

SZAKMAI BESZÁMOLÓ **OTKA 46567, Tretter László**

EREDMÉNYEK SZINAPTOSZÓMÁKON

Kísérleteinkben az izolált idegvégződés (szinaptoszómák) reaktív oxigén származék (ROS) képzését kezdtük el vizsgálni különböző légzési szubsztrátokkal. Egyik korai megfigyelésünk az volt, hogy a különböző légzési szubsztrátok jelenlétében az oxidatív stressz iránt érzékeny akonitáz enzim aktivitása különböző mértékben változik. A legnagyobb mértékű inaktiválódást alfa-ketoglutarát szubsztrát (a-KG) jelenlétében észleltük. Az akonitáz aktivitás változása azonban online nem mérhető. A hidrogén peroxid (H_2O_2) keletkezés nagy érzékenységgel, online mérésére bevezettük az amplex red fluorimetriás módszert.

Kimutattuk, hogy az alfa-ketoglutarát dehidrogenáz (a-KGDH), a citromsav ciklus sebességmeghatározó enzime, mely maga is érzékeny az oxidatív stressz általi funkciókárosodásra, képes hidrogénperoxid és szuperoxid képzésre. A-KG-al lélegeztetett szinaptoszómákban a H_2O_2 képződés 2.5-szeresére nőtt, és az oxidatív stresszre különösen érzékeny akonitáz enzim is szignifikáns mértékben inaktiválódott. Izolált a-KGDH enzimmel végzett kísérleteinkben az enzim koenzim-A és a-KG jelenlétében, de NAD hiányában H_2O_2 -ot termelt. A NAD, mely a H_2O_2 képzés erős gátlószere, az enzimet a ROS-képző módból a katalitikus módba (NADH képzés) kapcsolta. Ezzel szemben NADH jelenlétében az a-KGDH H_2O_2 képzése jelentősen nőtt, és NADH jelenlétében a H_2O_2 képzéshez nem volt szükség a-KG-ra. A NADH/NAD arány változtatása érzékenyen, de ellentétes előjellel szabályozta az enzim katalitikus és ROS-képző aktivitását, azaz a NADH/NAD arány emelkedése csökkentette a katalitikus aktivitást, de jelentősen fokozta a ROS-képzést. A kalcium koncentráció ($[Ca^{2+}]$) emelésével mind NAD jelenlétében, mind pedig NAD hiányában a ROS-képző aktivitás növekedése volt megfigyelhető.

Eredményeink arra utalnak, hogy a mitokondriális ROS képződésben nemcsak a légzési lánc enzime, de az a-KGDH is részt vehet, különösen a NADH oxidáció csökkenése esetén. Ennek a megfigyelésnek a hipoxiás állapotokban észlelhető emelkedett ROS-képzés magyarázatában van jelentősége.

Az a-KGDH enzim multienzim komplex, így a ROS képzés helyének megállapítása különösen érdekes. Analógiák alapján valószínűsíthető, hogy a ROS képzésért legalábbis részben az enzim E3 alegysége, a lipoamid dehidrogenáz a felelős, ugyanis a legtöbb, a reaktív oxigén származékok képzésében résztvevő enzim funkcionális csoportként flavin nukleotidot is tartalmaz. Munkánkkal párhuzamosan egy, az USA-ban dolgozó munkacsoport is hasonló eredményekre jutott. Tudtunk egymás munkájáról, és a két kéziratot (az övek elsősorban izolált mitokondriumokon nyert eredményeket tartalmazott) együtt, cosubmissionként nyújtottuk be. Az amerikai munkacsoportnak rendelkezésére állt az E3 alegység szempontjából génkiütött, heterozigóta egértörzs, és ezeken az állatokon kapott eredményeik nagymértékben valószínűsítették az E3 alegység fontos szerepét a ROS-képzésben. Ismert, hogy az E3 alegység több enzimkomplexnek is lehet építőanyaga, így az a-KGDH-on kívül az elágazó szénláncú ketosav dehidrogenáznak és a piruvát dehidrogenáznak is alegysége. Logikusan adódott a feltételezés, hogy a piruvát dehidrogenáz enzim is képes lehet ROS termelésre. Szinaptoszómákon vizsgáltuk a piruvát hatását a szinaptoszómák ROS képzésére. Amplex red-dal mérve a szinaptoszómákból felszabaduló H_2O_2 mennyiségét, ezt piruvát jelenlétében emelkedettnek találtuk. Meglepetésre a ROS iránt igen szenzitív akonitáz enzim aktivitása nem csökkent, sőt a piruvátnak részleges védő hatása volt a szubsztrátok nélkül inkubált szinaptoszómákban megnyílvánuló, időfüggő akonitáz inaktiválódással szemben. A szinaptoszómák detergenssel történő permeabilizálása megszüntette a piruvát protektív hatását, amiből arra következtettünk, hogy a piroszőlősavnak metabolizálnia kellett a citrátkörben a védőhatás eléréséhez, azaz a piroszőlősavból képződő akonitáz

szubsztrátok, úgymint a citrát és az izocitrát lehetnek felelősek a védő hatásért. A detergenssel kezelt idegvégződéseken a citrát és izocitrát jelenlétében az akonitáz inaktíválódása szignifikánsan csökkent, alátámasztva a feltételezés jogosságát.

A különböző légzési szubsztrátok ROS metabolizmusra gyakorolt hatásának vizsgálatát izolált mitokondriumokon folytattuk. Ennek oka az volt, hogy az izolált mitokondriumokon a szinaptoszómákban sokszor felmerülő permeabilitási problémákkal nem kellett törődnünk, a használt szubsztrátok mind bejutottak a mitokondriumokba. Az alkalmazott Amplex red hidrogén peroxid mérési módszerrel pedig, mivel ennek komponensei nem képesek áthatolni a plazmamembránon, közvetlenebbül lehetett a ROS-képzést mérni, nem kellett figyelembe venni a citoplazmában található szabadgyökök elleni védekezőrendszerek hatását.

EREDMÉNYEK MITOKONDRIUMOKON

A mitokondriális ROS-képzés vizsgálatához először is nagyon jó minőségű mitokondriumokra volt szükség. Két, az irodalomban elterjedten használt preparátum szukcináttal indukált ROS-képző hatását hasonlítottuk össze. Szukcinátot azért használtunk ezekben a kísérletekben, mert a terminális oxidációs lánc gátlószerei nélkül, önmagában szubsztráttal a legnagyobb ROS-képzés szukcináttal érhető el. A két különböző módon (digitoninnal és percoll grádiensen) preparált mitokondrium ROS képző tulajdonságai jelentősen eltértek. A nagy intenzitású H_2O_2 képzés, amit a digitoninnal preparált mitokondriumokon kaptunk, gátolható volt a komplex I gátlószereivel, rotenonnal, ami arra utalt, hogy a H_2O_2 nagy része az elektronok komplex I felé történő, visszafelé áramlásából, az úgynevezett reverz elektron transzportból (RET) származott. A Percoll grádiensen preparált mitokondriumok ROS képzése lényegesen kevésbé volt intenzív és rotenonnal stimulálható volt. Mivel a digitoninos mitokondrium preparálási módban a bovin szérum albumin (BSA) folyamatosan jelen volt, módszeresen vizsgáltuk a BSA hatását a H_2O_2 képzésre. A digitoninnal preparált mitokondriumok (BSA jelen volt az izoláció során) magas membránpotenciált ($\Delta\Psi_m$) mutattak (185 ± 3.2 mV) és BSA adása a mérőmédiumba a ROS képzést 50 %-kal emelte. A Percoll grádiensen tisztított mitokondriumok jelentős mértékben depolarizáltak voltak (171 ± 1.9 mV) és H_2O_2 képzésük, mely nagymértékben független volt a $\Delta\Psi_m$ -tól, 400 %-osan stimulálható volt a mérőmédiomhoz adott BSA-val. BSA hatására erősen $\Delta\Psi_m$ -függő és rotenonnal gátolható lett a ROS-képzés. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a BSA jelenléte vagy hiánya meghatározhatja a szukcináttal kiváltott ROS-képzés mechanizmusát, így magyarázatot ad az irodalom sok egymásnak ellentmondó eredményére. Bizonyítottuk, hogy a $\Delta\Psi_m$ kb. 10 mV-tal való csökkentése megszünteti a reverz elektron transzportot. A BSA hatásmechanizmusának magyarázatául a zsírsavak megkötését tételeztük fel. A mitokondriumok ugyanis hozzáadott külső szubsztrátok nélkül is mutatnak alap légzési aktivitást úgynevezett endogén szubsztrátokkal, melyek leggyakrabban zsírsavak. Kimutattuk az exogén zsírsavak depolarizáló és ROS képzést csökkentő hatását, amit BSA-val hatékonyan tudtunk antagonizálni. Bár a szukcináttal kiváltott ROS-képzés igen intenzív, jelentőségét fiziológias körülmények között nehéz felmérni. Ezért következő munkánkban a NADH-t generáló glutamátot és malátot választottuk légzési szubsztrátként és ezek ROS képző sajátosságait vizsgáltuk. BSA hiányában a mitokondriumok depolarizálása szétkapcsolószerezrel (FCCP) nem befolyásolta a ROS képzést. A mitokondriumok BSA-val való hiperpolarizációja a $\Delta\Psi_m$ emelése mellett kb. 40 %-kal emelte a ROS képzést. A $\Delta\Psi_m$ fokozatos kisütése 5-250 nM közötti koncentrációjú FCCP -vel fokozatosan csökkentette a ROS képzést, de csak a BSA nélküli szintre. A komplex I gátló rotenon BSA jelenlétében és hiányában is stimulálta a ROS képzést. Kísérleteink szerint a NADH-t képző szubsztrátokkal lélegeztetett mitokondriumok H_2O_2 képzése hiperpolarizált mitokondriumokban $\Delta\Psi_m$ érzékeny, de a mitokondriumok depolarizációjával csak mintegy 40 %-os ROS csökkenés

érhető el, a ROS képzés 60 %-a független a membránpotenciáltól. Ez a ROS képző mechanizmus tehát jelentősen különbözik a szukcinát által kiváltottól.

Folytatva a mitokondriális légzési szubsztrátok ROS-képző sajátosságainak vizsgálatát, az alfa-glicerofoszfát (a-GP) által kiváltott ROS-képzést tettük vizsgálataink tárgyává. A mitokondriumok a sejt erőműveinek tekinthetők, amelyek a környező citoplazmával és egyéb sejtorganelumokkal intenzív kapcsolatban állnak. Ennek a kapcsolatnak az egyik fontos eleme, hogy a citoszolban, a glikolízis során termelt NADH-nak a mitokondriumokban oxidálódnia kell. A NADH oxidációra két mechanizmus létezik, ezek közül az egyik a citoplazmában NADH közreműködésével keletkező alfa-glicerofoszfát (a-GP) oxidációja a mitokondrium belső membrán külső felszínén elhelyezkedő alfa-glicerofoszfát dehidrogenáz enzim (a-GPDH) segítségével. Az a-GP által kiváltott ROS képzés irodalma nem túl bőséges és a legtöbb kísérletet nem mitokondriumokon, hanem szubmitokondriális partikulumokon végezték. Irodalmi adatok felvetették az aGPDH önálló mitokondriális ROS-képző szerepét. Tekintve, hogy az a-GPDH a mitokondriális légzési láncban körülbelül hasonló redoxpotenciálon helyezkedik el, mint a szukcinát dehidrogenáz, vizsgáltuk az a-GP által kiváltott ROS képzést agymitokondriumokon és összehasonlítottuk tulajdonságait a szukcinát által kiváltottal. Az a-GP koncentrációt 5 mM-ról 40 mM-ig emelve a $\Delta\Psi_m$ és a ROS képzés emelkedését észleltük, együtt a mitokondriális NADH autofluoreszcencia emelkedésével. Az a-GP mitokondriális metabolizmusa azonban „klasszikus” módon nem eredményez NADH-t, tehát a NADH képződéshez a reverz elektron transzportra (RET) van szükség. Ezt a feltételezést alátámasztották azok az eredményeink, melyek szerint mind a ROS képzés, mind a [NADH] növekedés gátolható volt rotenonnal, ami az elektronok retrográd transzportjának útjába állított akadály, illetve ADP-vel és FCCP-vel, melyek a RET előfeltételül szolgáló magas $\Delta\Psi_m$ -et sűtötték ki. A RET rotenonnal való megszüntetése után megmaradó ROS képzést a komplex III gátlószere a myxothiazol fokozta, míg ugyanez a gátlás nem befolyásolta a szukcináttal energetizált, de rotenonnal kezelt mitokondriumok ROS képzését, jelezve, hogy a RET-en túlmenően, az a-GP-kiváltotta ROS képzésnek további ROS képző helye van a komplex III és az a-GP között. Tekintetbe véve, hogy a szukcinát és az a-GP metabolizmusa közötti különbség elsősorban a szukcinát dehidrogenáz és az a-GPDH enzimek különbözősége, ebből következik, hogy a ROS képzés nem RET komponenséért az a-GPDH felelős.

Ismert, hogy a mitokondriális a-GPDH izoenzim aktivitása Ca^{2+} -al fokozható. Logikusan adódott a kérdés, hogy a $[Ca^{2+}]$ változtatása befolyásolja-e az a-GP által kiváltott ROS képzést. Kalcium stimulusként kis, fiziológiás koncentrációkat, 100-250-500 nM-t alkalmazva, a ROS képzés fokozatos emelkedését írtuk le. Ezen túlmenően a Ca^{2+} fokozta a mitokondriumok $\Delta\Psi_m$ -ját, oxigénfogyasztását és NADH autofluoreszcenciáját (jelezve, hogy a Ca^{2+} ezen körülmények között a $\Delta\Psi_m$ emelésével fokozza a RET-et). Az a-GPDH enzimaktivitás közvetlen mérésével kimutattuk, hogy Ca^{2+} hatására az enzim a-GP-ra vonatkozó K_m -je csökken. Amennyiben a RET-et rotenonnal gátoltuk, a Ca^{2+} hatására bekövetkező ROS képződés fokozódás kisebb lett, de a Ca^{2+} stimuláló hatása mégis szignifikáns maradt, utalva arra, hogy a Ca^{2+} fokozza a közvetlenül az a-GPDH-on megvalósuló ROS-képzést is. Eredményeink direkt bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a citoplazmából származó fiziológiás kalcium szignál emelheti a mitokondriumok ROS képzését.

VISSZA AZ IDEGVÉGKÉSZÜLÉKEKHEZ.

A hatékony neuroprotektív stratégiák kidolgozása mind az akut iszkémia-reperfüziós, mind a krónikus idegi megbetegedésekben várta magára. Az a felismerés, hogy a ROS termelés fokozódás fontos patogenetikai szerepet játszik ezekben a betegségekben, kombinálva azokkal az adatokkal, hogy az úgynevezett mitokondriális szétkapcsoló fehérjék fokozott

kifejeződése részleges védelmet jelenthet az idegsejteknek a szabadgyökös károsodásokkal szemben, vezetett az úgynevezett „mild uncoupling” hipotézis megfogalmazásához, mely szerint a mitokondriális membránpotenciál in vivo történő kontrollált csökkentése (kontrollált alatt az értendő, hogy az ATP szintézist még ne gátolja) jótékony hatású lehet az iszkémia-reperfúziós, szabadgyökös károsodással járó kórképekben.

Vizsgálatainkban arra kerestünk választ, hogy az idegvégződéseknél, fiziológiai körülmények között „in situ” működő mitokondriumok- melyek a glukóz lebontási termékeit hasznosítják a citrátkörben- ROS termelése szintén érzékeny-e a $\Delta\Psi_m$ változásaira. A szinaptoszómákat glukózzal inkubálva, a H_2O_2 képződést Amplex red-dal mérve, a mitokondriumok $\Delta\Psi_m$ -ját szétkapcsolószerezettel (FCCP 10-200 nM) csökkentettük. A mitokondriumok depolarizációját JC-1 fluoreszcens festékkel követtük. A szétkapcsolószerez hatására az oxigénfogyasztás növekedését, az intraszinaptoszómális NADH autofluoreszcencia és a membránpotenciál csökkenését észleltük már a legkisebb FCCP koncentrációnál is, de a ROS termelésben változást nem tapasztaltunk. A mitokondriumokat veratridinnel is depolarizáltuk, amely drog megemeli a citoplazmatikus Na^+ koncentrációt, és így a Na,K -ATP-ase stimulálása révén fokozza a végkészülék ATP igényét. A veratridin hatására észlelhető fokozott oxigénfogyasztás és a kismértékben depolarizálódó $\Delta\Psi_m$ mellett a ROS képzésben nem észleltünk szignifikáns változást. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a mitokondriumok „alap” ROS képzése nem érzékeny a $\Delta\Psi_m$ lefelé történő elmozdulására, így a „mild uncoupling” elméletet nem támasztják alá.

EREDMÉNYEK MIKROGLIA SEJTEKEN

A mikroglia-sejtek a központi idegrendszer legfontosabb szabadgyöktermelő sejtfelesége, patológiai körülmények között a mikroglia-sejtek jelentős mennyiségű szuperoxidot és H_2O_2 -t termelnek, mely ROS-ok a környező neuronokra és egyéb gliasejtekre is toxikusak. BV-2 mikroglia sejteken vizsgáltuk a légzési lánc részleges gátlásának hatását a glikolízis és a mitokondriális energiatermelés néhány kulcsenzimére. A légzési lánc gátlása fokozta a mikroglia-ban termelődő ROS mennyiségét és részlegesen inaktiválta a glikolízis gliceraldehid dehidrogenáz és a citrát kör akonitáz enzimét. Eredményeink arra utalnak, hogy a légzési lánc veleszületett, vagy szerzett deficienciái nemcsak a neuronok és asztrociták funkcióját, de a mikroglia-sejtek életképességét is befolyásolhatják.

EREDMÉNYEINK NEMZETKÖZI VISSZHANGJA.

A pályázati periódusban írt közleményeinkre 2008. februárig 79. független idézetet kaptunk. Az a-KGDH ROS képzését bizonyító közleményünkről a Nature Medicine közölt figyelemfelhívót.