

**TDK dolgozat**  
**Sváb Gergely**

Pázmány Péter Katolikus Egyetem  
Információs Technológiai és Bionikai Kar

# A mitokondrium anyagcseréjének modellezése

Sváb Gergely

Info-bionikus mérnök  
I. évfolyam

Konzulensek:

Dr. Szederkényi Gábor, egyetemi tanár  
Pázmány Péter Katolikus Egyetem  
Információs Technológiai és Bionikai Kar

Dr. Tretter László, egyetemi tanár  
Semmelweis Egyetem  
Orvosi Biokémiai Intézet

Budapest, 2016.11.23.

# Tartalomjegyzék

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| Nyilatkozat                                                      | 3         |
| Tartalmi kivonat                                                 | 4         |
| Abstract                                                         | 6         |
| Rövidítések, jelölések                                           | 7         |
| <b>1. Bevezetés</b>                                              | <b>9</b>  |
| 1.1. A mitokondrium . . . . .                                    | 9         |
| 1.1.1. Felépítés . . . . .                                       | 9         |
| 1.1.2. Bioenergetika . . . . .                                   | 10        |
| 1.1.3. Egyéb funkciók . . . . .                                  | 12        |
| 1.2. A munkához szorosan kapcsolódó korábbi eredmények . . . . . | 13        |
| 1.3. Célkitűzés . . . . .                                        | 14        |
| <b>2. Kinetikai modellezés</b>                                   | <b>15</b> |
| 2.1. Az enzimek tulajdonságai és működése . . . . .              | 15        |
| 2.2. Michaelis-Menten kinetika . . . . .                         | 16        |
| 2.3. Reakciók modellezése . . . . .                              | 18        |
| 2.3.1. Egykomponensű reakciók . . . . .                          | 18        |
| 2.3.2. Többkomponensű reakciók . . . . .                         | 18        |
| <b>3. A modell elemei</b>                                        | <b>20</b> |
| 3.1. A reakciókat katalizáló enzimek . . . . .                   | 20        |
| 3.1.1. Általános tudnivalók . . . . .                            | 20        |
| 3.1.2. A modellben szereplő enzimek . . . . .                    | 20        |
| 3.2. Citrát-körben résztvevő koenzimek és ezek szerepe . . . . . | 22        |
| 3.2.1. AcKoA . . . . .                                           | 22        |
| 3.2.2. NAD <sup>+</sup> . . . . .                                | 22        |
| 3.2.3. FAD . . . . .                                             | 22        |
| 3.3. Energiatermelés és a P/O hányados . . . . .                 | 23        |

|           |                                                          |           |
|-----------|----------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.1.    | Energiatermelés . . . . .                                | 23        |
| 3.3.2.    | NADH és FADH <sub>2</sub> oxidációja . . . . .           | 23        |
| 3.3.3.    | P/O hányados . . . . .                                   | 23        |
| 3.4.      | A mitokondrium transzporterei . . . . .                  | 24        |
| 3.4.1.    | A modellben használt transzporterek . . . . .            | 25        |
| 3.4.2.    | További transzporterek . . . . .                         | 26        |
| <b>4.</b> | <b>A citrát-kört leíró kvantitatív modell</b>            | <b>27</b> |
| 4.1.      | Modellezési célok . . . . .                              | 27        |
| 4.2.      | Paraméterek . . . . .                                    | 28        |
| 4.3.      | A modellhez tartozó differenciálegyenletek . . . . .     | 30        |
| 4.4.      | További számított értékek . . . . .                      | 33        |
| 4.5.      | A differenciálegyenletek vektoros felírása . . . . .     | 33        |
| 4.5.1.    | Általános felírás . . . . .                              | 33        |
| 4.5.2.    | A reakcióegyenletek felírása transzporterek nélkül . . . | 33        |
| 4.5.3.    | A reakcióegyenletek felírása transzporterekkel . . . . . | 34        |
| <b>5.</b> | <b>A modell és a szimulációk eredményei</b>              | <b>35</b> |
| 5.1.      | A MATLAB környezet . . . . .                             | 35        |
| 5.2.      | Differenciálegyenletek megoldása . . . . .               | 35        |
| 5.3.      | Keletkezett ATP és P/O számítása . . . . .               | 36        |
| 5.4.      | Felhasználói felület . . . . .                           | 36        |
| 5.5.      | Megjelenítés . . . . .                                   | 36        |
| 5.6.      | Szimulációs eredmények . . . . .                         | 37        |
| 5.6.1.    | Transzporterek bevezetése . . . . .                      | 37        |
| 5.6.2.    | A modell alkalmazása iszkémiás állapot vizsgálatára . .  | 39        |
| <b>6.</b> | <b>Összefoglalás</b>                                     | <b>41</b> |
| 6.1.      | A létrehozott modell . . . . .                           | 41        |
| 6.2.      | Szimulációs eredményeink értékelése . . . . .            | 41        |
| 6.3.      | További tervek a modell bővítéséhez . . . . .            | 42        |

# Nyilatkozat

Alulírott Sváb Gergely, a Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Karának hallgatója kijelentem, hogy ezt az TDK dolgozatot meg nem engedett segítség nélkül, saját magam készítettem, és a beszámolóban csak a megadott forrásokat használtam fel.

Minden olyan részt, melyet szó szerint, vagy azonos értelemben, de átfogalmazva más forrásból átvettem, egyértelműen a forrás megadásával megjelöltem. Ezt az TDK dolgozatot más szakon még nem nyújtottam be.

Budapest, 2016. november 23.

Sváb Gergely

# Tartalmi kivonat

A mitokondriumok a sejtekben található prokarióta eredetű sejtalkotók, melyek a törzspejlődés során az eukarióta sejtekkel endoszimbiózist hoztak létre. A mitokondriumokban található citrát-kör komplex enzimszisztéma, ami fontos szerepet tölt be a szervezet anyagcseréjében. Itt végződik a táplálék makromolekuláinak (cukrok, zsírok, fehérjék és nukleinsavak) közös intermedierekké történő lebontása. Ezeknek a molekuláknak a további oxidációjával a mitokondrium képes energiát termelni, vagy prekursorokként fel tudja használni őket a felépítő folyamataihoz is.

A citrát-körben résztvevő molekulák képesek egymásba átalakulni, annak függvényében, hogy a mitokondriumnak milyen az aktuális anyagcsere állapota. A ciklus szabályozásának kulcselemei az egyes benne szereplő anyagok koncentrációja és a reakciók során bekövetkező redoxpotenciál változás. A körfolyamat átalakulásai között szerepelnek reverzibilis és irreverzibilis reakciók is. A reverzibilis reakciók kis, míg az irreverzibilis reakciók nagy szabadenergia változással járnak. A citrát-köri oxidoredukciós reakciók eredményeképpen úgynevezett redukáló ekvivalensek ( $\text{NADH}$ ,  $\text{FADH}_2$ ) képződnek. Ezek a molekulák az elektron transzportláncban adják át az elektronok energiáját az ATP-nek, ami a későbbiekben képes energiát szolgáltatni a sejt működéséhez.

A Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémiai Intézet Neurobiokémia munkacsoportjában végzett enzimkinetikai mérések során több mitokondriális enzim paramétereit határoztuk meg, és vizsgáltuk a szubsztrátok és enzimek közti interakciókat. Különböző szubsztrátok oxidációja mellett mértük a mitokondrium  $\text{O}_2$  fogyasztását, és reaktív oxigén gyök termelését. Ezen folyamatok további analízise érdekében természetes módon vetődik fel az igény a ciklusban szerepet játszó intermedierek időbeli koncentráció-változásának leírására egy megfelelő kvantitatív (matematikai) modell segítségével. A modellezés legfontosabb célja az egyes reakciókat katalizáló enzimek csökkent/ fokozott működése, vagy az egyes molekulák hiánya/többlete során kialakult módosult anyagcsere állapotok leírása. Ezt követően annak előrejelzése, hogy a mitokondrium képes-e alkalmazkodni ezen új állapothoz más anyagcse-

re utak aktivációjával/gátlásával, vagy patológiás következmények alakulnak ki. Az irodalomban már készültek ehhez hasonló modellek (pl. [1–4]), ezek továbbfejlesztése, és más aspektusokkal történő kiegészítése is a jelenlegi munka céljai közé tartozik.

# Abstract

Mitochondria are cell organelles with prokaryotic origin that established endosymbiosis with eukaryotic cells during evolution. Citric acid cycle is a complex enzyme system in mitochondria, and a key step of metabolism. Mitochondria produce energy during the catabolic degradation of carbohydrates, fats, proteins and nucleic acids. Additionally, molecules of the citric acid cycle take part as precursors in the construction of the anabolic procedures.

Molecules involved in the citric acid cycle are able to transform into each other depending on the current metabolic status of mitochondria. Regulation of citric cycle depends on the concentration of intermediate molecules and the changes in redox potential. The cycle consists of reversible reactions where the change in the Gibbs free energy is small, and irreversible reactions where the change is large. As a result of these reactions so-called reducing equivalents are produced, which can transport electrons to the electron transport chain, where the electrons' energy plays an important role in the synthesis of ATP which can later be used as an energy source in other cell functions.

In the Neurobiochemistry working group (Institute of Medical Biochemistry, Semmelweis University), we have taken enzyme kinetic measurements of several mitochondrial enzymes, and we have determined and analyzed interactions between enzymes and substrates. We have measured reactive oxygen species productions and the mitochondrial  $O_2$  consumptions with different respiratory substrates. The need naturally arises for further analysis of the process. Therefore a suitable quantitative (mathematical) model is constructed which describes the temporal changes in the quantities of cycle's molecules. The modeling goal in this research phase is to describe qualitatively the increased/decreased operation of the catalyzing enzymes as well as the modified operation of the intermediate molecules. After that we would like to be able to predict whether mitochondria have the ability to adapt to this new metabolic state by activating/inhibiting other metabolic pathways or the metabolism will become pathological. In previous studies similar models [1–4] were made, it belongs to our goals is to promote further development compared to the known models and to expand them in other aspects.

# Rövidítések, jelölések

|                    |                                      |
|--------------------|--------------------------------------|
| AcKoA              | Acetil-koenzim A                     |
| AKON               | Akonitáz                             |
| ADP                | Adenozin-difoszfát                   |
| AGC                | Aszpartát-glutamát carrier           |
| ASP                | Aszpartát                            |
| ATP                | Adenozin-trifoszfát                  |
| $\alpha$ KG        | $\alpha$ -ketoglutarát               |
| $\alpha$ KGDH      | $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz  |
| Cit                | Citrát                               |
| CS                 | Citrát-szintáz                       |
| CTP                | Citrát transzporter                  |
| DIC                | Dikarboxilát transzporter            |
| E                  | Enzim                                |
| ES                 | Enzim-szubsztrát-komplex             |
| FAD                | Flavin-adenin-dinukleotid (oxidált)  |
| FADH <sub>2</sub>  | Flavin-adenin-dinukleotid (redukált) |
| Fum                | Fumarát                              |
| FUM                | Fumaráz                              |
| GC                 | Glutamát carrier                     |
| GTP                | Guanozin-trifoszfát                  |
| IDH                | Izocitrát-dehidrogenáz               |
| Izo                | Izocitrát                            |
| $K_M$              | Michaelis-Menten állandó             |
| $K_t$              | Transzport konstans                  |
| Mal                | Malát                                |
| MDH                | Malát-dehidrogenáz                   |
| OA                 | Oxálacetát                           |
| OGC                | $\alpha$ -ketoglutarát carrier       |
| P                  | Produktum                            |
| PEP                | Foszfoenol-piruvát                   |
| $\text{PO}_4^{3-}$ | Inorganikus foszfát                  |

|                |                                             |
|----------------|---------------------------------------------|
| $\text{NAD}^+$ | Nikotinamid-adenin-dinukleotid (oxidált)    |
| $\text{NADH}$  | Nikotinamid-adenin-dinukleotid (redukált)   |
| $\text{ROS}$   | Reaktív oxigén származékok                  |
| $\text{S}$     | Szubsztrát                                  |
| $\text{SDH}$   | Szukcinát-dehidrogenáz                      |
| $\text{SzKoA}$ | Szukcinil-koenzim A                         |
| $\text{SUCLA}$ | Szukcinil-koenzim A-ligáz                   |
| $\text{Szukc}$ | Szukcinát                                   |
| $\text{UCP}$   | Uncoupling protein                          |
| $V_{max}$      | Maximális sebesség                          |
| $V_S$          | Szubsztrát koncentrációhoz tartozó sebesség |
| $V_t$          | Transzporter sebessége                      |

# 1. fejezet

## Bevezetés

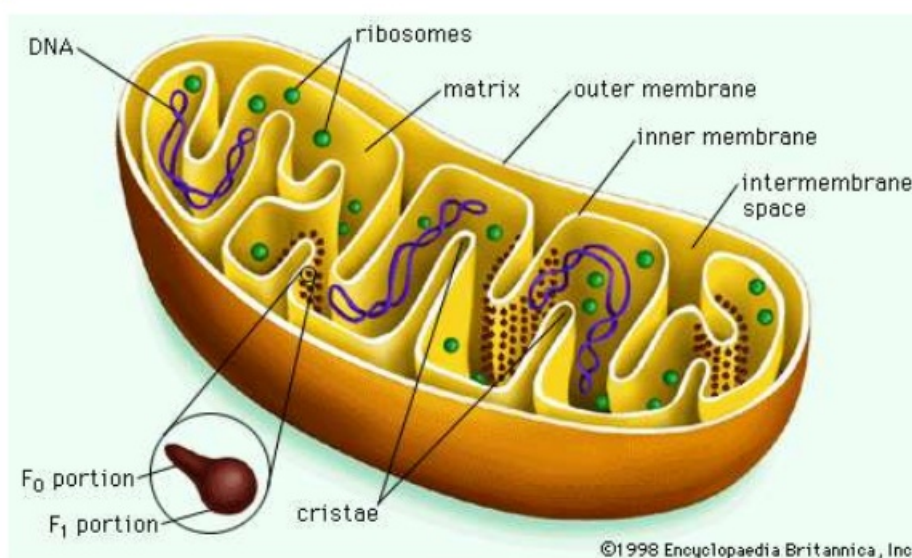
### 1.1. A mitokondrium

A mitokondriumok a sejtekben található prokarióta eredetű sejtalkotók, melyek a törzspejlődés során az eukarióta sejtekkel endoszimbiózist hoztak létre [5]. Ezek a prokarióták fontos szerepet töltenek be a sejt bioenergetikájában, anyagcsere folyamatainak szabályozásában, a hőtermelésben, a reaktív oxigén származékok egyensúlyának fenntartásában, a  $\text{Ca}^{2+}$  anyagcserében, és az apoptózis (programozott sejthalál) szabályozásában is [6].

#### 1.1.1. Felépítés

A mitokondriumok kettős membrán rendszerrel rendelkező sejtorganellumok, egy külső és egy belső membránnal rendelkeznek. Az extramitokondriális teret (sejtplazma), és az intermembrán teret a külső membrán, míg az intermembrán teret a mátrixtól a belső membrán választja el. A külső membrán szabadon átjárható a kisebb molekulák (kb. 6 kDa) számára. Ez a transzport a porinokon valósul meg, melyek a külső membránban található csatornák. A nagy permeabilitás következménye, hogy az intermembrán térben, a kisebb molekulák, és az ionok koncentrációja megegyezik a sejtplazmában mérhető koncentrációkkal. A belső membrán permeabilitása kisebb a külső membránénál, ezért a mátrixba belépő, és onnan kilépő anyagok szabályozott transzportja itt valósulhat meg. Emellett a felülete jelentősen meghaladja a külső membránét, ezért befűződéseket alkot. A mátrixban találhatóak a citrát-kör enzimeik, amelyek a mitokondrium elsődleges funkcióját, az energiatermelést valósítják meg [7].

## **Structure of Mitochondria.**



**1.1. ábra.** Mitokondrium felépítése [8]

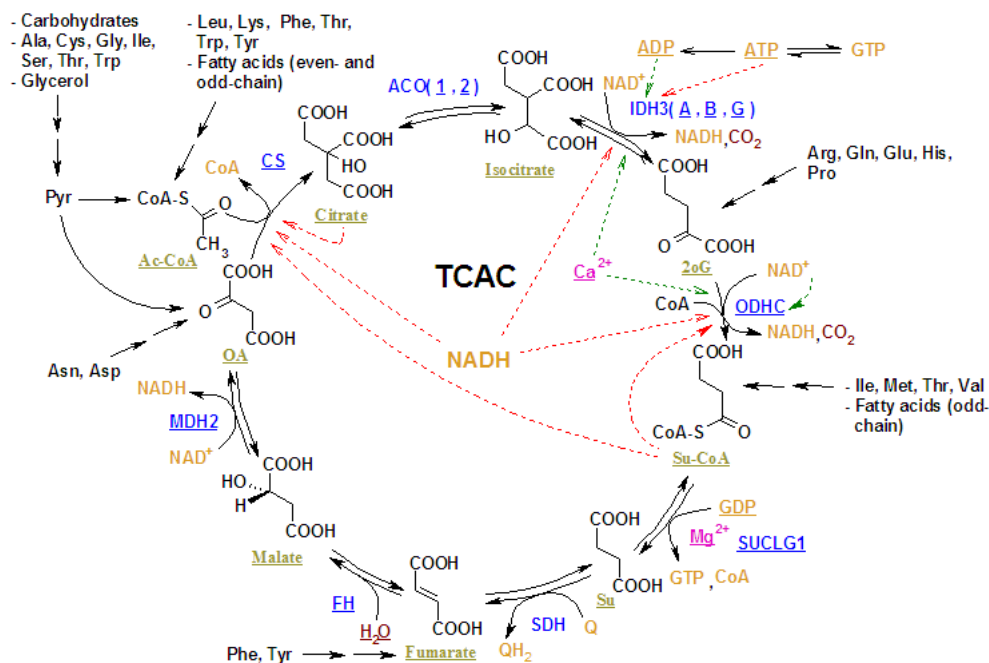
### **1.1.2. Bioenergetika**

A mitokondriumok azáltal, hogy képesek aerob légzést megvalósítani nagymértékben hozzájárulnak a sejt energiatermeléséhez. Ennek a folyamatnak a során a sejt egy glükóz molekulából szén-dioxidot és vizet állít elő, emellett energiát termel, mely ATP formájában raktározódik [9]. Ez a folyamat több részből áll, kezdve a glikolízissal, ami még a sejt citoplazmájában zajlik. Itt a glükóz piroszőlősavvá alakul [10], ami további oxidációja után egy szállítómolekulára (koenzim A) kerül, aminek segítségével képes belépni a citrát-körbe. A lebontás második szakasza már a mitokondrium mátrixában zajlik. Itt található egy komplex enzimszisztéma, a citrát-kör, amely nem csak a glükóz (és egyéb szénhidrátok), hanem zsírok, fehérjék, és nukleinsavak katabolizmusának közös állomása, és képes befogadni a lebontó folyamatok során keletkező molekulákat. Tehát a citrát-körben történik a közös anyagcseretermékek lebontása, és a reakciók során keletkező redukált energiahordozók előállításuk [11]. Az energiatermelés harmadik szakasza a terminális oxidáció, melynek során a redukált molekulák oxidációja történik. Az oxidáció során felszabadult energia segítségével a mitokondrium mátrixából

megtörténik a protonok kipumpálása. Ezt követően a protonok visszaáramlása következik be a mátrixba, és ez a folyamat szolgáltatja az energiát az ATP molekulák termeléséhez.

### Citrát-kör

A mitokondrium mátrixában található komplex enzimszisztéma, amely a makromolekulák (cukrok, zsírok, fehérjék és nukleinsavak) lebontásának intermediereit képes egymásba átalakítani ciklusos működése során [12]. Emellett az oxidációs lépések következményeként energiahordozó molekulák redukálódnak ( $\text{NAD}^+$ , FAD), melyek a légzési láncra szállítják az elektronokat, ahol az oxidációjuk során keletkező energia ATP formájában konzerválódik. A citrát-kör intermedierei ezen kívül a ciklusból kilépve a felépítő folyamatok prekursorai is lehetnek. A körfolyamat átalakulásai között szerepelnek irreverzibilis és reverzibilis reakciók is. A reverzibilis reakciók kis, míg az irreverzibilis reakciók nagy szabadenergia változással járnak. Ezeknek a reakcióknak a következményeként keletkeznek a redukáló ekvivalensek ( $\text{NADH}$ ,  $\text{FADH}_2$ ). Ezek a molekulák a terminális oxidációba lépve képesek oxidálódni, és energiájukat ATP formájában raktározni, ezzel a későbbiekben energiát biztosítani a sejt egyéb működéséhez.



1.2. ábra. Citrát-kör [13]

## Hőtermelés

Elsősorban a barna zsírszövet sejtjeiben található mitokondriumoknak fontos szerepük van a szervezet hőháztartásának szabályozásában. Szétkapcsoló fehérjék segítségével képesek a mátrixba visszaáramló protonok energiáját ATP szintézis helyett hőtermelésre fordítani [14].

### 1.1.3. Egyéb funkciók

#### ROS homeosztázis

A reaktív oxigén származékok (ROS) elsődleges forrása a sejtekben a NADPH oxidáz, amely a gyulladásos folyamatok során aktiválódik fagocita sejtekben. A mitokondriumok által termelt ROS a sejt szabályozásában vesz részt [15]. Modulálja a immunológiai folyamatokat [16, 17], részt vesz az apoptózis [18], a sejt differenciálódás [19], az autofágia [20], a celluláris [21, 22], és a szövet-szintű [23] gyulladások szabályozásában is, ezáltal hozzáigazítja a különböző szabályozási folyamatokat a sejt aktuális anyagcsere állapotához.

#### $\text{Ca}^{2+}$ anyagcsere

A sejtekben számos fehérje működését az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint szabályozza. A mitokondriumok azáltal, hogy képesek  $\text{Ca}^{2+}$ -ot felvenni és leadni, pufferelni tudják a sejtekben a  $\text{Ca}^{2+}$  szintet. Az intramitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  képes többek között aktiválni a citrát-kör sebességmeghatározó enzimeit (piruvát-, izocitrát-,  $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz) is, és ezzel képes fokozni a sejt anyagcseréjét [24].

#### Apoptózis

A programozott sejthalál (apoptózis) a szervezet fontos szabályozó mechanizmusa annak érdekében, hogy a károsodott, sérült, vagy előregedett sejteket eltávolítsa. A folyamat inicializációja több úton is megvalósulhat. Az apoptózis külső (extrinsic) útja során a sejt felszínén található halál-receptorokra halál ligandok kötnek be, ezzel aktiválva a kaspáz (cisztein-aszpartát-proteáz) rendszert, melynek hatására létrejön az apoptózis. A mitokondriumoknak az apoptózis belső (intrinsic) útjában van szerepe. A Bcl2 fehérjecsald egy mitokondriumokban található anti-apoptotikus faktor, mely gátolja az apoptózis létrejöttét. Ennek hiányában a mitokondriumokból citokróm c szabadul fel, mely kaspáz aktiváció révén az apoptózis irányába viszi a sejtet [25, 26].

## 1.2. A munkához szorosan kapcsolódó korábbi eredmények

Az [1] tanulmányban a szerzők izolált szív mitokondriumok és harántcsíkolt izom mitokondriumok adatait használják a metabolikus és elektrofiziológias paraméterek meghatározásához, és validálásához. A modell a gyorsan kialakuló egyensúlyi állapotot veszi alapul, amit a kinetikai és termodinamikai egyensúly határoz meg. A modell sok paramétert igényel, és ezek megfelelő megválasztása fontos, mivel a paraméterek értékei széles tartományban képesek mozogni a mitokondrium szubsztrátjaitól, és a mérések körülményeitől függően. A modellel megjósolható, hogy a citromsav ciklus szabályozásában az egyes tényezők milyen mértékben játszanak szerepet ( $\text{NAD}^+$ , ADP, fluxosok), továbbá előrejelzi a pH és membránpotenciál változás ATP hidrolízisre gyakorolt hatását.

A [2] tanulmány a citrát-kör, az elektron transzportlánc és az ATP szintézis egyszerűsített modelljét, és ezek egymással való kapcsolatát mutatja be. A rendszer leírásakor jelentős mértékben redukált a reakcióegyenletek száma, és több helyen irreverzibilis reakcióként tekint a valójában reverzibilis folyamatokra is, ezáltal megkönnyítve a matematikai analízist. A folyamatok leírásához differenciálegyenleteket használ, és ezek segítségével írja fel az időben változó vizsgált koncentrációkat. Emellett figyelembe veszi a membránpotenciál és az ATP reakciókra gyakorolt hatását is.

A [3]-as cikkben a citrát-kör, az elektron transzportlánc, és az ATP szintézis folyamatának vizsgálata történik. A citrát-kör reakcióit 8 differenciálegyenlettel írja föl. A sebességeket a Michaelis-Menten reakciókinetikai egyenlettel határozza meg. Emellett a pontos paraméterek helyett a  $\frac{v}{v_{max}}$  és  $\frac{[S]}{K_M}$  arányokkal dolgozik, ezáltal egyszerűsítve a reakciók leírását. Az elektron transzportlánc és az ATP szintézis modellezését a pH különbség által meghatározott dinamika alapján valósítja meg. Ezt követően az  $\text{O}_2$  koncentráció és az intramitokondriális pH függvényében vizsgálja az ATP szintézist.

A [4]-es hivatkozás a [3] cikkben leírt rendszert egészíti ki azáltal, hogy bevezeti a malát-aszpartát és a citrát-piruvát ingát. Ezek a transzporter-rendszerek a mitokondrium és az intermembrán tér közötti cseremechanizmusok következtében valósítják meg a NADH transzportját, és ezáltal a citoplazmatikus  $\text{NAD}^+$  pool regenerációját, továbbá a különböző szénatomszámú karbonsavak kicserélése következtében a citrát-kör intermedierjeinek egyensúlyát tartják fenn. A modell szemlélteti az egyes metabolitok egyensúlyi állapotra történő beállását, továbbá fázisdiagramon jeleníti meg ezek időbeli alakulását. Ezt követően összehasonlítja a korábbi modellel, majd az E. coli-ban mért adatokkal.

### 1.3. Célkitűzés

A modellezés legfontosabb célja a mitokondrium normál és bizonyos kóros állapotaihoz tartozó dinamikus működést leíró kvantitatív modell kifejlesztése és mért adatokkal történő validálása a saját és az irodalomból ismert eredmények felhasználásával és ezt követően a modell szükség szerinti továbbfejlesztésével. Tehát a különböző kórállapotokra jellemző koncentrációkkal is szeretnénk tesztelni a modellt, és összehasonlítani az élettani eredményekkel. A megfelelő leíróképeség esetén a modell alkalmas lehet az enzimdefektusokban létrejövő anyagcsere állapot szimulálására az enzimek paramétereinek megváltoztatásával. Ezzel megjósolhatóvá válna az adott betegségben kialakuló metabolikus állapot, és előre lehetne jelezni, hogy az adott enzim módosult működése mellett a mitokondrium képes-e alkalmazkodni az új anyagcsere állapothoz vagy patológias következmények alakulnak ki.

## 2. fejezet

# Kinetikai modellezés

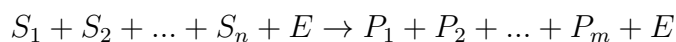
### 2.1. Az enzimek tulajdonságai és működése

Az enzimek az élővilágban lejártszóó biokémiai folyamatokat katalizáló makromolekulák, melyek képesek csökkenteni a reakció bekövetkezéséhez szükséges aktiválási energiát, ezzel növelve a reakció végbemenetelének valószínűségét, de a reakció során bekövetkező energiaváltozást nem befolyásolják. A reakció végén pedig változatlan formában fogjuk visszkapni az enzimeket. Az egyes enzimek működését a környezeti hatások (hőmérséklet, pH, ionkoncentráció) nagymértékben képesek befolyásolni.

Szerkezetük szerint az enzimek általában fehérjék, de léteznek RNS szerkezetűek (ribozim) is. A fehérje enzimek lehetnek egyszerűek, melyek csak fehérje részekből (alegység) állnak, vagy összetettek, ha tartalmaznak nem-fehérje alkotórészeket is. Ezek az alkotórészek kötődhetnek kovalens kötéssel az enzimhez, ez esetben prosztetikus csoportról beszélünk, míg ha csak lazán kötődő molekuláról van szó, akkor koenzimnek nevezzük.

A másik csoportosítási lehetőség az enzim által katalizált reakció típusa alapján történik. Az enzimek osztályozásakor a nyilvántartásban szereplő négy szám közül az első jelöli a reakciótípust (osztályt), ezt követően a számok az alosztályt, csoportot, és a konkrét enzimet. Ez alapján meg tudunk különböztetni oxidoreduktázokat (1, pl: malát-dehidrogenáz (1.1.1.37)), transzferázokat (2), hidrolázokat (3), liázokat (4, pl: citrát-szintáz (4.1.3.7)), izomerázokat (5), ligázokat (6, pl: szukcinil-KoA-ligáz (6.2.1.4)) [27].

Egy enzim (E) működése során egy (vagy több) kiindulási molekulából (szubsztrát, S) állít elő termék(ek)et (produktum, P). Egy n-ed rendű reakció általános felírása:



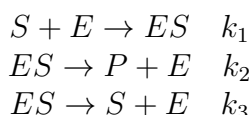
A kémiai felírással ellentétben az orvosi/biológia leírásban általában nem tüntetik föl az enzimet, ezért a későbbiekben mi is eltekintünk ettől.

## 2.2. Michaelis-Menten kinetika

A legegyszerűbb eset, amikor egy szubsztrátból egy termék keletkezik, és a folyamat végén az enzimet változatlan formában kapjuk vissza. A reakciót tekinthetjük két lépésből állónak. Az első lépés során, amely egy reverzibilis folyamat, az enzim megköti a szubsztrátot, ezzel kialakítva az enzim-szubsztrát komplexet (ES). Ezt követően ES disszociálhat, ezzel ismét S és E keletkezik. A másik eset, amikor megtörténik a katalízis, és a szubsztrát produktummá alakul. A modellben feltételezzük, hogy az első lépés során pillanatszerűen létrejön az ES komplex, és ennek koncentrációja hosszú ideig állandó marad (steady-state állapot). ES koncentrációja nehezen mérhető, ezért az egyéb paraméterekből határozzuk meg. Továbbá feltételezzük, hogy a szubsztrát koncentrációja nagyságrendekkel nagyobb az enzim koncentrációjánál, és fogyása elhanyagolható mértékű a reakció során. Emellett azt is feltesszük, hogy a keletkezett termék nem alakul vissza szubsztráttá [28, 29].



Ezt követően vizsgáljuk a három elemi reakciót, és a hozzájuk tartozó sebességi állandókat:



Mivel az  $[ES]$  mennyiséget állandónak tekintjük (steady-state állapot), ezért a változás 0. Ezt azért tehetjük meg, mert ES komplex mennyiségének változása elhanyagolható mértékű a szubsztrát fogyáshoz, és termék keletkezéséhez viszonyítva. Ezt az állandó értéket a sebességi állandók ( $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ), és az  $[E]$  és  $[S]$  értékei határozzák meg, amit az alábbi módon tudunk kiszámolni:

$$\frac{d}{dt}[ES] = k_1[S][E] - k_2[ES] - k_3[ES] = 0 \quad (2.1)$$

Átrendezzük az egyenletet (2.2), és tudjuk, hogy az enzim szabad formában van jelen vagy szubsztrátot köt, tehát a teljes enzim mennyiség ( $[E_t]$ ), ezek összegével egyenlő (2.3):

$$k_1[S][E] = k_2[ES] + k_3[ES] \quad (2.2)$$

$$[E] = [E_t] - [ES] \quad (2.3)$$

[E] helyére (2.2) egyenletbe beírva a (2.3) egyenletet, az átrendezések után a következőképp tudjuk kifejezni [ES]-t:

$$[ES] = \frac{k_1[S][E_t]}{k_1[S] + k_2 + k_3} = \frac{[S][E_t]}{[S] + \frac{k_2+k_3}{k_1}} \quad (2.4)$$

Ezt követően bevezethetjük a Michaelis-Menten konstanst ( $K_M$ , [30]). Ez az érték azt a szubsztrát koncentrációt jelenti, amelynél az enzim a maximális reakciósebesség felével működik. (Ennek ellenőrzésére a későbbiekben kerül sor.) Ezt követően behelyettesítjük  $K_M$ -et a (2.4) egyenletbe:

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.5)$$

$$[ES] = \frac{[S][E_t]}{[S] + K_M} \quad (2.6)$$

Ezzel meghatároztuk [ES] értékét (2.6). A termék keletkezésének sebessége ( $V_S$ ) csak [ES] értékétől és  $k_2$  sebességi állandótól függ (2.7), és tudjuk, hogy akkor maximális, ha minden enzim a szubsztrátot köt, tehát a teljes enzimmennyiség ( $E_t$ ) szubsztrátot kötve (ES formában) van jelen (2.8):

$$V_S = k_2[ES] = \frac{k_2[S][E_t]}{[S] + K_M} \quad (2.7)$$

$$[ES] = [E_t] \Rightarrow V_{max} = k_2[E_t] \quad (2.8)$$

Ezt követően a (2.7) és (2.8) egyenletet összevonva:

$$V_S = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_M} \quad (2.9)$$

Ezzel megkaptuk az adott szubsztrát koncentrációhoz tartozó reakciósebességet (2.9).

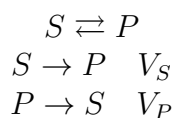
A (2.9) egyenletbe behelyettesítve a Michaelis-Menten konstanst ( $K_M$ ), látható hogy ennél a koncentrációnál valóban a maximális reakciósebesség ( $V_{max}$ ) felével működik az enzim:

$$[S] = K_M \Rightarrow V_S = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_M} = \frac{V_{max}K_M}{K_M + K_M} = \frac{V_{max}}{2} \quad (2.10)$$

## 2.3. Reakciók modellezése

### 2.3.1. Egykomponensű reakciók

Egykomponensű reakciók esetén az átalakulás sebessége függ a szubsztrát koncentrációjától, az enzim szubsztrát iránti affinitásától, és az enzim maximális reakciósebességétől. Ezt az összefüggést írja le az előző fejezetben tárgyalt Michaelis-Menten enzimkinetikai modell. Ebben az esetben a reakcióban a szubsztrát változását az átalakulás és visszaalakulás különbségéből kaphatjuk meg.  $V_{max}(E)$  egy enzimfüggő paraméter,  $[S]$  és  $[P]$  a szubsztrát és a produktum koncentrációja,  $K_M(S,E)$  és  $K_M(P,E)$  pedig az enzimtől és a szubsztráttól/produktumtól függő Michaelis-Menten állandó. Jelölje  $V_S$  és  $V_P$  a két elemi reakció sebességét.



$$\frac{d}{dt}[S] = -\frac{V_{max}(E)[S]}{[S]+K_M(S,E)} + \frac{V_{max}(E)[P]}{[P]+K_M(P,E)} = -V_S + V_P$$

$$\frac{d}{dt}[P] = +\frac{V_{max}(E)[S]}{[S]+K_M(S,E)} - \frac{V_{max}(E)[P]}{[P]+K_M(P,E)} = +V_S - V_P$$

### 2.3.2. Többkomponensű reakciók

#### Sztöchiometriai mátrix

A reakciórendszer általános leírásához érdemes bevezetni az ún. sztöchiometriai mátrixot ( $S_{n \times k}$ ), aminek oszlopai az egyes reakciókhoz tartozó sztöchiometriai viszonyokat írják le ( $n$  darab reakció), soraiban pedig az egyes anyagok szerepelnek ( $k$  számú anyag). Ha ezt a mátrixot megszorozzuk egy reakciósebesség vektorral ( $V_S$ ), ami a Michaelis-Menten kinetikával (ld. 2.2 alfejezet) számolt reakciósebességeket tartalmazza, akkor megkapjuk a koncentrációk időbeli változását.

$$\frac{d}{dt}X = S_{n \times k} \cdot V_S$$

### Reakciósebesség vektor

A modellünkben a reakciókra elsőrendű reakciókként tekintünk, tehát azt feltételezzük, hogy az átalakulás sebességét csak egy anyag koncentrációja határozza meg, ami jelen esetben a kiindulási szubsztrát. Ilyenkor tudjuk használni a Michaelis-Menten kinetikát a reakciósebesség vektor ( $V_S$ ) meghatározására.  $V_{S_i}$  az  $i$ -edik szubsztráthoz tartozó reakciósebességet,  $[X_i]$  az  $i$ -edik szubsztrát koncentrációját,  $K_{M_i}$  az enzim  $i$ -edik szubsztrátra vonatkozó  $K_M$  értékét,  $V_{max}$  pedig az enzim maximális sebességét jelöli.

$$V_{S_1} = \frac{V_{max}[X_1]}{[X_1] + K_{M_1}}$$

$$V_{S_2} = \frac{V_{max}[X_2]}{[X_2] + K_{M_2}}$$

$$\vdots$$

$$V_{S_n} = \frac{V_{max}[X_n]}{[X_n] + K_{M_n}}$$

Amennyiben modell bővítése során a Michaelis-Menten kinetika helyett más enzimkinetikai modellt szeretnénk használni, akkor az új modell szerint adjuk meg a reakciósebesség vektor ( $V_S$ ) értékeit.

### Reverzibilis reakciók felírása

Abban az esetben, ha egy reverzibilis reakciót két elemi reakcióként modellezünk, akkor ezt a sztöchiometriai mátrixban két oszlopként reprezentáljuk, ellentétes előjellel, mivel a két elemi reakcióhoz különböző reakciósebesség tartozik. Tehát egy reverzibilis reakcióban (ahol  $k$  és  $k+1$  a két elemi átalakulás indexe) a kiindulási anyagok változása az alábbi módon írható föl.

$$\frac{d}{dt}X_i = S_{k,i} \cdot (V_S)_k - S_{k+1,i} \cdot (V_S)_{k+1}$$

## 3. fejezet

### A modell elemei

#### 3.1. A reakciókat katalizáló enzimek

##### 3.1.1. Általános tudnivalók

A citrát-kör a különböző élőlényekben, de még szervezetben is eltérő aktivitással működhet. Egyes enzimek mennyisége és aktivitása nagymértékben függhet a szubsztrátok magas koncentrációjától, ami általában fokozza az aktivitást, míg a termék koncentrációjának emelkedése képes gátolni az enzimeket (negatív visszacsatolás). Ezért a modell megalkotása során igyekeztem mitokondriumok enzimeinek paramétereit hasonló körülmények között vizsgálni ( $V_{max}$  adatok forrása [31];  $K_M$  értékek forrása [32]). A konkrét enzimet a megnevezését követő szám azonosítja (ld. 2.1 alfejezet). Amennyiben a későbbiek során pontosabb mérési adatok állnak majd rendelkezésre, úgy lehet pontosabban kalibrálni a modellt.

##### 3.1.2. A modellben szereplő enzimek

###### Citrát-szintáz (4.1.3.7)

Katalizált reakció:

Acetil-KoA + oxálacetát  $\rightarrow$  citrát

Modellben használt paraméterek:

$V_{max} = 1.88 \frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}}$ ;  $K_{M,\text{oxálacetát}} = 4 \mu\text{M}$ ;

**Akonitáz (4.2.1.3)**

Katalizált reakció:

Citrát  $\rightleftharpoons$  izocitrát

Modellben használt paraméterek:

Az enzim nagy aktivitása miatt a modellben a citrát/izocitrát = 10 arány beállításával dolgoztunk [33].

**Izocitrát-dehidrogenáz (1.1.1.41)**

Katalizált reakció:

Izocitrát +  $\text{NAD}^+$   $\rightarrow$   $\alpha$ -ketoglutarát +  $\text{CO}_2$  +  $\text{NADH}$  +  $\text{H}^+$

Modellben használt paraméterek:

$V_{max} = 0.1 \frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}}$ ;  $K_{M,\text{izocitrát}} = 140 \mu\text{M}$ ;

 **$\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz (1.2.4.2)**

Katalizált reakció:

$\alpha$ -ketoglutarát + KoA-SH +  $\text{NAD}^+$   $\rightarrow$  szukcinil-KoA +  $\text{CO}_2$  +  $\text{NADH}$  +  $\text{H}^+$

Modellben használt paraméterek:

$V_{max} = 0.0037 \frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}}$ ;  $K_{M,\alpha\text{-ketoglutarát}} = 110 \mu\text{M}$ ;

**Szukcinil-KoA-ligáz (6.2.1.4)**

Katalizált reakció:

Szukcinil-KoA + GDP + P  $\rightarrow$  szukcinát + KoA-SH + GTP

Modellben használt paraméterek:

$V_{max} = 0.39 \frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}}$ ;  $K_{M,\text{szukcinil-KoA}} = 40 \mu\text{M}$ ;

**Szukcinát-dehidrogenáz (1.3.5.1)**

Katalizált reakció:

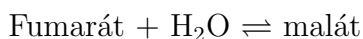
Szukcinát + FAD  $\rightarrow$  fumarát +  $\text{FADH}_2$

Modellben használt paraméterek:

$V_{max} = 0.258 \frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}}$ ;  $K_{M,\text{szukcinát}} = 270 \mu\text{M}$ ;

**Fumaráz (4.2.1.2)**

Katalizált reakció:



Modellben használt paraméterek:

Az enzim nagy aktivitása miatt a modellben a malát/fumarát = 4.4 arány beállításával dolgoztunk [32].

**Malát-dehidrogenáz (1.1.1.37)**

Katalizált reakció:



Modellben használt paraméterek:

$$V_{\max} = 0.816 \frac{\mu\text{mol}}{\text{perc}}; K_{M,\text{malát}} = 370 \mu\text{M}; K_{M,\text{oxálacetát}} = 52 \mu\text{M};$$

## 3.2. Citrát-körben résztvevő koenzimek és ezek szerepe

### 3.2.1. AcKoA

Az acetyl-koenzim A egy szállítómolekula, mely a piroszőlősav vagy a zsírsavak oxidációja során keletkezik. Ez a molekula juttatja be a citrát-körbe az acetyl csoportokat, melyek az oxálacetáttal egyesülve citráttá alakulnak, ezzel biztosítva a citrát-kör ciklusos működését.

### 3.2.2. $\text{NAD}^+$

A nikotinamid-adenin-dinukleotid az elektrontranszferben résztvevő molekula, mely 2 elektront képes szállítani a légzési lánc I-es komplexéhez. Ezt követően az I-es komplexen keresztül az elektronok az elektron transzportláncba kerülnek, és így biztosítanak energiát az ATP-szintáz működéséhez, mely az  $\text{ADP} \rightarrow \text{ATP}$  átalakulásért felelős.

### 3.2.3. FAD

A flavin-adenin-dinukleotid a citrát-körben résztvevő szukcinát-dehidrogenáz enzim prosztetikus csoportja, mely az enzimreakció során elektronokat szállít a légzési láncba, amely elektronok szintén az ATP-szintáz működéséhez biztosítanak energiát.

### 3.3. Energiatermelés és a P/O hányados

#### 3.3.1. Energiatermelés

A mitokondriumokban a citrát-kör működése azáltal biztosított hogy a különböző anyagok lebontása során olyan intermedier molekulák keletkeznek, melyek képesek belépni a citrát-körbe. Ezt követően a reakcióik során redukált koenzimek keletkeznek. Ezek a redukált molekulák fogják biztosítani az elektronokat az elektron transzportláncnak. A folyamat során az ATP-szintáz inorganikus foszfátot épít be az ADP molekulába. Ezzel párhuzamosan az ATP-szintáz által visszaengedett  $H^+$  elektronokkal  $O_2$  molekulákat redukálva vizet képeznek a IV-es komplexen. A beépített inorganikus foszfát és oxigén atomok aránya ad felvilágosítást az elektron transzportláncba bekerülő redukált koenzimek arányáról.

#### 3.3.2. NADH és $FADH_2$ oxidációja

A citrát-kör működése közben bizonyos reakciók során  $NAD^+$  és  $FAD$  molekulák redukálódnak. Ezt követően az elektron transzportlánc I-es komplexén a  $NADH$ , míg II-es komplexén a  $FADH_2$  molekulák fognak oxidálódni. Az I-es komplexen lezajló reakció során 4  $H^+$  áramlik ki a mitokondrium két membrán közti terébe, ezzel kialakítva egy elektrokémiai gradienst a membrán két oldala között. A II-es komplex reakciója során nem pumpálódik ki  $H^+$  a mitokondrium membránjai közé. Az oxidáció során a  $H^+$ -ok elektronjai az I-es és II-es komplexről a III-as komplexre kerülnek, mely további 4  $H^+$ -t pumpál ki az intermembrán térbe. Ezt követően az elektronok a IV-es komplexen haladnak át, mely további 2  $H^+$ -t juttat ki a mitokondrium mátrixából. A kijuttatott  $H^+$ -ok az elektrokémiai gradiens irányában tudnak visszajutni a mátrixba az ATP-szintázon keresztül, ahol megtörténik az energia konzerválása  $ADP \rightarrow ATP$  átalakulás során. A visszajutó  $H^+$  a transzportláncon végighaladó elektronokkal és  $O_2$ -nel egyesül, és vizet alkot.

#### 3.3.3. P/O hányados

A redukált  $NADH$  és  $FADH_2$  oxidációja során az előző részben leírt módon ADP-ből ATP keletkezik. Ehhez az ATP-szintáz enzim egy  $PO_4^{3-}$ -ot használ föl. A  $NADH$  oxidációja, mivel ennek első lépése az I-es komplexen zajlik, 10  $H^+$  juttat a mitokondrium két membránja közé. Ezzel szemben a  $FADH_2$  oxidációja során, ami a II-es komplexen kezdődik, 6  $H^+$  kipumpálása történik. A visszaáramló protonok ezt követően az elektronokkal és az  $O_2$ -nel vízzé fognak alakulni. Ezen reakciók során a  $NADH$  oxidációja esetén a P/O

hányados 2,7-2,9, míg a  $\text{FADH}_2$  oxidációjakor 1,6-1,8 [34, 35]. Az oxidáció mérése során a mért értékből kiszámolható, hogy a mitokondriumban milyen arányban történik a két redukált molekula oxidációja.

### 3.4. A mitokondrium transzporterei

A mitokondrium belső membránja a legtöbb molekula számára impermeabilis. Ennek következtében a különböző anyagok, csak transzportereken keresztül képesek bejutni a mitokondrium mátrixába, vagy kijutni onnan. Ezek a transzporterek lehetnek uniporterek (egy anyag transzportját végzik), szimporterek (egy irányba több anyag transzportját végzik), vagy antiporterek (ellentétes irányba több anyag transzportját végzik). Az SLC transzporter családban több citrát-kör szubsztrátot továbbító molekula található [36].

A modellben a transzporterek működését az enzimekhez hasonlóan a Michaelis-Menten kinetikával írjuk le. Ebben az esetben azonban figyelembe kell venni, hogy egy adott anyag kiáramlásával párhuzamosan egy másik anyag beáramlása történik. (A modell jelenleg csak antiportereket tartalmaz, és ezek közül is olyanokat, amelyek 1:1 arányban cserélnek molekulákat a belső membrán két oldala között.) A transzportok során a kicserélődő ionok töltése megegyezik, ezért a hajtóerőt a belső membrán két oldala közötti koncentrációk különbsége biztosítja. A koncentrációt a membrán külső oldalán állandónak tekintjük, mivel ez a sejten belüli koncentrációt reprezentálja (mivel a mitomondriumok külső membránja ezekre az ionokra permeabilis). Ezzel ellentétben a mátrixban lévő koncentráció folyamatosan változik a belső átalakulások és a transzportfolyamatok következtében. Így egy anyag transzportját a be-, és kiáramló anyag mennyiségének különbsége fogja megadni. Ezzel párhuzamosan a kicserélődés miatt ugyanennyi ion fog belépni a külső térből a mitokondriumba az antiporter által szállított másik anyagból. A modellben használt paraméterek forrása [37].

### 3.4.1. A modellben használt transzporterek

#### Citrát transzporter (CTP)

Szinonimák: CIC (citrate carrier), tricarboxylate carrier

Génje (locus): SLC25A1 (22q11.21), SLC20A3

Szubsztrátjai: citrát, izocitrát, malát, foszfoenol-piruvát (PEP)

Transzport: citrát +  $H^+ \rightleftharpoons$  malát

Lokalizáció: agy, tüdő, szív

Modellben használt paraméterek:

$$V_{t,max(Cit)} = 10.5 \frac{mmol}{perc}; V_{t,max(Mal)} = 11.5 \frac{mmol}{perc};$$

$$K_{t,Cit(ki)} = 27 \mu M; K_{t,Cit(be)} = 32 \mu M;$$

$$K_{t,Mal(ki)} = 60 \mu M; K_{t,Mal(be)} = 250 \mu M;$$

#### Dikarboxilát carrier (DIC)

Génje (locus): SLC25A10 (17q25.3)

Szubsztrátjai: malát, foszfát ( $HPO_4^{2-}$ ), szukcinát, szulfát ( $SO_4^{2-}$ ), tioszulfát ( $S_2O_3^{2-}$ )

Transzport:  $HPO_4^{2-} \rightleftharpoons$  malát

Lokalizáció: máj, vese, szív, agy, tüdő, hasnyálmirigy

Modellben használt paraméterek:

$$V_{t,max(Mal)} = 6 \frac{mmol}{perc}; V_{t,max(HPO_4^{2-})} = 6 \frac{mmol}{perc};$$

$$K_{t,Mal(ki)} = 920 \mu M; K_{t,Mal(be)} = 490 \mu M;$$

$$K_{t,HPO_4^{2-}(ki)} = 930 \mu M; K_{t,HPO_4^{2-}(be)} = 1410 \mu M;$$

#### Oxoglutarát carrier (OGC)

Szinonimák: Oxoglutarate/malate carrier

Génje (locus): SLC25A11 (17p13.3), SLC20A4

Szubsztrátjai:  $\alpha$ -ketoglutarát, malát

Transzport:  $\alpha$ -ketoglutarát  $\rightleftharpoons$  malát

Lokalizáció: szív, vázizom, máj, vese, agy, hasnyálmirigy

Modellben használt paraméterek:

$$V_{t,max(\alpha KG)} = 9.5 \frac{mmol}{perc}; V_{t,max(Mal)} = 10 \frac{mmol}{perc};$$

$$K_{t,\alpha KG(ki)} = 170 \mu M; K_{t,\alpha KG(be)} = 310 \mu M;$$

$$K_{t,Mal(ki)} = 710 \mu M; K_{t,Mal(be)} = 1360 \mu M;$$

### 3.4.2. További transzporterek

#### Aszpartát-glutamát carrier 1-2 (AGC1-2)

Szinonimák: Aralar1 (1), Citrin (2), CTLN2 (2), Aralar2 (2)

Génje (locus): SLC25A12 (2q24), SLC25A13 (7q21.3)

Szubsztrátjai: aszpartát,  $\alpha$ -ketoglutarát

Transzport: aszpartát  $\rightleftharpoons$   $\alpha$ -ketoglutarát +  $H^+$

Lokalizáció: agy, szív, vázizom, hasnyálmirigy, vese, tüdő (1), máj (2)

Betegség asszociáció: 2-es típusának defficienciája okozza a 2-es típusú citrullinaemiát (CTLN2) [38], és az újszülöttkori intrahepatikus kolesztázist (NICCD) [39]

#### Glutamát carrier 1-2 (GC1-2)

Génje (locus): SLC25A22 (11p15.5), SLC25A18 (22q11.2)

Szubsztrátjai:  $\alpha$ -ketoglutarát

Transzport:  $\alpha$ -ketoglutarát +  $H^+$  a mátrixba

Lokalizáció: hasnyálmirigy, agy, here, vese, szív, tüdő, máj (1), lép (1), bélrendszer (1)

Betegség asszociáció: 1-es típusának defficienciája okozza az újszülöttkori epilepsziával járó agyvelőgyulladást [40–42]

#### Uncoupling protein 1-5 (UCP1-5)

Szinonimák: Thermogenin (1), UCPH (2), Proton carrier (1-3), Brain mitochondrial carrier protein (BMCP1) (5)

Génjeik (locus): SLC25A7 (4q28-q31) (1), SLC25A8 (11q13) (2), SLC25A9 (11q13) (3), SLC25A27 (6p11.2-q12) (4), SLC25A14 (Xq24) (5)

Szubsztrátjai:  $H^+$  (1-3)

Transzport:  $H^+$  a mátrixba (1-3)

Lokalizáció: barna zsírszövet (1), tüdő (2, 3), vese (2), lép (2), szív (2), vázizom (3), agy (4, 5), here (5)

Betegség asszociáció: obezitás (1, 2), 2-es típusú cukorbetegség (2, 3), veseszületett hiperinzulinaemia (2)

## 4. fejezet

# A citrát-kört leíró kvantitatív modell

### 4.1. Modellezési célok

A modell a citrát-kör reakcióit szimulálja. A modellezés céljai a következők:

1. A reakciókban részvevő anyagok koncentrációjának meghatározása fízíológíás körülmények között.
2. A kezdeti feltételek megváltozása során létrejövő új egyensúlyi állapot predikcíója.
3. A modellben a fízíológíás paramétereket és/vagy kezdeti értékeket kórosra cserélve, a konkrét kórállapotokban létrejövő megváltozott dinamika modellezése.

Az irodalomban korábban már készültek ehhez hasonló modellek [1–4] (ld. 1.2 alfejezet), ezek továbbfejlesztése, és más aspektusokkal történő kiegészítése is a modellezésünk célja.

A ciklus során történő átalakulásokat a Michaelis-Menten kinetikával írjuk le. A reverzibilis reakciókat két ellentétes irányú elemi reakcióként írjuk föl, és a reakciók során a két szubsztrátra vonatkozó  $K_M$  értékeket használjuk. Az egyes intermedierek változását differenciálegyenletek segítségével írjuk le. A reakciók során keletkezett redukált koenzimek (NADH, FADH<sub>2</sub>), és GTP mennyiségéből kiszámoljuk az ezzel ekvivalens ATP mennyiséget, és az ehhez szükséges O<sub>2</sub> fogyasztást. Emellett kiszámoljuk a P/O hányadost, mely a mitokondrium által felhasznált redukált koenzimek arányáról ad felvilágosítást.

## 4.2. Paraméterek

Az enzimek paramétereit egy mátrixban tároljuk, melynek első oszlopában az enzim  $V_{max}$  értéke, második oszlopban a kiindulási szubsztráthoz kapcsolódó  $K_M(S)$  értéke, harmadik oszlopában pedig a produktumhoz kapcsolódó  $K_M(P)$  értéke található. A paraméterek forrása:  $V_{max}$  [31];  $K_M$  [32]. A transzporterek folyamataihoz tartozó paramétereket szintén egy mátrix tárolja, az enzimekhez hasonló módon. Az első két oszlopban található a szubsztráthoz tartozó  $V_{t,max}$  érték, a másodikban a kifelé áramló szubsztráthoz tartozó  $K_t(S_{ki})$  érték, míg a harmadik oszlopban a befelé áramló szubsztráthoz tartozó  $K_t(S_{be})$  érték. A paraméterek forrása [37].

| Enzim                               | Rövidítés     | $V_{max}$<br>( $\mu\text{mol/perc}$ ) | $K_M(S)$<br>( $\mu\text{mol}$ ) | $K_M(P)$<br>( $\mu\text{mol}$ ) |
|-------------------------------------|---------------|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Citrát-szintáz                      | CS            | 1.88                                  | 4                               | irrev                           |
| Akonitáz                            | AKON          | * ld. 3.1.2 alfejezetet, arány = 10   |                                 |                                 |
| Izocitrát-dehidrogenáz              | IDH           | 0.1                                   | 140                             | irrev                           |
| $\alpha$ -ketoglutarát-dehidrogenáz | $\alpha$ KGDH | 0.0037                                | 110                             | irrev                           |
| Szukcinil-KoA-ligáz                 | SUCLA         | 0.39                                  | 40                              | irrev                           |
| Szukcinát-dehidrogenáz              | SDH           | 0.095                                 | 270                             | irrev                           |
| Fumaráz                             | FUM           | * ld. 3.1.2 alfejezetet, arány = 4.4  |                                 |                                 |
| Malát-dehidrogenáz                  | MDH           | 0.816                                 | 370                             | 52                              |

**4.1. táblázat.** Enzimek paramétereit és értékei

| Transzporter                   | Röv. | Szubsz.             | $V_{t,max}$<br>( $\text{mmol/perc}$ ) | $K_t(S_{ki})$<br>( $\mu\text{mol}$ ) | $K_t(S_{be})$<br>( $\mu\text{mol}$ ) |
|--------------------------------|------|---------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Citrát-transzporter            | CTP  | Citrát              | 10.5                                  | 27                                   | 32                                   |
| Citrát-transzporter            | CTP  | Malát               | 11.5                                  | 60                                   | 250                                  |
| Dikarboxilát-carrier           | DIC  | Malát               | 6                                     | 920                                  | 490                                  |
| Dikarboxilát-carrier           | DIC  | $\text{HPO}_4^{2-}$ | 6                                     | 930                                  | 1410                                 |
| $\alpha$ -Ketoglutarát-carrier | OGC  | $\alpha$ -KG        | 9.5                                   | 170                                  | 310                                  |
| $\alpha$ -Ketoglutarát-carrier | OGC  | Malát               | 10                                    | 710                                  | 1360                                 |

**4.2. táblázat.** Transzporterek paramétereit és értékei

A kezdeti értékek szintén egy mátrixban tárolódnak, melynek első oszlopa a mitokondriális koncentrációkat tárolja, ezek az értékek változhatnak a folyamat során, míg a második oszlopa a citoplazmatikus koncentrációkat tartalmazza, amelyek a folyamat során konstansnak tekinthetők. Ezek az értékek módosíthatóak a modellezni kívánt szituáció szerint. Kezdetben a fiziológias koncentrációkat igyekszünk megadni [43–48]. Amelyik koncentrációval nem számolunk, vagy a kezdeti értékét 0-nak tekinthetjük azt a táblázatban feltüntettük. A citrát és az izocitrát mennyiségének összegét egy változónak tekintettük, mivel a két anyag között egyensúlyt feltételezünk, és ezért a citrát keletkezése arányosan növeli az izocitrát mennyiségét, és az izocitrát fogyása pedig arányosan csökkenti a citrát mennyiségét. Ugyanezt az összevonást használtuk a fumarát-malát reakciónál is (ld. 3.1.2 alfejezet).

| Anyag                  | Rövidítés          | $c_{mito}$<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | $c_{sejt}$<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | Jelölése a<br>modellben |
|------------------------|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Oxálacetát             | OA                 | 5.7                                 | 30                                  | $X_1$                   |
| Citrát                 | Cit                | 1250                                | 230                                 | $X_2$                   |
| Izocitrát              | Izo                | 125                                 | nem szükséges                       | $X_2$                   |
| $\alpha$ -ketoglutarát | $\alpha\text{KG}$  | 130                                 | 69                                  | $X_3$                   |
| Szukcinil-KoA          | SzKoA              | 38                                  | nem szükséges                       | $X_4$                   |
| Szukcinát              | Szuc               | 500                                 | nem szükséges                       | $X_5$                   |
| Fumarát                | Fum                | 490                                 | nem szükséges                       | $X_6$                   |
| Malát                  | Mal                | 2156                                | 1840                                | $X_6$                   |
| NADH                   | NADH               | 0                                   | 0                                   | $X_7$                   |
| $\text{FADH}_2$        | $\text{FADH}_2$    | 0                                   | 0                                   | $X_8$                   |
| GTP                    | GTP                | 0                                   | 0                                   | $X_9$                   |
| $\text{PO}_4^{3-}$     | $\text{PO}_4^{3-}$ | 8030                                | 11530                               | $X_{10}$                |

**4.3. táblázat.** A kezdeti értékek

### 4.3. A modellhez tartozó differenciálegyenletek

A modellezés során a differenciálegyenleteket az enzimek (ld. 3.1.2. alfejezet) és a transzporterek (ld. 3.4.1. alfejezet) adatai, és a Michaelis-Menten kinetika (ld. 2.2. alfejezet) alapján írjuk föl, az egyes anyagok időbeli változására vonatkozóan. Ezt követően az alábbi differenciálegyenlet-rendszer megoldásával kaphatjuk meg az egyes koncentrációk időbeli értékeit:

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt}[OA] &= -\frac{V_{CS}[OA]}{[OA] + K_{M(OA,CS)}} + \frac{V_{MDH}[Mal]}{[Mal] + K_{M(Mal,MDH)}} - \\
&\quad -\frac{V_{MDH}[OA]}{[OA] + K_{M(OA,MDH)}} \\
\frac{d}{dt}[Cit] &= \left( +\frac{V_{CS}[OA]}{[OA] + K_{M(OA,CS)}} - \frac{V_{IDH}[Izo]}{[Izo] + K_{M(Izo,IDH)}} - \right. \\
&\quad -\frac{V_{t,CTP}[Cit_m]}{[Cit_m] + K_{t(Cit,CTP)}} + \frac{V_{t,CTP}[Cit_c]}{[Cit_c] + K_{t(Cit,CTP)}} + \\
&\quad +\frac{V_{t,CTP}[Mal_m]}{[Mal_m] + K_{t(Mal,CTP)}} - \frac{V_{t,CTP}[Mal_c]}{[Mal_c] + K_{t(Mal,CTP)}} \Big) \cdot \\
&\quad \cdot \frac{1}{\frac{[Cit]}{[Izo]} + 1} \cdot \frac{[Cit]}{[Izo]} \\
\frac{d}{dt}[Izo] &= \left( +\frac{V_{CS}[OA]}{[OA] + K_{M(OA,CS)}} - \frac{V_{IDH}[Izo]}{[Izo] + K_{M(Izo,IDH)}} - \right. \\
&\quad -\frac{V_{t,CTP}[Cit_m]}{[Cit_m] + K_{t(Cit,CTP)}} + \frac{V_{t,CTP}[Cit_c]}{[Cit_c] + K_{t(Cit,CTP)}} + \\
&\quad +\frac{V_{t,CTP}[Mal_m]}{[Mal_m] + K_{t(Mal,CTP)}} - \frac{V_{t,CTP}[Mal_c]}{[Mal_c] + K_{t(Mal,CTP)}} \Big) \cdot \frac{1}{\frac{[Cit]}{[Izo]} + 1}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt}[\alpha KG] &= +\frac{V_{IDH}[Izo]}{[Izo] + K_{M(Izo,IDH)}} - \frac{V_{\alpha KGDH}[\alpha KG]}{[\alpha KG] + K_{M(\alpha KG,\alpha KGDH)}} - \\
&\quad -\frac{V_{t,OGC}[\alpha KG_m]}{[\alpha KG_m] + K_{t(\alpha KG,OGC)}} + \frac{V_{t,OGC}[\alpha KG_c]}{[\alpha KG_c] + K_{t(\alpha KG,OGC)}} + \\
&\quad +\frac{V_{t,OGC}[Mal_m]}{[Mal_m] + K_{t(Mal,OGC)}} - \frac{V_{t,OGC}[Mal_c]}{[Mal_c] + K_{t(Mal,OGC)}} \\
\frac{d}{dt}[SzKoA] &= -\frac{V_{SUCLA}[SzKoA]}{[SzKoA] + K_{M(SzKoA,SUCLA)}} + \frac{V_{\alpha KGDH}[\alpha KG]}{[\alpha KG] + K_{M(\alpha KG,\alpha KGDH)}} \\
\frac{d}{dt}[Szukc] &= +\frac{V_{SUCLA}[SzKoA]}{[SzKoA] + K_{M(SzKoA,SUCLA)}} - \frac{V_{SDH}[Szukc]}{[Szukc] + K_{M(Szukc,SDH)}} \\
\frac{d}{dt}[Fum] &= \left( -\frac{V_{MDH}[Mal]}{[Mal] + K_{M(Mal,MDH)}} + \frac{V_{SDH}[Szukc]}{[Szukc] + K_{M(Szukc,SDH)}} + \right. \\
&\quad +\frac{V_{MDH}[OA]}{[OA] + K_{M(OA,MDH)}} - \frac{V_{t,CTP}[Mal_m]}{[Mal_m] + K_{t(Mal,CTP)}} + \\
&\quad +\frac{V_{t,CTP}[Mal_c]}{[Mal_c] + K_{t(Mal,CTP)}} + \frac{V_{t,CTP}[Cit_m]}{[Cit_m] + K_{t(Cit,CTP)}} - \\
&\quad -\frac{V_{t,CTP}[Cit_c]}{[Cit_c] + K_{t(Cit,CTP)}} - \frac{V_{t,DIC}[Mal_m]}{[Mal_m] + K_{t(Mal,DIC)}} + \\
&\quad +\frac{V_{t,DIC}[Mal_c]}{[Mal_c] + K_{t(Mal,DIC)}} + \frac{V_{t,DIC}[PO_{4,m}^{3-}]}{[PO_{4,m}^{3-}] + K_{t(PO_4^{3-},DIC)}} - \\
&\quad -\frac{V_{t,DIC}[PO_{4,c}^{3-}]}{[PO_{4,c}^{3-}] + K_{t(PO_4^{3-},DIC)}} - \frac{V_{t,OGC}[Mal_m]}{[Mal_m] + K_{t(Mal,OGC)}} + \\
&\quad +\frac{V_{t,OGC}[Mal_c]}{[Mal_c] + K_{t(Mal,OGC)}} + \frac{V_{t,OGC}[\alpha KG_m]}{[\alpha KG_m] + K_{t(\alpha KG,OGC)}} - \\
&\quad \left. -\frac{V_{t,OGC}[\alpha KG_c]}{[\alpha KG_c] + K_{t(\alpha KG,OGC)}} \right) \cdot \frac{1}{\frac{[Mal]}{[Fum]} + 1}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt}[Mal] = & \left( -\frac{V_{MDH}[Mal]}{[Mal] + K_{M(Mal,MDH)}} + \frac{V_{SDH}[Szukc]}{[Szukc] + K_{M(Szukc,SDH)}} + \right. \\
& + \frac{V_{MDH}[OA]}{[OA] + K_{M(OA,MDH)}} - \frac{V_{t,CTP}[Mal_m]}{[Mal_m] + K_{t(Mal,CTP)}} + \\
& + \frac{V_{t,CTP}[Mal_c]}{[Mal_c] + K_{t(Mal,CTP)}} + \frac{V_{t,CTP}[Cit_m]}{[Cit_m] + K_{t(Cit,CTP)}} - \\
& - \frac{V_{t,CTP}[Cit_c]}{[Cit_c] + K_{t(Cit,CTP)}} - \frac{V_{t,DIC}[Mal_m]}{[Mal_m] + K_{t(Mal,DIC)}} + \\
& + \frac{V_{t,DIC}[Mal_c]}{[Mal_c] + K_{t(Mal,DIC)}} + \frac{V_{t,DIC}[PO_{4,m}^{3-}]}{[PO_{4,m}^{3-}] + K_{t(PO_4^{3-},DIC)}} - \\
& - \frac{V_{t,DIC}[PO_{4,c}^{3-}]}{[PO_{4,c}^{3-}] + K_{t(PO_4^{3-},DIC)}} - \frac{V_{t,OGC}[Mal_m]}{[Mal_m] + K_{t(Mal,OGC)}} + \\
& + \frac{V_{t,OGC}[Mal_c]}{[Mal_c] + K_{t(Mal,OGC)}} + \frac{V_{t,OGC}[\alpha KG_m]}{[\alpha KG_m] + K_{t(\alpha KG,OGC)}} - \\
& - \frac{V_{t,OGC}[\alpha KG_c]}{[\alpha KG_c] + K_{t(\alpha KG,OGC)}} \Big) \cdot \frac{1}{\frac{[Mal]}{[Fum]} + 1} \cdot \frac{[Mal]}{[Fum]} \\
\frac{d}{dt}[NADH] = & + \frac{V_{IDH}[Izo]}{[Izo] + K_{M(Izo,IDH)}} + \frac{V_{\alpha KGDH}[\alpha KG]}{[\alpha KG] + K_{M(\alpha KG,\alpha KGDH)}} + \\
& + \frac{V_{MDH}[Mal]}{[Mal] + K_{M(Mal,MDH)}} - \frac{V_{MDH}[OA]}{[OA] + K_{M(OA,MDH)}} \\
\frac{d}{dt}[FADH_2] = & + \frac{V_{SDH}[Szukc]}{[Szukc] + K_{M(Szukc,SDH)}} \\
\frac{d}{dt}[GTP] = & + \frac{V_{SUCLA}[SzKoA]}{[SzKoA] + K_{M(SzKoA,SUCLA)}} \\
\frac{d}{dt}[PO_4^{3-}] = & - \frac{V_{SUCLA}[SzKoA]}{[SzKoA] + K_{M(SzKoA,SUCLA)}} - \\
& - \frac{V_{t,DIC}[PO_{4,m}^{3-}]}{[PO_{4,m}^{3-}] + K_{t(Cit,DIC)}} + \frac{V_{t,DIC}[PO_{4,c}^{3-}]}{[PO_{4,c}^{3-}] + K_{t(Cit,DIC)}} + \\
& + \frac{V_{t,DIC}[Mal_m]}{[Mal_m] + K_{t(Mal,DIC)}} - \frac{V_{t,DIC}[Mal_c]}{[Mal_c] + K_{t(Mal,DIC)}}
\end{aligned}$$

## 4.4. További számított értékek

A differenciálegyenletek megoldását követően a P/O hányados kiszámítása következik. A folyamat során keletkezett NADH és  $\text{FADH}_2$  mennyiségéből kiszámítható a reakciók során fogyasztott  $\text{O}_2$ . Ennek mennyisége fele akkora, mint a redukáló ekvivalensek összege, mivel mindkét redukáló ekvivalens 2  $\text{H}^+$ -t szállít, az  $\text{O}_2$  molekula 2 O atomot tartalmaz, és a folyamat során víz keletkezik, amihez 2:1 arányban használódik föl a  $\text{H}^+$  és az oxigén atom. A felhasznált foszfát mennyisége egyenlő keletkezett ATP mennyiségével. Az irodalmi adatok alapján egy mól NADH molekula oxidációja során átlagosan 2,8 mól ATP, míg egy mól  $\text{FADH}_2$  molekula oxidációja során átlagosan 1,7 mól ATP keletkezik [34, 35]. Ezekből az értékekből tudjuk meghatározni a P/O hányadost a végső állapotban. Ami a citrát-körben keletkezett két redukáló ekvivalens arányáról ad információt.

$$\begin{aligned} [\text{O}_2] &= ([\text{NADH}] + [\text{FADH}_2])/2 \\ [\text{P}] &= [\text{NADH}] \cdot 2.8 + [\text{FADH}_2] \cdot 1.7 \\ (\text{P/O}) &= [\text{P}]/([\text{O}_2] \cdot 2) \end{aligned}$$

## 4.5. A differenciálegyenletek vektoros felírása

### 4.5.1. Általános felírás

A többkomponensű modelleknél ismertetett sztöchiometria mátrix, és a sebesség vektor segítségével felírható az általános egyenlet az egyes anyagok változására (ld. 2.3.2. alfejezet).  $X$  vektor tartalmazza az anyagok koncentrációit, tehát ennek deriváltja mutatja az egyes anyagok koncentrációjának megváltozását, amit a sztöchiometriai mátrix ( $S_{n \times k}$ ), és a reakciósebesség vektor ( $V_S$ ) szorzata eredményez.

$$\frac{d}{dt}X = S_{n \times k} \cdot V_S$$

### 4.5.2. A reakcióegyenletek felírása transzporterek nélkül

A citrát-körben lezajló változásokat a transzporterek nélkül felírva az alábbi egyenlet írja le. Az utolsó két oszlop egy reverzibilis reakciót ír le, tehát a sztöchiometriai arányok egymás ellentettjei lesznek.

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \\ X_5 \\ X_6 \\ X_7 \\ X_8 \\ X_9 \\ X_{10} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 1 \\ 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} V_{S_1} \\ V_{S_2} \\ V_{S_3} \\ V_{S_4} \\ V_{S_5} \\ V_{S_6} \\ V_{S_7} \end{pmatrix}$$

#### 4.5.3. A reakcióegyenletek felírása transzporterekkel

A modellben a transzportokat reverzibilis reakcióknak tekintjük, és ezért transzporterekkel bővítve a mátrix kiegészül hat oszloppal, mivel három transzporter szerepel 1-1 reverzibilis reakcióban.

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \\ X_5 \\ X_6 \\ X_7 \\ X_8 \\ X_9 \\ X_{10} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & -1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} V_{S_1} \\ V_{S_2} \\ V_{S_3} \\ V_{S_4} \\ V_{S_5} \\ V_{S_6} \\ V_{S_7} \\ V_{t_{ki},1} \\ V_{t_{be},1} \\ V_{t_{ki},2} \\ V_{t_{be},2} \\ V_{t_{ki},3} \\ V_{t_{be},3} \end{pmatrix}$$

A felállított modell leírja az egyes anyagok időbeli változását. Amennyiben sikerül megfelelő paraméterekkel kalibrálni a modellt, a szimuláció végén egy egyensúlyi állapotot kapunk, amely közel egyezik a fiziológias állapottal. Ennek megítéléséhez azonban különböző paraméterekkel történő szimulációkra, továbbá a modell biológiai analízisére van szükség.

## 5. fejezet

# A modell implementációja és szimulációs eredmények

### 5.1. A MATLAB környezet

Az előző fejezetben leírt matematikai modell szimulációjához MATLAB programot használunk. Ennek oka, hogy sokféle lehetőséget tartalmaz a differenciálegyenletek megoldásához, átlátható, könnyen kezelhető, egyszerűen lehet benne felhasználni felületet létrehozni, továbbá az eredmények megjelenítésére is alkalmas.

### 5.2. Differenciálegyenletek megoldása

A differenciálegyenletek megoldásához az ode45 függvényt használtuk. A függvény által létrehozott mátrix a szimulált mitokondriális koncentrációkat tartalmazza az egyes időpontokban. A differenciálegyenletekben szereplő paramétereket (enzimek és a transzporterek paramétereit), egy-egy mátrixból kéri be, amelyek előre meghatározottak. Az állapotváltozók (intra-, és extramitokondriális koncentrációk) a felhasználó által állíthatók a szimulálni kívánt helyzetnek megfelelően.

### 5.3. Keletkezett ATP és P/O számítása

A differenciálegyenletek megoldását követően a modellben leírt módon a program kiszámolja a folyamat során keletkezett NADH és  $\text{FADH}_2$  mennyiségéből, az ehhez szükséges fogyasztott  $\text{O}_2$  és a keletkezett ATP mennyiségét. Ezekből az értékekből pedig meghatározza a P/O hányadost.

### 5.4. Felhasználói felület

A felhasználó a szimuláció során meg tudja adni a kezdeti intra-, és extramitokondriális koncentrációkat, és az időintervallumot, amin a folyamatban szereplő anyagok koncentráció változását szeretné vizsgálni. A program ezt az időintervallumot fogja megjeleníteni az ábrán. Emellett kiírja a kiszámított koncentrációkat a záró időpontban, és az ehhez tartozó ATP termelést,  $\text{O}_2$  fogyasztást, és az ebből számított P/O hányadost.

### 5.5. Megjelenítés

A számolást követően a program az idő (perc) függvényében ábrázolja az egyes koncentrációk ( $\mu\text{M}$ ) alakulását, a kezdeti és záró időpont között, és ezt jeleníti meg az ábrán. Az egyes anyagok különböző színnel vannak jelölve:

Oxálacetát - piros

Citrát - sárga

Izocitrát - kék

$\alpha$ -ketoglutarát - zöld

Szukcinil-KoA - fekete

Szukcinát - cián

Fumarát - magenta

Malát - szürke

## 5.6. Szimulációs eredmények

### 5.6.1. Transzporterek bevezetése

Az első szimuláció során az enzimek működését vizsgáljuk, ezért csak az enzimek (ld. 3.1.2. alfejezet) által generált tagokat vettük figyelembe a differenciálegyenletek felírásakor. Kezdeti értékeknek a korábban feltüntetett irodalomból származó adatokat használjuk (5.1 ábra).

| Szubsztrátok: | Mitokondrium (uM): | Citoplazma (uM): | Végső állapot (uM): | Szín    |
|---------------|--------------------|------------------|---------------------|---------|
| AcKoA         | 42                 | 130              |                     |         |
| OA            | 5.7                | 30               | 2.1487              | piros   |
| Citrát        | 1250               | 230              | 1452.9787           | sárga   |
| Izocitrát     | 125                | 0                | 145.2979            | kék     |
| aKG           | 130                | 69               | 146.9441            | zöld    |
| Szukcinil-KoA | 38                 | 0                | 3.0134              | fekete  |
| Szukcinát     | 500                | 0                | 475.7229            | cián    |
| Fumarát       | 490                | 0                | 457.1471            | magenta |
| Malát         | 2156               | 1840             | 2011.4472           | szürke  |
| Aszptrát      | 1550               | 1540             |                     |         |
| Foszfát       | 8030               | 11530            |                     |         |

| A folyamat során keletkezik (uM): |          |
|-----------------------------------|----------|
| O <sub>2</sub> -fogyasztás:       | 157.9222 |
| ATP termelés:                     | 765.334  |
| P/O hányados:                     | 2.31     |

|                  |     |
|------------------|-----|
| Kezdeti időpont: | 0   |
| Záró időpont:    | 360 |

Számol

**5.1. ábra.** Enzimek működése, transzporterek nélkül

A számítás alapján a kezdeti értékekhez képest jelentős változás figyelhető meg néhány szubsztrát koncentrációjában (oxálacetát, citrát, szukcinil-KoA, malát). Ennek lehetséges magyarázata, hogy a szimuláció során egy izolált rendszerben vizsgáltuk a citrát-kör működését, és nem vettük figyelembe a mitokondrium és a külső környezet között létrejövő interakciókat. Ezért tapasztalhattuk, hogy a koncentrációk nem maradnak a fiziológiás értéken, hanem változik a koncentrációjuk.

Ezt követően az előző probléma megoldására kiegészítettük a differenciálegyenleteket három transzporter (ld. 3.4.1 alfejezet: CTP, DIC, OGC) által generált tagokkal, és ismételten lefuttattuk a szimulációt (5.2 ábra).

| Szubsztrátok: | Mitochondrium (uM): | Citoplazma (uM): | Végso állapot (uM): | Szín    |
|---------------|---------------------|------------------|---------------------|---------|
| AcKoA         | 42                  | 130              |                     |         |
| OA            | 5.7                 | 30               | 2.1888              | piros   |
| Citrát        | 1250                | 230              | 1300.7103           | sárga   |
| Izocitrát     | 125                 | 0                | 130.071             | kék     |
| aKG           | 130                 | 69               | 100.4266            | zöld    |
| Szukcinil-KoA | 38                  | 0                | 2.972               | fekete  |
| Szukcinát     | 500                 | 0                | 475.6574            | cián    |
| Fumarát       | 490                 | 0                | 496.7915            | magenta |
| Malát         | 2156                | 1840             | 2185.8824           | szürke  |
| Aszpatrát     | 1550                | 1540             |                     |         |
| Foszfát       | 8030                | 11530            |                     |         |

|                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| A folyamat során keletkezik (uM): |          |
| O <sub>2</sub> -fogyasztás:       | 158.3817 |
| ATP termelés:                     | 767.566  |
| P/O hányados:                     | 2.3106   |

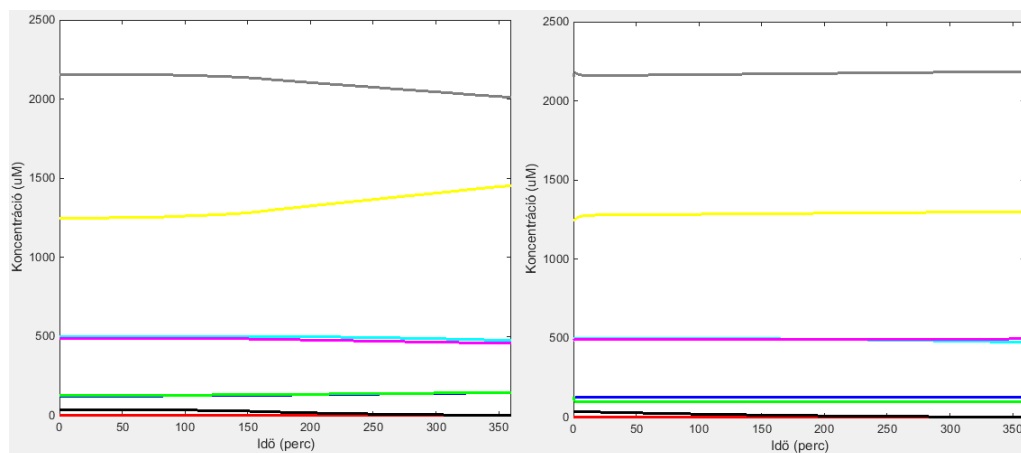
|                  |     |
|------------------|-----|
| Kezdeti időpont: | 0   |
| Záró időpont:    | 360 |

Számol

5.2. ábra. Enzimek és transzporterek közös működése

A végső értékeket tartalmazó táblázatokat és a két ábrát összehasonlítva az látható, hogy a transzporterek bevezetésével megszűnt a mitokondriumon belüli anyagcsere izolációja a környezettől (5.3 ábra). A kezdeti értékek változásának üteme lassabbá vált, és megfigyelhető, hogy adott idő alatt kevésbé tér el az eredeti (irodalomi fiziológias) állapottól. További transzporterek bevezetésével tovább növelhető a modell pontossága, mivel egyre jobban képesek integrálni a mitokondrium saját anyagcsere-rendszerét a környezetébe, ezért további transzporterek bevezetése is a szerepel a terveink között.



**5.3. ábra.** Működés transzporterek nélkül, és transzporterekkel

### 5.6.2. A modell alkalmazása iszkémiás állapot vizsgálatára

A második szimuláció során egy akut iszkémiás esetet vizsgáltunk, ami akkor jön létre, ha a szívben egy koszorúér elzáródik, és az elzáródást követő szakaszon megszűnik a vérellátás. Ilyen állapotban az egyes metabolitok koncentrációja jelentős mértékben megváltozik [49]. Az irodalmi adatok szerint iszkémiás állapotban a metabolitok aránya vese mitokondriumokban a normoxiás állapothoz képest: a citrát ötödére, az  $\alpha$ -ketoglutarát felére, fumarát és malát pedig harmadára csökken, emellett a szukcinát háromszorosára emelkedik. A kezdeti értékeket a fent leírt módon megváltoztatva vizsgáltuk a mitokondriumban lezajló változásokat (5.4 ábra).

Az eredményeket vizsgálva megfigyelhető, hogy az iszkémia lezajlását követően, az intermedierek koncentrációja elkezd közelíteni a fiziológiához, vagyis a rendszer ismét az eredeti fiziológiás szintet igyekszik elérni. Emellett megfigyelhető a P/O hányados csökkenése is, ami azt fejezi ki, hogy a NADH és a  $\text{FADH}_2$  oxidációjának aránya a  $\text{FADH}_2$  irányába tolódik el, ami arra utal, hogy a szukcinát fokozottan oxidálódik, mivel az oxidációjakor keletkező  $\text{FADH}_2$  aránya emelkedik meg. Ebből látható, hogy a módosult kezdeti állapotot a rendszer képes kompenzálni azáltal, hogy a különböző átalakulások arányát változtatja (5.5 ábra). Emellett megfigyelhető, hogy a jelenlegi paraméterek mellett is megközelítőleg egy hetes intervallumra tehető a mitokondriumban lévő koncentrációk arányának helyreállítása, ami élettani körülmények között is a legveszélyeztetettebb időszak egy infarktus lezajlását követően.

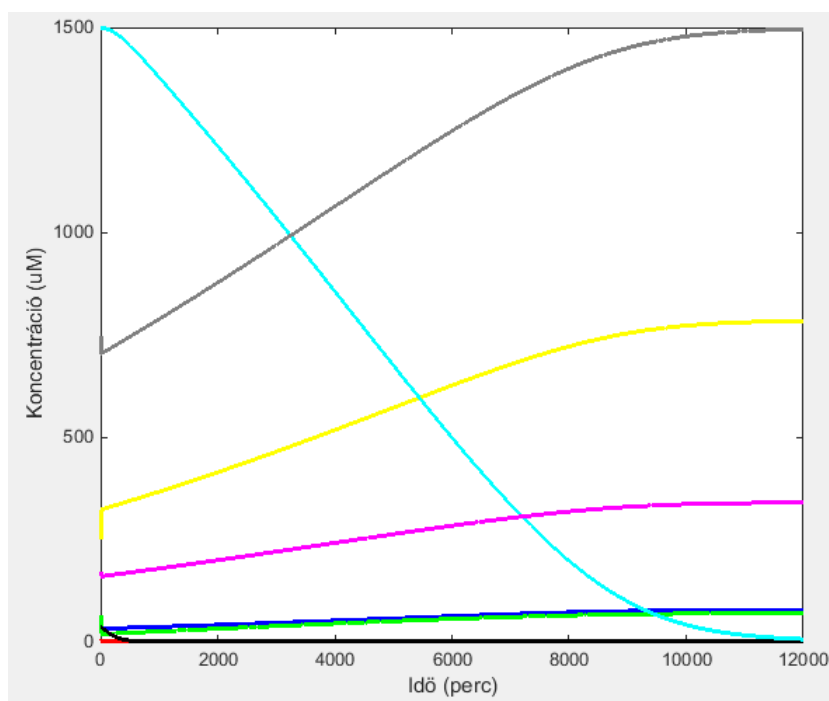
| Szubsztrátok: | Mitochondrium (uM): | Citoplazma (uM): | Végső állapot (uM): | Szín    |
|---------------|---------------------|------------------|---------------------|---------|
| AcKoA         | 42                  | 130              |                     |         |
| OA            | 5.7                 | 30               | 1.8559              | piros   |
| Citrát        | 340.9091            | 230              | 598.9329            | sárga   |
| Izocitrát     | 34.0909             | 0                | 59.8933             | kék     |
| aKG           | 65                  | 69               | 53.282              | zöld    |
| Szukcinil-KoA | 38                  | 0                | 0.12329             | fekete  |
| Szukcinát     | 1500                | 0                | 657.9579            | cián    |
| Fumarát       | 160                 | 0                | 273.2694            | magenta |
| Malát         | 704                 | 1840             | 1202.3854           | szürke  |
| Aszptrát      | 1550                | 1540             |                     |         |
| Foszfát       | 8030                | 11530            |                     |         |

A folyamat során keletkezik (uM):

O<sub>2</sub>-fogyasztás: 1716.4914  
 ATP termelés: 7740.4148  
 P/O hányados: 2.2425

Kezdeti időpont: 0  
 Záró időpont: 4320

5.4. ábra. Koncentrációk változása akut iszkémia után



5.5. ábra. Koncentrációk változása akut iszkémia után

## 6. fejezet

# Összefoglalás

### 6.1. A létrehozott modell

Jelen munka folyamán sikerült egy kvantitatív modellt létrehozni, amellyel a citrát-kör reakcióinak dinamikus működése vizsgálható. A matematikai modell szimulációja MATLAB környezetben valósult meg. A modell a reakciókat differenciálegyenletek segítségével modellezi, a reverzibilis reakciókat két elemi reakcióként, vagy egy pillanatszerűen kialakuló egyensúlyi állapotként értelmezi. A reakciók kinetikájának leírásához Michaelis-Menten enzimkinetikai modellt használ. Az irodalomban szereplő korábbi modellekkel ellentétben, ahol komoly egyszerűsítésekkel vagy a paraméterek arányokkal történő helyettesítésével ( $\frac{v}{v_{max}}$ ,  $\frac{[S]}{K_M}$ ) dolgoztak, a jelenlegi modell a reakciók során valós fiziológias paraméterekkel számol, melyek vagy az irodalomból, vagy az Orvosi Biokémiai Intézetben végzett saját mérésekből származnak. A modell validációja az irodalomban megtalálható fiziológias értékek használatával történt, és viselkedése kvalitatív értelemben megfelelő eredményt adott a citrát-köri szubsztrátok egyensúlyi koncentrációjára vonatkozóan. Egy másik, az eddigi irodalomban nem használt módon is teszteltük a modellt az iszkémiás kezdeti feltételek megadásával, és a modell ebben az esetben is a szubsztrátok egyensúlyi koncentrációihoz tartozó arányára állította vissza a koncentrációkat, tehát kvalitatív értelemben itt is jó eredményt kaptunk.

### 6.2. Szimulációs eredményeink értékelése

A szimulációkból látható, hogy a modell eredményei nagyságrendileg megfelelnek az elvárásoknak, azonban egyes anyagok esetén jelentős pontatlanságok figyelhetők meg. Ilyen a szukcinil-KoA, aminek koncentrációja a modellben jelentősen alacsonyabb az irodalmi értékhez képest. Ennek lehetséges

oka hogy nem vettük figyelembe a mitokondriumon belüli koenzim A készlet acetyl-KoA, szukcinil-KoA és a szabad koenzim megoszlását, és ennek koncentrációkra gyakorolt hatását. Másik jelentős eltérés az oxálacetát koncentrációban figyelhető meg, aminek lehetséges oka, hogy a citrát-kör négy szénatomos szakaszának szabályozása, és így az oxálacetát metabolizmusa is jelentős eltérést mutat a különböző szervek mitokondriumaiban. A harmadik koncentráció, amelyben jelentős különbség figyelhető meg, az  $\alpha$ -ketoglutarát. Ennek lehetséges magyarázata, hogy az  $\alpha$ -ketoglutarát fontos szerepet tölt be a sejtek aminosav anyagcseréjében ( $\alpha$ -ketoglutarát  $\leftrightarrow$  glutamát átalakulás). Az eltérő anyagcseréjű sejtekben lévő szubsztrát koncentrációk ezért különbözőek lehetnek, ami jelentős mértékben képes befolyásolni szubsztrátok közti egyensúlyt. Ezeknek az anyagoknak a metabolikus sajátosságait figyelembe véve és a későbbiekben a modellbe beépítve, pontosabb értékeket kaphatunk. Emellett a többi szubsztrát enzimeket és transzportereket befolyásoló hatását is érdemes beépíteni a modellbe. További paraméterek bevezetésével, ill. a paraméterek becslési eljárásokkal történő pontosításával a modell leíróképessége a jövőben várhatóan jelentősen javítható.

### 6.3. További tervek a modell bővítéséhez

Modellünket a későbbiekben szeretnénk kiegészíteni további transzporterekkel, melyek segítségével valósághűbb lenne a rendszer környezethez való illeszkedése, és ezzel közelebb kerülne a valós fiziológiás körülményekhez. Szeretnénk beépíteni a modellünkbe a különböző szubsztrátok enzimekre gyakorolt serkentő/gátló hatását ( $K_a$  és  $K_i$  bevezetése), és további anyagcsereutak figyelembe vételével a citrát-körön belüli reakciók dinamikáját is szeretnénk pontosítani. A mitokondriális enzimek  $K_M$  és  $V_{max}$  értékeinek azonos szervből és körülmények között történő mérésével lehetségessé válna az egyenletek paramétereinek a jelenleginél koherensebb beállítása is. Emellett szeretnénk szimulálni az egyes citrát-köri enzimek és mitokondriális transzporterek mutációja alatt kialakult megváltozott egyensúlyi állapotokat is. Ezt az enzimek és transzporterek paramétereinek megváltoztatásával szeretnénk megvalósítani. Ezeket a paramétereket az enzimmutációval rendelkező állatok mitokondriumainak vizsgálatával kaphatjuk meg.

# Irodalomjegyzék

- [1] Wu F, Yang F, Vinnakota KC, Beard DA  
*Computer modeling of mitochondrial tricarboxylic acid cycle, oxidative phosphorylation, metabolite transport, and electrophysiology*  
*The Journal of Biological Chemistry*, 2007 Aug 24; 282(34):24525-37.  
Epub 2007 Jun 25
  
- [2] Nazaret C, Heiske M, Thurley K, Mazat JP  
*Mitochondrial energetic metabolism: a simplified model of TCA cycle with ATP production*  
*The Journal of Theoretical Biology*, 2009 Jun 7; 258(3):455-64. Epub 2008 Oct 19
  
- [3] Korla K, Mitra CK  
*Modelling the Krebs cycle and oxidative phosphorylation*  
*Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, Volume 32, 2014;  
Pages 242-256
  
- [4] Korla K, Vadlakonda L, Mitra CK  
*Kinetic simulation of malate-aspartate and citrate-pyruvate shuttles in association with Krebs cycle*  
*Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2015; 33(11):2390-403. Epub 2015 Feb 11
  
- [5] Van der Giezen M  
*Mitochondria and the Rise of Eukaryotes*  
*BioScience*, 2011, 61(8):594-601

- [6] <http://www.ivyroses.com/Biology/Organelles/Function-of-Mitochondria.php> (2016.10.31.)
- [7] Cooper GM  
*The Cell: A Molecular Approach, 2nd edition*
- [8] <http://www.slideshare.net/ArbiaBareed/mitochondria-50806563>  
(2016.10.31.)
- [9] Lodish H, Berk A, Zipursky SL  
*Cellular Energetics: Glycolysis, Aerobic Oxidation, and Photosynthesis Molecular Cell Biology, 4th edition*
- [10] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L  
*Glycolysis Is an Energy-Conversion Pathway in Many Organisms Biochemistry, 5th edition*
- [11] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L  
*The Citric Acid Cycle Biochemistry, 5th edition*
- [12] [http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Citric\\_acid\\_cycle](http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Citric_acid_cycle)  
(2016.10.31.)
- [13] [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/97/TCA\\_reactions.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/97/TCA_reactions.png)  
(2016.10.31.)
- [14] Ricquier D, Bouillaud F  
*Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance*  
*The Journal of Physiology, 2000 Nov 15; 529(Pt 1):3-10*

- [15] Dunn JD, Alvarez LAJ, Zhang X, Soldatova T  
*Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis*  
*Redox Biology*, 2015 Dec; 6:472-485
- [16] West AP, Shadel GS, Ghosh S  
*Mitochondria in innate immune responses*  
*Nature Reviews Immunology*, 2011; 11:389-402
- [17] Bulua, Simon A, Maddipati R, Pelletier M, Park H, Kim KY, Sack MN, Kastner DL, Siegel RM  
*Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS)*  
*The Journal of Experimental Medicine*, 2011 Mar 14; 208(3):519-33
- [18] Bender, Martinou JC  
*Where killers meet-permeabilization of the outer mitochondrial membrane during apoptosis*  
*Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013 Jan 1; 5(1):a011106
- [19] Maryanovich, Gross A  
*A ROS rheostat for cell fate regulation*  
*Trends in Cell Biology*, 2013 Mar; 23(3):129-34
- [20] Chen, Azad MB, Gibson SB  
*Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy*  
*Cell Death and Differentiation*, 2009 Jul; 16(7):1040-52
- [21] Gurung P, Lukens JR, Kanneganti TD  
*Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome*  
*Trends in Molecular Medicine*, 2015 Mar; 21(3):193-201

- [22] Mills E, O'Neill LA  
*Succinate: a metabolic signal in inflammation*  
*Trends in Cell Biology*, 2014 May; 24(5):313-20
- [23] Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB  
*Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury*  
*Antioxidants and Redox Signaling*, 2014 Mar 1; 20(7):1126-67
- [24] Giorgi C, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, Marchi E, Marchi S, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Suski JM, Wieckowski MR, Pinton P  
*Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine*  
*Mitochondrion*, 2012 Jan; 12(1):77-85
- [25] Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, Mignotte B  
*The mitochondrial pathways of apoptosis*  
*Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2012; 942:157-83
- [26] Mignotte B, Vayssiere JL  
*Mitochondria and apoptosis*  
*European Journal of Biochemistry*, 1998 Feb 15; 252(1):1-15
- [27] Rodwell V, Bender D, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA  
*Harpers Illustrated Biochemistry*, 30th Edition
- [28] Ádám, Dux, Faragó, Fésűs, Machovich, Mandl, Sümegi  
*Orvosi Biokémia, Medicina kiadó, Budapest 2006*
- [29] Cornish-Bowden A  
*Fundamentals of Enzyme Kinetics*  
*Portland Press Ltd, 2004.*
- [30] Elődi P  
*Biokémia, Akadémia kiadó, Budapest 1980*

- [31] Pons LA, Schon EA  
*Mitochondria, second edition,*  
*Methods in Cell Biology Vol. 80.*
  
- [32] Lowenstein JM  
*Citric Acid Cycle,*  
*Methods in Enzymology, Vol. 13.*
  
- [33] <http://rle.cbi.pku.edu.cn/enzyme.cgi?id=RL00214> (2016.10.31.)
  
- [34] Beavis AD, Lehninger AL  
*The upper and lower limits of the mechanistic stoichiometry of*  
*mitochondrial oxidative phosphorylation*  
*Journal of Biochemistry, 158 (1986), pp. 315-322*
  
- [35] Hinkle PC  
*P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation*  
*Biochimica et Biophysica Acta. 2005 Jan 7; 1706(1-2):1-11.*
  
- [36] Palmieri F  
*The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties*  
*and physiopathology*  
*Molecular Aspects of Medicine 34 (2013) 465-484*
  
- [37] Palmieri F  
*Mitochondrial carrier proteins*  
*FEBS Letters, 1994 Jun 6; 346(1):48-54*
  
- [38] Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, Boright AP, Begum L, Lee JR,  
Yasuda T, Ikeda S, Hirano R, Terazono H, Crackower MA, Kondo I,  
Tsui LC, Scherer SW, Saheki T  
*The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a*  
*putative mitochondrial carrier protein*  
*Nature Genetics, 1999 Jun; 22(2):159-63*

- [39] Palmieri F  
*The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications*  
*European Journal of Physiology*, 2004 Feb; 447(5):689-709
- [40] Fiermonte G, Palmieri L, Todisco S, Agrimi G, Palmieri F, Walker JE  
*Identification of the mitochondrial glutamate transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms*  
*The Journal of Biological Chemistry*, 2002 May 31; 277(22):19289-94
- [41] Molinari F, Kaminska A, Fiermonte G, Boddaert N, Raas-Rothschild A, Plouin P, Palmieri L, Brunelle F, Palmieri F, Dulac O, Munnich A, Colleaux L  
*Mutations in the mitochondrial glutamate carrier SLC25A22 in neonatal epileptic encephalopathy with suppression bursts*  
*Clinical Genetics*, 2009 Aug; 76(2):188-94
- [42] Molinari F, Raas-Rothschild A, Rio M, Fiermonte G, Encha-Razavi F, Palmieri L, Palmieri F, Ben-Neriah Z, Kadhon N, Vekemans M, Attie-Bitach T, Munnich A, Rustin P, Colleaux L  
*Impaired mitochondrial glutamate transport in autosomal recessive neonatal myoclonic epilepsy*  
*American Journal of Human Genetics*, 2005 Feb; 76(2):334-9
- [43] Kaminsky YG, Kosenko EA, Kondrashova MN  
*Metabolites of citric acid cycle, carbohydrate and phosphorus metabolism, and related reactions, redox and phosphorylating states of hepatic tissue, liver mitochondria and cytosol of the pigeon, under normal feeding and natural nocturnal fasting conditions*  
*Comparative Biochemistry and Physiology*, 1982; 73(4):957-63
- [44] Hansford RG  
*The control of tricarboxylate-cycle of oxidations in blowfly flight muscle. The steady-state concentrations of coenzyme A, acetyl-coenzyme A and succinyl-coenzyme A in flight muscle and isolated mitochondria*  
*The Biochemical Journal*, 1974 Sep; 142(3):509-19

- [45] Hansford RG, Johnson RN  
*The steady state concentrations of coenzyme A-SH and coenzyme A thioester, citrate, and isocitrate during tricarboxylate cycle oxidations in rabbit heart mitochondria*  
*The Journal of Biological Chemistry*, 1975 Nov 10; 250(21):8361-75
  
- [46] Siess EA, Kientsch-Engel RI, Wieland OH  
*Concentration of free oxaloacetate in the mitochondrial compartment of isolated liver cells*  
*The Biochemical Journal*, 1984 Feb 15; 218(1):171-176
  
- [47] Peng L, Arauzo-Bravo MJ, Shimizu K  
*Metabolic flux analysis for a ppc mutant Escherichia coli based on <sup>13</sup>C-labelling experiments together with enzyme activity assays and intracellular metabolite measurements*  
*FEMS Microbiology Letters*, 2004 Jun 1; 235(1):17-23
  
- [48] Quagliariello E, Palmieri F  
*Control of succinate oxidation by succinate-uptake by rat-liver mitochondria*  
*European Journal of Biochemistry*, 1968 Mar; 4(1):20-7
  
- [49] Chouchani ET  
*Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS*  
*Nature*, 20 November 2014; 515, 431-435