

Záróbeszámoló az OTKA NK-81983 pályázathoz

A reaktív oxigén származékok keletkezésének mechanizmusa és regulációja agyi mitokondriumokban

A) A humán (dihidro)lipoamid dehidrogenáz enzim és patológiás mutánsai funkcionális és strukturális jellemzése

A humán (dihidro)lipoamid dehidrogenáz patológiás mutánsok ROS-képző és katalitikus tulajdonságai (Ref.6):

A humán (dihidro)lipoamid dehidrogenáz enzim (LADH; az alfa-ketoglutarát dehidrogenáz komplex (KGDHc) E3 alegysége) 8 patogén mutánsát állítottunk elő. Vizsgáltunk FAD-tartalmat, konformációt (CD-spektroszkópiával), oligomerizációt (nanospray LC-MS/kalibrált gélszűrővel), katalitikus és ROS-képző aktivitást. Megállapítottuk, hogy 4 mutáció szignifikánsan növeli az E3 ROS-képzését. A mutánsok biofizikai karakterizálása megmutatta, hogy az emelkedett ROS-képzést nem lehet közvetlenül összefüggésbe hozni sem a FAD-tartalom változásával, sem egy globális konformációs változással, de a LADH homo-dimer monomerizálódásával sem. Konklúzióink, hogy minden mutációnál valószínűleg egy specifikus, lokális konformációváltozás történik, és hogy az emelkedett ROS-képzés hozzájárulhat E3-deficienciákban tapasztalt súlyos kórképek kialakulásához bizonyos mutációk esetében. Ez utóbbi felveti egy kiegészítő antioxidáns terápia szükségességét.

A hLADH és mutánsai konformációs vizsgálata molekuláris dinamika szimulációval (Ref.14):

A hLADH először nyolc, majd a további öt (betegséget okozó) mutánsa molekuláris dinamika (MD) analízisét végeztük el (két külön közlemény tárgyalja az eredményeket), és megállapítottuk a patogén mutációk által okozott – szerkezet-szimulációval jósolható – konformációs eltéréseket. Meghatároztuk a patológiás működés – a csökkent aktivitás mellett a bizonyos mutánsok esetében megjelenő emelkedett ROS-képzés – mechanizmusában valószínűleg szerephez jutó aminosavakat is. Szintén javaslatot tettünk a hLADH acidózisban megjelenő ún. diaforáz konformációjára is, amelynek a fehérje ROS-képzése is tulajdonítható.

Az egyesített KGDH és a PDH enzimkomplexek ROS-képzésének vizsgálata: (Ref.19)

Dr. Ambrus Attila három hónapot töltött (2012. május–július) a Rutgers Egyetemen (Prof. Frank Jordan laboratóriumában) a Fulbright Ösztöndíj és az – ennek az OTKA pályázatnak nemzetközi kiegészítő pályázataként elnyert – OTKA-IN 85082 pályázat támogatásával. Az ottani munka eredményeinek leírása az OTKA-IN 85082 pályázat záró jelentésében található.

B) A reaktív oxigénszármazékok képzése és eliminációja mitokondriumokban. A kalcium és különböző légzési szubsztrátok szerepe

Vizsgáltuk az izolált mitokondriumok ROS-képző aktivitását különböző légzési szubsztrátok és különböző fiziológias, illetve patológiás stimulusok hatására. A kalcium mitokondriális ROS-képződésre gyakorolt hatása vonatkozásában az irodalom megosztott. A vizsgálatok jelentőségét egyebek mellett az adja, hogy mind a ROS-koncentráció növekedése, mind a mitokondriális kalcium akkumuláció a mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus (PTP) nyílásához vezethet, és a PTP nyitása rendszerint a sejt halálával jár együtt.

A kalcium hatása a légzési lánc komplex I szubsztrátokkal energetizált mitokondriumokra (Ref.5):

A mitokondriális vizsgálatok során leggyakrabban használt szubsztrátkombináció a mitokondriumok energetizálására a glutamát és malát. Ezen szubsztrátok felvételét és oxidációját is befolyásolja a kalcium. Az alább ismertetendő vizsgálat sorozatban kétféle szabad, extramitokondriális kalciumkoncentrációt ($[Ca^{2+}]$) használtunk: 50 és 300 μM -t. A kísérleteket ADP jelenlétében végeztük, mely vegyület a PTP nyitásának igen hatékony inhibitora és élettani körülmények között is mindig jelen van a mitokondriumokban, illetve a citoplazmában. 50 μM Ca^{2+} hatására a mitokondriális H_2O_2 képzés csak mérsékelten ($81 \pm 18\%$) emelkedett, míg 300 μM Ca^{2+} hatására a ROS képzésben szignifikáns változás nem volt látható. A H_2O_2 mérésekkel párhuzamosan membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$) méréseket is végeztünk. Megfigyeléseink szerint nukleotidok (ADP, ATP) jelenlétében a Ca^{2+} hatására bekövetkező ROS-képzés változások a $\Delta\Psi_m$ változással mutatnak párhuzamosságot, ADP jelenlétében az ADP által depolarizált mitokondriumok 100 μM $[Ca^{2+}]$ alatt átmeneti depolarizációt követően hiperpolarizálódnak és emelkedő ROS képzést mutatnak, míg magasabb $[Ca^{2+}]$ mellett a hiperpolarizáció elmaradása a ROS képzés növekedésének elmaradásával jár együtt. Kimutattuk azt is, hogy a fenti kalcium hatások nem hozhatók összefüggésbe a PTP nyitásával, kísérleti körülményeink között a PTP zárva maradt.

A kalcium hatása a mitokondriális ROS-eliminációra (Ref.10):

Ismert, hogy a mitokondriumok nemcsak a ROS képzésében, hanem azok eliminációjában is részt vesznek. Az exogén H_2O_2 lebontása a lélegző mitokondriumokban nagy sebességgel folyhat. Vizsgáltuk, hogy a mitokondriumok Ca^{2+} felvétele hogyan befolyásolja a külsőleg adott H_2O_2 lebontását, illetve, hogy a folyamat megfordítása, azaz a felvett kalciumnak a mitokondriumból való eltávolítása helyreállítja-e a mitokondriális ROS-elimináló kapacitást. Eredményeink azt mutatták, hogy a mitokondriumokba történő kalciumfelvétel csökkenti a H_2O_2 eliminációs kapacitást, a kalcium eltávolítása keláló szerekekkel, a további felvétel gátlásával és a mitokondriális Na^+/Ca^{2+} csere stimulálásával jelentős mértékben helyreállítja a mitokondriumok H_2O_2 -t elimináló képességét.

A kalcium hatása az alfa-glicerofoszfáttal energetizált mitokondriumok ROS-képzésére és bioenergetikai paramétereire (Ref.12):

A központi idegrendszer mitokondriumaiban a citoplazma és a mitokondrium közötti kölcsönhatás fontos aspektusa a glikolízisben keletkező NADH mitokondriális oxidációja. Enélkül a folyamat nélkül a NADH redukálná a glikolízisből származó piruvátot, ami nem tudna a citrát körbe belépve az oxidatív foszforilációval energiát szolgáltatni. A NADH oxidációjában szereplő „inga” mechanizmusok egyike a glicerofoszfát inga, melynek része a mitokondriális belső membrán külső részén elhelyezkedő glicerofoszfát dehidrogenáz (GPDH). Ismert, hogy a GPDH aktivitását a Ca^{2+} jelentős mértékben fokozza. A glicerofoszfáttal energetizált mitokondriumok működésének kalciumfüggését vizsgáltuk, különös tekintettel a H_2O_2 -képződésre. A bioenergetikai tulajdonságokat (oxigénfogyasztás, membránpotenciál, NAD(P)H-szint) és a ROS-képződést különböző glicerofoszfát és kalcium koncentrációk mellett, PTP-gátlók jelenlétében és hiányában vizsgálva az alábbi fontosabb megállapításokat tettük: a GPDH enzim, mely a citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ változásait érzékeli és annak emelkedésére aktiválódik, jelentősen hozzájárulhat a kalciumszint emelkedéséhez társuló mitokondriális ROS-képzés fokozódáshoz. A GPDH által megvalósuló fokozott ROS-képzés részben független a mitokondriumok funkcionális állapotától és fokozott aktivitást mutathat sérült, funkcionálisan inkompetens mitokondriumokban. A GPDH-enzim önmagában is jelentős mitokondriális ROS-képző struktúra.

Összefoglaló közlemény a mitokondrium, kalcium és reaktív oxigén species homeosztázis összefüggéséről: (Ref.1)

Az eredeti közleményeken túlmenően a mitokondrium, kalcium és reaktív oxigén species homeosztázis összefüggéséről egy összefoglaló közlemény is született Anatoli Starkovval, a téma egyik nemzetközileg elismert szakértőjével közösen. Ebben az összefoglaló munkában kísérletet tettünk az irodalom ellentmondó állításainak magyarázatára úgy, hogy számbavettük azokat a kísérleti körülményekben leírt eltéréseket, amelyek a különböző eredményekhez és az eredmények eltérő interpretációjához vezettek.

Összefoglaló közlemény a mitokondriális dehidrogenázok szerepéről a ROS-homeosztázisban (Ref.13):

Közleményünkben két, a ROS-képzésben fontos szerepet játszó mitokondriális dehidrogenáz enzim, a citoplazma-mitokondriális kapcsolatban a citoplazmatikus NADH oxidációjához szükséges alfa-glicerofoszfát dehidrogenáz (lásd fentebb), illetve a citrátkör sebességmeghatározó enzime az alfa-ketoglutarát dehidrogenáz ROS-képző tulajdonságaival foglalkoztunk, és leírtuk a fenti két dehidrogenáz valószínűsíthető szerepét az idegrendszer patológiás állapotaiban.

Összefoglaló metodikai közlemény az izolált mitokondriumok ROS homeosztázisának méréséről (Ref.20)

A feltételezeten neuroprotektív metilénkék (MK) bioenergetikai és ROS-homeosztázira gyakorolt hatásai (Ref.21):

A neurodegeneratív betegségek patomechanizmusában a mitokondriális funkciók sérülése és a fokozott oxidatív stressz jelentős szerepet játszik. Az oxidatív stressznek a mitokondriumok mind forrásai, mind pedig elszenvedői, és az oxidatív stressz is számos mitokondriális funkció károsodásához vezet. Jelenleg hatékony neuroprotektív stratégia még nem ismert. Újabban neurodegeneratív betegségmodellekben ígéretes eredményeket kaptak a metilénkék (MK) alkalmazásával. Az irodalom a jótékony hatásokat döntően a mitokondriális funkciókat javító hatások számlájára írja, bár a közvetlen mitokondriális vizsgálatok száma igen kevés. Vizsgáltuk a MK mitokondriális energiatermelésre, a H₂O₂-képzésre és eliminációra gyakorolt hatását normál és respirációjukban gátolt mitokondriumokon különböző légzési szubsztrátok alkalmazásával. Megállapítottuk, hogy: a metilénkék stimulálja az ATP szintézist a légzésükben komplex I vagy komplex III gátlóval akadályozott mitokondriumokban. Az MK helyreállítja a depolarizált mitokondriális membránpotenciált és fokozza a kalciumfelvételt a respirációjukban akadályozott mitokondriumokban, azonban oxidatív stresszt okoz, mert fokozza a ROS-keletkezést, és H₂O₂-szenzitív elektróddal mérve csökkenti a hidrogén peroxid eliminációs sebességét. Az MK által stimulált H₂O₂-keletkezés ugyanakkor olyan szignál is lehet, amely antioxidáns mechanizmusok génexpressziós szinten történő bekapcsolódását indítja el (közlemény elfogadva).

C) A mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus (PTP) és az adenin nukleotid transzlokátor szerepével kapcsolatos kutatások

Ezek a kutatások részben az OTKA NK-81983 által finanszírozottak.

Összefoglaló közlemény a kalciumtárolás és a kalciumfoszfát csapadék képzésének kapcsolatáról (Ref.3):

A közlemény áttekinti a kalciumfelvétel és -felszabadulás termodinamikáját, a szétkapcsoló szerek és az adenin nukleotidok szerepét, valamint a matrixban képződő kalciumfoszfát csapadék tulajdonságait.

Az adenin nukleotid transzlokátor (ANT) működésének vizsgálata során egy eddig ismeretlen működési módot találtunk (Ref.4):

Patológias körülmények között ismert, hogy a mitokondriális F₀F₁ ATP-áz ATP-t hidrolizál a membránpotenciál fenntartása érdekében. Elméleti megfontolásokból feltételeztük, hogy létezhet olyan állapot, mikor az F₀F₁ ATP-áz már ATP-t hidrolizál, de az adenin nukleotid transzporter irányultsága még nem változott a fiziológias állapothoz képest. Ebben az esetben a matrix szubsztrát szintű foszforilációja tartja fenn az ATP-áz fordított működését, és a mitokondriumok nem fogyasztják a citoszol ATP-t. Feltételezésünket sejtes rendszeren is igazoltuk. A leírt mechanizmus védi a sejtet az extrém mértékű ATP-depléciótól a citoplazmában.

Az alfa-ketoglutarát dehidrogenáz komplex (KGDHc) csökkent működésének hatása a mitokondriális szubsztrát szintű foszforilációra (Ref.16):

Nemzetközi kollaborációban transzgenikus állatokon vizsgáltuk a KGDHc komplex szerepét a mitokondriális szubsztrát szintű foszforilációra. Megállapítottuk, hogy a KGDHc komplex csökkent működése károsítja a szubsztrátszintű foszforilációt és ez hozzájárul a KGDHc deficienciában észlelhető neurodegenerációhoz.

A mitokondriális diaforázok hozzájárulása a szubsztrát szintű foszforilációhoz (Ref.18):

Anoxiás körülmények, illetve légzés-gátlás körülményei között is észlelhető a mitokondriális NADH-pool oxidációja. Ez az oxidáció döntően a mitokondriális diaforáz enzimeknek köszönhető. A diaforáz működés eredményeképpen a citrátkör el tud jutni szubsztrát szintű foszforilációs lépésig, és az így képződő ATP megakadályozhatja az adenin nukleotid transzlokáz megfordulását és a citoplazmatikus ATP mitokondriális hidrolízisét.

Összefoglaló közlemény azon állapotokról és mechanizmusokról, melyek esetén a mitokondriumok nettó ATP termelőkből ATP fogyasztókká válhatnak (Ref.2):

Közleményünkben összefoglaltuk a mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus (mPTP) alkotásában szerepet játszó Cyclophilin D fehérje és az ATP-szintáz között leírt funkcionális kapcsolatot, és megfogalmaztuk azt a hipotézist, mely szerint a Cyclophilin D kiütése, ill. csendesítése következtében a PTP-nyílás azért is gátlódik, mert a Cyclophilin gátló hatása megszűnik az ATP-ázra és így a depolarizált mitokondriumokban az ATP szintáz aktívabban lesz képes ATP-hidrolízis terhére proton-grádiens felépíteni, mely proton-grádiens csökkenti a PTP-nyílás valószínűségét.

A Ciklofillin D (cypD) fehérje szerepe az agyi mitokondriumok kalciumindukált permeabilitás tranzíciós pórusának (PTP) nyílásában (Ref.8):

Az agyi mitokondriumok PTP-nyílását részben gátolni lehet a ciklofillin D fehérjéhez kapcsolódó vegyületekkel, illetve a ciklofillin D gén kiütésével. Megállapítottuk, hogy a mitokondriumok deenergetizált állapotában a cypD jelenléte stimulálja a PTP-nyílást. Vizsgálataink magyarázatot adnak arra, miért hatékony a cypD hiánya a nekrotikus (deenergetizált mitokondriumok) sejthalállal szemben, míg nem véd az apoptotikus (energetizált mitokondriumok) stimulusokkal szemben.

Az Artemia franciscana rákfajta mitokondriumainak különleges viselkedése (Ref.9,11,17):

A sósvízi rákfajta *Artemia franciscana* mitokondriumai igen magas külső kalciumkoncentrációk mellett sem mutatják a mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus (mPTP) nyitás jelenségét. Ugyanakkor ez a rákfajta az egyetlen, melynek adenin nukleotid transzlokátora (ANT) nem érzékeny a bongkrekátra. Tekintve, hogy a mPTP alkotásában

az ANT-nek fontos szerepet tulajdonítanak, feltételeztük, hogy a bongrekát inszenzitív ANT és az mPTP-nyílás elmaradása között kapcsolat lehet. A kérdés tisztázására két másik rákfajtából (Crangon Crangonból és Palaemon serratusból) izoláltunk mitokondriumokat, melyek szintén rezisztensek voltak az mPTP-nyitásra. Ezek a mitokondriumok azonban bongrekát-érzékeny ANT-aktivitással rendelkeztek, és így arra a következtetésre jutottunk, hogy az ANT bongrekátérzékenysége és az mPTP-nyitás nem kapcsolt jelenségek (ref.2.). További vizsgálatainkban az Artemia ANT fehérjét olyan élesztő mutánsokban expresszáltuk, melyek saját ANT-jét eltávolítottuk, és azt tapasztaltuk, hogy a fehérje az élesztő mitokondrium környezetben bongrekát szenzitívnek mutatkozott.

A szukcinil-CoA ligáz enzim ATP-vel működő izoformája (SUCLA2) az agykéregben kizárólag neuronális (Ref.15):

A SUCLA2 hiánya encefalomiopátiát okoz. Boncolási anyagból származó agyi mintákon az enzimről kimutattuk, hogy normál esetben is csak a neuronokban expresszálódik, illetve GTP-vel működő izoformája sem a neuronokban, sem az asztrocitákban nem fejeződik ki, így asztrocitákban a citrát-kör nem a konvencionális módon működik.