



AZ α -KETOGLUTARÁT-DEHIDROGENÁZ KOMPLEX DEFICIENCIÁK SZEREPE A SZABADGYÖK TERMELÉSBEN

Horváth Gergő¹, Ravasz Dóra², Kacsó Gergely², Sváb Gergely¹, Chinopoulos Christos², Ádám Veronika¹, Tretter László¹



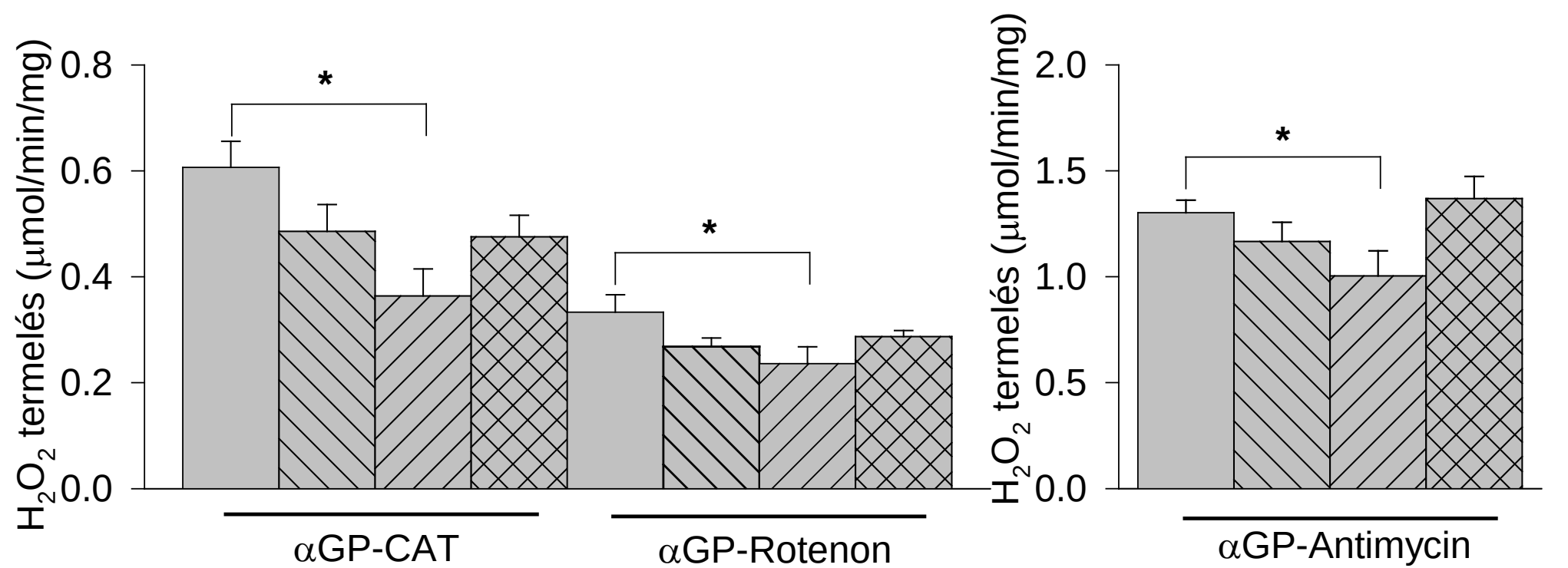
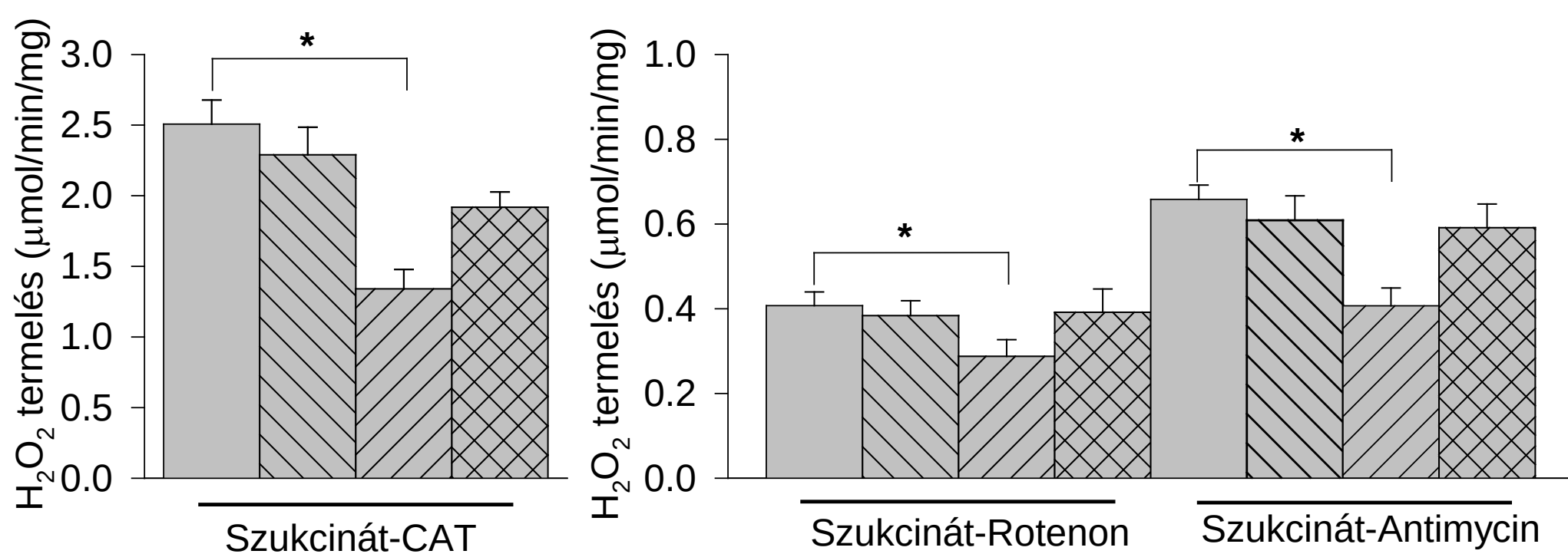
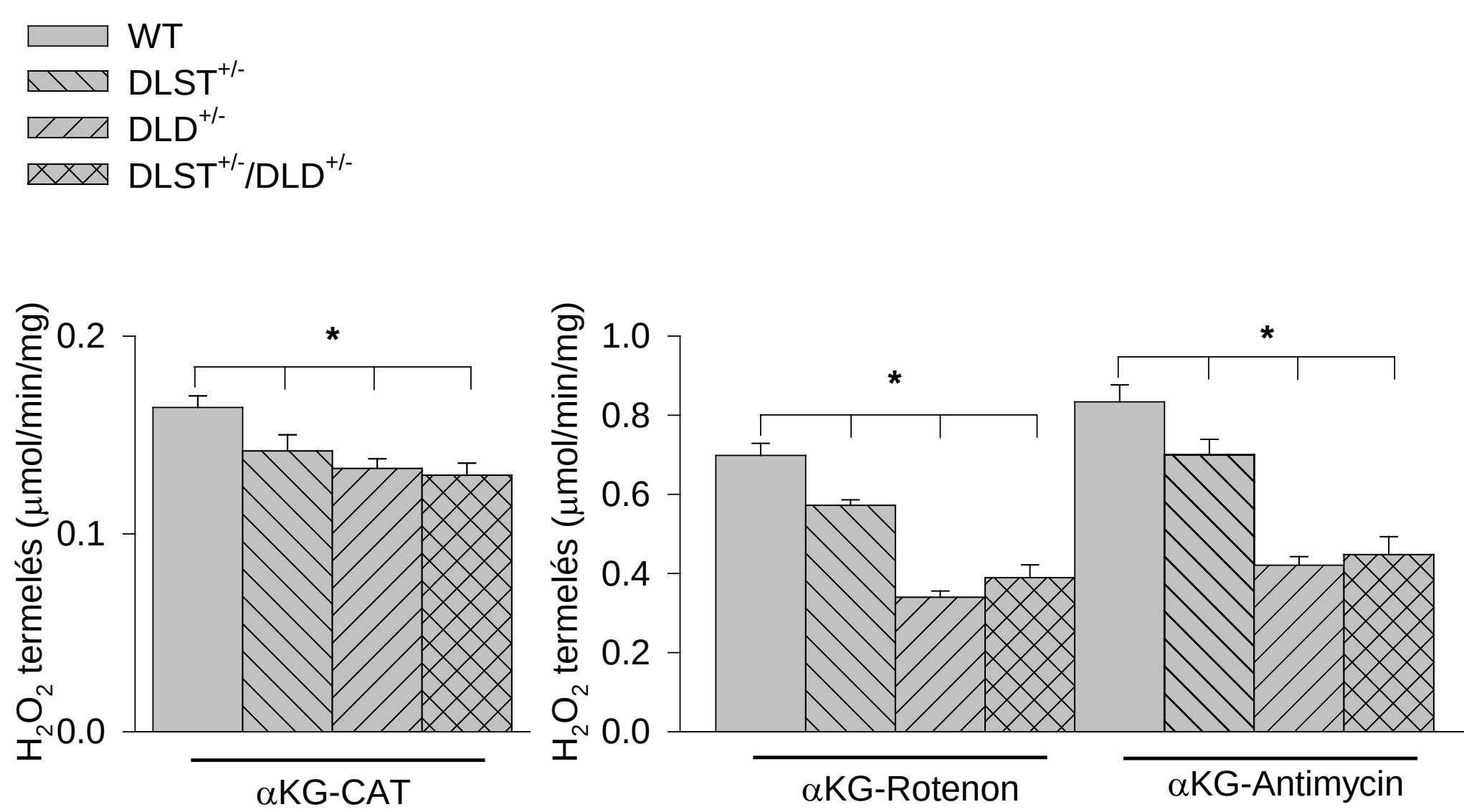
1. Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet, MTA-SE Neurobiokémiai Kutatócsoport
2. Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet, MTA-SE Lendület Neurobiokémiai Munkacsoport

Bevezetés

Az α -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex (KGDHC) a citrát-kör irreverzibilis, sebességhatározó enzime. A metabolikus funkción kívül fontos szerepet játszik a mitokondriális reaktív oxigén származékok (ROS) termelésben. Az KGDHC három alegységből (E1, E2, E3) épül fel, melyek katalitikus aktivitása szerteágazóan vizsgált, ellenben az egyes alegységek szerepe a ROS képzésben kevésbé ismert. Kísérleteinkben a különböző alegységek ROS termelésben betöltött szerepét vizsgáltuk.

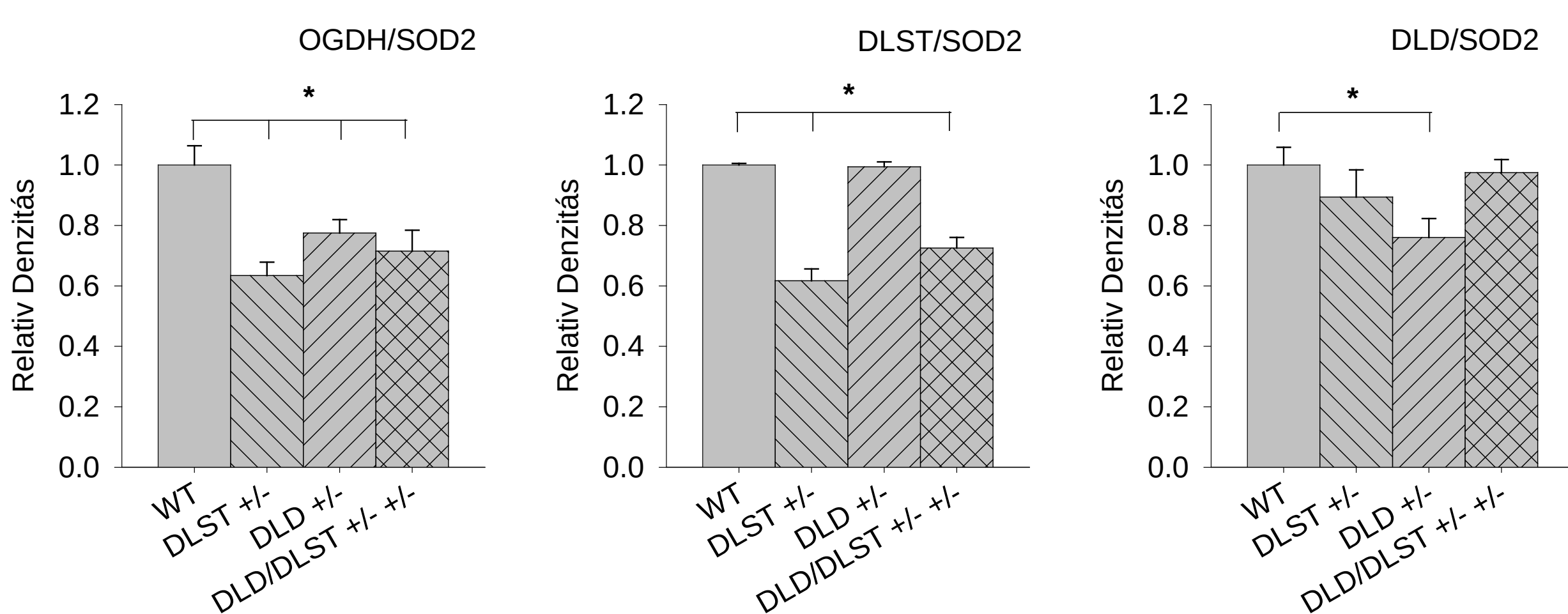
Kísérleteinket részlegesen génkiütött KGDHC deficiens egereken végeztük. A mitokondriumokat dihidrolipoil-szukciniltranszferáz (DLST^{+/-}, E2), dihidrolipoil-dehidrogenáz (DLD^{+/-}, E3) és kettős KO (DLST^{+/-}/DLD^{+/-}, E2/E3) állatokból agyából izoláltuk.

Az KGDHC-deficiens egerek H₂O₂ termelése különböző szubsztrátok jelenlétében



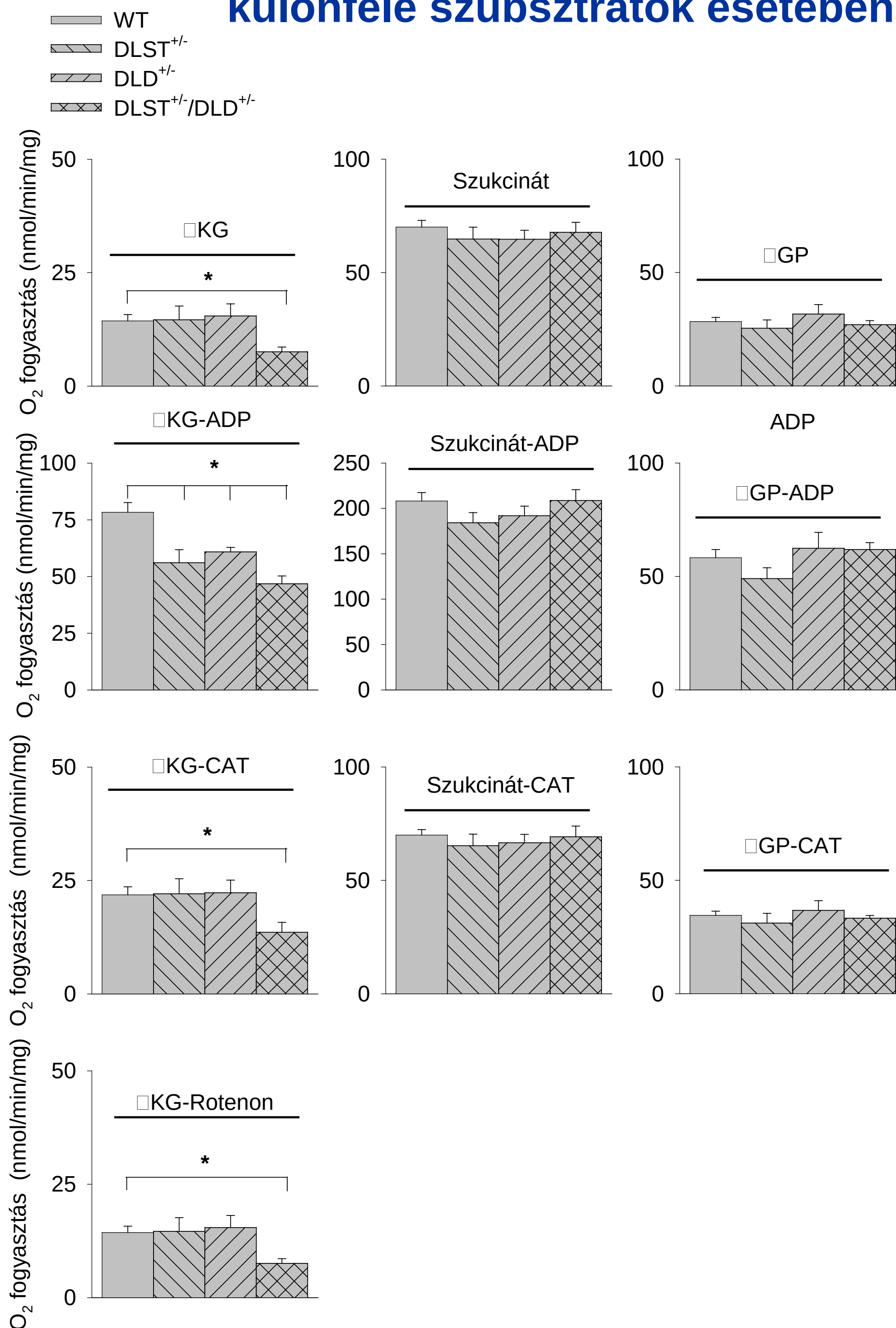
Az KGDHC-deficiens egerekben csökkent H₂O₂ termelést mértünk. A DLD alegység kiütése jelentősen csökkentette a ROS termelés.

Az KGDHC alegységek fehérje expressziója



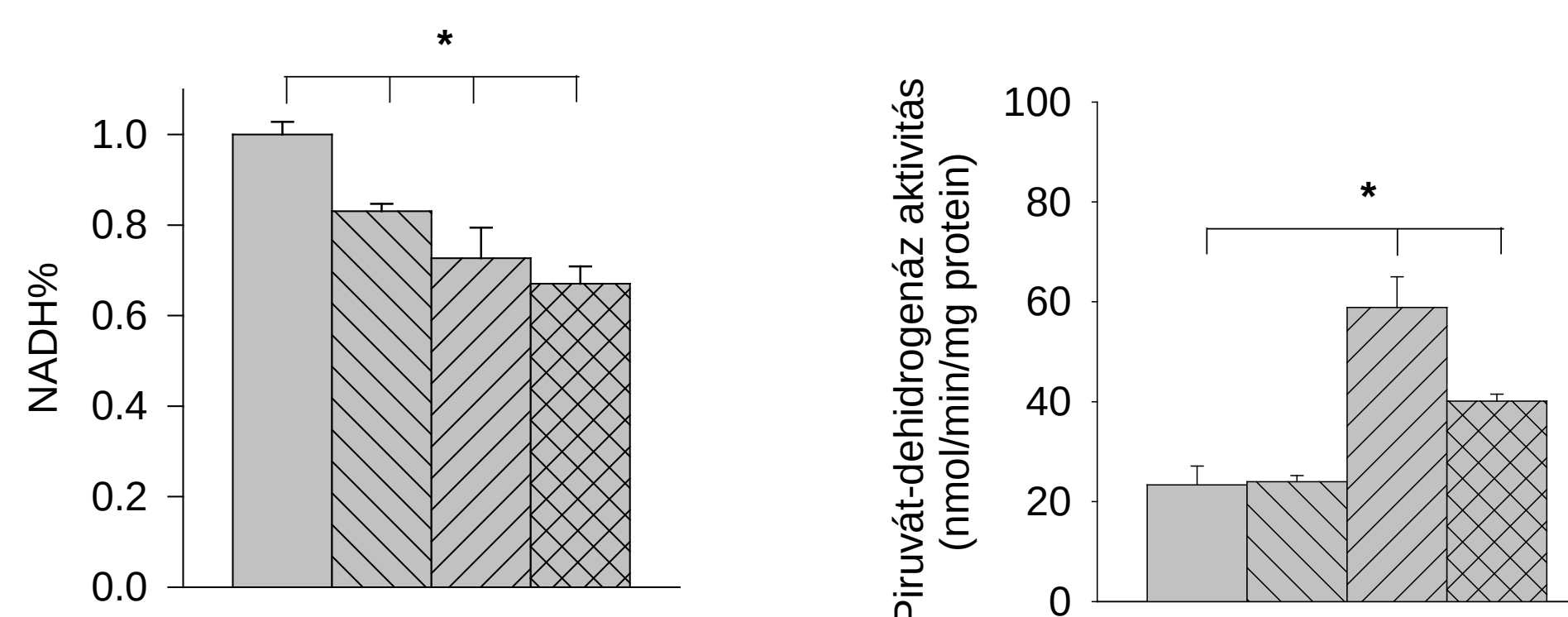
A DLST és DLD alegység részleges kiütése csökkentette az E1/OGDH alegység mitokondriális fehérjeszintjét is.

Az KGDHC KO egerek O₂ fogyasztása különféle szubsztrátok esetében



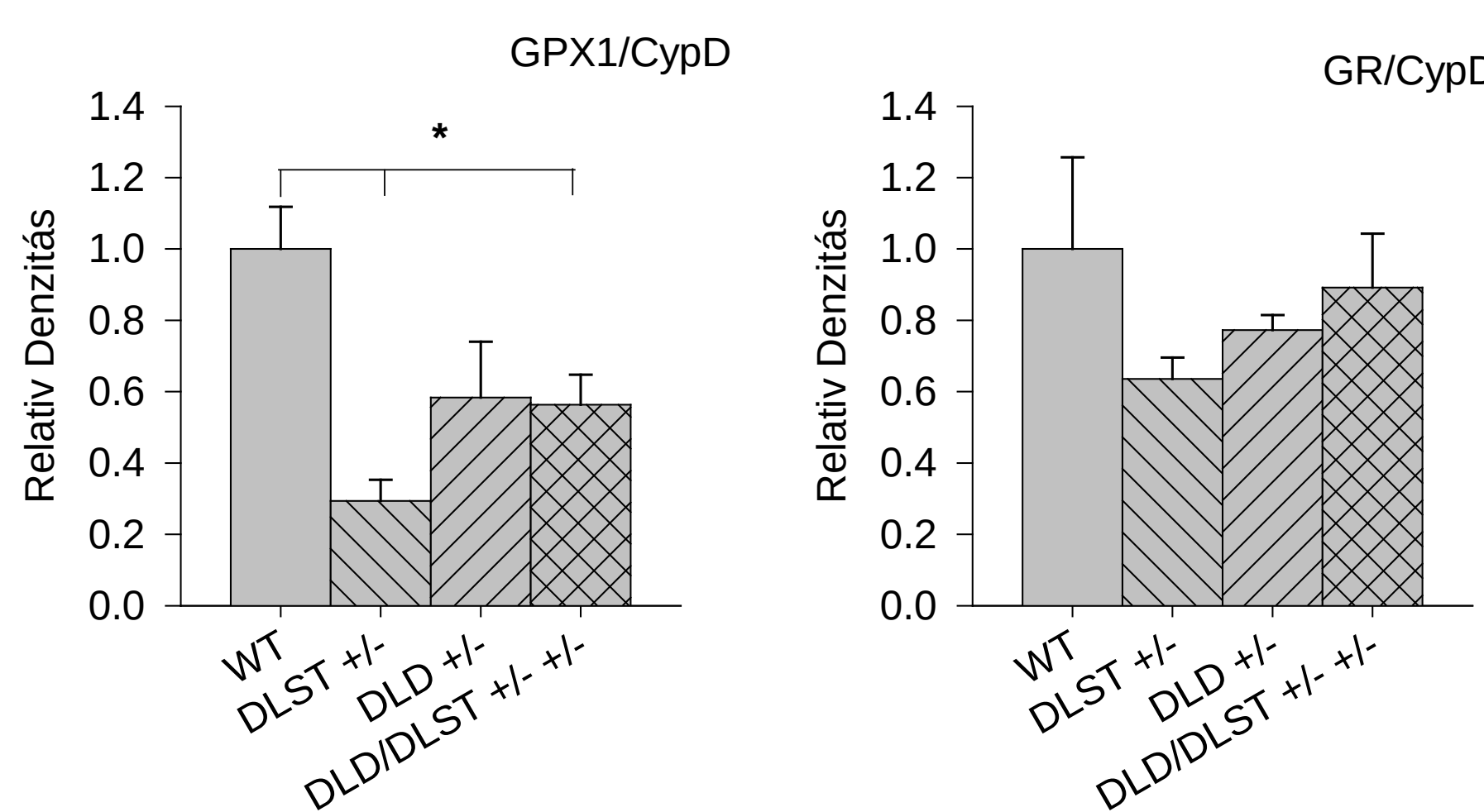
Az KGDHC KO egerekben csökkent O₂ fogyasztást mértünk α -ketoglutarát jelenlétében.

Mitokondriális NADH-szintek α -ketoglutarát jelenlétében Piruvát-dehidrogenáz enzimaktivitás



Az KGDHC-deficiens egerekben csökkent NADH termelést mértünk. A DLST KO állatokban a feleslegben keletkező DLD alegység feltehetően a piruvát-dehidrogenázba is beépülhet.

A H₂O₂ eliminációban résztvevő enzimek expressziója



A DLST-deficiens egerekben csökkent mitokondriális glutation-peroxidáz fehérjeszintet mértünk.

Eredmények

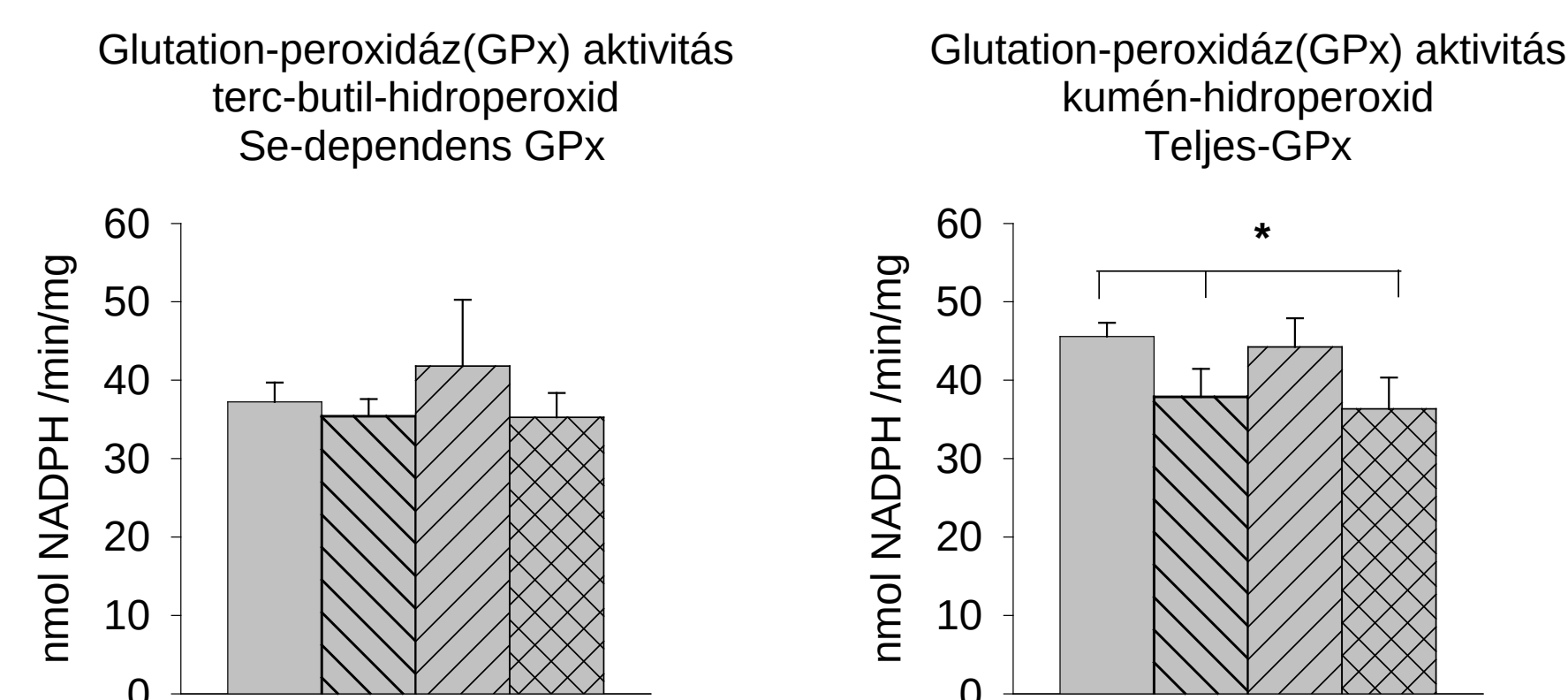
• α -ketoglutarát esetében csökkent oxigénfogyasztást mértünk az KGDHC-deficiens egerekben ADP jelenlétében. A kettős KO állatokban az alaplégzés is csökkent.

•Csökkent NADH szinteket és H₂O₂ termelést mértünk α KG jelenlétében mindhárom esetben. Az E3 alegység kiütése más szubsztrátok mellett is csökkentette a ROS termelést.

•Csökkent OGDH alegység fehérje szinteket mértünk mindhárom esetben, illetve csökkent glutation peroxidázt mértünk a DLST KO egerekben.

•A DLST deficiens állatokban fokozott piruvát-dehidrogenáz és csökkent glutation-peroxidáz aktivitást mértünk.

Glutation-peroxidáz enzimaktivitás



Csökkent a glutation-peroxidáz enzimaktivitás a DLST alegység kiütését követően.

Következtetés

Az α -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex alegységeinek részleges kiütése jelentősen csökkenti az enzim mitokondriális redoxhomeosztázisban betöltött szerepét, viszont lehetőséget biztosít a különböző alegységek reaktív oxigén származékok termelésében betöltött szerepének a vizsgálatára.

A három alegység közül a DLD kiütése eredményezte a legnagyobb csökkenést a H₂O₂ termelésben.

A KGDHC-deficiens állatmodellekben ROS eliminációért felelős enzimek aktivitása is megváltozhat, ami befolyásolhatja a mért H₂O₂ termelést.

Anyagok és módszerek

•**Mitokondriális oxigénfogyasztás mérés:** Oroboros High Resolution Oxygraph (Clark-elektrod) segítségével.

•**Mitokondriális H₂O₂ termelés:** Amplex UltraRed fluoreszcens festékkel.

•**Mitokondriális NADH termelés:** autofluoreszcens módon.

•**Mitokondriális enzimaktivitás(PDH,GPX) mérés:** Jasco spektrofotométerrel vizsgáltuk 340 nm-en.

•**Mitokondriális fehérje meghatározás:** Western-blot vizsgálat izolált mitokondriumokon

Köszönetnyilvánítás:

Támogatók: OTKA (NK 81983), TÁMOP (4.2.2./B-09/1), MTA (MTA TKI 2013), Nemzeti Agykutató Program (KTIA_13_NAP-A-III/6)