

Zaburzenia genetycznych struktur mitochondrialnych i procesów energetycznych oraz ich rola w etiologii choroby niedokrwiennej serca

Disturbances of mitochondrial energetic processes and mt-DNA and their role in the etiology of coronary artery disease

Paweł Burchardt¹, Alicja Warowicka², Anna Goździcka-Józefiak², Henryk Wysocki¹

¹Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Poznań

²Zakład Wirusologii Molekularnej, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

Abstract

Apart from the theory of local inflammation in etiopathogenesis of the arteriosclerosis, hypotheses concerning the role of mitochondria in this process arise growing interest. Some proteins of the respiratory chain (OXPHOS) are coded on mitochondrial DNA. Their damage leads to interruption of oxidative phosphorylation, what in turns raises the free oxygen radicals (ROS) generation. The relationship of insufficient mechanism of mitochondrial ROS elimination with the initiation of the atherosclerosis was confirmed in experimental data. The mutagenesis of mitochondrial DNA is tied with the etiology of coronary artery disease (CAD). Some disturbances of the structure of mt-DNA are primal. The second group is probably determined by the effect of CAD influence on the structure of mt-DNA in cardiomyocytes. The mitochondrial energetic transformations are described in the article, with special regard on their potential influence on the process of mt-DNA mutagenesis and secondarily on the formation of CAD.

Key words: mt-DNA, coronary artery disease

Kardiol Pol 2010; 68, 8: 947–950

WSTĘP

O miażdżycy naczyń wieńcowych wiadomo już bardzo wiele. Ciągłe jednak nie jest znany czynnik inicjujący proces powstawania blaszki miażdżycowej. W świetle rozważań molekularnych niewiadomą pozostaje istnienie sygnału aktywującego czynnik jądrowy [1], który z kolei — w myśl teorii zaproponowanej przez Rossa — prowadzi do kaskadowo następujących po sobie reakcji o charakterze lokalnego odczynu zapalnego [2]. Nieznany pozostaje również mechanizm wyzwalający pęknięcie łącznotkankowej pokrywy stabilizującej blaszkę miażdżycową, czego klinicznym objawem jest ostry zespół wieńcowy.

Oprócz teorii lokalnego zapalenia w etiopatogenezie miażdżycy coraz większe zainteresowanie budzą hipotezy dotyczące roli mitochondriów [3]. Ze względu na obecność w ich strukturze materiału genetycznego uzupełniają teorię Rossa o niezwykle ważny w etiologii choroby niedokrwiennej serca czynnik dziedziczny.

Istnieją przesłanki, że zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu (ROS) przyczynia się do oksydacji LDL, uszkodzenia mitochondrialnego DNA i w końcowym efekcie do powstania blaszki miażdżycowej [4, 5]. Na mitochondrialnym DNA są kodowane niektóre składowe białek łańcucha oddechowego (OXPHOS). Ich uszkodzenie również powoduje

Adres do korespondencji:

dr n. med. Paweł Burchardt, Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej, Uniwersytet Medyczny im K. Marcinkowskiego, ul. Przybyszewskiego 49, 60–355 Poznań, tel: 867 19 16, 869 13 91, 869 13 94, faks: 869 16 89, e-mail: pab2@tlen.pl

Praca wpłynęła: 30.11.2009 r. Zaakceptowana do druku: 09.12.2009 r.

zaburzenie procesów „oddechowych”, co z kolei nasila syntezę ROS [6]. W badaniach eksperymentalnych potwierdzono związek niesprawnego mechanizmu mitochondrialnej eliminacji ROS [brak lub niewystarczająca ilość dysmutazy nadtlenkowej typu drugiego (SOD2)] z inicjowaniem procesu miażdżycowego. Kwestią otwartą pozostaje, czy w klinicznych przypadkach miażdżycy uszkodzenie mitochondrialnego DNA jest przyczyną czy następstwem choroby.

MITOCHONDRIA

Mitochondria to organelle, które na drodze ewolucyjnej wniknęły do komórki eukariotycznej, pełniąc w niej wyspecjalizowane funkcje energetyczne. Stanowią centrum sprzęgające procesy metabolicznych przemian węglowodanów, lipidów czy białek z powstawaniem ATP. W mitochondriach dochodzi zatem do przemiany energii zawartej w cząsteczkach wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) czy glukozy i zakumulowanie jej pod postacią wysokoenergetycznego wiązania fosforowego. Substratem dla wspomnianych przemian jest związek pośredni Acetylo-CoA, powstający w przebiegu tlenowej degradacji cząsteczki glukozy lub w wyniku utleniania długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Związek ten wraz z pirogronianem, także powstającym z glikolizy, jest włączany w matrix mitochondrialnej do cyklu kwasu cytrynowego i następnie obydwa są degradowane do dwutlenku węgla. W cyklu Krebsa dodatkowo powstaje zredukowany dinukleotydamiadoadeninowy (NADH₂). Zredukowany dinukleotydamiadoadeninowy jest z kolei donorem elektronów dla łańcucha oddechowego. Poszczególne składowe kompleksów białkowych tworzących łańcuch oddechowy są uszeregowane według wzrastającego potencjału oksydoredukcyjnego. Elektrony dostarczone z NADH na kompleks I wytracają swoją energię stopniowo, redukując ostatecznie cząsteczkę tlenu. Przepływ elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego tworzy gradient elektryczny (istnieje bowiem różnica potencjału oksydoredukcyjnego między kompleksem I a tlenem). Energia gradientu elektrycznego jest z kolei wykorzystywana, by aktywnie transportować kationy przez kanały jonowe białkowych kompleksów łańcucha oddechowego. Dochodzi zatem do wytworzenia różnicy stężeń tych jonów, czyli gradientu elektrochemicznego.

Reasumując, energia z utleniania substratów metabolicznych zostaje zamieniona na „siłę redukcyjną”. Ta jest z kolei źródłem elektronów dla łańcucha oddechowego, wywołując gradient protonowy, którego drugą ważną składową, obok gradientu elektrycznego, jest różnica stężeń kationów w poprzek błony mitochondrialnej [3].

ŁAŃCUCH ODDECHOWY

Łańcuch oddechowy jest zespołem około 40 białek pogrupowanym w 5 kompleksów enzymatycznych. Pierwszy to kompleks dehydrogenazy NADH. Kompleks ten przyjmuje elektrony od NADH, które przenoszone są następnie na gru-

py prostetyczne kompleksu I [mononukleotyd flawinowy, centra żelazosiarkowe (FES) o wzrastającym potencjale oksydoredukcyjnym]. Z kompleksu I elektrony są przenoszone na koenzym Q, stamtąd na kompleks III, czyli ubichinol-reduktazę cytochromu C (kompleks Cytochromu B-c1). Cztery elektrony poprzez cytochrom C trafiają do kompleksu IV, czyli kompleksu oksydazy cytochromu C, stamtąd zostają przeniesione na cząsteczkę tlenu, tworząc dwie cząsteczki wody. Kompleks II (dehydrogenaza bursztynianowa) jako jedyny nie jest kanałem jonowym. Przyjmuje elektrony od swojej grupy prostetycznej nukleotydu flawinoadeninowego i przekazuje je bezpośrednio na koenzym Q. Przepływ elektronów wzdłuż białek łańcucha oddechowego wyzwala gradient elektryczny, co umożliwia aktywny transport jonów H⁺ przez wewnętrzną błonę mitochondrialną do przestrzeni międzymbłonnej, czyli dochodzi do wytworzenia gradientu stężeniowego. Protony są pompowane przez kanały jonowe kompleksu oddechowego I, III i IV. W łańcuchu oddechowym występuje jeszcze kompleks Ho ATP-azy, nazywany także kompleksem V. Jest to kanał jonowy, który przepuszcza jony wodorowe do matrix mitochondrialnej zgodnie z gradientem stężeń. Energia wyzwolona w tym procesem powoduje zmianę konformacji kompleksu V, w następstwie czego przejście pojedynczego protonu umożliwia dołączenie kolejnej reszty kwasu fosforanowego do cząsteczki ADP. W ten sposób powstaje ATP. Cykl tych przemian zachodzi tak długo, jak długo są dostarczane substraty reakcji. W przypadku odpowiedniej ilości substratów czynnikiem limitującym proces jest odpowiednio wysokie stężenie ATP [3].

POWSTAWANIE WOLNYCH RODNIKÓW

Wolne rodniki tlenowe powstają w wyniku niecałkowitej redukcji tlenu w kompleksie I i III łańcucha oddechowego [7, 8]. Zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu ma miejsce przede wszystkim w stanie energetycznym 4 (czyli gdy dominują warunki niskiej podaży O₂, niewielkiej syntezy ATP i niewielkiego gradientu protonowego) [9]. Dodatkowo efekt ten jest potęgowany niedoborem ADP, NADH, FADH₂. Okazuje się, że reaktywne formy tlenu powstają nie tylko w miarę zwiększania podaży tlenu, ale również w warunkach niedotlenienia. Hipoksja nasila bowiem hamowanie cytochromu C przez tlenek azotu.

Reaktywna forma tlenu jest transformowana przez dysmutazy SOD1 i SOD2 do nadtlenku wodoru, natomiast H₂O₂ jest redukowany do cząsteczki wody przez kompleks peroksydazy glutationowej, która powoduje oksydację glutationu (GSH). Utleniony GSH jest ponownie redukowany przez reduktazę glutationową (katalazę), dla której substratem jest NADPH. Ciekawostką jest fakt, że katalaza znajduje się wyłącznie w mitochondriach kardiomiocytów [10].

Ważną rolę w powstawaniu wolnych rodników tlenowych odgrywa białko p66. Proteina ta jest również inhibitorem cytochromu C i prawdopodobnie odgrywa znaczącą rolę

w inicjacji procesów apoptozy. Sugeruje się, że hamowanie cytochromu C jest powodowane uwalnianiem, pod wpływem czynnika proapoptycznego, białka p66 z wspólnego kompleksu z białkiem mitochondrialnego szoku cieplnego (mt HSP70). Myszy transgeniczne pozbawione genu białka p66 były odporne na proces miażdżycowy wywołany wolnymi rodnikami tlenowymi oraz LDL [11–15]. Zwiększona podaż LDL sprzyja ich oksydacji, to zaś prowadzi do uwalniania cytochromu C do cytosololu, aktywacji kaspaz i powstawaniu proapoptycznego — zapalnego białka BAX [16]. Dochodzi także do zwiększania potencjału błonowego i w efekcie nasilenia objawów stresu oksydacyjnego.

Powstawanie ROS jest ograniczone dzięki białkom „rozprzegającym” (są kanałami jonowymi), które umożliwiają bierny transport kationów do matrix mitochondrialnej („przeciek”) i w efekcie zahamowanie strumienia elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego [17, 18].

Reasumując, wolne rodniki wpływają na oksydację frakcji lipidowych osocza, oksydację lipidów błon komórkowych (nie tylko mitochondrialnych), kumulację uszkodzeń w mitochondrialnym DNA i w efekcie zaburzenie wielu enzymów mitochondrialnych (SOD1, SOD2, dehydrogenazy pirogronianowej, akonitazy, dehydrogenazy L-ketoglutonowej).

MT-DNA

Ludzki mt-DNA jest kolistą podwójną cząsteczką przyłączoną do wewnętrznej błony mitochondrialnej [3]. Choroby mitochondrialne mogą być wywołane upośledzeniem białek kodowanych przez genom jądrowy (niewielka liczba schorzeń) lub wynikać z uszkodzeń białek kodowanych na genomie mitochondrialnym. Choroby mitochondrialne mogą być także spowodowane wzajemnym oddziaływaniem obydwóch genomów (jądrowego i mitochondrialnego). Genom mitochondrialny może być zmutowany pierwotnie (mutacje genów strukturalnych — zespół atrofii neurogennej itp.), ale również wtórnie, na przykład w sytuacji zwiększonej produkcji ROS. Mt-DNA cechuje się olbrzymią podatnością na uszkodzenia z powodu braku białek histonowych oraz całego szeregu enzymów, które fizjologicznie chronią DNA jądrowe przed mutagenezą [3, 19].

Logiczną konsekwencją zmniejszonej podaży tlenu jest stymulacja ekspresji genów łańcucha oddechowego [20, 21]. Każdy podział mitochondrialnego DNA kumuluje coraz to nowe uszkodzenia, co fenotypowo objawia się nieprawidłową strukturą lub ilością białek łańcucha oddechowego. Proces fosforylacji oksydacyjnej jest więc upośledzony. To z kolei nasila dodatkową syntezę ROS [20, 21]. Dodatkowo pula powstającego mt-DNA nie jest jednakowa (poliplazmia), co prowadzi do koegzystencji typu dzikiego i zmutowanego. Od tej chwili niewielka ilość formy zmutowanej w istotny sposób będzie już oddziaływała na energetyczną jakość fosforylacji oksydacyjnej.

Opisano cały szereg zmian mitochondrialnego DNA, które próbuje wiązać się z etiologią choroby niedokrwiennej serca [3].

Tylko niektóre z nich to pierwotne uszkodzenia mt-DNA. Drugą grupę stanowią skutki oddziaływania choroby niedokrwiennej na strukturę mt-DNA w kardiomiocytach. Brakuje natomiast doniesień określających możliwy związek samego procesu replikacji mitochondrialnego DNA z zaawansowaniem miażdżycy naczyń wieńcowych. Prace zespołu autorów niniejszego artykułu dotyczą molekularnej analizy fragmentu mitochondrialnego DNA, tak zwanej pętli D, odpowiedzialnej właśnie za jego replikację. Wstępne wyniki wykazują jednak, że mimo ogromnej zmienności tego fragmentu nie można wytypować wysoce swoistego i czułego markera dla zaawansowanej miażdżycy naczyń wieńcowych. Patrząc zaś z pewnym naukowym dystansem na rozważania dotyczące roli zmienności mt-DNA w etiologii wielu chorób, a zwłaszcza choroby niedokrwiennej serca, wydaje się, że niecelowe jest dalsze poszukiwanie określonych mutacji. Należałoby raczej zwrócić uwagę na zjawisko osobniczej podatności na mitochondrialną mutagenezę, a także możliwości jej zapobiegania i regulacji. Ze względu na zasadniczą niezależność mt-DNA od genomu jądrowego należy również się zastanowić, czy każda komórka organizmu jest w stanie nagromadzić podobną liczbę i zakres mutacji. Z racji różnego metabolizmu tkanek wydaje się, że zakres mutagenezы mt-DNA może być różny. Kolejnym etapem badań powinna być próba oddzielenia zmienności mutacyjnej nabytej od wrodzonej. Być może porównanie mt-DNA z wielu rodzajów komórek pozwoli na określenie wyjściowej sekwencji tego DNA.

Słuszną wydaje się koncepcja upatrywania podłoża wielu chorób w zaburzeniach procesu fosforylacji oksydacyjnej i powstawaniu destrukcyjnych wolnych rodników tlenowych. Dopóki jednak nie odkryje się wspólnego mechanizmu, prawidłowości kierującej tym procesem, bardzo trudno będzie wnioskować o roli dynamicznie zmieniającego się mitochondrialnego DNA w etiologii miażdżycy naczyń wieńcowych oraz innych chorób.

Piśmiennictwo

1. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999; 340: 115–126.
2. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A et al. Activated transcription factor nuclear factor- κ B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest*, 1996; 97: 1715–1722.
3. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ. Res*, 2007; 100: 460–473.
4. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE et al. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, 1989; 320: 915–924.
5. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 1999; 283: 1482–1488.
6. Puddu P, Puddu GM, Galletti L, Cravero E, Muscari A. Mitochondrial dysfunction as an initiating event in atherogenesis: a plausible hypothesis. *Cardiology*, 2005; 103: 137–141.
7. Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev*, 2000; 80: 315–360.
8. Han D, Canali R, Rettori D, Kaplowitz N. Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Mol Pharmacol*, 2003; 64: 1136–1144.

9. Kokoszka JE, Coskun P, Esposito LA, Wallace DC. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 2278–2283.
10. Phung CD, Ezieme JA, Turrens JF. Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 1994; 315: 479–482.
11. Orsini F, Migliaccio E, Moroni M et al. The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential. *J Biol Chem*, 2004; 279: 25689–25695.
12. Trinei M, Giorgio M, Cicalese A et al. A p53-p66Shc signaling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*, 2002; 21: 3872–3878.
13. Migliaccio E, Giorgio M, Mele S et al. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*, 1999; 402: 309–313.
14. Nemoto S, Finkel T. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science*, 2002; 295: 2450–2452.
15. Nemoto S, Combs CA, French S et al. The mammalian longevity-associated gene product p66shc regulates mitochondrial metabolism. *J Biol Chem*, 2006; 281: 10555–10560.
16. Yao PM, Tabas I. Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J Biol Chem*, 2001; 276: 42468–42476.
17. Teshima Y, Akao M, Jones SP, Marban E. Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res*, 2003; 93: 192–200.
18. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C et al. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet*, 2000; 26: 435–439.
19. Yakes M, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94: 514–519.
20. Corral-Debrinski M, Stepien G, Shoffner JM et al. Hypoxemia is associated with mitochondrial DNA damage and gene induction. Implications for cardiac disease. *JAMA*, 1991; 266: 1812–1816.
21. Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Lott MT, Wallace DC. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat Res*, 1992; 275: 169–180.