

A kutatómunka lényegében a szerződésben vállaltaknak megfelelő ütemben és eredményességgel folyt, annak ellenére, hogy a résztvevők személye az évek során változott. Kollár Anna a Ph.D tanulmányait feladva a családjával külföldre ment, az utolsó két évben Sipos Ildikó és Dömötör Eszter már nem vett részt a munkában, mert klinikusok lettek, Törőcsik Bea édesanya lett, viszont visszajött az Egyesült Államokból Christos Chinopoulos és csatlakozott a munkacsoporthoz Dóczi Judit, így a vállalt munka zavartalanul folyhatott. Ennek célja, ahogya a szerződésben is fogalmaztunk „annak a molekuláris mechanizmusnak a megértése volt, amely az oxidatív stressz sejtkárosító hatásáért felelős”. Az elért eredmények az alábbiak:

1. A sejt pusztulásban fontos szerepet játszó **glutamát felszabadulását** vizsgáltuk izolált idegvégződésekben az ischemiás állapotot jól modellező egyidejű Na^+ terhelés és oxidatív stressz hatására. Az alkalmazott, enyhe oxidatív stressz ($100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$) önmagában nem indukált glutamát felszabadulást, de szignifikánsan növelte a kisdózisú ($10 \mu\text{M}$) veratridin által kiváltott Ca^{2+} -független neurotranszmitter felszabadulást. A nagyobb dózisú ($40 \mu\text{M}$) veratridin indukálta glutamát felszabadulást azonban az oxidatív stressz nem potenciózta. Ez azt jelenti, hogy a kismértékű Na^+ terhelés hatását az oxidatív stressz fokozza és Ca^{2+} -független glutamát felszabaduláshoz vezet, főként a neurotranszmittert felvevő, Na^+ -grádiénstől függő transzporterek fordított működése révén. Másrészt, az oxidatív stresszel kombinált Na^+ -terhelés jelentős ATP szint csökkenést okoz, mely az excitotikus vezikulákból történő glutamát felszabadulást gátolja. Eredményeink arra mutatnak rá, hogy az ischemia során kialakuló Na^+ -terhelés mértéke döntő tényező lehet a reperfüzió során, az oxidatív stressz következtében kialakuló glutamát excitotoxicitás mértékének meghatározásában (Tretter and Adam-Vizi, J. Neurochem. 83, 855-862, 2002).

2. Megállapítottuk, hogy hidrogén peroxid ($25-50 \mu\text{M}$) által kiváltott oxidatív stresszre csökken az idegvégződésekben a **gluthation mennyisége**, ami a hidrogén peroxid eliminálás következménye. A válasz gyors, 5 percen belül megtörténik az oxidáns 70 %-nak az eliminálása, a total és redukált gluthation mennyisége 10 perc után kezdett visszatérni. Az endogén glutamát fontos szerepet játszik a gluthation szint fenntartásában,

glutamát adással a glutathion szint csökkenés mérsékelhető, miközben a glutamát metabolikus felhasználása csökkent. Fontos következtetés ezekből az eredményekből, hogy oxidatív stressz során a glutamát metabolizmusa hozzájárul a glutathion szint fenntartásához és ezáltal az idegvégződésekben az antioxidáns kapacitás fenntartásához (Tretter et al. Neurochem.Int. 42, 393-400, 2003).

3. Leírtuk azt az összefüggést, ami a **mitokondriális légzési komplexek gátlása és a reaktív oxigén származékok (ROS) keletkezése** között fennáll izolált idegvégződések *in situ* mitokondriumaiban. A komplex I gátlás, már kismértékű gátlás esetén ROS képződéssel jár, míg a komplex III és Komplex IV nagymértékű (> 70%-os) gátlása szükséges ahhoz, hogy *in situ* mitokondriumban mérhető mennyiségű ROS keletkezzen. A mérésekben a ROS keletkezést követtük a hidrogén peroxid direkt detektálásával és a hidrogén peroxid hatására létrejövő akonitáz gátlással egyaránt. Ennek a megfigyelésnek a fontosságát az adja, hogy Parkinson korban elhunyt beteget agyából származó post-mortem mintákban a komplex I 25-30 %-os gátlását figyelték meg, amely mellett a mi *in vitro* kísérleteinkben már szignifikáns ROS keletkezés volt észlelhető, vagyis a patomechanizmusban ez fontos tényező lehet, mert ahogy kimutattuk, a mennyisége elégséges ahhoz, hogy gátolja az endogén akonitázt. Ezzel szemben Alzheimer kórban, ahol a komplex III csökkent aktivitását észlelték, a mi adataink szerint a légzési lánc károsodás másodlagos esemény (Sipos et al. J.Neurochem. 84, 112-118, 2003; Tretter et al, Neurochem. Res. 29, 569-577, 2004).

Megállapítottuk azt is, hogy *in situ* mitokondriumokban a komplex gátlások következtében létrejövő ROS termelés a mitokondrium membránpotenciáltól független (Sipos et al., Neurochem. Res. 28, 1575-1581, 2003). Ez egy tovább vizsgálendő eredmény, mert kétségessé tesz egy újkeletű neuroprotektív stratégiát, amelynek az a lényege, hogy *in vivo* a mitokondrium membránpotenciáljának csökkentésétől a ROS termelés csökkenése és ily módon neuroprotekciónak várható.

4. A mitokondriumok nemcsak az oxidatív stressz érzékeny célpontjai, hanem maguk is a szabadgyökök egyik legfontosabb sejten belüli termelői. Vizsgálatainkban a **mitokondriális légzési szubsztrátok hatását** vizsgáltuk *in situ* körülmények között a

ROS termelésre és az akonitáz enzim aktivitására. Kísérleteinkben izolált agyi idegvégkészülékeket használtunk, melyekben a mitokondriumok *in situ*, a fiziológiához közelálló körülmények között vizsgálhatók. Az akonitáz enzim extrém mértékben érzékeny a szuperoxidra és a hidrogén peroxidra, így a mitokondriális szabadgyökképzés helyi szenzorának is tekinthető. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a citrát kivételével minden vizsgált respirációs szubsztrát (izocitrát, alfa-ketoglutarát, szukcinát, piruvát) növelte a ROS termelést glukóz mentes médiumban tartott szinaptoszómákban. Az alfa-ketoglutarát kivételével minden szubsztrát egyszersmind védelmet is nyújtott az akonitáznak az inaktiválódással szemben. Ebből a szempontból a piruvát hatása külön kiemelendő, mert hatása azt mutatta, hogy az akonitáz aktivitását a szabadgyökökön túlmenően az enzimen átmenő szubsztrát fluxus is jelentősen befolyásolja (Tretter et al, Neurochem. Res. 30, 1331-1338, 2005).

5. Megállapítottuk, hogy az alfa-ketoglutarát metabolizmusa speciális jelentőséggel bír a citrát-kör és az egész sejt metabolizmusa szempontjából, nemcsak azért, mert ez a citrát-kör sebességmeghatározó enzime, de azért is, mert az **α -ketoglutarát dehidrogenáz normál katalitikus funkciója során hidrogénperoxidot termel**. Az izolált enzim vizsgálata során azt találtuk, hogy a hidrogén peroxid keletkezés mértéke a NADH/NAD aránytól és a Ca^{2+} koncentrációtól függ. Minél nagyobb a NADH/NAD arány, annál nagyobb mértékű az enzim H_2O_2 termelése. A Ca^{2+} abban a koncentráció tartományban, amelyben aktiválja az enzim katalitikus funkcióját, fokozza a H_2O_2 termelődést. Izolált idegvégződésben, ha nem a glukóz a szubsztrát, hanem α -ketoglutarát, a hidrogén peroxid keletkezés 2.5-szeresre fokozódik és csökken az akonitáz aktivitás, ami jelzi, hogy olyan mértékű hidrogén peroxid keletkezésről van szó, amely az endogén, oxidánsokra érzékeny enzimeket gátolni képes (Tretter and Adam-Vizi J.Neurosci. 24, 7771-7778, 2004). Velünk egy időben, izolált mitokondriumon dolgozva, hasonló következtetésre jutott Starkov és mtsai. Ezeket a munkákat a Nature Neuroscience egy figyelem felhívó cikkben referálta. A fenti adatok azt mutatják, hogy fiziológias körülmények között a citrát kör egy enzime reaktív oxigén származékot képez, amely minden olyan patológiás esetben, amelyben megnő a NADH/NAD arány oxidatív stressz kialakulásához vezethet. Ez történik ischémiában, amikor az oxigén hiány miatt csökken

a NADH redukciója a légzési láncban, illetve ez történhet Parkinson kórban a nigrostriatalis neuronokban, ahol a komplex I részlegesen gátolt (Tretter and Adam-Vizi Phil.Trans.R.Soc.B 360, 2335-2345, 2005).

6. Jellemeztük az **agyi kapilláris endothel sejtek** (blood-brain barrier) **pH regulációban** szerepet játszó mechanizmusait primer agyi kapilláris endothel sejtenyészeten. Megállapítottuk, hogy a normál nyugalmi pH fenntartásában, valamint az intracelluláris acidifikálás utáni pH visszaregulálásban a Na-H cseretranszport és a bikarbonát-klorid cseretranszport egyaránt részt vesz. RT-PCR technikával a Na-H exchanger gén család NHE-1, -2, -3 and -4 izoformáinak jelenlétét detektáltuk. Oxidatív stressz a sejtek nyugalmi pH-ját nem befolyásolta, azonban hidrogén peroxid jelenlétében az intracelluláris acidifikálást követő pH visszaregulálás lelassult. Ez azt mutatja, hogy oxidatív stressz a normál intracelluláris pH mellett a Na-H cserélő működését nem befolyásolja, azonban intracelluláris savanyodás esetén, pl. ischemiában a transzporter működését gátolja (Sipos et al, Cell. Mol. Neurobiol., 25, 141-151, 2005).

7. **Agyi kapilláris endothel sejtek tenyészetén** leírtuk az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedést követő **mitokondriális kalcium szignálok** jellemzőit. A sejtekben intracelluláris kalcium koncentráció emelkedést plazmamembrán receptorok (ATP) stimulálásával vagy kalcium ionofor alkalmazással váltottunk ki. Wide-field fluoreszcens image és digital image technikával egyetlen mitokondrium szintjén elsőként mutattuk ki az intracelluláris kalcium felvétel és leadás diszkrét helyeit, az u.n.hot-spot-okat, valamint azt, hogy a kalcium laterálisan diffundál a mitokondriumon belül és ez a diffúzió a mitokondriális hálózat rövid szakaszaira korlátozódik. Fluoreszcens festékkel láthatóvá tettük, hogy besugárzás a mitokondriális membránpotenciál szinkron fluktuációját okozta a mitokondriális hálózat nagy területein, ami arra utal, hogy a hálózat bizonyos részei elektromos szinciciumot alkotnak, ezzel szemben a kalcium mozgás az individuális mitokondriumokra korlátozódik (Gerencsér and Adam-Vizi, Biophys. J. 88, 698-714, 2005).

8. Glutamát meghatározó szerepet játszik a neuronok ischemiát követő kiterjedt károsodásában, de ennek molekuláris mechanizmusa nem ismert. **Agyi kortikális sejtek tenyészetén** modelleztük a **glutamát excitotoxikus hatását**, követve a glutamát expozíciót követő kezdeti és az időben utána következő u.n. delayed kalcium deregulációt (DCD). Ez utóbbi van összefüggésben a sejtkárosodással. Megállapítottuk, hogy a másodlagos kalcium koncentráció emelkedés gátolható olyan szerekkel, amelyek a TRP (transient receptor potential) csatorna gátlói. Ezek a csatornák jelen vannak a neuronokban, funkciójuk egyelőre ismeretlen. Valószínűsíthető, hogy a TRP csatornák néhány tagja azonos az u.n. store-operated kalcium belépésért felelős csatornával. Eredményeink arra utalnak, hogy a TRP csatornákon keresztül történő kalcium beáramlás a sejtekbe felelős lehet azért az intracelluláris kalcium terhelésért, amelynek következtében a sejtek glutamát terhelést követően elpusztulnak (Chinopoulos et al, J.Neurochem. 91, 471-483, 2004).

9. Patkány agyi kapilláris endothel sejtek Ca^{2+} -aktiválta nem-szelektív kation csatornáit (CA-NSC) vizsgáltuk. Bár a CA-NSC csatornák nagy számban vannak jelen az agyi kapilláris endothel sejtek felszínén, e csatornák élettani jelentősége egyelőre nem ismert. Munkánk elején mindössze annyi volt ismert, hogy a CA-NSC csatorna Na^+ -ra és K^+ -ra permeábilis, és hogy intracelluláris Ca^{2+} aktiválja, citoplazmatikus nukleotidok pedig gátolják. Első megközelítésként a csatornák pontos biofizikai jellemzését tűztük ki célul.

Részletesen jellemeztük a CA-NSC csatornák kapuzását intracelluláris nukleotidok hiányában. Megállapítottuk, hogy közvetlenül a sejtől történő kiszakítás után a csatornát mikromólos intracelluláris Ca^{2+} aktiválja, fél-maximális aktivációt kb. 20 μM Ca^{2+} okoz. A Ca^{2+} a csatorna nyitási sebességét stimulálja, a csukódási sebességnek nincs jelentős $[Ca^{2+}]$ -függése. A sejtől történő kiszakítás után a CA-NSC csatornák gyorsan elveszítik aktivitásukat, e folyamat időállandója kb. 30 másodperc. Az aktivitásvesztés a Ca^{2+} iránti érzékenység csökkenését tükrözi, a deaktiválódott csatornák nagy (millimólos) intracelluláris $[Ca^{2+}]$ alkalmazásával továbbra is megnyithatók. A CA-NSC csatornák kapuzása, konstans intracelluláris $[Ca^{2+}]$ mellett, feszültségfüggést is mutat. Közepes intracelluláris $[Ca^{2+}]$ mellett -80 és + 80 mV között a nyitvatartási valószínűség kb. 0.2-

ról 0.8-ra nő. A depolarizáció megnöveli a csatornák látszólagos $[Ca^{2+}]$ -affinitását, magasabb $[Ca^{2+}]$ -k pedig balra tolják a feszültség-áram karakterisztikát. Mind a csukva-, mind a nyitvatartási idők eloszlása több exponenciális komponenset tartalmaz (a nyitvatartási időké legalább 4-et, a csukvatartási időké legalább 5-öt). Ez arra utal, hogy a kapuzási séma bonyolult, a csatornák számos stabil csukott és nyitott konformációval rendelkeznek. A Ca^{2+} és a feszültség e konformációk közötti átmenetek sebességi állandóit modulálják. A kiszakítást követő aktivitásvesztés részben visszafordítható redukálószerrel, pl. DTT vagy β -merkaptoetanol, alkalmazásával. Ebből arra következtetünk, hogy e jelenséghez a csatornák citoszólikus felszínén található cisztein oldalláncok oxidációja (diszulfid híd képződés) is hozzájárul. E jellemzők alapján a csatornák élettani működésére vonatkozóan a következő megállapítások valószínűsíthetők. Az aktivációhoz szükséges magas, mikromólos, intracelluláris $[Ca^{2+}]$ arra utal, hogy a Ca^{2+} forrása a csatorna közvetlen közelében kell elhelyezkedjen. Ilyen lehetséges források e sejtek plazmamembránjában található raktárvezérelt Ca^{2+} -csatornák és mechanoszenzitív kation csatornák, valamint az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak IP_3 receptorai. Miután a CA-NSC csatornák megnyílása a sejtmembrán depolarizációjához vezet, e csatornák működése szerepet játszhat a Ca^{2+} tranziensek időbeli lefutásának alakításában (Csanády and Adam-Vizi. *Biophys. J.* 85, 313-327, 2003).

10. Inside-out patch-clamp mérések részletes kinetikai elemzésével tanulmányoztuk a **nukleotid okozta gátlás molekuláris mechanizmusát** a fenti csatorna jellemzésében. Az ATP, ADP, és AMP a nyitási sebesség lassításával és a csukódási sebesség gyorsításával érik el gátló hatásukat. A leghatékonyabb gátlószer az AMP, amelynek látszólagos affinitása kb. 2 μ M (az ADP ~ 9 μ M, az ATP ~17 μ M koncentrációban okoz fél-maximális gátlást). Kinetikai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy az ATP, az ADP és az AMP közös kötőhellyel rendelkeznek a CA-NSC csatornán. Gátló hatásuk egyszerű reverzibilis kötődés eredménye: erősebben kötődnek a csatornához a csukott konformációban, ezért stabilizálják azt. Meghatároztuk a csatornák nukleotid-érzékenységi profilját. A nukleotid bázis kémiai jellege nem meghatározó (UTP és CTP is gátló hatású), azonban valamely bázis jelenléte mindenképpen szükséges (ribóz-5-foszfát és 1-foszforibozil-5-pirofoszfát). Ciklikus nukleotidok (ciklikus AMP, ciklikus

GMP) nem gátoltak, és dinukleotidok (NAD, NADH, NADP, NADPH, NAADP, ADP-ribóz, ciklikus ADP-ribóz) is csak nagy koncentrációban okoztak részleges gátlást. Azok a nukleotidok amelyek nem, vagy csak kis mértékben, gátoltak, nem voltak képesek kivédeni az egyidejűleg adott ATP gátló hatását. Valószínű, hogy e nukleotidok nem kötődnek hatékonyan a csatornához. Végül felfedeztük, hogy a nukleotid okozta gátlás dekanadattal kompetitíve felfüggeszthető. A dekanadát erőlyesen aktiválja a CA-NSC csatornákat – még millimólos koncentrációjú nukleotid jelenlétében is – mivel rendkívül nagy (nanomólos) affinitással kötődik a csatorna nyitott konformációjához. Elképzelhető, hogy létezik egy negatív töltésű endogén ligand amely a dekanadát kötőhelyhez kapcsolódva lehetővé teszi a csatornák aktiválódását intakt sejtekben. Jelenleg a dekanadát a CA-NSC csatornák egyetlen ismert nagy affinitású aktivátora (Csanády and Adam-Vizi. *J. Gen. Physiol.* 123:743-757, 2004).

11. Neurodegeneratív kórképekben (pl. agyi ischemia) meghatározó a központi idegrendszer sejtjeinek metabolikus állapota és a mitokondriális funkciók. Az agyi metabolizmus szabályozásában fontos szerepet tölt be a vér-agy gát. Vizsgálataink során *in situ* képalkotó **mikrofluorimetriás méréseket** végeztünk primer **agyi kapilláris endotel sejt kultúrán** a mitokondriális **kalcium háztartás jellemzésére oxidatív stressz előidézése során**. Eredményeink azt mutatják, hogy fiziológias körülmények között az agyi endotel sejtek mitokondriumi ATP stimulus (100 μ M, 100 sec) hatására a plazmamembránon a citoplazmába beáramló Ca^{2+} ionokat felveszik, majd a mitokondriális Ca^{2+} tranziens átlagosan 60 sec-on belül teljesen lecseng (felezési ideje: 28 ± 5 sec), a mitokondriumok Ca^{2+} szintje visszatér az alapállapotba. Hidrogén-peroxid (250 μ M) kiváltotta oxidatív stressz hatására a mitokondriális Ca^{2+} tranziens lecsengése szignifikánsan hosszabb lett, a felezési idő a duplájára nőtt. A mitokondriális Ca^{2+} tranziens lecsengési idejének meghosszabbodása egyértelműen jelzi a mitokondrium Ca^{2+} efflux mechanizmusainak károsodását oxidatív stresszben. Az eredményekből jelenleg készül publikálásra alkalmas anyag.

12. **Excitotoxikus glutamát kezelés** hatására **primer kortikális neuronokban** egy kezdeti, átmeneti csúcsot követően az intracelluláris Ca^{2+} szint hirtelen, irreverzibilisen

megemelkedik (késői kalcium dereguláció, DCD), mely a sejt Ca^{2+} homeosztázisának összeomlásához és sejtpusztuláshoz vezet (1. szintén a 9. pont). Kísérleteink során fluoreszcens mikroszkópos technikával vizsgáltuk a neuronok NAD(P)H autofluoreszcenciájának ($F_{\text{NAD(P)H}}$) változását excitotoxikus glutamát kezelés hatására, hogy nyomon kövessük a sejtek **metabolikus és redox állapotának változását**. Glutamát kezelés hatására az $F_{\text{NAD(P)H}}$ szignál két lépcsőben (iniciális és másodlagos), irreverzibilisen esik. A másodlagos $F_{\text{NAD(P)H}}$ esés korrelál a DCD során bekövetkező irreverzibilis $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedéssel. Mérési eredményeink szerint az iniciális $F_{\text{NAD(P)H}}$ esés a mitokondriális NAD(P)H teljes és a citoplazmatikus NAD(P)H részleges oxidációjakor következik be, míg a másodlagos $F_{\text{NAD(P)H}}$ esés a maradék citoplazmatikus NAD(P)H oxidációja. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy NMDA és AMPA receptorok közreműködése szükséges az $F_{\text{NAD(P)H}}$ iniciális és másodlagos esésének kialakulásához. Ca^{2+} -mentes médiumban másodlagos $F_{\text{NAD(P)H}}$ esés nem alakul ki, míg az iniciális esés kialakulásának megakadályozásához mind a Ca^{2+} , mind a Na^+ ionokat el kell távolítani az extracelluláris médiumból. Meggátolható az iniciális $F_{\text{NAD(P)H}}$ esés továbbá a mitokondriális Ca^{2+} influx és efflux blokkolásával is. Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a glutamát kezelés során bekövetkező iniciális $F_{\text{NAD(P)H}}$ esés a mitokondriális 'Ca²⁺-cycling' következménye, mely nagymértékben függ a plazmamembránon át történő Ca^{2+} és Na^+ ion beáramlástól. A másodlagos $F_{\text{NAD(P)H}}$ esés az MPTP nyílása miatt következik be, amely pórus nyílás azonban nem a DCD oka, hanem következménye.

Az eredményekből jelenleg folyik egy kézirat összeállítása.