

# A mitokondriális szubsztrátszintű foszforilációt befolyásoló metabolikus utak

Doktori tézisek

**Dr. Ravasz Dóra**

Semmelweis Egyetem  
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Chinopoulos Christos  
Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Tárnok Krisztián  
Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Sóti Csaba  
az MTA doktora, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Enyedi Péter  
az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Káldi Krisztina  
Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Pázmándi Kitti Linda  
Ph.D., tudományos munkatárs

Budapest  
2018

# BEVEZETÉS

Normoxiában a mitokondriumok képesek a sejt számára ATP-t szintetizálni az oxidatív foszforiláció révén. Azonban anoxiában vagy a mitokondriális légzési lánc defektusa esetén az oxidatív foszforiláció általi energiatermelés meghiúsul. Ez esetben a mitokondriumok ATP-termelő organellekből ATP-fogyasztóvá válhatnak és a citoszol ATP-készletének csökkentése révén súlyosbíthatják az adott patológias állapot kimenetelét. A szukcinil-CoA-szintetáz enzim által katalizált mitokondriális szubsztrátszintű foszforiláció szerepe kritikus ennek kivédésében, ugyanis a reakció a légzési lánctól függetlenül képes magas energiájú foszfátok előállítására. Így amennyiben a szubsztrátszintű foszforiláció működőképes, a mitokondrium továbbra is képes ATP-t exportálni a mátrixból, a gátolt légzési lánc ellenére. A szukcinil-CoA-szintetáz által katalizált reverzibilis reakcióban szukcinil-CoA, ADP (vagy GDP) és  $P_i$  alakul át szukcináttá, ATP-vé (GTP-vé) és CoASH-vá. A reakció működését befolyásoló metabolikus utak meghatározóak lehetnek abból a szempontból, hogy az oxidatív foszforilációt érintő patológias állapot esetén ez a mentő

mechanizmus mennyire képes fenntartani a mitokondrium ATP-exportáló funkcióját.

Az egyik ilyen metabolikus út, mely hatással lehet a mitokondriális szubsztrátszintű foszforiláció működésére, a GABA átalakulása a GABA-shunt útján keresztül. A GABA egy neurotranszmitter, mely a mitokondrium mátrixába belépve szukcinát-szemialdehid (SSA) keresztül szukcináttá katabolizálódik, ez pedig a citromsav ciklusban oxidálódhat tovább. Szintén a GABA-shunt folyamatában degradálódik egy neurotranszmitter és pszichoaktív szer, a gamma-hidroxi-butyrát (GHB), ugyancsak szukcinát keletkezését eredményezve. Anoxiában a keletkező szukcinát további átalakulása a komplex-II által akadályozott, így a mátrix szukcinát koncentráció emelkedik és ez a szukcinil-CoA-szintetáz által katalizált reakciót ATP-fogyasztó irányba tolja el. Feltételezésünk szerint a GABA-shunt működése ily módon anoxiában gátolja a mitokondriális szubsztrátszintű foszforilációt, és ez ahhoz vezet, hogy a mitokondrium ATP-fogyasztóvá válik.

A szubsztrátszintű foszforilációhoz szükséges szukcinil-CoA ellátást az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz

enzimkomplex biztosítja, mely a működéséhez azonban oxidált  $\text{NAD}^+$ -ot igényel. Amennyiben a komplex-I gátolt, a mátrixban a NADH oxidációját mitokondriális diaforázok képesek katalizálni, megfelelő kinon szubsztrát redukciója mellett. A kinon vegyületről az elektronok a légzési láncre adódhatnak tovább. Munkacsoportunk korábbi kísérletei bizonyították, hogy az intramitokondriálisan rendelkezésre álló endogén kinonok lehetővé teszik a reakció végbemenetelét. A diaforáz enzimek azonban nem telítettek ezekkel a kinonokkal, és ha az intramitokondriális  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  arányt mesterségesen emeljük, exogén kinonok hozzáadása jelentősen fokozza a szubsztrátszintű foszforiláció működését. Kutatásunk második fő szakasza egy diaforáz enzim, illetve különböző kinonok mint potenciális diaforáz szubsztrátok NADH oxidációhoz és szubsztrátszintű foszforilációhoz való hozzájárulásának vizsgálatára irányult.

## CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk első felvetett kérdése, hogy mivel a GABA-shunt működése anoxiában szukcinát felhalmozódásához vezet, ez vajon a szukcinil-CoA-szintetáz által katalizált reakciót ATP-fogyasztó irányba tolja-e el. Hipotézisünk vizsgálatához a GABA, SSA és GHB izolált mitokondriumok bioenergetikai paramétereire és a mitokondriális szubsztrátszintű foszforilációra kifejtett hatását tanulmányoztuk.

A szubsztrátszintű foszforiláció működéséhez szükséges  $\text{NAD}^+$  ellátást a komplex-I gátoltsága esetén biztosító diaforáz enzim egyelőre nem azonosított. Munkánkban célként tűztük ki, hogy meghatározzuk egy diaforáz enzim, a  $\text{NAD(P)H}$ :kinon oxidoreduktáz 1 (Nqo1) hozzájárulását a  $\text{NADH}$  oxidációjához gátolt légzési lánc mellett.

További célunk volt öt kinon vegyületnek (menadion, mitokinin, durokinon, idebenon, 2-metoxi-1,4-naftokinon) mint lehetséges diaforáz szubsztrátnak a vizsgálata. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy ezek vajon támogatják-e a szubsztrátszintű foszforilációt  $\text{NAD}^+$  termelésén keresztül, illetve hogy az esetleges hatásukat az Nqo1 enzimen keresztül fejtik-e ki.

# MÓDSZEREK

## **Kísérleti állatok**

Kísérleteinkhez 2 és 6 hónapos kor közötti, 129Sv illetve C57Bl/6 háttérű vad típusú és Nqo1<sup>-/-</sup> egereket használtunk.

## **Mitokondrium izolálás**

Az egér agy és máj mitokondriumokat differenciál centrifugálással izoláltuk. Agy esetében a nem szinaptikus mitokondriumokat Percoll gradiensben frakcionálva nyertük ki. A minták fehérjekoncentrációját BCA (bicinkoninsavas) módszerrel határoztuk meg Tecan Infinite® 200 PRO series microplate olvasóban.

## **A membránpotenciál meghatározása izolált mitokondriumokban**

Az izolált mitokondriumok membránpotenciálját safranin O fluoreszcens festék segítségével detektáltuk, Hitachi F-7000 fluoreszcens spektrofotométerrel vagy Oroboros Oxygraph-2k műszerrel. A fluoreszcencia jelet egy feszültség-fényintenzitás kalibrációs görbe segítségével millivolttá alakítottuk. A méréseket 37 °C-on végeztük.

## **Mitokondriális oxigénfogyasztás meghatározása**

A mitokondriumok oxigénfogyasztását polarográfiás úton, a membránpotenciál mérésével párhuzamosan detektáltuk, Oroboros Oxygraph-2k Clark-elektrodhoz kapcsolt fluoriméterben. Az oxigénkoncentráció és fluxus rögzítésére a “DatLab” szoftvert használtuk. A méréseket 37 °C-on végeztük.

## **NADH autofluoreszcencia mérése**

A mitokondriális NADH autofluoreszcenciát Hitachi F-7000 fluoreszcens spektrofotométerben detektáltuk 37 °C-on. A fluoreszcencia intenzitás értékeket NADH titrálásával felvett kalibrációs görbe segítségével váltottuk át koncentráció egységbe.

## **Diaforáz aktivitás meghatározása**

A diaforáz aktivitást kétféle módszerrel detektáltuk a vad típusú illetve az Nqo1<sup>-/-</sup> egerek májából származó citoszol és mitokondriális frakciókban. A citoszol frakciót a máj homogenizátum ultracentrifugálásával nyertük. Az első mérési módszer NADH vagy NADPH elektrondonor mellett egy redox festék, a 2,6-diklórfenol-indofenol (DCPIP) redukciójának spektrofotometriás

mérésén alapul. A második módszer esetén a diaforáz enzimek NADH elektrondonor mellett kinonokat redukálnak, majd az elektronok a másodlagos elektron akceptorra, a citokróm c-re kerülnek, melynek redukciója spektrofotometriásan nyomon követhető. Mindkét módszer esetén megismételtük a kísérleteket egy diaforáz inhibitor, a dikumarol jelenlétében is. A méréseket 30 °C-on végeztük.

### **Sejttenyésztés**

A HepG2 sejteket 10% magzati borjú szérummal és antibiotikummal kiegészített Dulbecco's modified Eagle's médiumban (DMEM) tenyésztettük, 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett.

### **A membránpotenciál meghatározása permeabilizált HepG2 sejtek in situ mitokondriumaiban**

A sejteket digitoninnal permeabilizáltuk, majd a mitokondriális membránpotenciált safranin O fluoreszcens festék segítségével Tecan Infinite® 200 PRO series microplate olvasóban detektáltuk. A méréseket 37 °C-on végeztük.



## **A HepG2 sejtek transzfekciója**

A HepG2 sejteket a humán *NQO1*-re specifikus siRNS-sel és nem targetált kontroll siRNS-sel transzfektáltuk, lipofectamine 2000 segítségével. A szubsztrátszintű foszforiláció vizsgálatát 56 órával a transzfekció után végeztük, majd a sejteket azonnal lefagyasztottuk western blothoz.

## **Western blot**

A HepG2 sejteket RIPA pufferben, proteáz inhibitor koktéll jelenlétében,  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Jégen való felolvasztás után a minták fehérjekoncentrációját a BCA (bicinkoninsavas) módszerrel határoztuk meg. A fehérjéket SDS-PAGE gélelektroforézissel választottuk el, ezt követően metanol-aktivált polivinilidén-difluorid membránra transzferáltuk őket. Az immunoblottoláshoz poliklonális nyúl anti-NQO1 és monoklonális eger anti- $\beta$ -aktin elsődleges antitestet, illetve peroxidázhoz kötött másodlagos szamar antitestet használtunk. Az immunoreaktivitásokat kemilumineszcenciás előhívással tettük láthatóvá.

## **EREDMÉNYEK**

### **A GABA, a szukcinát-szemialdehid és a $\gamma$ -hidroxibutirát metabolizmusa a GABA-shunt útján keresztül gátolja a mitokondriális szubsztrátszintű foszforilációt**

Annak felderítésére, hogy a GABA, a SSA és a GHB szukcináttá való átalakulása gátolja-e a szubsztrátszintű foszforilációt, először azt kívántuk igazolni, hogy a három vegyület valóban metabolizálódik izolált egér agy és máj mitokondriumokban. GABA, SSA és GHB hozzáadására mind agy, mind máj mitokondriumokban membránpotenciál növekedés következett be, kivéve az agy mitokondriumokban GHB esetén. A három vizsgált vegyület közül a SSA bizonyult a leghatékonyabb mitokondriális szubsztrátnak, a hozzáadása után kialakult a maximális membránpotenciál, melyet csak az I-es és II-es komplex együttes gátlása akadályozott meg, a két komplex külön-külön való gátlása nem. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a SSA NADH és FADH<sub>2</sub> termelésen keresztül is képes proton motoros erő generálására. Az SSA hozzáadása után bekövetkező NADH fluoreszcencia emelkedést mérve azt tapasztaltuk, hogy egér máj

mitokondriumban az SSA körülbelül ötször gyorsabb NADH-termelést eredményez, mint egy mitokondriumok esetén.

A szubsztrátszintű foszforiláció lejátszódására az adenin nukleotid transzlokáz (ANT) működési irányából következtettünk. Amennyiben a légzési lánc gátolt, és a szubsztrátszintű foszforiláció működik, az ANT továbbra is ATP-t exportál a mitokondriumból. Ha azonban a szubsztrátszintű foszforiláció gátolt, az ANT megfordul és extramitokondriális ATP-t importál a mátrixba. Az ANT működési irányát gátolt légzési lánc esetén a transzporter egy gátlószere, karboxiatraktilozid hatására bekövetkező membránpotenciál-változásból tudjuk megállapítani. Anoxiában vizsgálva a szubsztrátszintű foszforilációt olyan szubsztrátkombinációk mellett, amelyek támogatják azt (glutamát és malát vagy alfa-ketoglutarát és malát), az ANT nem fordult meg, ATP-t exportált a mátrixból. Ha azonban a kísérleti médium GABA-t, SSA-t vagy GHB-t is tartalmazott, ez anoxiában az ANT megfordulását eredményezte, mely a szubsztrátszintű foszforiláció gátoltságára utal. Kivételek ez alól a GHB jelenlétében egy mitokondriumokon

végzett kísérleteink, ahol a GHB nem befolyásolta a szubsztrátszintű foszforilációt.

### **Az Nqo1 szerepe a szubsztrátszintű foszforiláció támogatásában endogén illetve exogén kinonok jelenlétében**

Az Nqo1 NAD<sup>+</sup>-ellátásban betöltött szerepének vizsgálatához vad típusú és Nqo1<sup>-/-</sup> egér májból származó mintákat hasonlítottunk össze. Amennyiben DCPIP elektron akceptor mellett vizsgáltuk a NADH-oxidáló aktivitást, ez a knockout minták citoszol frakciójában jelentősen kisebb volt, mint a vad típus esetén. A mitokondrium frakciót vizsgálva azonban nem volt szignifikáns különbség a két minta között. Menadiont, durokinont illetve 2-metoxi-1,4-naftokinont mint elsődleges elektron akceptort alkalmazva, a knockout egérből származó mitokondriális frakció kisebb diaforáz aktivitást mutatott, mely különbség MNQ esetén szignifikánsnak adódott. A mitokondriális légzést, illetve a szubsztrátszintű foszforilációt anoxiában vagy komplex-I gátlás mellett összehasonlítva a vad típusú és a knockout mintában, nem tapasztaltunk különbséget. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az Nqo1

nélkülözhető a szubsztrátszintű foszforiláció működéséhez gátolt légzési lánc mellett. Diaforáz inhibitorok jelenléte azonban gátolta a szubsztrátszintű foszforilációt a  $Nqo1^{-/-}$  mintában.

Vizsgáltuk, hogy az öt kinon vegyület képes-e a NADH-ról származó elektronokat átadni a légzési láncnak. A kinonok rotenonnal gátolt komplex-I mellett fokozták a mitokondriális légzést, és a vad típusú mintában membránpotenciál növekedést eredményeztek. Annak eldöntéséhez, hogy a kinonok támogatják-e a szubsztrátszintű foszforilációt NADH oxidáció révén, a mitokondriumokat egy olyan szubsztrátkombinációval energetizáltuk, ami az intramitokondriális NADH/NAD<sup>+</sup> arányt megemeli. Az öt kinon közül három: a durokinon, az idebenon és a 2-metoxi-1,4-naftokinon támogatta a szubsztrátszintű foszforilációt a vad típusú mintában rotenonnal gátolt légzési lánc mellett. Ezek közül a 2-metoxi-1,4-naftokinon csak a vad típusú mintában fejtette ki hatását, az  $Nqo1^{-/-}$  mitokondriumokban nem befolyásolta a szubsztrátszintű foszforilációt. A 2-metoxi-1,4-naftokinon hatása diaforáz inhibitorokkal felfüggeszthető volt. Anoxiában csak a durokinon tette lehetővé a szubsztrátszintű foszforiláció működését, és ez

a hatás mind a vad típusban, mind a knockout mintában érvényesült. Permeabilizált HepG2 sejteken - melyekben az NQO1 expressziója ismertén magas -, vizsgálva a durokinon, idebenon és 2-metoxi-1,4-naftokinon hatását, mindhárom kinon dikumarol-szenzitív módon támogatta a szubsztrátszintű foszforilációt. Annak igazolására, hogy a 2-metoxi-1,4-naftokinon az NQO1 enzim szubsztrátjaként járul hozzá az intramitokondriális ATP-termelés fenntartásához, megkíséreltük a HepG2 sejtekben az NQO1 expressziót specifikus siRNS-sel csendesíteni. A western blot analízis azonban a fehérje mennyiségének csak igen kismértékű csökkenését mutatta, ennek megfelelően a csendesített sejtek in situ mitokondriumaiban a 2-metoxi-1,4-naftokinon által kifejtett hatásban nem mutatkozott különbség a kontrollhoz képest.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteinkből megállapítottuk, hogy a GABA, a SSA és a GHB metabolizálódott izolált egér agy és máj mitokondriumokban, kivéve a GHB-t agy minta esetén. A három szubsztrát közül a SSA energetizálta a leghatékonyabban a mitokondriumokat, NADH és FADH<sub>2</sub> termelésén keresztül. Mindhárom vegyület átalakulása a GABA-shunt útján keresztül gátolta a szubsztrátszintű foszforilációt anoxiában.

Az Nqo1<sup>-/-</sup> mintákon végzett kísérletekből arra következtettünk, hogy az Nqo1 hozzájárulása a mitokondriális NADH oxidációhoz igen kismértékű, és az enzim jelenléte nem szükséges a szubsztrátszintű foszforiláció működéséhez gátolt légzési lánc mellett. A kísérleteink azonban más, egyelőre azonosítatlan dikumarol-szenzitív diaforázok szerepét igazolják. A vizsgált kinonok közül anoxiában csak a durokinon, rotenonnal gátolt légzési lánc mellett viszont a durokinonon kívül az idebenon és a 2-metoxi-1,4-naftokinon is hatékonyan támogatta a szubsztrátszintű foszforilációt. A 2-metoxi-1,4-naftokinon ezen hatását az Nqo1 enzimen keresztül fejtette ki.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

*Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények*

Nemeth B, Doczi J, Csete D, Kacso G, Ravasz D, Adams D, Kiss G, Nagy AM, Horvath G, Tretter L, Mocsai A, Csepanyi-Komi 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.: 5.498

Kacso G, Ravasz D, Doczi J, Nemeth 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, Gal A, Molnar MJ, Nagy Z, Patocs A, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. (2016) Two transgenic mouse models for beta-subunit components of succinate-CoA ligase yielding pleiotropic metabolic alterations. *Biochem J*, 473: 3463-3485.

IF.: 3.797



Ravasz D, Kacso G, Fodor V, Horvath K, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. (2017) Catabolism of GABA, succinic semialdehyde or gamma-hydroxybutyrate through the GABA shunt impair mitochondrial substrate-level phosphorylation. *Neurochem Int*, 109:41-53.

IF.: 3.603

Ravasz D, Kacso G, Fodor V, Horvath K, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. (2018) Reduction of 2-methoxy-1,4-naphthoquinone by mitochondrially-localized Nqo1 yielding NAD<sup>+</sup> supports substrate-level phosphorylation during respiratory inhibition. *Biochim Biophys Acta*, 1859: 909-924.

IF.: 4.280

*Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények*

Chen E, Kiebish MA, McDaniel J, Gao F, Narain NR, Sarangarajan R, Kacso G, Ravasz D, Seyfried TN, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. (2016) The total and mitochondrial lipidome of *Artemia franciscana* encysted embryos. *Biochim Biophys Acta*, 1861:1727-1735.

IF.: 5.547

Chen E, Kiebish MA, McDaniel J, Niedzwiecka K, Kucharczyk R, Ravasz D, Gao F, Narain NR, Sarangarajan R, Seyfried TN, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. (2018) Perturbation of the yeast mitochondrial lipidome and associated membrane proteins following heterologous expression of *Artemia*-ANT. *Sci Rep*, 8:5915.

IF.: 4.122