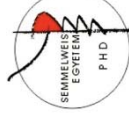


**A KÁLCIUM HATÁSA AZ IZOLÁLT
MITOKONDRIMUMOK REAKTÍV OXIGÉNSZÁRMAZÉK
KÉPZÉSÉRE**

DOKTORI TÉZISEK

Dr. Komáromy Zsófia

SEMMEIWEIS EGYETEM
SZENTÁGÓTHAI JÁNOS IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI
ISKOLA



Témavezetők:

Dr. Ádám Veronika egyetemi tanár,
a MTA rendes tagja
Dr. Tretter László egyetemi tanár,
a MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Sümegei Balázs egyetemi tanár,
a MTA doktora
Dr. Kardón Tamás egyetemi adjunktus,
PhD

A szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Mandl József egyetemi tanár,
a MTA rendes tagja

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Zelles Tibor PhD
Dr. Gallyas Ferenc egyetemi tanár, PhD

Budapest, 2012.

felhívni a figyelmet, hogy a kalcium ROS termelésre gyakorolt hatása alapvetően a mitokondrium metabolikus állapotától és a kalcium terhelés nagyságától függ.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Komary Z, Tretter L, Adam-Vizi V (2008) H₂O₂ 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)

BEVEZETÉS

A glutamát excitotoxicitás számos akut és krónikus neurológiai betegség kialakulásában a patomechanizmus meghatározó eleme.

Glutamát excitotoxicitás során a központi idegrendszer glutamát receptorainak tartós stimulációja neuronális károsodáshoz vezet. A glutamát okozta neuronpusztulás patofiziológiájában az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedés és a fokozott celluláris reaktív oxigénszármazék (ROS) képzés kiemelkedő jelentőséggel bír. Glutamát excitotoxicitás esetén a fokozott celluláris ROS termelés különböző forrásokból eredhet: kalcium hatására a foszfolipáz A₂ enzim arachidonsavat szabadít fel, az arachidonsav további metabolizmusa során szuperoxid anion keletkezik. A kalcium aktiválja a nitrogén-monoxid szintáz, illetve a szuperoxid aniont képző xantin-oxidáz és NADPH -oxidáz enzimeket is. Glutamát excitotoxicitás során a fokozott celluláris ROS képzéshez feltehetően a mitokondriumok is hozzájárulnak. Erre elsősorban azok a neuronális sejtkultúrán végzett vizsgálatok utalnak,

melyekben a glutamát expozíciót követő ROS képzés mértéke mitokondriális légzési komplex gátlókkal és szétkapcsoló szerekkel befolyásolható.

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a kalcium az izolált agyi mitokondriumok ROS képzését.

Az izolált mitokondriumok ROS termelését, egyben a kalcium ROS képzésre gyakorolt hatását nagy mértékben befolyásolják az adenin nukleotidok, a légzési komplex gátlók, a respirációs szubsztrátok, a mitokondriális $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$ arány és a mitokondriális permeabilitási pórus (mPTP) nyílás. Az alkalmazott kísérleti kondíciók különbözőségével magyarázható az, hogy a szakirodalom erősen megosztott a kalcium mitokondriális ROS termelésre gyakorolt hatására vonatkozóan: a kalcium ROS termelést növelő és csökkentő hatásáról is van irodalmi adat. Munkánkban arra törekedtünk, hogy tisztázzuk a kalcium hatását a mitokondriális ROS termelésre, egyben meghatározzuk azokat a mechanizmusokat, amelyek szerint a kalcium modulálja a mitokondriális ROS termelést. Eredményeinkkel reményeink szerint a megosztó szakirodalmi adatok értelmezéséhez is hozzá tudunk járulni.

4.) Szukcinát jelenlétében, ADP-vel kialakított alacsony membránpotenciál esetén a RET nem működik, a kalcium olyan tartományba csökkentette tovább a $\Delta\Psi\text{m}$ -t, ahol a ROS képzést már nem befolyásolja a $\Delta\Psi\text{m}$, így ADP jelenlétében a kalcium nem változtatta meg a mitokondrium H_2O_2 termelését.

A KÁLCIUM HATÁSA A MITOKONDRIÁLIS ROS TERMELESRE mPTP NYÍLÁS ESETÉN

Kísérleteinkben adenin nukleotid mentes médiumban a kalcium mPTP nyílást indukált. A mPTP nyílás mind I. mind II. légzési szubsztrátok jelenlétében csökkentette a mitokondrium ROS termelését.

KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink alapján nem igazolható a tudományos közvélekedés, mely szerint a patológias körülmények között kalciumot akkumuláló mitokondriumok ROS képzése jelentősen fokozódik. Munkánkkal inkább arra kívánjuk

Foszforiláló üzemmódban a kalcium ROS képzést befolyásoló hatása függ a kalcium inzultus nagyságától is: magas, 300 μM -os $[\text{Ca}^{2+}]$ tartósan depolarizálta a mitokondriumokat, így a $\Delta\Psi\text{m}$ az ADP által létrehozott alacsony membránpotenciál érték alá csökkent, ahol a mitokondriális ROS képzést már nem befolyásolja a $\Delta\Psi\text{m}$. Ennek megfelelően ez a $[\text{Ca}^{2+}]$ nem változtatta meg a mitokondriális ROS képzést.

2.) I. légzési komplex szubsztrátokkal energizált mitokondriumokban ATP, ill. ADP és oligomicin jelenlétében tapasztalható magas membránpotenciál esetén a kalcium depolarizálta a belső membránt, így csökkentette a mitokondriumok H_2O_2 termelését.

3.) Szukcinát légzési szubsztrát jelenlétében magas $\Delta\Psi\text{m}$ esetén reverz elektron transzport jön létre, melynek során az elektronok egy hányada visszafelé, az I. légzési komplexre áramlik és ott redukálja a NAD^+ -ot. A RET magas ROS képzéssel jár, az elektronok egy része az I. komplexen szuperoxid aniont képez. Az erősen $\Delta\Psi\text{m}$ -függő RET magas ROS képzését a kalcium depolarizáló hatása következtében csökkentette.

CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Megváltoztatja-e a kalcium az izolált mitokondrium ROS termelését?
 - 1.1. Hogyan befolyásolja a mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi\text{m}$) a kalcium ROS termelésre gyakorolt hatását?
 - 1.2. A kalcium mitokondriális ROS termelésre gyakorolt hatása 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?

MÓDSZEREK

MITOKONDRIMUM PREPARÁLÁS

A mitokondriumok izolálása tengerimalac agykéregből történt differenciál centrifugálással, Percoll grádiens alkalmazva. A méréseket megelőzően Clark-típusú oxigén elektróddal meghatároztuk a mitokondriumok respirációs kontroll hányadosát.

KÁLCIUM KONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁS

A mérések során a hozzáadott összes kalcium koncentrációt Chelator szoftverrel határoztuk meg. A mérési médiumban a szabad kalcium koncentrációt Fura-6F fluoreszcens festékkel ellenőriztük.

A MITOKONDRIÁLIS H_2O_2 TERMEELÉS MÉRÉSE

A mitokondrium H_2O_2 termelését extramitokondriálisan detektáltuk Amplex Red fluoreszcens festékkel, amely tormaperoxidáz jelenlétében 1:1 sztöchiometriával reagál H_2O_2 -dal fluoreszcens rezorufint eredményezve. A H_2O_2 termelést glutamát és malát, ill. szukcinát légzési

$NADH+H^+/NAD^+$ arány befolyásolásán, iv) illetve a mPTP indukcióján keresztül valósul meg.

A KÁLCIUM $\Delta\Psi_m$ –FÜGGŐ MÓDON BEFOLYÁSOLJA A MITOKONDRIMUMOK ROS TERMEELÉSÉT

1.) Glutamáttal és maláttal energetizált mitokondriumokban, ADP-vel létrehozott alacsony mitokondriális membránpotenciál esetén a kalcium $50 \mu M$ -os koncentrációban kezdeti depolarizációt követően hiperpolarizálta a mitokondriumok belső membránját, azaz az ADP által kialakított alacsony $\Delta\Psi_m$ érték fölé emelte a membránpotenciált. Ez a kalcium koncentráció a mitokondriumok ADP jelenlétében mérhető alacsony ROS képzését közel kétszeresére növelte, mivel a hiperpolarizáció olyan tartományba emelte a membránpotenciált, ahol a mitokondrium ROS képzése $\Delta\Psi_m$ -függő. A ROS képzés fokozódásához a kalcium hatása megemelkedő $NADH+H^+/NAD^+$ arány is hozzájárulhatott.

A MITOKONDRIÁLIS KÁLCIUM FELVÉTEL

A mitokondriális kalcium felvétel mérését 50 μM szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ esetén calcium green-5N, 300 μM szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ esetén Rhod-5N fluoreszcens festékkel végeztük. A fluoreszcenciát PTI Deltascan fluoreszcencia spektrofotométer segítségével mértük. A fluoreszcencia intenzitást ismert mennyiségű kalcium pulzusokkal létrehozott kalibrációs skálával kalibráltuk.

EREDMÉNYEK

Kísérleteink alapján összefoglalóan azt lehet megállapítani, hogy nem azonosítható olyan mitokondriális target, ill. mechanizmus, ami univerzálisan meghatározná a kalcium hatását a mitokondriális ROS termelésre. A kalcium hatása a mitokondriális ROS termelésre ehelyett i) a mitokondriális membránpotenciál megváltoztatásán, ii) a II. légzési komplex szubsztrát ROS képző mechanizmusának, a reverz elektron transzportnak (RET) a modulálásán, iii) a

szubsztrátokkal iniciáltuk. A fluoreszcenciát Photon Technology International (PTI) Deltascan fluoreszcencia spektrofotométer segítségével mértük. A mérések végén a kalibrációt ismert mennyiségű H_2O_2 hozzáadásával végeztük.

NAD(P)H+H⁺ AUTOFLUORESCENCIA MÉRÉS

A mitokondriális NAD(P)H+H⁺ autofluoreszcenciáját a H_2O_2 mérésel szimultán detektáltuk a PTI Deltascan fluoreszcencia spektrofotométeren.

A MITOKONDRIÁLIS NAD⁺+ NADH+H⁺ MENNYISÉG MEGHATÁROZÁSA

A mitokondriális NAD⁺+ NADH+H⁺ mennyiségének meghatározásához a mitokondriális membránokat Triton X-100 detergenseel permeabilizáltuk, majd a mitokondriumokat alkohol-dehidrogenázt, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium-bromidot (MTT), fenazin etoszulfátot (PES) és etanol tartalmazó oldatba helyeztük. A MTT optikai denzitását GBC UV/VIS 920

spektrofotométeren mértük. A kalibrációhoz ismert mennyiségű NAD^+ -ot használtunk.

MEMBRÁNPOTENCIÁL MEGHATÁROZÁS

A mitokondriális membránpotenciál meghatározását Safranin O fluoreszcens festékkel végeztük, amely pozitív töltésénél fogva akkumulálódik a mátrixban. A mitokondrium membránpotenciálját tetrametilrodamin-metil-észterrel (TMRM) is meghatároztuk. A fluoreszcencia detektálása PTI Deltascan fluoreszcencia spektrofotométerrel vagy Hitachi F-450 spektrofluoriméterrel történt. A fluoreszcencia szignált nem kalibráltuk, így a mérés kvalitatív értékelést tett lehetővé.

A MITOKONDRIÁLIS DUZZADÁS MÉRÉSE

A mitokondriumok duzzadását fényszórás segítségével határoztuk meg PTI Deltascan fluoreszcencia spektrofotométerrel vagy Hitachi F-450 spektrofluoriméterrel. A mitokondriális duzzadás mérése a $\Delta\Psi_m$ Safranin O fluoreszcens festékkel történő meghatározásával párhuzamosan történt.

A mPTP MEGHATÁROZÁSA KALCEIN FLUORESCENCIÁVAL

A mitokondriumokat a kalcein acetoximetilészter formáját (kalcein-AM) tartalmazó pufferben inkubáltunk. A membrán-permeabilis kalcein-AM-ből a mitokondriális észterázok hatására szabad, fluoreszkáló kalcein szabadul fel a mátrixban, ez utóbbi hidrofíli tulajdonságánál fogva nem jut ki a mitokondriumból. A mérési médium CoCl_2 -t tartalmazott, amely elnyeli a kalcein fluoreszcenciáját mPTP nyilván esetén. A fluoreszcenciát PTI Deltascan fluoreszcencia spektrofotométerrel detektáltuk.

A mPTP MEGHATÁROZÁSA TRANZMISSZIÓS ELEKTRON MIKROSKÓPPAL

Az izolált mitokondriumokat glutaraldehidben és nátrium kakodilát pufferben fixáltuk, ezt követően ozmium tetroxidban utófixáltuk, majd etilalkohollal és propilén oxiddal dehidráltuk, végül Durcupanba ágyasztuk. A szeleteket JEOL 1200 EMX transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.