

A MITOKONDRIÁLIS CIKLOFILIN D FEHÉRJE HIÁNYÁNAK NEUROPROTEKTÍV HATÁSAI; VIZSGÁLATOK BÉTA-AMILOIDOT TERMELŐ EGÉRMODELLBEN

Horváth Gergő, Horváth Mátyás, Tóth Krisztina, Sváb Gergely, Ádám Veronika, Tretter László

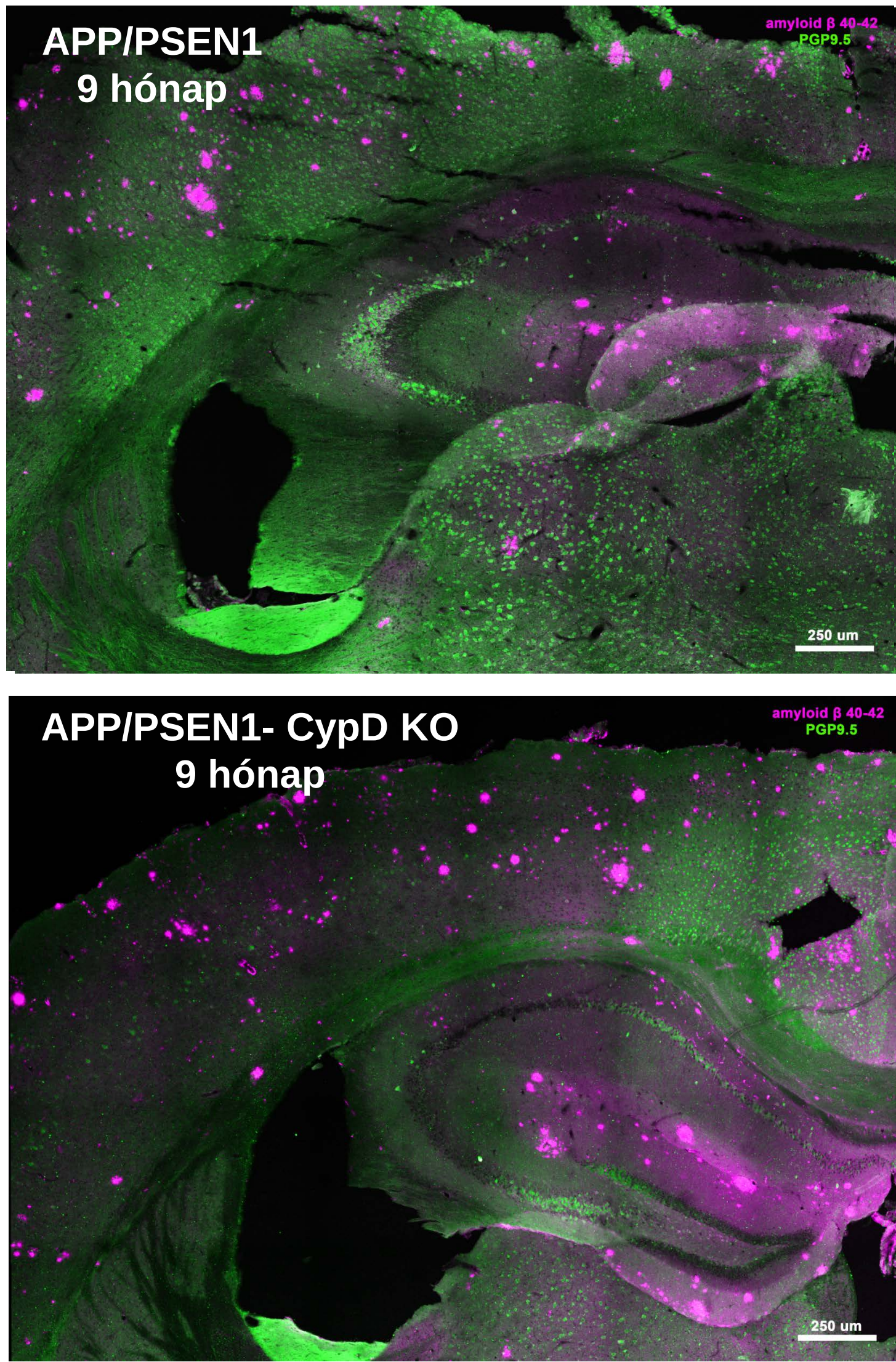
Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet, MTA-SE Neurobiokémiai Kutatócsoport

Bevezetés

Az Alzheimer-kórt a β -amiloid ($A\beta$) és a tau fehérjék felhalmozódása jellemzi. A betegség korai szakaszában a $A\beta$ kapcsolódása a különböző mitokondriális fehérjékhez előidézhetheti a bioenergetikai funkciók romlását, az oxidatív stressz fokozódását ennek következtében neuron károsodást és sejtpusztulást eredményez. A mitokondriumban lévő ciklofilin D (CypD) fehérje a mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus egyik fő regulátora. A mitokondriális pórus nyílását követően a sejt pusztulása következhet be. Agy mitokondriumon végzett kísérleteinkben a CypD fehérje génkiütésének neuroprotektív hatását vizsgáltuk kóros mennyiségű $A\beta$ jelenlétében.

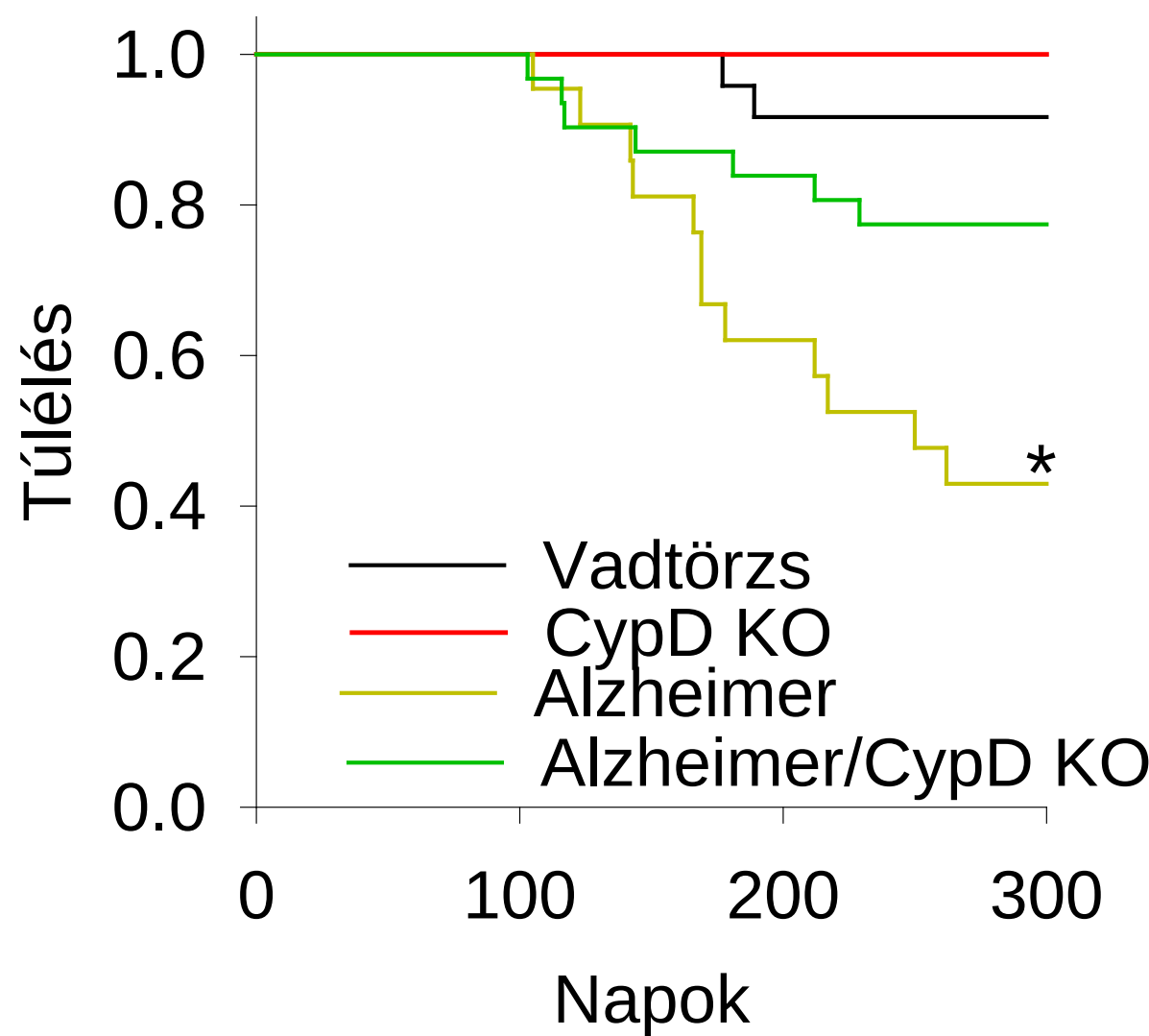
Hipotézisünk szerint a CypD KO-val keresztezett Alzheimer-kór egérmodellben kevésbé sérülnek a bioenergetikai paraméterek.

Az β -amiloid plakkok detektálása fluoreszcens immunhisztokémiával



Az amiloid plakkok mind a a cortexban mind a hippocampusban előfordultak.

Túlélés vizsgálat a négy egértörzsben



A β -amiloidot expresszáló hím egerek mortalitása megnövekedett. A ciklofilin D fehérje kiütése javította a túlélést.

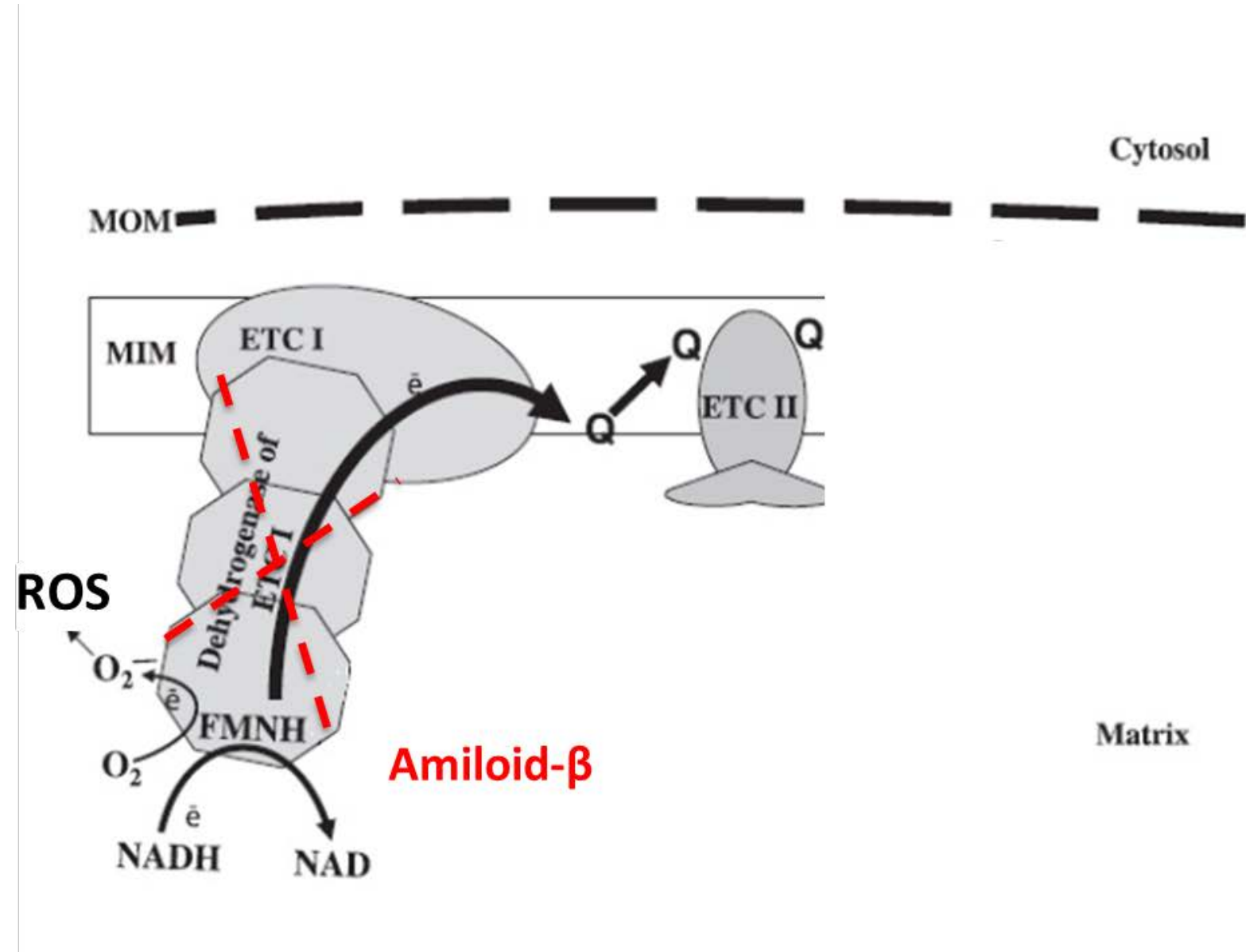
Módszerek

- Mitokodrium izolálás: 9 hónapos hím egerek agyából Percoll grádiens centrifugálással
- Mitokondriális oxigénfogyasztás mérése Oroboros High Resolution Oxigráffal (Clark-elektroddal)
- Mitokondriális ATP termelés kapcsolt enzimrendszer és enzimaktivitás mérése spektrofotométerrel
- Mitokondriális H_2O_2 termelés Amplex UltraRed fluoreszcencia mérés : PTI spektrofluorométer 571/585 nm

Köszönetnyilvánítás:

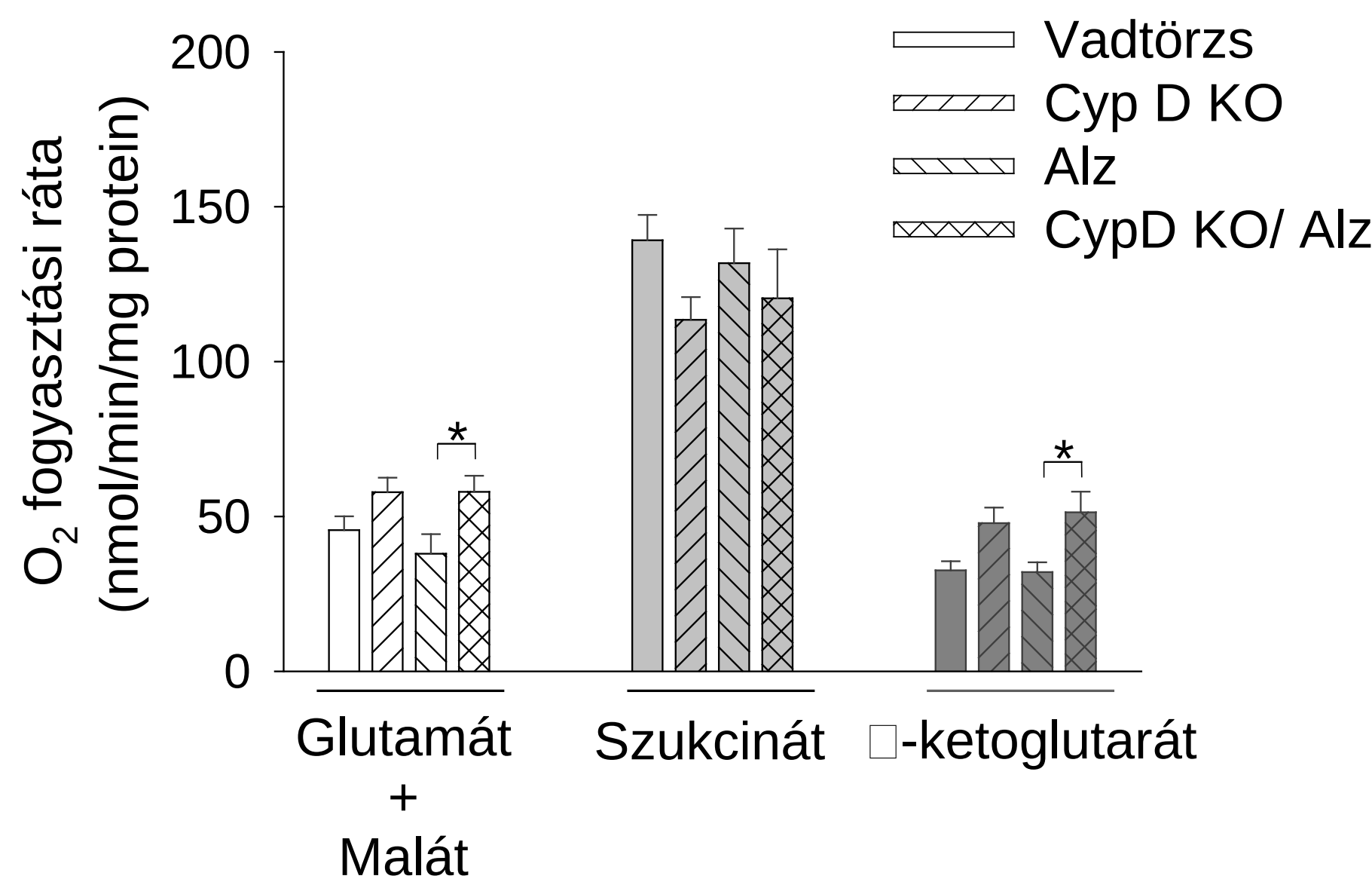
OTKA (NK 81983), MTA (MTA TKI 2013), Nemzeti Agykutatás Program (KTIA_13_NAP-A-III/6)

A β -amiloid feltételezett hatásai a mitokondriális légzési láncra



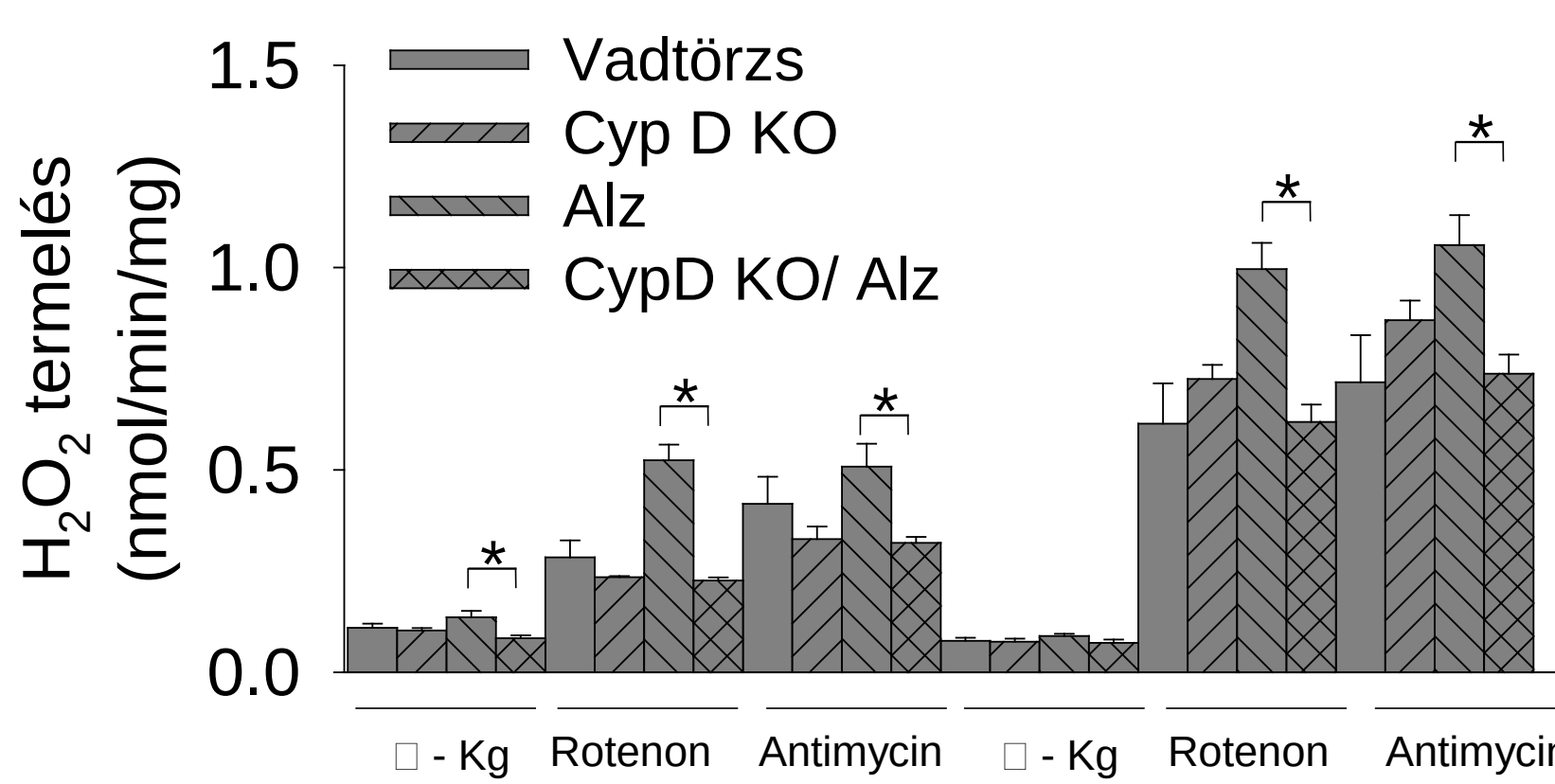
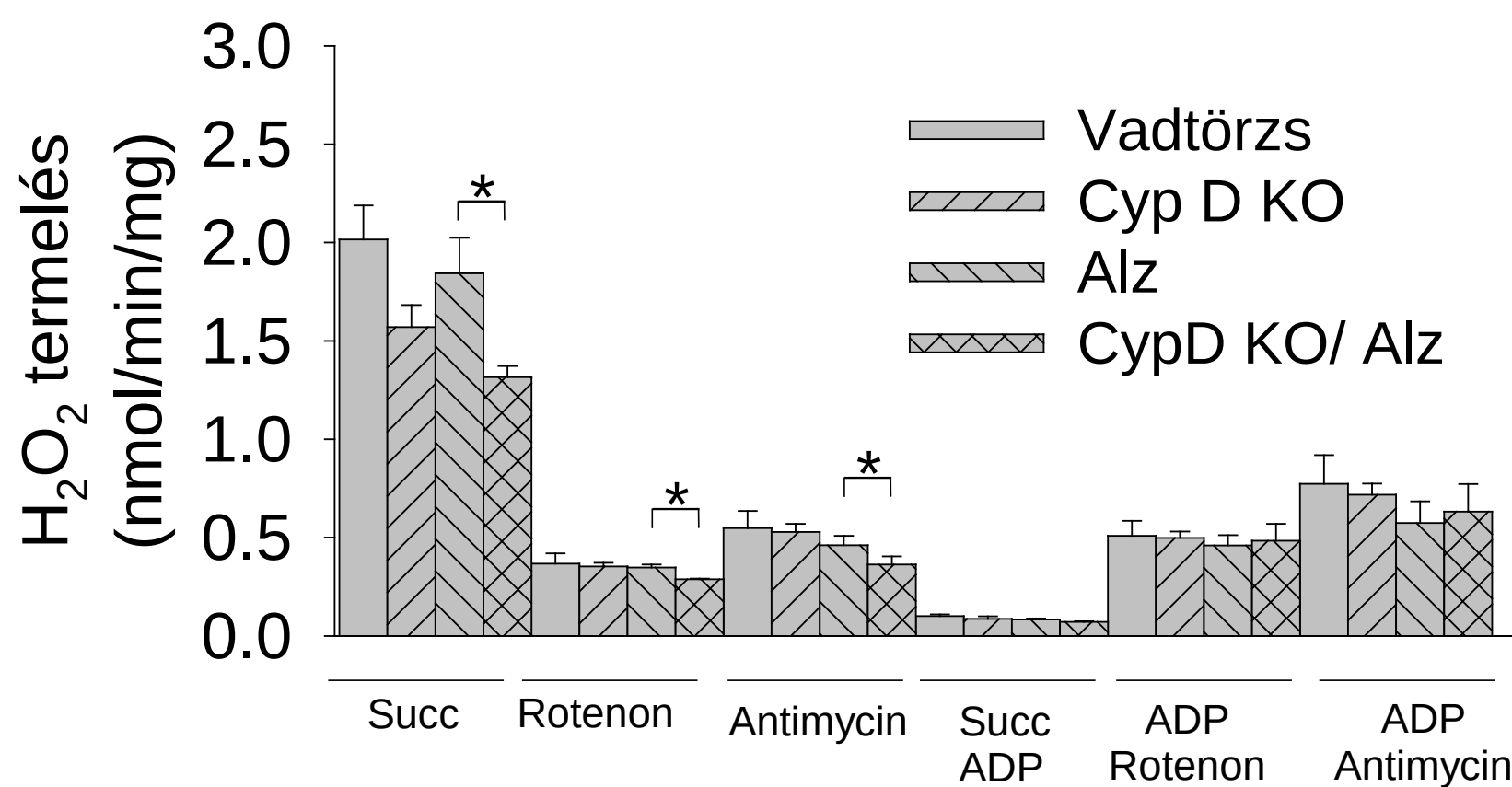
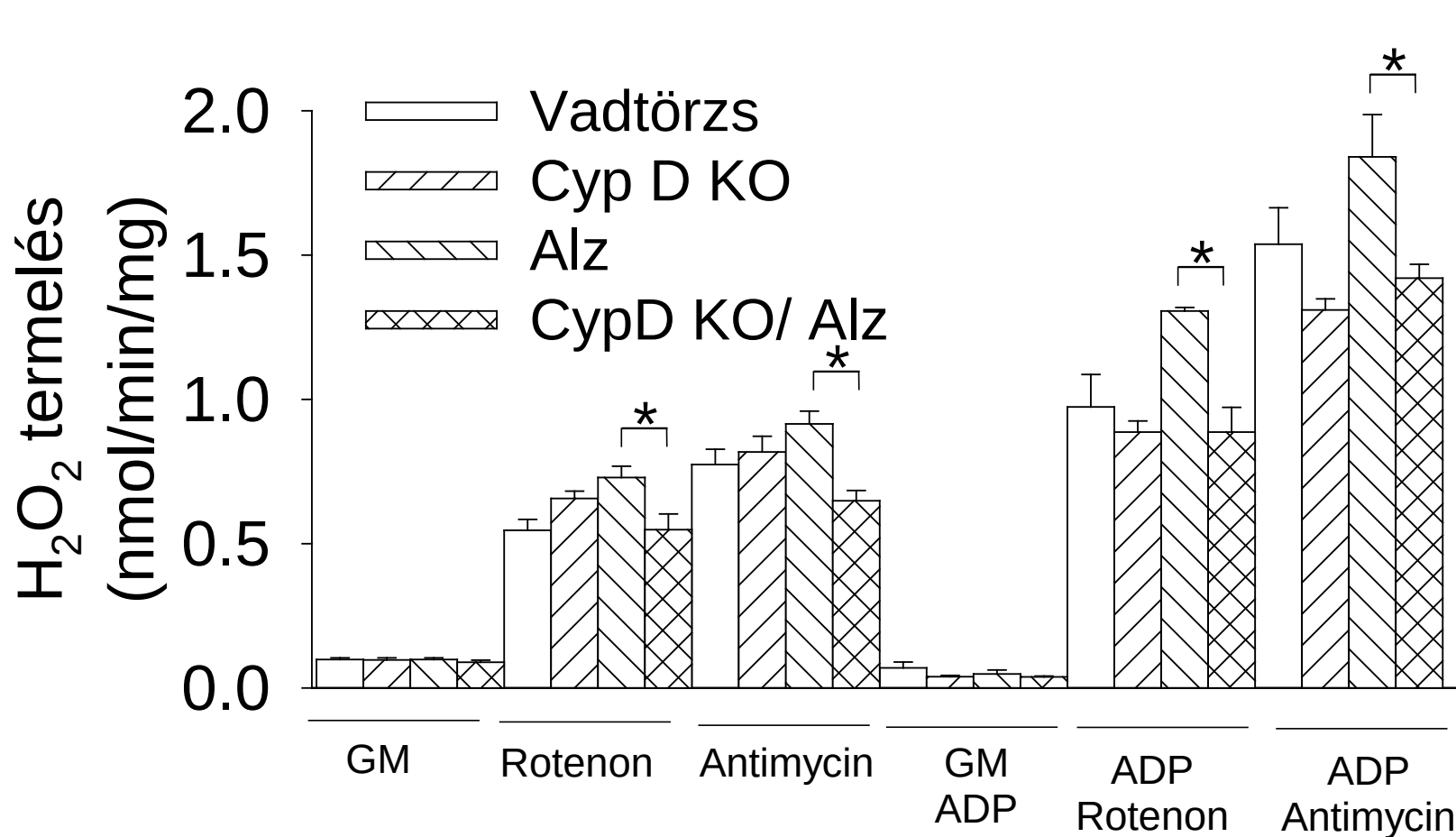
	O ₂ fogyasztás	ATP termelés	ROS termelés	Légzési komplexek aktivitása
Alz	↓	↓	↑	↓
Alz/CypD KO	↑	↑	↓	—
CypD KO	↑	↑	↓	—

Mitokondriális O₂ fogyasztás különböző légzési szubsztrátokkal



Oxigén fogyasztás csökkent NADH-termelő légzési szubsztrátok jelenlétében az Alzheimeres egér mitokondriumokban.

Mitokondriális H₂O₂ termelés különböző légzési szubsztrátokkal

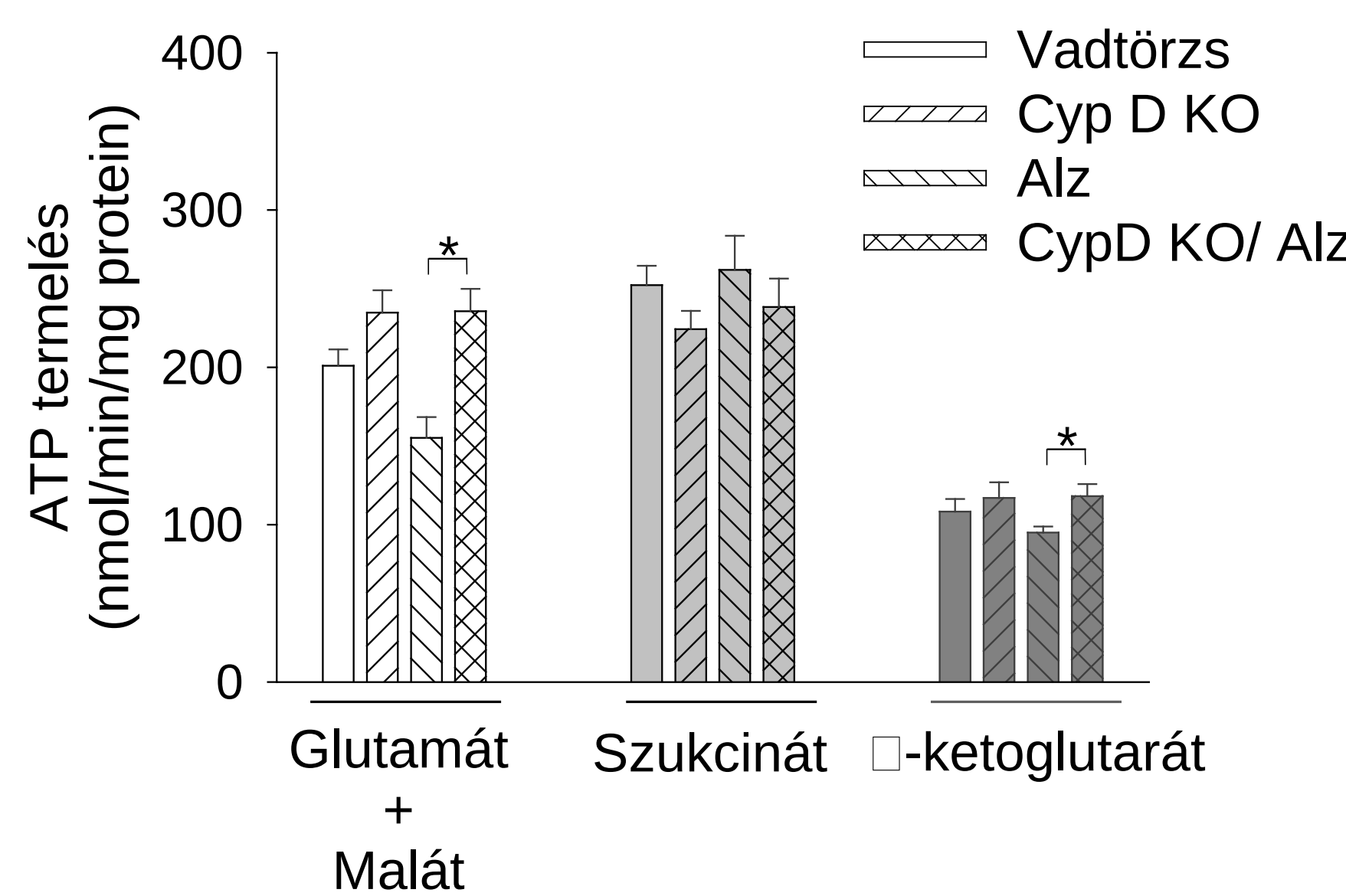


Megemelkedett a H_2O_2 termelés az Alzheimeres egerek mitokondriumokban, de a ciklofilin D gén kiütése mérsékelte ezt.

Eredmények

- A β -amiloid plakkok az Alzheimer és Alzheimer/CypD KO egérben is kialakultak.
- A ciklofilin D fehérje kiütése növelte az Alzheimer egerek túlélését.
- A mitokondriális légzés csökkent NADH-termelő légzési szubsztrátok jelenlétében.
- A respirációs eredményekkel parallel csökkent az ATP termelés NADH termelő szubsztrátok jelenlétében.
- A mitokondriális H_2O_2 termelés megemelkedett az Alzheimeres egerek mitokondriumokban, de a ciklofilin D gén kiütése csökkentette ezt.
- Csökkent enzimaktivitást mértük a mitokondriális légzési lánc komplexeinek és az α -ketoglutarát dehidrogenáznak az Alzheimeres egerek mitokondriumaiban.

Mitokondriális ATP termelés különböző légzési szubsztrátokkal

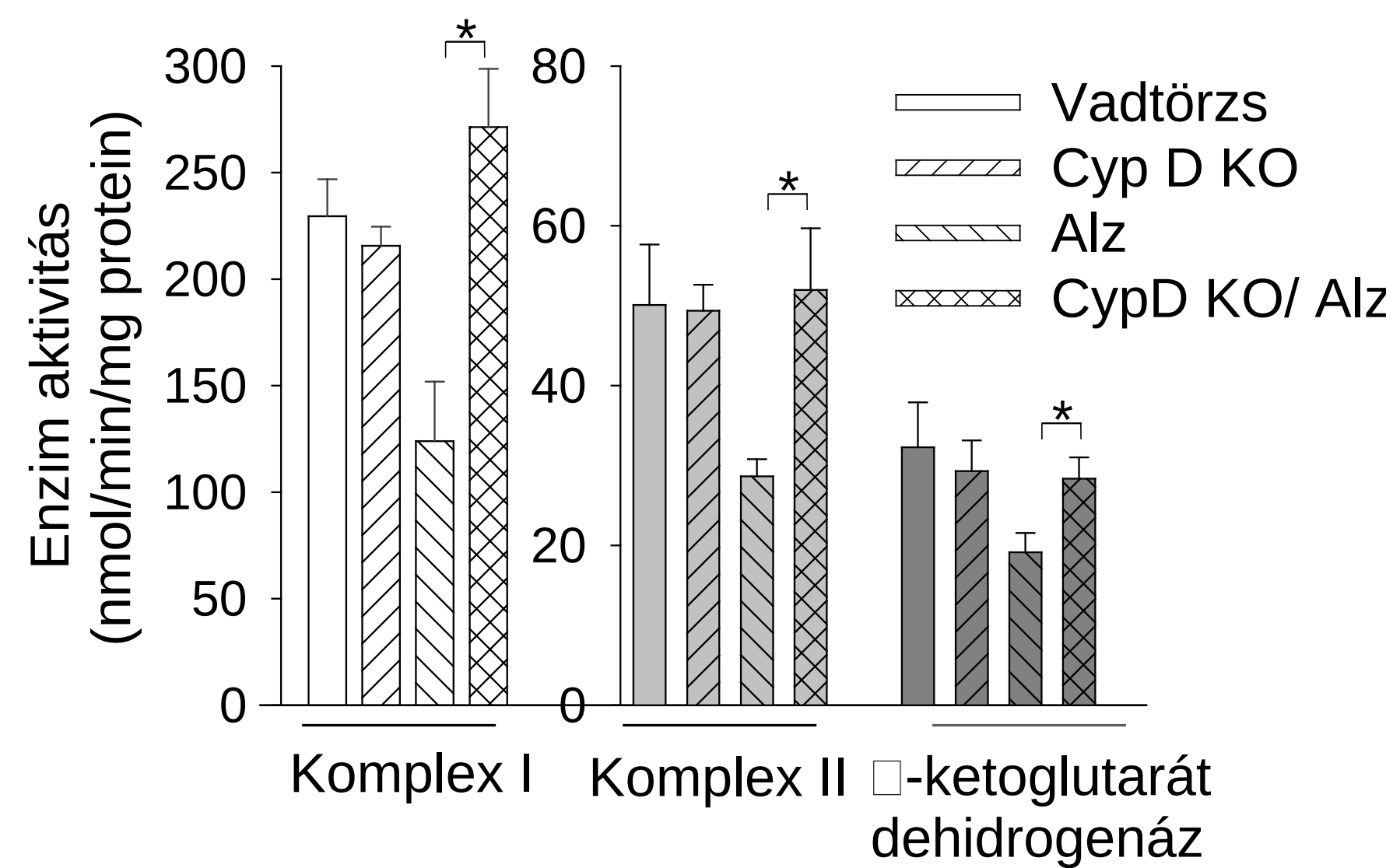


ATP termelés csökkent NADH-termelő légzési szubsztrátok jelenlétében az Alzheimeres egér mitokondriumokban.

Következtetések

Eredményeink alapján az Alzheimer-kór egérmodelljében a mitokondriumok működése és funkciója jelentősen károsodott, viszont a CypD fehérje kiütése javította a mitokondriumok bioenergetikai funkcióit. A vizsgálatunk alapján arra következhetünk, hogy a CypD fehérje gátlószerek (ciklosporin és analógjai) potenciális szerepet játszhatnak a neurodegeneratív betegségekben kezelésben.

Mitokondriális légzési lánc komplexeinek enzimaktivitás vizsgálata



Csökkent az I és II légzési komplex és α -ketoglutarát dehidrogenáz aktivitása az Alzheimeres mitokondriumokban.