

Az elvégzett kutatómunkáról a munkaterv tematikája alapján számolunk be.

## **I. Elektron transzfer rendszer a plazmamembránban**

Ezen altéma keretében a fagocitáló sejtek plazma membránjában aktiválódó NADPH oxidáz enzim szabályozását, valamint a baktériumölésben betöltött szerepét vizsgáltuk.

### **I.1. A NADPH oxidáz enzim szabályozása**

Az enzim aktiválásában, valamint az elektron transzfer fenntartásában egyaránt kulestényező a Rac kis molekulású G-fehérje aktív, GTP-kötött alakjának jelenléte. A Rac által katalizált GTP hidrolízis sebességét a GTPáz aktiváló fehérjék (GAPok) serkentik, ezzel korlátozzák a NADPH oxidáz által termelt  $O_2^-$  mennyiségét. Eredményeink szerint granulocitákban mind a membrán, mind a citoszolikus frakció tartalmaz konstitutív aktivitással rendelkező GAP-okat, amelyek folyamatosan negatív hatást fejtenek ki a NADPH oxidáz enzimre. Ezen GAP-ok aktivitásának gátlása a  $O_2^-$ -termelés jelentős mértékű emelkedését eredményezi. A GAP-okra ható gátlószer, valamint eltérő GAP-aktivitású komponenseket tartalmazó *in vitro* aktiválási esszé segítségével negatív korrelációt mutattunk ki a GAP aktivitás valamint a  $O_2^-$ -termelés intenzitása között.

A kis G-fehérjék Rac/Rho családjára ható GAP-ok nagy méretű proteinek, amelyek a GTPáz aktiváló hatásért felelős, kritikus arginint tartalmazó doménon („GAP-domén”) kívül igen nagy számú és változatos egyéb doménnel rendelkeznek. Ezek a molekuláris részek számtalan más fehérjével ill. lipiddel való együttműködést, valamint szabályozó módosítást tesznek lehetővé. Minderről ma elég kevés ismeret áll rendelkezésre. Saját kutatásainkban két, korábbi ismereteink szerint granulocitákban előforduló Rac/RhoGAP szabályozását vizsgáltuk részletesen.

Az 50 kD-os GAP-ot sok helyen CDC42GAP-ként említik, de kísérleteink szerint a Cdc42 mellett mind a Rac, mind a Rho kis G-fehérjével szubsztrátként együttműködik, és serkenti azok endogén GTPáz aktivitását. *In vitro* GAP-esszében megállapítottuk, hogy a teljes hosszúságú p50GAP fehérje sokkal jobban reagál prenilált, mint nem-prenilált Rac-al és Rho-val. Ezt követően a p50GAP molekula különböző fragmenseit GST-fúziós fehérje formájában állítottuk elő, és vizsgáltuk

azok hatását prenil csoportot tartalmazó ill. nem tartalmazó kis-G fehérjékre. A molekula N-terminális 50 aminosavának eltávolítása után lényegesen javult a reaktivitás a nem-prenilált Rac-al és Rho-val, de csak a teljes, N-terminális domén (Sec14-homológia domén) hiányában vált azonossá a prenilált- és nem-prenilált G-fehérje felismerése.

A GAP-esszében nyert eredményeinket megerősítettük a NADPH oxidáz in vitro aktiválására alkalmas kísérleti rendszerben is, amelyben a GAP aktivitás növekedése a RacGTP mennyiség csökkenése következtében csökkent  $O_2^-$ -termelést eredményez. A p50GAP molekula különböző fragmenseivel kapott eredmények tökéletes egyezést mutattak az in vitro GAP-esszé eredményeivel.

Végül élesztő két-hibrid rendszerben vizsgáltuk a p50GAP fehérje különböző szakaszainak lehetséges interakcióját. Azt tapasztaltuk, hogy a molekula C-terminális végén levő GAP domén kötődik az N-terminális végén levő Sec14 homológia doménhez, és ezzel stabil interakció jöhet létre a molekulán belül.

Kísérleteink alapján felállított modellünk szerint a p50GAP fehérjén belüli interakciók alapállapotban gátolják a molekula GAP aktivitását (autoinhibíció). A szubsztrátként szereplő monomer G-fehérje prenil csoportja képes a gátlás feloldására. Kísérleteinkben először demonstráltuk egy, a Rac/Rho családra ható GAP molekula autoinhibitoros konformációját. Ez a jelenség korábban csak a monomér G-fehérjék célfehérjéi esetében volt ismert. Az eredményeket a *Journal of Biological Chemistry*-ben publikáltuk (Moskwa et al. 2005).

Eredményeink felkeltették Klaus Scheffzek munkacsoportjának (EMBL, Heidelberg) érdeklődését, akikkel együttműködésben próbálkozunk a p50GAP kristályosításával és a molekulaszervezet meghatározásával. Ezek a kísérletek még folyamatban vannak.

A p50GAP intracelluláris eloszlását lézer konfokális mikroszkópiával követtük. Megállapítottuk, hogy HeLa sejtekben a molekula a mag körüli endoszómákban dúsul, azonban nem mozog együtt a korábbiakban feltételezett szubsztrátjával, a Cdc42 G-fehérjével. Együttmozgást tapasztaltunk viszont a transzferrin valamint az EGF receptorokkal, és markáns kolokalizációt találtunk két, a membrán körforgás irányításában ismert szereppel bíró G-fehérjével, a Rab11 valamint Rab5 fehérjékkel. A p50GAP különböző fragmenseinek kifejezésével megállapítottuk, hogy a molekula jellegzetes intracelluláris eloszlásáért az N-terminális Sec14 homológia domén felelős, viszont a lokalizáció teljesen független a

GAP domén aktivitásától. Kísérleteinkkel először mutattunk ki funkcionális kapcsolatot a monomer G-fehérjék Rac/Rho valamint Rab családjai között.

A 190 kD tömegű GAP-ról korábbi munkánkban kimutattuk, hogy savanyú foszfolipidek befolyásolják a szubsztrát-specifitását: csökkentik a RhoGAP aktivitást és jelentősen fokozzák a RacGAP működést (Ligeti et al. 2004. J.Biol.Chem.279. 5055-5058.). Ezt a jelenséget mindkét homológ fehérje (p190A és p190B) is mutatta. Jelen kutatási periódusban ennek a szabályozásnak a molekuláris részleteit vizsgáltuk a p190A fehérje esetében.

Előállítottuk GST-fúziós fehérje formájában a p190A molekula különböző hosszúságú N-terminális, a GAP domén mellett változó méretű további aminosav szakaszokat tartalmazó fragmentumait. A p190A(1135-1499) valamint a p190A(1191-1499) fehérjék ugyanúgy viselkedtek, mint korábban a teljes hosszúságú p190A, azaz savanyú foszfolipideket tartalmazó vezikulák jelenlétében csökkent a RhoGAP és növekedett a RacGAP aktivitásuk. Hasonló eredményeket nyertünk, ha savanyú foszfolipidként foszfatidilszerint (PS) vagy foszfatidilinozitol (PI) vizsgáltunk. Ezzel szemben a p190A(1252-1499) fehérje GAP aktivitását egyáltalán nem befolyásolta foszfolipid jelenléte. A p190A molekula 1191 és 1252 aminosavak közötti szakasza feltűnően nagy számú (24-ből 13) bázikus aminosavat tartalmaz. Elkészítettük tehát azt a mutánst, amelyben ezt a polibázikus régiót kitöröltük ( $\Delta$ PBR deléciós mutáns). Korábbi eredményeinkkel összhangban ennek a fehérjének a GAP aktivitása sem változott PS vagy PI jelenlétében. Ezen kísérleteinkben tehát sikerült meghatározni a p190GAP szabályozásában lényeges szerepet játszó lipid-kötő régiót, ami a 1213 és 1236 aminosavak közötti polibázikus szakasznak felel meg.

Korábbi kísérletekből valószínűsítették, hogy a p190GAP protein kináz C-vel (PKC) foszforilálható. Összehasonlító méréseink szerint mind a p190A, mind a p190B leghatásosabban a PKC $\alpha$  izoenzimmel foszforilálható. A foszforilációs helyek meghatározásában a továbbiakban ezt az izoenzimet alkalmaztuk. Elsőként a lipid-kötő régió azonosításához előállított fúziós fehérjék foszforilációját vizsgáltuk, és megállapítottuk, hogy a p190A(1135-1499) és a p190A(1191-1499) fehérjék intenzíven foszforilálódnak, míg a p190A(1252-1499) valamint a p190A $\Delta$ PBR fehérjéken hasonló körülmények között egyáltalán nem következik be PKC-függő foszforiláció. Tehát a PKC által katalizált foszforiláció a PBR-ben történik. Ez a szakasz két szerint és egy treonint tartalmaz, amelyek a megfelelő adatbázisok alapján valószínűsíthető foszforilációs helyek. Előállítottuk mindhárom aminosav alanin-

mutánsát, de ezek az egyszeres mutánsok valamennyien mutattak foszforilációt. Ugyancsak tapasztaltunk radioaktív foszfát beépülést mindhárom lehetséges kettős-mutánson, míg a hármas-mutáns nem foszforilálódott. Ezekkel a kísérleteinkkel tehát meghatároztuk, hogy a p190A fehérje polibázikus szakaszában található mindhárom lehetséges PKC foszforilációs helyen valóban bekövetkezik a PKC $\alpha$  által katalizált foszforiláció.

A kis G-fehérjék és szabályozó fehérjék interakcióinak vizsgálatában megállapítottuk, hogy nemcsak a korábban részletesen tanulmányozott p50GAP reakciókészsége függ a kis G fehérje preniláltsági állapotától. Két további fehérje, a p190GAP valamint a Bcr esetében mutattuk ki, hogy a prenil csoportot tartalmazó Rac és Rho fehérjékkel lényegesen nagyobb a reakciókészség, mint nem módosított Rac-al és Rho-val.

A NADPH oxidáz enzimkomplexben részt vevő GAP azonosítása a korábban tervezett, alapvetően immunprecipitáción alapuló módszerrel nem hozott egyértelmű eredményeket, így más megközelítést kerestünk. Adatbázisokban találtunk egy eddig nem vizsgált GAP-ot, amelynek az előfordulása hemopoetikus sejtekre korlátozódik. Ezt, az ArhGAP25-nek nevezett fehérjét előállítottuk GST-fuzió formában, és megállapítottuk, hogy főként Rac-ot fogad el szubsztrátként, Rho-val és Cdc42-vel csak nagyon kevésbé reagál. Szubsztrát-specifitása alapján tehát várható lenne, hogy a NADPH oxidáz működésének valamint a sejtek alakváltozásának szabályozásában szerepeljen. Az ArhGAP25 molekula két különböző szakasza ellen készítettünk poliklonális ellenanyagot, de ezeknek a specifitása nem bizonyult kellően magasnak ahhoz, hogy a GAP molekula intracelluláris eloszlását és átfedését a NADPH oxidázzal biztonsággal megvizsgálhassuk. Jelenleg folyamatban van monoklonális ellenanyagok előállítása.

Az ArhGAP szerepét a granulociták működésében a molekula kifejeződésének változtatásával próbáljuk megközelíteni. Tenyészthető és granulocita irányba differenciálható sejtvonalban (PLB) sikerült előállítanunk olyan stabil klónokat, amelyekben az ArhGAP25 génjét csendesítettük, és a fehérje mennyisége a vad típusban tapasztalt mennyiség tört részére esett le. Ezen sejtekben vizsgáltuk a fluoreszcensen jelzett élesztő részecskék fagocitózist, amit enyhén, de 7 kísérletben konzekvensen emelkedettnek találtunk. Ezzel szemben ugyanezek a sejtek nem mutattak egyértelmű eltérést a forbol észterrel vagy kemotaktikus ágenssel stimulált  $O_2^-$ -termelésben.

## I.2. A ROS termelés részvétele a baktériumölésben

Az elmúlt években megkérdőjeleződött a  $O_2^-$  és a belőle keletkező ROS szerepe a fagociták baktériumölésében, helyette a NADPH oxidázon keresztül történő elektrontranszfert kísérő  $K^+$  mozgások kerültek előtérbe. Saját korábbi eredményeink (Rada et al. 2004, Blood 104. 2947-2953.) a két folyamat egymást kiegészítő funkciójára mutattak. Jelen kutatási periódusban tovább teszteltük a  $K^+$  mozgások jelentőségét, valamint vizsgáltuk a lehetséges résztvevő  $K^+$  csatornákat.

A  $O_2^-$  és származékainak kémiai hatását megpróbáltuk különválasztani a termelését kísérő elektrofiziológiai változásoktól.  $Zn^{2+}$  ionok az elektrogén  $H^+$  mozgások gátlásával növelik a depolarizációt és csökkentik a  $O_2^-$ -termelést. Ilyen körülmények között azonban a *S. aureus* túlélése egyáltalán nem növekedett a  $O_2^-$ -termelés csökkenésével, míg kontroll kísérleteinkben, ahol a  $O_2^-$ -termelést a NADPH oxidáz gátlásával csökkentettük, jelentős mértékű baktériumszaporulatot láttunk. Eredményeink felvetik, hogy a depolarizáció (és feltehetőleg a  $K^+$  mozgás) fokozódása részben kompenzálni képes a  $O_2^-$  és a ROS hiányát.

A  $K^+$  mozgások szerepét központba helyező munkacsoport mérései szerint a nagy konduktanciájú, kalciummal és depolarizációval aktiválható  $K^+$  csatornák (BK csatornák) gátlásával a granulociták baktériumölő képessége teljesen gátlható. Ezzel szemben saját kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az iberiotoxin (a BK csatorna gátlószere) nem befolyásolja a neutrofil granulociták baktériumölési képességét. Független elektrofiziológiai mérésekben igazoltuk, hogy az általunk használt gátlószer autentikus BK csatornákon hatásos. Kimutattuk, hogy a kísérleti eredmény független attól, hogy a közegben szérum jelen van-e vagy sem. Három további munkacsoporttal együttműködve bizonyítottuk, hogy a BK típusú csatornák nincsenek jelen és nem játszanak szerepet neutrofil granulociták baktériumölési aktivitásában.

A fagocitákban, a baktériumölés helyszínén uralkodó elektrolit-viszonyok kedvezőek lennének a két-pórusú  $K^+$  csatornák közül az alkalikus pH által indukált csatornák (pl. TASK2) működésére. Megvizsgáltuk ezért ezen csatorna-típusok kifejeződését granulocitákban valamint promielocitákon. A TASK2 fehérje mRNS-ét megtaláltuk mindkét sejttípusban. Kvantitatív real-time PCR kísérletekben viszont olyan alacsony volt az mRNS mennyisége, ami eddig nem tette lehetővé a részletesebb vizsgálatokat fehérje szinten akár immunoblot, akár patch clamp technikával.

A  $K^+$  mozgások jelentőségének megítélésére a baktériumölési folyamatban megpróbáltuk a  $K^+$  vándorlást részben a hajtóerő, részben a permeabilitás módosításával befolyásolni. Összehasonlítottuk *S. aureus* valamint *E. coli* túlélését fiziológiás, hyper- és hypokalaemiás oldatokban, de se humán, se egér PMN esetében nem találtunk semmilyen értékelhető különbséget. A  $K^+$  permeabilitás szelektíven fokozható valinomycin hozzáadásával. Kontroll kísérletben kimutattuk, hogy valinomycin hyperpolarizációt hoz létre, tehát valóban mérhetően fokozza a plazma membrán  $K^+$  permeabilitását nyugvó granulocitában. Az intenzív  $O_2^-$  -termelést kísérő depolarizációt viszont valinomycin jelenléte nem befolyásolta érdemlegesen. Ez az észlelésünk összhangban van azzal a korábbi megfigyeléssel, hogy valinomycin csak mérsékelten - mintegy kétszeresére - fokozza a  $K^+$  permeabilitást. A baktériumok túlélését vizsgálva nem tapasztaltunk különbséget valinomycin jelenlétében vagy hiányában, bár igen széles tartományban változtattuk a valinomycin koncentrációját. Eredményeink arra mutatnak, hogy teljes aktivitással működő NADPH oxidáz mellett a  $K^+$  mozgások fiziológiai jelentősége elhanyagolható.

### **I.3. A NADPH-oxidáz elektrofiziológiai jellemzése**

A fagocita NADPH-oxidázon végzett méréseinkben bizonyítani kívántuk, hogy erősen pozitív membránpotenciálon (~180 mV, citoplazma pozitív), megfelelő szuperoxid/ $O_2$  és NADPH/NADP<sup>+</sup> arány mellett (ti. amikor az elektron elektrokémiai gradiense a szuperoxid felől a NADP<sup>+</sup> irányába mutat) az elektronok képesek a normál oxidáz működés kapcsán megfigyelhető iránnyal ellentétesen mozogni. Bizonyítani kívántuk tehát, hogy a mitokondriális elektrontranszportláncához hasonlóan a NADPH-oxidázon keresztüli elektrontranszport sem tartalmaz irreverzibilis lépést. Az aktivált NADPH-oxidáz elektrontranszportját humán eozinofil granulocitákból kivágott inside-out patchben vizsgáltuk. A membrán külső oldalán a szuperoxid néhány mikroszekundumos félléletidejét az extracelluláris oldat lúgosításával (pH 7.1-ről 7.9-re) próbáltuk elérni. Eddigi méréseinkben ilyen körülmények között csak nagyon kis amplitúdójú elektronáram jött létre. További vizsgálatainkban a szuperoxid félléletidejének a jelentősebb növelését  $H_2O_2$  hozzáadásával próbáltuk növelni, aminek eredményeképpen többször a NADPH-függő (elektron) áram megfordulását tapasztaltuk (150 mV felett). Jelenleg vizsgáljuk, hogy a szuperoxid gyorsított kémiai dizmutációja a fenti jelenséget kivédi-e.

## **II. Elektron transzfer rendszer a mitokondriumban**

### **II.1. Reaktív oxigénszármazékok képződése a központi idegrendszer mitokondriumaiban**

A mitokondrium a reaktív oxigén származékok (ROS) intracelluláris termelésében meghatározó szerepet játszik. Minden mitokondrium, származzon az bármely szövetből, vagy bármely specieszből, képes ROS termelésre, tehát a ROS-termelés a mitokondrium jellemző tulajdonsága. A mitokondrium ROS képzésének alapvető szerepe van a humán patológiában, olyan fontos kórképek patogenezisében, mint az iszkémiás-reperfúziós károsodás, illetve a neurodegeneratív megbetegedések. A pályázatban megvalósult munkánk egyik célja az volt, hogy az agyszövetből izolált mitokondriumokon vizsgáljuk azokat a fiziológiás és patológiás körülményeket (membránpotenciál, permeabilitás tranzíciós pórus (mPTP), calcium jelenléte, stb), melyek a mitokondriális ROS-képzést befolyásolják, illetve vizsgáljuk, hogy a különböző mitokondriális légzési szubsztrátok jelenlétében hogyan változik a mitokondrium ROS termelő képessége. Vizsgálatainkban a különféle ROS-ok közül a hidrogén peroxid ( $H_2O_2$ ) felszabadulást vizsgáltuk, részben, mert a  $H_2O_2$  nagyon pontosan és érzékenyen határozható meg, részben pedig, mivel a  $H_2O_2$  szuperoxidból is keletkezik, így képződéséből a szuperoxid keletkezésére is következtethetünk.

#### ROS termelés az izolált agyi mitokondriumokban különböző légzési szubsztrátok jelenlétében.

Vizsgálataink első fázisában a megfelelő mitokondrium preparálási módszert választottuk ki kísérleteinkhez. Az egyik kritikus paraméter a légzési szubsztrát megválasztása, ugyanis a különböző légzési szubsztrátok különböző mechanizmusokkal képesek ROS képzést kiváltani, a másik kritikus paraméter pedig a mitokondrium preparálási módja. Az izolált mitokondriummal foglalkozó munkákban általában két általánosan elfogadott módszer valamelyikét használják a mitokondrium izolálására. Az egyik módszer digitoninnal roncsolja a koleszterintartalmú membránokat (a mitokondrium belső membránja nem tartalmaz koleszterint) és nyer funkcionáló, izolált mitokondriumot, míg a másikban a mitokondriumot

Percoll grádiensen tisztítják. A kétféle módszerrel preparált mitokondriumot hasonlítottuk össze a szukcináttal kiváltott mitokondriális ROS képzés szempontjából. A digitoninnal preparált mitokondriumok szukcináttal jelentős mértékű ROS képzést mutattak, mely ROS képzés a légzési lánc I-es komplexét gátló rotenonnal gátolható volt. Az eredmény arra utalt, hogy ezen körülmények között az elektronok a kettes komplex felől nemcsak előre a III-as és IV-es komplex felé, hanem visszafelé az I-es komplex felé is áramlanak (reverz elektron transzport (RET)), és ez az áramlás ROS képzéssel jár együtt. A Percoll grádiensen preparált mitokondriumok esetében a szukcináttal kiváltott ROS képzés jelentősen (kb 70 %-al) kisebb volt és a ROS-képzés rotenon jelenlétében fokozódott. Mivel a digitoninnal preparált mitokondrium izolációs médiumában általában jelen van a bovin szérum albumin (BSA), (hogy a digitonin hatására széteső membránokból felszabaduló zsírsavakat megkösse), ezért a továbbiakban vizsgáltuk a BSA szerepét, hatását a  $H_2O_2$  képződésre. A digitonin módszerrel preparált mitokondriumok jelentős mértékben polarizáltak voltak, membránpotenciáljuk ( $\Delta\Psi_m$ )  $185\pm 3.2$  mV volt, és a mérő médiumhoz adott BSA (0.025 %) a ROS képzést 50 %-kal fokozta. A Percoll grádiensen izolált mitokondriumok jóval depolarizáltabbak voltak ( $171\pm 2$  mV), és BSA hatására a  $\Delta\Psi_m$  kb. 11 mV-al emelkedett. A Percoll mitokondriumok ROS képzése, mely addig csak igen kismértékben függött a  $\Delta\Psi_m$ -tól, négyszeresére nőtt, membránpotenciál-függő lett és BSA jelenlétében az emelkedett ROS-képzés rotenonnal gátolható lett. Az eredmények mutatják, hogy a Percoll módszerrel izolált mitokondriumokban a reverz elektron transzport következtében ROS képzés csak akkor észlelhető, ha BSA is jelen van a médiumban. Kimutattuk tehát, hogy a BSA jelenléte, illetve hiánya meghatározhatja, hogy a ROS-képzés a szukcináttal lélegeztetett mitokondriumokban milyen mechanizmussal történik, azaz BSA jelenlétében reverz elektron transzport következtében főleg a komplex I-en, BSA nélkül a komplex III-on. Kimutattuk, hogy  $\Delta\Psi_m$  kb. 10 mV-tal történő csökkentése megszünteti a RET-et és a ROS képzés, ami ilyenkor csökkent, de kimutatható, nem függ már a  $\Delta\Psi_m$ -tól.

#### A NADH-függő szubsztrátok ROS-termelésének függése a $\Delta\Psi_m$ -tól

A NADH-függő szubsztrátok ROS-termelése hosszabb ideje élénk tudományos diskusszió tárgya volt. Abban minden vizsgáló egyetértett, hogy a terminális oxidációs lánc komplexeinek gátlásával NADH-t képző mitokondriális szubsztrátokat



használva jelentős mértékű ROS termelés érhető el. Abban a tekintetben azonban megoszlottak a vélemények, hogy gátlószerek nélkül, csak a szubsztrátok jelenlétében van-e egyáltalán kimutatható ROS termelés, és milyen tényezők befolyásolják ezt a ROS termelést. Vizsgálatainkban a NADH-t képző szubsztrátok (glutamát + malát) ROS képzésének függését a  $\Delta\Psi_m$ -től vizsgáltuk tengerimalacból izolált agymitokondriumokon. BSA nélküli médiumban a szétkapcsolószerral előidézett depolarizáció nem befolyásolta a ROS képzés intenzitását. BSA adása a médiumba hyperpolarizálta a mitokondriumokat átlagosan 169-ről 175 mV-ra, és növelte a ROS képzés intenzitását 207-ről 312 pmol/min/mg fehérjére. Az FCCP-vel történő depolarizáció csökkentette a ROS képzés intenzitását BSA jelenlétében is, de csak addig a szintig, mely megfelelt a BSA-nélküli médiumban észlelt ROS képzés intenzitásának. Rotenon stimulálta a ROS képződést mind BSA jelenlétében, mind pedig annak hiányában. Következtetésünk az, hogy a NADH-függő szubsztrátok esetén a ROS képzés csak erősen hiperpolarizált mitokondrium esetében mutat  $\Delta\Psi_m$ -függést, és még ebben az esetben is a  $H_2O_2$  képződés 70 %-a független a membránpotenciáltól. Ez a tulajdonság jól megkülönbözteti a NADH-függő szubsztrátok és a szukcinát ROS képzését, mivel a szukcinát szubsztráttal energetizált mitokondrium ROS képzése döntően  $\Delta\Psi_m$ -függő.

#### Az alfa-glicerofoszfát ( $\alpha$ -GP), mint légzési szubsztrát jelenlétében észlelhető ROS képzés jellegzetességei

Az „alfa-glicerofoszfát inga” a citoplazmában képződő redukáló ekvivalensek oxidálásának egyik fontos útja. Az „inga” mechanizmus esszenciális része a mitokondrium belső membrán külső felszínén lokalizálódó alfa-glicerofoszfát dehydrogenáz ( $\alpha$ -GPDH) enzim. A központi idegrendszer mitokondriumaiban az enzim nagy aktivitással van jelen. Az  $\alpha$ -GP által kiváltott agyi ROS képzés mechanizmusáról ellentmondó közlemények jelentek meg az irodalomban, de főként a komplex III-at, illetve a coenzim Q-t tették felelőssé az észlelhető  $H_2O_2$  és szuperoxid termelésért. Vizsgálatainkban az  $\alpha$ -GP-által kiváltott ROS képzést jellemeztük, és hasonlítottuk össze a szukcinát által kiváltottal. Az összehasonlítást az indokolta, hogy mind a szukcinát, mind pedig az  $\alpha$ -GP a terminális oxidációs láncban hasonló helyen, a komplex I és a komplex III között oxidálódnak, és elektronjaikat az ubikinonnak adják át. Az  $\alpha$ -GP szubsztráttal lélegeztetett mitokondrium

koncentrációfüggően emelkedő membránpotenciált, és  $H_2O_2$  képződést mutatott. A koncentrációfüggő ROS képzéshez NAD(P)H képződés is társult, ami a reverz elektron transzport jelenlétére utalt. A NAD(P)H képződés elmaradása és a  $H_2O_2$  képződés csökkenése rotenon, ADP, illetve szétkapcsolószert jelenlétében szintén a RET fontosságát húzták alá a ROS képzésben. Szétkapcsolószert jelenlétében a ROS képzés nagymértékben csökkent a RET elmaradása miatt, de a komplex III-t gátló myxothiazol adására az  $\alpha$ -GP-tal lélegeztetett mitokondrium ROS képzése jelentősen nőtt, míg a szukcináttal lélegeztetett esetben változatlan maradt. A ROS képzés helye ilyen körülmények között magán az  $\alpha$ -GPDH enzimben található. Hatalmas ROS termelés volt kiváltható az  $\alpha$ -GP-tal lélegeztetett mitokondriumokban a komplex III antimycinnel történő gátlásával (az antimycin gátlóhely és a myxothiazolos gátlás helye a komplex III-n belül különböző). Az antimycinnel kiváltott ROS képződés myxothiazollal gátolható volt, ami arra utalt, hogy az antimycinnel kiváltott ROS termelés főként a kinol oxidációs helyen történt. Munkánk fő konklúziója és újdonsága az, hogy az  $\alpha$ -GP metabolizmusa során a képződő  $H_2O_2$  döntően a komplex I-en képződik a RET következtében, de az  $\alpha$ -GPDH enzimben magán is történik ROS képződés. A komplex III szerepe az  $\alpha$ -GP-kiváltott ROS képzésben csak a komplex III antimycinnel történő gátlásakor, tehát nem-fiziológias körülmények között nyilvánul meg.

#### A kalcium hatása a mitokondriális ROS termelésre különböző szubsztrátok és kalcium koncentrációk esetén

A citoplazmatikus  $[Ca^{2+}]$  emelkedése fontos jelátvivő mechanizmus, mely a mitokondriumot is érinti. Ismert, hogy a citrát kör dehidrogenázai közül többek  $Ca^{2+}$  hatására aktiválódnak, így a  $Ca^{2+}$  szignálhoz fokozott mitokondriális energiatermelés rendelődik hozzá. A mitokondriális  $\alpha$ -GPDH enzim fiziológias koncentrációjú kalciummal aktiválható. A kalcium ROS-képzésre gyakorolt hatását mértük 100-250-500 nM  $[Ca^{2+}]$  jelenlétében, és a  $H_2O_2$  képzés szignifikáns növelését észleltük. A kalcium növelte a membránpotenciált, a mitokondrium oxigénfogyasztását és a NAD(P)H autofluoreszcenciát. Az  $\alpha$ -GPDH aktivitásának direkt mérése is megerősítette a kalcium stimuláló hatását, az enzim  $\alpha$ -GP-ra vonatkozó  $K_m$ -jének csökkentése által. Ha az I-es légzési komplexet rotenonnal gátoltuk, vagy a mitokondriumot ADP-vel depolarizáltuk, kevesebb  $H_2O_2$  keletkezett, de még így is a

calcium stimuláló hatása a ROS képzésre szignifikáns volt. Adataink azt mutatják, hogy  $\alpha$ -GP-tal energetizált mitokondriumokon az  $\alpha$ -GPDH kalcium általi stimulációja emelkedett ROS képzéshez vezet, részben a reverz elektron transzporton keresztül, részben pedig közvetlenül az enzimen megvalósuló ROS képzés útján.

A glutamát excitotoxicitásban az emelkedő citoplazmatikus  $[Ca^{2+}]$ -t és a mitokondrium  $Ca^{2+}$  felvételét jelentős ROS-képzés fokozódás kíséri. A ROS emelkedés eredetét azonban eddig nem sikerült tisztázni. Kísérleteinkben izolált tengerimalac agykérgi mitokondriumok  $Ca^{2+}$ -terhelést (1-100  $\mu$ M) követő  $H_2O_2$  termelését vizsgáltuk Amplex Red fluoreszcens festékkel glutamát és malát (G-M), illetve szukcinát szubsztrátok esetén. NADH függő szubsztrátok (G-M) alkalmazásakor a  $H_2O_2$  termelés 10  $\mu$ M  $[Ca^{2+}]$  jelenlétében 22 %-al csökkent, míg szukcináttal lélegeztetett mitokondriumokban a kalcium 86%-al csökkentette a ROS képződést adenin nukleotidok és a légzési lánc gátlószerei nélkül. A  $H_2O_2$  keletkezés mérésével párhuzamosan kalcium hatására csökkent NAD(P)H fluoreszcenciát, tartós depolarizációt, valamint csökkent fényszórást és calcein fluoreszcenciát detektáltunk, melyek jelezték a mitokondrium duzzadását és fokozott permeabilitását. A kalcium ezen hatásait ADP (2 mM) kivédte. ADP jelenlétében a mitokondrium  $H_2O_2$  termelése alacsonyabb volt, és a kalcium rövidtávon nem befolyásolta a ROS képzést. Feltételezzük, hogy a  $Ca^{2+}$  által okozott csökkent mitokondriális  $H_2O_2$  termelés oka a  $Ca^{2+}$  hatására bekövetkező depolarizáció, valamint a mPTP kinyílása miatti NADH veszteség.

## **II.2. Az „in situ” mitokondrium ROS termelése**

Az iszkémia-reperfúziós kórképekben alkalmazandó lehetséges neuroprotektív stratégiák között az utóbbi években felvetődött az „enyhe szétkapcsolás” teória. Izolált mitokondriumon történő vizsgálatok során, amint azt mi is a fentiekben kimutattuk, a ROS képzés jelentős membránpotenciál-függést mutathat, függően az alkalmazott légzési szubsztráttól. A teória szerint néhány millivolt csökkenés a membránpotenciálban neuroprotektív lehet a csökkent mitokondriális ROS-képzés miatt. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy „in situ” normális citoszolikus környezetben működő, glukóz-eredetű fiziológias szubsztrátokat oxidáló mitokondrium ROS képzése függ-e a mitokondrium  $\Delta\Psi_m$  változásaitól. A frissen preparált, glukóz-tartalmú médiumban inkubált izolált idegvégződések

(szinaptoszómák)  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelését mértük. A  $\Delta\Psi\text{m}$ -et szétkapcsolószerezrel csökkentettük, ami gyorsította az oxigénfogyasztást, csökkentette a NADH szintet és depolarizációt indukált, amit JC-1 fluoreszcens festékkel mértünk. Ezek a változások már a legkisebb FCCP koncentrációnál is megfigyelhetőek voltak, ugyanakkor a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -képzés minden alkalmazott szétkapcsolószerez koncentráció esetén változatlan maradt. A mitokondrium depolarizálására veratridint is használtunk, ami növeli az intracelluláris  $[\text{Na}^+]$ -t, így fokozott szinaptoszómális ATP termelést indukál. A fokozott oxigén fogyasztás és a veratridin okozta depolarizáció az „in situ” mitokondriumban nem járt együtt a ROS képzés változásával. Ezekből az eredményekből arra következtetünk, hogy az „in situ” mitokondriumok alap ROS képzését nem változtatja meg a membránpotenciál csökkentése, mely eredmény ellentétes a „mild uncoupling” teóriával, és arra utal, hogy „in situ” körülmények között a mitokondrium már olyan mértékben depolarizált, hogy a membránpotenciál további csökkentése nem befolyásolja a ROS-képzést. Eredményeink összhangban vannak az izolált mitokondriumokon nyert eredményekkel, mert a glukózból elsősorban NADH-t generáló szubsztrátok képződnek, melyek ROS képzése maximálisan hyperpolarizált mitokondriumok esetén is csak kb.30%-ban membránpotenciál-függő, és fiziológias depolarizáció (mint például ADP) hatására a potenciálfüggetlenség megszűnik.

### **II.3. A glutamát excitotoxicitással összefüggő bioenergetikai változások követése, új technikák kidolgozása**

#### A mitokondriális $\text{Ca}^{2+}$ szignál terjedése

A glutamát excitotoxikus hatása során a sejt kalcium koncentrációja jelentősen megemelkedik, és az emelkedett  $[\text{Ca}^{2+}]$  jelentős mitokondriális felvételt is indukál. A mitokondriális kalcium szignalizáció és a  $\Delta\Psi\text{m}$  időbeli és térbeli dinamikáját vizsgáltuk egyes mitokondriumokon (sejtenyészeten) konvencionális fluoreszcens mikroszkóppal, digitális képalkotó technikákkal. Először tettük láthatóvá a kalcium felvételt követő úgynevezett „hot spotokat” (intramitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$ -felvevő mikrokompartmenteket) és a kalcium diffúzióját a mitokondriumban belül. A jelenséget összehasonlítottuk ATP-vel stimulált intakt sejteken és magas  $[\text{Ca}^{2+}]$ -nak kitett permeabilizált, vagy ionofórral kezelt sejteken. Vizsgálataink azt mutatják, hogy

a kalcium laterális diffúzióval terjed a mitokondriumon belül, és a  $\text{Ca}^{2+}$ -felvétel a mitokondriális hálózatnak csak kis szegmensére terjed ki. Ezt a megfigyelést a diffúzió matematikai szimulációjával is megerősítettük. A mitokondriális  $\Delta\Psi_m$ -t TMRM fluoreszcens festékkel mértük. A TMRM fluoreszcenciája szinkron változott a mitokondriális hálózat kiterjedt részén, jelezve, hogy az intracelluláris mitokondriális hálózat elektromos szincíciumokat képez. Ezeknek a szincíciumoknak a kiterjedése 2-APB-vel (aminoethoxy-diphenyl borate), vagy propranolollal csökkenthető. Adatainkból arra következtethetünk, hogy a mitokondriumok szincíciumokat képeznek az elektromosság vezetésére, míg a kalcium diffúziója mitokondriumról mitokondriumra történik.

#### A mitokondriumok duzzadásának mérése

A glutamát excitotoxikus hatása együtt jár a mitokondriumok duzzadásával, a permeabilitás tranzíciós pórus (mPTP) megnyílásával. Az „in situ” mitokondriumok duzzadásának kvantitatív, élő sejten való mérésére mindeddig nem volt megfelelő módszer. Egy új, kvantitatív „in situ” egysejtes mérési módszert dolgoztunk ki, mellyel a mitokondriális duzzadás standard, vagy konfokális fluoreszcens mikroszkópon detektálható. Ez a morфомetrikus technika alkalmas a fluoreszcens proteinnel láthatóvá tett mitokondriumok relatív átmérőjének meghatározására. A sejtekről felvett fluoreszcens képeket felül- és alul- áteresztő filterekkel szűrtük. A mitokondriális duzzadást a felül- és az aluláteresztő szűrőkkel kapott kép fluoreszcencia intenzitásának aránya adja meg. Ezt az arányt „thinness ratio”-nak neveztük el. A filtereket az érzékenységhez igazított numerikus optimalizálással választottuk ki. A thinness ratio érzékeny volt a mitokondriális duzzadásra, de a mitokondriumok fúzióját és hasadását nem tudjuk vele követni. Méréseink azt mutatják, hogy az asztrociták mitokondriumai rövid ideig tartó szétkapcsolást, vagy az oxidatív foszforiláció gátlását követően megduzzadnak, míg tenyésztett kérgi neuronokban ez a jelenség nem figyelhető meg.

## **II.4. Vizsgálatok a vér-agy gát működésével kapcsolatban**

#### A tight junction struktúra mátrix-függése

A vér-agy gátnak (BBB) fontos szerepe van a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartásában. Munkacsoportunk hosszabb ideje foglalkozik a vér-agy-gát létrehozásában alapvető szerepet játszó endotél sejtek működésével. Az intakt endotélium barrier funkcióját úgynevezett szoros "tight" kapcsolatok (TJ), valamint az ezt segítő adherens kapcsolatok biztosítják. Ebben a munkánkban a TJ fehérjék közül a kladin-5, a ZO-1 (zonula ocludens), az adherens kapcsolatok fehérjéi közül a beta-katenin expresszióját vizsgáltuk patkány agyból izolált endotél sejteken. Kérdésünk: megmarad-e az intakt endotélre jellemző TJ struktúra, és thrombin receptor expresszió, ha a sejteket egy egyszerű, jól reprodukálható, de szintetikus matrixon (Matrigel) növesztjük az általánosan alkalmazott természetes, de nagy egyedi ingadozásokat mutató corneális endotél mátrix helyett. Az eredmények igazolták a Matrigel alkalmazhatóságát általános mátrixként, mind a TJ szerkezet, mind a thrombin receptor jelátvitel változatlan maradt.

#### A Na/H cserélők működése oxidatív stresszben

A vér-agy gát (BBB) alapvető fontosságú az agy ion és pH homeosztázisának fenntartásában is. A BBB modellezésére primer patkány agyi kapilláris sejteket (RBCE) választottunk, melyek a BBB-vel *in vivo* megegyező morfológiai és biokémiai tulajdonságokkal bírnak. Munkánk során ezen sejtek pH szabályozó mehanizmusát és a hidrogén peroxid indukálta oxidatív stresszre adott válaszát vizsgáltuk.

Az RBCE sejtekben  $\text{NH}_4\text{Cl}$  hatására jelentkező sejten belüli acidózis reverzibilis. A folyamatban elsődleges szerepet játszanak a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélők és a  $\text{Na}^+$ -függő  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  cserélők. Szerepüket a következő kísérletek igazolták: a pH visszatérése gyorsabb volt bikarbonát, mint HEPES médiumban; a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélők gátlása után az intracelluláris pH nem emelkedett az  $\text{NH}_4\text{Cl}$  adása előtti 6.83-6.9 értékre;  $\text{Na}^+$  mentes bikarbonát pufferben az intracelluláris pH változás irreverzibilis.

RT-PCR vizsgálattal igazoltuk a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélők NHE-1, NHE-2, NHE-3, NHE-4 izoformájának jelenlétét RBCE sejtekben. Az izoformák mennyisége között lényeges eltérés nem található, lokalizációjukra korábbi publikációk alapján következtethetünk.

A szabadgyökök közül a nagy fokban membránpermeábilis  $\text{H}_2\text{O}_2$  hatását vizsgáltuk. A  $\text{H}_2\text{O}_2$  önmagában nem befolyásolta a steady-state intracelluláris pH-t.

Ugyanakkor  $\text{NH}_4\text{Cl}$  adása után a  $\text{H}_2\text{O}_2$  gátolta az intracelluláris pH visszaállását feltehetően a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélők gátlásán keresztül.

## **II. 5. Az angiotenzin II posztreceptorális hatásmechanizmusa**

A mellékvesekéreg glomerulosa sejtek aldoszteron termelésének legfontosabb szabályozó hormonja az angiotenzin II, mely  $\text{AT}_1$ -receptorok aktiválásával hozza létre ezt a hatását. Az angiotenzin hatására fokozódó szteroid termelés fokozott szabadgyök képzéssel jár, ezért az angiotenzin II hatásmechanizmusának jobb megismerése közvetve hozzájárul a szabadgyök termelés szabályozásának megismeréséhez. Miután az  $\text{AT}_1$ -receptor működésének mechanizmusát olyan sejtekben kívántuk vizsgálni, melyek endogén módon is expresszálják a receptort, ezért problémát jelentett az általunk expresszált (mutáns, illetve eredeti), valamint az endogén  $\text{AT}_1$ -receptorok hatásainak elkülönítése. E probléma megoldására olyan  $\text{AT}_1$ -receptort hoztunk létre, mely nem köti az  $\text{AT}_1$ -receptor blokkoló candesartant, de egyéb működéseit tekintve megegyezik az eredeti receptorral. Számos mutáns  $\text{AT}_1$ -receptor vizsgálatát követően azt találtuk, hogy az S109Y mutációt tartalmazó receptor felel meg ezeknek a követelményeknek. Ez a receptor nem köt detektálható mértékben candesartant, de expressziós szintje, internalizációs kinetikája, inozitol-foszfát jel aktiváló képessége és  $\beta_2$ -arresztin kötése megegyezik az eredeti receptoréval. E receptort C9 sejtekben expresszáva igazoltuk, hogy ez a mutáns receptor azonos jelátviteli tulajdonságokkal rendelkezik az endogén receptorral, és az S109Y mutációt a G-fehérje aktiválásért felelős régió (Asp125 és Arg126) mutációjával kombinálva azt is kimutattuk, hogy C9 sejtekben létrejöhet angiotenzin II hatására G-fehérje aktiválástól független MAP-kináz aktiválódás.

A G-fehérjétől független mechanizmussal kialakuló ERK aktiválás kialakulásában alapvető szerepet tulajdonítanak az aktivált receptorokhoz kötődő beta-arresztin molekuláknak. A  $\beta_2$ -arresztin kötés vizsgálatát konfokális mikroszkóppal (GFP-vel megjelölt  $\beta_2$ -arresztin segítségével) és biolumineszcencia energia transzferen (BRET) alapuló módszerrel is elvégeztük. A BRET vizsgálat esetében renilla luciferázhoz kapcsolt  $\beta_2$ -arresztin molekulát és sárga fluoreszcens fehérjéhez (YFP) kapcsolt  $\text{AT}_1$ -receptort alkalmaztunk. Az angiotenzin II G-fehérjétől független jelátvitelének vizsgálatára szintén alkalmas a Sar1,Ile4,Ile8-angiotenzin II vegyület, mely nem képes G-fehérjét aktiválni, de serkenti a receptorok internalizációját és  $\beta_2$ -arresztin kötését. 6 óra angiotenzin II-stimulálás H295R

adrenokortikális sejtekben aldosteron-szintáz (CYP11B2) mRNA expressziót real-time PCR-rel kvantifikálva  $6,3 \pm 1,3$  - szorosára növelte. Ez a hatás nem jött létre, ha a sejteket Sar1, Ile4, Ile8-angiotenzin II-vel serkentettük, ami arra utal, hogy az angiotenzin II aldosteron-szintáz aktiválást kiváltó hatása G-fehérje mediált folyamat.

További vizsgálatainkban a receptorok jelátviteli heterotrimerikus G-fehérjékre kifejtett hatásának nyomon követésére alkalmas BRET módszert állítottunk be. Ennek érdekében létrehoztunk YFP-hez, illetve RL-hoz kapcsolt G-fehérje alegységeket, és megvizsgáltuk az AT1-receptor aktiválásának hatását e G-fehérje alegységek interakciójára. A mérés során azt használtuk ki, hogy a G-fehérje alfa, illetve béta-gamma alegységek között nyugalmi körülmények között BRET módszerrel kimutatható interakció a sejtek serkentésekor csökken, hiszen az aktivált G-fehérje alegységek szétválnak. Elsőként Renilla luciferázhoz kapcsolt  $\alpha_o$  fehérje ( $\alpha_o$ -RL) és fokozott fluoreszcenciájú YFP-vel jelölt  $\beta_1$  alegység (EYFP- $\beta_1$ ) interakcióját vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy ha ezeket a fehérjéket CHO sejtekben ko-expresszáljuk AT1-receptorral, akkor angiotenzin II hatását követően minimális mértékű BRET interakció változás mutatható csak ki angiotenzin II hatására. Ezzel szemben  $G_{o/i}$ -fehérjéhez kapcsolt kannabinoid CB1-receptort expresszáló CHO sejtekben agonista (WIN55,212-2) hatására jelentős BRET interakció csökkenés mérhető ki. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az AT1-receptor kevésbé aktiválja a  $G_o$ -fehérjét CHO sejtekben, mint a CB1-receptor. Kimutattuk, hogy ha az AT1 és a CB1 receptorokat ko-expresszáljuk a sejtekben, akkor angiotenzin II hatására is létrejön a G-fehérje aktiváció, mely hatás gátolható AT1 és CB1 receptor gátlókkal, valamint diacilglicerol-lipáz gátlóval, mely az egyik legfontosabb endokannabinoid vegyület, a 2-arachidonil-glicerol keletkezését gátolja. Ezek az adatok arra utalnak, hogy angiotenzin II hatására a sejtekben endokannabinoidok keletkeznek, melyek CB1 receptorokat képesek aktiválni.

Megvizsgáltuk, hogy H295R adrenokortikális sejtekben a transzaktiváció szerepet játszik-e az aldosteron-szintáz expressziójának szabályozásában, illetve a MAP-kináz ERK1/2 aktiválásában. Az AngII hatására létrejövő ERK1/2 aktivációt különféle protein kináz C $\delta$  gátlókkal meg tudjuk akadályozni. Az aldosteron-szintáz expresszióját a  $Ca^{2+}$ /kalmódulin-függő protein kináz II gátlószere gátolja. Ezek szerint az aldosteron-termelő sejtekben a proliferációt létrehozó AngII-indukált ERK-



aktiváció PKC $\delta$  enzimen keresztül történik, míg az aldosteron-szintáz expresszióját a hormon a Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin rendszeren keresztül fokozza. A  $\beta$ -arresztin aktiválást létrehozó ([Sar<sup>1</sup>,Sar<sup>4</sup>,Ile<sup>8</sup>]-angiotenzin II nem fokozza a szintáz expresszióját.

H295R sejten vizsgáltuk az angiotenzin hatását az aldosteron-szintáz gén és a Nurr1 transzkripciós faktort kódoló NR4A2 gén expressziójára. Ang II a CYP11B2 mRNS expressziót többszörösére növelte, amelyet a MEK- és CaMK inhibitor kezelés csaknem teljesen gátolt. A Nurr1 expressziója Ang II hatására nagyságrenddel nőtt, amelyet MEK - és CaMK inhibitor kezelés ugyancsak gátolt. Arra következtetünk, hogy az aldosteron-szintáz expressziójában a CaMK és a MEK-ERK útvonal együttesen játszik szerepet, ez utóbbi valószínűleg a Nurr1 korai transzkripciós faktor indukcióján keresztül is.

## **II. 6. Szabadgyökszint változások hatása a Ca<sup>2+</sup> jelképzésre glomerulóza sejtben**

Szteroid termelő sejtekben a mitokondriális elektron transzport mellett a mitokondriális szteroid hidroxiláció is szuperoxid képződéssel járhat. Többféle szteroid termelő sejt típuson összehasonlító vizsgálatokat kezdtünk a ROS hatásainak és szerepének tisztázására. UV fény hatására a patkány glomerulóza sejt mitokondriális NAD(P)H szintje monoexponenciális esést mutat. Exogén O<sub>2</sub><sup>-</sup> és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatására a NAD(P)H szint úgyszintén esik. Az UV fénnel létrehozott NAD(P)H esést szabadgyök ellenes szerekkel csökkenteni lehet. Ellentétben a kóros mértékben fokozódó szabadgyök (ROS) termelés hatásával, amelynek következtében a citoplazma [Ca<sup>2+</sup>] glomerulóza sejt is emelkedik, kisintenzitású UV-besugárzással kiváltott kisfokú O<sub>2</sub><sup>-</sup> termelés az angiotenzin II Ca<sup>2+</sup> jel képző hatását gátolta. Extracellulárisan képződő O<sub>2</sub><sup>-</sup> hasonló hatású volt. A ROS támadáspontja a belső raktárból történő Ca<sup>2+</sup> felszabadulás. UV hatására a mitokondrium Ca<sup>2+</sup> felvétele is csökkent. Míg általában a szabadgyököket károsító tényezőnek tekintik, megfigyeléseink azt mutatják, hogy alacsony koncentrációban sejtvédő hatást is kifejthetnek, s feltehetően a fiziológias viszonyoknak az alacsony koncentrációjú hatás felel meg.

## **II. 7. A mitokondriális Ca<sup>2+</sup> felvétel szabályozása adrenokortikális sejtben**

Fehérje foszforiláció hatása a mitokondrium Ca<sup>2+</sup> felvételére

A mitokondriális szabadgyök termelést jelentősen befolyásolja a mitokondrium matrix  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja. H295R adrenokortikális sejtben, konfokális lézer pásztázó mikroszkópiával, az endoplazmás retikulumba célzott GFP transzfekciója után vizsgáltuk a mitokondrium és az endoplazmás retikulum közötti távolság hatását a mitokondrium  $\text{Ca}^{2+}$  felvételére. Megállapítottuk, hogy az angiotenzin II hatás idején történő mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  jel képzés sebessége és a jel maximális mérete az adott mitokondrium és az endoplazmás retikulum közötti távolság reciprokával, tehát „közelségével” szorosan korrelál, ami egyben azt is jelenti, hogy az endoplazmás retikulumtól távol is képződik, ugyan lassú kinetikával, mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  jel. Megfigyelésünk nemcsak azt igazolja, hogy H295R sejtben a magas  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjú perimitokondriális elősegíti a mitokondrium  $\text{Ca}^{2+}$  felvételét, hanem azt is, hogy e mikrodomén képződése nélkül is lehetséges mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  felvétel. A feszültség-aktivált  $\text{Ca}^{2+}$  belépést követő  $\text{Ca}^{2+}$  jel áttevődése a mitokondriumba független a mitokondriumnak nemcsak az endoplazmás retikulumtól, hanem a plazmamembrántól való távolságától is, tehát a  $\text{Ca}^{2+}$  jel ezúttal is magas  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjú perimitokondriális mikrodomén nélkül képződik.

A p38 MAPK gén csendesítése, az enzim farmakológiai gátlása, továbbá az új típusú (*novel*) protein kináz C izoformák farmakológiai gátlása elősegíti az angiotenzin II-vel létrehozott  $\text{Ca}^{2+}$  jel áttevődését a citoszolból a mitokondriumba. Protein foszfatáz gátlás ellentétes hatású. Ezekkel összhangban a p38 MAPK és az új típusú PKC izoformák *egyidejű* aktiválása a  $\text{Ca}^{2+}$  jelnek a citoszolból a mitokondriumba történő áttevődését gátolta. A  $\text{Ca}^{2+}$  felvételi sebesség és a mitokondrium – endoplazmás retikulum közelsége közötti pozitív korrelációt a p38 MAPK, az új típusú (*novel*) protein kináz C izoformák, továbbá a protein foszfatázok gátlása megszünteti. Az adatok analízise azt mutatja, hogy a kezelések hatására elsősorban az endoplazmás retikulumtól távoli mitokondriumok működése változott: a fehérje foszforilációk gátlásának hatására  $\text{Ca}^{2+}$  felvételük fokozódott, a foszforilációs állapot fokozásának hatására viszont csökkent. A H295R sejtben a feszültség aktivált  $\text{Ca}^{2+}$  belépéssel létrejövő  $\text{Ca}^{2+}$  jel közel akkora mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  jelet hoz létre, mint az angiotenzin II, holott magas  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjú perimitokondriális mikrodomén csak az utóbbi esetben jöhet létre. Eredményeinkből arra következtetünk, hogy  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizáló agonista hatására olyan fehérje foszforiláció jön létre, amely a  $\text{Ca}^{2+}$  felvételi mechanizmusának gátlásával a felvételt az endoplazmás retikulum-közeli mitokondriumokra korlátozza és ezzel védi a sejtet a

mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  túlterhelés és az ebből következő apoptózissal szemben. Ezzel ellentétben fiziológiás mértékű  $\text{Ca}^{2+}$  belépés (pl. fiziológiás  $\text{K}^+$  ingerlés vagy raktár-szabályozott  $\text{Ca}^{2+}$  belépés) esetén a mitokondriumok térbeli korlátozás nélkül, tehát a sejt egész területén, szubmikromoláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjú citoszolból vesznek fel  $\text{Ca}^{2+}$ -ot.

#### A citoszol $\text{Mg}^{2+}$ jel hatása a mitokondrium $\text{Ca}^{2+}$ felvételére

A  $\text{Mg}^{2+}$  általában gátolja a  $\text{Ca}^{2+}$  transzport folyamatokat, s régóta az is ismert, hogy a  $\text{Mg}^{2+}$  az izolált mitokondrium  $\text{Ca}^{2+}$  felvételét gátolja. Hogy ennek van-e fiziológiás jelentősége, az tisztázatlan maradt. HEK293T sejten végzett kísérletekben megállapítottuk, hogy az extramitokondriális  $[\text{Mg}^{2+}]$  emelkedése, elsősorban a 0.3 – 1 mM-os tartományban, erősen gátolja a mitokondrium  $\text{Ca}^{2+}$  felvételét.  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizáló agonista (metabotrop receptoron ható ATP) hatására a citoszolban  $\text{Mg}^{2+}$  jel képződik, amelynek csúcértéke 2-3-szorosan haladja meg a nyugalmi átlagban 0.3 mM-os értéket. A  $\text{Mg}^{2+}$  jel kialakulásának mechanizmusát illetően kimutattuk, hogy 1) a  $[\text{Ca}^{2+}]$  emelkedés hatására  $\text{Mg}^{2+}$  szabadul fel a citoszol fehérjékről; 2) az  $\text{IP}_3$  hatására nem csak  $\text{Ca}^{2+}$ , hanem  $\text{Mg}^{2+}$  is lép ki az endoplazmás retikulumból.  $\text{Mg}^{2+}$  influxnak vagy az ATP bomlásból felszabaduló  $\text{Mg}^{2+}$ -nak a jel létrehozásában kimutatható hatása nem volt. Ezek szerint  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizáló agonista hatására olyan  $\text{Mg}^{2+}$  jel képződhet, amely az eddig ismert támadáspontokon kívül a mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  felvételt is gátolja. E gátlás csökkentheti a mitokondrium szabadgyök képzését.

### **III. Elektron transzfer rendszer az endoplazmás retikulumban**

Kutatásaink elsősorban az endoplazmás retikulum lumen redox viszonyainak, illetve az endoplazmás retikulum eredetű stressz és apoptózis mechanizmusának vizsgálatára irányultak.

#### **III. 1. Az endoplazmás retikulum intraluminális redox rendszereinek vizsgálata**

Igazoltuk, hogy a FAD emlős sejtekben is oxidálja az ERO1p-protein diszulfid-izomeráz elektronátvivő láncot. Az oxidatív hatáshoz az endoplazmás retikulum membrán épsége elengedhetetlen.

Megállapítottuk, hogy az endoplazmás retikulumból származó mikroszomális vezikulák megtartják piridin-nukleotid tartalmukat. A piridin-nukleotidok döntően redukált formában vannak jelen. Miután bizonyítottuk, hogy az endoplazmás retikulum lumenében magas a [NADPH]/[NADP] arány, vagyis a piridin-nukleotid redox rendszer redukált állapotban van, felvetődött a kérdés, hogy hogyan lehet ezt fenntartani a jellegzetesen oxidált tiol-diszulfid redox rendszerrel közös kompartmentumban. A citoplazmában ugyanis a két rendszer közti egyensúlyt biztosítja az őket összekapcsoló glutation-reduktáz enzim. Májból sejtfrakciókat izoláltunk, és bizonyítottuk, hogy az endoplazmás retikulum lumenében nincs glutation-reduktáz enzim, illetve aktivitás, így a két eltérő redox állapotú rendszer egymástól függetlenül jelen lehet a közös kompartmentumban.

### **III.2. A G6PT - H6PDH - 11 $\beta$ HSDH1 triász vizsgálata**

Máj mikroszómák felhasználásával bizonyítottuk az endoplazmás retikulum glukóz-6-foszfát-transzportere (G6PT), a hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PDH) és az 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (11 $\beta$ HSDH1) közötti funkcionális kapcsolatot. A transzporter szükséges a glukóz-6-foszfát bejutásához az endoplazmás retikulum lumenébe, ahol a H6PDH oxidálja, miközben NADPH-t termel, amelyet a 11 $\beta$ HSDH1 felhasznál a kortizon kortizollá alakításához. A három fehérje által alkotott rendszer jelenlétét sikerült kimutatnunk a zsírszövetben is. Mivel a G6PT alapvető funkciójának sokáig a glukoneogenikus sejtek endoplazmás retikulumában működő glukóz-6-foszfátáz (G6P-áz) enzim szubsztráttal való ellátását tekintették, kérdéses volt a G6PT szerepe olyan sejtekben, amelyek ezt az enzimet nem tartalmazzák. Eredményeink azt mutatják, hogy az ilyen sejtekben (pl. zsírsejtek) a G6PT a redukált piridin-nukleotidok termelésén keresztül a glukokortikoidok prereceptorális aktiválásában játszanak szerepet. A glukóz metabolizmusa és a glukokortikoidok prereceptorális aktiválása közötti kapcsolat különösen az elhízás, a metabolikus szindróma, illetve a 2-es típusú diabetes patomechanizmusa szempontjából jelentős.

Az endoplazmás retikulum intraluminális NADPH-termelésének egy lehetséges alternatív módját is megtaláltuk. A NADP<sup>+</sup>-függő izocitrát-dehidrogenáz citoszólikus izoenzimének intraluminális jelenlétét mutattuk ki.

### **III.3. Celluláris és *in vivo*, redox alapú endoplazmás retikulum stresszmodellek kifejllesztése és vizsgálata**

S3483, a G6PT gátlószere apoptózist idéz elő granulocitákban, ami összhangban van azzal a klinikai megfigyeléssel, hogy a G6PT-hiányos glikogéntárolási betegség 1b altípusában (GSD1b) szenvedő betegekben rendszerint súlyos neutropénia alakul ki. Mivel ezek a sejtek sem rendelkeznek G6P-áz aktivitással, feltételeztük, hogy itt is a H6PDH működésével és a NADPH-termeléssel összefüggő hatásról van szó. Ezt támasztotta alá az a megfigyelésünk is, hogy az S3483-okozta apoptózis antioxidánsokkal kivédhető. Kimutattuk, hogy a granulocita endoplazmás retikulum tartalmazza a korábban májsejtekben és adipocitákban észlelt G6PT-H6PDH-11 $\beta$ HSDH1 rendszer elemeit, és ezek funkcionális kapcsolatban is állnak egymással. Kimutattuk, hogy korábbi – mikroszómális rendszerben nyert eredményeink alapján felállított – hipotézisünknek megfelelően az aszkorbinsav hiánya tengerimalacok májában endoplazmás retikulum sztrepszhez kötődő jelpályák aktiválódnak, és az apoptózis kezdeti jelei is észlelhetők.

Megállapítottuk, hogy a hepatotoxikus acetaminofen endoplazmás retikulum eredetű apoptózist indukál egér májban. *In vivo* acetaminofen-alkalmazás után az endoplazmás retikulum sztrepszhez kötődő jelpályák aktiválódnak, és az apoptózis kezdeti jelei is észlelhetők.

### **III.4. Endoplazmás retikulum transzporterek vizsgálata**

Mivel az endoplazmás retikulum lumenben folyik a szteroid-szulfátok dekonjugálása, kíváncsiak voltunk, mely transzporter(ek) részvételével jut ki a keletkező szulfát anion a citoplazmába. Feltételeztük a G6P-áz rendszer részét képező foszfát-transzporter és G6PT szerepét a folyamatban. Kimutattuk, hogy a szulfát anion transzportere patkány máj mikroszómában fehérjemediált, kétirányú, alacsony affinitású és magas kapacitású, melyet aniontranszport-gátlószerekkel (pl. 4,4'-diizotiocianatostilbén-2,2'-diszulfonát) gátolni lehetett. A transzportot sem a

foszfátranzsport ismert gátlószereivel, sem foszfáttal vagy pirofoszfáttal nem tudtuk befolyásolni, tehát a foszfát-transzporter szerepét kizártuk. Bár S3483 csökkentette a szulfát transzportját, a szulfát és a G6P közötti gyenge kompetíció nem támasztotta alá a G6PT részvételét a transzportban. G6PT-t overexpresszáló, illetve vad típusú COS-7 sejtekből származó mikroszómák szulfátranzsportja között nem volt különbség. Az eredmények szerint a glukóz-6-foszfát, a foszfát és a szulfát mikroszomális transzportjáért különböző transzporterek felelősek.

Kimutattuk, hogy az endoplazmás retikulum transzlokon peptidcsatornája aspecifikus módon nemcsak kationok és töltéssel nem rendelkező kis molekulák, hanem szerves anionok (UDP-glukuronsav, mannóz-6-foszfát stb.) membrántranszportját is elősegítheti. A jelenségnek szerepe lehet az intraluminális aktív centrummal rendelkező enzimek szubsztrátellátásában. Kimutattuk, hogy a transzlokon protein csatorna – egy eddig nem azonosított kation csatornával együtt – részt vesz az endoplazmás retikulumból történő passzív kalciumeffluxban. A transzlokon kis molekulák transzportjában betöltött szerepét review-ban foglaltuk össze.

### **III.5. Zöldtea fitofarmakonok hatása az endoplazmás retikulum egyes enzimeire és transzportereire**

Kimutattuk, hogy a zöldtea fitofarmakonjai, köztük a legnagyobb mennyiségben jelenlevő epigallokatechin-gallát (EGCG) gátolják az endoplazmás retikulum lumenben a glukozidáz II aktivitását. A gátlás lassíthatja a glikoproteinek minőségellenőrzését. Az EGCG gátolja az endoplazmás retikulum membránon keresztüli glukuronidtranszportot is, mely hatás csökkentheti a xenobiotikumok reaktivációját. Az EGCG korábban megfigyelt számos hatása mellett az általunk leírt új támadáspontok további magyarázatot adhatnak a zöldtea *in vivo* megfigyelt jótékony hatásaira.

Az EGCG-ről leírták, hogy csökkenti a máj glukóztermelését, valamint feltételezhetően a G6PT gátlása révén okoz apoptózist glióma sejtekben, ezért megvizsgáltuk hatását a G6P-áz enzimrendszerre. Máj mikroszómákon végzett kísérleteink azt mutatták, hogy az EGCG nem hat a G6PT-re, a G6P-áz enzimet közvetlenül csak alig gátolja, de a glukóztranszport gátlása révén mégis csökkenti az aktivitását. A megfigyelt jelenségnek szerepe lehet a szer antidiabetikus hatásában.