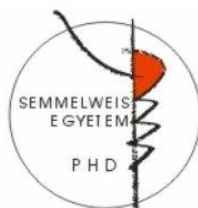


# A Szukcinil-KoA hozzájárulása a szubsztrát-szintű foszforilációhoz

PhD Doktori tézisek

**Dr. Kacsó Gergely**

Semmelweis Egyetem  
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola  
Funkcionális Idegtudományok



Témavezető:

Dr. Christos Chinopoulos PhD egyetemi docens,

Hivatalos bírálók:

Ifj. Dr. Gallyas Ferenc egyetemi tanár, az MTA doktora  
Dr. Kardon Tamás PhD, egyetemi docens

A szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Mandl József az MTA rendes tagja, egyetemi tanár

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Ligeti Erzsébet az MTA rendes tagja, egyetemi tanár  
Dr. Ozohanics Olivér PhD, tudományos munkatárs

Budapest  
2018

## **BEVEZETÉS**

Mint ismeretes, a sejtek “energiabankja” a mitokondrium. Az utóbbi években bebizonyosodott, hogy számos patológias folyamat párosítható valamely mitokondriális funkció károsodásával. Ezek között említeném az excitotoxicitás jelenségét, iszkémia/reperfúziós-, neurodegeneratív betegségek kialakulását, vagy magát az oxidatív stresszt. A mitokondriumok energiaszegény állapotában vagy oxigénhiányban csökken a belső membrán impermeabilitása, és csökken vagy megszűnik a mitokondriális membrán potenciál ( $\Delta\Psi_m$ ). A mitokondriális funkciók teljes kiesése esetén a membránpotenciál megszűnése a citoszol ATP-készletének sérülését eredményezheti. Éppen ezért nem meglepő, hogy lennie kell egy olyan mentőreakciónak, amely képes megakadályozni a citoszólikus ATP-készlet csökkenését abban az esetben, ha az oxidatív foszforiláció működése valamilyen oknál fogva nem elégséges. A kutatócsoportunk az elmúlt évek során sikeresen feltárt egy lehetséges mentőutat, a szubsztrát-szintű foszforilációt, amelyet a szukcinil-KoA ligáz- és az ezt az enzimet támogató egyéb környező enzimek katalizálnak.

A különböző encefalopátiák hátterében mitokondriális diszfunkciók állhatnak. Ezekben az esetekben a mitokondriális diszfunkciók mitokondriális DNS deplécióval társulnak. Számos állatmodellt hoztak már létre annak tanulmányozására, hogy a mitokondriális DNS-szintézisért felelős enzimek hatását vizsgálják. A szukcinil-KoA ligáz és a mitokondriális DNS-szintézis kapcsolatának vizsgálatára ezidáig egy tanulmány született.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

1. Az elsődleges célunk egy olyan állatmodell létrehozása volt, amely jól modellezi a szukcinil-KoA ligáz deficienciákat, és rávilágít a szubsztrát-szintű foszforiláció szerepére különböző bioenergetikai paraméterek vizsgálatával.

2. Céljaink közt szerepelt a következő kérdések megválaszolása:

- a. A szukcinil-KoA ligáz enzim különböző mutációi milyen mértékben befolyásolják a szubsztrát-szintű foszforiláció folyamatát?
- b. Mi történik akkor, ha a szubsztrát-szintű foszforilációban résztvevő enzimek által alkotott reakcióútban (SKDCC-tengely),

maga a központi enzim, a szukcinil-KoA ligáz működése sérül?

- c. Milyen különbségek mutatkoznak az ATP- és GTP-termelő alegységeket érintő mutációkat hordozó mitokondriumok működésében a különböző szövetekben?

3. Célunk volt, hogy megmagyarázzuk az általunk kidolgozott állatmodell segítségével, hogy a szukcinil-KoA ligáz érintő mutációval született betegekben a fenotípusos tüneteknek mi a molekuláris-szintű magyarázata? Mi áll a mitokondriális DNS-, illetve egyéb metabolit-szintekben történő eltérés hátterében?

4. Célunk volt feltárni egy esetleges kompenzációs mechanizmust, amivel magyarázható az a jelenség, hogy a heterozigóta mutációban szenvedő betegek nem mutatnak fenotípusos eltérést.

# MÓDSZEREK

## Kísérleti Állatok

Az egerek 129/SvEv (*Sucla2* heterozigóta vonal) és C57Bl/6N (*Suclg2* heterozigóta vonal) háttérrel rendelkeztek.

A *Sucla2*<sup>+/-</sup> heterozigóta egereket a Texas A&M Institute for Genomic Medicine (TIGM) állította elő „gén-csapda” módszerrel.

A *Suclg2* heterozigóta egereket [B6-Suclg2Gt(pU-21KBW)131Card] a CARD, Kumamotoi Egyetem, Japán állította elő, szintén „gén-csapda” módszerrel. Természetes úton sem a *Sucla2* <sup>-/-</sup> sem pedig a *Suclg2* <sup>-/-</sup> nem születtek meg, azt mutatva, hogy feltehetőleg az enzim alegység teljes hiánya az étellel összeegyeztethetetlen egerekben. *Sucla2* és *Suclg2* heterozigóta egereket összepárosítva, duplán heterozigóta (*Sucla2*<sup>+/-</sup>/*Suclg2*<sup>+/-</sup>) életképes egerek születtek.

Vizsgálataink során 3-, 6-, és 12 hónapos egyedekkel dolgoztunk.

## **Izolált mitokondriumok preparálása**

A mitokondriumok izolálását egér májából, -szívből és -agyból végeztük, differenciáló centrifugálás módszerével. A nem-szinaptikus agyi mitokondriumokat Percoll grádiensen történő szeparációs technikával különítettük el.

## **Fehérjekoncentráció mérése**

A fehérjekoncentráció mérése bicinchoninic assay segítségével (ThermoFisher SCIENTIFIC - Pierce™ BCA Protein Assay Kit), a mérés kalibrációja marhaszérum albumin standard-del, a mérés kivitelezése Tecan Infinite® 200 PRO series plate olvasóval (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany) történt.

## **A mitokondriális membránpotenciál meghatározása izolált mitokondriumokon**

A mitokondriális membránpotenciál ( $\Delta\Psi_m$ ) meghatározása izolált mitokondriumokon, safranin O fluoreszcencia detektálásával történt. A kationos festék a működő mitokondrium negatívan töltött belső membránjának mátrix felőli oldalán felhalmozódik. A fluoreszcencia mérését kétféle eszközzel, egy Hitachi F-4500 fluoreszcens spektrofotométerrel és egy O2k-Fluorescence LED2-Module, OROBOROS Oxygraph-2k-vel végeztük. A

fluoreszcens szignált egy kalibrációs görbe segítségével tudtuk átszámolni mV értékekre.

### **Mitokondriális légzés**

Az oxigénfogyasztás mérése polarográfiás módszerrel történt, Oxygraph-2k műszer segítségével. A szövet típusától függően 0.5-1 mg fehérjetartalomnak megfelelő mennyiségű mitokondriumot szuszpendáltunk 2 ml inkubációs közegben. A kísérleteket 37 °C fokon végeztük. Az oxigénkoncentráció és az oxigénfogyasztás DatLab szoftver segítségével történt (Oroboros Instruments).

### **Sejtkultúrák**

Fibroblaszt kultúrákat készítettünk bőrbioptziák felhasználásával. A biopsziamintákat SUCLA2 aktivitással nem rendelkező betegekből vételeztük. 5-7 napig tenyésztettük a sejteket poly-L-ornithine bevonatú flaskákban, 10% borjúsérummal, 2mM glutaminnal, penicillinnel, streptomycinnel és amphotericinnel kiegészített RPMI1640 típusú médiumban 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> közegben.

## **A mitokondriális membránpotenciál meghatározása *in situ* permeabilizált fibroblaszt sejtekben**

A membránpotenciál mérése ( $\Delta\Psi_m$ ) Safranin O fluoreszcens festékkel, az előbbieken már leírt jelenségen alapuló módszerrel történt. A fibroblaszt sejteket tripszinizációval választottuk le a flaskák felszínéről. A mérés a sejtek szuszpenzálása és permeabilizálása után az izolált mitokondriumokhoz használatos oldatban történt. A szubsztrátok: 5 mM glutamát és 5 mM malát voltak. A fluoreszcens szignált Tecan Infinite® 200 PRO series plate olvasóval regisztráltuk, 37 °C-on.

## **Western blot**

A Western blot mérésekhez az izolált mitokondriumok fagyasztott, RIPA pufferben és proteáz koktél jelenlétében történő szuszpenzált mintáját használtuk. A mintákból 3,75  $\mu$ g fehérjetartalomnak megfelelő mennyiséget vittünk fel soronként a poliakrilamid – nátrium dodecilszulfát (SDS-PAGE) gélelektroforézishez. Az elválasztott fehérjéket egy metanollal aktivált polivinilidén difluorid membránra vittük át. Az immunblottolás az antitestek alkalmazási előírataiban foglaltak szerint történt. Nyúl poliklonális anti-SUCLG1,



anti-SUCLG2, anti-VDAC1 és anti-SUCLA2 elsődleges antitesteket használtunk. Az immunreaktivitás egy peroxidáz-kapcsolt másodlagos antitest segítségével (szamár – antinyúl) történt, amelyet kemilumineszcens detektáló reagenssel erősítettünk. A denzitometriás kvantifikációhoz Fiji szoftvert használtunk.

### **mtDNA tartalom meghatározása**

Teljes DNS-tartalmat izoláltunk a 3 vizsgált szövetből (agy, szív, máj), mindegyik egércsoportból (3 hónapos, 6 hónapos 1 éves). A teljes DNS-tartalom izolálásához QIAamp DNS Mini Kitet (QIAGEN) használtunk, a gyártói előíratnak megfelelően. A relatív mitokondriális DNS-tartalom „real-time PCR” segítségével történt, cox1 primérről használva, nukleáris kódolású aktinB génre normalizálva. DNS-amplifikációhoz ABI 7900 rendszert használtunk.

### **Légzési lánc komplexek és citrát szintáz aktivitás mérése**

Izolált mitokondrium mintákon mértük a rotenone-érzékeny NADH CoQ reduktáz (komplex I)-, szukcinát-citokróm C reduktáz (komplex II/III)-, szukcinát

dehidrogenáz (komplex II, SDH)-, citokrom C oxidáz (COX, komplex IV)-, és citrát szintáz (CS) aktivitást.

### **Szukcinil-KoA aktivitás mérése**

Az ATP- és GTP-formáló szukcinil-KoA ligáz aktivitást 30°C-on mértük, DTNB használatával. A 2-nitro-5-tióbenzoát keletkezést spektrofotometriásan követtük, folyamatos kevertetés mellett.

### **Vér acilkarnitin szintjének meghatározása**

A vér acilkarnitin származékainak elemzéséhez vérfoltból történt 'electrospray ionization-tandem' tömegspektrószkópiát alkalmaztunk (MS-MS). A kísérletek elvégzéséhez Waters Alliance 2795 szeparációs egységgel kapcsolt Waters Micromass quarto micro API tömegspektrométert használtunk (Milford MA USA).

### ***Sucla2* mRNS mérése qRT-PCR-rel**

A *Sucla2* mRNS meghatározása qPCR-rel történt, két különböző kollaborátor segítségével, két különböző normalizáláshoz használt „housekeeping” mRNS ( $\beta$ -aktin és Proteoszóma 26S alegység, ATPáz 4 (Psmc4)) felhasználásával. Mindkét esetben a totál RNS-tartalom

került izolálásra a vizsgált szervekből (máj, agy, szív). Az izoláláshoz RNeasy Micro Kitet (Qiagen, Hilden, Germany) használtunk.

## **EREDMÉNYEK**

### **Sucla2 mRNA meghatározása, Szukcinil-KoA alegység expresszió és enzimaktivitás vad típusú és Sucla2+/- egerekben**

A Sucla2 mRNA tartalom szignifikánsan csökkent (26-71%) a Sucla2+/- egerekből nyert szövetekben a vad típusú egerekkel összehasonlítva. Ezek az eredmények összhangban vannak a Western blot eredményekkel, miszerint a Sucla2+/- egerek 76%-kal csökkent Sucla2 expressziót mutatnak szövettípustól és az egerek korától függően. Mindemellett a Sucla2+/- egerek 66%-kal csökkent Suclg1 expressziót, ugyanakkor 177%-kal megnövekedett Suclg2 expressziót mutatnak.

A fenti Suclg1/g2/a2 expresszió vizsgálat eredményeivel összefüggésben, az ATP-termelő Sucla2+/- aktivitás csökkent, míg a GTP-termelő aktivitás növekedett a szívből izolált mintákon.

### **Szukcinil-KoA alegység expresszió és enzimaktivitás vad típusú és Suclg2+/- egerekben**

A *Suclg2*<sup>+/-</sup> egerek 56% csökkenést mutattak a *Suclg2* expresszióban, a *Suclg1* expresszió gyakorlatilag nem változott, és a *Suclg2* szint csökkenését nem követte a *Sucla2* expresszió „rebound” megnövekedése. A *Suclg2* (és *Sucla2*) expresszió változékonysága arra utalhat ezekben a transzgénikus állatvonalakban, hogy a mutáns allél bizonyos esetekben képes vad típusú mRNS-t produkálni a gén-csapda körüli alternatív kivágódással (splicing).

### **Szukcinil-KoA alegység expresszió és enzimaktivitás vad típusú és *Sucla2*<sup>+/-</sup>/*Suclg2*<sup>+/-</sup> egerekben**

*Sucla2*<sup>+/-</sup> és *Suclg2*<sup>+/-</sup> egerek keresztezésével életképes *Sucla2*<sup>+/-</sup>/*Suclg2*<sup>+/-</sup> egerek születtek. A 12 hónapos korcsoportban végeztünk kísérleteket, három szövettípuson (szív, agy, máj), *SUCLG1*, *SUCLG2*, *SUCLA2* és *VDAC1* fehérjék elemzésével, ahol a *VDAC1* volt a kontrollcsoport. A Western blot eredmények a következők voltak: Az egyik *Sucla2* allél deléciója még az egyik *Suclg2* allél deléciója mellett is a *Suclg2* fehérje expressziójának emelkedését eredményezte májban. Ezen felül a *Suclg2* alegység

várható csökkenése (az egyik *Suclg2* allél deléciója miatt) elmaradt, minden bizonnyal azért, mert az egyik *Sucla2* allél deléciójának hatása ezt ellensúlyozta. Ezeket az eredményeket az ATP/GTP-termelőaktivitás mérések alátámasztották (vad típus vs. *Sucla2*<sup>+/-</sup>/*Suclg2*<sup>+/-</sup> egerek): ATP-termelőaktivitás csökkent a duplán heterozigóta egerekben, ugyanakkor a GTP-termelőaktivitás változatlan maradt a vad típusú egerekhez képest.

### **Az egyik *Sucla2* allél törlésének hatásai a mitokondriális légzésre**

Nem mutatkozott különbség a vad típusú egerek és a *Sucla2*<sup>+/-</sup> egerek mitokondriumain mért légzésben. Ez alól kivétel a State 2 légzés (egy eset) és a State 3 légzés (3 eset). A maradék 84 különböző szubsztrát- és szövetkombináció nem mutatott szignifikáns eltérést.

### **Az egyik *Sucla2* allél törlésének hatásai a membránpotenciálra és a szubsztrát-szintű foszforilációra rotenone-nal történt complex I gátlása mellett, illetve valódi anoxiában**

A mátrix szubsztrát-szintű foszforiláció működését rotenonnal történő Complex I gátlása, illetve valódi anoxia előidézése mellett is vizsgáltuk. Nem találtunk eltérést a vad típusú és a *Sucla2*<sup>+/-</sup> egerekből nyert minták között egyik kísérleti felállás esetén sem. Hasonló módon, a *Suclag2*<sup>+/-</sup> és vad típus összehasonlításakor sem találtunk eltérést. A *Sucla2*<sup>+/-</sup>/*Suclg2*<sup>+/-</sup> kettős heterozigóták esetén szintén nem mutatkozott eltérés, kivétel a májszövet esetén, amikor glutamát + malát +  $\beta$ -hidroxibutirát hármasszubsztrátkombinációt használtunk (ez a kombináció nem támogatja a szubsztrát-szintű foszforilációt). Ugyanakkor fontos eredmény, hogy a permeabilizált fibroblaszt sejteken végzett kísérleteink alkalmával, a *SUCLA* <sup>-/-</sup> betegekből származó *in situ* mitokondriumok nem voltak képesek a szubsztrát-szintű foszforilációra, rotenonnal történt légzési lánc gátlása mellett.

### **Az egyik *Sucla2* allél törlésének hatásai a légzési lánc komponensek aktivitására**

Kísérleteinkben vizsgáltuk az egyik *Sucla2* allél törlésének hatását egereken a komplex I, II, II/III és IV aktivitás mérésével. Az aktivitás értékeket citrát szintázra

normalizáltuk. Méréseink alapján elmondhatjuk, hogy a vad típusú egerek a  $Sucla2^{+/-}$  egerekhez képest a három szövettípusban és a három korcsoportban nem mutattak szignifikáns különbséget. A  $Sucla2^{+/-}/Suclg2^{+/-}$  duplán heterozigóta egerek szívéből nyert mitokondriumok esetén a szukcinát dehidrogenáz aktivitás szignifikáns növekedését tapasztaltuk a vad típusú egerekhez képest.

### **Az egyik $Sucla2$ allél törlésének hatásai a mitokondriális DNS tartalomra**

Ismert, hogy a szukcinil-KoA ligáz enzim résztvesz a mitokondriális DNS szintézisben. Ebből kifolyólag fontosnak tartottuk megvizsgálni a mitokondriális DNS tartalmat, összehasonlítva a vad típusú és a  $Sucla2^{+/-}$  egereket. A relatív DNS tartalmat máj-, agy-, szív mintákon mértük, három korcsoportban (3-, 6-, 12 hónapos) „real time PCR” módszerrel. Mérsékelt, de statisztikailag szignifikáns csökkenés mutatkozott a  $Sucla2^{+/-}$  mitokondriális DNS tartalomban az összes szövetben 3 hónapos -, illetve agy-mintákban 12 hónapos korban. A kettős heterozigóta  $Sucla2^{+/-}/Suclg2^{+/-}$  egerekben sokkal markánsabb csökkenés mutatkozott, mint a vad típusú egerekben.



## **Az egyik Sucla2 allél törlésének hatásai a vér acil-karnitin szinjeire**

20 karnitin észter vérszintjét vizsgáltuk vad típusú és Sucla2+/- egerekben, 3 korcsoportban. Eredményeink 63 összehasonlításból 36 esetben mutattak szignifikáns emelkedést a heterozigóta egerekben, 6 esetben szignifikáns csökkenés mutatkozott.

## KÖVETKEZTETÉSEK

A tézis legfontosabb eredményének azt tartom, hogy a *Sucla2*<sup>+/-</sup> egerekben a *Suclg2* alegység szintjének megemelkedése (upregulation) képes kompenzálni az ATP-termelő alegységet kódoló *Sucla2* allél kiesésének fenotípusos következményeit. Ugyanakkor fontos észrevétel az is, hogy az egyik *Suclg2* allél kiesése fordított esetben nem okozta a *Sucla2* fehérje alegység termelésének megemelkedését. A *Sucla2*<sup>+/-</sup> egereken végzett kísérleteink alapján elmondható, hogy az egyik *Sucla2* allél törlése az invariáns *Suclg1* alegység csökkenését-, és a GTP-termelő alegység kompenzatórikus emelkedését eredményezte. Ez a fehérjeszint-változás összhangban volt az ATP- és GTP-termelő aktivitás mérés eredményeivel. Az egyik *Suclg2* allél törlése nem okozta a *Sucla2* egység szintjének emelkedését. Egy kézenfekvő magyarázat lehet erre, hogy maga a *Suclg2* alegység felelős a kompenzációért. A kompenzáció olyan jelentős mértékű, hogy *Suclg2*<sup>+/-</sup> egereken a megmaradó egyetlen *Suclg2* allél képes volt annyi GTP-termelő alegységet expresszálni, hogy fenotípusosan nem mutatkozott különbség még a kettős heterozigóta egerekben sem. Továbbá ezekben a kettős

heterozigótákban az egyik *Suclg2* allél törlése miatti *Suclg2* fehérje alegység csökkenés elmaradt, feltehetőleg azért, mert az egyik *Sucla2* allél törlés hatása miatt a megmaradó *Suclg2* alegység expressziója felülszabályozódott. A *Suclg2* „upregulációja” olyan mértékű, hogy képes kompenzálni az egyik kieső *Suclg2* allélt.

Figyelembe véve, hogy a szukcinil-KoA ligáz számos metabolikus útvonal találkozásában foglal helyet, meglepő, hogy a *SUCLA2* heterozigóta betegek tünetmentesek. A karnitin észterek vizsgálatával, sikeresen kimutattunk egy fenotípusos eltérést a heterozigóta és a vad típusú egerek között. Elképzelhetőnek tartjuk ezen eredményeink alapján, hogy a *SUCLA2* heterozigóta betegekben az acil karnitin szintek eltérését szintén ki lehetne mutatni.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

*Az értekezés anyagát képző közlemények*

Abolition of mitochondrial substrate-level phosphorylation by itaconic acid produced by LPS-induced Irg1 expression in cells of murine macrophage lineage.

Németh B, Doczi J, Csete D, **Kacso G**, Ravasz D, Adams D, Kiss G, Nagy AM, Horvath G, Tretter L, Mócsai A, Csépanyi-Kömi R, Iordanov I, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. FASEB J. 2016 Jan;30(1):286-300. doi: 10.1096/fj.15-279398.

Impakt faktor: 5.498

Two transgenic mouse models for  $\beta$ -subunit components of succinate-CoA ligase yielding pleiotropic metabolic alterations.

**Kacso G**, Ravasz D, Doczi J, Németh B, Madgar O, Saada A, Ilin P, Miller C, Ostergaard E, Iordanov I, Adams D, Vargedo Z, Araki M, Araki K, Nakahara M, Ito H, Gál A, Molnár MJ, Nagy Z, Patocs A, Adam-Vizi V, Chinopoulos C.

Biochem J. 2016 Oct 15;473(20):3463-3485.

Impakt faktor: 3.797

Catabolism of GABA, succinic semialdehyde or gamma-hydroxybutyrate through the GABA shunt impair mitochondrial substrate-level phosphorylation.

Ravasz D, **Kacso G**, Fodor V, Horvath K, Adam-Vizi V, Chinopoulos C.

Neurochem Int. 2017 Mar 11. pii: S0197-0186(17)30045-1.

Impakt faktor: 3.262

*Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények*

The total and mitochondrial lipidome of *Artemia franciscana* encysted embryos.

Chen E, Kiebish MA, McDaniel J, Gao F, Narain NR, Sarangarajan R, **Kacso G**, Ravasz D, Seyfried TN, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Biochim Biophys Acta. 2016 Nov;1861(11):1727-1735.

Impakt faktor: 5.547

Reduction of 2-methoxy-1,4-naphthoquinone by mitochondrially-localized Nqo1 yielding NAD<sup>+</sup> supports substrate-level phosphorylation during respiratory inhibition

Ravasz D; **Kacso G**; Fodor V; Horvath K; Adam-Vizi V; Chinopoulos C Biochim Biophys Acta. 2018 Sep;1859(9):909-924. doi: 10.1016/j.bbabi.2018.05.002. Epub 2018 May 7.

Impakt faktor: 4.280