

Az itakonát hatása a mitokondriális szubsztrátszintű foszforilációra

Doktori értekezés

Németh Beáta

Semmelweis Egyetem

Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Christos Chinopoulos
Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Szondy Zsuzsa
az MTA doktora, egyetemi tanár

Dr. Kardon Tamás
Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Mandl József
az MTA tagja, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sarkadi Balázs
az MTA tagja, kutatóprofesszor
Dr. Liliom Károly
Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest, 2017

BEVEZETÉS

Az itakonát egy telítetlen dikarbonsav. Ipari méretekben a *cisz*-akonitátból állítják elő az extramitokondriális *cisz*-akonitát dehidrogenáz segítségével, mely enzimet a *cad1* gén kódolja az *Aspergillus terreus*-ban, és mint monomer használják különböző termékek előállítására, beleértve a műanyagokat, festékeket és szintetikus szálakat. Az itakonátot az emlős szövetek metabolikus folyamatainak a vizsgálata során is azonosították, mint az aktivált makrofágokban, *Mycobacterium tuberculosis*-fertőzte tüdő sejtekben, vizelet és szérum mintákban, valamint glioblasztomában. Nemrég kimutatták, hogy a humán és eger makrofág sejtek lipopoliszacharid (LPS) indukálta aktiválás következtében itakonátot termelnek *cisz*-akonitátból az *Aspergillus terreus*-ban azonosított enzimhez hasonló aktivitású enzim által, melyet a *cisz*-akonitát dekarboxiláz 1 gén (*Acod1*) kódol (korábbi névén: immunoresponsive gén 1, *Irg1*). Az utóbbi évek felfedezései alátámasztották a korábbi adatokat mi szerint az itakonát jelen van a makrofág jellegű tumor sejtekben és a primer rágszáló makrofágokban millimólos nagyságrendben. Az *Acod1*-mediálta itakonát szintézis a makrofágok antimikrobiális hatásához járul hozzá azáltal, hogy gátolja az izocitrát liázt, a glioxilát ciklus kulcs enzimét. A glioxilát ciklus az állati eredetű sejtekben nincs jelen, ugyanakkor nélkülözhetetlen a baktériumok túléléséhez, amikor zsírsav vagy acetát szubsztráton növekednek, mint limitáló szénatom forrás.

Annak ellenére, hogy az itakonát és származékainak a felhasználása kiterjed a fogászati, szemészeti és gyógyszerészeti területekre, valamint a benzilammóniummal komplexálva vízben oldódó felületi anyagok gyártására használják az élelmiszeriparban a baktérium fertőzés csökkentésére, a táplálékláncba nem lép be detektálható mennyiségben. Ugyanakkor kimutatták, hogy jelentős mértékben metabolizálja a szervezet, amikor *per os* adták be macskáknak, kutyaáknak és rágcsálóknak.

Henry A. Lardy és munkatársai több, mint 50 évvel ezelőtt kimutatták, hogy az izolált mitokondriumhoz kívülről hozzáadott itakonát oxidálódik, hasonlóan, mint a citrátciklus legtöbb alkotóeleme. Az említett munkacsoport felfedezéseket tett az itakonát metabolizmusára vonatkozóan, mely a piruvát és az acetyl-CoA felé irányul. Ugyanakkor abban az időben a szukcinil-CoA-szintetáz (úgy hivatkoznak rá, mint „szukcinát-aktiváló enzim” vagy „P enzim”) és szerepe a szubsztrátszintű foszforilációban ismeretlen volt.

CÉLKITÚZÉSEK

Azt feltételeztük, hogy az itakonát bioenergetikai hatást fejt ki az adenin (vagy guanozin) nukleotidok képződésére a mitokondrium mátrixában található szukcinát-CoA-ligáz által.

A következőt tűztük ki célul:

- vizsgáljuk az LPS-indukálta itakonát képződés bioenergetiaki hatásait a *cis*-akonitát dekarboxiláz (Acod1) enzimre makrofágokban;
- vizsgáljuk a külsőleg hozzáadott itakonát koncentrációfüggő hatását izolált máj mitokondriumban, meghatározott metabolikus feltételek között, hogy ezáltal kiderítsük az itakonát szubsztrátszintű foszforilációra gyakorolt hatását.

MÓDSZEREK

Kísélreti állatok: Kísérleteink során C57Bl/6 egereket használtunk – mindkét nemű és 2-3 hónapos állatokat.

Mitochondrium izolálása: A cervikális diszlokációt követően, a májat gyorsan eltávolítottuk, felaprítottuk, majd mosást követően jéghideg pufferben homogenizáltuk. A mitochondriumokat az egerek májából differenciál centrifugálással izoláltuk. A protein koncentrációt fehérjekoncentráció meghatározási eljárással állapítottuk meg.

A májból izolált mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$) meghatározása: Az izolált mitokondriumok membránpotenciálját ($\Delta\Psi_m$) a safranin O segítségével határoztuk meg fulorometriás eljárással. A fluoreszcenciát a Hitachi F-7000 spektrofotométerrel detektáltuk 5 Hz-es felvételi frekvencián vagy 1 Hz frekvenciával az Oxygraph-2k műszeren. A méréseket 37°C-on végeztük.

Mitokondriális légzés: Az oxigénfogyasztást polarográfiásan, az OROBOROS Oxygraph-2k segítségével határoztuk meg. A kísérleteket 37°C-on végeztük. Az oxigénkoncentráció és fluxus rögzítésére, ill. kalkulációjára a DatLab szoftvert (Oroboros Instruments) használtuk.

Sejtkultúrák:

BMDM sejtek (csontvelői sejtekből differenciáltatott makrofágok) egérből származtak. A sejteket először minimális esszenciális

medium α -án tenyésztettük, mely kiegészítésként tartalmazott bovinszérum-albumint, L-glutamint, penicillin/sztreptomicint és makrofág kolónia stimuláló faktort (M-CSF). Két nap után a nemletapadt sejteket petricsészébe helyeztük az előbb említett médiumot használva, ugyanakkor az M-CSF, mint kondicionált medium a CMG14-12 sejtekből származott. A medium/citokinek cseréje kétnaponta történt.

TIPM sejteket (tioglikolát-indukálta peritoneális makrofágok) a peritoneális üreg mosásával nyertük ki C57BL/6 egerekből, melyeket 3 nappal korábban nátrium-tioglikoláttal kezeltünk. A sejteket hasonló módon raktuk ki és tenyésztettük, mint a BMDM sejteket.

RAW-264.7 sejteket a RPMI 1640 médiumban tenyésztettük, mely kiegészítésként tartalmazott L-glutamint, penicillint/sztreptomicint. A médiumot kétnaponta lecseréltük. A sejteket petricsészébe helyeztük a Western blot analízis céljából, vagy üveglemezre képkötői vizsgálatok céljából. A kirakást követően nyolc óra elteltével friss médiumot helyeztünk a sejtekre, mely médium tartalmazott vagy nem tartalmazott ultratisztaságú LPS-t, és a sejteket további tizenkét órán át tenyésztettük, mielőtt sor került volna a kísérletekre.

COS-7 sejteket DMEM médiumban tenyésztettük glutamin, FCS, és sztreptomicint-penicillin jelenlétében. A megfelelő konfluenciát elérve a sejteket tripszinizációs eljárás segítségével összegyűjtöttük és transzfektáltuk a gyártói előírásnak megfelelően.

Mitokondriális membránpotenciál mérések BMDM és RAW-264.7 sejtekben: A membránpotenciál méréséhez a sejteket TMRM-vel jelöltük és 34°C-on inkubáltuk. Miután a transzfektált sejteket beazonosítottuk, epifluoreszcenciás mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk – TMRM valamint a fluoreszcensen jelölt siRNS és scrambled siRNS (a nem specifikus targetált kontroll) esetében.

Képkalkotói eljárások: A képkalkotói eljárásokat az Image Analyst MKII (Novato, CA) segítségével végeztük. A mérések során a sejtek jelentős migrációja következtében, az első képsorozatok képezték a maximum intenzitást adott keretbe leképezve (pixelenként) és ezt követően a releváns tartományt a szoftver automatizált algoritmus határozta meg. A releváns tartományokat a későbbiek során az egyes sejtekhez rendeltük, és az egyes sejtekhez tartozó TMRM-intenzitást az idő függvényében ábrázoltuk.

Az *in situ* mitokondriális oxidációs és glikolitikus aktivitás mérése: A valós idejű oxigén fogyasztási rátát (OCR – a mitokondriális oxidációt tükrözi) és az extracelluláris savasodási arányt (ECAR – a glikolitikus aktivitást jelzi) az XF96 Analyzer mikrofluorométeren végeztük (Seahorse Bioscience, Nort Billerica, MA, USA). A sejteket 1-2 nappal a mérés előtt kiraktuk a Seahorse XF96 médiumba és ultratisztaságú LPS-vel lettek kezelve. A mérés előtt a médiumot lecseréltük az XF médiumra. Az oxigén nyomás és a pH értékeket detektáltuk és az OCR, ECAR értékeket az XF96 analízáló szoftver segítségével határoztuk meg. Az adatokat az össz

protein mennyiségre normalizáltuk, melyet a BCA protein meghatározási kit segítségével állapítottunk meg.

Western blot: A sejteket tripszinezési eljárással összegyűjtöttük, mostuk, majd proteáz gátlókat tartalmazó RIPA pufferben szolubilizáltuk és -80°C -ra fagyasztottuk. A minták fehérjekoncentrációját bicinchoninic sav módszerrel határoztuk meg, valamint a fragmentek szeparálását SDS-PAGE eljárással végeztük. Az immunoblottoláshoz a következő elsődleges antitesteket használtuk: nyúl poliklonális anti-Acod1, egér monoklonális anti-FLAG és egér monoklonális anti- β aktin. Az immunoreaktivitást a megfelelő peroxidáz-kapcsolt másodlagos antitessttel detektáltuk.

Fluorescein-jelölt siRNS és transzfekció: A RAW-264.7 sejteket transzfektáltuk siRNS-vel, mely rágcsáló Acod1-re specifikus vagy scrambled siRNS-re (a nem specifikus targetált kontroll), amit megelőzően az LPS kezelés. A transzfekciót megelőzően a sejteket kiraktuk a szokásos médiumba, mely antitesteket nem tartalmazott.

Acod1-FLAG plazmid transzfekció: A pCMV6-FLAG-Acod1 túlexpresszázó plazmidot RAW-264.7 vagy COS-7 sejtekbe transzfektáltuk Lipofectamine 2000 segítségével, majd 24-48 órán keresztül inkubáltuk.

Immunocitokémia: RAW-264.7 sejteket a pCMV6-FLAG-Acod1 túlexpresszázó plasmiddal transzfektáltuk OPTIMEM médiumban (antitestek nélküli redukált szérum médium). A fixálást megelőzően

a sejteket kezeltük Mitotracker Orange felhasználásával. A megfelelő immunocitokémiás eljárás érdekében a sejteket paraformaldehidben fixáltuk majd TX-100-ban permeabilizáltuk. A sejt kultúrákat 10%-os szarar szérummal kezeltük egy éjszakán át 4°C-on majd 1%-os szarar szérumban tartottuk ezt követően pedig anti-FLAG antitesttel jelöltük szobahőmérsékleten egy órán kersztük. A sejteket a továbbiakban Alexa 492 másodlagos antitesttel kezeltük majd imaging segítségével vizualizáltuk.

A SDH aktivitásának meghatározása: Az SDH (szukcinát dehidrogenáz) aktivitását az izolált máj mitokondriumban spektrofotometriás eljárással határoztuk meg.

EREDMÉNYEK

Kísérleteink során a lipopoliszacharid (LPS)-indukálta és megnövekedett itakonát koncentráció bioenergetikai hatásait vizsgáltuk csontvelői sejtekből differenciáltatott makrofágokban (BMDM) és RAW-264.7 sejtekben.

A rotenonnal kezelt és LPS-indukálta makrofág sejtekben a szubsztrátszintű foszforiláció meghiúsult az *in situ* mitokondriumokban, melyre az adeninnukleotid-transzporter fordított működéséből lehetett következtetni.

A RAW-264.7 sejtekben a szubsztrátszintű foszforiláció szintén meghiúsult az LPS-indukció hatására, ugyanakkor az Acod1 ellen készített rövid interferáló RNS (siRNS) kivédte ezt a hatást, ellenben a scrambled siRNS (a nem specifikus targetált kontroll) nem.

Különböző metabolikus körülmények között vizsgálva, a LPS koncentrációfüggően gátolta az oxigén felhasználást (61-91%) és megemelte a glikolízis arányát (>21%) a BMDM sejtekben, de a RAW-264.7 sejtekben nem.

A rotenonnal kezelt izolált egér mitokondriumban, az itakonát koncentrációfüggően (0,5-2 mM) megfordította az adeninnukleotid-transzporter működését, utalva a szubsztrátszintű foszforiláció hibás működésére; a hatást részben utánozta a malonát. Ugyanakkor a malonát jelentősebb mértékű ADP-indukálta depolarizációt idézett elő (3-19%), mint az itakonát.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az itakonát okozta szubsztrátszintű foszforiláció csökkenését a következő tényezőknek tulajdonítjuk:

1. „CoA” csapda itakonil-CoA formájában, mely negatívan befolyásolja a szukcinil-CoA termelést az α -ketoglutarát dehidrogenáz komplex által;
2. ATP (vagy GDP) deplíciónak, melyek nélkülözhetetlenek a szukcinil-CoA-szintetáz tioészterifikációjához;
3. a komplex-II gátlása, mely a szukcinát felhalmozódásához vezet és a szukcinát-CoA-ligáz egyensúlyát az ATP (vagy GTP) felhasználása felé tolja el.

Az eredményeink alátámasztják azt a megfigyelést, hogy az *Acod1* gént expresszáló makrofág sejtek elveszítik a mitokondriális szubsztrátszintű foszforilációs képességüket az immun folyamatok közben termelődő itakonát hatására.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Kiss G, Konrad C, Pour-Ghaz I, Mansour JJ, **Németh B**, Starkov AA, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. (2014) Mitochondrial diaphorases as NAD⁺ donors to segments of the citric acid cycle that support substrate-level phosphorylation yielding ATP during respiratory inhibition. *FASEB J* 28, 1 682-1697 IF: 5.043

Németh B, Doczi J, Csete D, Kacso G, Ravasz D, Adams D, Kiss G, Nagy AM, Horvath G, Tretter L, Mócsai A, Csépanyi-Kömi R, Iordanov I, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. (2016) Abolition of mitochondrial substrate-level phosphorylation by itaconic acid produced by LPS-induced Irg1 expression in cells of murine macrophage lineage. *FASEB J* 30, 286-300 IF: 5.299

Kacso, G, Ravasz D, Doczi J, **Németh B**, Madgar O, Saada A, Ilin P, Miller C, Ostergaard E, Iordanov I, Adams D, Vargedo Z, Araki M, Araki K, Nakahara M, Ito H, Gál A, Molnár MJ, Nagy Z, Patocs A, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. (2016) Two transgenic mouse models for β -subunit components of succinate-CoA ligase yielding pleiotropic metabolic alterations. *Biochem J* 15, 3463-3485

IF: 3.562

A disszertációtól független közlemények:

Hájos N, Pálhalmi J, Mann EO, **Németh B**, Paulsen O, Freund TF. (2004) Spike timing of distinct types of GABAergic interneuron during hippocampal gamma oscillations *in vitro*. *J Neurosci* 24, 9127-9137 IF: 7.907

Makara JK, Katona I, Nyiri G, **Németh B**, Ledent C, Watanabe M, de Vente J, Freund TF, Hajos N. (2007) Involvement of nitric oxide in depolarization-induced suppression of inhibition in hippocampal pyramidal cells during activation of cholinergic receptors. *J Neurosci* 27, 10211-10222 IF: 7.490

Haller J, Mátyás F, Soproni K, Varga B, Barsy B, **Németh B**, Mikics É, Freund TF, Hájos N. (2007) Correlated species differences in the effects of cannabinoid ligands on anxiety and on GABAergic and glutamatergic synaptic transmission. *Eur J Neurosci* 25, 2445-2456 IF: 3.673

Németh B, Ledent C, Freund TF, Hajos N. (2008) CB1 receptor-dependent and -independent inhibition of excitatory postsynaptic currents in the hippocampus by WIN 55,212-2. *Neuropharmacology* 54, 51-57 IF: 3.383

Holderith N, **Németh B**, Papp OI, Veres JM, Nagy GA, Hajos N. (2011) Cannabinoids attenuate hippocampal gamma oscillations by suppressing excitatory synaptic input onto CA3 pyramidal neurons

and fast spiking basket cells. *J Physiol* 589, 4921-4934

IF: 4.881

Cserep C, Szonyi A, Veres JM, **Nemeth B**, Szabadits E, de Vente J, Hajos N, Freund TF, Nyiri G. (2011) Nitric oxide signaling modulates synaptic transmission during early postnatal development. *Cereb Cortex* 21, 2065-2074

IF: 6.544

Peterfi Z, Urban GM, Papp OI, **Nemeth B**, Monyer H, Szabo G, Erdelyi F, Mackie K, Freund TF, Hajos N, Katona I. (2012) Endocannabinoid-mediated long-term depression of afferent excitatory synapses in hippocampal pyramidal cells and GABAergic interneurons. *J Neurosci* 32, 14448-14463

IF: 6.908

Hajos N, Holderith N, **Nemeth B**, Papp OI, Szabo GG, Zemankovics R, Freund TF, Haller J. (2012) The effects of an echinacea preparation on synaptic transmission and the firing properties of CA1 pyramidal cells in the hippocampus. *Phytother Res* 26, 354-362

IF: 2.068

Hajos N, Karlocai MR, **Nemeth B**, Ulbert I, Monyer H, Szabo G, Erdelyi F, Freund TF, Gulyas AI. (2013) Input-output features of anatomically identified CA3 neurons during hippocampal sharp wave/ripple oscillation *in vitro*. *J Neurosci* 33, 11677-11691

IF: 6.747