



A SZUKCINÁT-DEHIDROGENÁZ AKTIVITÁSÁNAK SZERVSPECIFIKUS SZABÁLYOZÁSA

Horváth Gergő, Sváb Gergely, Török Eszter, Ádám Veronika és Tretter László

Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémiai Intézet, MTA-SE Neurobiokémiai Kutatócsoport



Bevezetés

A szukcinát-dehidrogenáz (SDH) a mitokondriális légzési lánc és a citrát-kör közös enzime. Fontos szerepet játszik a mitokondriális oxidációban, a hipoxiára adott válaszbán és a tumorképződésben. Korábban megfigyeltük agy és szív mitokondriumokon, hogy a kis koncentrációjú szukcinát jelenlétében az ADP gátolta az oxigénfogyasztást. Azonban máj és vese mitokondriumok esetében ez a gátlás nem volt megfigyelhető.

Kutatásunk céljaul a SDH enzim szervspecifikus szabályozásának vizsgálatát tűztük ki. Kísérleteinkben az ADP-re bekövetkező légzésgátlás mögötti regulációs mechanizmusokat vizsgáltuk.

Kísérleteinket agyból és veséből izolált mitokondriumokon végeztük. A mitokondriális oxigénfogyasztást Clark típusú elektróddal mértük. A SDH enzim aktivitását spektrofotometriásan vizsgáljuk. A jelenség háttérében az irodalomban korábban leírt oxálcetát SDH gátló hatását gondoltuk, azonban ez nem magyarázta a szervcsoportokban tapasztalt eltéréseket.

Az oxigénfogyasztásból nyert eredményeink alapján az agy és vese mitokondriumok SDH enzimei között nincs különbség a szukcinát iránti affinitás tekintetében, amit spektrofotometriásan permeabilizált mitokondriumokon végzett mérésekkel is igazoltunk.

Intakt agy mitokondriumokon rotenon jelenlétében az ADP-re bekövetkező légzéscsökkenés nem volt kimutatható. Rotenonhoz hasonlóan az extramitokondriálisan adott almasav enzim is megszüntette a légzésgátlást. Az almasav enzim hatására fokozódott mitokondriumból kilépő malát piruváttá történő átalakulása. A keletkező piruvát illetve a csökkenő malát koncentráció szerepet játszhat az intramitokondriális oxálcetát koncentráció csökkentése révén a légzés gátlás megszüntetésében.

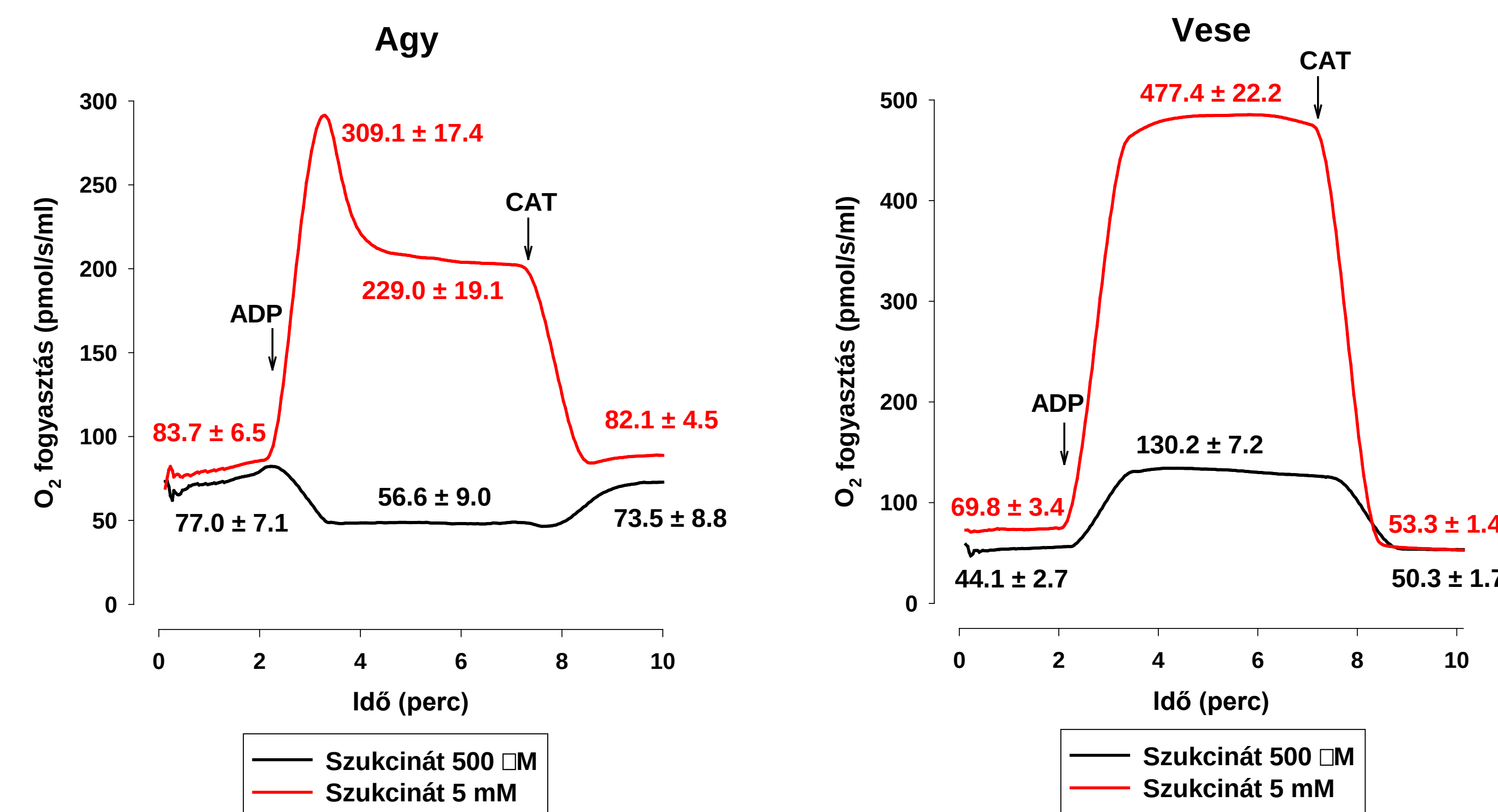
A szukcinát-dehidrogenáz paradoxon oka a citrát-kör négyzénatomos szakaszának a szervspecifikus kvantitatív különbségeiben keresendő. A szervspecifikus oxálcetát eliminációs útvonalak következtében csökkent oxálcetát szint fokozhatja a szukcinát oxidációját.

Következtetés

A vizsgálataink során használt szukcinát mennyisége megfelel a mitokondriumban fiziológias körülmények között mérhető koncentrációjával, ezért a méréseink során tapasztalt gátlás fontos szerepet játszik a Szent-Györgyi-Krebs-ciklus endogén módon történő autoregulációjában.

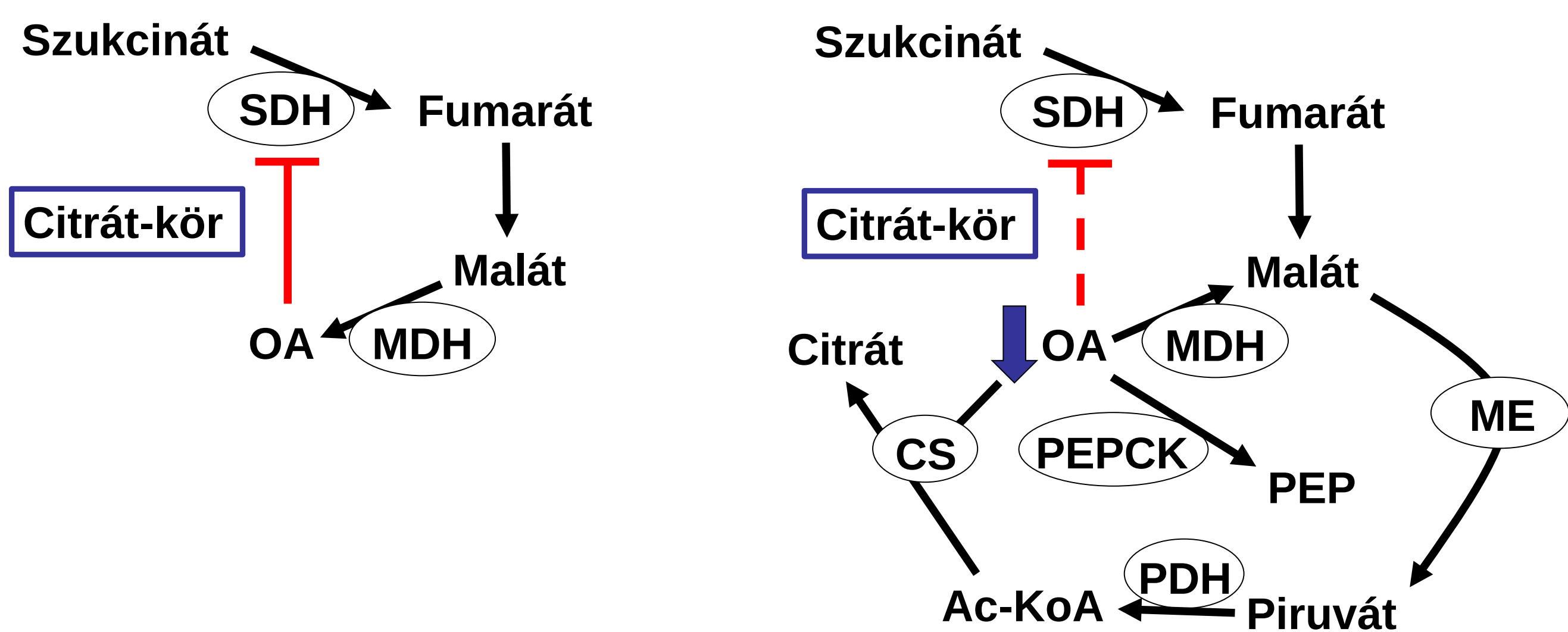
A szervekben előforduló különféle oxálcetát eliminációs útvonalak felvetik a citrát-kör külső metabolikus szabályozásának a lehetőségét.

Oxigénfogyasztás szukcináttal légző agy és vese mitokondriumokon

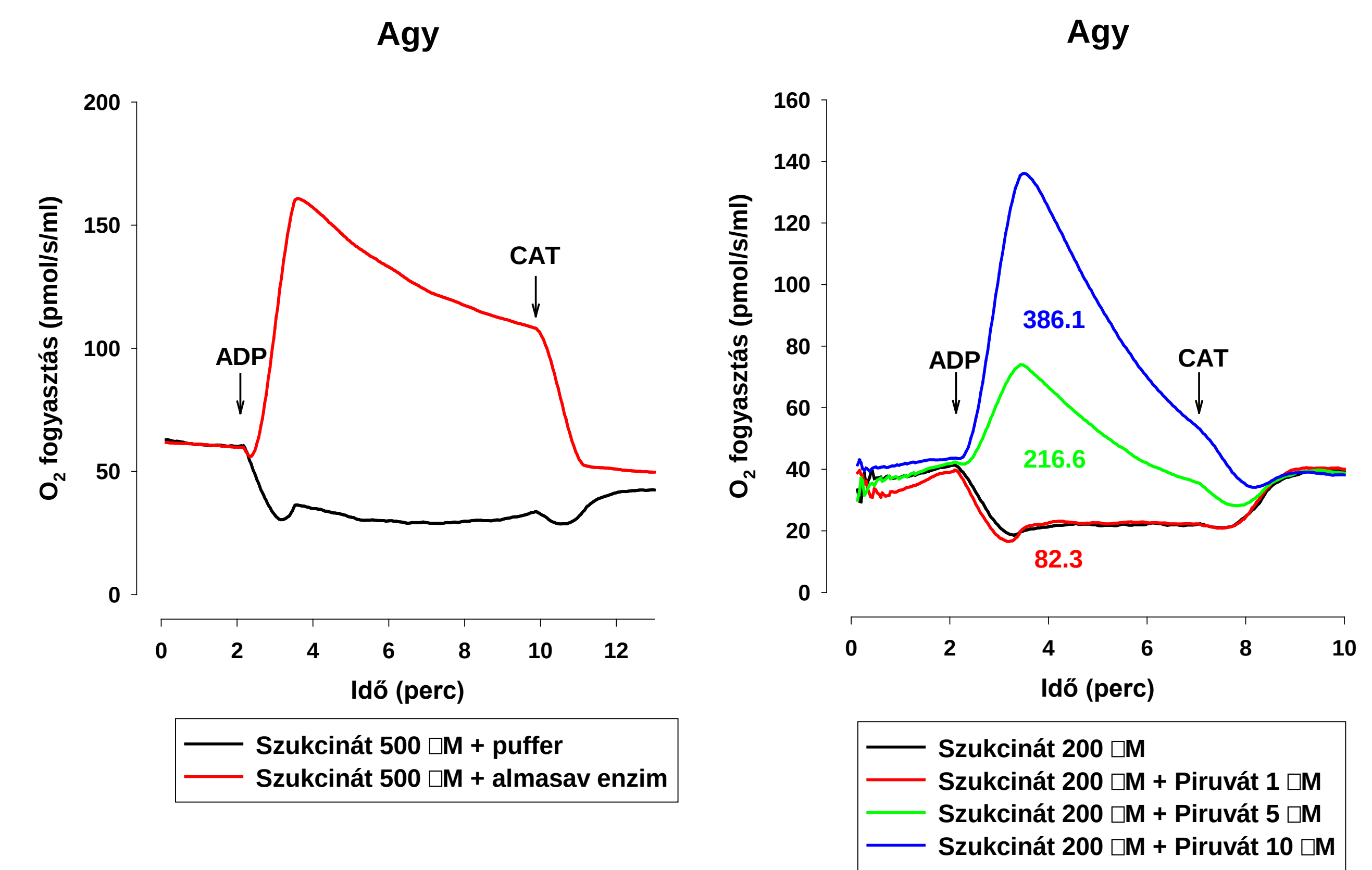


Kis koncentrációjú szukcináttal légző agy mitokondriumokon ADP csökkentette a légzést.

Az oxálcetátot elimináló metabolikus útvonalak

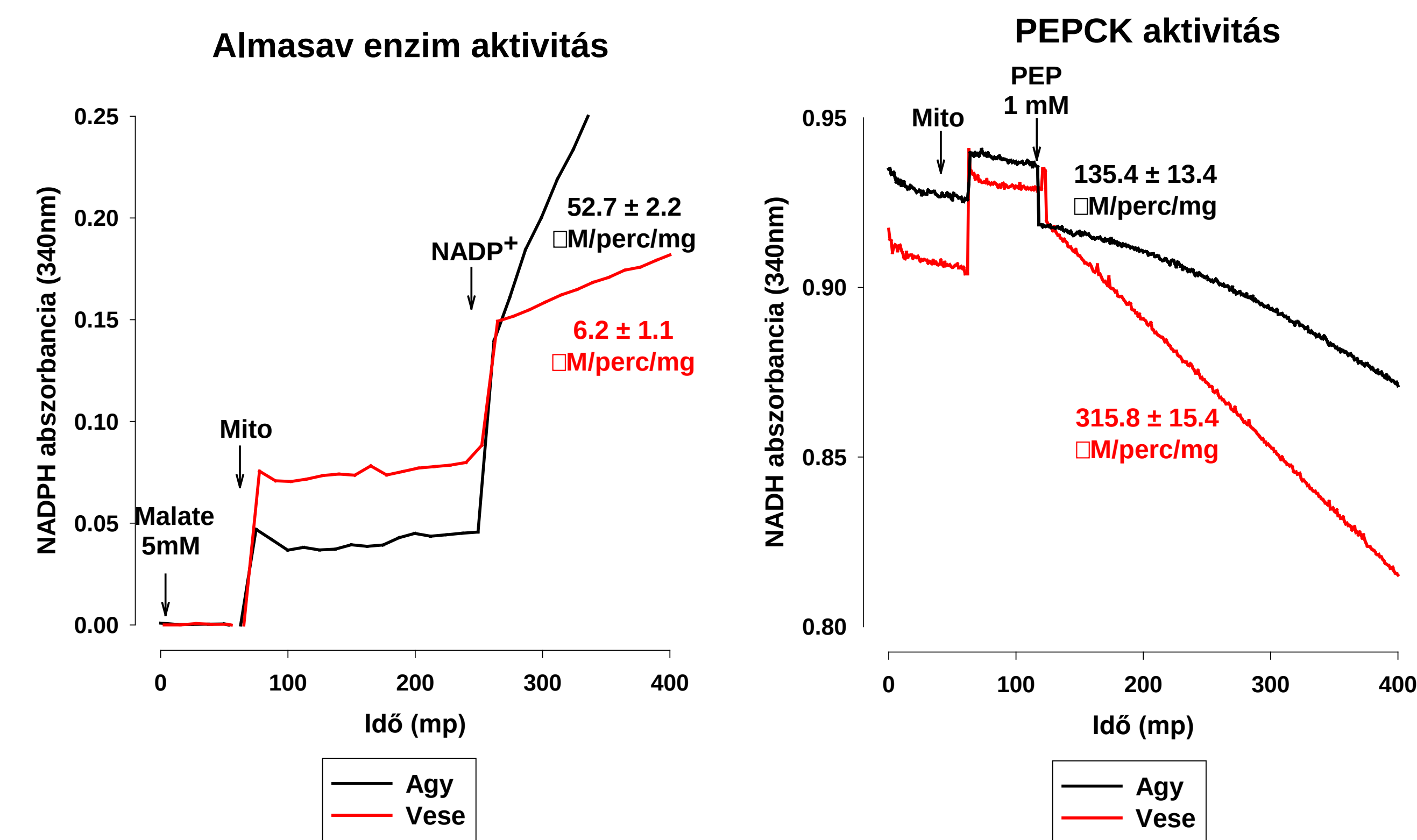


Oxigénfogyasztás almasav enzim és piruvát jelenlétében



Almasav vagy piruvát hozzáadása fokozta a légzést kis koncentrációjú szukcinát jelenlétében.

Almasav-enzim és foszfoenol-piruvát karboxikináz enzim aktivitás



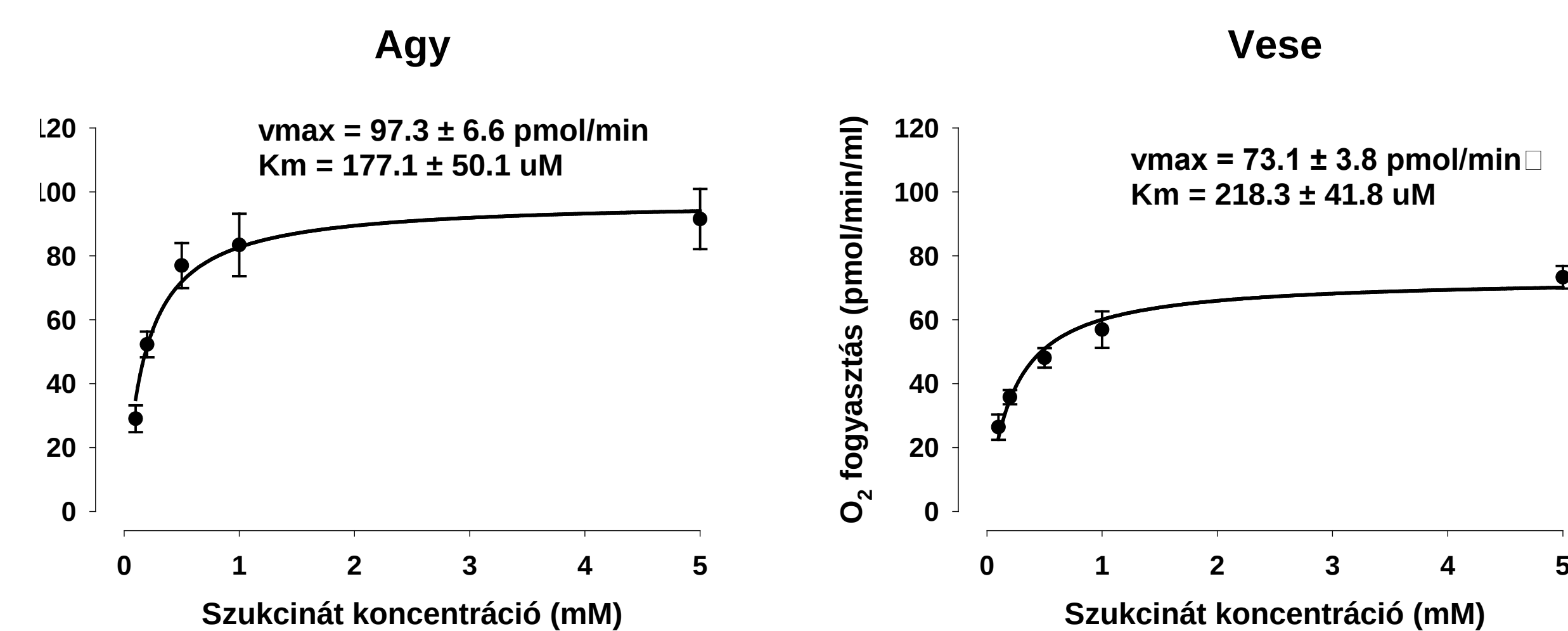
Nagyobb almasav enzim aktivitást mértünk agyi mitokondriumokban . A PEPCK aktivitása viszont vese mitokondriumokban volt magasabb.

Eredmény

Alacsony szukcinát koncentráció esetén ADP hatására az agy mitokondriumokon az oxidáció gátlása volt megfigyelhető, amit a vese mitokondriumokban nem tapasztaltunk. Agy és vese mitokondriumokon végzett szukcinát-dehidrogenáz oxidációs és enzim aktivitás vizsgálatok esetében a Km értéke nem különbözött. Az enzim aktivitás vizsgálatok során az oxálcetát gátolta az SDH-t mindkét szervben. Agy mitokondriaiban a rotenon, almasav enzim és piruvát is megszüntette a gátlást. Az almasav enzim aktivitása magasabb az agyból izolált mitokondriumok esetében. Viszont magasabb PEPCK aktivitását mértünk vese mitokondriumokban.

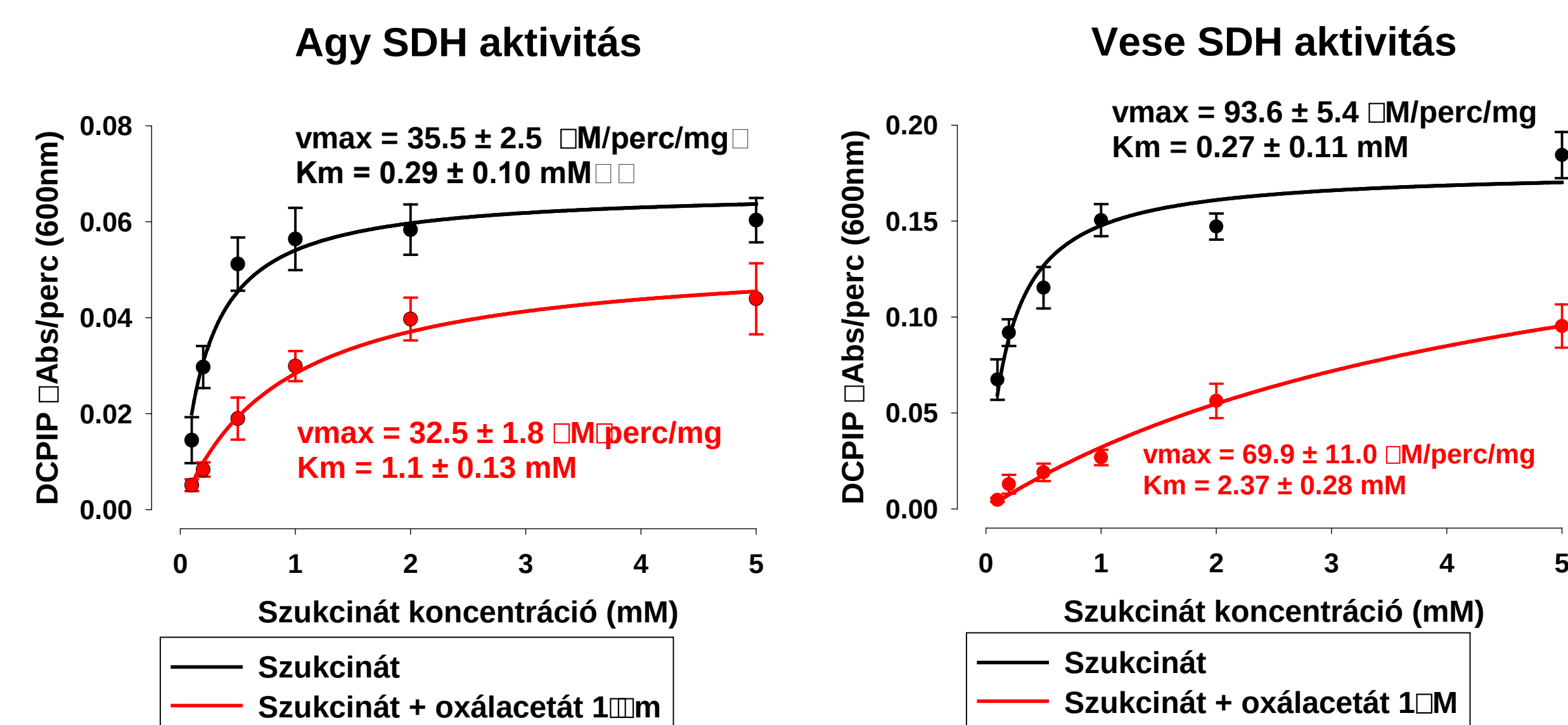
	Agy	Vese
Légzésgátlás kis szukcinát koncentráció esetén	Van (rotenonnal felfüggeszthető)	Nincs
Szukcinát-dehidrogenáz aktivitás	Nincs különbség	
Almasav enzim aktivitás	Magas (9x)	Alacsony
PEPCK aktivitás	Alacsony	Magas (2.5x)

Oxigénfogyasztás különböző szukcinát koncentrációk esetében ADP hiányában



Agy és vese mitokondriumok szukcináttal történt nyugalmi légzésében nincs különbség szukcinát telítési koncentrációjának tekintetében.

Szukcinát-dehidrogenáz enzim aktivitás



A két szervben az SDH enzim aktivitása hasonló a Km megegyezik. Mindkét szervben az oxálcetát gátolt.

Anyag és módszer

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

•**Szukcinát-dehidrogenáz enzim aktivitás mérés:** diklórfenol indofenol esszével történt 600 nm-en Jasco spektrofotométerrel.

•**Mitokondriális almasav enzim aktivitás mérés:** Jasco spektrofotométerrel vizsgáltuk 340 nm-en.

•**Mitokondriális foszfoenol-piruvát karboxikináz (PEPCK) enzim aktivitás mérése:** kapcsolt enzim esszével segítségével Jasco spektrofotométerrel mértük.

Köszönetnyilvánítás:

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