

25

A MIOZIN FOSZFATÁZ SZEREPE A NEUROTRANZMITTER-KIBOCSÁTÁSBAN

Horváth Dániel¹, Sipos Adrienn¹, Darula Zsuzsanna², TamásIstván¹, Bécsi Bálint¹, LontayBeáta¹

¹Debreceni Egyetem ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet;

²MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Proteomikai Laboratórium

Az ingerületátvivő anyagok felszabadulását a neuronális fehérjék reverzibilis foszforilációja is szabályozza. A fehérjék foszforilációs szintjét a protein kináz és foszfatáz enzimek határozzák meg. A miozin foszfatáz (PP1M) protein foszfatáz 1 katalitikus alegységet (PP1c) és miozinhoz is kötődő regulátor alegységet (MYPT) tartalmaz, és elsősorban citoskeletális fehérjék szabályozásában játszik szerepet. Munkacsoportunk előzetes eredményei alapján a PP1M az idegrendszerben is expresszálódik. A Rho-A aktivált protein kináz (ROK) és a PP1M számos közös szubsztráttal rendelkezik, és ezek foszforilációs/defoszforilációs módosításait enzimpárként katalizálják. Újabb vizsgálatok alapján a PP1M és a ROK inhibitorai jelentős mértékben befolyásolják a neurotransmitter kibocsátást is, ami az idegrendszerben betöltött fontos szerepükre utal. Immunprecipitációval bizonyítottuk a MYPT kölcsönhatását a neurotransmitter kibocsátásban kulcsszerepet játszó SNARE komplex elemei közül a SNAP25 fehérjével. A kölcsönhatás tényét felületi plazmonrezonancia módszerrel és Far Western analízissel nyert eredményeink is igazolják. Tömegspektrometriás elemzések alapján a ROK a SNAP25 Thr138 oldalláncát specifikusan foszforilálja. *In vitro* kináz assay segítségével is bizonyítottuk, hogy a ROK foszforilálja a tisztított SNAP25 fehérjét ezen az oldalláncon, míg a miozin foszfatáz rekombináns alegységei a foszforilációs szint drasztikus csökkenését eredményezték. Egér agykéregből preparált funkcióképes szinaptoszómákba a PP1M-t specifikusan gátló KEPI fehérjét transzdukcióval bejuttatva az exocitózis assay-vel a neurotransmitter kibocsátás mérséklődését, Western blottal pedig a SNAP25 Thr138 foszforilációs szintjének a növekedését tapasztaltuk. Eredményeink alapján a ROK/PP1M enzimpár a SNAP25 fehérje Thr138-as oldalláncának szabályozása által a neurotransmitter felszabadulásban és a szinaptikus vezikulumok szállításában játszik szerepet.

PP1M: miozin foszfatáz, PP1c: protein foszfatáz 1 katalitikus alegység, MYPT: miozin foszfatáz szabályozó alegység, SNARE: oldható N-etilmaleimid érzékeny faktort kötő fehérje receptor, ROK: Rho-A aktivált kináz, SNAP25: szinaptoszóma-asszociált protein 25 kDa, KEPI: protein kináz C aktivált gátló fehérje.

Támogatók: OTKA PD104878, TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025

26

A SZUKCINÁT-DEHIDROGENÁZ AKTIVITÁSÁNAK SZERVSPECIFIKUS SZABÁLYOZÁSA

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

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

A szukcinát-dehidrogenáz (SDH) a mitokondriális légzési lánc és a citrát-kör közös enzime. Fontos szerepet játszik a mitokondriális oxidációban, a hipoxiára adott válaszban és a tumor-képződésben. 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 céljával 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 spektrofotometriás esszével vizsgáltuk. A jelenség hátterében az irodalomban korábban leírt oxálacetát SDH gátló hatását gondoltuk, azonban ez nem magyarázta a szervcsoportokban tapasztalt eltéréseket.

Az oxigénfogyasztásból nyert eredményeink alapján az agy és vese mitokondriumok SDH enzime 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 oxálacetát koncentráció csökkentése révén a légzés gátlás megszüntetésében.

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

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