

A MITOKONDRIÁLIS ENERGIATERMELŐ FOLYAMATOK VIZSGÁLATA: AZ ELEKTRON TRANSZPORT, A H⁺-ELEKTROKÉMIAI POTENCIÁL ÉS AZ ATP-SZINTÉZIS KAPCSOLATÁNAK TANULMÁNYOZÁSA

A légzési szubsztrátok oxidációja, az ADP foszforilációja és a mitokondrium iontranszportja az ún. kemiozmotikus hipotézis szerint az elektrontranszporthoz H⁺-ion gradiens kialakulása révén kapcsolt. A légzési lánc redox-lépéseinek szabadenergiaváltozása terhére a légzési lánc komponensei H⁺-ionokat juttatnak ki a belső membrán mátrix-oldaláról a belső és külső membrán határolta "intermembrán" térrészbe, ezáltal a mátrix (mx) és az intermembrán (im) térrész között koncentráció-gradiens (H⁺-ionra) és elektromos potenciálkülönbség alakul ki (ΔE_m). E két tag algebrai összegét a proton elektrokémiai potenciáljának nevezzük:

$$\Delta P = \Delta E_m + \frac{2,3RT}{F} \lg \frac{[H^+]_{im}}{[H^+]_{mx}} = \Delta E_m - 0,06(\text{pH}_{im} - \text{pH}_{mx}) = \Delta E_m - 0,06\Delta,0$$

A proton elektrokémiai potenciáljának terhére számos aktív iontranszport-folyamat (Ca²⁺-, foszfát-, szukcinát-felvétel, a mitokondrium saját fehérjeinek transzportja) és nem utolsó sorban ATP-szintézis folyhat. E folyamatok lejátszódása H⁺-ionoknak az elektrokémiai gradiens irányába (a mátrix-tér felé) történő transzportjához kötött. Így, pl. 1 mól ATP szintézise 2 mól H⁺-ion mátrixba történő transzportjával jár. Azok az anyagok, amelyek a H⁺-ion koncentráció-gradienst megszüntetik, egyszersmind a fenti energiaigényes folyamatok hajtóerejét is megszüntetik: jelenlétükben az energiatermelés és felhasználás kapcsolata sérül ("szétkapcsoló szerek", általában lipofil molekulák, melyek a mitokondrium belső membránján keresztül H⁺-ionok átjutását teszik lehetővé, pl. 2,4-dinitro-fenol).

A kísérleti körülmények gondos megválasztásával elérhető, hogy a mitokondrium-preparátum légzése során létrehozott proton-gradiens (ΔP) elsősorban iontranszportra, vagy éppen foszforilációra (ATP-szintézis) használódjon fel. Az előbbi lehetőséget egy kálium-ionofór vegyület, a valinomycin segítségével, a mitokondrium protongradiens-függő kálium felvétele kimutatásával tanulmányozhatjuk.

Az oxidatív foszforiláció és az elektrontranszportlánc egyes sajátosságait a mitokondrium-szuszpenzió oxigénfogyasztásának mérésével vizsgáljuk.

SZUBSZTRÁT OXIDÁCIÓ ÉS KAPCSOLATA AZ ATP-SZINTÉZISSEL

1. Respirációs kontroll és a P/O hányados

Ép mitokondriumok megfelelő kísérleti körülmények között a légzési szubsztrátokat egyidejű ATP-szintézis mellett oxidálják, és az oxigénfelvétel sebessége alkalmas műszerrel ("oxigráf") mérhető. A szubsztrátok oxidációjának sebessége optimális körülmények között (telítési szubsztrátkoncentráció, anorganikus foszfát és oxigén jelenlétében) csak a mitokondrium koncentrációjától és az ADP (a foszforilálható akceptor) jelenlététől függ. ADP jelenlétében ugyanis az ADP→ATP átalakulás a protongradiens megszüntetése miatt stimulálja az oxigénfogyasztást. Ezt nevezzük az oxigénfogyasztás "akceptor-kontrolljának". ADP hiányában az oxigénfogyasztás lassú ("nyugalmi" légzés), de ADP hozzáadásakor többszörösére nő ("aktív" légzés). Az ADP

elfogyása után az oxigénfogyasztás sebessége visszatér az ADP-hozzáadás előtti lassú értékre. Az ADP jelenlétében és elfogyása után mért sebességek aránya a szubsztrát oxidáció és foszforiláció kapcsoltságára jellemző, és respirációs kontroll-hányadosnak nevezzük:

$$RC = \frac{V_{(+ADP)}}{V_{(-ADP)}} > 1$$

³²P-vel jelzett anorganikus foszfát jelenlétében végezve a fenti kísérletet az ADP hozzáadás után az oxigénfelvétellel sztöchiometrikus arányban képződik [γ -³²P]-ATP; a sztöchiometriai együttható az ún. P/O hányados:

$$P/O = \frac{\text{mól } [^{32}\text{P}]\text{-ATP}}{\text{mól oxigénatom}} > 0$$

A P/O értéke intakt mitokondrium esetében attól függ, hogy az oxidálódó szubsztrát a légzési láncba melyik ponton lép be (ha a szubsztrát-szintű foszforilációt leszámítjuk).

Ha a protongradiens megszüntető szétkapcsoló anyagok vannak jelen, vagy a mitokondrium membránja károsodott, mind az RC, mind pedig a P/O hányados lecsökken, tehát ADP nem, vagy alig gyorsítja az oxigénfelvételt, és ³²P-vel nem jelződik jelentős mennyiségű ATP (nincs nettó ATP-szintézis). Ugyanakkor viszont a légzés kb. olyan sebességű, mintha ADP folyamatosan lenne a reakcióelegyben. A protongradiens folyamatos "kisülése" a fenti esetekben akkor is stimulálja az oxigénfogyasztást, ha ATP keletkezésére nincs lehetőség.

Az ADP-ből történő ATP-szintézist gátló oligomicin a légzést is gátolja, mivel a kialakult protongradiens nem használódik fel jelenlétében. Hasonlóan az oligomicin hatásához, olyan vegyületek is gátolhatják az oxigénfelvételt, amelyek megakadályozzák az ADP eljutását a mitokondrium belső membrán mátrix felőli oldalára (ahol az ATP-szintézishez az ADP kötőhely van). Az atraktilozid és karboxiatraktilozid az ATP:ADP-transzlokázt gátolják specifikusan. Mivel a légzési lánc elektrontranszportja érintetlen, a protongradiens kiépült (csak éppen nem használódik fel), a lassú légzést csak szétkapcsolószerekkel (pl. dinitrofenol) lehet meggyorsítani.

2. A légzési lánc gátlása

A légzési láncot alkotó enzimkomplexek mindegyikének ismerjük szelektív gátlószereit. Legismertebbek a CN⁻, CO, (gátolják a citokróm-a₃ autooxidációját), antimycin-A (cit. b és c₁ közötti elektronátmenetet), rotenon (NADH-dehidrogenázt), malonát (szukcinát-dehidrogenázt). Jelenlétükben a lánc gátolt tagjától az oxigén felé eső komponensek oxidált állapotba kerülnek, az elektrontranszport és a további oxigénfelvétel leáll. Mivel energiatermelés nincs, protongradiens sem épül ki; a légzés sem ADP-vel, sem szétkapcsolóanyagokkal nem indítható meg.

3. A protongradiens és az iontranszport kapcsolata

A protongradiens energiája terhére nem csak ATP szintetizálódhat, hanem ADP hiányában kationok felvétele is, ha a belső membránon a kérdéses ion át tud jutni. A Ca²⁺ bejutása például a citoplazmából a mátrixba élettanilag is fontos, és szabályozó szerepet tölt be. In vitro adott ionofor, pl. valinomicin (K⁺), vagy gramicidin (K⁺ és Na⁺) segítségével más kationok is bejuttathatók. A membránpotenciál a hajtóereje egyes, nem-kicserélődési mechanizmussal a mitokondriumba jutó szubsztrátok, valamint a citoplazmában újonnan szintetizálódott mitokondrium-fehérjék felvételének is. A problémakör modellszerű tanulmányozásához a légzési szubsztráttal ellátott mitokondrium lassú oxigénfogyasztását ADP hiányában, ill. foszforilációt gátló szerek jelenlétében mérjük, majd a vizsgált kationt (esetleg specifikus ionoforjával) hozzáadjuk, és a légzésgyorsulást regisztráljuk. Ilyenkor a mátrix lúgosodik, mivel a felvett kationnal ekvivalens H⁺-ion kerül ki az intermembrán térbe. (Ezt bizonyítja, hogy az akkumulált kation kiáramlik a mátrixból, ha protonofort [DNP] adunk.)

AZ OXIGÉNFOGYASZTÁS SEBESSÉGÉNEK MÉRÉSE POLAROGRÁFIÁS MÓDSZERREL, OXIGÉN-ELEKTRODDAL

Az oldott oxigén aktuális koncentrációját Clark-típusú polarográfias oxigénelektroddal mérjük. Ez egy platinából és ezüst-ezüstklorid állandó potenciálú elektródból összeállított kombinált elektród, amelynek negatív pólusa a Pt. A két elektród telített KCl-ba merül, és az elektródkombinációt egy vékony, az oldatot nem, de a benne oldott gázokat átteresztő, polietilén-membrán választja el a reakciótértől. Az elektródra a polarizátor egység (l. 1. ábra) 0,6 V feszültséget ad, ezen az értéken az oldott oxigén elektrolitikusan redukálódik. Ha változtatnánk a polarizáló feszültséget, és mérnénk a cellán átfolyó áram erősségét, ez egy lépcsőszerű görbét adna, egy közel vízszintes szakasszal 0,5 és 0,8 V között. Ezen a szakaszon körülményeink között csak oxigén redukálódik a platinaelektrodon. A lépcső magassága (tehát az átfolyó áram erőssége a plató-szakaszon) az adott potenciálon (pl. 0,6 V) töltést felvevő anyagnak, a molekuláris oxigénnek az elektródfelületen való koncentrációjával, ez pedig megfelelő, állandó keveredés esetén az oldott oxigénnek a reakcióelegybeni koncentrációjával arányos. Tehát, ha állandó, 0,6 V polarizáló feszültség mellett regisztráljuk a reakcióedénybe nyúló oxigén elektródon átfolyó áram erősségét (az ún. diffúziós határáramot), az arányos lesz az oldott oxigén pillanatnyi koncentrációjával. (Ez az érték egy potenciometrikus rekorderen feszültséggé alakítva jelenik meg.) Az oxigénfogyasztást időben követhetjük, ha a rekorder regisztrálópapírját állandó sebességgel (pl. 1cm/perc) hajtjuk, és a feszültségváltozás értékeket írószerkezettel regisztráljuk.

A reakcióedény tartalmát tehát egyenletesen kevertetnünk kell (motoros keverő által az edényben forgatott műanyaggal bevont kis mágnessel); a reakció indításakor el kell zárni a levegőtől, hogy további oxigén ne oldódjon be; és a reakcióelegy hőmérsékletét a lehetőségekhez képest állandó értéken kell tartani. A mi körülményeink között elegendő, ha a kísérletek szobahőmérsékleten folynak (de a reakcióelegy hőmérsékletét a reakciók befejeződésekor hőmérővel mérjük meg). A mért hőmérsékletre megadott **telítési** oxigén koncentrációt (ennek felel meg a rekorder kiindulási, 100%-ra általunk, a kísérlet kezdetén beállított állása) a 2. ábrán bemutatott nomogramról olvassuk le. A nulla oxigénkoncentrációra elektródunkat Na-ditionit hozzáadásával kalibráljuk.

Patkánymáj mitokondrium preparálása differenciál centrifugálás módszerével

Egy éjszakán át éheztetett kb. 150 g-os patkányt vágunk le, máját vegyük ki, öblítsük le néhányszor izoláló pufferben (0,25 M szacharóz, 5 mM TRIS, 0,5 mM EGTA, pH 7,4-re állítva sósavval), jégben aprítsuk darabkákra, mossuk néhányszor jéghideg izoláló pufferrel, hogy a vért eltávolítsuk, majd homogenizáljuk 4-szeres térfogat izoláló pufferrel Potter-Elvehjem-típusú homogenizálóban. Először gömbös, nagyrésű, majd finomabb, hengeres dugattyút használjunk. Az utóbbit csak néhányszor (4-5-ször) mozgatunk fel és le, hogy elkerüljük a mitokondriumok károsodását. A homogenátumot 600 * g-vel 12 percig centrifugáljuk (a csapadékban fel-nem-tárt szövetdarabkák, sejtmag, plazmamembrán van, az üledék eldobható), a felülúszót tiszta centrifugacsőbe öntjük át, és 6-8000xg-vel 20 percig centrifugáljuk (a felülúszóban mikroszoma-frakció, citoszol, stb.). A mitokondriumot tartalmazó csapadékot jégben tarthatjuk el néhány órán át, és felhasználás előtt jéggel töltött kémcső segítségével saját levében homogenizáljuk (óvatosan!), kb. 60-80 mg/ml fehérjekoncentrációra (ezt pl. biuret-reakcióval határozhatjuk meg). A kész preparátumot és a reagenseket is jégben tartjuk. (Az ily módon előállított preparátum már készen áll a gyakorlatokon a hallgatók rendelkezésére.)

Reagensek

1. Inkubáló oldat: 80 mM KCl, 20 mM TRIS-HCl, 1 mM EGTA, 10 mM KH₂PO₄, pH 7,2
2. mitokondrium-szuszpenzió: 60-80 mg/ml
3. 0,7 M glutamát, 0,3 M malát pH 7,2
4. 0,75 M szukcinát, pH 7,2
5. 50 mM ADP, pH 7,2; 260 nm-nél le kell mérni 2-3000x hígításban. Pontos koncentrációját a P/O hányados kiszámításához tudni kell. (Ext. koeff. = 15,4 mM⁻¹cm.⁻¹)
6. 10 mM DNP
7. 0,08 mg/ml oligomicin (alkoholban oldva)
8. 0,1 M malonát pH 7,2
9. 100 mM KCN
10. 5 mg/ml atraktolozid
11. Na-ditionit szubsztancia.

Eszközök

Inkubáló edény (küvetta), oxigénelektrod polarizátor-egységgel és potenciometrikus rekorderrel, mágneses keverőmotor, keverő-mágnes, vízlégszivattyú
20-200 µl és 1-5 ml között mérő automata pipetták; hőmérő.

A kísérlet kivitelezése

Fontos: A használt reagensek igen mérgezőek! Minden reagenshez rendszeresítsünk 1-1 pipettacsőrt! Tiszta papírlapra helyezzük őket és írjuk melléjük a reagens rövid nevét. Ne szennyezzük át a reagenseket egymással!

1. Az elektród kalibrálása

A reakcióedénybe 3,0 ml inkubáló oldatot mérünk, az edényt buborékmentesen lezárjuk, majd tartalmát lassan kevertetjük. A rekordert 1 cm/perc papírsebességre állítjuk, majd a polarizátoron levő forgatógombbal 100%-ra állítjuk. Addig állítgatjuk, amíg ott stabilizálódik. Ez az érték felel meg tehát a teljes oxigénkoncentrációnak a kísérlet hőmérsékletén. A nulla oxigénkoncentrációt pár kristálynyi szilárd Na-ditionitnak a reakcióelegyhez adásával érjük el. (A fedélen levő adagolólyukon át fél spatulányi ditionitot szórunk a reakcióelegyhez.) Ekkor az írószerkezet gyorsan a 0% felé mozdul. Amikor értéke stabilizálódott, a rekorder "0" gombjával - 0 %-ra - állítjuk. Ez a helyzet felel meg a későbbiek során a "0" oxigénkoncentrációnak.

A művelet végén vízlégszivattyúval eltávolítjuk a reakcióelegyet a kamrából, és 2-3-szor desztillált vízzel kimossuk. Ügyeljünk a membrán (oldalt van!) épségére!

2. A P/O hányados meghatározása

Igen pontosan kell adagolnunk az ADP-t a mikropipettával. Vegyük fel először a kívánt szubsztrát jelenlétében a nyugalmi légzést, majd adjunk hozzá pontosan 20 µl ismert koncentrációjú ADP-t. Várjuk meg az aktív, és a nyugalmi légzési szakaszt. Adjunk ismét 20 µl ADP-t, és hatását mérjük meg. Az ADP/O (=P/O)-hányados az egyes ADP-adásokhoz tartozó oxigénfogyások alapján határozható meg az oxigén telítési koncentrációjának és a reakcióelegyhez adott ADP-mennyiségének ismeretében (lásd mellékelt jegyzőkönyv-minta és diagramok).

3. ADP, oligomicin, DNP és KCN hatása az oxigénfogyasztásra

A kísérletet szukcináttal és glutamát-malát szubsztrátpárral is el lehet végezni.

Javasolt reagenstérfogatok:

Inkubáló oldat: 3,0 ml, mitokondrium: 50 µl, légzési szubsztrát: 20 µl, ADP: 20 µl (kb. 30%-os oxigénfogyást okoz).

Jelöljük a regisztrátumon, hogy milyen reagenst, mikor és mennyit adtunk.

Javasolt sorrend:

Inkubáló elegy + szubsztrát (lezárjuk buborékmentesen a kamrát a zárófedéllel, és megvárjuk, míg beáll az egyenesbe az írótoll, kb. 1 perc);

+ mitokondrium (a fedélen lévő adagolólyukon át buborékmentesen, és megvárjuk amíg a közel lineáris oxigénfogyasztás beáll);

+ 20 µl ADP (a fedélen levő adagolólyukon át beszívódik). Amikor az átmeneti gyors szakasz után 2-3 percig újra lassú az oxigénfogyasztás, újabb, de most 50 µl ADP-t adjunk. Az ADP beadását követően meggyorsul az oxigénfogyasztás, most kell gyorsan adni az oligomicint. A csaknem leálló légzés DNP-vel indítható újra, és KCN-dal gátolható. (Igyekezzünk, nehogy elfogyjon az oxigén). A kísérletet szemernyi ditionit hozzáadásával fejezzük be, amivel igazoljuk, hogy nem az oxigén hiánya miatt állt le a légzés.

4. Szukcinát oxidáció gátlása malonáttal

Szukcinát szubsztrát használata esetén 20 μ l malonáttal kb. 50%-ig gátlódik a légzés.

Javasolt kivitelezés:

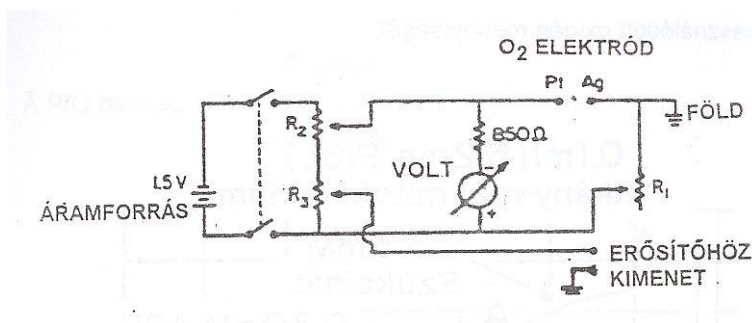
Inkubáló oldat 3 ml, 50 μ l mitokondrium, majd kb. 1 perc múlva 20 μ l szukcinát és 20 μ l DNP. 1 percig mérjük az oxigénfogyasztást, majd 20 μ l malonátot adunk. A gátlást kb. 100 μ l szukcináttal lehet felfüggeszteni.

5. Karboxiatraktilozid hatásának tanulmányozása

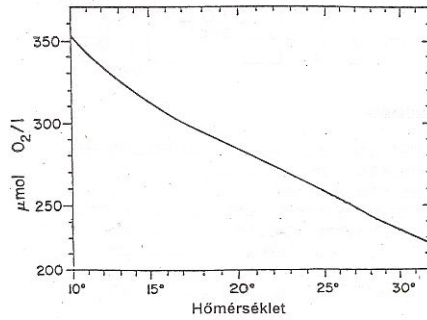
Szubsztrátként válasszuk a glutamát-malátot (lassúbb légzés), és adjunk kb. 40-50 μ l ADP-t, hogy a reakcióelegy teljes oxigén tartalmához elég legyen (korábbi eredményeinkből számolható). A légzésgyorsulás bekövetkezte után 20 μ l gátlószert adunk. Amikor a gátlás kialakult, ellenőrizzük, hogy szétkapcsolószerral (20 μ l DNP) a légzés megindítható-e.

Kiértékelés, felmerülő problémák

1. Számítsuk ki a mitokondrium nyugalmi és ADP-stimulált oxigén-fogyasztásának sebességét (μ mól O_2 /perc/ μ l) tömény mitokondrium-szuspenzió és szukcinát, illetve glutamát-malát szubsztrát használata esetén.
2. Számítsuk ki kísérleti adatainkat használva a respirációs kontroll-hányados (RC) értékét glutamát-malát és szukcinát szubsztrát használata esetén.
3. Számítsuk ki a P/O hányados értékét kísérleti adatainkból.
4. Melyik mérés nem sikerült, és mi lehetett a hiba?
5. Mi a szerepe a glutamátnak a malát transzportjában?
6. Lehet-e valamilyen klinikai haszna egy nem mérgező szétkapcsolószereknek? Milyen fiziológiai folyamat alapul a szétkapcsolás jelenségén?

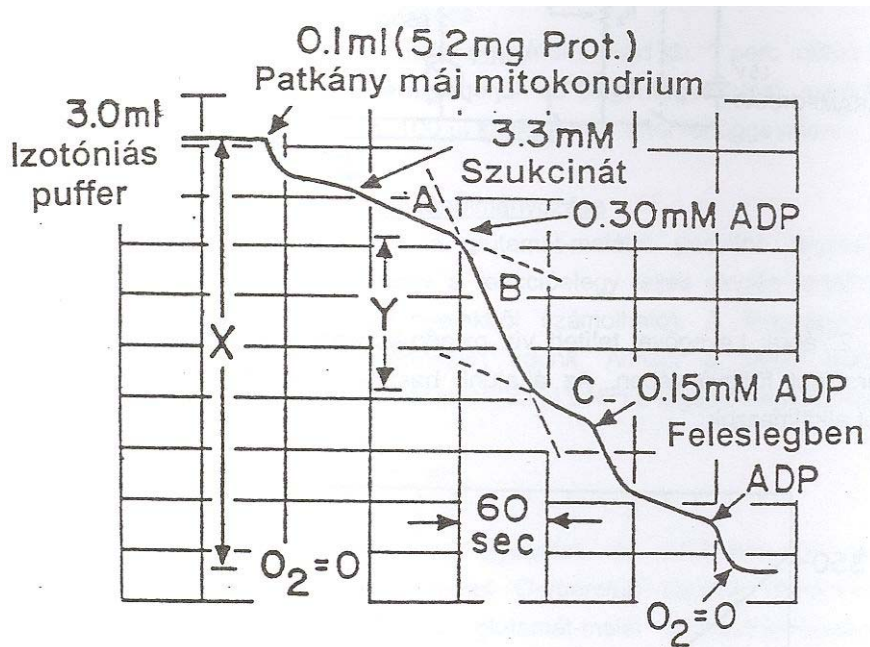


1. ábra: Az oxigén-elektrod feszültségforrása és érzékenység-szabályzó egysége.



2. ábra: Levegővel telített víz oxigén-koncentrációjának változása a hőmérséklet függvényében.

Az általunk használt reakcióelegyre is ezt a görbét alkalmazzuk.



3. ábra: Minta az ADP/O (P/O) hányados mérési adatainak kiértékeléséhez.

A regisztrátumon az ADP jelenlétében, illetve távollétében mért sebességek nyomvonalait meghosszabbítjuk, és a metszéspontok távolságának megfelelő oxigénfogyasztás adja meg a reakcióelegyhez adott ADP-re felhasznált oxigén mennyiségét.

Kiértékelés

A P/O hányados meghatározása a mitokondriális oxidáció során

Reakcióelegy térfogata:	ml
Reakcióelegy hőmérséklete:	°C
Telítési oxigénkoncentráció (t °C-on)	μmól/ml
Cellában fogyott oxigén mennyisége	μmól
ADP törzsoldat koncentrációja:	mM
Használt ADP térfogat:	μl
Felhasznált ADP mennyiség	μmól

Számítás:

ADP-re fogyott O₂:%, mennyisége:μmól

$$A \frac{P}{O} \text{ hányados} = \frac{ADP, \mu \text{ mól}}{2 * O_2, \mu \text{ mól}} = \frac{\dots\dots\dots}{2 * \dots\dots\dots} = \dots\dots\dots$$