



Dihidrolipoil-transzszukciniláz és dihidrolipoil-dehidrogenáz enzimek vizsgálata rágcslókon és humán sejtenyészeten

Kokas Márton, Dr. Sváb Gergely, Dr. Horváth Gergő, Dr. Tretter László
Biokémia Tanszék – Neurobiokémia Csoport
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Semmelweis Egyetem

Bevezetés:

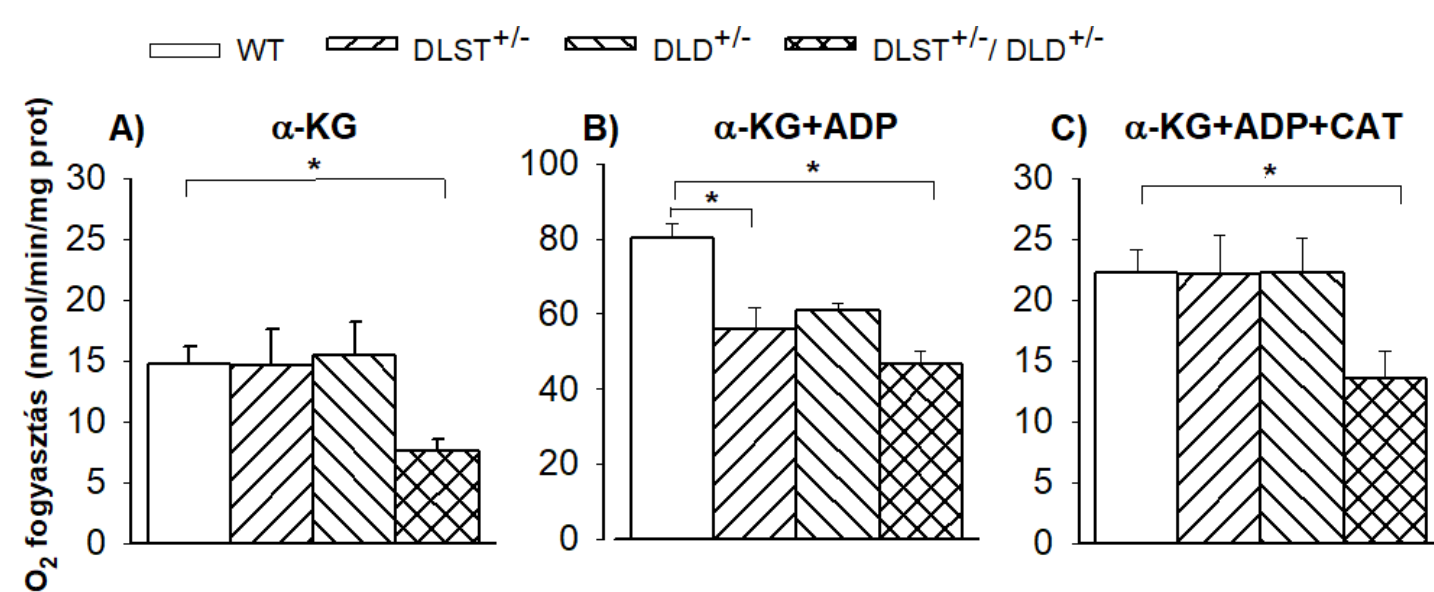
Az emlősök katabolikus folyamatainak központi szereplője a mitokondriális Krebs ciklus, amelybe különböző energiaforrásokból (fehérjék, szénhidrátok, lipidek) származó intermederek lépnek be. Az intermederek oxidációjuk során elektronokat adnak az elektrontranszport láncba (ETL) és ezzel párhuzamosan a mitokondriális komplexek protonokat pumpálnak a mátrixból az intermembrán térbe. A Krebs ciklus sebességhatározó lépése az α -ketoglutarát-dehidrogenáz komplex (α -KGDHc), ami egy dekarboxilációs lépés során α -ketoglutarátból (α KG) szukcinil-koenzim A-t állít elő, miközben NAD⁺ redukálódik NADH-vá egy CO₂ molekula keletkezése mellett. Az enzim három alegységből áll: 2-oxoglutarát-dehidrogenáz (OGDH, E1); dihidrolipoil-transzszukciniláz (DLST, E2); dihidrolipoil-dehidrogenáz (DLD, E3). Jelen kutatásunkban az α KGDHc E2 és E3 alegység heterozigóta formában történt kiütésének hatását vizsgáltuk a mitokondriális oxigénfogyasztásra és a reaktív oxigéngyök (ROS) termelésre különböző légzési szubsztrátok jelenlétében. Az α KGDHc alulműködését számos neurodegeneratív kórképben azonosították, így a mutáció következtében kialakuló bioenergetikai változások tanulmányozása nagy jelentőséggel bír a betegségek patomechanizmusának megismerésében.

Eszközök és Módszerek:

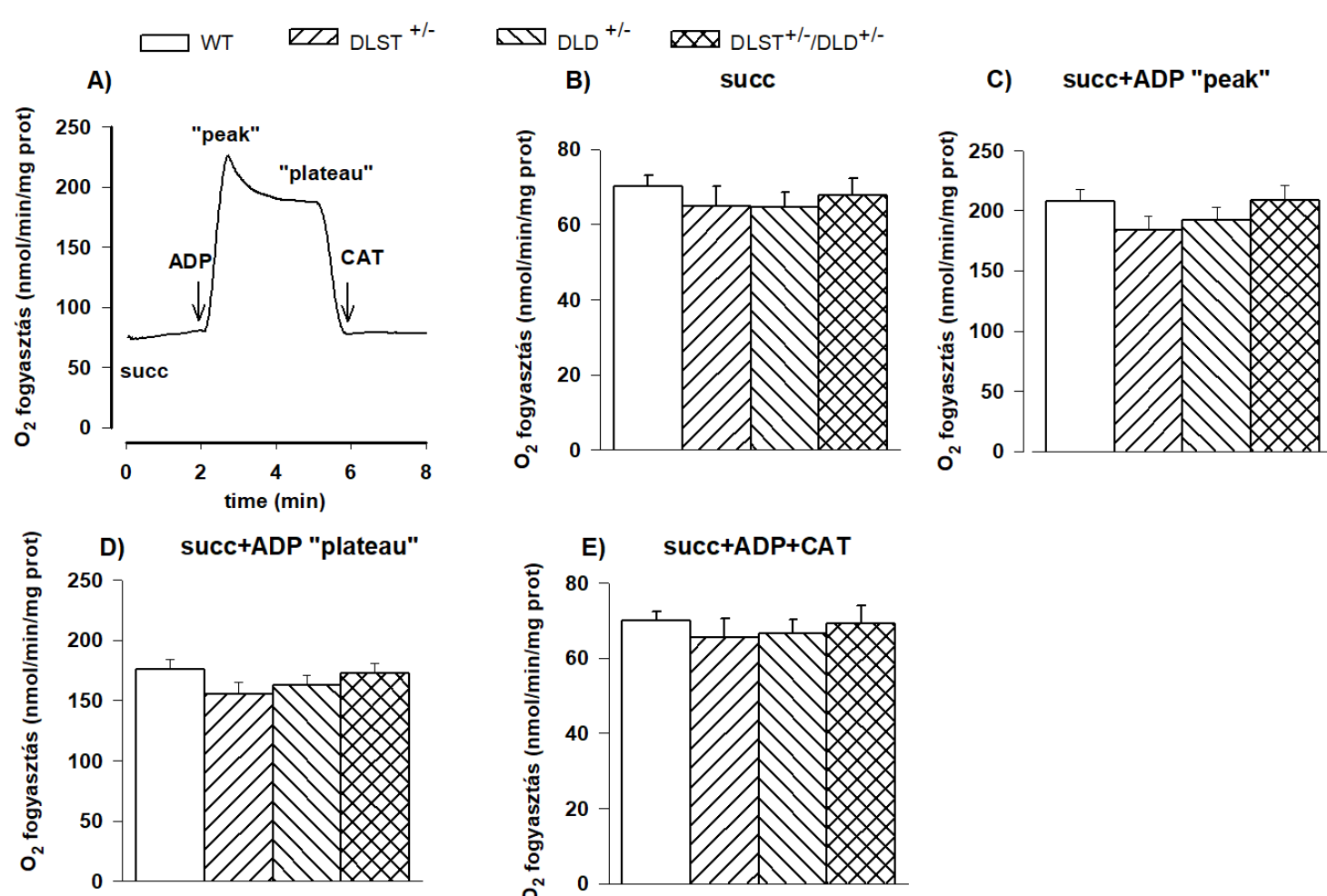
Kísérleteinkhez egér agyából izoláltunk mitokondriumot differenciál centrifugálással. Négyféle egér modellt használtunk: vad típusút (WT) kontrollnak; E2 heterozigóta KO-t (DLST^{+/-}); E3 heterozigóta KO-t (DLD^{+/-}); E2 és E3 kettős heterozigóta KO-t (DLST^{+/-}, DLD^{+/-}). Homozigóta KO genotípus mindkét gén (DLST és DLD) esetében letális. Az egereket, nemüktől függetlenül, három és hat hónap közötti életkorban voltak a terminálás időpontjában. Méréseinkben 0,1 mg/ml mitokondriális fehérjét használtunk.

A mitokondriális oxigénfogyasztást Clark-típusú polarográfiás oxigénelektóddal 37 °C-on 2 ml térfogatú kamrákban mértünk. H₂O₂ termelést torna peroxidáz (5 U/ 2 ml) és Amplex UltraRed segítségével fluoreszcensen detektáltuk (550/585 nm) 37 °C-on. Minden mérésben a fluoreszcens jelet ismert mennyiségű H₂O₂-valkalibráltuk.

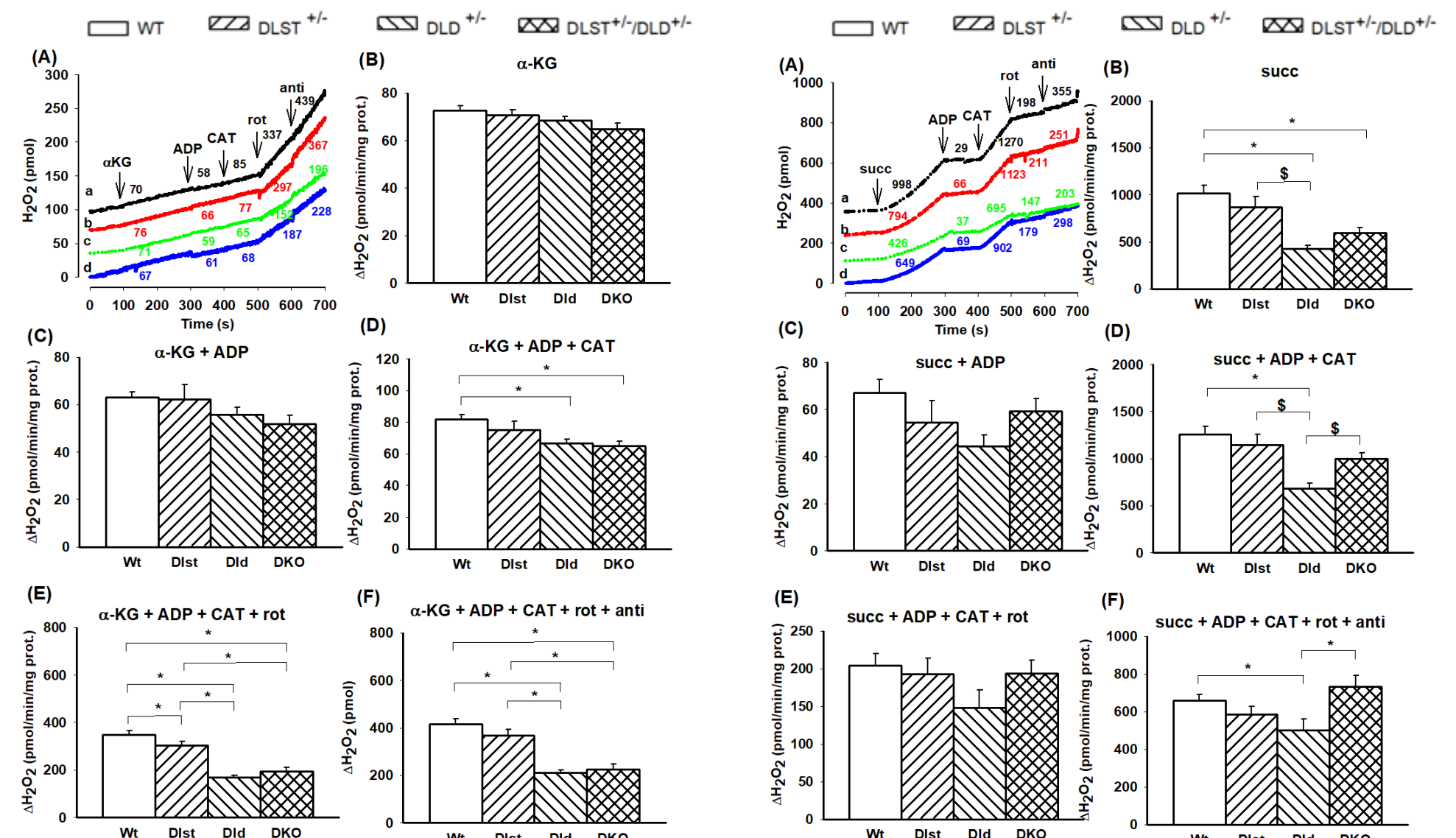
Emellett humán mutáns homozigóta (DLD^{-/-}) és gyermek kontroll (DLD^{+/+}) dermális fibroblast monolayer sejtenyészetet készítettünk. A foszfát-pufferben (PBS) szuszpendált sejtek ATP mennyiségét luciferin-luciferáz kemilumineszcens reakció segítségével vizsgáltuk, valamint α -KGDH enzimaktivitást NAD(P)H abszorbancia változásának detektálásával mértük 340 nm-en α -KG szubsztrát jelenlétében lizált sejteken.



1. ábra: Oxigénfogyasztás α -KG szubsztráttal energizált mitokondriumokban (A) szubsztrát, (B) ADP, (C) karboxi-atriktilát (CAT) adása után. α -KG (5 mM), ADP (2 mM), CAT (2 μ M); $n=4-16$. Szubsztrát jelenlétében a DLST^{+/-}, DLD^{+/-} csoport szignifikánsan csökkent értéket mutatott. ADP adására megnövekedett az oxigénfogyasztás, de a transzgenikus csoportokban szignifikánsan kisebb mértékben. ANT gátló CAT adására a mitokondriális légzés csökkent minden csoportban csökkent, de a DLST^{+/-}, DLD^{+/-} kettős heterozigóta csoportban szignifikánsan alacsonyabb értékre, mint a többi állat mitokondriumában.



2. ábra: Oxigénfogyasztás szukcináttal energizált mitokondriumokban (A) Egy mérés folyamatábrája, succ (5 mM), ADP (2 mM), CAT (2 μ M); O₂ fogyasztás mértéke különböző genotípusú állatokban (B) szubsztrát, (C, D) ADP, és (E) CAT adása után; $n=4-16$. Komplex I (CI) független szubsztrátot használva vizsgáljuk az O₂ fogyasztást transzgenikus állatokban. Szukcinát adására nincs különbség a respiráció mértékében. ADP hatására először nagymértékben felgyorsul a légzés, amit a görbén csúcsként (peak) láthatunk, majd csökken az oxigénfogyasztás (plateau). CAT hatására visszaesik a légzés.



3. ábra: α -KG szubsztráttal energizált mitokondriumok ROS termelése. (A) H₂O₂ termelés különböző egerekben. a: WT, b: DLST^{+/-}, c: DLD^{+/-}, d: DLST^{+/-}, DLD^{+/-}, α -KG (5 mM), ADP (2 mM), CAT (2 μ M), rot (250 nM), anti (1 μ M). A grafikonok a H₂O₂ termelést mutatják (B) α -KG, (C) ADP, (D) karboxi-atriktilát (CAT), (E) rotenon (rot), és (F) antimycin A (anti) hozzáadását követően; $n=4-14$. ADP adására mindegyik csoportban csökken a ROS termelés. ANT gátló CAT hatására szignifikáns csökken a DLD^{+/-} és DLST^{+/-}, DLD^{+/-} csoportokban a H₂O₂ termelés. Rotenone hatására jelentősen emelkedik a H₂O₂ termelés. de a KO egerekben szignifikánsan kisebb mértékben, mint a kontrol állatokban.

Következtetés:

Kezdetben az α -KG segítségével energizált mitokondriumok O₂ fogyasztása ADP nélkül nem különbözött jelentősen a DLST^{+/-} és DLD^{+/-} csoportokban a kontrollhoz képest, aminek oka lehet, hogy maradt még endogén szubsztrát az izolált mitokondriumokban. ADP hatására felgyorsult a szubsztrátok oxidációja, fokozódott az oxigénfogyasztás. Ebben az állapotban már mindhárom KO típusban szignifikánsan csökkent az oxigénfogyasztás. Ahogy az ADP hatását CAT hozzáadásával megszüntettük, a légzés mértéke visszaesett, de szignifikáns különbség a kontrollhoz képest csak a dupla KO állatcsoportban volt tapasztalható. Szukcináttal történő energizálás esetén a mitokondrium elsősorban FADH₂ oxidációjával termel energiát, ennek következtében az α KGDHc alegységeinek hiánya nem fog szignifikáns hatást kiváltani.

A mitokondriális ROS termelés jelentős mértékben hozzájárul a sejt szabadgyök termeléséhez. Számos kutatócsoport megfigyelte, hogy a mitokondriális mátrix dehidrogenázok képesek ROS képzésre emelkedett NADH/NAD⁺ arány mellett. Jelen kutatásunkban az α KGDHc E2 és E3 alegység heterozigóta formában történt kiütésének hatását vizsgáltuk. DLD KO egerekben csökkent a H₂O₂ termelést tapasztaltunk. α -KG-tal energizált mitokondriumban ADP adására csökkent a ROS képzés, aminek oka a membrán depolarizációja és a NADH/NAD⁺ arány csökkenése. CAT gátolta az ADP hatását, így a H₂O₂ termelés fokozódott. Rotenon hatására szignifikánsan kisebb jelet kapunk a különböző alegységek kiütése következtében, ami egyértelműen utal az E2 és E3 alegység ROS képzésben játszott szerepére. Antimycin A csak kevésbé emelte meg a ROS képzést, ami arra utal, hogy rotenonnal létrehozott gátlást követően az elektronoknak csak kis része jut el a CIII-ig, így kevesebb elektron fog kilépni az ETL-ből a CIII-nál. Szukcináttal való energizálás esetén ADP nélkül kifejezetten nagy volt a H₂O₂ termelés mértéke, aminek oka a RET. ADP adására csökken a RET, így a ROS termelés is, de sokkal nagyobb mértékben, mint az α -KG esetén, aminek az oka, hogy a RET érzékeny a $\Delta\Psi_m$ -ra. CAT adása itt is visszaállítja a H₂O₂ termelést az ADP adás előtti mértékre. Rotenon hatására megszűnik a RET, ami szukcinát jelenlétében a fő ROS forrás.

Támogatás:

AZ INNOVÁCIÓS ÉS TECHNOLÓGIAI MINISZTERIUM ÚNKP-21-2-I-SE_30 KÓDSZÁMÚ ÚJ NEMZETI KIVÁLÓSÁG PROGRAMJÁNAK A NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS ALAPBÓL FINANSZÍROZOTT SZAKMAI TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT.



KIEGÉSZÍTŐ KUTATÁSI KIVÁLÓSÁGI ÖSZTÖNDÍJ TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT (EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009).