Otevření mitochondriálního megakanálu železem:

Kompetice železa s kalciem důležitější než oxidační stres

MUDr. Jan Pláteník, PhD.

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1.LF UK v Praze

Mitochondrial Permeability Transition (MPT)

Perseus vs The Kraken by VegasMike
(http://www.whiskeyandbeans.com/things-of-interest/release-the-kraken)

Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPT)

- Otevření "megakanálu" ve vnitřní mitochondriální membráně
- Propustné pro všechny molekuly < 1500 Da
- Depolarizace, rozpřažení/inhibice respirace, zbobtnání mitochondrie
- Spouští: matrix Ca^{2+}
- Stimulováno: oxidanty, depolarizace, P_i
- Inhibováno: H^+ (acidifikace matrix), Mg^{2+}, ATP, ADP, vysoký poměr $NADH/NAD^+$, cyklosporin A
- Struktura ? ADP/ATP exchanger, P_i carrier, Cyclophilin D
- Funkce?
  - Reversibilní MPT: export Ca z mitochondrie/Ca signalizace
  - Irreversibilní MPT: autofagie, buněčná smrt

Železo v těle:
Nezbytné pro život, zároveň nebezpečné

Fentonova reakce:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe(H_2O_2)^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH\bullet + OH^-$$

Damage to biomolecules

FeII autoxidace:

$$Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2\bullet^-$$

$$O_2\bullet^- + O_2\bullet^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

$$Fe^{3+} + O_2\bullet^- \text{ (askorbát)} \rightarrow Fe^{2+} + O_2 \text{ (dehydroaskorbát)}$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe(H_2O_2)^{2+} \; (\rightarrow Fe^{3+} + OH\bullet + OH^-)$$

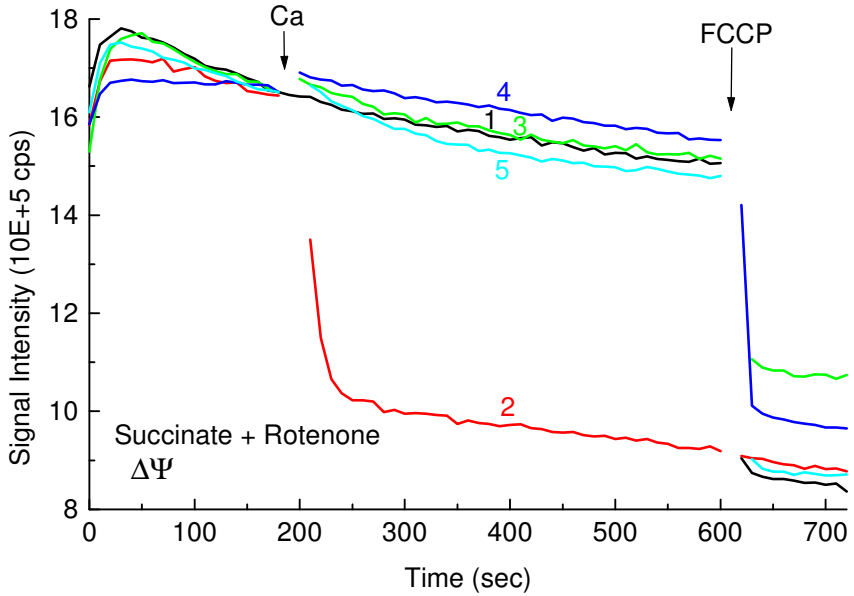
FeIII je nerozpustné v neutrálním oxygenovaném roztoku:

$$Fe^{3+} + nH_2O + nO_2 \rightarrow [FeO(OH)_2]_n$$

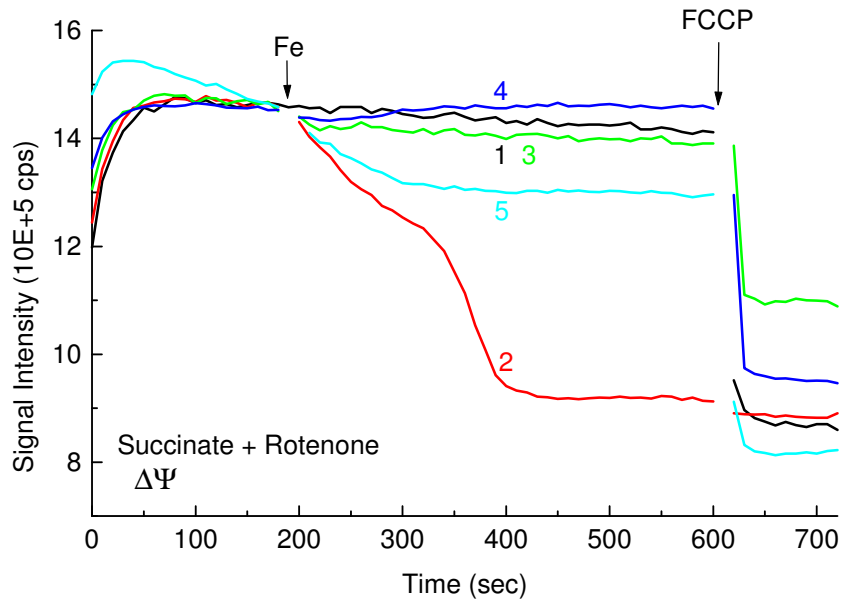
Možnost indukce MPT železem?

- Mitochondrie izolované z krysích jater v 10 mM Tris/HCl pufru pH 7.4, 250 mM sacharosa, 0.5 mM EDTA. Stabilizovány přídavkem hovězího albuminu
- Recording medium: sacharosa/KCl, pufrováno na pH 7.3, 1 mM fosfát, bez Mg, 37 °C
- Substráty: 5 mM sukcinát sodný + 1 μM rotenon, nebo 2.5 mM malát draselný + 5 mM pyruvát sodný
- Měření:
  - Bobtnání jako rozptyl světla při 504 nm
  - Membránový potenciál se sondou JC-1 (488 nm/593 nm)
  - NAD(P)H autofluorescence (340 nm/465 nm)
- MPT indukováno pomocí:
  - 20 μM $CaCl_2$ (předpokl.: 7.5 μM volného Ca^{2+}, ostatní váže reziduální EDTA)
  - 20 μM $FeCl_2$ předpokl.: 7.5 μM volného Fe^{2+} , ostatní váže reziduální EDTA)

Ca:

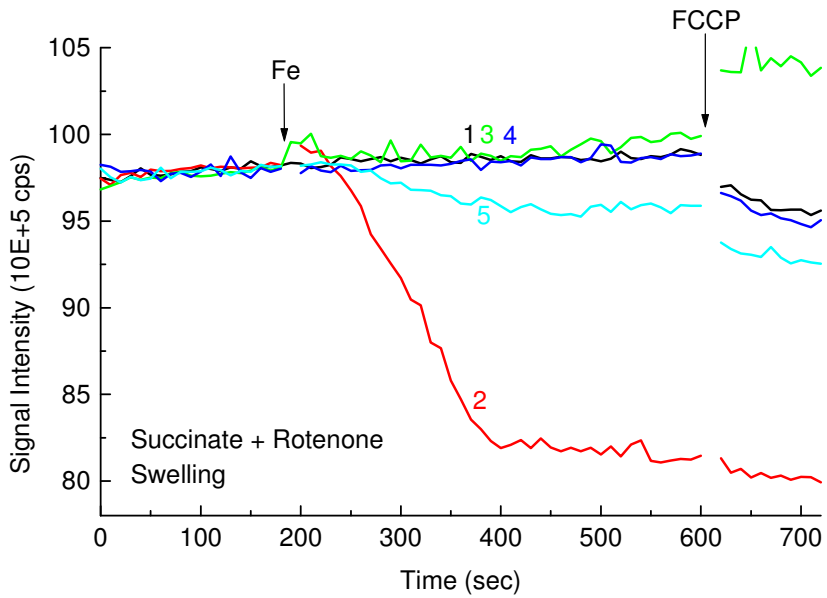


Fe:



MPT lze indukovat kalciem i železem

1: kontrola (bez Ca/Fe)
2: jen Ca nebo Fe ve 180 s
3: 512.5 µM EDTA
4: 2 µM Ruthenium Red
5: 5 µM Cyclosporin A



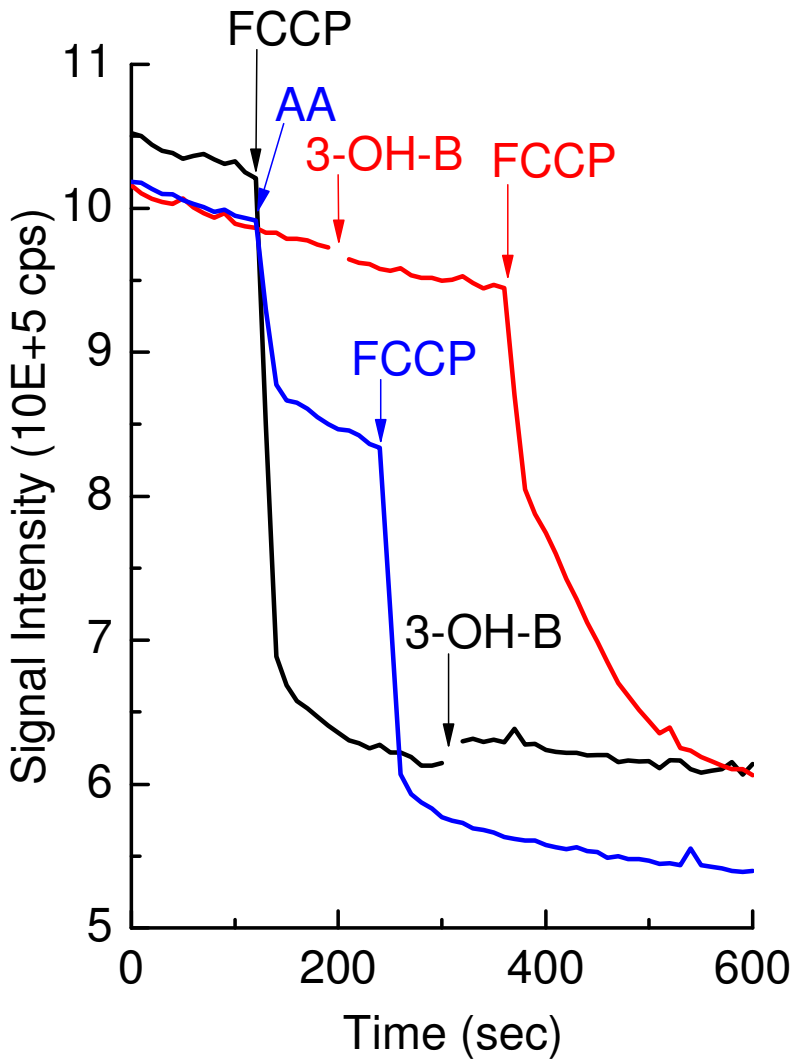
Hypotéza I:

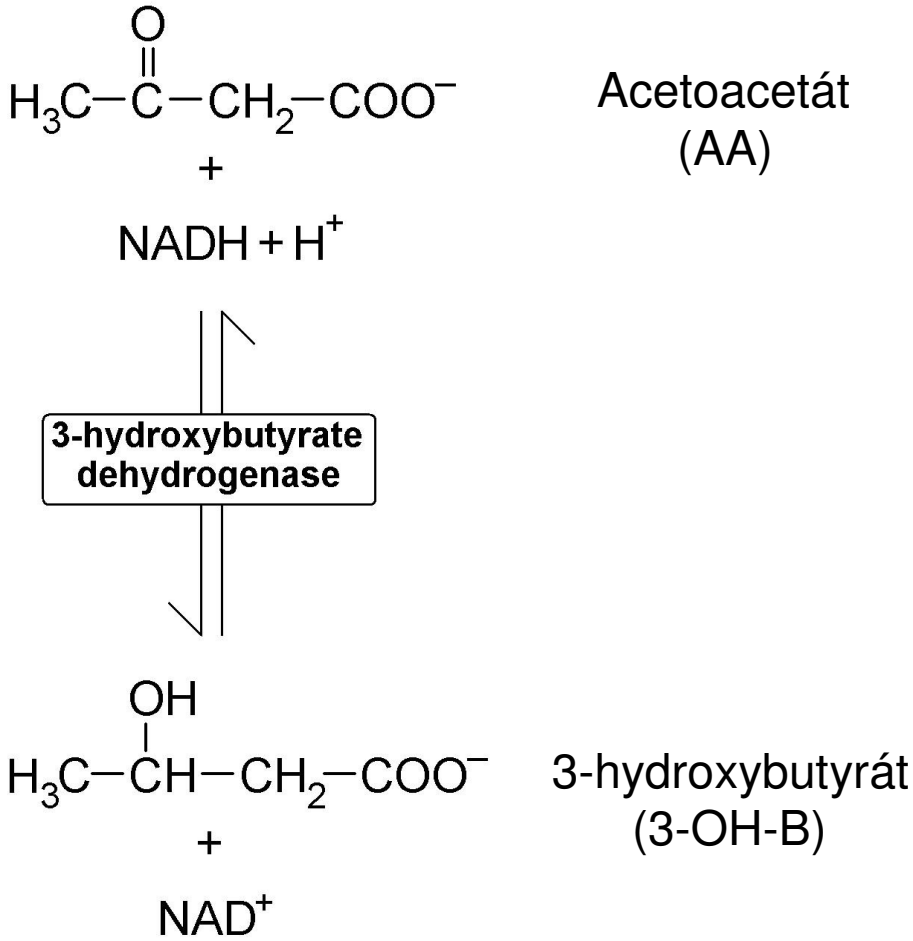
- Autoxidace železa/redoxní cyklování generuje kyslíkové radikály, ty zatíží mitochondriální antioxidační obranu, která v konečné instanci spotřebovává elektrony z NADH
- Pokles NADH/NAD+ poměru následně stimuluje otevření MPT póru endogenním Ca

Podle:

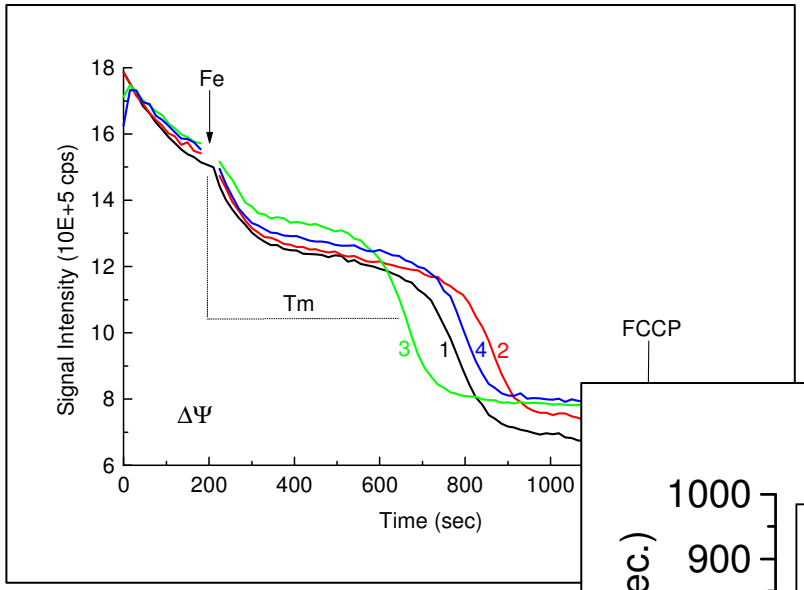
A. Masini, T. Trenti, D. Ceccarelli, E. Ventura, The effect of ferric iron complex on isolated rat liver mitochondria. III. Mechanistic aspects of iron-induced calcium efflux, Biochim. Biophys. Acta 891 (1987) 150-156.

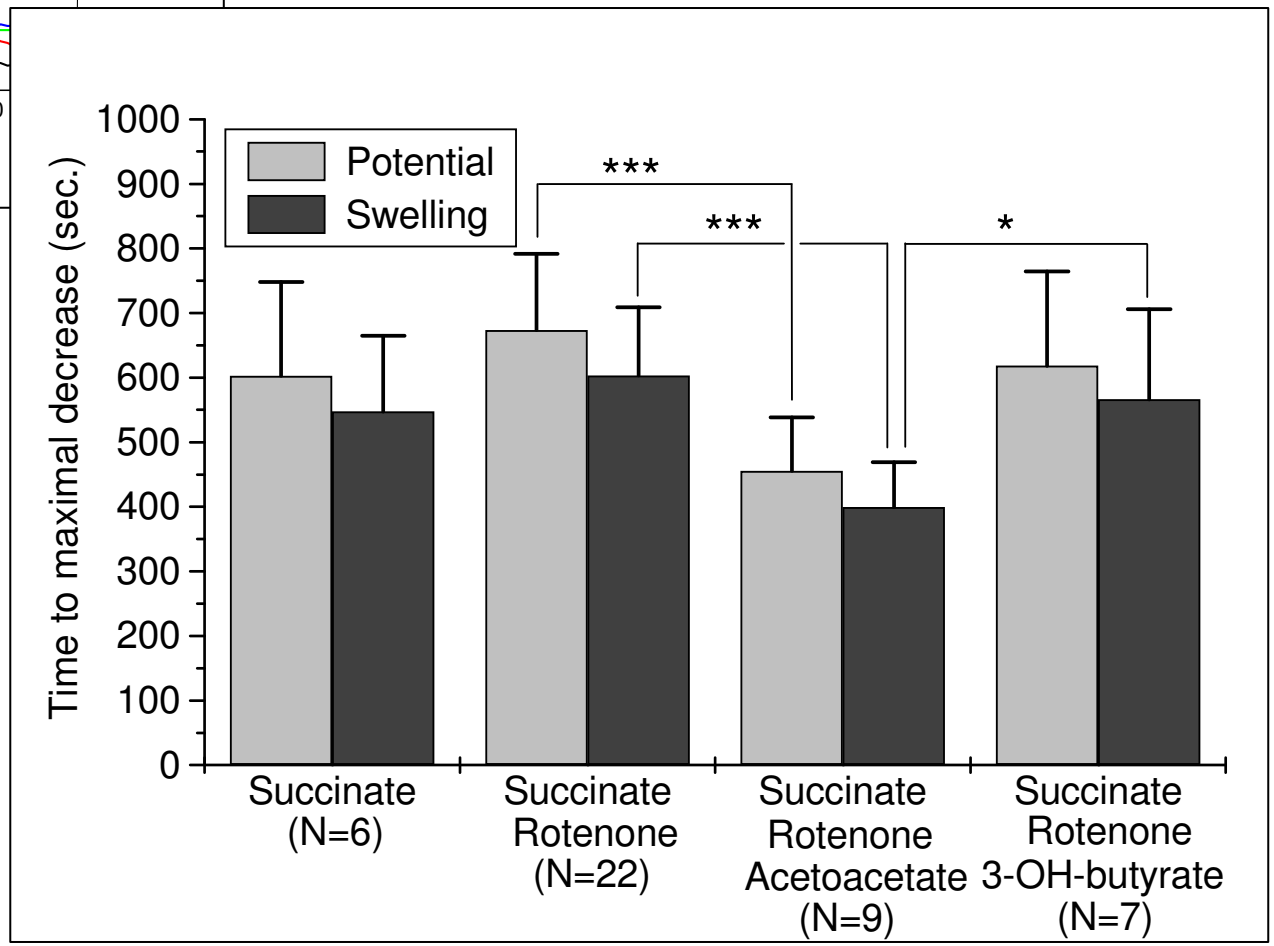
NADH/NAD$^+$ poměr lze experimentálně měnit pomocí ketolátek



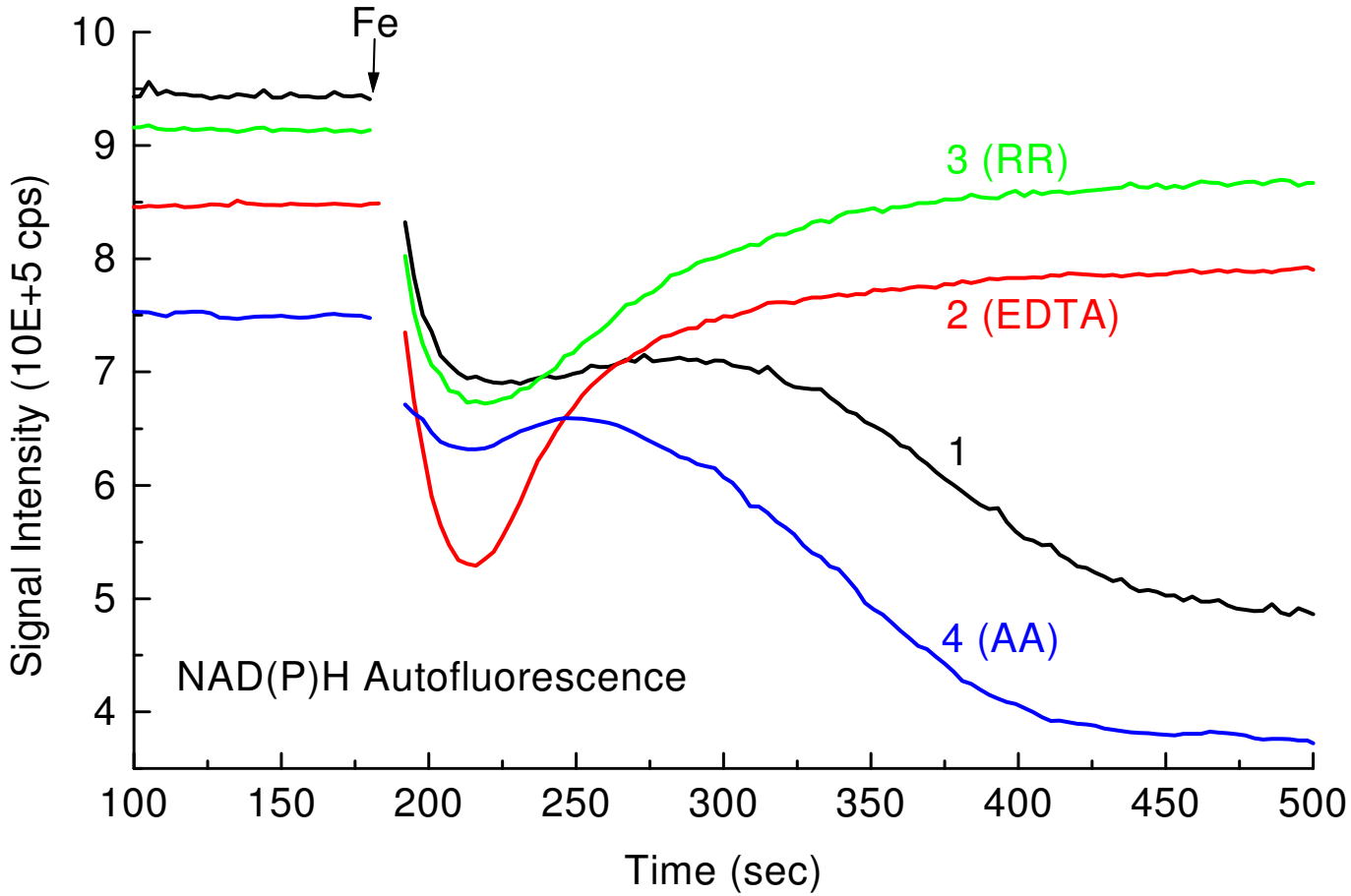


Ketolátky nemají na indukci MPT železem zásadní vliv

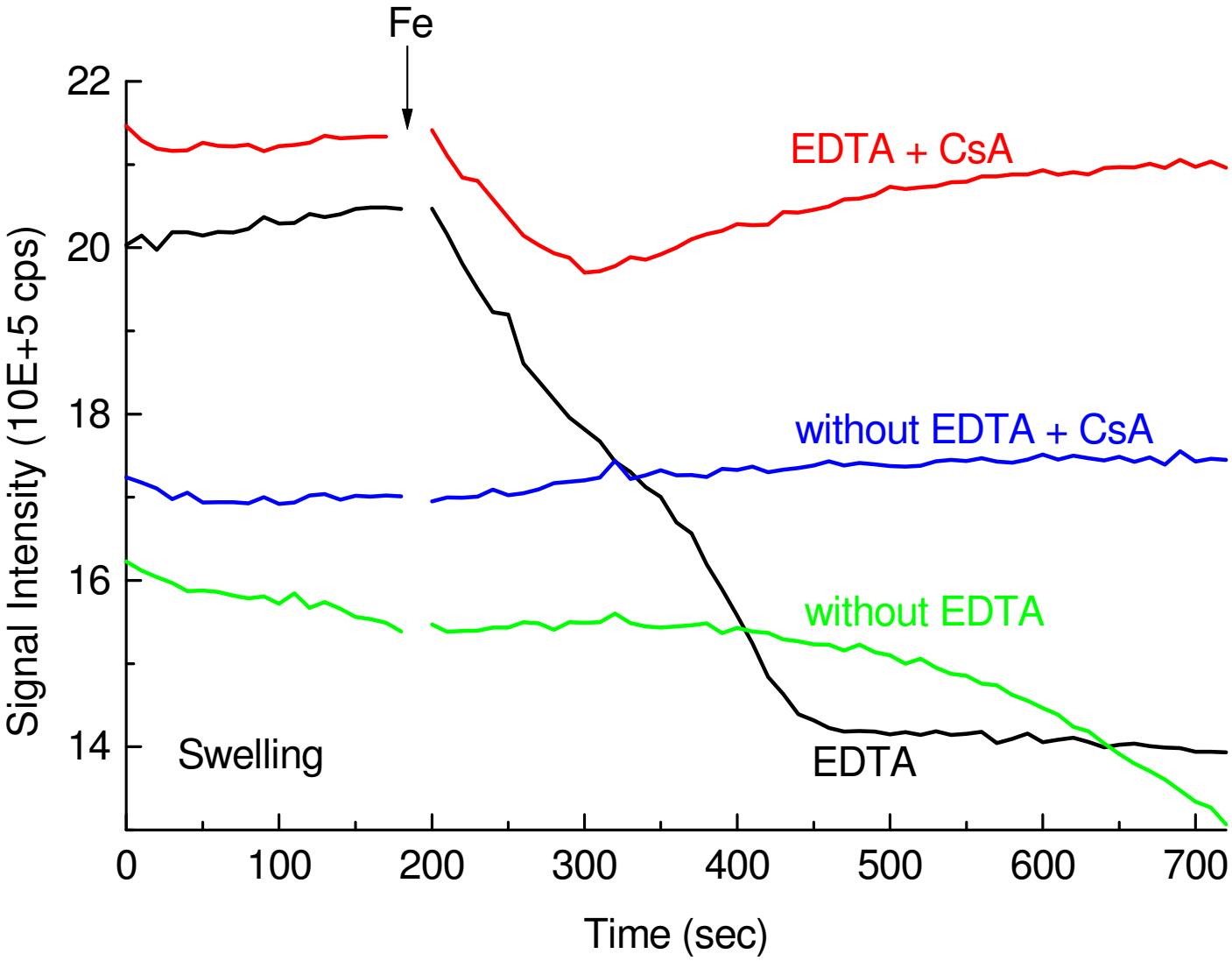




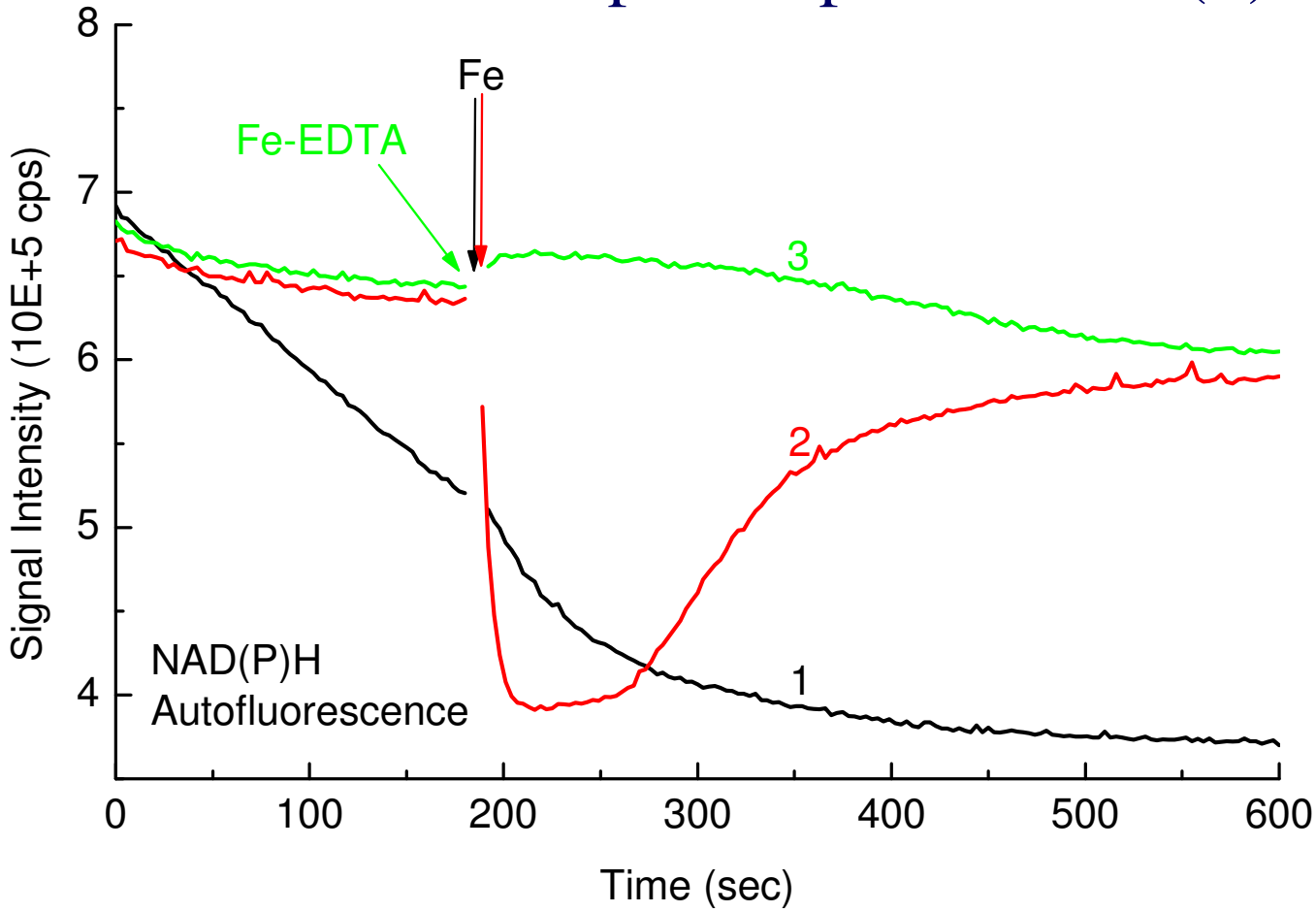
NAD(P)H/NAD(P) v průběhu indukce MPT železem



Mitochondrie bez EDTA:
Železo ztrácí schopnost indukovat MPT



Mitochondrie bez EDTA:
Přidání Fe už nepůsobí pokles NAD(P)H

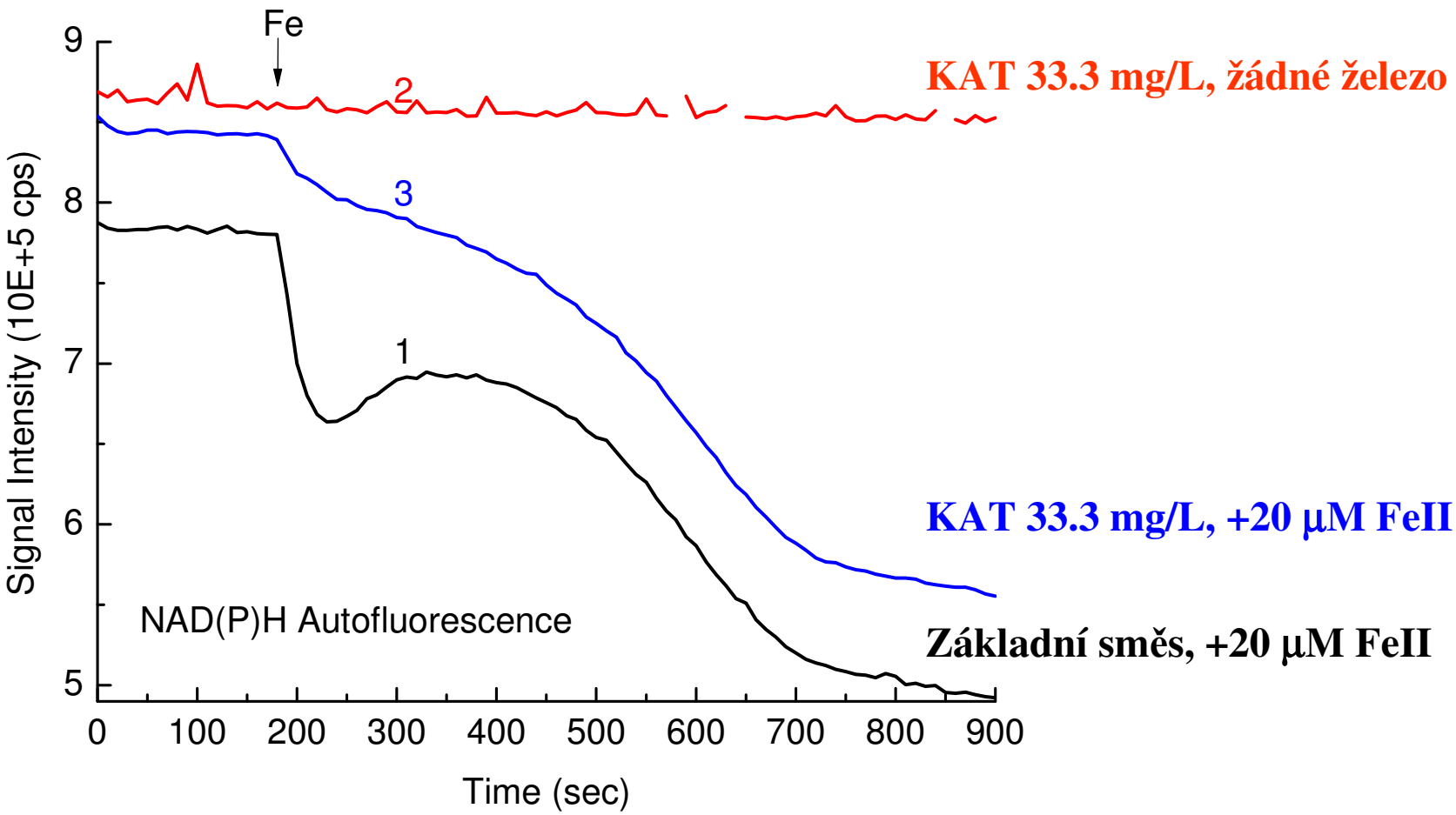


1: Mito bez EDTA, +20 µM FeII bez dalších přídavků

2: Mito bez EDTA naředěny do směsi obsahující 500 µM EDTA, +20 µM FeII

3: Mito bez EDTA naředěny do směsi obsahující 400 µM EDTA, +20 µM FeII přidáno jako komplex se 100 µM EDTA

Kataláza inhibuje železem navozenou NAD(P)H oxidaci, ale nikoliv MPT



Hypotéza II:

- Železo nevázané do komplexu s EDTA je importováno do mitochondriální matrix přes kalciový uniporter a indukuje MPT zevnitř mitochondrie

Podle:

– I. Romslo, T. Flatmark, Energy-dependent accumulation of iron by isolated rat liver mitochondria. II. Relationship to the active transport of Ca^{2+}, Biochim. Biophys. Acta 325 (1973) 38-46.

– V. Gogvadze, P.B. Walter, B.N. Ames, Fe^{2+} induces a transient Ca^{2+} release from rat liver mitochondria, Arch. Biochem. Biophys. 398 (2002) 198-202.

Kolik železa je importováno do matrix?

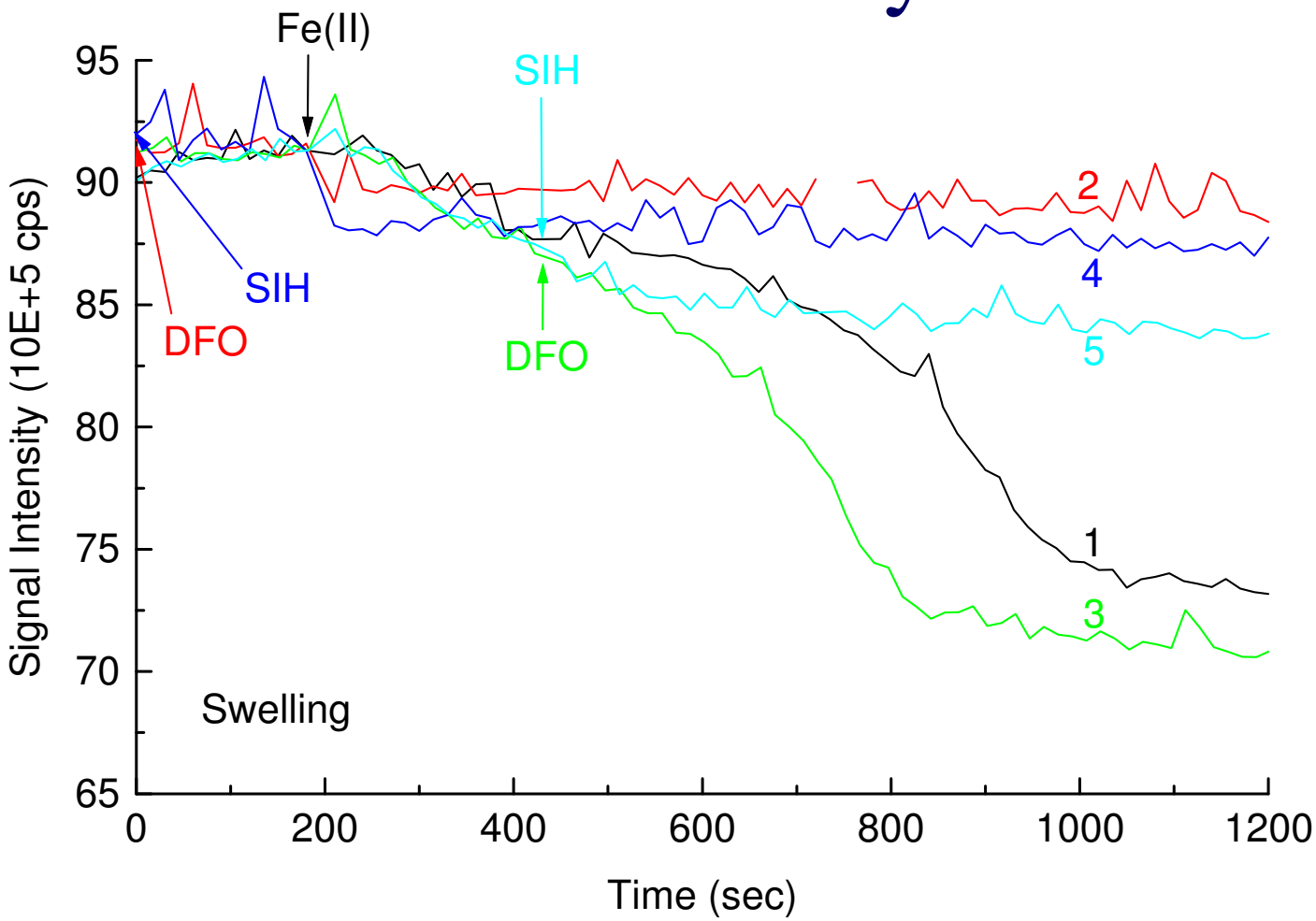
- Mito stabilizované cyklosporinem A, energizované sukcinátem (+rotenon)
- Inkubace s 20 μM Fe, s/bez FCCP, s/bez Ruthenium Red
- Centrifugace a v supernatantu kolorimetrické stanovení koncentrace Fe (Ferrozin + askorbát)

	Fe detected (μM)			
	–FCCP	+FCCP	Mean difference	Paired t-test
–RR	18.75±0.28	19.49±0.55	0.73±0.66	*
+RR	17.67±0.56	17.87±0.57	0.20±0.30	NS

* …$p<0.05$, NS … not significant

Ruthenium Red-sensitive Fe import: **0.5 μM (2 nmol Fe/mg mito protein)**

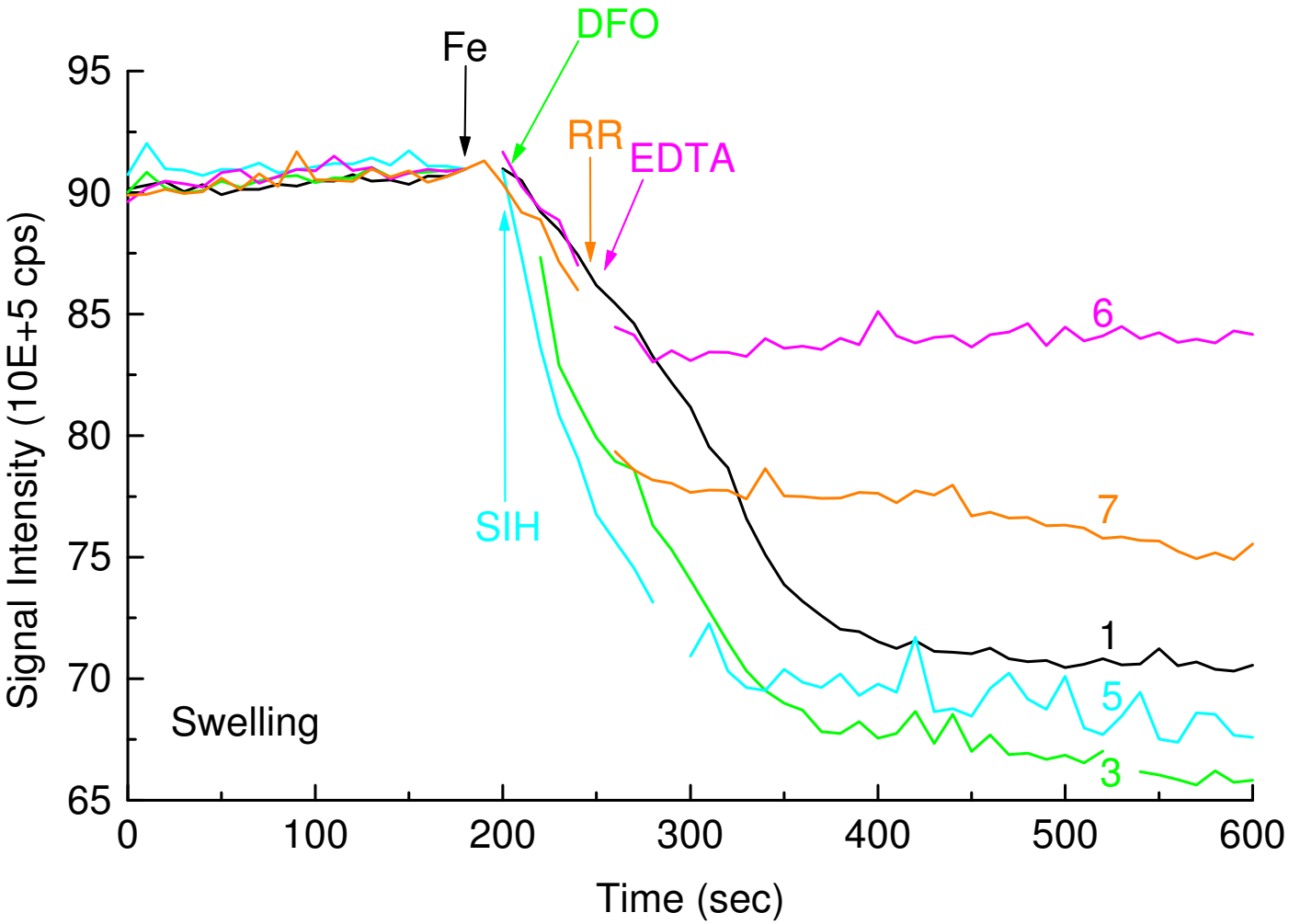
Chelátory



DFO (desferoxamin): váže FeIII a FeII, ne Ca, přes membrány prochází špatně

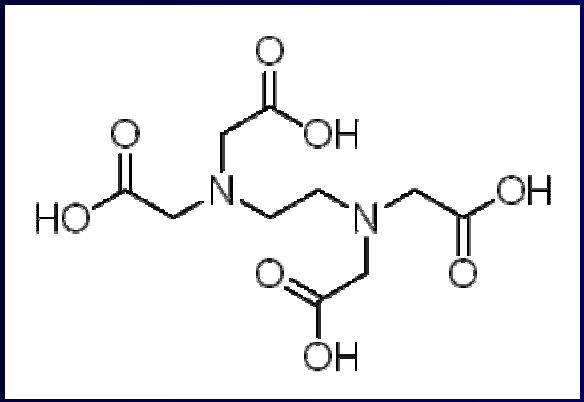
SIH (salicylaldehydisonikotinoylhydrazon): váže FeIII a FeII, ne Ca, lipofilní a výborně prochází přes membrány

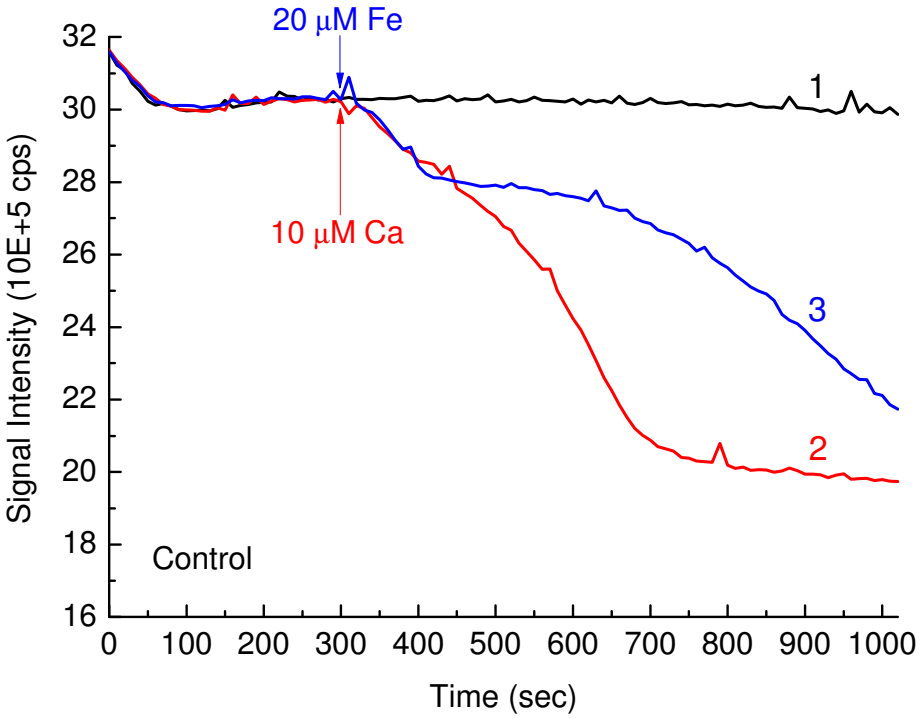
Rychlé MPT: chelátory železa neúčinné, ale přídavek EDTA nebo Ruthenium Red ho zastaví kdykoliv.

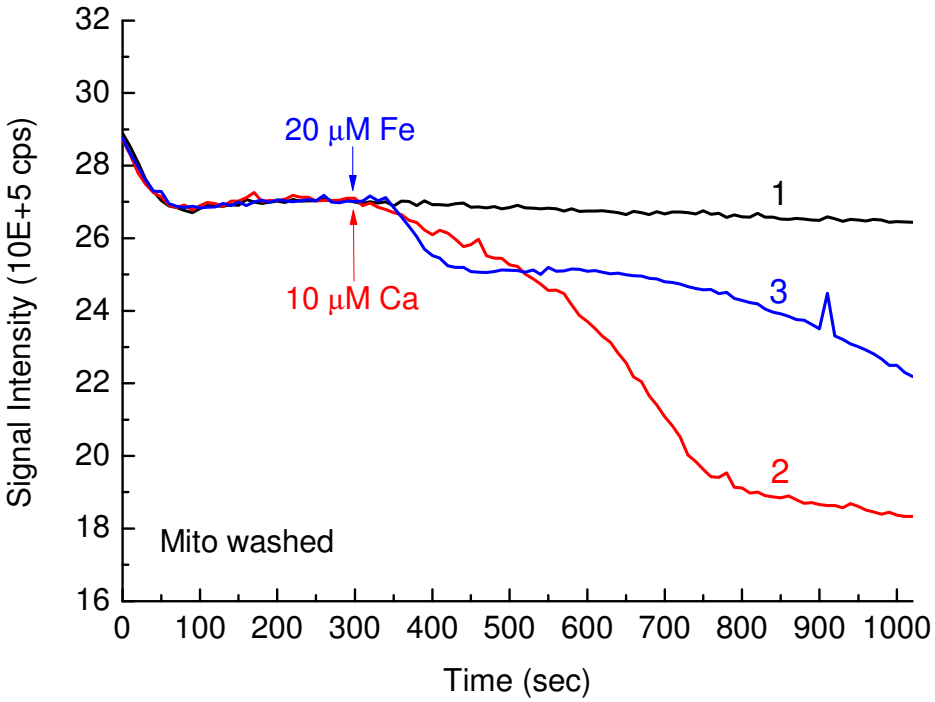


Úloha kalcia v MPT indukovaném železem ???

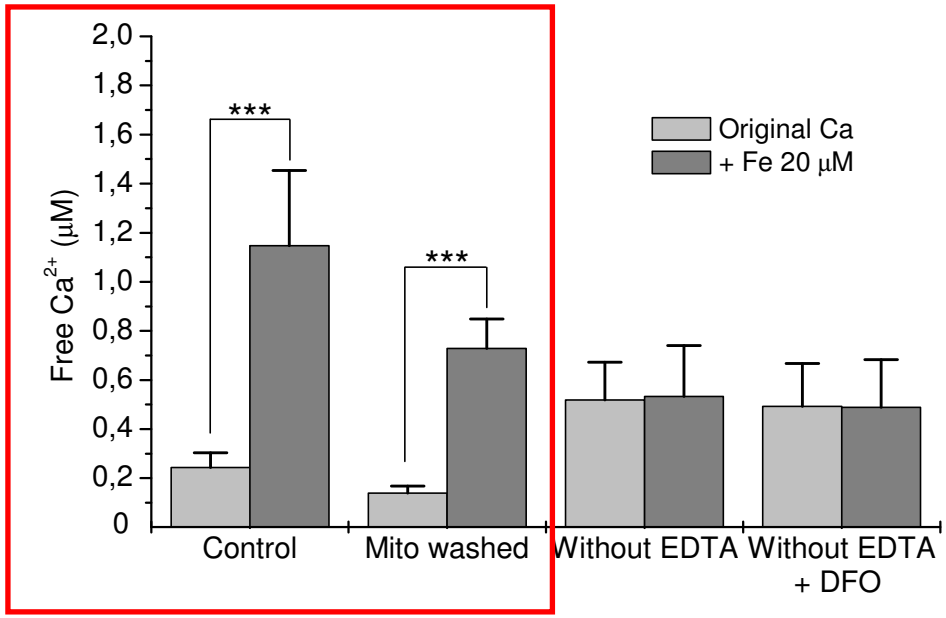
- Co když EDTA v našich pokusech funguje jako zdroj endogenního/kontaminujícího kalcia, železo se pak na EDTA váže s větší afinitou a toto kalcium uvolní do roztoku ?

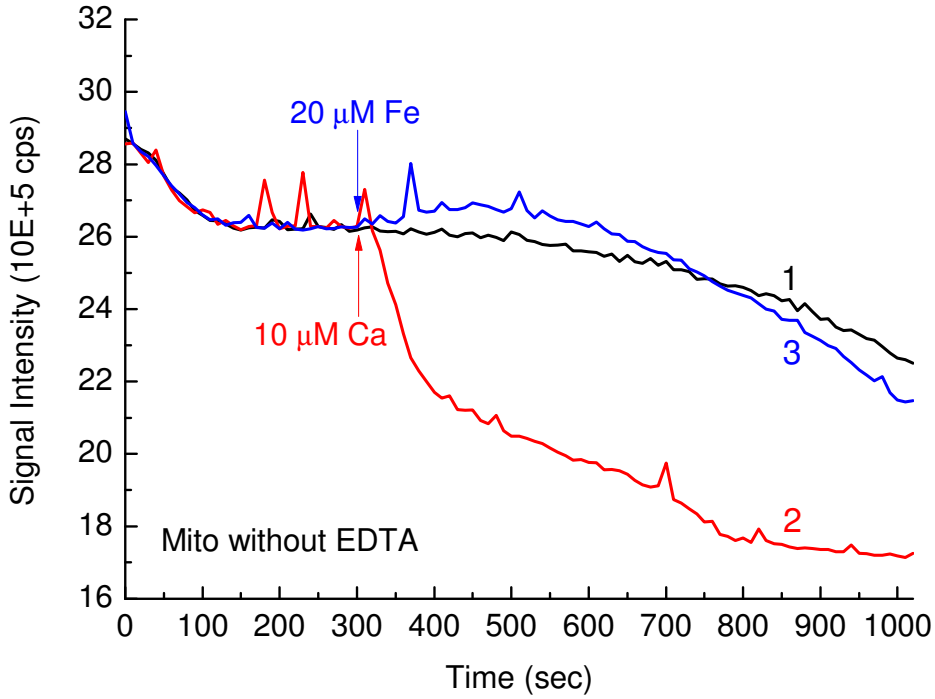


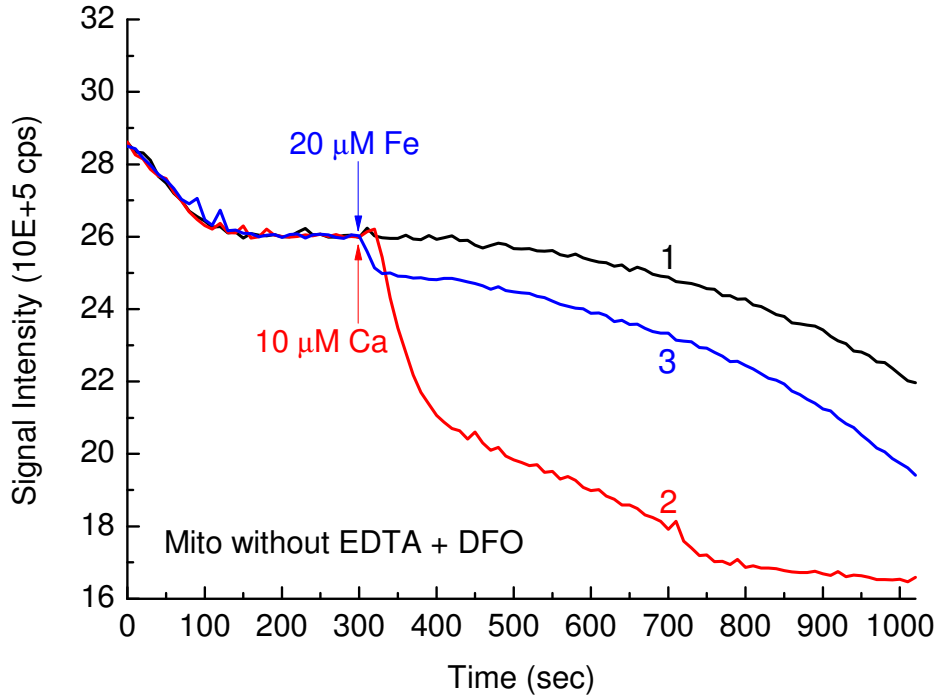

20 µM Fe
10 µM Ca
1
2
3
Control
Signal Intensity (10E+5 cps)
Time (sec)

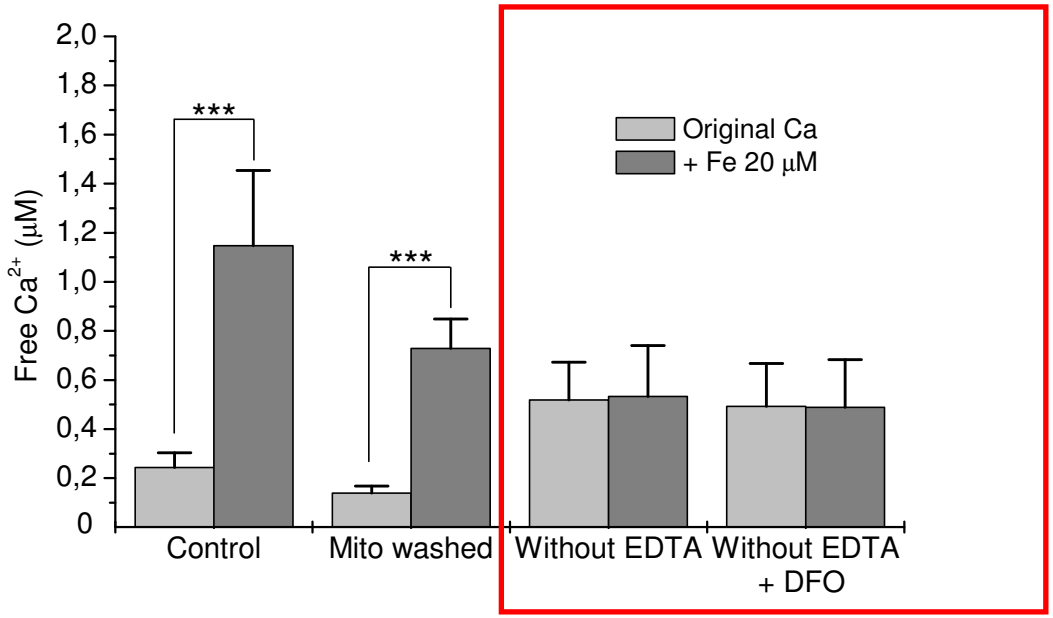

20 µM Fe
10 µM Ca
1
2
3
Mito washed
Signal Intensity (10E+5 cps)
Time (sec)

Mito s EDTA


Free Ca2+ (µM)
***
***
Original Ca
+ Fe 20 µM
Control
Mito washed
Without EDTA
Without EDTA + DFO







Mito bez EDTA

Závěr

- Základním mechanismem účinku Fe na indukci MPT je kompetice s Ca o vazbu na EDTA, nikoliv železem navozený oxidační stres.

…Experimentální artefakt,

anebo nový mechanismus toxicity železa?

Jak koncentrace volného Fe (7.5 μM), tak Ca (0.13 μM) v našich pokusech byly blízké fyziologické situaci.

Me^{2+} ionty jsou podobné … mnoho Ca chelátorů váže i Zn, FeII…

Pufrační schopnost cytosolu pro Ca je vysoká… přítomnost Ca-EDTA je tak blíže situaci in vivo než jednoduchý pufr.

V cytosolu je 100-300x menší koncentrace kyslíku než ve vnějším prostředí … FeII bude spíše soutěžit s Ca než se oxidovat

Spolupracovníci:

MUDr. Juraj Gáll

MUDr. Jan Škrha, Jr.

Mgr. Richard Buchal

MUDr. Eva Sedláčková

MUDr. Karina Verébová

J. Gáll, J. Škrha Jr., R. Buchal, E. Sedláčková, K. Verébová, J. Pláteník: **Induction of the mitochondrial permeability transition (MPT) by micromolar iron: Liberation of calcium is more important than NAD(P)H oxidation**
Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics 1817 (2012) 1537-1549

Podpořeno grantem GAUK 43/2006/C/1.LF a VZ MSM0021620807.