

Muutused energiaülekanne radades arengu käigus ja vananemisel, lähtudes süsteemibioloogilisest mudelitest

*Kersti Tepp**

Süsteemibioloogia on pidev liikumine lihtsamatelt mudelitelt keerulisemate poole. Võib öelda, et teadmiste omandamine toimub mööda spiraali: kasutades uut, kõrgema organiseerituse tasemega mudelit, leiame sama nähtust uurides, et selles toimub regulatsioon küll üldjoontes nii, nagu me olime eelnevalt avastanud, kuid lisanduvad uued, nn süsteemi tasemel omadused ja seosed, mida samu komponente eraldiseisvatena vaadeldes oli võimatu avastada (Saks *et al.*, 2009).

Bioenergeetikas toimus selline paradigmanihe, kui eraldatud mitokondrite uurimiselt liiguti edasi *in vivo* preparaaside (permeabiliseeritud rakud, fiibrid) uurimisele. See võimaldas hakata vaatlema mitte ainult seda, mis toimub mitokondris ja kuidas toodetakse ATP-d, vaid ka seda, kuidas toimub energiaülekanne mitokondrist energiatarbimise punktidesse (transporterid, ATPaasid) ja info liikumine sealt tagasi mitokondrisse, reguleerimaks selle toimimist.

Bioenergeetikas on üks parimaid mudeleid suure energiatarvidusega oksüdatiivne lihas, eriti südamelihhas. Hea näide uute,

*KBFI, kontakt: kersti.tepp@kbfi.ee

süsteemitasandi omaduste tekkest on näilise Michaelis-Menteni koefitsiendi (K_m) erinevus ADP suhtes rakkudes ja mitokondrites. Kui kasutati isoleeritud mitokondrite mudelit, saadi tulemuseks, et südamelihases eraldatud mitokondrite välismembraani difusioonitakistus adeniinnukleotiididele on suhteliselt väike: näiline K_m ADP suhtes oli suurusjärgus 20 μM . Samad mõõtmised mitokondritega *in situ*, täiskasvanud südamerakkudes, andsid $K_m(\text{ADP})$ väärtuseks 360 μM (Guzun *et al.*, 2009). Eelnevad uuringud on näidanud, et eriti nendes rakkudes paiknevad ensüümkompleksid ja organellid tihedalt üksteise kõrvale pakituna (nn *makromolekular crowding*) põhjustavad difusioonitakistuse olulist kasvu. Samuti toimub spetsiifiline sidestatus, seega on energiavoo transport mitokondrist müofibrillidesse ja teiste ATPaaside juurde üks olulisemaid lahendamist vajav probleem.

Südamelihases, kus energiatarve muutub suures ulatuses, on eriti oluline, et fosforrühmade ülekanne oleks efektiivne nii ATPaaside suunal kui ka informatsiooni liikumisena tagasi mitokondritesse. On näidatud, et vajaduse korral varieerub see voog erinevate ensümaatiliste radade vahel, millest südamelihases on olulisemad kreatiinkinaas (CK) ja adenülaatkinaas (AK) (Dzeja ja Terzic, 2003). Järgnevad uuringud südamerakkudega *in vivo* on näidanud, et mitokondri välismembraanil asuva pingest sõltuva kanali (VDAC) läbitavus on selektiivne: sellal kui ATP ja ADP läbitavus on takistatud (kõrge $K_m(\text{ADP})$), fosfokreatiini (PCr) transpordile piirangut pole (Timohhina *et al.* 2009). Seega terve südameraku puhul on ATP voo osakaal suhteliselt väike, valdav on otsene ülekanne sidestatud ensüümikomplekside kaudu.

Võrdlesime kardiomiotsüütides metaboolse kontrolli analüüsi meetodit kasutades hingamisahela komplekside ja ATP sünteesi soomiga seotud komplekside (fosforkandja, adeniin nukleotiidi translokaas (ANT), mitokondriaalne CK) osakaalu ATP sünteesi regulatsioonis. Mõõtmised viidi läbi kahtedel tingimustel: kui mitokondriaalne hingamine aktiveerida otseselt ADP lisamisega või kui ka CK süsteem on aktiveeritud. Viimasel juhul suurenes voo kontrollikoefitsientide summa mitu korda, lähenedes neljale (Tepp *et al.*, 2011). See näitab, et antud raja puhul on komplekside vahel tegemist otsese

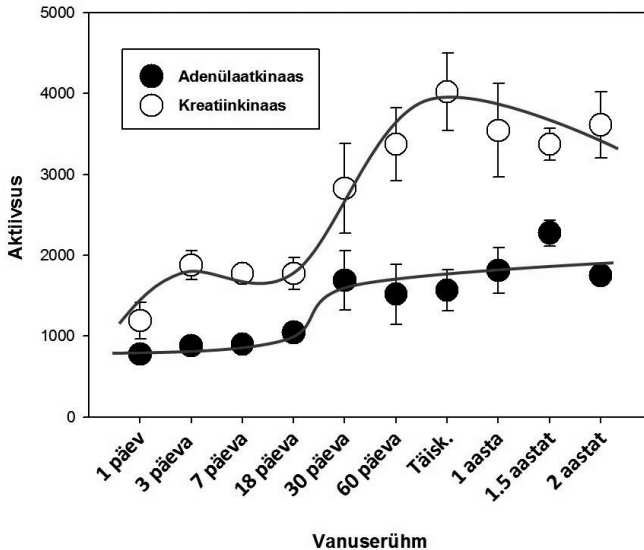
sidestatusega. Eriti kõrge ja samal ajal lähedase väärtusega olid voo kontrollikoefitsiendid mitokondriaalse CK ja ANT-i puhul. See tähendab, et need kompleksid on olulise regulatiivse tähtsusega ja moodustavad antud rajal sisuliselt ühtse kompleksi: inhibeerides ühte, inhibeerime me mõlema tööd.

Üks võimalusi, et täpsemalt mõista mitokondriaalse hingamise ja energiaülekande regulatsiooni olemust, on viia läbi uuringud arengu käigus ning vananemisel. Sünnijärgses arengus toimuvad südamelihases kiired muutused. Senine, valdavalt glükolüütilise energia tootmine asendub oksüdatiivse fosforüülimisega ning toimub kõrgeltorganiseeritud energiametabolismi väljakujunemine. Arengu käigus on võimalik teha järeldusi mitokondriaalse hingamise ja selle regulatsiooni kohta, leida, millise faktori väljaarenemine (näiteks ensüümkomplekside või tsütoskeleti valkude paiknemine) on järgneva protsessi (näiteks maksimaalse hingamiskiiruse saavutamise) eelduseks. Vananemisel toimuva taandarengu käigus on omakorda võimalik ühelt poolt kindlaks teha energiametabolismi eri osade omavahelisi seoseid ning määrata, milline muutus raku bioenergeetilises regulatsioonis omab kõige olulisemat kaalu lihase sooritusvõimekuse kadumises.

Meie laboris läbi viidud uuringud kaardistavad mitokondris toimuva oksüdatiivse fosforüülimise väljakujunemist, uurida muutusi energiaülekande radade profiilis südameraku sünnijärgse arengu jooksul ja võimalikke taandarenguid vananemisel. Uuringus kasutati Wistari rotte ja permeabiliseeritud kardiomiotsüüdi mudelit. Kesken-duti muutustele mitokondri välismembraani läbitavuse regulatsioonis $K_m(\text{ADP})$, samuti mõõdeti kolme olulisema energiaülekanderaja ensüümi: AK, CK ja heksokinaasi aktiivsuste muutusi sünnijärgse arengu käigus (Anmann *et al.*, 2014) ja vananemisel (Tepp *et al.*, 2017).

Ülekandel osalevate ensüümikomplekside aktiivse mõõtmise tulemustest nähtub, et samal ajal kui heksokinaasi aktiivsus püsib kogu eluea vältel samas vahemikus, suureneb nii CK kui ka AK aktiivsus esimeste sünnijärgsete päevade jooksul, mis on ootuspärane, kuna samal ajal toimub ka aeroobsele ainevahetusele üleminek. Järgneb

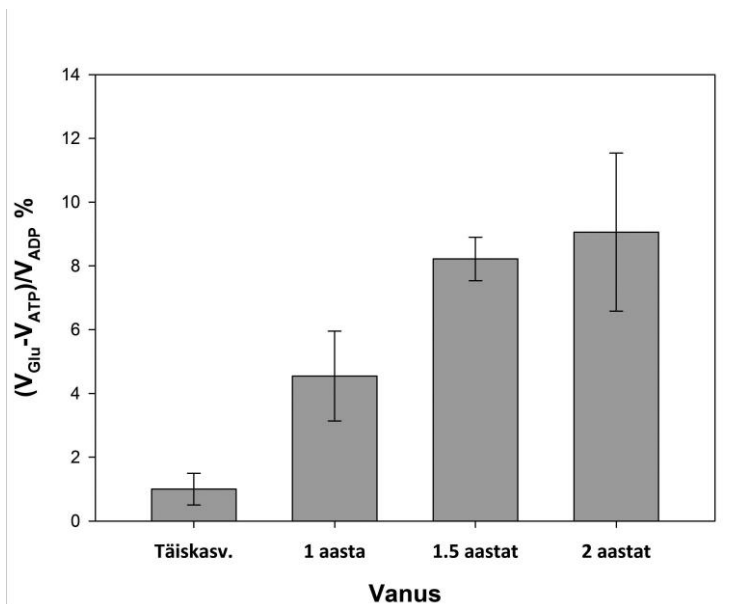
periood, mil aktiivsused püsivad samal tasemel (joonis 1). Selle aja jooksul viiakse südamelihase rakus läbi olulised struktuursed muutused ning nii mitokondrite kui ka tsütoskeleti paigutus muutub sarnaseks täiskasvanud raku omaga (Anmann *et al.*, 2014). Alates 1 kuu vanusest CK ja AK aktiivsuste kasv jätkub, kuni täiskasvanuga võrdse taseme saavutamiseni, mis AK puhul on 1 kuu vanuses. CK aktiivsuse suurenemine jätkub aga veel ka 3. elukuu jooksul (joonis 1). Antud mõõtmiste tulemused langevad kokku eelnevalt meie laboris läbi viidud oksügraafiliste mõõtmistega, kus kreatiiniga aktiveeritud hingamise kiirus saavutas täiskasvanuga võrdse taseme kolmanda elukuu lõpuks (Anmann *et al.*, 2014). Mõõtes samade ensüümide aktiivsusi vananemise käigus, selgus, et samal ajal kui AK aktiivsuses muutusi ei täheldatud, CK aktiivsus vananedes väheneb, kusjuures olulisim vähenemine on 1-aastaste vanuserühmas (mida Wistari liini rotil peetakse eluea kõvera kohaselt keskealisuse mudeliks).



Joonis 1. Energiaülekanega seotud ensüümide aktiivsused südamelihases. Muudetuna artiklist Tepp *et al.*, 2017

Olulised muutused toimusid energiametaboliitide difusioonitakistuses ($K_m(\text{ADP})$). Arengu käigus saavutati maksimaalne hingamiskiirus paari esimese elunädala jooksul, samal ajal $K_m(\text{ADP})$ väärtus jätkas kasvu kuni kolmanda elukuuni. Oluline on, et see areng korreleerus tubuliinide paigutuse muutusega rakus (Anmann *et al.*, 2014). Vananemisel saab huvitava tulemusena välja tuua, et statistiliselt oluline muutus $K_m(\text{ADP})$ väärtuses avaldub esmalt emastel rottidel 1,5 aasta vanuses; 2-aastaste rühmas on langus registreeritav juba mõlemast soost rottide südamerakkudes (Tepp *et al.*, 2017). Oksügraafiliselt mõõdetud hingamisahela komplekside aktiivsuste väärtustes statistiliselt olulist vähenemist vananemisel ei täheldatud. Samal ajal kreatiiniga aktiveeritud hingamise kiirus langes 1-aastaste grupis, samas vanuserühmas toimus ka üldine kreatiinkinaasi aktiivsuse vähenemine ja kreatiini mõjul toimuva $K_m(\text{ADP})$ muutuse vähenemine (Tepp *et al.*, 2017). Samal ajal AK, teise olulisema ülekaneraja aktiivsuse vähenemine ei olnud statistiliselt oluline, seega selle ülekaneraja olulisus energiametabolismis vanemas eas kasvab. Olulise tulemusena võib välja tuua ka glükoosi kui substraadi rolli suurenemist vananemise käigus (joonis 2), mida on täheldatud ka patoloogiliste muutuste korral südamelihases.

Kui vaadelda kirjandust bioenergeetika alastest uuringutest vananemise käigus toimuvatest muutustest lihasrakkude energia-tootmises, oli kuni viimaste aastateni valdav nn mitokondriaalne teooria. Lihasrakkude vähenenud töövõime põhjustajaks peeti mitokondri hingamisahela komplekside defekte ja vähenenud aktiivsust, mille tulemusena hapniku aktiivsete vormide (ROS) hulk kasvab, mis omakorda põhjustab kahjustusi hingamisahela kompleksidele ja mitokondriaalsele DNA-le, tekitades nii surnud ringi. Samal ajal on viimastel aastatel esitatud mitmeid tulemusi, mis, kasutades eraldatud mitokondrite asemel permeabiliseeritud lihaskiude või rakke, näitasid, et kuigi muutused mitokondrites toimuvad, on oksüdatiivse fosforüülimise vähenemine ja ROS-i roll vananemisel ülehinnatud.



Joonis 2. Glükoosi indeks. Muudetuna artiklist Tepp *et al.*, 2017

Meie laboris tehtud uuringu tulemused toetavad viimast teooriat: muutused oksüdatiivse lihase bioenergeetikas vananemisel ei ole põhjustatud valdavalt hingamisahela komplekside aktiivsuste vähenemisest, nagu on eelnevalt väidetud eraldatud mitokondritega tehtud uuringute alusel. Suurema tähtsusega on mitokondrist ATP-aasidesse toimuva energiaülekanne efektiivsuse vähenemine, mis on eriti ilmekas kreatiinkinaasi raja puhul. Samal ajal AK suhteline tähtsus energiaülekandes vananemise käigus kasvab.

Kirjandus

- Anmann, T., Varikmaa, M., Timohhina, N., Tepp, K., Shevchuk, I., Chekulayev, V., Saks, V., Käämbre, T. (2014). Formation of highly organized intracellular structure and energy metabolism in cardiac muscle cells during postnatal development of rat heart. *Biochim Biophys Acta*, 1837(8), 1350–1361.
- Dzeja, P. P., & Terzic, A. (2003). Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol*, 206(Pt 12), 2039–2047.
- Guzun, R., Timohhina, N., Tepp, K., Monge, C., Käämbre, T., Sikk, P., Kuznetsov, A. V., Pison, C., Saks, V. (2009). Regulation of respiration controlled by mitochondrial creatine kinase in permeabilized cardiac cells in situ. Importance of system level properties. *Biochim Biophys Acta*, 1787(9), 1089–1105.
- Saks, V., Monge, C., & Guzun, R. (2009). Philosophical basis and some historical aspects of systems biology: from hegel to noble - applications for bioenergetic research. *Int J Mol Sci*, 10(3), 1161–1192.
- Tepp, K., Puurand, M., Timohhina, N., Adamson, J., Klepinin, A., Truu, L., Shevchuk, I., Chekulayev, V., Käämbre, T. (2017). Changes in the mitochondrial function and in the efficiency of energy transfer pathways during cardiomyocyte aging. *Mol Cell Biochem*.
- Tepp, K., Shevchuk, I., Chekulayev, V., Timohhina, N., Kuznetsov, A. V., Guzun, R., Saks, V., Käämbre, T. (2011). High efficiency of energy flux controls within mitochondrial interactosome in cardiac intracellular energetic units. *Biochim Biophys Acta*, 1807(12), 1549-1561.
- Timohhina, N., Guzun, R., Tepp, K., Monge, C., Varikmaa, M., Vija, H., Sikk, P., Käämbre, T., Sackett, D., Saks, V. (2009). Direct measurement of energy fluxes from mitochondria into cytoplasm in permeabilized cardiac cells in situ: some evidence for Mitochondrial Interactosome. *J Bioenerg Biomembr*, 41(3), 259-275.

