992) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *The Journal of biological chemistry* **267**: 2934-2939

Bernofsky C, Swan M (1973) An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Analytical biochemistry* **53**: 452-458

Beutner G, Ruck A, Riede B, Welte W, Brdiczka D (1996) Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS letters* **396**: 189-195

Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ (1996) Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**: 1324-1336

Bindoli A (1988) Lipid peroxidation in mitochondria. *Free radical biology & medicine* **5**: 247-261

Bjorneboe A, Nenseter MS, Hagen BF, Bjorneboe GE, Prydz K, Drevon CA (1991) Effect of dietary deficiency and supplementation with all-rac-alpha-tocopherol on hepatic content in rats. *The Journal of nutrition* **121**: 1208-1213

Blandini F, Higgins DSJ, Greene JG, Greenamyre JT (1997) Glutamate and Mitochondrial Defects in Neurodegeneration. In *Mitochondria and Free Radicals in Neurodegenerative Diseases*, Beal MF, Howell N, Bodis-Wollner I (eds), pp 145-158. New York: Wiley-Liss Inc.

Bloem BR, Irwin I, Buruma OJ, Haan J, Roos RA, Tetrud JW, Langston JW (1990) The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences* **97**: 273-293

Boveris A, Cadenas E (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS letters* **54**: 311-314

Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *The Biochemical journal* **156**: 435-444

Boveris A, Martino E, Stoppani AO (1977) Evaluation of the horseradish peroxidase-scopoletin method for the measurement of hydrogen peroxide formation in biological systems. *Analytical biochemistry* **80**: 145-158

Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemasters JJ (1998) The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Molecular and cellular biology* **18**: 6353-6364

Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals of neurology* **41**: 646-653

Brustovetsky N, Brustovetsky T, Purl KJ, Capano M, Crompton M, Dubinsky JM (2003a) Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 4858-4867

Brustovetsky N, Dubinsky JM (2000) Limitations of cyclosporin A inhibition of the permeability transition in CNS mitochondria. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**: 8229-8237

Brustovetsky N, Dubinsky JM, Antonsson B, Jemmerson R (2003b) Two pathways for tBID-induced cytochrome c release from rat brain mitochondria: BAK- versus BAX-dependence. *Journal of neurochemistry* **84**: 196-207

Bunik VI, Sievers C (2002) Inactivation of the 2-oxo acid dehydrogenase complexes upon generation of intrinsic radical species. *European journal of biochemistry / FEBS* **269**: 5004-5015

Buntinas L, Gunter KK, Sparagna GC, Gunter TE (2001) The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* **1504**: 248-261

Burkitt MJ, Wardman P (2001) Cytochrome C is a potent catalyst of dichlorofluorescein oxidation: implications for the role of reactive oxygen species in apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* **282**: 329-333

Butler J, Jayson GG, Swallow AJ (1975) The reaction between the superoxide anion radical and cytochrome c. *Biochimica et biophysica acta* **408**: 215-222

Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* **180**: 248-257

Cao X, Wei Z, Gabriel GG, Li X, Mousseau DD (2007) Calcium-sensitive regulation of monoamine oxidase-A contributes to the production of peroxyradicals in hippocampal cultures: implications for Alzheimer disease-related pathology. *BMC neuroscience* **8**: 73

Chae HZ, Kim HJ, Kang SW, Rhee SG (1999) Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes research and clinical practice* **45**: 101-112

Chalmers S, Nicholls DG (2003) The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **278**: 19062-19070

Chang MC, Pralle A, Isacoff EY, Chang CJ (2004) A selective, cell-permeable optical probe for hydrogen peroxide in living cells. *Journal of the American Chemical Society* **126**: 15392-15393



Chen Z, Lash LH (1998) Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **285**: 608-618

Chinopoulos C, Gerencser AA, Doczi J, Fiskum G, Adam-Vizi V (2004) Inhibition of glutamate-induced delayed calcium deregulation by 2-APB and La<sup>3+</sup> in cultured cortical neurones. *Journal of neurochemistry* **91**: 471-483

Chinopoulos C, Starkov AA, Fiskum G (2003) Cyclosporin A-insensitive permeability transition in brain mitochondria: inhibition by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *The Journal of biological chemistry* **278**: 27382-27389

Chinopoulos C, Tretter L, Adam-Vizi V (1999) Depolarization of in situ mitochondria due to hydrogen peroxide-induced oxidative stress in nerve terminals: inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Journal of neurochemistry* **73**: 220-228

Choo YS, Johnson GV, MacDonald M, Detloff PJ, Lesort M (2004) Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Human molecular genetics* **13**: 1407-1420

Coelho JL, Vercesi AE (1980) Retention of Ca<sup>2+</sup> by rat liver and rat heart mitochondria: effect of phosphate, Mg<sup>2+</sup>, and NAD(P) redox state. *Archives of biochemistry and biophysics* **204**: 141-147

Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, Bernardi P (1996) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *The Journal of biological chemistry* **271**: 6746-6751

Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**: 689-695

Crompton M, Costi A, Hayat L (1987) Evidence for the presence of a reversible Ca<sup>2+</sup>-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *The Biochemical journal* **245**: 915-918

Crompton M, Heid I (1978) The cycling of calcium, sodium, and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. *European journal of biochemistry / FEBS* **91**: 599-608

Crompton M, Moser R, Ludi H, Carafoli E (1978) The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. *European journal of biochemistry / FEBS* **82**: 25-31

Crompton M, Virji S, Ward JM (1998) Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *European journal of biochemistry / FEBS* **258**: 729-735

Crow JP (1997) Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **1**: 145-157

Csordas G, Hajnoczky G (2009) SR/ER-mitochondrial local communication: calcium and ROS. *Biochimica et biophysica acta* **1787**: 1352-1362

Das AM, Harris DA (1990) Control of mitochondrial ATP synthase in heart cells: inactive to active transitions caused by beating or positive inotropic agents. *Cardiovascular research* **24**: 411-417

Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH (1992) A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Annals of neurology* **32**: 297-311

De Gomez-Puyou MT, Gavilanes M, Gomez-Puyou A, Ernster L (1980) Control of activity states of heart mitochondrial ATPase. Role of the proton-motive force and Ca<sup>2+</sup>. *Biochimica et biophysica acta* **592**: 396-405

De la Harpe J, Nathan CF (1985) A semi-automated micro-assay for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *Journal of immunological methods* **78**: 323-336

De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**: 336-340

Degli Esposti M (1998) Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica et biophysica acta* **1364**: 222-235

Denton RM, Randle PJ, Martin BR (1972) Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *The Biochemical journal* **128**: 161-163

Denton RM, Richards DA, Chin JG (1978) Calcium ions and the regulation of NAD<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. *The Biochemical journal* **176**: 899-906

Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, Bernardi P (2001) Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *The Journal of biological chemistry* **276**: 2571-2575

Dodoni G, Canton M, Petronilli V, Bernardi P, Di Lisa F (2004) Induction of the mitochondrial permeability transition by the DNA alkylating agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Sorting cause and consequence of mitochondrial dysfunction. *Biochimica et biophysica acta* **1658**: 58-63

Drechsel DA, Patel M (2010) Respiration-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> removal in brain mitochondria via the thioredoxin/peroxiredoxin system. *The Journal of biological chemistry* **285**: 27850-27858

Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, Yan Y, Wang C, Zhang H, Molkenin JD, Gunn-Moore FJ, Vonsattel JP, Arancio O, Chen JX, Yan SD (2008) Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nature medicine* **14**: 1097-1105

Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW (1995) Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**: 6377-6388

Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin JP, Bockaert J (1988) NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature* **336**: 68-70

Dykens JA (1994) Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated CA<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup>: implications for neurodegeneration. *Journal of neurochemistry* **63**: 584-591

Eriksson O, Fontaine E, Bernardi P (1998) Chemical modification of arginines by 2,3-butanedione and phenylglyoxal causes closure of the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of biological chemistry* **273**: 12669-12674

Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A, Martinou JC (1998) Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions. *The Journal of cell biology* **143**: 217-224

Esposito LA, Kokoszka JE, Waymire KG, Cottrell B, MacGregor GR, Wallace DC (2000) Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free radical biology & medicine* **28**: 754-766

Fato R, Bergamini C, Leoni S, Stocchi P, Lenaz G (2008) Generation of reactive oxygen species by mitochondrial complex I: implications in neurodegeneration. *Neurochemical research* **33**: 2487-2501

Fiskum G, Murphy AN, Beal MF (1999) Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **19**: 351-369

Folbergrova J, Ljunggren B, Norberg K, Siesjo BK (1974) Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex. *Brain research* **80**: 265-279

Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P (1998) Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *The Journal of biological chemistry* **273**: 12662-12668

Fowler CJ, Wiberg A, Orelund L, Marcusson J, Winblad B (1980) The effect of age on the activity and molecular properties of human brain monoamine oxidase. *J Neural Transm* **49**: 1-20

Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, Wieloch T (1998) Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**: 5151-5159

Funke F, Gerich FJ, Muller M (2011) Dynamic, semi-quantitative imaging of intracellular ROS levels and redox status in rat hippocampal neurons. *NeuroImage* **54**: 2590-2602

Gardner PR (2002) Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods in enzymology* **349**: 9-23

Gardner PR, Fridovich I (1992) Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical. *The Journal of biological chemistry* **267**: 8757-8763

Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, White CW (1995) Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **270**: 13399-13405

Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, Lenaz G (2001) The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS letters* **505**: 364-368

Gibson GE, Sheu KF, Blass JP (1998) Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J Neural Transm* **105**: 855-870

Gogvadze V, Robertson JD, Zhivotovsky B, Orrenius S (2001) Cytochrome c release occurs via Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent mechanisms that are regulated by Bax. *The Journal of biological chemistry* **276**: 19066-19071

Gomez-Puyou A, Tuena de Gomez-Puyou M, Klapp M, Carafoli E (1979) The effect of calcium on the translocation of adenine nucleotides in rat liver mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* **194**: 399-404

Griffiths EJ, Halestrap AP (1993) Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *Journal of molecular and cellular cardiology* **25**: 1461-1469

Gunter KK, Zuscik MJ, Gunter TE (1991) The Na(+)-independent Ca<sup>2+</sup> efflux mechanism of liver mitochondria is not a passive Ca<sup>2+</sup>/2H<sup>+</sup> exchanger. *The Journal of biological chemistry* **266**: 21640-21648

Gunter TE, Gunter KK (2001) Uptake of calcium by mitochondria: transport and possible function. *IUBMB life* **52**: 197-204

Gyulkhandanyan AV, Pennefather PS (2004) Shift in the localization of sites of hydrogen peroxide production in brain mitochondria by mitochondrial stress. *Journal of neurochemistry* **90**: 405-421

Halestrap AP (1989) The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochimica et biophysica acta* **973**: 355-382

Halestrap AP, Davidson AM (1990) Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *The Biochemical journal* **268**: 153-160

Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry* **97**: 1634-1658

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, New York: Oxford University Press Inc.

Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, Walter CA, Richardson A (2001) Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 10469-10474

Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E (2003a) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *The Journal of biological chemistry* **278**: 5557-5563

Han D, Canali R, Rettori D, Kaplowitz N (2003b) Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Molecular pharmacology* **64**: 1136-1144

Han D, Williams E, Cadenas E (2001) Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *The Biochemical journal* **353**: 411-416

Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V (1997) Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **29**: 89-95

Hansson MJ, Mansson R, Morota S, Uchino H, Kallur T, Sumi T, Ishii N, Shimazu M, Keep MF, Jegorov A, Elmer E (2008) Calcium-induced generation of reactive oxygen species in brain mitochondria is mediated by permeability transition. *Free radical biology & medicine* **45**: 284-294

Hattori F, Murayama N, Noshita T, Oikawa S (2003) Mitochondrial peroxiredoxin-3 protects hippocampal neurons from excitotoxic injury in vivo. *Journal of neurochemistry* **86**: 860-868

Haugland RP (2002) *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Products* Eugene, OR: Molecular Probes Inc.



Hauptmann N, Grimsby J, Shih JC, Cadenas E (1996) The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Archives of biochemistry and biophysics* **335**: 295-304

Haworth RA, Hunter DR (1979) The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site. *Archives of biochemistry and biophysics* **195**: 460-467

Haworth RA, Hunter DR (1980) Allosteric inhibition of the Ca<sup>2+</sup>-activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides. *The Journal of membrane biology* **54**: 231-236

Henderson LM, Chappell JB (1993) Dihydrorhodamine123: a fluorescent probe for superoxide generation? *European journal of biochemistry / FEBS* **217**: 973-980

Henneberry RC (1997) Excitotoxicity as a Consequence of Impairment of Energy Metabolism: The Energy-Linked Excitotoxic Hypothesis. In *Mitochondria and Free Radicals in Neurodegenerative Diseases*, Beal MF, Howell N, Bódis-Wollner I (eds), pp 111-143. New York: Wiley-Liss Inc.

Herrero A, Barja G (2000) Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **32**: 609-615

Hinkle PC, Butow RA, Racker E, Chance B (1967) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XV. Reverse electron transfer in the flavin-cytochrome beta region of the respiratory chain of beef heart submitochondrial particles. *The Journal of biological chemistry* **242**: 5169-5173

Hoffman DL, Salter JD, Brookes PS (2007) Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell

signaling. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* **292**: H101-108

Hopper RK, Carroll S, Aponte AM, Johnson DT, French S, Shen RF, Witzmann FA, Harris RA, Balaban RS (2006) Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium. *Biochemistry* **45**: 2524-2536

Humphries KM, Yoo Y, Szveda LI (1998) Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* **37**: 552-557

Hunter DR, Haworth RA (1979a) The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Archives of biochemistry and biophysics* **195**: 453-459

Hunter DR, Haworth RA (1979b) The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca<sup>2+</sup> release. *Archives of biochemistry and biophysics* **195**: 468-477

Hunter DR, Haworth RA, Southard JH (1976) Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **251**: 5069-5077

Hurd TR, Prime TA, Harbour ME, Lilley KS, Murphy MP (2007) Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: implications for mitochondrial redox signaling. *The Journal of biological chemistry* **282**: 22040-22051

Huser J, Rechenmacher CE, Blatter LA (1998) Imaging the permeability pore transition in single mitochondria. *Biophysical journal* **74**: 2129-2137

Hutson SM, Berkich D, Williams GD, LaNoue KF, Briggs RW (1989)  $^{31}\text{P}$  NMR visibility and characterization of rat liver mitochondrial matrix adenine nucleotides. *Biochemistry* **28**: 4325-4332

Imai H, Nakagawa Y (2003) Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free radical biology & medicine* **34**: 145-169

Irwin WA, Bergamin N, Sabatelli P, Reggiani C, Megighian A, Merlini L, Braghetta P, Columbaro M, Volpin D, Bressan GM, Bernardi P, Bonaldo P (2003) Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nature genetics* **35**: 367-371

Jensen PK (1966) Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. I. pH dependency and hydrogen peroxide formation. *Biochimica et biophysica acta* **122**: 157-166

Johansson C, Lillig CH, Holmgren A (2004) Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. *The Journal of biological chemistry* **279**: 7537-7543

Johnson DT, Harris RA, Blair PV, Balaban RS (2007) Functional consequences of mitochondrial proteome heterogeneity. *American journal of physiology Cell physiology* **292**: C698-707

Jones DP (1986) Intracellular diffusion gradients of  $\text{O}_2$  and ATP. *The American journal of physiology* **250**: C663-675

Jung DW, Baysal K, Brierley GP (1995) The sodium-calcium antiport of heart mitochondria is not electroneutral. *The Journal of biological chemistry* **270**: 672-678

Kahlert S, Zundorf G, Reiser G (2005) Glutamate-mediated influx of extracellular Ca<sup>2+</sup> is coupled with reactive oxygen species generation in cultured hippocampal neurons but not in astrocytes. *Journal of neuroscience research* **79**: 262-271

Kakinuma Y, Matsubara T, Hashimoto T, Sakamoto N (1994) Myocardial metabolic markers of total ischemia in vitro. *Nagoya journal of medical science* **57**: 35-42

Kamga CK, Zhang SX, Wang Y (2010) Dicarboxylate carrier-mediated glutathione transport is essential for reactive oxygen species homeostasis and normal respiration in rat brain mitochondria. *American journal of physiology Cell physiology* **299**: C497-505

Kamo N, Muratsugu M, Hongoh R, Kobatake Y (1979) Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *The Journal of membrane biology* **49**: 105-121

Kang D, Narabayashi H, Sata T, Takeshige K (1983) Kinetics of superoxide formation by respiratory chain NADH- dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Journal of biochemistry* **94**: 1301-1306

Kanno T, Sato EE, Muranaka S, Fujita H, Fujiwara T, Utsumi T, Inoue M, Utsumi K (2004) Oxidative stress underlies the mechanism for Ca<sup>(2+)</sup>-induced permeability transition of mitochondria. *Free radical research* **38**: 27-35

Kantrow SP, Piantadosi CA (1997) Release of cytochrome c from liver mitochondria during permeability transition. *Biochemical and biophysical research communications* **232**: 669-671

Keep M, Elmer E, Fong KS, Csiszar K (2001) Intrathecal cyclosporin prolongs survival of late-stage ALS mice. *Brain research* **894**: 327-331

Keller A, Mohamed A, Droese S, Brandt U, Fleming I, Brandes RP (2004) Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species. *Free radical research* **38**: 1257-1267

Kiedrowski L (2007) Critical role of sodium in cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] elevations in cultured hippocampal CA1 neurons during anoxic depolarization. *Journal of neurochemistry* **100**: 915-923

Kil IS, Park JW (2005) Regulation of mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase activity by glutathionylation. *The Journal of biological chemistry* **280**: 10846-10854

Kim HS, Lee JH, Lee JP, Kim EM, Chang KA, Park CH, Jeong SJ, Wittendorp MC, Seo JH, Choi SH, Suh YH (2002) Amyloid beta peptide induces cytochrome C release from isolated mitochondria. *Neuroreport* **13**: 1989-1993

Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* **427**: 360-364

Klohn PC, Soriano ME, Irwin W, Penzo D, Scorrano L, Bitsch A, Neumann HG, Bernardi P (2003) Early resistance to cell death and to onset of the mitochondrial permeability transition during hepatocarcinogenesis with 2-acetylaminofluorene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 10014-10019

Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC (2004) The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* **427**: 461-465

Komary Z, Tretter L, Adam-Vizi V (2008) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation is decreased by calcium in isolated brain mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* **1777**: 800-807

Korshunov SS, Krasnikov BF, Pereverzev MO, Skulachev VP (1999) The antioxidant functions of cytochrome c. *FEBS letters* **462**: 192-198

Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS letters* **416**: 15-18

Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE (1995) Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. *The American journal of physiology* **269**: C141-147

Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE (1996) Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca<sup>2+</sup> is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS letters* **378**: 150-152

Kowaltowski AJ, Netto LE, Vercesi AE (1998) The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. *The Journal of biological chemistry* **273**: 12766-12769

Koza RA, Kozak UC, Brown LJ, Leiter EH, MacDonald MJ, Kozak LP (1996) Sequence and tissue-dependent RNA expression of mouse FAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Archives of biochemistry and biophysics* **336**: 97-104

Krapfenbauer K, Engidawork E, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G (2003) Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain research* **967**: 152-160

Krishnamoorthy G, Hinkle PC (1988) Studies on the electron transfer pathway, topography of iron-sulfur centers, and site of coupling in NADH-Q oxidoreductase. *The Journal of biological chemistry* **263**: 17566-17575

Kristal BS, Park BK, Yu BP (1996) 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *The Journal of biological chemistry* **271**: 6033-6038

Kristian T, Pivovarova NB, Fiskum G, Andrews SB (2007) Calcium-induced precipitate formation in brain mitochondria: composition, calcium capacity, and retention. *Journal of neurochemistry* **102**: 1346-1356

Kroner H (1986) Ca<sup>2+</sup> ions, an allosteric activator of calcium uptake in rat liver mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* **251**: 525-535

Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS (2004) Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **279**: 4127-4135

Kumar MJ, Nicholls DG, Andersen JK (2003) Oxidative alpha-ketoglutarate dehydrogenase inhibition via subtle elevations in monoamine oxidase B levels results in loss of spare respiratory capacity: implications for Parkinson's disease. *The Journal of biological chemistry* **278**: 46432-46439

Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *The Biochemical journal* **368**: 545-553

Kusmaul L, Hirst J (2006) The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 7607-7612

Kwong LK, Sohal RS (1998) Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* **350**: 118-126

Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* **364**: 535-537

Lai JC, Cooper AJ (1986) Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *Journal of neurochemistry* **47**: 1376-1386

Lai JC, DiLorenzo JC, Sheu KF (1988) Pyruvate dehydrogenase complex is inhibited in calcium-loaded cerebrocortical mitochondria. *Neurochemical research* **13**: 1043-1048

Lambert AJ, Brand MD (2004) Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *The Biochemical journal* **382**: 511-517

Lapidus RG, Sokolove PM (1994) The mitochondrial permeability transition. Interactions of spermine, ADP, and inorganic phosphate. *The Journal of biological chemistry* **269**: 18931-18936

Lazarewicz JW, Wroblewski JT, Palmer ME, Costa E (1988) Activation of N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors stimulates arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* **27**: 765-769

Lewandowski ED, Doumen C, White LT, LaNoue KF, Damico LA, Yu X (1996) Multiplet structure of <sup>13</sup>C NMR signal from glutamate and direct detection of tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* **35**: 149-154



Leyens G, Donnay I, Knoop B (2003) Cloning of bovine peroxiredoxins-gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse and primate peroxiredoxins. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology* **136**: 943-955

Li PA, Uchino H, Elmer E, Siesjo BK (1997) Amelioration by cyclosporin A of brain damage following 5 or 10 min of ischemia in rats subjected to preischemic hyperglycemia. *Brain research* **753**: 133-140

Li W, Shariat-Madar Z, Powers M, Sun X, Lane RD, Garlid KD (1992) Reconstitution, identification, purification, and immunological characterization of the 110-kDa Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter from beef heart mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **267**: 17983-17989

Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature genetics* **11**: 376-381

Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M (1989) Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* **1**: 642-645

Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry* **80**: 780-787

Llinas R, Sugimori M, Silver RB (1992) Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* **256**: 677-679

Loffler M, Becker C, Wegerle E, Schuster G (1996) Catalytic enzyme histochemistry and biochemical analysis of dihydroorotate dehydrogenase/oxidase and succinate dehydrogenase in mammalian tissues, cells and mitochondria. *Histochemistry and cell biology* **105**: 119-128

Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS letters* **42**: 68-72

Maciel EN, Vercesi AE, Castilho RF (2001) Oxidative stress in Ca(2+)-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. *Journal of neurochemistry* **79**: 1237-1245

Mailer K (1990) Superoxide radical as electron donor for oxidative phosphorylation of ADP. *Biochemical and biophysical research communications* **170**: 59-64

Malis CD, Bonventre JV (1986) Mechanism of calcium potentiation of oxygen free radical injury to renal mitochondria. A model for post-ischemic and toxic mitochondrial damage. *The Journal of biological chemistry* **261**: 14201-14208

Marchesi E, Rota C, Fann YC, Chignell CF, Mason RP (1999) Photoreduction of the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein: a spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress measurements. *Free radical biology & medicine* **26**: 148-161

Martensson J, Lai JC, Meister A (1990) High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7185-7189

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G (1998a) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**: 2027-2031

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G (1998b) The permeability transition pore complex: a target for

apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *The Journal of experimental medicine* **187**: 1261-1271

Massari S, Azzone GF (1972) The equivalent pore radius of intact and damaged mitochondria and the mechanism of active shrinkage. *Biochimica et biophysica acta* **283**: 23-29

Mather M, Rottenberg H (2000) Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications* **273**: 603-608

McCord JM (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England journal of medicine* **312**: 159-163

McCormack JG, Denton RM (1979) The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *The Biochemical journal* **180**: 533-544

McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 3170-3174

McLain AL, Szweda PA, Szweda LI (2011) alpha-Ketoglutarate dehydrogenase: a mitochondrial redox sensor. *Free radical research* **45**: 29-36

Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF (1994) Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* **36**: 747-751

Menze MA, Hutchinson K, Laborde SM, Hand SC (2005) Mitochondrial permeability transition in the crustacean *Artemia franciscana*: absence of a calcium-regulated pore in

the face of profound calcium storage. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* **289**: R68-76

Miller EW, Albers AE, Pralle A, Isacoff EY, Chang CJ (2005) Boronate-based fluorescent probes for imaging cellular hydrogen peroxide. *Journal of the American Chemical Society* **127**: 16652-16659

Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148

Mizuno Y, Matuda S, Yoshino H, Mori H, Hattori N, Ikebe S (1994) An immunohistochemical study on alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease. *Annals of neurology* **35**: 204-210

Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG (1997) A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *Journal of immunological methods* **202**: 133-141

Moreno-Sanchez R (1985) Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **260**: 12554-12560

Muller FL, Liu Y, Van Remmen H (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *The Journal of biological chemistry* **279**: 49064-49073

Murphy AN, Kelleher JK, Fiskum G (1990) Submicromolar Ca<sup>2+</sup> regulates phosphorylating respiration by normal rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria by different mechanisms. *The Journal of biological chemistry* **265**: 10527-10534

Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* **417**: 1-13

Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y (2005) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434**: 652-658

Narabayashi H, Takeshige K, Minakami S (1982) Alteration of inner-membrane components and damage to electron-transfer activities of bovine heart submitochondrial particles induced by NADPH-dependent lipid peroxidation. *The Biochemical journal* **202**: 97-105

Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 14681-14686

Neher E (1998) Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* **20**: 389-399

Nicholls D, Akerman K (1982) Mitochondrial calcium transport. *Biochimica et biophysica acta* **683**: 57-88

Nicholls DG (2005) Mitochondria and calcium signaling. *Cell calcium* **38**: 311-317

Nicholls DG (2008) Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1147**: 53-60

Nicholls DG (2009) Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. *Biochimica et biophysica acta* **1787**: 1416-1424

Nicholls DG, Chalmers S (2004) The integration of mitochondrial calcium transport and storage. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **36**: 277-281

Nicolli A, Petronilli V, Bernardi P (1993) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry* **32**: 4461-4465

Nohl H, Breuninger V, Hegner D (1978) Influence of mitochondrial radical formation on energy-linked respiration. *European journal of biochemistry / FEBS* **90**: 385-390

Nonn L, Williams RR, Erickson RP, Powis G (2003) The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Molecular and cellular biology* **23**: 916-922

Nordberg J, Arner ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology & medicine* **31**: 1287-1312

Norenberg MD, Rao KV (2007) The mitochondrial permeability transition in neurologic disease. *Neurochemistry international* **50**: 983-997

Nosek MT, Dransfield DT, Aprille JR (1990) Calcium stimulates ATP-Mg/Pi carrier activity in rat liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **265**: 8444-8450

Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC (1988) Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain research* **451**: 205-212

Novgorodov SA, Gudz TI, Kushnareva YE, Roginsky VA, Kudrjashov YB (1991) Mechanism accounting for the induction of nonspecific permeability of the inner mitochondrial membrane by hydroperoxides. *Biochimica et biophysica acta* **1058**: 242-248

Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **276**: 38388-38393

Packer L, Weber SU, Rimbach G (2001) Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *The Journal of nutrition* **131**: 369S-373S

Panfili E, Sandri G, Ernster L (1991) Distribution of glutathione peroxidases and glutathione reductase in rat brain mitochondria. *FEBS letters* **290**: 35-37

Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Hemendinger R, Greenamyre JT, Rosenfeld J (2007) Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice. *American journal of physiology Cell physiology* **292**: C708-718

Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2001) Reactive oxygen species generated by the mitochondrial respiratory chain affect the complex III activity via cardiolipin peroxidation in beef-heart submitochondrial particles. *Mitochondrion* **1**: 151-159

Pardo B, Contreras L, Serrano A, Ramos M, Kobayashi K, Iijima M, Saheki T, Satrustegui J (2006) Essential role of aralar in the transduction of small Ca<sup>2+</sup> signals to neuronal mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **281**: 1039-1047

Parker WD, Jr., Parks J, Filley CM, Kleinschmidt-DeMasters BK (1994) Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology* **44**: 1090-1096

Pastorino JG, Chen ST, Tafani M, Snyder JW, Farber JL (1998) The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *The Journal of biological chemistry* **273**: 7770-7775

Petronilli V, Cola C, Bernardi P (1993) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix Ca<sup>2+</sup>. *The Journal of biological chemistry* **268**: 1011-1016

Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F (1999) Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophysical journal* **76**: 725-734

Petronilli V, Nicolli A, Costantini P, Colonna R, Bernardi P (1994) Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochimica et biophysica acta* **1187**: 255-259

Petronilli V, Szabo I, Zoratti M (1989) The inner mitochondrial membrane contains ion-conducting channels similar to those found in bacteria. *FEBS letters* **259**: 137-143

Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolese M, Paradies G (2004) Ca<sup>2+</sup>-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin. *The Journal of biological chemistry* **279**: 53103-53108

Pfeiffer DR, Tchen TT (1975) The activation of adrenal cortex mitochondrial malic enzyme by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. *Biochemistry* **14**: 89-96

Pivovarova NB, Hongpaisan J, Andrews SB, Friel DD (1999) Depolarization-induced mitochondrial Ca accumulation in sympathetic neurons: spatial and temporal characteristics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**: 6372-6384



Plaisant F, Clippe A, Vander Stricht D, Knoops B, Gressens P (2003) Recombinant peroxiredoxin 5 protects against excitotoxic brain lesions in newborn mice. *Free radical biology & medicine* **34**: 862-872

Przedborski S, Kostic V, Jackson-Lewis V, Naini AB, Simonetti S, Fahn S, Carlson E, Epstein CJ, Cadet JL (1992) Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**: 1658-1667

Pushpa-Rekha TR, Burdsall AL, Oleksa LM, Chisolm GM, Driscoll DM (1995) Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *The Journal of biological chemistry* **270**: 26993-26999

Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **266**: 22028-22034

Randall RD, Thayer SA (1992) Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**: 1882-1895

Rao KM, Padmanabhan J, Kilby DL, Cohen HJ, Currie MS, Weinberg JB (1992) Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. *Journal of leukocyte biology* **51**: 496-500

Rasola A, Bernardi P (2007) The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **12**: 815-833

Raza H, Robin MA, Fang JK, Avadhani NG (2002) Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *The Biochemical journal* **366**: 45-55

Reed KC, Bygrave FL (1974) The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. *The Biochemical journal* **140**: 143-155

Reynolds IJ, Hastings TG (1995) Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**: 3318-3327

Rich PR, Bonner WD (1978) The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* **188**: 206-213

Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1993) Microdomains with high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* **262**: 744-747

Rizzuto R, Pozzan T (2006) Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiological reviews* **86**: 369-408

Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP, Beckman JS (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 15038-15043

Rosen DR (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **364**: 362

Rota C, Chignell CF, Mason RP (1999a) Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by

horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free radical biology & medicine* **27**: 873-881

Rota C, Fann YC, Mason RP (1999b) Phenoxy free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase. Possible consequences for oxidative stress measurements. *The Journal of biological chemistry* **274**: 28161-28168

Rothe G, Oser A, Valet G (1988) Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Die Naturwissenschaften* **75**: 354-355

Royall JA, Ischiropoulos H (1993) Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Archives of biochemistry and biophysics* **302**: 348-355

Rybnikova E, Damdimopoulos AE, Gustafsson JA, Spyrou G, Pelto-Huikko M (2000) Expression of novel antioxidant thioredoxin-2 in the rat brain. *The European journal of neuroscience* **12**: 1669-1678

Sadek HA, Szweda PA, Szweda LI (2004) Modulation of mitochondrial complex I activity by reversible Ca<sup>2+</sup> and NADH mediated superoxide anion dependent inhibition. *Biochemistry* **43**: 8494-8502

Salet C, Moreno G, Ricchelli F, Bernardi P (1997) Singlet oxygen produced by photodynamic action causes inactivation of the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of biological chemistry* **272**: 21938-21943

Salvi M, Battaglia V, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pietrangeli P, Marcocci L, Mondovi B, Rossi CA, Toninello A (2007) Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *The Journal of biological chemistry* **282**: 24407-24415

Sandri G, Panfili E, Ernster L (1990) Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase in isolated rat-brain mitochondria: its effect on glutathione levels and Ca<sup>2+</sup> efflux. *Biochimica et biophysica acta* **1035**: 300-305

Santos JB, Schauwecker PE (2003) Protection provided by cyclosporin A against excitotoxic neuronal death is genotype dependent. *Epilepsia* **44**: 995-1002

Saura J, Richards JG, Mahy N (1994) Age-related changes on MAO in Bl/C57 mouse tissues: a quantitative radioautographic study. *Journal of neural transmission Supplementum* **41**: 89-94

Scaduto RC, Jr., Grotyohann LW (1999) Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical journal* **76**: 469-477

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* **54**: 823-827

Scheff SW, Sullivan PG (1999) Cyclosporin A significantly ameliorates cortical damage following experimental traumatic brain injury in rodents. *Journal of neurotrauma* **16**: 783-792

Schellenberg GD, Anderson L, Cragoe EJ, Jr., Swanson PD (1985) Inhibition of brain mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport by amiloride analogues. *Cell calcium* **6**: 431-447

Schild L, Reiser G (2005) Oxidative stress is involved in the permeabilization of the inner membrane of brain mitochondria exposed to hypoxia/reoxygenation and low micromolar Ca<sup>2+</sup>. *The FEBS journal* **272**: 3593-3601

Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, Hetz C, Danial NN, Moskowitz MA, Korsmeyer SJ (2005) Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 12005-12010

Schoenmakers TJ, Visser GJ, Flik G, Theuvenet AP (1992) CHELATOR: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *BioTechniques* **12**: 870-874, 876-879

Schultheiss HP, Klingenberg M (1984) Immunochemical characterization of the adenine nucleotide translocator. Organ specificity and conformation specificity. *European journal of biochemistry / FEBS* **143**: 599-605

Scorrano L, Petronilli V, Bernardi P (1997) On the voltage dependence of the mitochondrial permeability transition pore. A critical appraisal. *The Journal of biological chemistry* **272**: 12295-12299

Sengpiel B, Preis E, Kriegstein J, Prehn JH (1998) NMDA-induced superoxide production and neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons: role of mitochondria. *The European journal of neuroscience* **10**: 1903-1910

Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ (2004) Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochimica et biophysica acta* **1644**: 107-113

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**: 483-487

Simonson SG, Zhang J, Canada AT, Jr., Su YF, Benveniste H, Piantadosi CA (1993) Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia-reperfusion in the rat brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **13**: 125-134

Sims NR (1990) Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *Journal of neurochemistry* **55**: 698-707

Sipos I, Tretter L, Adam-Vizi V (2003) Quantitative relationship between inhibition of respiratory complexes and formation of reactive oxygen species in isolated nerve terminals. *Journal of neurochemistry* **84**: 112-118

Soh N (2006) Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. *Analytical and bioanalytical chemistry* **386**: 532-543

Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H (1994) Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mechanisms of ageing and development* **74**: 121-133

Sorgato MC, Sartorelli L, Loschen G, Azzi A (1974) Oxygen radicals and hydrogen peroxide in rat brain mitochondria. *FEBS letters* **45**: 92-95

Soriano ME, Nicolosi L, Bernardi P (2004) Desensitization of the permeability transition pore by cyclosporin a prevents activation of the mitochondrial apoptotic pathway and liver damage by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of biological chemistry* **279**: 36803-36808

Sousa SC, Maciel EN, Vercesi AE, Castilho RF (2003) Ca<sup>2+</sup>-induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone. *FEBS letters* **543**: 179-183

Sparagna GC, Gunter KK, Sheu SS, Gunter TE (1995) Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *The Journal of biological chemistry* **270**: 27510-27515

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of biological chemistry* **277**: 44784-44790

Starkov AA (2008) The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1147**: 37-52

Starkov AA, Fiskum G (2001) Myxothiazol induces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from mitochondrial respiratory chain. *Biochemical and biophysical research communications* **281**: 645-650

Starkov AA, Fiskum G (2003) Regulation of brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *Journal of neurochemistry* **86**: 1101-1107

Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 7779-7788

Starkov AA, Polster BM, Fiskum G (2002) Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *Journal of neurochemistry* **83**: 220-228

Swift LM, Sarvazyan N (2000) Localization of dichlorofluorescein in cardiac myocytes: implications for assessment of oxidative stress. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* **278**: H982-990

Szabo I, Bernardi P, Zoratti M (1992) Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. *The Journal of biological chemistry* **267**: 2940-2946

Szabo I, Zoratti M (1993) The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS letters* **330**: 201-205

Takehige K, Minakami S (1979) NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH-ubiquinone reductase preparation. *The Biochemical journal* **180**: 129-135

Tarpey MM, Fridovich I (2001) Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circulation research* **89**: 224-236

Taylor ER, Hurrell F, Shannon RJ, Lin TK, Hirst J, Murphy MP (2003) Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *The Journal of biological chemistry* **278**: 19603-19610

Tischler ME, Hecht P, Williamson JR (1977) Effect of ammonia on mitochondrial and cytosolic NADH and NADPH systems in isolated rat liver cells. *FEBS letters* **76**: 99-104

Tretter L, Adam-Vizi V (2000) Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**: 8972-8979

Tretter L, Adam-Vizi V (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 7771-7778

Tretter L, Adam-Vizi V (2005) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **360**: 2335-2345



Tretter L, Adam-Vizi V (2007) Uncoupling is without an effect on the production of reactive oxygen species by in situ synaptic mitochondria. *Journal of neurochemistry* **103**: 1864-1871

Tretter L, Mayer-Takacs D, Adam-Vizi V (2007a) The effect of bovine serum albumin on the membrane potential and reactive oxygen species generation in succinate-supported isolated brain mitochondria. *Neurochemistry international* **50**: 139-147

Tretter L, Takacs K, Hegedus V, Adam-Vizi V (2007b) Characteristics of alpha-glycerophosphate-evoked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in brain mitochondria. *Journal of neurochemistry* **100**: 650-663

Tretter L, Takacs K, Kover K, Adam-Vizi V (2007c) Stimulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by calcium in brain mitochondria respiring on alpha-glycerophosphate. *Journal of neuroscience research* **85**: 3471-3479

Trumpower BL (1990) The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *The Journal of biological chemistry* **265**: 11409-11412

Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* **552**: 335-344

Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* **237**: 408-414

Turrens JF, Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *The Biochemical journal* **191**: 421-427

Tzagoloff A (1982) *Mitochondria*, New York: Plenum Press.

Uchino H, Elmer E, Uchino K, Li PA, He QP, Smith ML, Siesjo BK (1998) Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat. *Brain research* **812**: 216-226

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Kennedy MC (2000) Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation. *The Journal of biological chemistry* **275**: 14064-14069

Vercesi AE (1984) Dissociation of NAD(P)<sup>+</sup>-stimulated mitochondrial Ca<sup>2+</sup> efflux from swelling and membrane damage. *Archives of biochemistry and biophysics* **232**: 86-91

Vermulst M, Bielas JH, Kujoth GC, Ladiges WC, Rabinovitch PS, Prolla TA, Loeb LA (2007) Mitochondrial point mutations do not limit the natural lifespan of mice. *Nature genetics* **39**: 540-543

Vesce S, Kirk L, Nicholls DG (2004) Relationships between superoxide levels and delayed calcium deregulation in cultured cerebellar granule cells exposed continuously to glutamate. *Journal of neurochemistry* **90**: 683-693

Vogel R, Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R (1999) The regeneration of reduced glutathione in rat forebrain mitochondria identifies metabolic pathways providing the NADPH required. *Neuroscience letters* **275**: 97-100

Votyakova TV, Reynolds IJ (2001) DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *Journal of neurochemistry* **79**: 266-277

Votyakova TV, Reynolds IJ (2004) Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. *Archives of biochemistry and biophysics* **431**: 138-144

Votyakova TV, Reynolds IJ (2005) Ca<sup>2+</sup>-induced permeabilization promotes free radical release from rat brain mitochondria with partially inhibited complex I. *Journal of neurochemistry* **93**: 526-537

Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA (1995) Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *Journal of immunological methods* **178**: 89-97

Wahllander A, Soboll S, Sies H, Linke I, Muller M (1979) Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases. *FEBS letters* **97**: 138-140

Walter L, Miyoshi H, Leverve X, Bernard P, Fontaine E (2002) Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by ubiquinone analogs. A progress report. *Free radical research* **36**: 405-412

Wang W, Fang H, Groom L, Cheng A, Zhang W, Liu J, Wang X, Li K, Han P, Zheng M, Yin J, Mattson MP, Kao JP, Lakatta EG, Sheu SS, Ouyang K, Chen J, Dirksen RT, Cheng H (2008) Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* **134**: 279-290

Wardman P (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free radical biology & medicine* **43**: 995-1022

Wernette ME, Ochs RS, Lardy HA (1981) Ca<sup>2+</sup> stimulation of rat liver mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *The Journal of biological chemistry* **256**: 12767-12771

Whatley SA, Curti D, Das Gupta F, Ferrier IN, Jones S, Taylor C, Marchbanks RM (1998) Superoxide, neuroleptics and the ubiquinone and cytochrome b5 reductases in

brain and lymphocytes from normals and schizophrenic patients. *Molecular psychiatry* **3**: 227-237

Wiesner RJ, Rosen P, Grieshaber MK (1988) Pathways of succinate formation and their contribution to improvement of cardiac function in the hypoxic rat heart. *Biochemical medicine and metabolic biology* **40**: 19-34

Williamson JR, Corkey BE (1979) Assay of citric acid cycle intermediates and related compounds--update with tissue metabolite levels and intracellular distribution. *Methods in enzymology* **55**: 200-222

Wilson DF, Erecinska M, Dutton PL (1974) Thermodynamic relationships in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Annual review of biophysics and bioengineering* **3**: 203-230

Winterbourn CC, Metodiewa D (1994) The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Archives of biochemistry and biophysics* **314**: 284-290

Wolkowicz PE, Michael LH, Lewis RM, McMillin-Wood J (1983) Sodium-calcium exchange in dog heart mitochondria: effects of ischemia and verapamil. *The American journal of physiology* **244**: H644-651

Woo HA, Kang SW, Kim HK, Yang KS, Chae HZ, Rhee SG (2003) Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence. *The Journal of biological chemistry* **278**: 47361-47364

Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in biochemical sciences* **28**: 32-40

Wrona M, Patel K, Wardman P (2005) Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free radical biology & medicine* **38**: 262-270

Yamada EW, Huzel NJ, Dickison JC (1981) Reversal by uncouplers of oxidative phosphorylation and by Ca<sup>2+</sup> of the inhibition of mitochondrial ATPase activity by the ATPase inhibitor protein of rat skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry* **256**: 10203-10207

Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibatani T, Belter JG, Motta L, Richardson A, Prolla TA (2003) The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free radical biology & medicine* **34**: 496-502

Ying WL, Emerson J, Clarke MJ, Sanadi DR (1991) Inhibition of mitochondrial calcium ion transport by an oxo-bridged dinuclear ruthenium ammine complex. *Biochemistry* **30**: 4949-4952

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Masse B, Kroemer G (1996a) Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS letters* **384**: 53-57

Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G (1996b) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *The Journal of experimental medicine* **183**: 1533-1544

Zeevalk GD, Nicklas WJ (1990) Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **253**: 1285-1292

Zhang L, Yu L, Yu CA (1998) Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **273**: 33972-33976

Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ (1990) The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *The Journal of biological chemistry* **265**: 16330-16336

Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B (2003) Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free radical biology & medicine* **34**: 1359-1368

Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical biochemistry* **253**: 162-168

Zhu H, Bannenberg GL, Moldeus P, Shertzer HG (1994) Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-dichlorofluorescein. *Archives of toxicology* **68**: 582-587

Zielonka J, Srinivasan S, Hardy M, Ouari O, Lopez M, Vasquez-Vivar J, Avadhani NG, Kalyanaraman B (2008) Cytochrome c-mediated oxidation of hydroethidine and mitochondrial hydroethidine in mitochondria: identification of homo- and heterodimers. *Free radical biology & medicine* **44**: 835-846

Zoccarato F, Cavallini L, Alexandre A (2004) Respiration-dependent removal of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in brain mitochondria: inhibition by Ca<sup>2+</sup>. *The Journal of biological chemistry* **279**: 4166-4174

Zoccarato F, Cavallini L, Bortolami S, Alexandre A (2007) Succinate modulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release at NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) in brain mitochondria. *The Biochemical journal* **406**: 125-129

Zoccarato F, Cavallini L, Deana R, Alexandre A (1988) Pathways of hydrogen peroxide generation in guinea pig cerebral cortex mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications* **154**: 727-734

Zundorf G, Kahlert S, Bunik VI, Reiser G (2009) alpha-Ketoglutarate dehydrogenase contributes to production of reactive oxygen species in glutamate-stimulated hippocampal neurons in situ. *Neuroscience* **158**: 610-616

## 13. Saját publikációk jegyzéke

Komary Z, Tretter L, Adam-Vizi V (2008) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation is decreased by calcium in isolated brain mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1777**: 800-807 (IF: 4.447)

Komary Z, Tretter L, Adam-Vizi V (2010) Membrane potential-related effect of calcium on reactive oxygen species generation in isolated brain mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1797**: 922-928 (IF: 5.132)