

სიგმა-1 რეცეპტორის ლიგანდების ზემოქმედება მიტოქონდრიის
ბიოენერგეტიკაზე ფიზიოლოგიური და ამილოიდ-β პეპტიდით
გამოწვეული პათოლოგიური მდგომარეობის დროს

ნინო გოგუაძე

*სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და საინჟინრო ფაკულტეტზე სიცოცხლის
შემსწავლელ მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნების
შესაბამისად*

სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა სადოქტორო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: დავით მიქელაძე, სრული პროფესორი, დოქტორი
ბიოქიმიაში.

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თბილისი, 2020

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი (სიგმა-1 რეცეპტორის ლიგანდების ზემოქმედება მიტოქონდრიის ბიოენერგეტიკაზე ფიზიოლოგიური და ამილოიდ-β პეპტიდით გამოწვეული პათოლოგიური მდგომარეობის დროს) წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

ნინო გოგუაძე

16/12/2019

აბსტრაქტი

სიგმა-1 რეცეპტორი (Sig-1R) წარმოადგენს მიტოქონდრიასთან-ასოცირებულ ენდოპლაზმური ბადის (ეზ) მემბრანებზე (MAMs) არსებულ ცილა-შაპერონს, რომელიც ინოზიტოლ-1,4,5, ტრიფოსფატი-ის რეცეპტორებთან (IP₃Rs) ინტერაქციით ეზ-სა და მიტოქონდრიას შორის Ca²⁺-ის მიმოცვლის მოდულაციას უწყობს ხელს. Sig-1R ჭარბად ექსპრესირდება ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში და მისი აქტივაცია იწვევს ალცჰაიმერის დაავადების ნეირომოდულაციას და ნეიროპროტექციას ექსპერიმენტების in vitro და in vivo მოდელებში. Sig-1R ზეგავლენა მიტოქონდრიის პათოფიზიოლოგიასა და დაღმავალ სასიგნალო სისტემებზე არ არის სრულად გარკვეული.

ჩვენი კვლევის შედეგად გაირკვა, რომ სიგმა-1 რეცეპტორი ფიზიკურად არის დაკავშირებული მიტოქონდრიასთან ასოცირებულ ცილებთან, კერძოდ ერთ-ერთ მცირე, GTP-დამაკავშირებელ ცილა – Rac1-თან, რომლის საშუალებითაც, ჩვენი ვარაუდით, სიგმა-1 რეცეპტორის ლიგანდები ახორციელებენ უჯრედშიდა პროცესების რეგულაციას. გარდა ამისა, ჩვენ მიერ ჩატარებული გამოკვლევებით დადგინდა Sig-1R ლიგანდების ეფექტი თავის თავის ტვინის მიტოქონდრეებში ჟანგბადის რეაქტიული ფორმების (ROS) პროდუქციაზე, მიტოქონდრიული სუნთქვის და სუნთქვით ჯაჭვში შემავალი კომპლექსების აქტივობაზე ფიზიოლოგიურ პირობებში და Aβ₁₋₄₂ პეპტიდის დამატების შემდეგ. კერძოდ, ნანახი იყო, რომ Sig-1R აგონისტებმა PRE-084, ANAVEX1-41, AN1-41, ANAVEX3-71, AN3-71, DHEAs, დონეპეზილმა გაზარდეს მიტოქონდრიული ROS-ი Sig-1R ანტაგონისტის მიმართ სენსიტიური მექანიზმით, მაგრამ შეამცირეს Aβ₁₋₄₂-ის მიერ ინდუცირებული ROS-ის ზრდა. გარდა ამისა, გაირკვა, რომ Sig-1R ლიგანდებმა (აგონისტებმა და ანტაგონისტებმა) არ იმოქმედეს მიტოქონდრიულ რესპირაციაზე, თუმცა შეამცირეს Aβ₁₋₄₂-ის მიერ გამოწვეული დარღვევები. Sig-1R აგონისტების (PRE-084, AN1-41, ANAVEX2-73, AN2-73, AN3-71) დამატებამ გაზარდა მიტოქონდრიის I კომპლექსის აქტივობა, Ca²⁺ დამოკიდებული და Sig-1R ანტაგონისტის მიმართ - სენსიტიური მექანიზმით. Sig-1R ლიგანდებს ეფექტი არ მოუხდენიათ მიტოქონდრიის II, III, და IV კომპლექსების აქტივობაზე. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ Sig-1R-აგონისტების მიერ ინდუცირებული ROS-ის პროდუქცია განპირობებულია I

კომპლექსის აქტივაციით, რადგან სიგმა ლიგანდებს, ROS-ის სხვა წყაროების აქტივობაზე (NADPH ოქსიდაზა (NOX) და სუპეროქსიდ დისმუტაზა (SOD)) ეფექტი არ მოუხდენიათ. $A\beta_{1-42}$ -მა მნიშვნელოვნად დათრგუნა I და IV კომპლექსების აქტივობა, ხოლო Sig-1R აგონისტებმა შეამცირეს $A\beta_{1-42}$ -ით გამოწვეული ეფექტი. აქედან გამომდინარე, შესაძლებელია დავასკნათ, რომ Sig-1R-ის ცვლილებებმა მიტოქონდრიაში ROS-ზე ორმხრივი, ინისა და იანგის მსგავსი ეფექტი გამოიწვია: ROS-ის საშუალო დონით მატება, როგორც ფიზიოლოგიური სასიგნალო მექანიზმი და მნიშვნელოვანი ანტი-ოქსიდანტური ეფექტი პათოლოგიური (A β) მდგომარეობისგან დასაცავად.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: სიგმა-1 რეცეპტორი, მიტოქონდრია, ოქსიდაციური სტრესი, ამილოიდ ტოქსიკურობა.

Abstract

The sigma-1 receptor (Sig-1R) is a chaperone protein residing at mitochondria-associated endoplasmic reticulum (ER) membranes (MAMs), where it modulates Ca^{2+} exchange between the ER and mitochondria by interacting with inositol-1,4,5 trisphosphate receptors (IP_3Rs). The Sig-1R is highly expressed in the central nervous system and its activation stimulates neuromodulation and neuroprotection, for instance in Alzheimer's disease (AD) models in vitro and in vivo. Sig-1R effects on mitochondria pathophysiology and the downstream signaling are still not fully understood.

Based on our findings we discovered that the Sigma-1 receptor is physically connected with mitochondria associated structural proteins, such as one of the small GTP-associated proteins Rac. By modulating Rac-Sig-1R interaction, Sig-1R ligands control intracellular processes.

We here evaluated the impacts of Sig-1R ligands in mouse mitochondria preparations on reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial respiration, and complex activities, in physiological condition and after direct application of amyloid $\text{A}\beta_{1-42}$ peptide. Sig-1R agonists PRE-084, ANAVEX1-41, AN1-41, ANAVEX3-71, AN3-71, DHEAs, donepezil increased mitochondrial ROS in a Sig-1R antagonist-sensitive manner but decreased $\text{A}\beta_{1-42}$ -induced increase in ROS. Sig-1R ligands (agonists or antagonists) did not impact respiration but attenuated $\text{A}\beta_{1-42}$ -induced alteration. Sig-1R agonists (PRE-084, AN1-41, ANAVEX2-73, AN2-73, AN3-71) increased complex I activity, in a Ca^{2+} -dependent and Sig-1R antagonist-sensitive manner. Sig-1R ligands failed to affect complex II, III, and IV activities. The increase in complex I activity explains the Sig-1R-induced increase in ROS since ligands failed to affect other sources of ROS accumulation in mitochondria and homogenates, namely NADPH oxidase (NOX) and superoxide dismutase (SOD) activities. Furthermore, $\text{A}\beta_{1-42}$ significantly decreased the activity of complexes I and IV and Sig-1R agonists attenuated the $\text{A}\beta_{1-42}$ -induced complex I and IV dysfunctions. Sig-1R activity in mitochondria therefore results in a Ying-Yang effect, by triggering moderate ROS increase acting as a physiological signal and promoting a marked anti-oxidant effect in pathological ($\text{A}\beta$) conditions.

Key Words: Sigma-1 receptor, Mitochondria, Oxidative stress, Amyloid toxicity

მადლობა

ეს სადისერტაციო ნაშრომი ეძღვნება ჩემი პირველი ხელმძღვანელის, პროფესორ ნინო ნაცვლიშვილის ხსოვნას, რომლის თანადგომასა და მხარდაჭერას ყოველთვის ვგრძნობდი.

წარმოდგენილი სადისერტაციო კვლევის ნაწილი შესრულებულია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის ქიმიური ბიოლოგიის ინსტიტუტში. ინსტიტუტის თითოეული წევრისაგან, მათ შორის ინსტიტუტში მყოფი დოქტორის წოდების მამიებელი სტუდენტებისაგან კვლევის თითოეულ ეტაპზე ვგრძნობდი უზომო თანადგომას.

განსაკუთრებული მადლობა მინდა გადავუხადო ჩემს ხელმძღვანელს ბ.ნ დავით მიქელაძეს, რომელმაც მთელი კვლევის პერიოდში, სხვადასხვა საკითხზე მსჯელობისას მასწავლა და მომცა თავისუფლად ფიქრისა და აზროვნების საშუალება. ასევე, ამავე ინსტიტუტის წევრს ელენე ჟურავლიოვას, რომელიც კვლევის მანძილზე მუდმივად მაძლევდა რჩევებს და მიწევდა ტექნიკურ დახმარებას.

მინდა დიდი მადლობა გადავუხადო ერასმუს მუნდუსის გაცვლით პროგრამას „Euroeast“ და ჩემს ფრანგ მენტორს მონპელიეს უნივერსიტეტიდან: დოქტორ ტანგი მორისს და მისი ლაბორატორიის (INSERM U1198) ყოფილ და ამჟამინდელ წევრებს ტექნიკური დახმარებისათვის. პროფესორ მორისის ლაბორატორიაში ვისწავლე და უფრო ფართოდ შევიცანი კვლევაზე მუშაობის მეთოდები და სტილისტიკა. ასევე, მინდა მადლობა გადავუხადო კომპანია Anavex Life Sciences (New York, USA), რომელმაც საფრანგეთში ჩატარებული კვლევა ნაწილობრივ დააფინანსა. კომპანიას არ მიუღია მონაწილეობა კვლევის დიზაინის და მონაცემთა ანალიზის მომზადებაში.

მინდა დიდი მადლობა გადავუხადო ილიას უნივერსიტეტის რექტორატს სამეცნიერო კონფერენციების სამგზავრო ხარჯების დასაფარად გაწეული ფინანსური დახმარებისთვის.

სარჩევი

სარჩევი.....	vi
სურათების ჩამონათვალი.....	ix
აბრევიატურის ჩამონათვალი.....	x
შესავალი.....	1
სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა.....	5
თავი 1. მიტოქონდრია და მისი მნიშვნელობა ალცჰაიმერის დაავადების განვითარებასა და პროგრესში.....	5
1.1. ნეიროდეგენერაციული დაავადებების ზოგადი მიმოხილვა (აქცენტი ალცჰაიმერის დაავადებაზე).....	5
1.2. Rho GTP-აზები და მათი როლი ალცჰაიმერის დაავადების პათოგენეზში.....	7
1.3. მიტოქონდრია, როგორც ერთ-ერთი სამიზნე ორგანო ალცჰაიმერის დაავადების დროს.....	9
1.4. სუნთქვითი ჯაჭვის კომპლექსები ალცჰაიმერის დაავადებების დროს.....	11
1.5. რეაქტიული ჟანგბადის ფორმები და მათი როლი ალცჰაიმერის დაავადების განვითარებაში.....	16
1.6. კალციუმი და მიტოქონდრია.....	19
თავი 2. სიგმა-1 რეცეპტორი და მისი ფუნქციები.....	22
2.1 მიტოქონდრიასთან ასოცირებული ენდოპლაზმური ბადის მემბრანები (MAMs) და მათი ფუნქცია.....	22
2.2 სიგმა-1 რეცეპტორის სტრუქტურა, ფუნქცია, ექსპრესია, ლიგანდები და პარტნიორები.....	23
თავი 3. სიგმა-1 რეცეპტორის როლი ალცჰაიმერის დაავადების განვითარებასა და მიმდინარეობაში.....	26
მეთოდოლოგია.....	29
1.1 რეაგენტები.....	29

1.2 ცხოველები.....	29
1.3 მიტოქონდრიის გამოყოფა თავის თავის ტვინიდან.....	30
1.4 მიტოქონდრიის გამოყოფა ხარის თავის ტვინიდან.....	30
1.5 რეაქტიული ჟანგბადის სახეობების გაზომვა.....	31
1.6 ჟანგვითი ფოსფორილირების გაზომვა.....	31
1.7 მიტოქონდრიის სუნთქვით ჯაჭვში შემავალი ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრა.....	32
1.7.1 I კომპლექსის აქტივობის განსაზღვრა (NADH უბიქინონ ოქსიდორედუქტაზა).....	32
1.7.2 II კომპლექსის აქტივობის განსაზღვრა (სუქცინატდეჰიდროგენაზა).....	32
1.7.3 III კომპლექსის აქტივობის განსაზღვრა (უბიქინოლ ციტოქრომ c რედუქტაზა).....	33
1.7.4 IV კომპლექსის აქტივობის განსაზღვრა (ციტოქრომ c ოქსიდაზა).....	33
1.8 NADPH ოქსიდაზას (NOX)-ის აქტივობის განსაზღვრა.....	33
1.9 სუპეროქსიდდისმუტაზას (SOD) აქტივობის განსაზღვრა.....	34
1.10 იმუნოპრეციპიტაცია და Western Blotting.....	34
1.11 Bad-ის ფოსფორილირების ცდა.....	35
1.12 სტატისტიკური ანალიზი.....	35
მიღებული შედეგები და მათი განხილვა.....	36
თავი 1 Rac1-ის და Sig-1R-ის ინტერაქციის შესწავლა.....	36
1.1 Rac1 უკავშირდება Sig-1R-ს ჰეტეროპროტეინული კომპლექსის მეშვეობით.....	36
1.2 Sig-1R ლიგანდები მოქმედებენ Rac1-ის დაღმავალ ეფექტორებზე	39
შედეგების განხილვა (თავი1).....	40
თავი 2. Sig-1R ლიგანდების ეფექტები თავის თავის ტვინის მიტოქონდრიაზე ფიზიოლოგიურ პირობებში.....	42
თავი 3. Sig-1R ლიგანდების ეფექტები პათოლოგიური მდგომარეობისას (ამილოიდ ცილით გამოწვეული ტოქსიკურობა).....	52
შედეგების განხილვა (თავი 2, 3).....	57

დასკვნები.....	65
გამოყენებული ლიტერატურა.....	67

სურათების ჩამონათვალი

სურათი 1. ალცჰაიმერის დაავადების პათოგენეზი.....	6
სურათი 2. მიტოქონდრიის მატრიქსი და ელექტრონების გადამტანი სისტემა.....	12
სურათი 3. რეაქტიული ჟანგბადის ფორმები (ROS) და მათი წარმოქმნა.....	17
სურათი 4. კალციუმის მიმოცვლა მიტოქონდრიაში.....	20
სურათი 5. (+) პენტაზოცინის (P), ჰალოპერიდოლის (H), და გუანინ ნუკლეოტიდების ეფექტი Sig-1R, Rac1 და Bcl-2 ინტერაქციაზე.....	36
სურათი 6. (+)პენტაზოცინის(P) და ჰალოპერიდოლის(H) ეფექტი Total Bad და Bad(pSer112) მიტოქონდრიულ ლიზატში.....	39
სურათი 7. Sig-1R ლიგანდების ეფექტი მიტოქონდრიული ROS-ის წარმოქმნაზე.....	43
სურათი 8. Sig-1R ლიგანდების მოქმედება NOX-ის და SOD-ის აქტივობაზე.....	45
სურათი 9. Sig-1R ლიგანდების ეფექტები თავის ტვინის მიტოქონდრიის ჟანგბადის მოხმარებაზე (State 3 და RCR).....	46
სურათი 10. Sig-1R აგონისტების და ანტაგონისტების მოქმედება I კომპლექსის აქტივობაზე ფიზიოლოგიურ პირობებში.....	48
სურათი 11. Sig-1R ლიგანდების გავლენა II-IV კომპლექსების აქტივობაზე ფიზიოლოგიურ პირობებში.....	50
სურათი 12. Aβ პეპტიდის ზეგავლენა ROS-ის დონეზე მიტოქონდრიაში.....	52
სურათი 13. Aβ ₁₋₄₂ ეფექტი მიტოქონდრიულ რესპირაციაზე.....	54
სურათი 14. Sig-1R ლიგანდების ეფექტები I და IV კომპლექსის Aβ ₁₋₄₂ -ინდუცირებულ ცვლილებებზე.....	55

აბრევიატურის ჩამონათვალი

ADP - ადენოზინ დიფოსფატი

APP - ამილოიდის წინამორბედი ცილა

ATP - ადენოზინ ტრიფოსფატი

Aβ - ბეტა ამილოიდი

ABAD - ამილოიდთან დაკავშირებული ალკოჰოლდეჰიდროგენაზა

BACE1 - ბეტა სეკრეტაზა 1

Bcl2 – B უჯრედის ლიმფომა 2

DCIP - 2,6 დიქლორფენოლინდოლი

DHEAs - დეჰიდროეპიანდროსტერონ-3 სულფატი

DRP1 - დინამინ დაკავშირებული ცილა 1

ETC - ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვი

FADH₂ - აღდგენილი ფლავინ-ადენინ დინუკლეოტიდი

GppNHp - არაჰიდროლიზებადი გუანინ ტრიფოსფატის ანალოგი

GTP - გუანინ ტრიფოსფატი

IP₃Rs - ინოზიტოლ-1,4,5, ტრიფოსფატ-ის რეცეპტორები

MCU - მიტოქონდრიული Ca²⁺-ის უნიპორტერ კომპლექსი

mM - მილიმოლი

NAD⁺ - ნიკოტინამიდ ადენინდინუკლეოტიდი

NADH - აღდგენილ ნიკოტინამიდ ადენინდინუკლეოტიდი

PAK - p-21-აქტივირებული კინაზა

Q - უბიქინონი

QH₂ - უბიქინოლი

Rac1 – Ras-თან დაკავშირებული C3 ბოტულიზმის ტოქსინის სუბსტრატი 1

RCR (respiration control ration) - რესპირაციის საკონტროლო თანაფარდობა

ROS - ჟანგბადის რეაქტიული ფორმები

MAMs - მიტოქონდრიასთან ასოცირებული ენდოპლაზმური ბადის მემბრანები

Sig-1R - სიგმა-1 რეცეპტორი

SOD - სუპეროქსიდ დისმუტაზა

μ M - მიკრომოლი

VDACs - ვოლტაჟ დამოკიდებული ანიონ-სელექციური არხები

WB - ვესტერნ ბლოტინგი

ად - ალცჰაიმერის დაავადება

ედ / ER- ენდოპლაზმური ბადე

შესავალი

ჟანგვა-აღდგენითი რეაქციები და მათ მიერ ინიცირებული სასიგნალო პროცესები მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ უჯრედის ფიზიოლოგიურ თუ პათოლოგიურ პროცესებში. ისინი ზეგავლენას ახდენენ უჯრედის მრავალ ფუნქციაზე: დიფერენციაციის, პროლიფერაციისა და აპოპტოზის ჩათვლით (Giachin et al. 2016; Stram and Payne 2016; Srivastava 2016).

მიტოქონდრია, როგორც ჟანგბადის რეაქტიული ფორმების (ROS) წარმომქმნელი, მნიშვნელოვან როლს ასრულებს უჯრედის ფუნქციონირებაში. ნორმალური, ფიზიოლოგიური მდგომარეობისას, უჯრედული სუნთქვის დროს ელექტრონის ტრანსპორტის შედეგად მიტოქონდრია წარმოქმნის ROS-ს (Rigoulet, Yoboue, and Devin 2011). ამ ბიოქიმიური პროცესის შედეგად წარმოქმნილი მიტოქონდრიული ROS-ი, ჟანგვითი ფოსფორილების შუალედურ პროდუქტად ითვლება. მიტოქონდრიის მიერ ROS-ის წარმოქმნის დაქვეითება ზეგავლენას ახდენს უჯრედულ სასიგნალო მექანიზმებზე.

ROS-ის გარკვეული დონე აუცილებელია სხვადასხვა ბიოქიმიური პროცესის სტიმულირებისათვის და არსებობს ROS-ის კონცენტრაციის ზღვრული დონე, რის შემდეგაც, ROS-ი ხდება უჯრედისთვის საზიანო და იწვევს ოქსიდაციურ სტრესს. ისეთი ნეიროდეგენერაციული დაავადებების პათოგენეზისას, როგორიცაა ალცჰაიმერის დაავადება (ად) მიტოქონდრიული დისფუნქცია და ოქსიდაციური სტრესი ნეირონული სინაფსის ფუნქციის დარღვევისა და უჯრედის დეგენერაციის გამომწვევი ერთ-ერთი მთავარი ფაქტორია.

ად მსოფლიოში გავრცელებული დემენციაა, რომელიც კლინიკურად ხასიათდება პროგრესული და შეუქცევადი კოგნიტური ფუნქციების დაქვეითებით. პათოლოგიური სურათის მიხედვით, ად-ის დროს აღინიშნება ამილოდ- β ($A\beta$) ცილით შემდგარი უჯრედგარე სენილური ფოლაქები და უჯრედშიგა, ნეიროფიბრილური ხვეულები, რომლებიც ჰიპერფოსფორილირებული ტაუ ცილით არის წარმოდგენილი (Selkoe 2004).

კვლევები ტრანსგენურ ად-ის თაგვის მოდელიდან გვიჩვენებენ რომ ად-ის პათოგენეზის განვითარებისას ოქსიდაციური დაზიანება წინ უსწრებს ამილოიდური ნაწილაკების ჩამოყალიბებას. β ამილოიდური ($A\beta$) ცილების ოლიგომერული ფორმების

დაგროვება მონაწილეობს ნეირონული და არანეირონული უჯრედების დეგენერაციაში. უფრო მეტიც, Aβ გროვდება მიტოქონდრიის შიგნითაც, სავარაუდოდ ორგანელას გარე მემბრანის ტრანსლოკაზა ფორის კომპლექსის მეშვეობით და პირდაპირ თრგუნავს მიტოქონდრიულ სუნთქვით ჯაჭვს და კომპლექსების აქტივობას (Parks et al. 2001; Hernandez-Zimbron et al. 2012; Tsukada et al. 2014).

მიტოქონდრიასთან ასოცირებული ენდოპლაზმური ბადის მემბრანა (MAMs) წარმოადგენს ენდოპლაზმური ბადის სუბდომენს, რომელიც ფიზიკურად და ბიოქიმიურად დაკავშირებულია მიტოქონდრიასთან (Rusinol et al. 1994; Csordás et al. 2006; Hayashi, Maurice, and Su 2000; Hayashi et al. 2009). MAM-ი უჯრედის დინამიური კომპარტმენტია, მისი ცილოვანი შემადგენლობა, მნიშვნელოვნად იცვლება უჯრედის მოთხოვნილების მიხედვით. დაახლოებით 75-მდე ცილაა MAM-თან ასოცირებული; კალციუმის ჰომეოსტაზში, ქოლესტეროლის მეტაბოლიზმსა და ფოსფოლიპიდების მეტაბოლიზმში მონაწილე ცილების ჩათვლით.

MAM-ის ერთ-ერთ რეზიდენტ ცილას წარმოადგენს ცილა-შაპერონი სიგმა-1 რეცეპტორი (Sig-1R). Sig-1R-ის მრავალ პარტნიორ ცილას შორის არის, ინოზიტოლ-1,4,5, ტრიფოსფატ რეცეპტორი (IP₃R) და იმუნოგლობულინ დამაკავშირებელი ცილა (BiP). სიგმა-1 რეცეპტორის აქტივაცია ხელს უწყობს უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობის ზრდას Ca²⁺-ის სასიგნალო მექანიზმების გააქტივებით ენდოპლაზმურ ბადესა და მიტოქონდრიას შორის. ასევე, Sig-1R-ი ხელს უწყობს ენდოპლაზმურ ბადესა და ბირთვს შორის ინფორმაციის მიმოცვლას, რაც ანტიოქსიდანტური ნაერთების გამოყოფას განაპირობებს. Sig-1R-ის დისფუნქცია შეინიშნება ისეთი დაავადებების დროს როგორცაა, წამლდამოკიდებულება, შიზოფრენია, დეპრესია, იშემია, ალცჰაიმერის დაავადება და სხვა ნეიროდეგენერაციული დაავადებები (Maurice et al. 2019; Su et al. 2016). Sig-1R-ის გამააქტივებელი ლიგანდები წარმოადგენენ ანტიდეპრესანტ, ანტიამნეზიურ და ნეიროპროტექციულ საშუალებებს. მაგალითად, Sig-1R-ის სელექციური აგონისტი PRE-084, ან არასელექციური ANAVEX2-73 პოტენციურ ნეიროპროტექტანტებს წარმოადგენენ Aβ ტოქსიკოზის წინააღმდეგ ად-ის არატრანსგენურ და ტრანსგენურ მოდელებში (Maurice et al. 2019). კერძოდ, აღნიშნულმა Sig-1R ლიგანდებმა შეძლეს

უჯრედის პროტექცია მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის დისფუნქციის, ოქსიდაციური სტრესის და აპოპტოზისაგან. $A\beta^{25-35}$ ინექციებულ თაგვებში, ANAVEX2-73 და PRE084 აღადგინეს ნორმალური უჯრედული რესპირაცია. ორივე ნაერთმა შეძლო $A\beta^{25-35}$ -ით გამოწვეული IV კომპლექსის აქტივობის დათრგუნვის, ლიპიდების პეროქსიდაციის დონის, Bax/Bcl-2 თანაფარდობისა, და ციტოქრომ c ციტოზოლში გამოყოფის პრევენცია, რაც მიტოქონდრიის მთლიანობის შენარჩუნებაში სიგმა-1 რეცეპტორის ეფექტურ როლზე მიუთითებს (Lahmy et al. 2014).

Rho ოჯახი წარმოადგენს მცირე GTP-აზების ერთ-ერთ ჯგუფს, რომლებიც მონაწილეობენ ნეირონულ პლასტიურობაში და ჩართულნი არიან სხვადასხვა ფსიქიატრიული და ნევროლოგიური დარღვევების პათოგენეზში. Rac1, Rho ოჯახის წარმომადგენელია; იგი ჩართულია ისეთ სასიგნალო გზებში, როგორიცაა ციტოსქონჩხის რეორგანიზაცია, გენების ტრანსკრიპცია, უჯრედის პროლიფერაცია, და სიცოცხლისუნარიანობის ზრდა.

ჩვენი კვლევის მიზანია სიგმა-1 რეცეპტორის ლიგანდების ზემოქმედების შესწავლა მიტოქონდრიულ რესპირაციაზე და კომპლექსების აქტივობაზე ლიგანდების პირდაპირი დამატებით თაგვის ტვინის მიტოქონდრიის უხეშ ფრაქციაზე. ასევე, Sig-1R და Rac1 ინტერაქციის დადგენა ხარის თაგვის ტვინის მიტოქონდრიის სუფთა ფრაქციაში სიგმა-1 რეცეპტორის სხვადასხვა ლიგანდის თანაობისას.

კვლევაში გამოვიყენეთ სიგმა-1 რეცეპტორის რამოდენიმე ლიგანდი: კლასიკური აგონისტი PRE-084, რომლის აფინობაც რეცეპტორის მიმართ წარმოადგენს 44nM; სტეროიდული აგონისტი დეჰიდროეპიანდროსტერონ-3 სულფატი (DHEAs), რომელსაც შედარებით დაბალი აფინობა აქვს სიგმა-1 რეცეპტორის მიმართ (15 μ M), აცეტილქოლინესტერაზას ინჰიბიტორი დონეპეზილი, რომლის აფინობაც სიგმა-1 რეცეპტორის მიმართ 14.6nM-ს წარმოადგენს და შერეული: მუსკარინული აცეტილქოლინის რეცეპტორისა და სიგმა-1 რეცეპტორის ლიგანდები ANAVEX1-41, ANAVEX2-73 და ANAVEX3-71, რომლებიც ამჟამად კლინიკურ კვლევებში არიან ჩართულნი და მათი აფინობა Sig-1R-ის მიმართ შესაბამისად 44nM, 860nM და 1.3nM-ია. კლასიკურ ანტაგონისტებს, რომლებიც კვლევაში გამოვიყენეთ წარმოადგენენ: NE-100,

სელექციური სიგმა-1 რეცეპტორის ლიგანდი 1.5nM აფინობით და სტეროიდი პროგესტერონი 200nM აფინობით. ასევე, Sig-1R და Rac1 ურთიერთმოქმედების შესასწავლად ხარის ტვინის მიტოქონდრიის სუფთა ფრაქციაში გამოვიყენეთ (+)პენტაზოცინი და ჰალოპერიდოლი. ჩვენ შევისწავლეთ ლიგანდების ეფექტი მიტოქონდრიული ROS-ის პროდუქციაზე და ოქსიდაციურ რესპირაციაზე, ფიზიოლოგიურ და პათოლოგიურ მდგომარეობაში, რომელიც გამოწვეული იყო მიტოქონდრიულ პრეპარატზე Aβ პეპტიდის პირდაპირი დამატებით.

სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა

თავი 1. მიტოქონდრია და მისი მნიშვნელობა ალცჰაიმერის დაავადების განვითარებასა და პროგრესში

1.1. ნეიროდეგენერაციული დაავადებების ზოგადი მიმოხილვა (აქცენტი ალცჰაიმერის დაავადებაზე)

ნეიროდეგენერაციული დაავადებები წარმოადგენენ დარღვევათა ჰეტეროგენურ ჯგუფს, რომელიც ხასიათდება ნერვული სისტემის ანატომიური თუ ფიზიოლოგიური ფუნქციის შერჩევითი დანაკარგით. ტიპიურ დაავადებებში შედიან, ალცჰაიმერის დაავადება, პარკინსონის დაავადება, გვერდითი ამიოტროფული სკლეროზი და ჰანტინგტონის დაავადება. მიუხედავად, დაავადებათა ჰეტეროგენურობისა, მიტოქონდრია ამ დარღვევების დროს ერთ-ერთ სამიზნე ორგანელას წარმოადგენს.

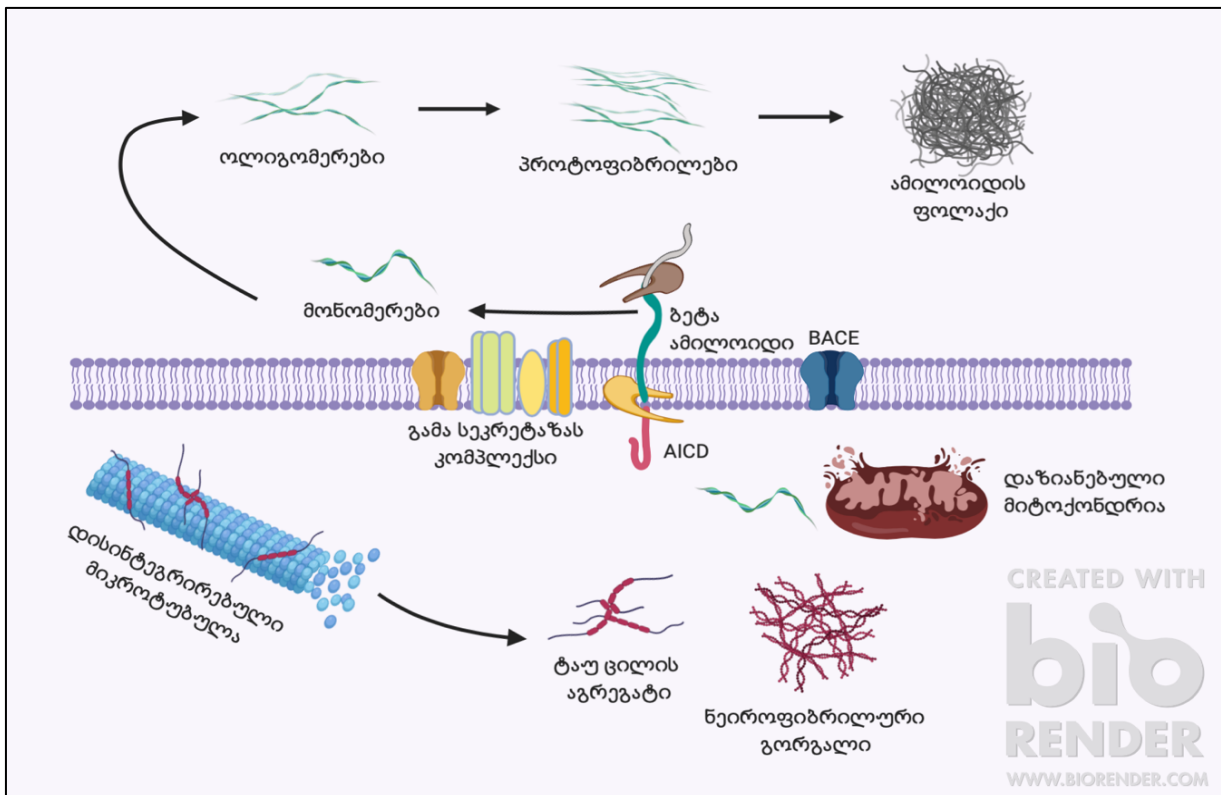
ნეიროდეგენერაციულ პათოლოგიათაგან, ალცჰაიმერის დაავადება ყველაზე გავრცელებული დემენციაა, რომელიც კლინიკურად პროგრესული და შეუქცევადი კოგნიტური დაქვეითებით ხასიათდება. ად შემთხვევათა რაოდენობა სწრაფად იზრდება, მაგრამ დაავადების პროგრესიის საწინააღმდეგო საშუალებები საკმაოდ მწირია. დემენციის თერაპიას და მართვას დაავადების იდიოპათური ხასიათი კიდევ უფრო ართულებს.

ად გამომწვევი მიზეზების სხვადასხვა ჰიპოთეზა არსებობს, გენეტიკური დამემკვიდრების, აცეტილქოლინის დაქვეითებული სინთეზის, ნეიროტოქსიური ცილა ამილოიდ ბეტას დაგროვების, ჰიპერფოსფორილირებული ტაუ ცილის ფიბრილური ხვეულების აკუმულირების და უჯრედის მიტოქონდრიის არარეგულარული ფუნქციისა და დინამიკის ჩათვლით (Goedert and Spillantini 2006).

ყველა ექსპერიმენტულ კვლევაში, ად-ს გვიან სტადიაზე თავის ტვინში A β აგროვაცია და ტაუს ხვეულების დაგროვება დაავადების პათოლოგიურ ნიშანს

წარმოადგენს, თუმცა უცნობია, ცილათა დაგროვება დაავადების მიმდინარეობის შედეგია, თუ გამომწვევი მიზეზი.

ამილოიდის მონომერები წარმოიქმნება დიდი, ამილოიდის წინამორბედი ცილისგან (APP), რომელიც სხვადასხვა უჯრედის ზედაპირზე გვხვდება, მათ შორის ნეირონებზეც. Aβ წარმოქმნისას APP განიცდის პროტეოლიზს β-სეკრეტაზას, β-საიტის APP გამხლეჩი ფერმენტი 1 (BACE1) და γ-სეკრეტაზას მიერ, რომლებიც საბოლოოდ Aβ ფრაგმენტებს წარმოქმნიან. თავის ტვინში Aβ-ს ორი ძირითადი სახეობა გვხვდება: Aβ₄₂ და Aβ₄₀. მიუხედავად იმისა, რომ Aβ₄₀ უფრო მეტად გვხვდება ვიდრე Aβ₄₂, ხსნად ფორმაში, ამილოიდის ფოლაქის მთავარი შემადგენელი Aβ₄₂-ია. ფიბრილოგენეზის პროცესი ამილოიდის მონომერებით იწყება, რომლებიც ერთიანდებიან სხვადასხვა ოლიგომერული ფორმების წარმოსაქმნელად. ოლიგომერული ფორმების შემდგომი აგრეგირებით წარმოქმნიებიან მოკლე, დრეკადი, არარეგულარული პროტოფიბრილები. შემდგომ ხდება პროტოფიბრილების მომწიფება და დაგრძელება უხსნად ფიბრილებად. ამილოიდის ფიბრილები გროვდება და დეპოზირდება უჯრედგარე ფოლაქების სახით (Rossner et al. 2006).



სურათი 1. ალცჰაიმერის დაავადების პათოგენეზი.

ჩატარებული კვლევები გვიჩვენებენ რომ ამილოიდის თითოეულ სახეობას გარკვეული ტოქსიკურობა ახასიათებს, ამასთანავე თითქმის ყველა თანხმდება ოლიგომერული ფორმების შედარებით უფრო მაღალ ტოქსიკურობაზე, რაც მათი უჯრედის მემბრანებთან ურთიერთქმედებისა და მთლიანობის დარღვევის შესაძლებლობითაა განპირობებული.

1.2 Rho GTP-აზები და მათი როლი ალცჰაიმერის დაავადების პათოგენეზში

აქტინის პოლიმერიზაციის დინამიკური რეგულაცია მნიშვნელოვან როლს თამაშობს დენდრიტული ქაცვების მორფოლოგიურ ცვლილებებში (Matus 2000). აქტინის პოლიმერიზაციის მთავარი რეგულატორები Rho ოჯახის მცირე GTP-აზები არიან. მცირე Rho GTP-აზები, კერძოდ კი Rho, Rac, CDC42 ჩართულები არიან სხვადასხვა ფსიქიატრულ და ნევროლოგიური დარღვევების პათოგენეზში და ნეირონის ზრდის კონუსის დინამიკის, დენდრიტების ფორმირებისა და აქსონის გზის გაკვლევაში (Pertz 2010). ზოგადად, Rac და მისი დადმავალი ეფექტორები ნეირონის სიცოცხლისუნარიანობის ზრდას უწყობენ ხელს, მაშინ, როცა Rho და მისი დადმავალი ეფექტორები ნეირონში აპოპტოზს იწვევენ. Rac-ის მთავარ ეფექტორს ნეირონებში p-21-აქტივირებული კინაზა (PAK) წარმოადგენს. Rac-დამოკიდებული PAK-ის აქტივაცია ნეირონების სიცოცხლისუნარიანობას უწყობს ხელს მიტოგენ-აქტივირებულ პროტეინ კინაზას (MAPK) და ფოსფატიდილ ინოზიტოლ-3 კინაზა (PI3K)/Akt სასიგნალო გზების მონაწილეობით, რომლებიც შესაბამისად პრო-აპოპტოზური ცილების (მაგ. BAD) ინჰიბიციას ახდენენ და ხელს უწყობენ სიცოცხლისუნარიანობის ზრდაში მონაწილე Bcl2 ოჯახის წევრი ცილების (Bcl-xL) ექსპრესიის მატებას (Johnson and D'Mello 2005; Linseman and Loucks 2008; Stankiewicz and Linseman 2014).

კოფილინი წარმოადგენს აქტინის დეპოლიმერიზაციის ფაქტორს და მონაწილეობს სინაფსის მორფოგენეზსა და პლასტიურობაში (Shirao and Gonzalez-Billault 2013; Penzes

and Cahill 2012). Ser³ ნაშთის ფოსფორილირების შემთხვევაში კოფილინი ინაქტივირდება და ვეღარ ემაგრება აქტინს (Yang et al. 1998). Rac1-ი, თავისი ეფექტორის, PAK1-ის მეშვეობით ახდენს კოფილინის ფოსფორილირებას და შესაბამისად აქტინის პოლიმერიზაციას და დენდრიტული ქაცვების რემოდელირებას. სხვადასხვა კვლევის თანახმად, კოფილინის მიტოქონდრიაზე ტრანსლოკაცია აპოპტოზის ინიცირებაში მნიშვნელოვან როლს თამაშობს (Chua et al. 2003). მხოლოდ დეფოსფორილირებულ კოფილინს შესწევს ციტოზოლიდან მიტოქონდრიაზე გადაადგილების უნარი (Kasahara and Scorrano 2014). უჯრედის გარკვეული მდგომარეობისას, კოფილინი მიტოქონდრიების დაყოფას არეგულირებს DRP1-თან ინტერაქციის მეშვეობით (Li et al. 2015).

სინაფსური კავშირების დაკარგვას ად-სთან დაკავშირებული კოგნიტური დეფიციტის განვითარებაში დიდი წვლილი მიუძღვის (Selkoe 2004), შესაბამისად, Rho GTP-აზას სასიგნალო მექანიზმები ამ პათოლოგიის დროს აქტიურად შეისწავლება. მაგალითად, თავისი ჰიპოკამპის პირველად ნეირონებში, Rac1-ის დათრგუნვა APP გენის ტრანსკრიპტორულ აქტივობას ამცირებს (P.L. Wang et al. 2009) და ასევე აქვეითებს A β ₄₂ წარმოქმნას γ -სეკრეტაზას სუბსტრატული სელექციურობის ცვლილებით (Boo et al. 2008). ად-ის ტრანსგენური თავისი მოდელში, 12-18 თვის თავგში აღინიშნა RhoA-ს ზრდა და Rac1-ის აქტივობის დაქვეითება იმავე ასაკის თავგების საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (Petratos et al. 2008). ად პაციენტებში, სელექციურ ნეირონების პოპულაციაში Cdc41 და Rac1 ექსპრესიის მატება აღინიშნა, თუმცა აღსანიშნავია ის ფაქტი, რომ ად-ის ადრეულ ეტაპზე Rac1-ის ექსპრესია იკლებს (Zhao et al. 2006). ად იმუნოჰისტოლოგიური კვლევებით RhoA-ს სუბუჯრედული ლოკალიზაცია შეცვლილია, მაშინ როცა Cdc42 და Rac-1 არ იცვლება. RhoA შემცირებულია ნეიტროფილში, თუმცა იზრდება ნეირონებში და კოლოკალიზდება ჰიპერფოსფორილებულ ტაუ ცილასთან, რაც RhoA-ს აქტივობის შემცირებას იწვევს (Huesa et al. 2010). Rho GTP-აზების აქტივობა ად პაციენტებში მნიშვნელოვან როლს თამაშობს დაავადების პათოგენეზში და შესაძლოა იცვლებოდეს დაავადების განვითარების სხვადასხვა ეტაპზე.

1.3 მიტოქონდრია, როგორც ერთ-ერთი სამიზნე ორგანელა ალცჰაიმერის დაავადების დროს

მიტოქონდრია, როგორც ენერგოწარმოქმნელი ორგანელა აუცილებელია უჯრედის ცხოველმყოფელობისთვის. დაახლოებით 20 წლის წინ აღიწერა გლუკოზას დაბალი მეტაბოლიზმი ტვინის იმ უბნებში, სადაც ამილოიდური ფოლაქები აღინიშნებოდა, რამაც გარკვეულწილად დააკავშირა მიტოქონდრიის ფუნქცია და ად პათოგენეზი (Ray 2010). ნეირონი გლუკოზას ენერგიის მთავარ წყაროდ იყენებს. შესაბამისად ენერგიის მიღების ნებისმიერი ხელშემშლელი ფაქტორი შესაძლოა უჯრედის ბედის განსაზღვრისათვის გადამწყვეტი იყოს. უფრო მეტიც, მიტოქონდრია ROS-ის წარმოქმნის მთავარი წყაროა. ოქსიდაციური სტრესის მაღალი დონე ად დაავადებულთა თავ-ზურგტვინის სითხეში იქნა ნანახი. მიტოქონდრიის დისფუნქცია ად-ს ადრეულ ეტაპზე ვლინდება. მრავალფოტონური მიკროსკოპიით ცოცხალ თაგვებში ნანახი იქნა სახეცვლილი მიტოქონდრია ნევრიტული ფოლაქის მიმდებარედ (Xie et al. 2013). არსებობენ კვლევები, რომლებიც ამტკიცებენ A β -ას მიტოქონდრიის შიგნით პენეტრირებას და სუნთქვით ჯაჭვზე ზემოქმედებით უჯრედის ბიოენერგეტიკული პროცესს დარღვევას (Hansson Petersen et al. 2008). მიუხედავად იმისა, რომ არ არსებობს ზუსტი ბიოლოგიური მექანიზმი, იმისა, თუ როგორ გადაადგილდება A β მიტოქონდრიას შიგნით (თუ საერთოდ ეს პროცესი ხორციელდება), მიტოქონდრიის დისფუნქცია აღინიშნება დაავადების საწყის ეტაპზე, რაც ამ ორგანელას პათოლოგიის სამკურნალოდ ან პრევენციისთვის ეფექტურ სამიზნედ სახავს (Ankarcrona, Mangialasche, and Winblad 2010).

ად პათოგენეზისას ცვლილებები გვხვდება არა მხოლოდ მიტოქონდრიული ფერმენტების აქტივობის, არამედ გენების ექსპრესიის დონეზეც (Ridge and Kauwe 2018). მაგალითად, მიტოქონდრიის მეტაბოლიზმსა და აპოპტოზში მონაწილე გენების up-რეგულაცია კოლოკალიზდება ნეირონებში, სადაც მიმდინარეობს ოქსიდაციური სტრესი. უფრო მეტიც, ამგვარი ოქსიდაციური სტრესი და მიტოქონდრიული დისფუნქცია შესაძლოა მონაწილეობდეს ად-ის მაგვარი პათოლოგიების ჩამოყალიბებაში. მაგალითად: ზღვის გოჭის ნაყოფის ნეირონებში, წყალბადის ზეჟანგის მიწოდებამ გაზარდა

უჯრედშიგა A β დაგროვება (Ohya et al. 2000). ად-ის პათოგენეზში მონაწილე ცილათა უმეტესობას უშუალო კავშირი აქვთ მიტოქონდრიულ ცილებთან. APP-ს გააჩნია ორმაგი, ენდოპლაზმურ ბადის (ედ)/ მიტოქონდრიის სამიზნე თანმიმდევრობა და უჯრედებსა და ტრანსგენურ თაგვებში APP-ს გაზრდილი ექსპრესია ახშობს მიტოქონდრიულ იმპორტს, იწვევს მეტაბოლიზმის შეფერხებას და მიტოქონდრიის დისფუნქციას (Anandatheerthavarada et al. 2003). A β უკავშირდება მიტოქონდრიის მატრიქსულ ცილას - ალკოჰოლდეჰიდროგენაზას (ABAD). ABAD არის მრავალი ფუნქციის მქონე ფერმენტი რომელიც ჩართულია ენერგიის წარმოქმნაში. როდესაც ABAD უკავშირდება A β -ს, ABAD-ი კონფორმაციულად იცვლება, რაც ხელს უშლის NAD $^{+}$ დაკავშირებას და შესაბამისად, იწვევს ფერმენტული აქტივობის დაკარგვას. ეს, თავის მხრივ, ხელს უშლის მიტოქონდრიის ნორმალურ ფუნქციონირებას. ABAD-ის კატალიზური ფუნქციის დარღვევამ შესაძლოა შეცვალოს მიტოქონდრიის მემბრანის გამტარობა და გავლენა იქონიოს სუნთქვითი ჯაჭვის ფერმენტებზე, რაც ხელს უწყობს მიტოქონდრიის დაზიანებას. ABAD-სა და A β ინტერაქციის დათრგუნვა იცავს ნეირონს A β -გაშუალებული ტოქსიკურობისგან (Lustbader et al. 2004).

A β შესაძლოა პირდაპირ იწვევდეს მიტოქონდრიულ დისფუნქციას მიტოქონდრიების შერწყმისა და გაყოფის პროცესის დარღვევით. მიტოქონდრიების შერწყმა და გაყოფა ნორმალური, დინამიური პროცესია, რომელიც ინტენსიურად მიმდინარეობს და მორგებულია უჯრედულ და მიტოქონდრიულ კონდიციებზე. თუმცა, მიტოქონდრიის მოჭარბებული შერწყმა წარმოქმნის დაგრძელებულ, უფორმო მიტოქონდრიებს, მაშინ როცა არაპროპორციული დაყოფა, მიტოქონდრიის ფრაგმენტაციას იწვევს. დინამინის მსგავსი GTP-აზა ცილა, დინამინ დაკავშირებული ცილა 1 (DRP1) არის მიტოქონდრიის დაყოფაში მონაწილე წამყვანი ცილა. ზოგიერთ კვლევაზე დაყრდნობით, DRP1 აქტივდება A β -ს მიერ S-ნიტროზილირების მეშვეობით. S-ნიტროზილირების შედეგად გააქტივებული DRP1 იწვევს მიტოქონდრიის ფრაგმენტაციას და სინაფსის დეგენერაციას ად-ის დროს (Cho et al. 2009).

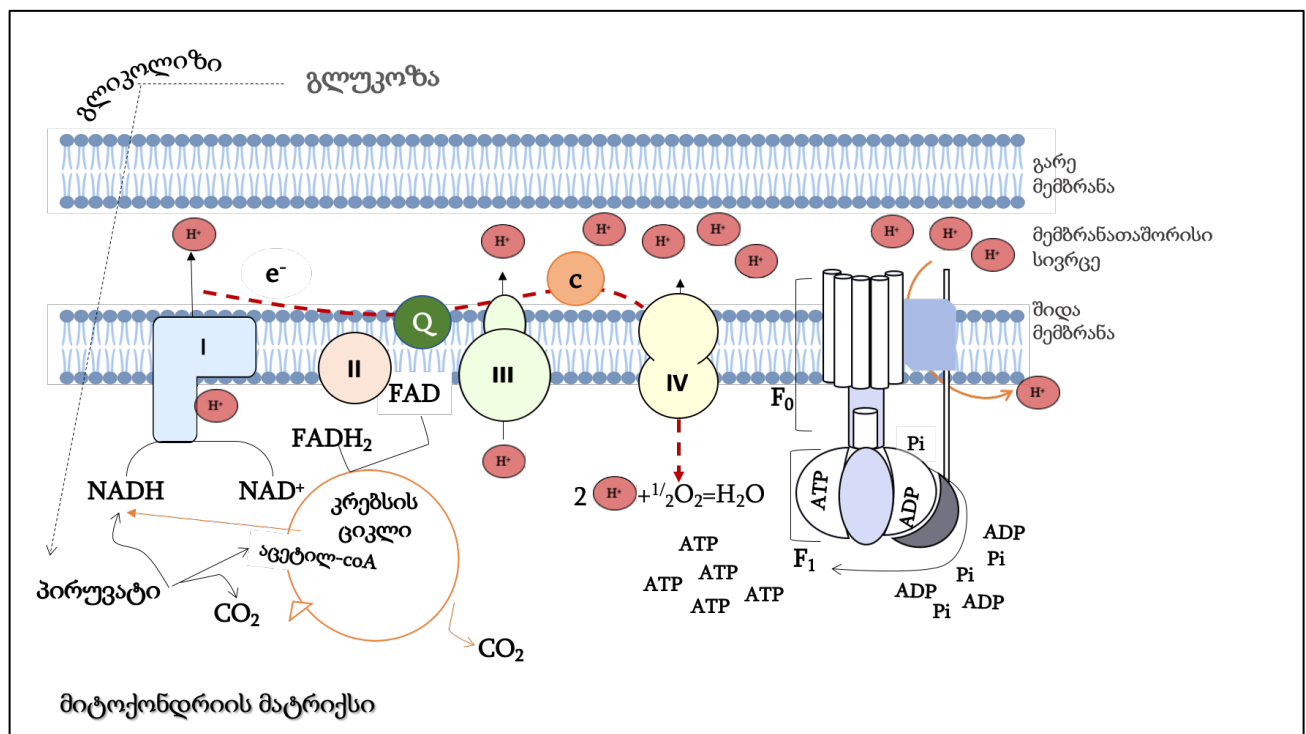
მიტოქონდრიები ნეირონში, მხოლოდ სომაში არ ლოკალიზდებიან, არამედ გვხვდებიან მთელი ნეირონის გასწვრივ. მიტოქონდრია ჭარბად გვხვდება სინაფსის

არეში, სადაც ენერგიაზე მოთხოვნა შედარებით უფრო დიდია. მიტოქონდრიები აქსონის ტერმინალში არეგულირებენ Ca^{2+} -ის და შესაბამისად ნეიროტრანსმიტერების გამოყოფას (Billups and Forsythe 2002). ად-ს თავის მოდელში, აქსონის ტერმინალურ ნაწილში ნანახი იქნა დისფუნქციური მიტოქონდრია. $\text{A}\beta$ ზეექსპრესიის მქონე თავგებში დარღვეულია მიტოქონდრიის მიერ კალციუმის იონის ათვისება, რაც საბოლოოდ სინაფსურ პლასტიურობას არღვევს (Lee et al. 2012). კორტიკალურ ნეირონებში $\text{A}\beta$ -ს შეუძლია გაზარდოს კალციუმის უჯრედშიდა დონე ენდოპლაზმური ბადიდან კალციუმის გამოყოფის მეშვეობით. ამ გაზრდილი, ციტოზოლური კალციუმის ათვისება მიტოქონდრიის მიერ კალციუმის დონის ნორმალიზებისთვის ხორციელდება. ამიტომ, კალციუმის ანომალურმა ათვისებამ, შესაძლოა დათრგუნოს მიტოქონდრიის ფუნქცია და ხელი შეუწყოს ROS-ის წარმოქმნას, აპოპტოზური სიგნალის გააქტიურებასა და უჯრედულ კვდომას (Ferreiro, Oliveira, and Pereira 2008).

1.4 სუნთქვითი ჯაჭვის კომპლექსები ალცჰაიმერის დაავადებების დროს

მიტოქონდრიას გააჩნია გარე მემბრანა, რომელიც თავისუფლად ატარებს პატარა მოლეკულებსა და იონებს და შიდა მემბრანა, რომელიც ბევრი მოლეკულისა და იონის მიმართ გაუმტარია. შიდა მემბრანა მიტოქონდრიულ სივრცეს ორ ნაწილად ჰყოფს: შიდა სივრცე - მიტოქონდრიული მატრიქსი და ვიწრო, მემბრანათაშორისი სივრცე. მიტოქონდრიის შიდა მემბრანაზე მოთავსებულია ელექტრონების სატრანსპორტო სისტემა, ADP-ATP ტრანსლოკაზა, ATP სინთაზა და სხვა მემბრანული სატრანსპორტო სისტემები. ყველაზე რელევანტური ბიოლოგიური სუბსტრატი მიტოქონდრიის ბიოენერგეტიკული ფუნქციონირებისათვის არის გლუკოზა. უჯრედში ტრანსპორტირების შემდეგ, გლიკოლიზის პროცესის შედეგად წარმოიქმნება პიროყურძნის მჟავას ორი მოლეკულა, ორი ATP-ს, ორი H_2O მოლეკულა და ორი აღდგენილ ნიკოტინამიდ ადენინდინუკლეოტიდის (NADH) მოლეკულა. შემდგომ,

NADH მოლეკულები მალაქ-ასპარტატის ან გლიცეროლ-3-ფოსფატის გადამტანი სისტემით გადაადგილდებიან ციტოზოლიდან მიტოქონდრიაში დაჟანგვისათვის. გლიკოლიზის შედეგად მიღებული პირუცყრძნის მჟავას ორი მოლეკულა გადაიტანება მიტოქონდრიაში და ოქსიდაციური დეკარბოქსილირების შედეგად გარდაიქმნება აცეტილ-CoAდ, რის შემდგომაც ერთვება ლიმონმჟავას (კრებსის) ციკლში. უნდა აღინიშნოს, რომ თავად ეს გარდაქმნა წარმოქმნის NADH-ს თითოეული პირუცატის მოლეკულადა. გლიკოლიზის პროცესისა თუ კრებსის ციკლის შედეგად წარმოქმნილი NADH და აღდგენილი ფლავინ-ადენინ დინუკლეოტიდი (FADH_2) ერთვებიან ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვში (Butterworth 2005).



სურათი 2. მიტოქონდრიის მატრიქსი და ელექტრონების გადამტანი სისტემა.

ელექტრონების გადამტანი სისტემა წარმოდგენილია ოთხი ინტეგრალური ცილით: (NADH)-კოენზიმ Q ოქსიდორედუქტაზა, ან I კომპლექსი; სუქცინატ-კოენზიმ Q ოქსიდორედუქტაზა, II კომპლექსი; კოენზიმ Q-ციტოქრომ c ოქსიდორედუქტაზა, III კომპლექსი და ციტოქრომ c ოქსიდაზა, IV კომპლექსი. დამატებითი ინტეგრალური ცილა,

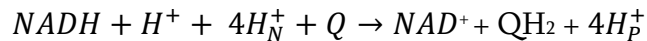
რომელიც დაკავშირებულია ჟანგით ფოსფორილირებასთან არის ATP სინთაზა, V კომპლექსი. ეს ცილათა ნაკრები განთავსებულია მიტოქონდრიის შიდა მემბრანაზე. ჟანგვა-აღდგენითი რეაქციების შედეგად ელექტრონები გადატანება ერთი სუბსტრატიდან, აღმდგენიდან, მეორე, მჟანგველ აგენტზე. კომპლექსები ისეა მოწყობილი, რომ ელექტრონების გატარება ხდება შედარებით უფრო დიდი აღმდგენი პოტენციის მქონე ცენტრების მეშვეობით ისე, რომ ჯაჭვის ყოველი მომდევნო კომპონენტს ელექტრონის მიმღები უფრო მაღალი პოტენციალი გააჩნია, მის წინამორბედთან შედარებით. ეს ხელს უწყობს ჯაჭვის მიერ ელექტრონის გავრცელებას I და II ელექტრონის შემომტანი კომპლექსებიდან, IV კომპლექსში ელექტრონის საბოლოო აქცეპტორ - O_2 -მდე.

სუნთქვით ჯაჭვში, ელექტრონის ცენტრალური გადამტანი არის NADH, რომელიც სუბსტრატებიდან ელექტრონების სეკვესტრირებას ახდენს. ელექტრონების მიტანა ასევე ხორციელდება ფლავოპროტეინების მეშვეობით, ცილები, რომლებიც შეიცავენ ფლავინ ნუკლეოტიდს, ფლავინ მონონუკლეოტიდის (FMN) ფორმით, I კომპლექსში და ფლავინ ადენინ დინუკლეოტიდს (FAD) II კომპლექსში. NAD-ის მსგავსად, ეს მოლეკულები ფუნქციონირებენ როგორც ელექტრონების მიმღებლები, ამთვისებლები $FMNH_2$ ან $FADH_2$ წარმოსაქმნელად, მაგრამ ელექტრონების გადატანას სხვადასხვა საშუალებით ახდენენ.

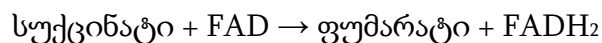
სუბსტრატულ დონეზე ელექტრონების გადამტანების გარდა, ასევე არსებობენ ელექტრონების მემბრანასთან დაკავშირებული გადამტანები: ჰიდროფობური უბიქინონი (კოენზიმ Q), ციტოქრომები, და რკინა-გოგირდის კლასტერები (Fe-S).

I კომპლექსი შეიცავს 45 ცილოვან ერთეულს. იგი იყოფა მოკლე, ჰიდროფილურ სეგმენტად, რომელიც ლოკალიზებულია მატრიქსში და გრძელ, ჰიდროფობურ სეგმენტად, რომელიც მთლიანად შიდა მემბრანაშია მოთავსებული. I კომპლექსის მოკლე სეგმენტი იწყებს ელექტრონების გადატანის პროცესს, რადგან იგი შეიცავს NADH დეჰიდროგენაზას, FMN კოფაქტორს, და NADH დამაკავშირებელ საიტს, რაც აუცილებელია NADH-ის დაჟანგვისა და შესაბამისად ელექტრონის გადატანისთვის. NADH დეჰიდროგენაზა ჟანგავს NADH-ს NADH-დან ორი ელექტრონის მიღებით, სადაც FMN კოფაქტორი მოქმედებს როგორც გადამცემი ცენტრი რომელიც ყოფს (ანაწილებს)

ორ ელექტრონს შვიდ რკინა-გოგირდის კლასტერს შორის. ეს განაწილების პროცესი უზრუნველყოფს ერთი ელექტრონის გადატანას კომპლექსის მიერ მემბრანასთან დაკავშირებულ ელექტრონის გადამტან უბიქვინონზე (Q) და აღადგენს მას უბიქვინოლად (QH₂). ელექტრონის გადატანისას, I კომპლექსის გრძელ სუბერთეულს გადააქვს პროტონი, თუმცა პროცესის ზუსტი მექანიზმი ცნობილი არ არის.

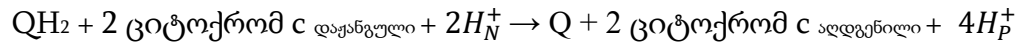


II კომპლექსი არის პატარა ცილა კომპლექსი, რომელიც შეიცავს ოთხ ცილა სუბერთეულს - შიდა ინტეგრანულ ღუზა პროტეინებს და სუქცინატდეჰიდროგენაზას. ეს კომპლექსი ერთადერთია სუნთქვით ჯაჭვში, რომელსაც კრების ციკლში პირდაპირი ფერმენტული აქტივობა გააჩნია. ამ კომპლექსს სჭირდება კოვალენტურად დაკავშირებული FAD კოფაქტორი, რომელიც ოპერირებს ელექტრონების შატლის პრინციპით. გარდა FAD კოფაქტორისა, ეს კომპლექსი ასევე შეიცავს მრავალ რკინა-გოგირდიოვან კლასტერს და ჰემის ჯგუფს, ჰემ b. II კომპლექსი ელექტრონებს იღებს კრების ციკლიდან სუქცინატდეჰიდროგენაზას მეშვეობით, შემდგომ კი რკინა-გოგირდის კლასტერების გავლით აღადგენს Q-ს QH₂-ად. I და II კომპლექსები მოქმედებენ როგორც ელექტრონების შემომტანი პუნქტები და გადასცემენ მათ III კომპლექსს QH₂ გადამტანის მეშვეობით.

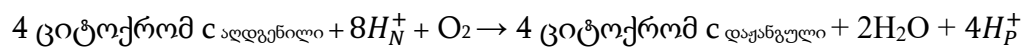


III კომპლექსის სტრუქტურა უნიკალურია იმით რომ იგი დიმერია, შედგება ორი იდენტური ცილისგან. თითოეული ცილის სეტი შედგება 11 ცილის სუბერთეულის წყვილისგან და 4 მეტალის რედოქს ცენტრისგან. III კომპლექსის Q0 საიტს უკავშირდება QH₂. Q შეიძლება ასავე დაუკავშირდეს III კომპლექსს Qi საიტზე, რომელიც მიტოქონდრიის მატრიქსთან ახლოს არის ლოკალიზებული. ციტოქრომ c შეუძლია

დაუკავშირდეს III კომპლექსს ინტერმემბრანულ სივრცესთან ახლოს, სადაც ის როგორც ელექტრონის საბოლოო აქცეპტორი ისე მოქმედებს.



IV კომპლექსი არის ბოლო კომპლექსი ელექტრონების ჯაჭვში, რომელიც უშუალოდ ჩართულია ელექტრონის მოძრაობაში. IV კომპლექსი დიდი, ინტეგრირებული ცილაა და როგორც III კომპლექსი დიმერის სახითაა წარმოდგენილი. თითოეული ნახევარი 13 ცილის ჯაჭვისგან და მეტალური აღმდგენელი ცენტრებისგან იქმნება. IV კომპლექსში, ელექტრონების მოძრაობაში ბოლო საიტი არის მოლეკულური ჟანგბადი.



ATP სინთაზა არის ინტეგრირებული ცილა. იგი გვხვდება მიტოქონდრიის შიდა მემბრანაზე და პირდაპირ ჩართულია ATP-ის წარმოქმნაში. ATP სინთაზა, ანუ V კომპლექსი შედგება ორი მთავარი კომპონენტისაგან, Fo, რომელიც მემბრანაშია მოთავსებული და F1 პორციისგან, რომელიც მიტოქონდრიის მატრიქსის მხრიდან მემბრანაზეა მოთავსებული.

მიტოქონდრიის კომპლექსების დეფიციტი და დაქვეითებული, თუ მომატებული ფუნქცია დამახასიათებელია ნეიროდეგენერაციული დაავადებებისათვის. ზოგადად, გვხვდება კატაბოლური პროცესების დეფიციტი გლიკოლიზსა და კრებსის ციკლში, პირუვატ დეჰიდროგენაზას, α -კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას და სუქცინატ დეჰიდროგენაზას დარღვევები (Filadi et al. 2018; Santos et al. 2010).

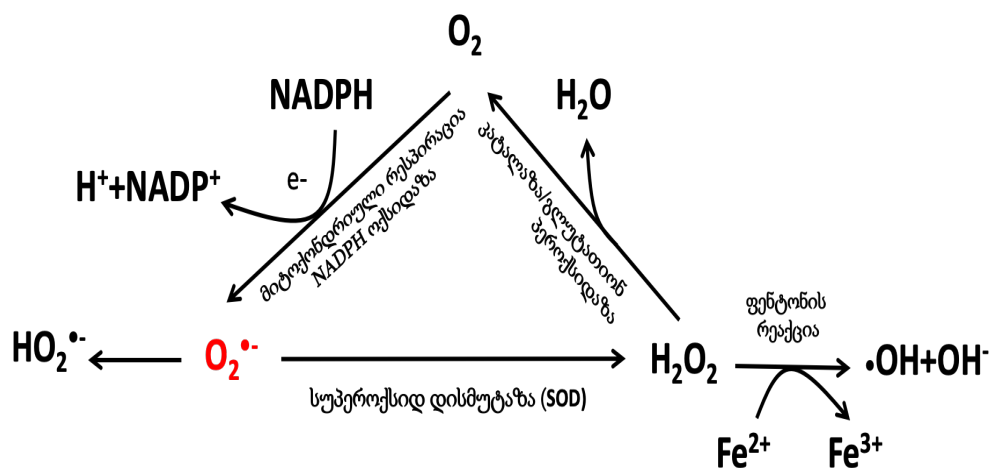
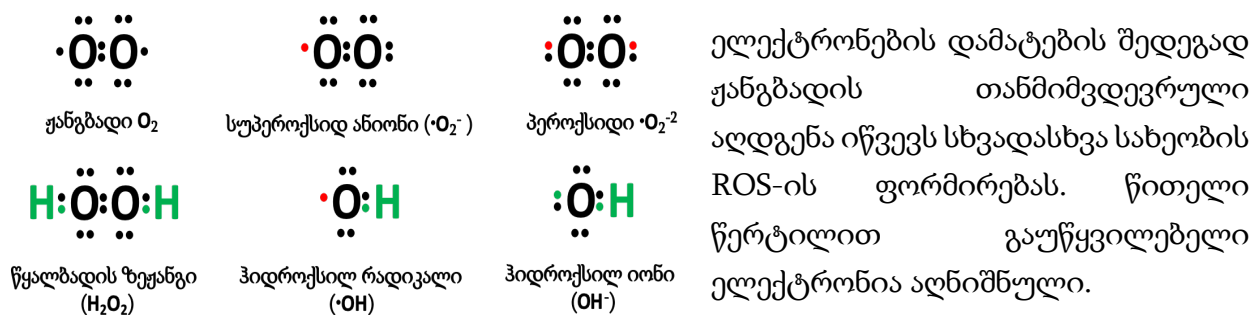
ციტოქრომ c ოქსიდაზას, ელექტრონული სუნთქვითი ჯაჭვის ტერმინალური ფერმენტის დაქვეითებული აქტივობა, მუდმივად შეინიშნება Aβ-ს აკუმულირებასთან ერთად. Aβ მიერ გამოწვეული ტოქსიკურობა, შესაძლოა განპირობებული იყოს ციტოქრომ c და ციტოქრომ c ოქსიდაზას ურთიერთდაკავშირების შეფერხებით (Shoffner 1997). მიუხედავად იმისა, რომ გარკვეულმა კვლევებმა IV კომპლექსის დეფიციტი აჩვენა,

კვლევათა ნაწილმა ტვინის ზოგიერთ რეგიონში კომპლექსის ცვლილება საერთოდ ვერ ნახა და დამატებით, ტვინის ქერქის გარკვეულ უბნებში I-III კომპლექსების დეფიციტი ექსპერიმენტალურად დაადასტურა. Aβ-ს დაგროვების შედეგად, ასევე ნანახი იქნა II კომპლექსის აქტივობის დაქვეითება. თვითონ კომპლექსების ორგანიზებულობაც დარღვეულია ად დროს (Seelert et al. 2009).

1.5 რეაქტიული ჟანგბადის ფორმები და მათი როლი ალცჰაიმერის დაავადების განვითარებაში

ად პათოგენეზისას, როგორც მიტოქონდრიული დისფუნქცია, ისე Aβ და ტაუ ცილების დაგროვება და ანტიოქსიდაციური სისტემის დეფიციტი ხელს უწყობს ოქსიდაციური სტრესის განვითარებას, ასევე ოქსიდაციურმა სტრესმა შესაძლოა ბიძგი მისცეს Aβ აგრეგაციას და ტაუ ცილის ჰიპერფოსფორილირებას, რაც დაავადების პათოგენეზის მანკიერ წრეს ქმნის (X. Wang et al. 2014).

ოქსიდაციური სტრესი ჟანგბადის რეაქტიული ფორმების წარმოქმნასა და ანტიოქსიდაციური სისტემას შორის დისბალანსის შედეგია. ჟანგბადზე შესაძლებელია რადიკალის ფორმირება გარე ელექტრონულ შრეზე ორი გაუწყვილებელი ელექტრონის არსებობის გამო. რეაქტიული ჟანგბადის ფორმები ეწოდება რეაქტიულ მოლეკულათა ჯგუფს რომელიც ჟანგბადისგან წარმოიქმნება. ROS მიეკუთვნება სუპეროქსიდი (O_2^-), ჰიდროქსილ რადიკალი ($\cdot OH$), ან არა რადიკალები (წყალბადის ზეჟანგი H_2O_2). O_2^- მთავარ როლს ასრულებს ROS-ის პროდუქციაში. O_2^- შესაძლოა გარდაიქმნას უფრო სტაბილურ ფორმად, H_2O_2 , სუპეროქსიდდისმუტაზას (SOD) მეშვეობით. შესაძლოა აგრეთვე იქნას პროტონირებული და წარმოიქმნას $HO_2^{\cdot}$. H_2O_2 -დან შესაძლოა წარმოიქმნას ჰიდროქსილ რადიკალი, ან იგი დაიყოს H_2O და O_2 -ად კატალაზას, გლუტათიონ პეროქსიდაზას და სხვა პეროქსიდაზების მეშვეობით. $\cdot OH$ ცნობილია, როგორც ROS-ის ყველაზე რეაქტიული ფორმა და ციტოტოქსიკურობით ხასიათდება (Bolisetty and Jaimes 2013).



სუპეროქსიდი (O_2^-) წარმოიქმნება როგორც მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის თანაპროდუქტი ან NADPH ოქსიდაზას მეშვეობით. სუპეროქსიდ დისმუტაზას (SOD) მიერ, სუპეროქსიდი შესაძლოა გარდაიქმნას წყალბადის ზეჟანგად (H_2O_2), რომელიც თავისთავად შესაძლოა ტრანსფორმირდეს ROS-ის ისეთ სახეობებად როგორიცაა ჰიდროქსილ რადიკალი ($\cdot\text{OH}$) და ჰიდროქსილ ანიონები (OH^-).

სურათი 3. რეაქტიული ჟანგბადის ფორმები (ROS) და მათი წარმოქმნა.

უჯრედში, როგორც წესი ROS-ი ეგზოგენური და ენდოგენური წყაროებისგან გენერირდება. ეგზოგენურ წყაროებს ულტრაიისფერი რადიაცია, მაიონიზირებული რადიაცია, და ისეთი მედიკამენტები წარმოადგენენ, რომელთა მოქმედების მექანიზმიც ROS-ის წარმოქმნასთანაა დაკავშირებული. გარემო ტოქსინებმა და ქიმიურმა ნივთიერებებმაც შესაძლოა წამოქმნან ROS-ი, როგორც მათი მეტაბოლიზმის

თანაპროდუქტი. ROS-ის ენდოგენური პროდუქცია მიტოქონდრიის და არა-მიტოქონდრიული ROS-ის წარმომქმნელი ფერმენტებით არის გამოწვეული, რომელთა შემადგენლობაშია ნიკოტინამიდ ადენინ დინუკლეოტიდ ფოსფატ (NADPH) ოქსიდაზა (Nox), ქსანტინ ოქსიდაზა, ციტოქრომ P450 ენდოპლაზმურ ბადეზე და ფლავინ ოქსიდაზები პეროქსისომებზე. ROS-ი ყველაზე დიდ წყაროს მიტოქონდრია და Nox-ი წარმოადგენს.

ნორმალური ფიზიოლოგიური პროცესის დროს მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის ფუნქციონირებისას I კომპლექსი, რომელიც NADH-დან CoQ-ზე ახდენს ელექტრონების გადატანას, მონაწილეობს O_2^- -ის წარმოქმნაში. ამ პროცესის დროს, ასევე ხორციელდება პროტონის გადატანა მატრიქსიდან მემბრანათაშორის სივრცეში. III კომპლექსი O_2^- -ის მემბრანათაშორის სივრცეში წარმოქმნის. O_2^- გენერირება იზრდება ელექტრონების ტრანსპორტის შეფერხებისას (Cadenas and Davies 2000). საინტერესოა ის ფაქტი, რომ ამ ფერმენტების მიერ ROS-ის წარმოქმნის შესაძლებლობა განსხვავდება ორგანოებისა და პათოლოგიური დარღვევების მიხედვით. მაგალითად, I კომპლექსი პასუხისმგებელია O_2^- წარმოქმნაზე თავის ტვინში, მაშინ როცა, ROS-ის მთავარ წყაროს გულისა და ფილტვის ქსოვილში III კომპლექსი წარმოადგენს. ფიზიოლოგიური მდგომარეობის დროს, I კომპლექსიდან ROS-ის პროდუქცია დაახლოებით III კომპლექსის მიერ წარმოქმნილი ROS-ის ნახევარს წარმოადგენს, მაშინ როცა პათოლოგიური მდგომარეობის დროს რეაქტიული ფორმების წარმოქმნაში I კომპლექსი დომინირებს (Turrens 2003).

Nox-ი მიეკუთვნება ტრანსმემბრანულ ფერმენტთა კომპლექსს, რომელიც ენდოგენური O_2^- წყაროა. Nox-ი ჭარბად გვხვდება ფაგოციტებში (ნეიტროფილები, ეოზინოფილები, მონოციტები და მაკროფაგები). დღემდე ცნობილია Nox-ის 7 იზოფორმა. Nox-ის თითოეულ იზოფორმას უნიკალური უჯრედული ლოკალიზაცია, რეგულაცია და ფუნქცია გააჩნია (Infanger, Sharma, and Davisson 2006; Babior 2004).

ROS-ის სხვადასხვა სახეობები ურთერთქმედებენ და აზიანებენ ბიოლოგიურ მოლეკულებს, ლიპიდებს, ცილებისა და ამინომჟავებს, იწვევენ ბირთვული და მიტოქონდრიული დნმ-ის დაზიანებას და ასევე ლიპიდებისა და ცილების დესტრუქციას.

ოქსიდაციური სტრესი ნანახი იქნა პოსტ მორტემ ალცჰაიმერით დაავადებულთა ტვინებში, სადაც მომატებული ლიპიდების პეროქსიდაცია და ცილების ოქსიდაცია აღინიშნა. მკვლევართა შორის ად მიმდინარეობისას ძირითად სადებატო საკითხს ROS-ის წარმოქმნის ეტაპის განსაზღვრა წარმოადგენს. ზოგი მკვლევარი ვარაუდობს, რომ Aβ-ს წარმოქმნა და აგრეგაცია არის ოქსიდაციური სტრესის გამომწვევი, მაშინ როცა სხვების აზრით ოქსიდაციური სტრესი წინ უსწრებს Aβ-ს დაგროვებას და შესაბამისად ხელს უწყობს Aβ-ს პროდუქციას (Radi et al. 2014; Matsuoka et al. 2001).

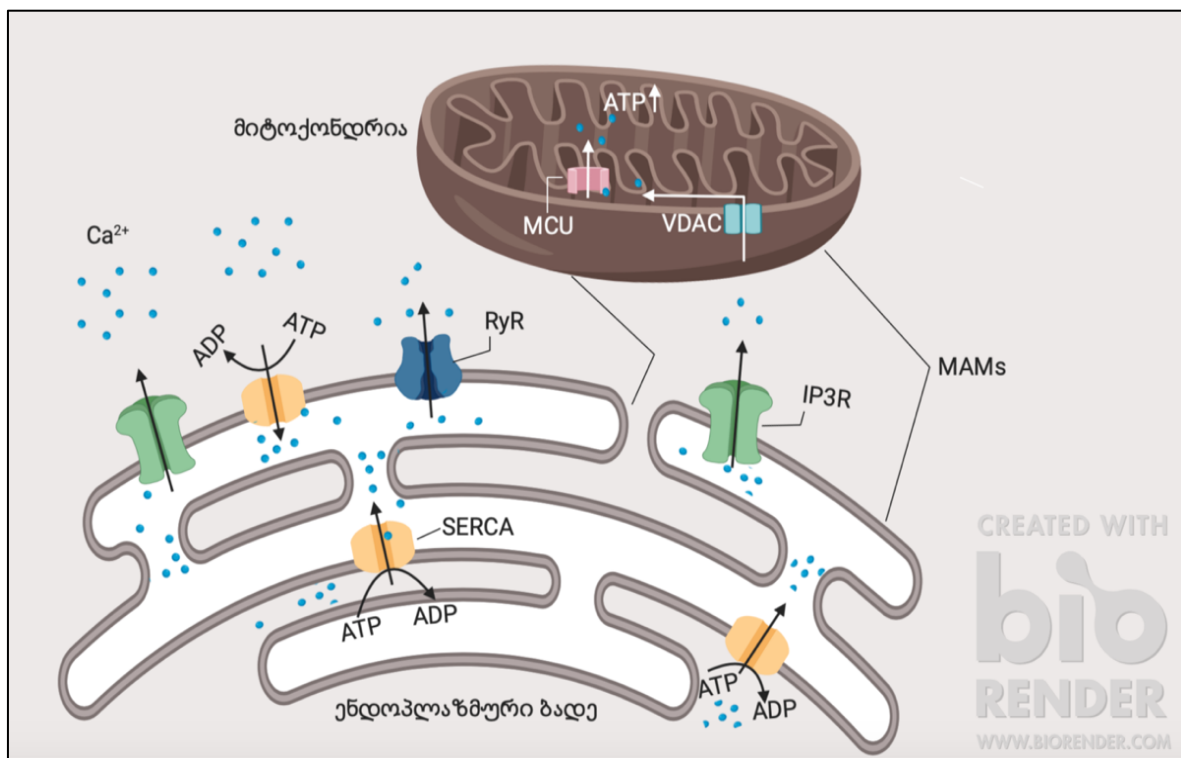
Aβ-მ შესაძლოა გამოიწვიოს ოქსიდაციური სტრესი მიტოქონდრიის შიდა (ინტრამიტოქონდრიული) მექანიზმით, დაიწყოს ROS პროდუქცია ელექტრონული ტრანსპორტის ჯაჭვის დარღვევით და III და I კომპლექსების აქტივობის დაქვეითებით. ROS-ის წარმოსაქმნელად ამილოიდის სამიზნე ასევე შესაძლოა იყოს α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზა. Aβ-მ შესაძლოა ხელი შეუშალოს ბირთვის მიერ კოდირებული ცილების იმპორტს მიტოქონდრიაში და შეაფერხოს ორგანელას ფუნქციონირება (Cenini et al. 2016). ლიპიდების პეროქსიდაცია და ოქსიდაციური დაზიანება აღინიშნება Aβ აკუმულაციამდე ად-ის თაგვების მოდელში. ამის მსგავსად, უჯრედული კულტურის მოდელში HEK293 ადამიანის ებრიონული თირკმლის უჯრედებში, მიტოქონდრიულმა ROS-მა Aβ-ს პროდუქცია გამოიწვია (Leuner et al. 2012).

1.6 კალციუმი და მიტოქონდრია

კალციუმის იონები მრავალფუნქციურ სასიცნალო მოლეკულებს წარმოადგენენ და შესაბამისად ბევრ ფიზიოლოგიურ პროცესში არიან ჩართულნი: კუნთის შეკუმშვის, ნეირონული აგზნებადობის, უჯრედის მიგრაციასა და ზრდაში. Ca^{2+} -ის სეკვესტრაციისა და გამოთავისუფლების უნარის გამო, მიტოქონდრია უჯრედული Ca^{2+} -ის მნიშვნელოვანი რეგულატორია. მიტოქონდრიულ Ca^{2+} -ს ისეთი მნიშვნელოვანი

ფუნქციებიც აკისრია როგორიცაა მიტოქონდრიული მეტაბოლიზმის რეგულაცია, ATP-ის პროდუქცია და უჯრედული კვდომა (Vasington and Murphy 1962).

ენდოპლაზმური ბადე უჯრედშიდა კალციუმის შემნახველი ორგანელაა. სარკოპლაზმურ/ენდოპლაზმურ რეტუკულუმის Ca^{2+} ATP-აზებს (SERCAs) აქტიურად შეაქვთ Ca^{2+} ებ-ში დასამარაგებლად. Ca^{2+} -ის დინამიური გამოყოფა ებ-დან ხორციელდება რიანოდინის რეცეპტორებით (RyRs) და ინოზიტოლ 1,4,5,-ტრიფოსფატის რეცეპტორებით. ებ-დან გამოყოფილი Ca^{2+} აითვისება ახლოს მდებარე მიტოქონდრიის მიერ ვოლტაჟ-დამოკიდებულ ანიონ-სელექციური არხებით (VDACs) და მიტოქონდრიული Ca^{2+} -ის უნიპორტერ კომპლექსის (MCU) მეშვეობით. ინოზიტოლ ტრიფოსფატის რეცეპტორების საშუალებით Ca^{2+} გამოყოფის შემდეგ, კალციუმი აღწევს მიტოქონდრიაში მიტოქონდრიის გარე მემბრანის VDAC არხის მეშვეობით. Ca^{2+} მიტოქონდრიის მატრიქსში MCU კომპლექსის მეშვეობით ხვდება, რომელიც მიტოქონდრიის შიდა მემბრანაზეა განლაგებული (Baines et al. 2007).



სურათი 4. კალციუმის მიმოცვლა მიტოქონდრიაში.

ელექტრონული სატრანსპორტო ჯაჭვის აქტივობის შედეგად H^+ იონები გადაიქაჩება მიტოქონდრიული მატრიქსიდან მემბრანათაშორის სივრცეში, რაც წარმოიქმნის ელექტროქიმიურ პროტონულ გრადიენტს. ეს გრადიენტი ორი კომპონენტისგან შედგება: მატრიქსული და ციტოზოლური pH სხვაობისა და მემბრანული პოტენციალის სხვაობისაგან ($\Delta\psi$) რომელიც -180mV -ზე ნარჩუნდება და მიტოქონდრიული კალციუმის ათვისების წამყვან ძრავას წარმოადგენს. მიტოქონდრიას კალციუმის გამოსაყოფად გააჩნია ორივე, Na^+ -დამოკიდებული და Na^+ -დამოუკიდებელი მექანიზმი. მიტოქონდრიული კალციუმის ზრდა ააქტივებს მეტაბოლიზმს, რადგან პირუვატდეჰიდროგენაზა და კრებსის ციკლის მიმდინარეობის განმსაზღვრელი ორი ფერმენტი, იზოციტრატდეჰიდროგენაზა და α -კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზა Ca^{2+} -ით აქტივდება, რაც საბოლოოდ ATP-ის პროდუქციის გაზრდას იწვევს. ციტოზოლური კალციუმი ასევე პირდაპირ ზეგავლენას ახდენს მიტოქონდრიულ მეტაბოლიზმზე რადგან მალატ-ასპარტატის შათლის კომპონენტი, ასპარტატ-გლუტამატ გადამტანი ციტოზოლური კალციუმის მეშვეობით სტიმულირდება (Giorgi, Marchi, and Pinton 2018).

ად-ის უჯრედულ და ცხოველთა მოდელებში A β აძლიერებს Ca^{2+} წვდომას ციტოპლაზმაში, და ამცირებს უჯრედის ციტოპლაზმური Ca^{2+} დაქვეითების უნარს. მომატებული კალციუმის დონე ხელს უშლის მიტოქონდრიის ფუნქციონირებას, რაც თავის მხრივ, ამცირებს ATP-ის პროდუქციას. ოქსიდაციური ფოსფორილირების დათრგუნვა, იწვევს მიტოქონდრიის დეპოლარიზაციას, რაც კიდევ უფრო ზღუდავს უჯრედში კალციუმის ნორმალურ გადანაწილებას.

თავი 2. სიგმა-1 რეცეპტორი და მისი ფუნქციები

2.1. მიტოქონდრიასთან ასოცირებული ენდოპლაზმური ბადის მემბრანები (MAMs) და მათი ფუნქცია

ალცჰაიმერის დაავადების დროს როგორც პაციენტებში, ასევე ცხოველთა და უჯრედულ მოდელებში აღინიშნება მიტოქონდრიის დაქვეითებული ფუნქცია. მიტოქონდრიას ცენტრალური როლი უჭირავს აპოპტოზის, ლიპიდების სინთეზისა და უჯრედშიდა კალციუმის ბუფერულ ფუნქციებში. მიტოქონდრიის გარე მემბრანა უკავშირდება ენდოპლაზმური ბადის რეგიონს, რომელსაც მიტოქონდრიასთან ასოცირებული ენდოპლაზმური ბადის მემბრანები ეწოდება. MAMs არის უჯრედშიდა ლიპიდური რაფტი რომელიც Ca^{2+} -ის ჰომეოსტაზს, გლუკოზის, ფოსფოლიპიდებისა და ქოლესტეროლის მეტაბოლიზმს არეგულირებს (Hayashi et al. 2009). ყველა ეს პროცესი ზიანდება/იცვლება ად-ის დროს (Janikiewicz et al. 2018). MAMs სტრუქტურა თანაბარად გვხვდება როგორც ნეირონების სომის, ისე სინაფსის არეში, MAMs-ზე ასოცირებული ცილების მომატებული ექსპრესია აღინიშნება როგორც პოსტმორტულ ად ტვინში, ისე APP Swe/Lon თავგებში. β -სეკრეტაზას მიერ გახლეჩილი APP-დან გენერირებული 99-aa -ტერმინალ ფრაგმენტი (C99) იხლიჩება γ -სეკრეტაზას მიერ $\text{A}\beta$ -ს წარმოსაქმნელად. γ -სეკრეტაზას აქტივობა მომატებულია MAMs-ზე. C99 ენდოსომების გარდა, MAMs-ზეც არის ნანახი, სადაც γ -სეკრეტაზას მეშვეობით სწრაფად პროცესირდება. ად-ის უჯრედულ მოდელებში MAMs-ზე არაპროცესირებული C99 კონცენტრაცია იზრდება, რაც შესაბამისად სფინგოლიპიდების მიმოცვლის და მიტოქონდრიის და MAMs-ის მემბრანების ლიპიდების შემადგენლობის ცვლილებას იწვევს. მიტოქონდრიული მემბრანის კომპოზიციის ცვლილება მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის აქტივობაზე და სუპერკომპლექსების ფორმირებაზე ახდენს ზეგავლენას, რაც შესაბამისად შესაძლოა ად-თვის დამახასიათებელ ბიოენერგეტიკულ დეფიციტს იწვევდეს (Pera et al. 2017).

ჰიპოკამპის ნეირონების პირველად კულტურაში $\text{A}\beta$ -ს ექსპოზიციის შემდეგ მიტოქონდრიასა და ენდოპლაზმურ ბადეს შორის კონტაქტი მატულობს.

A β -ს ექსპოზიციის შემდეგ, ორ ორგანელას შორის გაზრდილმა კონტაქტმა გამოიწვია მიტოქონდრიისა და ენდოპლაზმურ ბადეს შორის კალციუმის მიმოცვლის გაძლიერება ნეირობლასტომას უჯრედებში. ოლიგომერიული A β , ნანომოლარულ კონცენტრაციებში ზეგავლენას ახდენს მიტოქონდრიასა და ენდოპლაზმურ ბადეს შორის კავშირზე და მიტოქონდრიული კალციუმის რეგულაციაზე. Ca²⁺-ის მაღალი კონცენტრაციისას მიკროდომენების ფორმირება ებ-სა და მიტოქონდრიას შორის მნიშვნელოვანია მიტოქონდრიის მატრიქსში Ca²⁺-ის შესვლისათვის. მიტოქონდრიასა და ებ-ს შორის დისტანცია (~50 ნმ) დაცულია სხვადასხვა რეგულატორების მიერ (Hedskog et al. 2013).

ერთ-ერთი ცილა, რომელიც ჩართულია Ca²⁺ რეგულაციაში MAMs-ზე არის სიგმა-1 რეცეპტორი. Sig-1R არის მოლეკულური შაპერონი რომელიც ენდოპლაზმური ბადისა და მიტოქონდრიის კონტაქტის ადგილას მდებარეობს და სხვადასხვა კვლევით გარკვეულ როლს ასრულებს ნეიროდეგენერაციული დაავადებების პათოგენეზში.

2.2. სიგმა-1 რეცეპტორის სტრუქტურა, ფუნქცია, ექსპრესია, ლიგანდები და პარტნიორები

Sig-1R რეცეპტორის შესახებ პირველი ინფორმაცია მარტინსა და მის კოლეგებს უკავშირდება. მათ გამოთქვეს ვარაუდი ოპიოიდური რეცეპტორის რამდენიმე სახეობის არსებობის შესახებ, რომლებიც მორფისა და მისი სხვადასხვა სტრუქტურული ანალოგების სამიზნეს წარმოადგენდნენ (Gilbert and Martin 1976). სხვადასხვა ოპიოიდური რეცეპტორის ჰიპოთეზაზე მუშაობისას, სუმ (Su, 1982) დაადასტურა სიგმა რეცეპტორის არსებობა, რომელიც განსხვავდებოდა მარტინის და მისი კოლეგების „სიგმა ოპიოიდური“ რეცეპტორისგან იმით, რომ ამ უკანასკნელს ახასიათებდა დაბალი აფინობა ნალტრექსონის მიმართ, რომელიც უნივერსალურ, მაღალი აფინობის მქონე ანტაგონისტს წარმოადგენს ყველა ოპიოიდური რეცეპტორის ქვეტიპისათვის. შესაბამისად, სუს მიერ აღმოჩენილი რეცეპტორი, თავისთავად წარმოადგენდა ცალკეულ, ორიგინალურ

რეცეპტორს და არა ოპიოიდური რეცეპტორების სახეობას. სიგმა რეცეპტორის ორი სახეობა არის იდენტიფიცირებული: სიგმა-1 და სიგმა-2 რეცეპტორი (Hellewell and Bowen 1990). სიგმა-1 კლონირებულია და წარმოადგენს ენდოპლაზმური ბადის ცილას. სიგმა-2 რეცეპტორი 2017 წ. იქნა კლონირებული. სიგმა-1 რეცეპტორი ძირითადად მდებარეობს MAMs-ზე, სადაც ის ფუნქციონირებს როგორც მოლეკულური შაპერონი და ინარჩუნებს IP₃ რეცეპტორის სწორ კონფორმაციას, რითაც უზრუნველყოფს კალციუმის მიმოცვლას ენდოპლაზმური ბადიდან მიტოქონდრიაში და ამით ხელს უწყობს ატფ-ის წარმოქმნას (Hayashi and Su 2007). MAMs-ზე Sig-1R ასევე შაპერონულ ფუნქციას უწევს ენდოპლაზმური ბადის სტრესის სენსორ, ინოზიტოლის-საჭიროების მქონე ფერმენტს (IRE-1 Inositol-requiring enzyme), რითაც უზრუნველყოფს ენდოპლაზმური ბადის სტრესის სწორ ტრანსმისიას უჯრედის ბირთვზე და შესაბამისად, ანტისტრესული და ანტიოქსიდაციური ცილების ექსპრესიის მატებას. Sig-1R ასევე ამცირებს რეაქტიული ჟანგბადის ფორმების წარმოქმნას Nrf2-ის სიგნალის გაძლიარებით. აგონისტების ან სტრესორების სტიმულაციის შედეგად, Sig-1R-ს შეუძლია გადაადგილდეს პლაზმურ მემბრანაზე და დაუკავშირდეს არხებს, რეცეპტორებს და სხვადასხვა კინაზებს. Sig-1R ასევე ნაწილობრივ იყო ბირთვის გარე მემბრანაზე, სადაც ის ურთიერთქმედებს ემერინთან, ბირთვის მემბრანის რეზიდენტ ცილასთან და ახდენს ქრომატინის რემოდელირებაში მონაწილე ფაქტორების ჩართვას გენის ტრანსკრიპციის რეგულირებისათვის. სხვადასხვა ექსპერიმენტარული თუ ბიოინფორმატიკული კვლევა სწავლობს Sig-1R რეცეპტორის შესაძლო პარტნიორ ცილებს პლაზმურ მემბრანაზე, ენდოპლაზმურ ბადეზე, მიტოქონდრიაში თუ ციტოზოლში (Mori et al. 2013).

სიგმა-1 რეცეპტორი არის მემბრანის ინტეგრალური ცილა, 26kDa ზომით. რეცეპტორის კლონირებამ 1990 წლებში აჩვენა რომ, იგი არ არის დაკავშირებული აქამდე ცნობილი რეცეპტორების კლასებთან. 2016წ. დადგენილ იქნა რეცეპტორის სამგანზომილებიანი სტრუქტურა - ტრიმერული არქიტექტურა ერთი ტრანსმემბრანული დომენით. კრისტალოგრაფიით დადგინდა ცილის C-ტერმინალიც. ავტორების მიერ შემოთავაზებულ იქნა ვერსია C-ტერმინალის ციტოპლაზმური ლოკაციის შესახებ.

თუმცა, მოგვიანებით *in vivo* ექსპერიმენტებმა C-ტერმინალის ორიენტაცია ებ-ის ლუმენის მხარეს წარმოადგინეს (H. R. Schmidt et al. 2016; Mavylutov et al. 2018).

მიუხედავად იმისა, რომ Sig-1R მნიშვნელოვანია თავისი ფართო ფიზიოლოგიური და ფარმაკოლოგიური აქტივობის გამო, წლების მანძილზე მისი დეფინიცია ხდებოდა მხოლოდ ფარმაკოლოგიური დაკავშირების საიტის მიხედვით. ენდოგენური ლიგანდის შესწავლისა და აღმოჩენის მრავალი მცდელობა ჯერ-ჯერობით წარუმატებლად დასრულდა. ცილას არ გააჩნია აქამდე ცნობილი ენდოგენური აქტივობა, და ფუნქციონირებს სხვადასხვა ცილების შაპერონად და ალოსტერულ მოდულატორად. შესაბამისად, Sig-1R ლიგანდები ფუნქციონირებენ, როგორც ცილა-ცილოვანი ურთიერთქმედებების ალოსტერული მოდულატორები. რენტგენოსტრუქტურული კრისტალოგრაფიით დადგენილ მოდელზე დაყრდნობით, კრუსმა და მისმა კოლეგებმა წარმოადგინეს რეცეპტორის სტრუქტურული ცვლილებები აგონისტ და ანტაგონისტებთან დაკავშირების შემდეგ. ამ კვლევის თანახმად, აგონისტების ზემოქმედებამ შესაძლოა ხელი შეუშალოს ცილის ოლიგომერიზაციას (Hayden R. Schmidt et al. 2018; Yano et al. 2018).

სიგმა-1 რეცეპტორის ფიზიოლოგიური ფუნქციის მიხედვით, Sig-1R ლიგანდების დაყოფა „აგონისტებად“ და „ანტაგონისტებად“, ისევე როგორც G-ცილასთან დაკავშირებული რეცეპტორების შემთხვევაშია, არ არის შესაძლებელი. მაგალითად: სიგმა-1 რეცეპტორის „ანტაგონისტები“ ავლენენ ტკივილგამაყუჩებელ ეფექტს ნეიროპათიული ტკივილის დროს და წამლის მიმართ დამოკიდებულ ცხოველებში ამცირებენ წამლის ძეხვისა და მიღების ქცევას, მაშინ როდესაც სიგმა-1 რეცეპტორის „აგონისტები“ დადებით ეფექტს ავლენენ დეპრესიის წინააღმდეგ. თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ თერაპიული ფუნქციის მხრივ, ეფექტებს შორის სხვადასხვაობის გამო კონსესუსი არ იქნა მიღწეული. მაგალითად, ფსიქოზის საწინააღმდეგო საშუალებების ძიების დროს, როგორც „აგონისტებმა“, ისე „ანტაგონისტებმა“ დადებითი ეფექტი აჩვენეს. Sig-1R აქვს უნარი დაუკავშირდეს სხვადასხვა ცილას და მათთან დაკავშირება შესაძლოა განსაზღვრავდეს ლიგანდების ფუნქციის ბუნებას და სიგნალის შედეგს.

თავი 3. სიგმა-1 რეცეპტორის როლი ალცჰაიმერის დაავადების განვითარებასა და მიმდინარეობაში

ნეიროდეგენერაციის ზოგადი პათოფიზიოლოგიური სურათი საკმაოდ კომპლექსურია. სახეზეა: ოქსიდაციური სტრესი და მიტოქონდრიული დისფუნქცია, პროტეოტოქსიკური და უჯრედული სტრესი, კალციუმის დისბალანსი, ნეიროინფლამაცია, ჰიპოქსია, დნმ-ის დაზიანება, ცვლილება სინაფსის არეში და აპოპტოზი. კლინიკურად დიაგნოზი ძირითადად ეფუძნება კოგნიტური ფუნქციების შეფასებას, მაგნიტურ რეზონანსულ კვლევას - ჰიპოკამპის მოცულობის განსასაზღვრად, ფოლაქების ვიზუალიზაციას პოზიტრონ ემისიური ტომოგრაფიის მეშვეობით. სისხლში A β -ს სახეობების ან ფოსფორილირებული ტაუ ცილის ფორმების აღმოჩენა დღემდე განვითარების ფაზაში მყოფ დიაგნოსტიკურ საშუალებებს წარმოადგენს. მკურნალობასთან დაკავშირებით, მხოლოდ სიმპტომური მკურნალობაა შესაძლებელი. სტანდარტულ სამკურნალო საშუალებას წარმოადგენენ ქოლინესთერაზას ინჰიბიტორები-დონეპეზილი, რივასტიგმინი, გალანტამინი, ან NMDA რეცეპტორის ანტაგონისტი მემანტინი. ფსიქოტროპული საშუალებები გამოიყენება ად-ის თანხმლები სიმპტომების სამკურნალოდ, როგორიცაა დეპრესია, აგზნებადობა და ძილის დარღვევები (Lane, Hardy, and Schott 2018).

ვინაიდან, Sig-1R-ის აქტივაცია სხვადასხვა ციტოპროტექციული პროცესების მოდულირებას ახდენს, Sig-1R აგონისტები შესაძლო კანდიდატებს წარმოადგენენ დაავადების სამკურნალოდ, ამასთანავე ად-ის პრეკლინიკურ კვლევებში Sig-1R-ის ლიგანდებმა ნეიროპროტექციული თვისებები გამოავლინეს. In vitro, Sig-1R სელექციურმა აგონისტმა PRE-084 და (-)MR-22 შეძლეს A β ₂₅₋₃₅ გამოწვეული ტოქსიკურობის პრევენცია ვირთხის ნეირონების კულტურაში (Marrazzo et al. 2005). აფობაზოლმა რომელიც შერეულ Sig-1R და Sig-2R ნაერთს წარმოადგენს დათრგუნა უჯრედშიდა Ca²⁺ ზრდა ვირთხის კორტიკალურ ნეირონებში A β ₂₅₋₃₅ გახანგრძლივებული ექსპოზიციის შემდეგ და ასევე შეამცირა უჯრედული კვდომა, პრო-აპოპტოზური ცილის

Bax და Caspasa-3 ცილის ექსპრესია და გამოიწვია ანტი-აპოპტოზური ცილა Bcl-2 ზრდა. საინტერესოა ის ფაქტი, რომ მიკროგლიაც მნიშვნელოვან როლს თამაშობს Sig-1R გაშუალებულ ციტოპროტექციაში $A\beta_{25-35}$ -ის ტოქსიკურობის წინააღმდეგ. აფოზოლოით მკურნალობამ შეამცირა მიკროგლიის გააქტივება $A\beta$ -ს მიერ. ამ პრეპარატმა ასევე შეძლო მიკროგლიაში ATP-ის დაქვეითების პრევენცია, რაც $A\beta_{25-35}$ 24 საათიანი ექსპოზიციის შემდეგ აღინიშნა (Behensky et al. 2013).

In vivo, Sig-1R რეცეპტორის აგონისტებმა PRE-084, (-)-MR22, ANAVEX1-41, ANAVEX2-73, DHEA, DHEAs, და პრეგნენოლონ სულფატმა ად-ის ფარმაკოლოგიურ მოდელში ნეიროპროტექციული თვისებები გამოავლინეს (Villard et al. 2011; Villard et al. 2009; Lahmy et al. 2013; Antonini et al. 2011). ამ Sig-1R აგონისტების ადმინისტრაცია ხდებოდა ერთჯერადად ან ქრონიკულად ფარმაკოლოგიური, ტოქსიკანტების ინექციის შემდეგ ($A\beta_{25-35}$ პეპტიდი ან ალუმინის ქლორიდი). $A\beta$ პეპტიდის ინექცია ხორციელდებოდა ინტრაცერებროვენტრიკულურად ან ლოკალურად ჰიპოკამპის ფორმაციაში, განცალკევებით ან კომბინირებულად ^{125}I -საპორინთან ერთად, რათა უფრო ძლიერი ქოლინერგული დაზიანება გამოეწვიათ. ამ მოდელებში, Sig-1R აგონისტებმა შეამცირეს დასწავლასთან დაკავშირებული დარღვევები, ოქსიდაციური სტრესის მარკერები, ქოლინერგული ტონუსი, ნეიროინფლამაცია, და აპოპტოზური სასიგნალო გზის ინდუქცია (Antonini et al. 2011). ორმა კვლევამ ასევე აჩვენა $A\beta_{1-42}$ შემცირებული დაგროვება თავის ტვინში. Lahmy et al. შეამოწმეს ტაუს ჰიპერფოსფორილებაში მონაწილე მთავარი კინაზას, გლიკოგენსინთაზა კინაზა 3 β (GSK-3 β) გააქტივება და ჰიპერფოსფორირებული ტაუს ფიზიოლოგიური და პათოლოგიური ეპიტოპები $A\beta_{25-35}$ ინექცირებულ თაგვებში. PRE-084 და ANAVEX2-73 დააქვეითეს GSK-3 β აქტივაცია და ტაუ ცილის ჰიპერფოსფორილება (Lahmy et al. 2013). უფრო მეტიც, Fisher et al კვლევაში AF710B, შერეულმა M1 mAChR/Sig1-R აგონისტმა, 2 თვის განმავლობაში 10 μ g/kg კონცენტრაციით ადმინისტრაციის შემდეგ მდებარე 3xTG ად თაგვებში დააქვეითა დარღვევები დასწავლაში, შეამცირა BACE1 დონე, GSK3 β აქტივობა, p25/CDK5 დონე და ნეიროინფლამაცია. AF710B ასევე დააქვეითა ხსნადი

და უხსნადი $A\beta_{1-40}$ და $A\beta_{1-42}$ აკუმულაცია, ფოლაქების რაოდენობა და ტაუს ჰიპერფოსფორილირება (Fisher et al. 2016).

მიუხედავად იმისა, რომ სიგმა-1 რეცეპტორის ლიგანდების, როგორც ად-ის პოტენციური თერაპიული საშუალებების როლი იზრდება, უშუალოდ პათოლოგიის ზეგავლენა რეცეპტორის ექსპრესიაზე არ არის კარგად დოკუმენტირებული, განსაკუთრებით დაავადებულთა თავის ტვინში დაავადების სხვადასხვა ფაზის დროს. პოზიტრონ ემისიული ტომოგრაფიის გამოყენებით ალცჰაიმერიტ დაავადებულთა თავის ტვინებში აღინიშნება Sig-1R-ის დანაკარგი. ად-ის ადრეული ფორმის მქონე პაციენტებში კონტროლთან შედარებით მცირეა 11 C-SA4503 მიმაგრების პოტენციალი შუბლის, საფეთქლის, კეფის წილებში, ნათხემსა და თალამუსში, თუმცა მსგავსი სურათი ჰიპოკამპის არეში არ შეინიშნა (Mishina et al. 2008).

საგულისხმოა ის ფაქტი, რომ ამჟამინდელი მედაკამენტური საშუალებები, რომლებიც ძირითადად ქოლინესთერაზას ინჰიბიტორებს და NMDA რეცეპტორის ანტაგონისტებს წარმოადგენენ მხოლოდ საშუალო დონის ეფექტურობას აჩვენებენ ად სიმპტომების მართვის თვალსაზრისით. პირველი მიღწევა ად-ს თერაპიულ მკურნალობაში სავარაუდოდ იქნება ეფექტური ნეიროპროტექციული აგენტის აღმოჩენა.

სიგმა-1 რეცეპტორზე და მის შაპერონულ ფუნქციებზე კვლევები არსებობს, თუმცა აქამდე არ გამოქვეყნებულა მისი Rho GTP-აზებთან ურთიერთქმედება და ლიგანდების ეფექტები მიტოქონდრიის ბიოენერგეტიკაზე და სუნთქვითი ჯაჭვის ფერმენტების აქტივობაზე. შეასბამისად, აღნიშნული კვლევისას ჩვენ შევისწავლეთ სიგმა-1 ლიგანდების ზემოქმედება მიტოქონდრიაზე ფიზიოლოგიურ და პათოლოგიურ პირობებში, რომელიც გამოწვეული იყო $A\beta$ -პეპტიდის მიტოქონდრიაზე პირდაპირი დამატებით.

მეთოდოლოგია

1.1 რეაგენტები

2-(4-მორფონილეთილ)-1-ფენიციკლოჰეპანკარბოქსილატ ჰიდროქლორიდი (PRE-084), 4-მეთოქსი-3-(2-ფენილეთოქსი)-N,N დიპროპილ ბენზენეთანამინ ჰიდროქლორიდი (NE-100), დეჰიდროეპიანდროსტერონ სულფატი (DHEAs), პროგესტერონი შეძენილ იქნა Sigma-Aldrich-დან. დონეპეზილი, ტეტრაჰიდრო-N,N-დიმეთილ-5,5-დიფენილ-3-ფურანმეთანამინ (ANAVEX1-41, AN1-41), ტეტრაჰიდრო-N,N-დიმეთილ-2,2-დიფენილ-3-ფურანმეთანამინ ჰიდროქლორიდი (ANAVEX2-73, AN2-73) და (S)-1-(2,8-დიმეთილ-1-თია-3,8-დიაზასპირო [4.5]dec-3-yl)-3-(1H-ინდოლ-3-yl)პროპან-1-one (ANAVEX3-71, AN3-71) მოწოდებულ იქნა ANAVEX Life Sciences (New York, USA). VAS-3947 Calbiochem (Millipore, Molsheim, საფრანგეთი). ჰალოპერიდოლი და (+)პენტაზოცინი (Sigma Aldrich). Aβ₁₋₄₂ პეპტიდი Anaspec (Eurogentec, Liège, ბელგია) და Aβ₂₅₋₃₅ პეპტიდი Polypeptides (Strasbourg, საფრანგეთი). ანტი-Sig-1R ანტისხეული (ab53852) და ანტი-კომპლექს I იმუნოშემოკავი ანტისხეული (ab109798) Abcam (პარიზი, საფრანგეთი). ყველა სხვა ქიმიური ნაერთი და ცდის კიტი შეძენილი იყო Sigma-Aldrich-დან.

1.2 ცხოველები

მამრი Swiss OF-1 თაგვები შეძენილ იქნა Janvier-დან (სანტ-ბერთევეინი (Saint-Berthevin) საფრანგეთი). ექსპერიმენტებისათვის გამოყენებული იქნა 7კვირის ასაკის ცხოველები. ცხოველები იმყოფებოდნენ პლასტმასის გალიებში, საკვებსა და წყალზე თავისუფალი წვდომით, (22 ± 1 °C, 40–60% ტენიანობა) სინათლისა და სიბნელის 12 საათიან ციკლში. ცხოველთა პროცედურები ექვემდებარება 2010/63/EU დირექტივებს და ARRIVE გაიდლაინებს (Kilkenny et al. 2010).

1.3 მიტოქონდრიის გამოყოფა თავის თავის ტვინიდან

თავის წინა ტვინი აწონვის შემდეგ ჰომოგენიზირდა ცივ ჰომოგენიზაციის ბუფერში (220mM მანიტოლი, 70mM საქაროზა, 10mM 4-(2-ჰიდროქსიეთილ)-1-პიპერაზინეთანსულფონური მჟავა (HEPES), 2mM ეთილენ გლიკოლ ტეტრა-აცეტატის მჟავა (EGTA), pH7.4) დუნსის (Dounce) ჰომოგენიზატორის გამოყენებით. თითოეული ჰომოგენატი დაცენტრიფუგირდა 10წთ-ის განმავლობაში 1000g. მიღებული ნალექი გადაიღვარა და სუპერნატანტი დაცენტრიფუგირდა 10 000g 20 წთ-ის განმავლობაში. მიღებული ნალექი შეგროვდა და დარესუსპენდირდა ცივ იზოლაციის ბუფერში (220mMმანიტოლი, 70mM საქაროზა, 10mM HEPES, 0.01mM EGTA, pH7.4).

1.4 მიტოქონდრიის გამოყოფა ხარის თავის ტვინიდან

კორტიკალური არა-სინაპტოსომური ხარის თავის ტვინის მიტოქონდრიების გამოყოფა განხორციელდა წყვეტილი პერკოლის გრადიენტით (Sims and Anderson 2008). თავის ტვინის ქერქი დაჰომოგენიზირდა იზოლაციის ბუფერში (225mM მანიტოლი, 75mM საქაროზა, 5mM HEPES, 1mM EGTA, pH7.5). ჰომოგენატი დაცენტრიფუგირდა 1250 g 5 წთ. მიღებული სუპერნატანტი დაცენტრიფუგირდა 21 000 g 10 წთ-ის განმავლობაში. ნალექი დარესუსპენდირდა 15% პერკოლის ხსნარში და დატანილ იქნა 23% და 40% პერკოლის გრადიენტზე. ნიმუშები დაცენტრიფუგირდა 25 000 g 8 წთ, და ქვედა ინტერფაზა შეგროვდა. მიღებული მასალა გაირეცხა ორჯერ იზოლაციის ბუფერში და დარესუსპენდირდა ამავე ბუფერში EGTA-ს გარეშე. მთელი პროცედურა შესრულდა ცივ ოთახში.

1.5 რეაქტიული ჟანგბადის სახეობების გაზომვა

მიტოქონდრიული ROS-ის ფორმირება გაზომილ იქნა 2',7'-დიქლოროფლუორესცინ დიაცეტატიტის 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH₂-DA) საშუალებით. თავის წინა ტვინის მიტოქონდრიები (0.2mg/ml) ინკუბირებულ იქნა რესპირაციულ ბუფერში (100mM საქაროზა, 100mM KCl, 10mM HEPES, 5mM KH₂PO₄, 0.5mM MgCl₂ pH 7.4) ოქსიდაციური სუბსტრატების (5mM პირუვატი და 2.5mM მალატი) და სხვადასხვა Sig-1R ლიგანდების თანაობისას. 10μM DCFH₂-DA დამატებულ იქნა არეში და DCF-ის ფლუორესცენცია აღირიცხა ყოველ წუთში, 30 წუთის განმავლობაში 37°C Fluoroskan Ascent წამკითხველზე 485nm ამგზნები და 538nm ემისიური ფილტრებით. ბუფერის ფლუორესცენცია, მიტოქონდრიის გარეშე (ფონი) გამოაკლდა შედეგებს. ექსპერიმენტში სადაც Aβ პეპტიდი იქნა დამატებული, მიტოქონდრია ინკუბირებული იყო პეპტიდთან/პეპტიდ + ლიგანდებთან და ROS-ის პროდუქცია იქნა მონიტორირებული. Aβ₁₋₄₂-ის რეკონსტიტუცია მოხდა 1% NH₄OH (მწარმოებლის მიერ მოწოდებული) და განზავებულ იქნა 10mM კალიუმ ფოსფატის ბუფერში (KPB), ალიქვოტები შენახულ იქნა -20°C. ყოველი ექსპერიმენტის წინ, პეპტიდის „დაძველება“ განხორციელდა 37°C 24სთ-ის განმავლობაში.

1.6 ჟანგვითი ფოსფორილირების გაზომვა

ჟანგბადის მოხმარების დონე გაიზომა პოლაროგრაფიის მეშვეობით, კლარკის (Clark) ტიპის ელექტროდით, ტემპერატურა კონტროლირებად (30°C) კამერაში (MS-200 system, Strathkelvin, UK). მიტოქონდრია (0.8 mg/ml) მოთავსებულ იქნა რესპირაციის ბუფერში. მეორე მდგომარეობის (State 2) რესპირაცია განისაზღვრა 5mM პირუვატ-მალატის დამატებით და მესამე მდგომარეობა (State3) გაიზომა 0.5mM ADP-ის დამატებით, სადაც რესპირაციის ზრდა ATP-ის სინთეზისათვის პროტონების ძვრადობაზე მიუთითებს. რესპირაციის საკონტროლო თანაფარდობა (respiration control

ration RCR) გამოთვლილ იქნა როგორც state3/state2 თანაფარდობა. RCR სუბსტრატის ოქსიდაციასა და ფოსფორილირებას შორის კავშირს განსაზღვრავს, რითაც შეგვიძლია განვსაზღვროთ მიტოქონდრიის ინტაქტურობა და რაიმე სახის შეფერხების არსებობა სუბსტრატის დაჟანგვასა და ფოსფორილირებას შორის. ლიგანდების ეფექტების შესაფასებლად, მიტოქონდრიისა და $A\beta_{1-42}$ და/ან Sig-1R ლიგანდების 20წთ-იანი პრეინკუბაცია განხორციელდა ოთახის ტემპერატურაზე.

1.7 მიტოქონდრიის სუნთქვით ჯაჭვში შემავალი ფერმენტების აქტივობის განსაზღვრა

1.7.1 I კომპლექსის აქტივობის განსაზღვრა (NADH უბიქინონ ოქსიდორედუქტაზა)

I კომპლექსის აქტივობა განისაზღვრა სპექტროფოტომეტრით (Specord 250, Analytik Jena). ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრამდე, ფერმენტის აქტივობის გაზრდის მიზნით, იზოლირებული მიტოქონდრია სამჯერ გაიყინა და გამოიღო. ნიმუში (0.15 მგ მიტოქონდრია $\pm$ ლიგანდები და/ან $A\beta_{1-42}$) და 200 μ M NADH დამატებულ იქნა ცდის ბუფერში რომელიც შეიცავდა 25mM KPB (კალიუმ-ფოსფატის ბუფერს), 250 μ M KCN და 1მგ/მლ ხარის შრატის ალბუმინს (BSA) pH 7.4. პარალერულად, ცალკე კიუვეტაში იმავე რაოდენობის რეაგენტებთან და ნიმუშთან ერთად, ფერმენტული აქტივობა განისაზღვრა 3 μ M როტენონის დამატებით. რეაქცია დაიწყო 100 μ M დეცილუბიქინონის (DUQ), ელექტრონის აცეპტორის დამატებით. I კომპლექსის მიერ NADH-ის დაჟანგვა გაიზომა 340ნმ ტალღაზე 2წთ-ის განმავლობაში. სპეციფიური აქტივობა გამოთვლილ იქნა, როგორც როტენონ-მგრძნობიარე აქტივობა.

1.7.2 II კომპლექსის აქტივობის განსაზღვრა (სუქცინატდეჰიდროგენაზა)

სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობა განისაზღვრა როგორც ხელოვნური ელექტრონის აცეპტორის 2,6 დიქლორფენოლინდოლის (DCIP) აღდგენის რეაქცია. მიტოქონდრია 0.05მგ ინკუბირებულ იქნა 6 mM სუქცინატთან 7წთ-ის განმავლობაში 37 °C ბუფერში რომელიც შეიცავდა 10mM KH_2PO_4 , 2mM EDTA, 3 μ M როტენონს და 1მგ/მლ

BSA. 100 μ M DUQ და 80 μ M DCIP დაემატა და გაიზომა აბსორბციის კლება 600ნმ, რომელიც DCIP აღდგენას შეესაბამება (Specord 250, Analytik Jena).

1.7.3 III კომპლექსის აქტივობის განსაზღვრა (უბიქვინოლ ციტოქრომ c რედუქტაზა)

III კომპლექსის აქტივობა განისაზღვრა როგორც აბსორბციის ზრდა ციტოქრომ c-ს აღდგენისას 550ნმ სიგრძის ტალღაზე (Specord 250, Analytik Jena). 0.025მკგ მიტოქონდრია მოთავსებულ იქნა 10mM KH_2PO_4 , 2mM EDTA, 3 μ M როტენონს და 1მგ/მლ BSA და 250 μ M KCN. რეაქცია დაიწყო 100mM DUQH_2 -ის დამატებით. პარალერურად, იგივე ექსპერიმენტი ჩატარდა 1 μ M ანტიმიცინ A (anti-mycin A) თანაობისას. III კომპლექსის სპეციფიური აქტივობა განისაზღვრა ანტიმიცინ A მგრძნობელობის მიხედვით.

1.7.4 IV კომპლექსის აქტივობის განსაზღვრა (ციტოქრომ c ოქსიდაზა)

25მკგ მიტოქონდრიული ცილა დაემატა ცდის ბუფერს (10mM KPB, 1მგ BSA, 33 μ M აღდგენილი ციტოქრომ c). რეაქციის სპეციფიკურობის განსაზღვრად 250 μ M KCN იქნა დამატებული პარალერულ კიუვეტაში. რეაქცია დაიწყო ნიმუშის დამატებით და აბსორბციის შემცირება 550ნმ ტალღის სიგრძეზე იქნა მონიტორირებული (Specord 250, Analytik Jena).

1.8 NADPH ოქსიდაზას (NOX)-ის აქტივობის განსაზღვრა

NOX-ის აქტივობა გაიზომა ლუციგენინით-გამლიერებული ქემილუმინესცენციით ლუმინომეტრში (Berthold 360). ცილა, 30-40მკგ მიტოქონდრიის უხეში ფრაქცია ან თაგვების ტვინის ჰომოგენატი ინკუბირდა ბუფერში 100mM KCl, 3mM NaCl, 3.5mM MgCl_2 , 10mM HEPES, 1.25mM EGTA $\pm$ Sig-1R ლიგანდები. ხელოვნურად სუპეროქსიდის წარმოქმნის მინიმუმადე დასაყვანად გამოვიყენეთ დაბალი კონცენტრაციით ლუციგენინი (5 μ M) და NADPH (100 μ M). O_2^- პროდუქცია გამოიხატა, როგორც არბიტრარული (შეფარდებითი) სინათლის ერთეული arbitrary light units (RLU). ზოგი

ექსპერიმენტი ჩატარდა 200ერთეული სუპეროქსიდ დისმუტაზას (SOD) ან NOX-ის ინჰიბიტორ VAS3947 (10 μ M) თანაობისას.

1.9 სუპეროქსიდდისმუტაზას (SOD) აქტივობის განსაზღვრა

SOD-ის აქტივობა განისაზღვრა ქსანტინოქსიდაზას კოლორომეტრული კიტის გამოყენებით (Sigma-Aldrich). 40 მკგ მიტოქონდრიის უხეში ფრაქცია ან თავის ტვინის ჰომოგენატი მოთავსდა WST ბუფერში სიგმა-1 რეცეპტორის ლიგანდებით ან მათ გარეშე. პროცედურა ჩატარდა მწარმოებლის მიერ მოწოდებული ინსტრუქციების შესაბამისად. 37 °C 20წთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ, აბსორბცია განისაზღვრა 450 ნმ-ზე (Biotrak II Amersham Biosciences).

1.10 იმუნოპრეციპიტაცია და Western Blotting

ახლადგამოყოფილი მიტოქონდრიების ნალექი 0.25მგ გაიხსნა იზოლაციის ბუფერში (5mM HEPES, 225mM მანიტოლი, 75mM საქაროზა) და ინკუბირდა ლიგანდებთან ერთად 60წთ-ის განმავლობაში 4°C. მიტოქონდრია დაილექა 20000g ცენტრიფუგირებით 20წთ-ის განმავლობაში და ნალექი გაიხსნა ცივ ლიზის ბუფერში და ინკუბირდა 30წთ-ის განმავლობაში 4°C-ზე. არასოლუბილიზირებული მასალა მოსცილდა ცენტრიფუგირების მეშვეობით (60წთ 20000g). სუპერნატანტი, ინკუბირდა ანტი-კომპლექსი I იმუნოშემბოჭავ ანტისხეულთან, რომელიც შეკავშირებული იყო A/G აგაროზასთან ან A/G აგაროზასთან დაკავშირებულ ანტი-Sig-1R ან ანტი Bip24 ანტისხეულთან. ინკუბაცია ტარდებოდა ღამის განმავლობაში 4°C-ზე. ცილა A/G აგაროზას ნალექის რესუსპენდირების შემდეგ ცილოვანი კომპლექსების ანალიზი მოხდა ვესტერნ ბლოტინგის მეშვეობით. SDS-პოლიაკრილამიდის გელი, ელექტროფორეზის შემდეგ გადატანილ იქნა PVDF მემბრანაზე. მემბრანის დაბლოკვის შემდეგ, ინკუბაცია განხორციელდა ანტი-Sig1-R რეცეპტორის ან სხვა სამიზნე ცილის ანტისხეულთან და ვიზუალიზირდა ECL-ის გამოყენებით (Amersham, აშშ).

1.11 Bad-ის ფოსფორილირების ცდა

Bad-ის ფოსფორილირება განისაზღვრა PhosphoTracer BAD (pSer112)+Total BAD ELISA კიტის გამოყენებით (Abcam, UK). ახლადგამოყოფილი მიტოქონდრიის ნალექი (0.25mg თითოეული ნიმუშისათვის) გაიხსნა იზოლაციის ბუფერში (5mM HEPES, 75mM საქაროზა, 220mM მანიტოლი) და დაინკუბირდა ან 1 μ M (+)პენტაზოცინთან, ან 1 μ M ჰალოპერიდოლთან ან ორივე ლიგანდთან ერთად 4°C 60წთ-ის განმავლობაში. ინკუბაციის შემდგომ, მიტოქონდრია დაილექა ცენტრიფუგის მეშვეობით 20 000 g 20წთ. მიღებული ნალექი გაიხსნა ლიზის ბუფერში (20mM Tris-HCl pH 8.0, 137mM NaCl, 10% გლიცეროლი, 1% ტრიტონ X-100, 2mM EDTA) და გაუხსნელი მასალა მოსცილდა ცენტრიფუგირებით (60წთ 20 000 g). მიტოქონდრიული ექსტრაქტები დატანილ იქნა PhosphoTracer ცდის პლანშეტზე და სუმარული BAD და BAD (pSer112) ანალიზი ჩატარდა მწარმოებლის მიერ მოწოდებული პროტოკოლის შესაბამისად.

1.12 სტატისტიკური ანალიზი

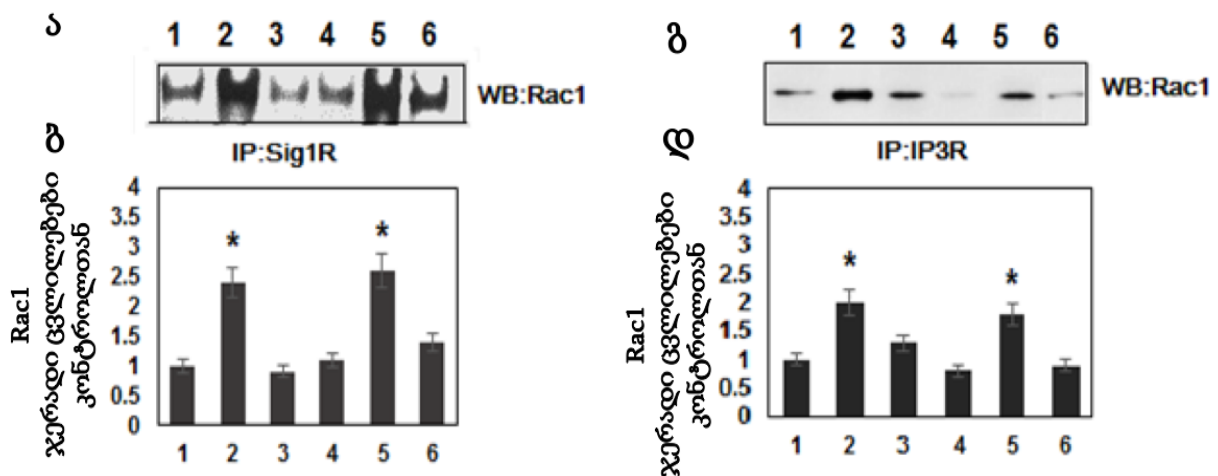
მონაცემები წარმოდგენილია როგორც საშუალო მაჩვენებლს $\pm$ S.E.M. კონცენტრაციის მრუდების ანალიზისას, რომელთაც გააჩნდათ სამზე მეტი მაჩვენებელი გამოვიყენეთ one-way ANOVA (F მაჩვენებელი), რასაც მოჰყვა one-sample post hoc t test vs. შესადარებელი დონე (მაგ.100%). ლიგანდების შედეგები, რომელთა მხოლოდ ორი კონცენტრაცია იქნა გამოყენებული, სტატისტიკურად დამუშავდა Student's t ტესტის გამოყენებით. სტატისტიკური მნიშვნელობის დონე $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$. F მონაცემები სურათების აღწერებშია მოცემული.

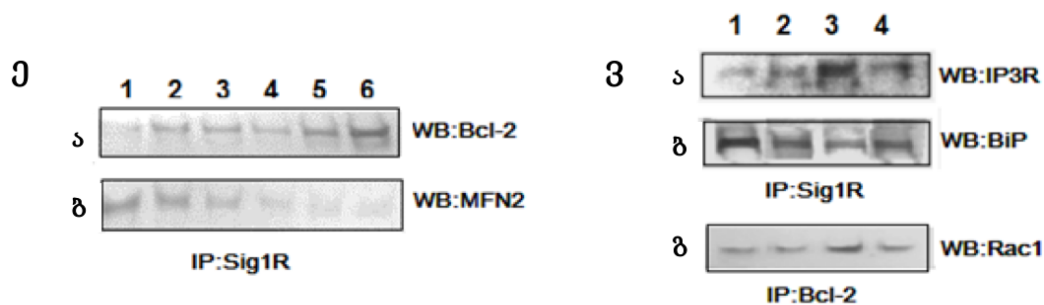
მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

თავი 1. Rac1 და Sig-1R ინტერაქციის შესწავლა

1.1 Rac1 უკავშირდება Sig-1R-ს ჰეტეროპროტეინული კომპლექსის მეშვეობით

Sig-1R-ის Rac1-თან ურთიერთდაკავშირების, აგრეთვე მათი სხვა ცილებთან დაკავშირების შესასწავლად ჩავატარეთ იმუნოპრეციპიტაციის ექსპერიმენტები. მიტოქონდრია დავაინკუბირეთ 10 μ M ჰალოპერიდოლთან (სიგმა-1 ანტაგონისტი) და 1 μ M (+)პენტაზოცინთან (სიგმა-1 სელექციური აგონისტი) ან ორივე ლიგანდთან ერთად 60 წთ-ის განმავლობაში. როგორც სხვა G ცილები, Rac1-ც გვხვდება არააქტიურ, GDP-შეკავშირებულ და აქტიურ GTP-დაკავშირებულ ფორმებში. მაკრომოლეკულურ კომპლექსის ფორმირებაში Rac1-ის აქტიური და არააქტიური მდგომარეობის განსასაზღვრად მიტოქონდრია დავაინკუბირეთ არაჰიდროლიზებად ანალოგებთან - GTP-ის შემთხვევაში GppNHp ან GDP-სთან. მიტოქონდრიული ექსტრაქტები დაილექა აგაროზასთან კონიუგირებული ანტი-Sig-1R, ანტი-IP₃R ან ანტი-Bcl-2 ანტისხეულებით და ჩამოხსნილი ცილები შევისწავლეთ Western Blot (WB)-ის მეშვეობით (სურათი 5).





სურათი 5. (+) პენტაზოცინის (P), ჰალოპერიდოლის (H), და გუანინ ნუკლეოტიდების ეფექტი Sig-1R, Rac1 და Bcl-2 ინტერაქციაზე.

მიტოქონდრიული ექსტრაქტი დაილექა ანტი-Sig-1R (IP: Sig-1R ა, ბ, ე, ვ-ა, ვ-ბ), ანტი-IP₃R (IP:IP₃R გ, დ) ან ანტი Bcl2 (IP:Bcl2 ვ-გ) ანტისხეულებით. WB ჩატარდა Rac1 (WB:Rac1 ა, გ, ვ-გ), Bcl2 (WB:Bcl2, ე-ა), MFN2 (WB: ა, გ, ე), IP₃R (WB:IP₃R ვ-ა) და BiP (WB:BiP ვ-ბ) ანტისხეულებით, სამ დამოუკიდებელ ექსპერიმენტად. (ა, გ, ე) - ზოლი 1-კონტროლი, 2-GppNp, 3-GPD, 4-ჰალოპერიდოლი, 5-(+)პენტაზოცინი, 6-ჰალოპერიდოლი და (+)პენტაზოცინი. (ვ) ზოლი 1-კონტროლი, 2-ჰალოპერიდოლი, 3-(+)პენტაზოცინი, 4-ჰალოპერიდოლი და (+)პენტაზოცინი. (ბ) Rac1 ცილის რაოდენობრივი გამოთვლა (ა) სურათის მიხედვით. n=3. P<0.05, კონტროლთან შედარებით. (დ) Rac1 რაოდენობრივი გამოთვლა (გ) სურათის მიხედვით. n=3. P<0.05, კონტროლთან შედარებით.

მიტოქონდრიული ცილების WB აჩვენა, რომ Sig-1R იმუნოპრეციპიტირდება Rac1-ით. ამ ცილებს შორის ასოციაცია მატულობს (+)პენტაზოცინის თანაობისას (სურ. 5ა და 5ბ, ზოლი-5) და იმუნოპრეციპიტატის ფორმირება იკლებს (+) პენტაზოცინის (აგონისტი) და ჰალოპერიდოლის (ანტაგონისტი) ერთდროული აპლიკაციისას (სურ 5ა და 5ბ ზოლი 6). Sig-1R-ისა და Rac1-ის ინტერაქცია ასევე მატულობს GppNHp არსებობისას (სურ 5ა და 5ბ ზოლი 2), რაც მიუთითებს, რომ მხოლოდ გააქტივებული Rac1 პირდაპირ ან არაპირდაპირ უკავშირდება Sig-1R-ს.

იმის გათვალისწინებით, რომ MAMs-ზე Sig-1R კომპლექსებს სხვადასხვა ცილებთან ამყარებს, ჩვენ გადავწყვიტეთ Sig-1R-ის IP₃R, BiP და Bcl-2-თან დაკავშირების შესწავლა.

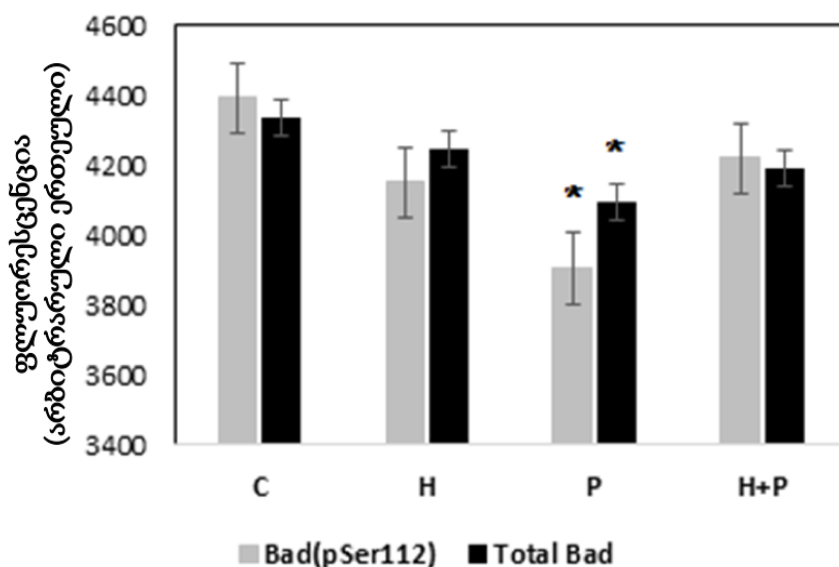
(+)პენტაზოცინ-დამოკიდებული ასოციაცია Sig-1R-სა და IP₃R-ს შორის დავადასტურეთ Sig-1R-ით იმუნოპრეციპიტაციით და ანტი-IP₃R ანტისხეულით WB-ით (სურათი-5ვ ა ზოლი-3). უფრო მეტიც, (+)პენტაზოცინ დამოკიდებული დისოციაცია Sig-1R და BiP-ს შორის მივიღეთ მიტოქონდრიული ექსტრაქტის ანტი-Sig-1R იმუნოპრეციპიტაციითა და იმუნორეაქტიულობის ანტი-BiP ანტისხეულით შესწავლით (სურ. 5ვ, ზოლი 3). ჰალოპერიდოლმა ორივე შემთხვევაში მოხსნა (+)პენტაზოცინის ეფექტები (სურ. 5ვ-ა, 5ვ-ბ, ზოლი 4), რითაც კიდევ ერთხელ დადასტურდა Sig-1R ლიგანდების მიერ სიგმა-1 გადანაწილება IP₃R-სა და BiP-ს შორის (Hayashi and Su 2007).

საინტერესოა, რომ ამგვარი ლიგანდ სპეციფიკური ინტერაქცია Sig-1R-სა და Bcl-2ს შორის არ დაფიქსირდა მაშინ როცა იმუნოპრეციპიტაცია ჩატარდა ანტი-Sig-1R ანტისხეულით (სურ. 5 ე-ა, ზოლები 4-6). თუმცა მიტოქონდრიული ექსტრაქტის ანტი-Bcl2 ანტისხეულით დალექვისას და იმუნობლოტინგის ანტი-Rac-1 ანტისხეულით ჩატარებისას, (+) პენტაზოცინ დამოკიდებული იმუნორეაქტიულობის ზრდა აღინიშნა (სურ. 5 ვ-გ, ზოლი 3). ეს მონაცემები გვიჩვენებენ, რომ სიგმა-1 რეცეპტორი პირდაპირ არ არის ჩართული Rac1-სა და Bcl-2-ის ცილოვან კომპლექსში. გარდა ამისა, ჩვენ ვნახეთ, რომ Rac1 შესაძლოა დაუკავშირდეს IP₃R-ს და ეს ასოციაცია დამოკიდებულია სიგმა-1 რეცეპტორის ლიგანდებზე (სურ. 5გ, 5დ ზოლები 1-6). ამ მონაცემებზე დაყრდნობით, Rac1 უკავშირდება IP₃R და ეს ურთიერთდაკავშირება რეგულირდება როგორც Sig1R ლიგანდებით, ასევე გუანინ ნუკლეოტიდებით.

უნდა აღინიშნოს, რომ მიტოფუზინ-2 (MFN2), რომელიც ერთ-ერთი მთავარი GTP-დამაკავშირებელი ცილაა MAM-ზე, ასევე დაილექა ანტი-Sig-1R ანტისხეულით, თუმცა ამ შემთხვევაში, არც სიგმა-1 რეცეპტორის ლიგანდებს და არც გუანინ ნუკლეოტიდებს ცილათა შეკავშირებაზე ეფექტი არ ჰქონიათ (სურ. 5ე-ბ).

1.2. Sig-1R ლიგანდები მოქმედებენ Rac1 დადმავალ ეფექტორებზე

P21-გააქტივებული კინაზები (PAK) Rac1-ის ყველაზე კარგად დახასიათებულ დადმავალ ეფექტორებს წარმოადგენენ. PAK პირდაპირ ან არაპირდაპირ, სხვა კინაზების გააქტივებით (მაგ. Raf, Akt) მრავალი ტიპის რეგულატორი ცილების ფოსფორილირებას განაპირობებს, მათ შორის პრო-აპოპტოზური ცილა Bad-ის (Ye et al. 2011). Bad-ის ფოსფორილირება S112 და S136 სერინის ნაშთებზე ამცირებს Bad/Bcl-2 კომპლექსის ფორმირებას, რაც უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობის ზრდას უწყობს ხელს (Zha et al. 1996). შესაბამისად, Sig-1R-Rac1 კომპლექსის ერთ-ერთ სამიზნეს მიტოქონდრიაში შესაძლოა PAK/Bad-ი წარმოადგენდეს. Bad-ის ფოსფორილირების დონეზე სიგმა-1 რეცეპტორის ლიგანდების ეფექტების შესასწავლად, მიტოქონდრიები დავაინკუბირეთ სიგმა ლიგანდებთან და განვსაზღვრეთ ფოსფორილირებული Bad-pSer112 და სუმარული Bad-ის რაოდენობები. ჩვენი მონაცემებით, (+)პენტაზოცინმა შეამცირა მიტოქონდრიის იმუნოროეაქტიულობა Bad(pSer112) და სუმარული Bad, რაც სიგმა-1 რეცეპტორის აგონისტების გავლენით მიტოქონდრიიდან Bad-ის ჩამოცილებაზე მეტყველებს. ამ შემთხვევაში, ჰალოპერიდოლმა მოხსნა (+) პენტაზოცინის ეფექტი (სურათი 6).



სურათი 6. (+)პენტაზოცინის(P) და ჰალოპერიდოლის(H) ეფექტი Total Bad და Bad(pSer112) მიტოქონდრიულ ლიზატში.

მიტოქონდრია დავაინკუბირეთ სიგმა 1 ლიგანდებთან. Total Bad და Bad(pSer112) ELISAs ცდის შედეგები (mean±SD) წარმოადგენენ სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის შედეგს და ნაჩვენებია არბიტრალურ ერთეულებში. * $P < 0.05$ კონტროლთან (C) შედარებით.

შედეგების განხილვა (თავი 1)

Rho ოჯახის GTPაზები ნეირონის განვითარებაში, სიცოცხლისუნარიანობაში და დეგენერაციაში წამყვანი მოთამაშეები არიან (Stankiewicz and Linseman 2014). Rac-ის აქტივაცია ნეირონის სიცოცხლისუნარიანობის ზრდასთან, ხოლო Rho-ს აქტივაცია ნეირონის კვდომასთან არის დაკავშირებული (Linseman and Loucks 2008). შემთხვევათა უმეტესობაში, Rac-GTP-აზა მულტიცილოვან კომპლექსს აყალიბებს აღმავალ და დაღმავალ რეგულატორებთან რაც Rac-ის მოქმედებისთვის აუცილებელია (Pertz 2010). Rac1 ძირითადად ააქტივებს PAK-ის მიერ სხვადასხვა რეგულატორული თუ ციტოჩონჩხის ცილების ფოსფორილირებას (Linseman and Loucks 2008). Rac1 შესაძლოა არსებობდეს მიტოქონდრიის მემბრანაზე სადაც ის ურთიერთქმედებს Bcl-2-თან და იწვევს მსუბუქ ოქსიდაციურ სტრესს (Velaithan et al. 2011).

Sig-1R ნეიროპროტექტორულ როლს თამაშობს ინსულტსა და ცერებრალური იშემიის დროს. ასევე ეს რეცეპტორი დაკავშირებულია შიზოფრენიის, ალცჰაიმერის დაავადების, დეპრესიასა და წამალდამოკიდებულების განვითარებასთან (Maurice and Su 2009).

Sig-1R აქტივობა რეგულირდება მრავალი ეგზოგენური ლიგანდით. ცილა-ცილოვანი ურთიერთობები აუცილებელია სიგმა რეცეპტორის ფუნქციონირებისათვის და როგორც Rac1, სიგმა-1 რეცეპტორიც ჩართულია ნეირონების მორფოგენეზში.

იმუნოპრეციპიტაციის ცდების გამოყენებით, ჩვენ პირველმა ვაჩვენეთ რომ Sig-1R პირდაპირ უკავშირდება Rac-1. ეს ურთიერთკავშირი არის ლიგნდ-სპეციფიური, რადგან ორ ცილას შორის კომპლექსი მხოლოდ (+)პენტაზოცინის თანაობისას აღინიშნება. გარდა ამისა, მიღებულმა შედეგებმა გვიჩვენეს, რომ მხოლოდ აქტიური, GTP დაკავშირებული Rac1 აყალიბებს კომპლექსს სიგმა-1 რეცეპტორთან. ჩვენი აზრით, ამ კომპლექსის ფორმირება ხდება IP₃R-ზე, რომელიც MAM-ზე სხვადასხვა ცილას უკავშირდება (Kiviluoto et al. 2012).

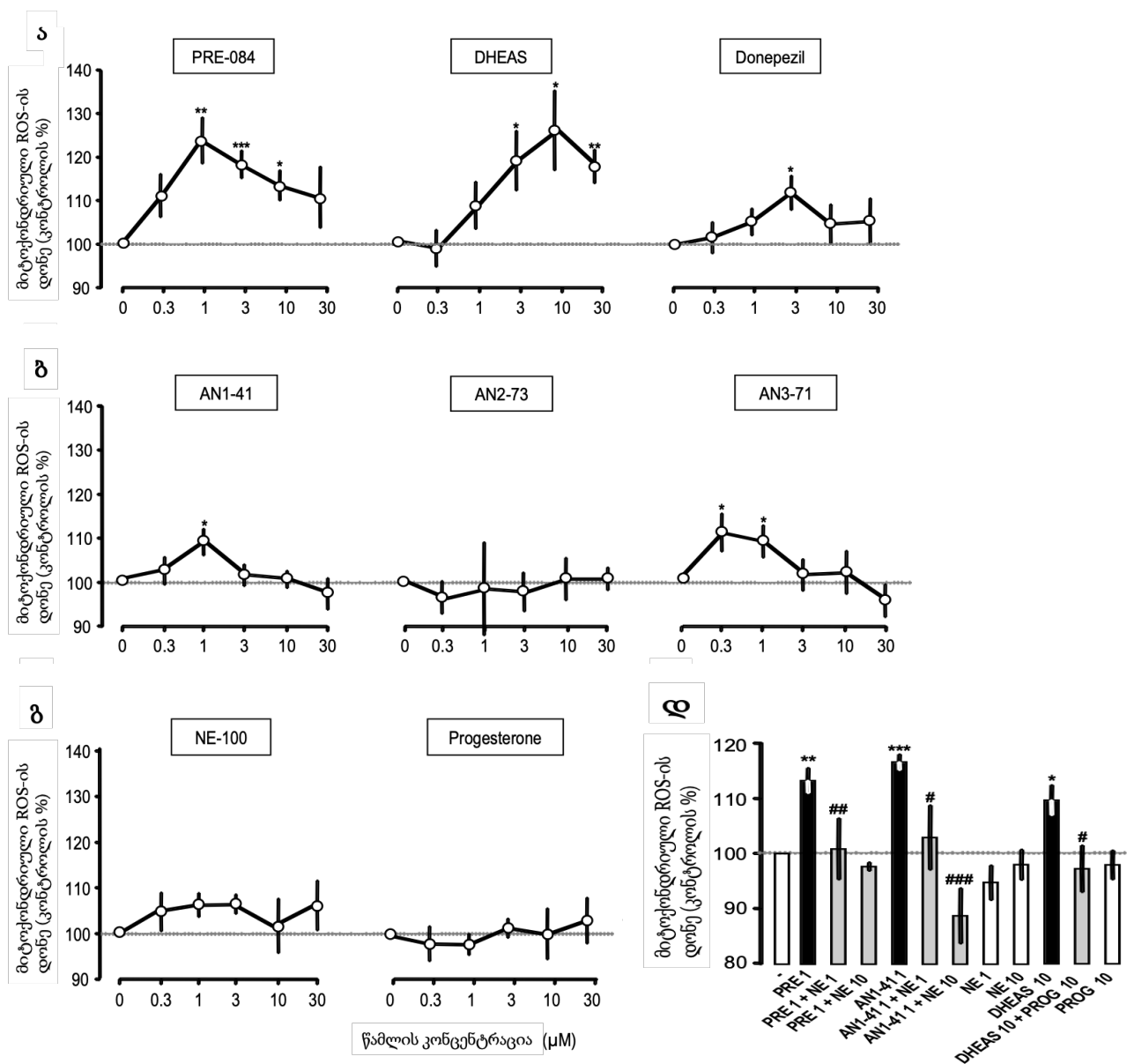
ჩვენმა შედეგებმა ასევე აჩვენეს, რომ Rac1 მულტიცილოვან კომპლექსს წარმოქმნის Bcl-2-თან (სურ. 5ვ გ). BH3 დომენი აუცილებელია Bcl-2 ცილის და Rac1 ცილის დაკავშირებისას და ეს კავშირი კრიტიკულია Bcl-2-ის პროოქსიდაციური აქტივობისათვის (Velaithan et al. 2011). მნიშვნელოვანია, რომ ანტიაპოპტოზური Bcl-2 ოჯახის წევრები მაკრომოლეკულურ კომპლექსს წარმოქმნიან IP₃R -თან ენდოპლაზმურ ბადეზე (Decuypere et al. 2011). ამ ცილებთან ინტერაქცია IP₃R-ს მგრძნობიარეს ხდის IP₃-ის შედარებით უფრო დაბალი კონცენტრაციებისადმი, რაც სამარაგო Ca²⁺-ის შემცირებას და სუსტი ოსცილატორული Ca²⁺-ის სიგნალის ინდუქციას იწვევს (White et al. 2005), რაც უჯრედებს აპოპტოზისგან იცავს. Bcl-2 ოჯახის წევრების გარდა, სხვადასხვა ცილა, რომელიც ენდოპლაზმურ ბადეზე IP₃-ის მიერ ინდუცირებული Ca²⁺-ის გამოყოფას არეგულირებს შესაძლოა უშუალოდ უკავშირდებოდეს IP₃R-ს.

Rac1-ის აქტივობის შესაფასებლად, ჩვენ გამოვიკვლიეთ სიგმა ლიგანდების შესაძლო ეფექტები Rac1-ის დადმავალ სისტემაზე. Rac1-ის უკვე კარგად დახასიათებულ სამიზნე სისტემას PAK-პროტეინკინაზა წარმოადგენს. PAK-ს შეუძლია სხვადასხვა რეგულატორული ცილების, მათ შორის მიტოქონდრიული Bad-ის ფოსფორილირება (Ye et al. 2011). ჩვენი შედეგების მიხედვით, (+)პენტაზოცინმა გაზარდა ფოსფორილირება და შესაბამისად Bad-ის მიტოქონდრიიდან დისოციაცია. იმის გათვალისწინებით, რომ პრო-აპოპტოზური Bad-ი სცილდება Bcl-2-ს ფოსფორილირების შემდეგ, ჩვენ დავასკვნით

რომ სიგმა-1 რეცეპტორის აქტივაცია აგონისტის მიერ ათავისუფლებს BH3 ცილას მიტოქონდრიიდან ან MAM-იდან. Bad-ის რელოკაცია შესაძლოა მნიშვნელოვანი იყოს აპოპტოზისა და ავტოფაგის პროცესების პრევენციისათვის (Erlich et al. 2007).

თავი 2. Sig-1R ლიგანდების ეფექტები თავის თავის ტვინის მიტოქონდრიაზე ფიზიოლოგიურ პირობებში

მიტოქონდრიის უხეში ფრაქცია მივიღეთ თავის წინატვინიდან. ROS-ი გაიზომა DCF-ის ფლუორესცენციის წარმოქმნით ფიზიოლოგიურ პირობებში (სურ.7). ყველა ლიგანდის ეფექტი გაზომილ იქნა 0.3-30 μM კონცენტრაციის დიაპაზონში. Sig-1R აგონისტების უმეტესობამ მნიშვნელოვნად გაზარდა ROS-ის დონე ფიზიოლოგიურ პირობებში, თუმცა ზარის ფორმის მრუდის სახით. ყველაზე ეფექტური ნაერთი იყო PRE-084, რომელმაც 1 μM კონცენტრაციაში, ROS-ის 24%-ით მატება უჩვენა (სურ.7ა). DHEA-მ +26%-იანი ზრდა 10 μM კონცენტრაციისას და დონეპეზილმა +12% 3 μM კონცენტრაციისას. AN1-41, +11% 1 μM და AN3-71 +12% 0.3-1 μM კონცენტრაციით დამატებისას. აგონისტებიდან, მხოლოდ AN2-73 არ ჰქონია ეფექტი (სურ. 7ბ). ორ შესწავლილ ანტაგონისტს, ROS-ის წარმოქმნაზე რაიმე ეფექტი არ უჩვენებია (სურ. 7გ). აგონისტ/ანტაგონისტის კომბინაციურ ცდებში NE-100-მა 1 და 10 μM კონცენტრაციებში, დაბლოკა 1 μM PRE-084 და AN1-41 გამოწვეული ეფექტები (სურ 7დ) და 10 μM PROG-მა დაბლოკა 10 μM DHEA-ს ეფექტი (სურ. 7დ), რამაც Sig-1R-ზე მოქმედების სპეციფიკურობა და ფარმაკოლოგია დაადასტურა.



სურათი 7. Sig-1R ლიგანდების ეფექტი მიტოქონდრიული ROS-ის წარმოქმნაზე.

Sig-1R აგონისტების (ა,ბ) და ანტაგონისტების (გ) ეფექტი მიტოქონდრიულ ROS-ზე. (დ) კომბინირებული, აგონისტ/ანტაგონისტების კვლევები. მონაცემები წარმოდგენილია, როგორც ლიგანდის გარეშე ნიმუშის, კონტროლის %. ANOVA: $F(5, 45) = 3.09$, $p < 0.05$, $n = 8$ PRE-084; $F(5, 45) = 3.53$, $p < 0.01$, $n = 8$ DHEA; $F(5, 47) = 1.17$, $p > 0.05$, $n = 8$ donepezil (ა). $F(5, 29) = 3.60$, $p < 0.05$, $n = 5$ AN1-41-თვის; $F(5, 41) = 0.05$, $p > 0.05$, $n = 5$ AN2-73, $F(5, 41) = 3.28$, $p < 0.05$, $n = 7$ AN3-71 (ბ). $F(5, 68) = 0.57$, $p > 0.05$, $n = 12$ NE-100, $F(5, 34) = 0.26$, $p > 0.05$, $n = 6$ PROG (გ). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. 100% level; one-sample t test. $n = 6-7$ PRE-

084 და AN1-41 $\pm$ NE-100 ანტაგონიზმი და $n = 4$ DHEA $\pm$ PROG ანტაგონიზმი (დ). $\#p < 0.05$, $\#\#p < 0.01$, $\#\#\#p < 0.001$ vs. მხოლოდ აგონისტი; Student's t test.

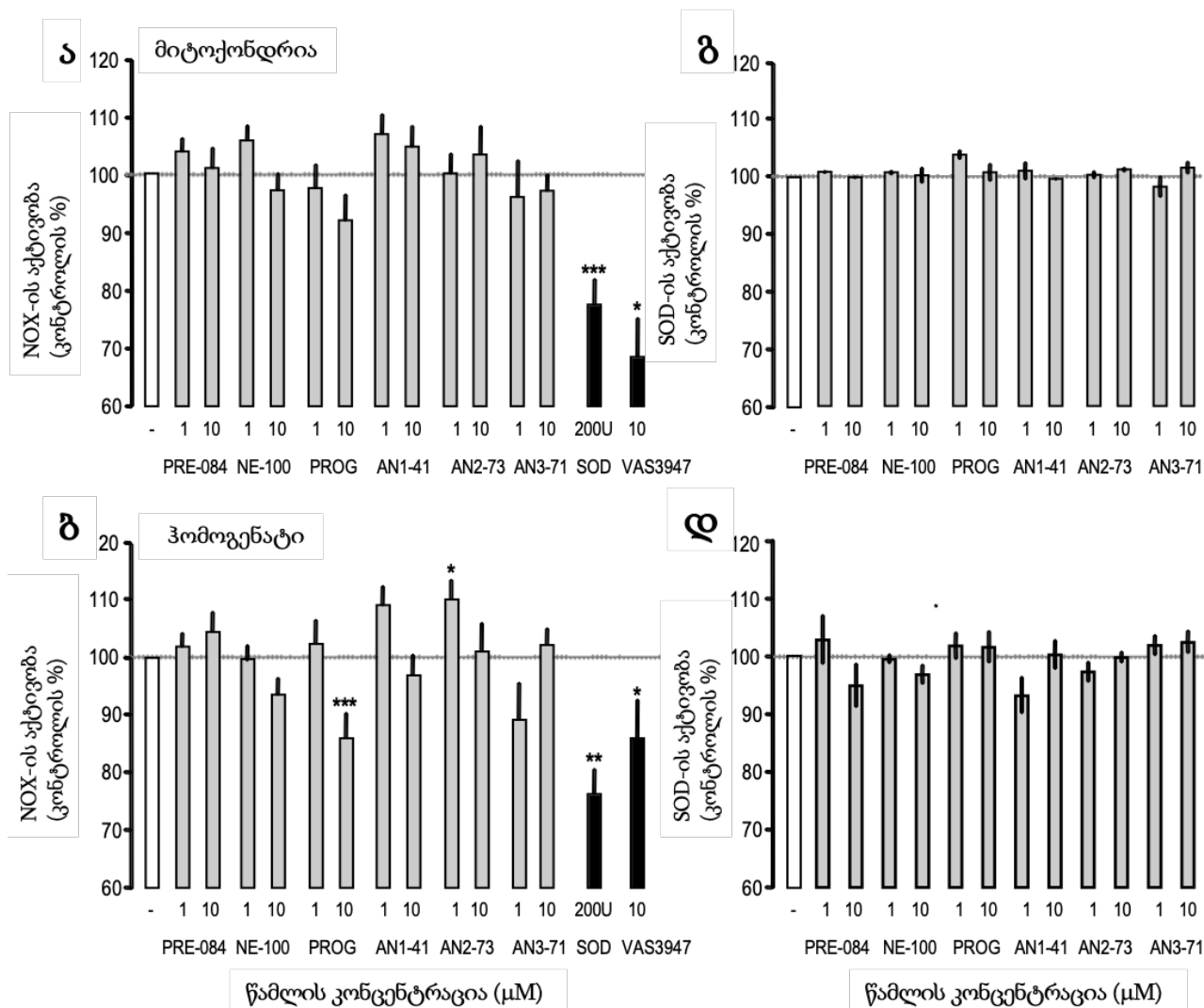
პოლიმორფონუკლეარულ ნეიტროფილებში NOX-ის აღმოჩენიდან მოყოლებული, NADPH ოქსიდაზა ნანახი იქნა არაფაგოციტურ უჯრედებში და ასევე სხვადასხვა ორგანოში, თავის ტვინის ჩათვლით (Maru, Nishino, and Kakinuma 2005). თავის ტვინში NADPH ოქსიდაზას დისტრიბუცია მიკროგლიაში, ნეირონებსა და ასტროციტებში არის დადასტურებული, შესაბამისად ეს ფერმენტი ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში ROS-ის წარმოქმნის ერთ-ერთ კერას წარმოადგენს.

ვინაიდან წინა კვლევები Sig-1R ლიგანდებით NOX-ის აქტივობის მოდულაციაზე მიუთითებდნენ, ჩვენ შევისწავლეთ Sig-1R ლიგანდების ეფექტები NOX-ის აქტივობაზე მიტოქონდრიულ პრეპარატში და უჯრედული ტიპის NOX-ის აქტივობა თავის ტვინის მთლიან ჰომოგენატში (სურ.8).

ჩვენს მიერ ჩატარებულ კვლევაში, NOX-ის აქტივობა თავის ტვინის მიტოქონდრიაში მნიშვნელოვნად დაითრგუნა SOD-ით ან NOX-ის ინჰიბიტორ VAS3947-ის დამატებისას, მაგრამ Sig-1R ლიგანდებს 1 და 10 μ M კონცენტრაციებში ეფექტი არ ჰქონიათ (სურ 8ა).

თავის ტვინის ჰომოგენატში, Sig-1R ანტაგონისტებმა ყველაზე მაღალ კონცენტრაციაში დააქვეითეს NOX-ის აქტივობა, თუმცა ეს ეფექტი სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი მხოლოდ პროგესტერონის შემთხვევაში იყო (სურ. 8ბ). PRE-084 ეფექტი არ მოუხდენია, მაგრამ ANAVEX-ის ნაერთებმა AN1-41 და AN2-73 უჩვენეს NOX-ის აქტივობის ზრდის ტენდენცია ან მნიშვნელოვნად გაზარდეს იგი 1 μ M კონცენტრაციებში (სურ.8ბ). თუმცა ეფექტი ლიმიტირებული იყო $\pm 10\%$ -ის ფარგლებში, რის გამოც NOX-ის მიერ პროდუცირებულ ROS-ში Sig-1R წილი არ იყო მნიშვნელოვანი.

NOX-ის აქტივობის გაზომვა, როგორც პრერეკვიზიტი საჭირო იყო იმის გასარკვევად ჰქონდათ თუ არა ლიგანდებს რაიმე ეფექტი SOD-ის აქტივობაზე. როგორც სურ. 8 გ,დ მოცემული Sig-1R ლიგანდებს ეფექტი არ მოუხდენიათ SOD-ის აქტივობაზე მიტოქონდრიულ თუ თავის ტვინის ჰომოგენატის პრეპარატებში.

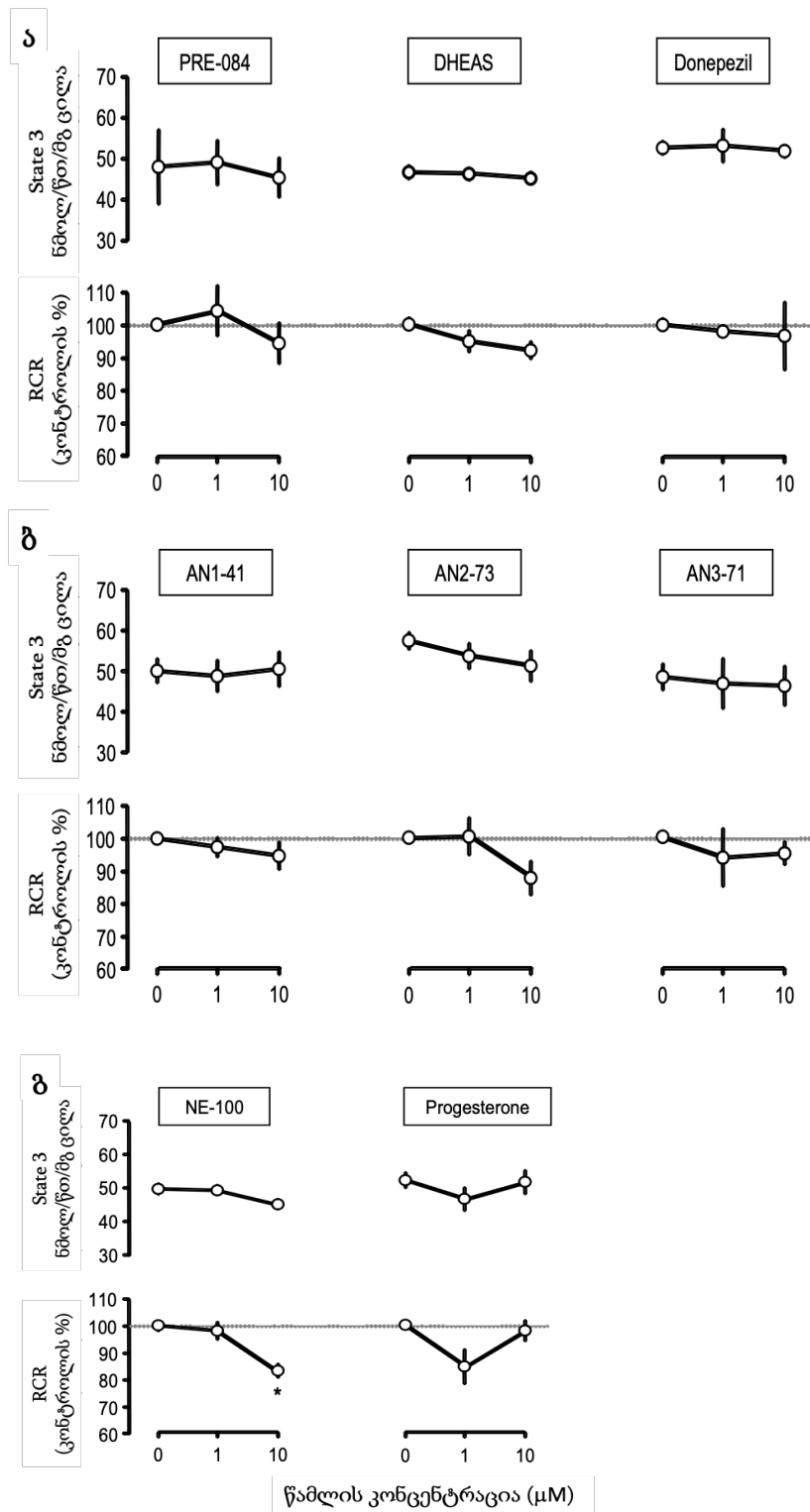


სურათი 8. Sig-1R ლიგანდების მოქმედება NOX-ის და SOD-ის აქტივობაზე.

Sig-1R ლიგანდების მოქმედება NOX-ის (ა,ბ) და SOD-ის (გ,დ) აქტივობაზე თავის ტვინის მიტოქონდრიაში და ჰომოგენატში ფიზიოლოგიურ პირობებში. $n = 8-11$ თითოეულ ჯგუფში (ა), $n = 5$ თითოეულ ჯგუფში (ბ), და $n = 4$ (გ, დ) მაგრამ $n = 4$ VAS3947 (ა, ბ). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. 100% level, one-sample t test.

მიტოქონდრიული რესპირაციის ანალიზი მოხდა ოქსიგრაფის გამოყენებით. ლიგანდების ეფექტები განისაზღვრა 1 და 10 μM კონცენტრაციებში და მონაცემები წარმოდგენილია როგორც State3 და RCR-ი (სურ. 9ა). როგორც სურათ 9 ა-გ-ზეა ნაჩვენები გამოკვლეულ ნაერთთაგან ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაში არცერთ ლიგანდს State 3-

ზე ან RCR-ზე ეფექტი არ მოუხდენია. RCR-ის მნიშვნელოვანი კლება მხოლოდ NE-100 აჩვენა 10 μ M კონცენტრაციით დამატებისას (სურ. 9გ).



სურათი 9. Sig-1R ლიგანდების ეფექტები თავის ტვინის მიტოქონდრიის ჟანგბადის მოხმარებაზე (State 3 და RCR).

State3 წარმოდგენილია, როგორც ნაწილობრივ (nmol) O_2 -ის მოხმარება ყოველ წუთში ცილის ერთ მილიგრამზე. RCR-ი წარმოდგენილია State3/State2 თანაფარდობით და გამოხატულია, როგორც წამლის გარეშე ნიმუშის მონაცემების %. $n = 3-6$ თითოეული ჯგუფისთვის (ა), 5-6 (ბ), და 4-5 (გ). * $p < 0.05$ vs. 100% level, one-sample t test.

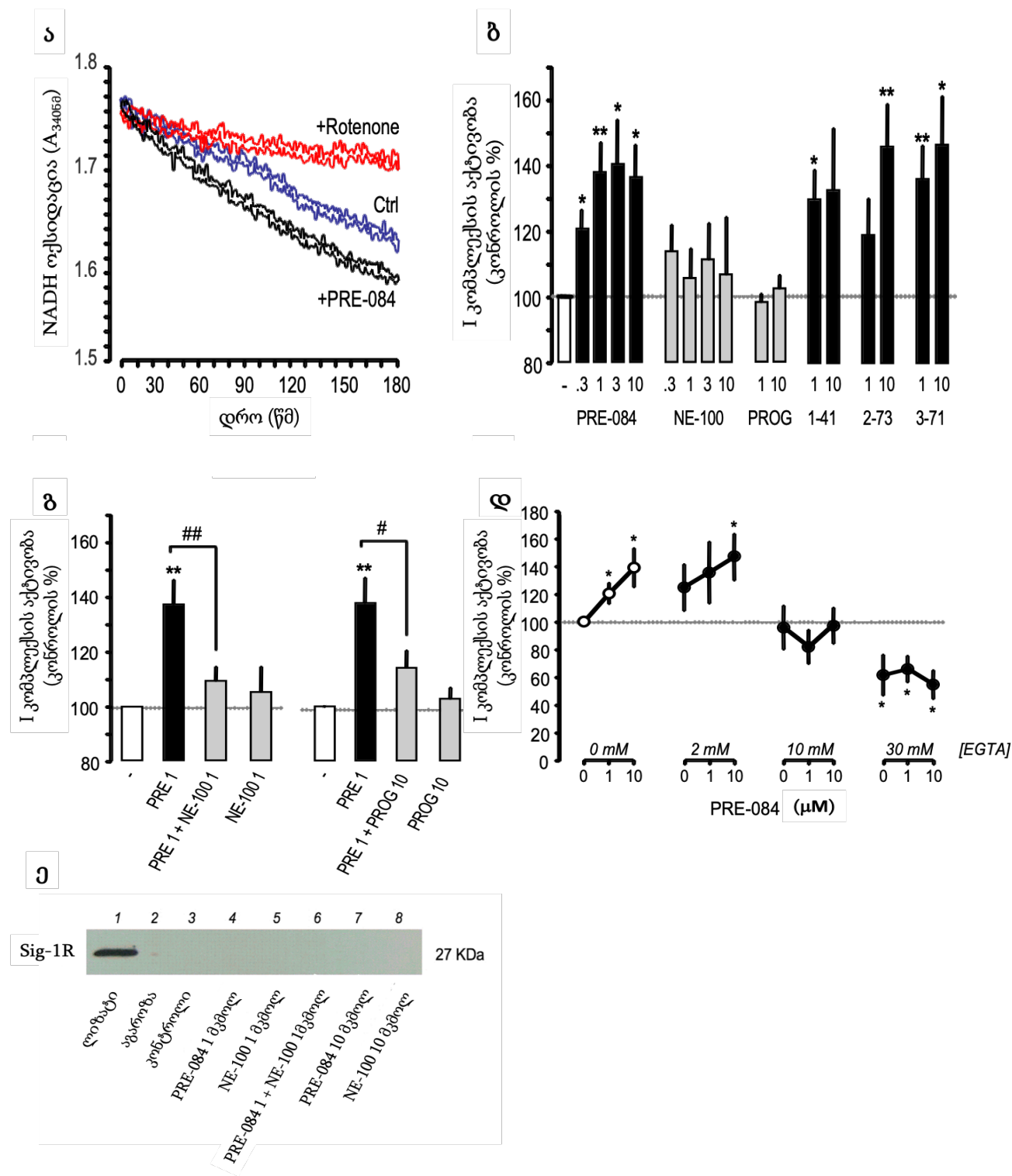
Sig-1R ლიგანდების მიერ გენერირებული ROS-ის ასახსნელად, ჩვენ სპეციალურად შევისწავლეთ ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვის (ETC) კომპლექსების აქტივობა.

I კომპლექსის აქტივობა გავაანალიზეთ სპექტროფოტომეტრის საშუალებით NADH-ის დაჟანგვის გაზომვით (სურ. 10ა). PRE-084 და NE-100 ეფექტი შევისწავლეთ 0.3–10 μM კონცენტრაციებში და დანარჩენი ნაერთები 1 და 10 μM კონცენტრაციით. ჩვენი დაკვირვებებით, PRE-084-მა მნიშვნელოვნად, +40%-ით გაზარდა პირველი კომპლექსის აქტივობა ფიზიოლოგიურ პირობებში. Sig-1R ანტაგონისტებს ეფექტი არ ჰქონიათ. ANAVEX-ის ნაერთებმაც გაზარდეს I კომპლექსის აქტივობა (სურ. 10ბ). 1-10 μM NE-100 ან PROG კო-აპლიკაციამ მოახდინა PRE-084 ინდუცირებული I კომპლექსის აქტივობის ზრდის პრევენცია, რაც Sig-1R ფარმაკოლოგიური ეფექტის დასტურია (სურ. 10-გ).

ცნობილია, რომ Ca^{2+} ახდენს კრების ციკლის ფერმენტების მოდულაციას, რომლებიც NADH-ის, I კომპლექსის სუბსტრატის დაგროვებაში მონაწილეობენ (Glancy and Balaban 2012). შესაბამისად, ჩვენ შევისწავლეთ Ca^{2+} -ის EGTA-ით ქელაციის ეფექტი PRE-084-ით ინდუცირებულ I კომპლექსის აქტივობაზე (სურ. 10-დ). 2mM EGTA-ს აპლიკაციამ ცდის არეში არ შეცვალა PRE-084-ის ეფექტი. 10mM EGTA-მ შეძლო PRE-084 ინდუცირებული ეფექტის პრევენცია, თუმცა I კომპლექსის ბაზალური დონე არ შეუცვლია. უფრო მაღალ კონცენტრაციაში, 30mM, EGTA-მ დააქვეითა I კომპლექსის აქტივობა ყოველგვარი ლიგანდის დამატების გარეშე. ამ დაკვირვებამ გვიჩვენა, რომ 10mM EGTA-ით Ca^{2+} -ის ქელაციამ მოხსნა I კომპლექსზე Sig-1R აგონისტის ეფექტი.

შესწავლილ იქნა აგრეთვე Sig-1R-ის მიტოქონდრიის I კომპლექსთან პირდაპირი დაკავშირების შესაძლებლობა იმუნოპრეციპიტაციის ექსპერიმენტით (სურ. 10-ე). არც

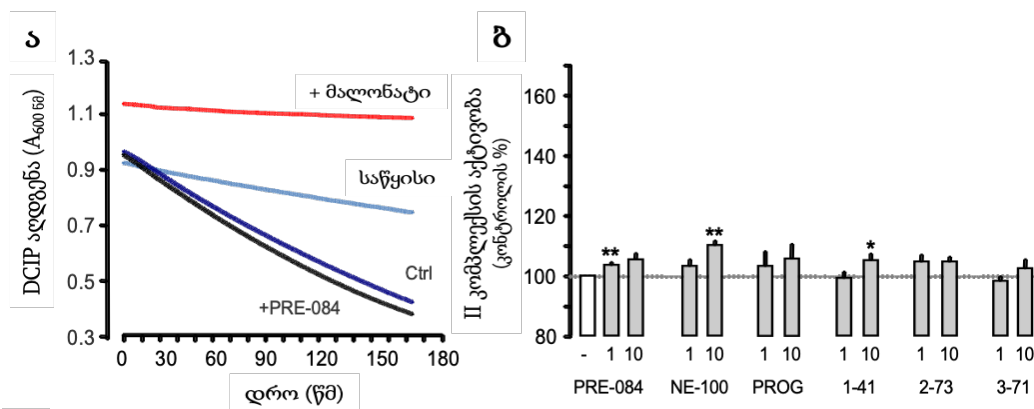
კონტროლში და არც PRE-084 და/ან NE-100 ინკუბაციისას co-იმუნოპრეციპიტაცია Sig-1R და I კომპლექს შორის არ დადასტურდა.

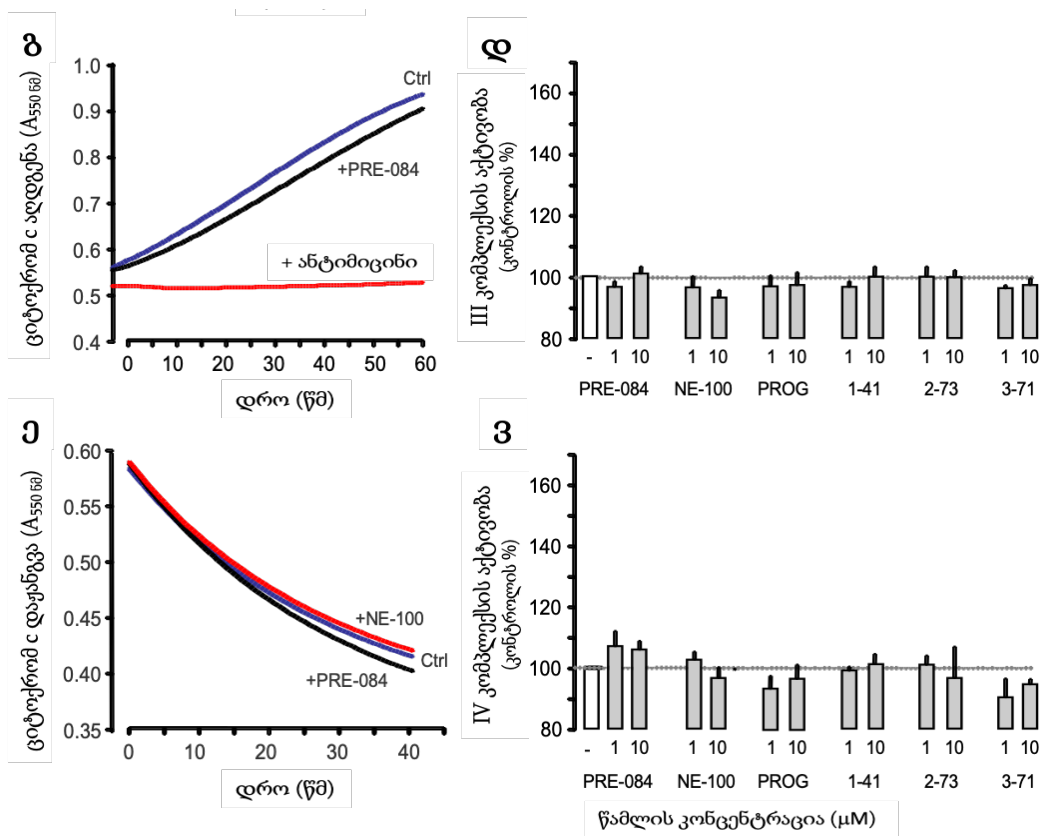


სურათი 10. Sig-1R აგონისტების და ანტაგონისტების მოქმედება I კომპლექსის აქტივობაზე ფიზიოლოგიურ პირობებში.

(ა) სპექტროფოტომეტრული ჩანაწერი. (ბ) სხვადასხვა ლიგანდის ეფექტი. (გ) ანტაგონიზმის კვლევები. (დ) EGTA-ს მიერ Ca^{2+} ხელაჯის ეფექტი PRE-084 გამოწვეული I კომპლექსის აქტივობაზე. (ე) Sig-1R WB I კომპლექსის იმუნოპრეციპიტაციის შემდეგ. ANOVA: $F(4, 30) = 4.14, p < 0.01, n = 5-7$ PRE-084; $F(4, 23) = 0.18, p > 0.05, n = 3-6$ NE-100; $n = 6-12$ დანარჩენი ლიგანდებისთვის. (ბ), $F(3, 25) = 6.29, p < 0.01, n = 5-7$ PRE-084/NE-100 მონაცემები; $F(3, 24) = 8.83, p < 0.001; n = 5-7$ PRE-084/PROG მონაცემები (გ). $n = 5-6$ თითოეული ნიშნულისთვის (დ). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 100% დონე, one-sample t test. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. PRE-084 (1 μ M) Student's t test.

Sig-1R-ის ლიგანდების ეფექტები შევისწავლეთ ასევე II, III და IV კომპლექსების აქტივობაზე (სურ.11). II კომპლექსის აქტივობა, გაიზომა სპექტროფოტომეტრის საშუალებით, როგორც DCIP აღდგენის ექსპერიმენტი (სურ. 11ა). სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობა, მარგინალურად გაიზარდა ზოგიერთი ლიგანდის მიერ, თუმცა ცვლილება 10%-ს არ ასცილებია (სურ. 11ბ). III კომპლექსის აქტივობა გაიზომა ციტოქრომ c-ს აღდგენით (სურ. 11გ), და IV კომპლექსის აქტივობა გაიზომა ციტოქრომ c-ს ოქსიდაციით (სურ. 11ე). Sig-1R ლიგანდებს ეფექტი არ ჰქონიათ (სურ. 11დ-ვ).





სურათი 11. Sig-1R ლიგანდების გავლენა II-IV კომპლექსების აქტივობაზე ფიზიოლოგიურ პირობებში.

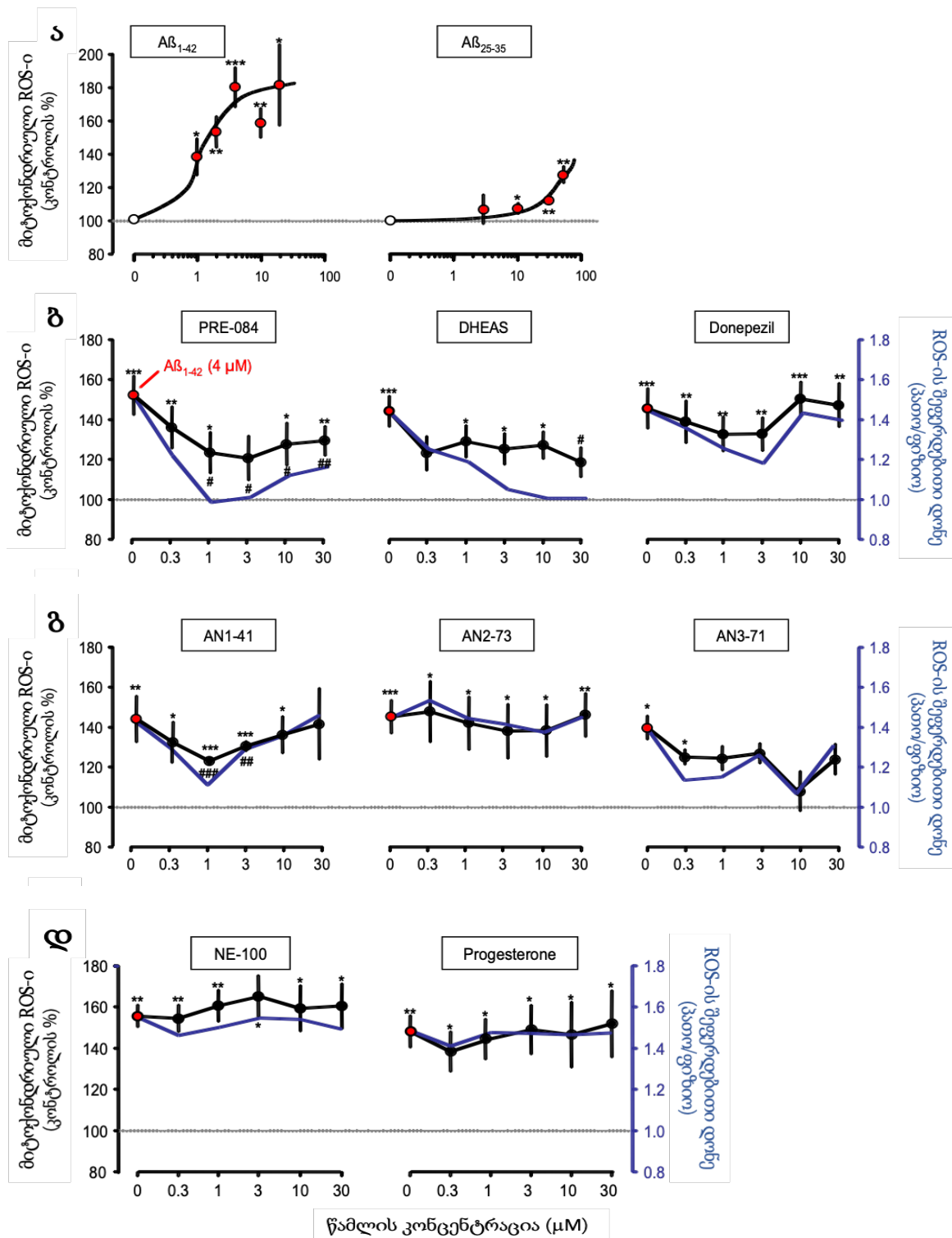
(ა,გ,ე) ტიპური სპექტროფოტომეტრული ჩანაწერი. (ა,ბ) II კომპლექსის აქტივობა $n = 6-8$ თითოეული ჯგუფისთვის. (გ, დ) III კომპლექსის აქტივობა $n = 4-6$ თითოეული ჯგუფისთვის. (ე, ვ) IV კომპლექსის აქტივობა $n = 5-6$ თითოეული ჯგუფისთვის. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 100%, one-sample t test.

ამრიგად, ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაში, Sig-1R-ის გააქტივებამ გამოიწვია შერჩევითად, I კომპლექსის აქტივობის ზრდა. ეს ეფექტი იყო არაპირდაპირი და ზოგიერთ შემთხვევაში Ca^{2+} დამოკიდებული. ეს ყოველივე შესაბამისობაში მოვიდა Sig-1R-ის ლიგანდებით ROS-ის დონის ინდუქციასთან.

თავი 3. Sig-1R ლიგანდების ეფექტები პათოლოგიური მდგომარეობისას (ამილოიდ ცილით გამოწვეული ტოქსიკურობა)

ამიოლოიდ-β პეპტიდის პირდაპირმა აპლიკაციამ მიტოქონდრიულ პრეპარატზე კონცენტრაცია-დამოკიდებულად და მნიშვნელოვნად გაზარდა ROS-ის დონე. Aβ₁₋₄₂ +80%-იანი მატება აჩვენა 4 μM და უფრო მაღალ კონცენტრაციებში (სურ. 12ა). მაღალი ტოქსიკურობის მქონე მოკლე ფრაგმენტები, Aβ₂₅₋₃₅, უფრო ნაკლებ პოტენციურები აღმოჩნდნენ და ROS-ის მხოლოდ 25%-იანი ზრდა გამოიწვიეს 50 μM კონცენტრაციისას. Sig-1R ლიგანდებმა დამცველობითი ეფექტი უჩვენეს 4 μM Aβ₁₋₄₂ მიერ გამოწვეულ ROS-ის მატებაზე (სურ. 12ბ-დ). ყველა აგონისტმა U ფორმის მრუდით შეამცირა Aβ₁₋₄₂-ით გამოწვეული ROS-ის ზრდა, თუმცა სხვადასხვა ეფექტურობით. PRE-084-მა მნიშვნელოვნად დააქვეითა ROS-ის დონე 1 μM ან უფრო მაღალ კონცენტრაციაში (სურ. 12ბ), და DHEA-მ ROS-ის დონის კლების ტენდენცია აჩვენა ყველა ცდაში გამოყენებულ კონცენტრაციაში, თუმცა მნიშვნელოვანი ეფექტი უმაღლეს კონცენტრაციას ჰქონდა. დონეპეზილმა საშუალო ეფექტი აჩვენა 1 და 3 μM. ANAVEX-ის ნაერთებს შორის, AN1-41 და უფრო ნაკლებად AN3-71 1 და 3 μM კონცენტრაციით შეამცირეს Aβ₁₋₄₂ ინდუცირებული ROS-ის ზრდა, კლება მნიშვნელოვანი იყო AN-1-41-ის შემთხვევაში (სურ. 6გ). AN2-73-ს ეფექტი არ მოუხდენია. საინტერესოა ის ფაქტი, რომ ROS-ის შაფარდებითმა დონემ, რომელიც გამოვსახეთ როგორც თანაფარდობა ფიზიოლოგიურ მდგომარეობასთან გვაჩვენა 1.0 ნიშნული ყველა ნაერთის შემთხვევაში მათი ყველაზე ეფექტური კონცენტრაციისას.

კვლევაში გამოყენებულმა Sig-1R ანტაგონისტებმა ვერ შეძლეს Aβ₁₋₄₂ გამოწვეული ROS-ის შემცირება ვერცერთ შესწავლილ კონცენტრაციაში (სურ. 12დ).



სურათი 12. Aβ პეპტიდის ზეგავლენა ROS-ის დონეზე მიტოქონდრიაში.

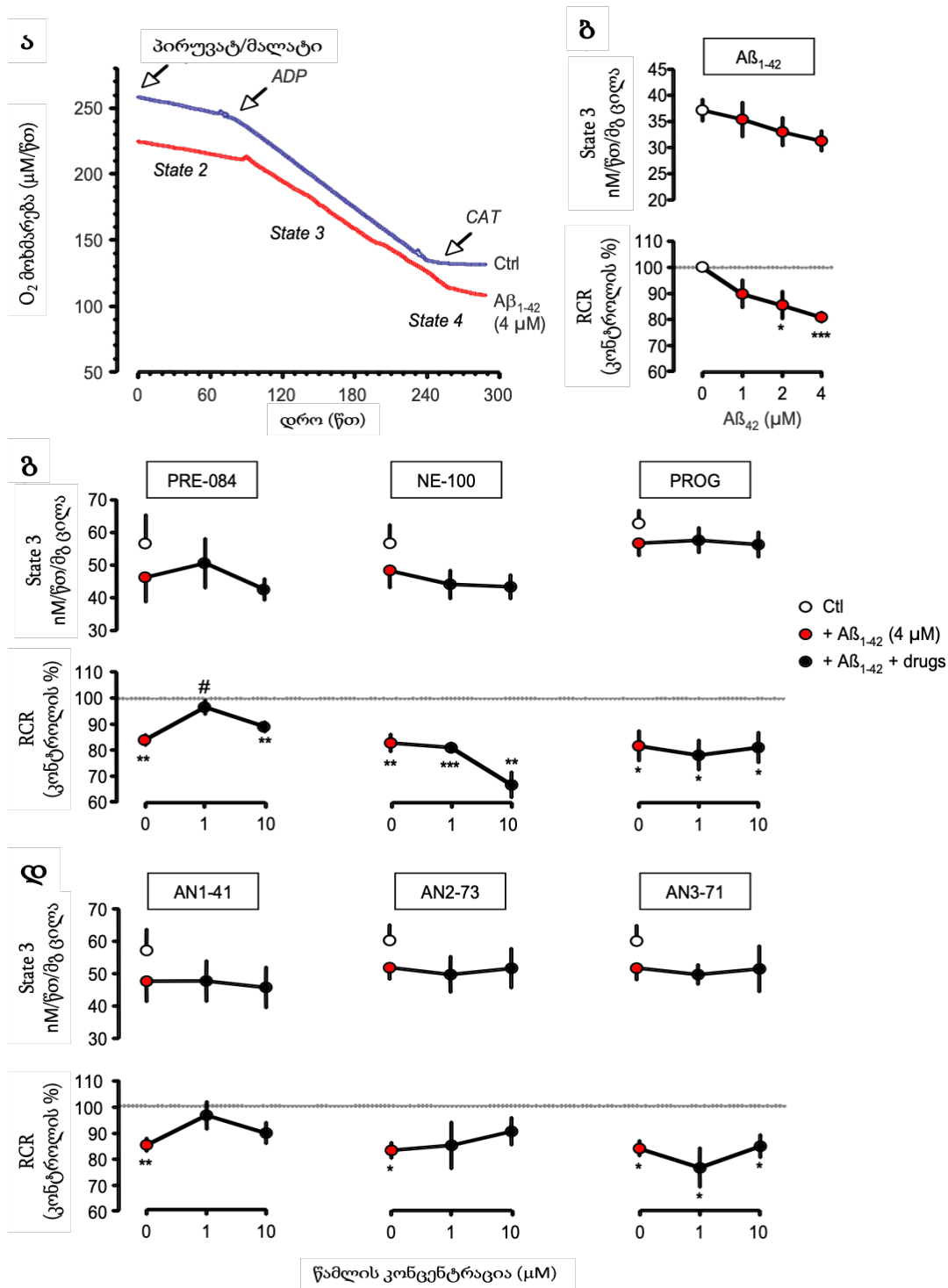
(ა) Aβ₁₋₄₂ ეფექტი მიტოქონდრიული ROS-ის წარმოქმნაზე. (ბ,გ) Sig-1R აგონისტების და ანტაგონისტების(დ) ეფექტი Aβ₁₋₄₂-ინდუცირებული ROS-ის ზრდაზე. მონაცემები

წარმოდგენილია, როგორც კონტროლ ნიმუშიდან (უწამლო) მიღებული მონაცემების პროცენტი. ლურჯი ხაზები ბ-დ აღნიშნავენ ROS-ის შედარებით თანაფარდობას პათოლოგიურსა და ფიზიოლოგიურ პირობებში $A\beta_{1-42}$ ($4 \mu M$) თანაობისას ან მის გარეშე. ANOVA: $F(6, 36) = 7.13, p < 0.0001, n = 7$ $A\beta_{1-42}$; $F(5, 27) = 10.4, p < 0.0001, n = 5$ $A\beta_{25-35}$ ა. $F(6, 62) = 3.03, p < 0.05, n = 9$ PRE-084; $F(6, 33) = 3.41, p < 0.05, n = 5$ DHEA; $F(6, 75) = 3.70, p < 0.01, n = 11$ donepezil ბ. $F(6, 38) = 2.81, p > 0.05, n = 6$ for AN1-41; $F(6, 53) = 2.09, p > 0.05, n = 8$ AN2-73; $F(6, 31) = 1.26, p > 0.05, n = 5$ AN3-71 გ. $F(6, 48) = 2.23, p > 0.05, n = 7$ NE-100; $F(6, 27) = 2.60, p < 0.05, n = 4$ progesterone დ. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. 100% level, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. $A\beta_{1-42}$ ($4 \mu M$) level, one-sample t test.

$A\beta_{1-42}$ პირდაპირმა აპლიკაციამ $0-4 \mu M$ კონცენტრაციით, გამოიწვია State3 დაქვეითების ტენდენცია და კონცენტრაცია დამოკიდებულად შეამცირა RCR-ი, მნიშვნელოვნად $2 \mu M$ და უფრო მაღალ კონცენტრაციაში (სურ 13ა). შესაბამისად, Sig-1R ლიგანდები გამოვცადეთ $4 \mu M$ $A\beta_{1-42}$ -ით გამოწვეული რესპირაციული ცვლილებებისას.

PRE-084-მა $1 \mu M$ კონცენტრაციით $A\beta_{1-42}$ -გამოწვეულ RCR დაქვეითების პრევენცია მოახდინა (სურ 13ბ). ანტაგონისტებს NE-100, PROG ეფექტი არ მოუხდენიათ და $10 \mu M$ NE-100-ის შემთხვევაში მდგომარეობა გაუარესდა.

აღსანიშნავია, რომ ყველა ექსპერიმენტში, State3 მონაცემი უფრო დაბალი იყო ვიდრე $A\beta_{1-42}$ გარეშე, თუმცა სტატისტიკური სარწმუნო მნიშვნელობა ამ მონაცემებს არ ჰქონიათ (სურ. 13გ,დ).



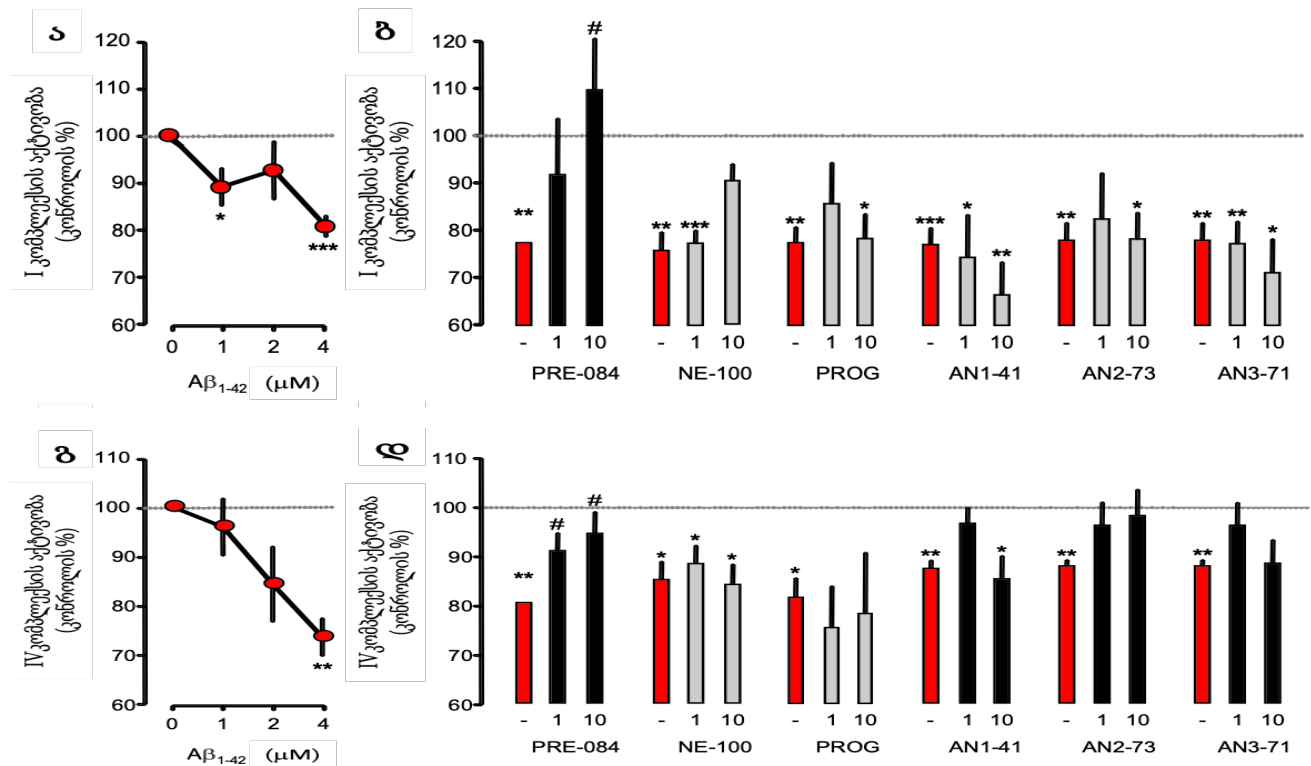
სურათი 13. $A\beta_{1-42}$ ეფექტი მიტოქონდრიულ რესპირაციაზე.

(ა) მიტოქონდრიული რესპირაციის გრაფიკი. (ბ) $A\beta_{1-42}$ სხვადასხვა კონცენტრაციის ეფექტი. $n=3-7$ თითოეულ დეტერმინანტასთვის. State3 მონაცემები წარმოდგენილია

როგორც ჟანგბადის მოხმარება nm წუთში მგ. ცილაზე. RCR წარმოდგენილია, როგორც წამლის გარეშე მიღებული მონაცემის, კონტროლის პროცენტი.

n = 4-7 (ბ), 3-7 (გ), და 4 (დ). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. 100%, one-sample t-test. # p < 0.05 vs. Aβ₁₋₄₂ მონაცემი, Student's t-test.

Aβ₁₋₄₂ კონცენტრაცია დამოკიდებული ეფექტით აქვეითებს I და IV კომპლექსების აქტივობას (სურ 14 ა, გ). 4 μM კონცენტრაციით Aβ₁₋₄₂ აჩვენა -20% კლება I კომპლექსის და -30% IV კომპლექსის ფერმენტული აქტივობის შემთხვევაში. გამოკვლეულ ლიგანდთაგან PRE-084 მოახდინა Aβ₁₋₄₂ ინდუცირებული I კომპლექსის აქტივობის დაქვეითების მნიშვნელოვანი პრევენცია (სურ. 14ბ). სხვა ლიგანდებს ეფექტი არ მოუხდენიათ. PRE-084 ასევე მნიშვნელოვნად დაიცვა IV კომპლექსი ამილოიდის ეფექტისაგან, მაშინ. როცა AN1-41, AN2-73, და AN3-71 შეამცირეს Aβ₁₋₄₂ ინდუცირებული IV კომპლექსის აქტივობის დაქვეითება (სურ 8დ). NE-100 და PROG ეფექტი არ მოუხდენიათ.



სურათი 14. Sig-1R ლიგანდების ეფექტები I და IV კომპლექსების $A\beta_{1-42}$ -ინდუცირებულ ცვლილებებზე.

(ა) $A\beta_{1-42}$ (1–4 μ M) ეფექტი I კომპლექსის აქტივობაზე და (ბ) Sig-1R ლიგანდების ეფექტები 1 და 10 μ M კონცენტრაციებში. (გ) $A\beta_{1-42}$ (1–4 μ M) ეფექტი IV კომპლექსის აქტივობაზე და (დ) Sig-1R ლიგანდების ეფექტები 1 და 10 μ M კონცენტრაციებში. ANOVA: $F(3, 33) = 6.90$, $p < 0.01$, $n = 10$, ა. $F(3, 17) = 6.23$, $p < 0.01$, $n = 4-6$, in c. $n = 4-7$ in c, d. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. 100%level, one-sample t test. # $p < 0.05$ vs. $A\beta_{1-42}$, Student's t test.

ამ მონაცემებზე დაყრდნობით, პათოლოგიურ მდგომარეობაში, ისეთი როგორიცაა $A\beta_{1-42}$ ცილა, I და IV კომპლექსების აქტივობის ცვლილებები შესაძლოა აღვადგინოთ Sig-1R აგონისტების მეშვეობით.

შედეგების განხილვა (თავი 2, 3)

Sig-1R მდებარეობს MAMs-ზე და მის ძირითად ფუნქციას IP_3R მოდულაცია და შესაბამისად მიტოქონდრიაში Ca^{2+} -ის ინფლუქსი წარმოადგენს (Hayashi, Maurice, and Su 2000). ალცჰაიმერის დაავადების დროს Sig-1R აგონისტებმა დაავადების in vitro და in vivo ფარმაკოლოგიურ და გენეტიკურ მოდელებში ეფექტური ნეიროპროტექციული შედეგი უჩვენეს (Fisher et al. 2016; Lahmy et al. 2014). კერძოდ, მიტოქონდრიული ინტეგრულობა შენარჩუნდა Sig-1R აგონისტებით მკურნალობის შემდეგ. ROS-ის დონის ზრდა, ცვლილებები ჟანგით რესპირაციაში და I და IV კომპლექსების აქტივობის ცვლილება, რაც აღინიშნება ად-ის დროს თავის თავის ტვინში, მცირდება Sig-1R აგონისტების მიწოდებისას. გარდა ამისა, Sig-1R აგონისტები ეფექტურ პროტექციულ საშუალებებს

წარმოადგენენ ჰანტიგტონის (Hyryskyluoto et al. 2013) და პარკინსონის დაავადების დროს (Francardo et al. 2014), სადაც მიტოქონდრიის ფუნქცია უმნიშვნელოვანესია.

Sig-1R ლიგანდების პირდაპირი ეფექტი თავის ტვინის მიტოქონდრიების ბიოენერგეტიკაზე აქამდე შესწავლილი არ იყო. კვლევის ამ ნაწილის მთავარ მიზანს წარმოადგენდა Sig-1R ლიგანდების ეფექტების შესწავლა მიტოქონდრიული ROS-ის, რესპირაციის და სუნთქვითი ჯაჭვის შემადგენელ კომპლექსებზე ფიზიოლოგიურ და ალცჰაიმერის დაავადებასთან დაკავშირებულ პათოლოგიურ პირობებში.

თავდაპირველად შევისწავლეთ Sig-1R ლიგანდების ზემოქმედება მიტოქონდრიული ROS-ის წარმოქმნაზე. Sig-1R აგონისტებმა (PRE-084, AN1-41, AN3-71, DHEA, Donepezil) გამოიწვიეს მიტოქონდრიული ROS-ის ზომიერი ზრდა, 10-30%-ით. Sig-1R ანტაგონისტებს (NE-100, PROG) ROS-ის პროდუქცია არ შეუცვლიათ, თუმცა განაპირობეს Sig-1R აგონისტების ეფექტის პრევენცია.

ROS-ის ასეთი ზრდა შესაძლოა ფიზიოლოგიური სიგნალის შემადგენელი ნაწილი იყოს. ზოგადად, კვლევებით დადგენილია, რომ ROS-ი შესაძლოა სასიგნალო ფუნქციას ასრულებდეს (Angelova and Abramov 2016) და გარკვეულ კომუნიკაციის საშუალებას წარმოადგენდეს მიტოქონდრიაში და სხვა ორგანოებს შორის უჯრედის ჰომეოსტაზის შენარჩუნებასა და სტრესისადმი ადაპტაციაში (Sena and Chandel 2012). მიტოქონდრიული ROS-ის პროდუქციის სხვადასხვა საიტს განსაკუთრებული სასიგნალო როლი გააჩნია და სავარაუდოდ მთავარი ROS-ის წარმომქმნელი საიტები იცვლებიან უჯრედში სხვადასხვა მდგომარეობების დროს. ROS-ის სიგნალინგი ახდენს იონური არხების ფუნქციის მოდულირებას, BK, KCN, ERG, ან TRP არხების ჩათვლით და შესაბამისად არეგულირებს ნეირონულ აგზნებადობას (Angelova and Abramov 2017). ROS-ის ინდუქცია ასევე ახდენს ციტოპროტექციული მექანიზმების გააქტივებას, მაგალითად, ROS-ი, Bcl2-ის ექსპრესიის პოტენციური რეგულატორია ტრანსკრიფციულ და ცილის დეგრადაციულ მექანიზმებზე ზეგავლენის უნარით (Hildeman et al. 2003). ROS-ი ამცირებს Bcl-2-ის mRNA-ის დონეს Bcl-2-ის პრომოუტერზე CRE-დაკავშირებული ცილის ან NF-κB – CRE და κB შეკავშირებით (Pugazhenthii et al. 2003). საინტერესოა, რომ Sig-1R-ებს შეუძლიათ უჯრედის გადარჩენის ხელშეწყობა გარკვეულწილად Bcl-2-ის ტრანსკრიფციის რეგულირებით ROS/NF-κB

სასიგნალო გზით. Sig-1R knockdown-მა H_2O_2 -ის მიერ ინდუცირებული აპოპტოზის პოტენცირება მოახდინა CHO უჯრედებში (Meunier and Hayashi 2010). აქედან გამომდინარე, ჩანს, რომ ოქსიდაციური სტრესი Sig-1R-ის ფიზიოლოგიური აქტივობის მთავარ კომპონენტს წარმოადგენს.

ჟანგვა-აღდგენით რეაქციებზე დამოკიდებული სასიგნალო სისტემები ეფუძნება ცისტეინის ნაშთების ჟანგვას და აღდგენას. ექსპერიმენტული კვლევებით დადგენილია, რომ ROS-ის წარმოქმნა ახდენს არა მხოლოდ ცისტეინის ნაშთების პოსტრანსლაციურ მოდიფიკაციას, არამედ სელენოცისტეინის, მეთიონინის და ჰისტიდინის ნაშთებისასაც (Johnston 2011). მიუხედავად იმისა, რომ ROS-ის სიგნალინგი არ არის სრულად გარკვეული, მიტოქონდრიაში, ROS-ს შეუძლია მიტოქონდრიული გამტარობის გარდამავალი მდგომარეობის არხის (mPTP) გახსნა ინტაქტურ უჯრედში. ROS-ის მიერ mPTP-ის გახსნა ასოცირებულია დამატებით ROS-ის პროდუქციასთან რასაც ტერმინოლოგიურად ROS-ის მიერ ინდუცირებული ROS-ის გამოყოფა ეწოდება (Zorov et al. 2000). მიტოქონდრიული ROS-ის წყაროდ ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვი, მიტოქონდრიული მატრიქსი და კრებსის ციკლი, ან მიტოქონდრიის გარე მემბრანის ფერმენტი მონოამინოქსიდაზა ითვლება (Tahara, Navarete, and Kowaltowski 2009; Angelova and Abramov 2016). ვინაიდან და რადგანაც Sig-1R-ის აგონისტებმა ფიზიოლოგიურ პირობებში თავის ტვინის მიტოქონდრიულ პრეპარატში ROS-ის წარმოქმნას შეუწყვეს ხელი, ROS-ის წყაროს დასადგენად ჩვენ თავდაპირველად შევისწავლეთ NOX-ისა და SOD-ის აქტივობა მიტოქონდრიულ პრეპარატსა და ჰომოგენატში. SOD-ის აქტივობაზე არცერთ ლიგანდს ეფექტი არ ჰქონია. NOX-ის აქტივობა ჰომოგენატსა და მიტოქონდრიაში მხოლოდ მარგინალურად შეიცვალა. Sig-1R აგონისტების მიერ NOX-ის აქტივობის ზრდა და ანტაგონისტების მიერ აქტივობის კლების ტენდენცია მხოლოდ ზოგიერთმა ნაერთმა აჩვენა. შესაბამისად, NOX-სა და SOD-ზე Sig-1R ლიგანდების ეფექტი გამოირიცხა.

ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვში, ზოგადად დამკვიდრებული მონაცემების თანახმად, I და III კომპლექსი ROS-ის წარმოქმნის მთავარ კერას წარმოადგენენ. ჩვენი დაკვირვებებით, Sig-1R ლიგანდებს სუნთქვითი ჯაჭვის ფუნქციონირებაზე ზეგავლენა

არ მოუხდენიათ. ATP-ის პროდუქცია ამ კვლევის ფარგლებში არ შეგვიმოწმებია, თუმცა ლიგანდებს ფიზიოლოგიურ პირობებში ოქსიდაციურ რესპირაციაზე გავლენა არ ჰქონიათ. მარგინალური ეფექტი მხოლოდ NE-100 აჩვენა უმაღლეს კონცენტრაციაში. საინტერესოა ის ფაქტი, რომ მიტოქონდრიულ სუნთქვით ჯაჭვში შემავალი კომპლექსების აქტივობის შესწავლისას Sig-1R აგონისტებმა (PRE-084, AN1-41, AN2-73, AN3-71) სელექციურად გაზარდეს I კომპლექსის აქტივობა. Sig-1R ანტაგონისტებს გავლენა არ მოუხდენიათ, თუმცა შეძლეს Sig-1R აგონისტების ეფექტის პრევენცია, რაც Sig-1R ლიგანდების ფარმაკოლოგიის დასტურია. Sig-1R აქტივობას დანარჩენ კომპლექსებზე ფიზიოლოგიურ პირობებში ეფექტი არ ჰქონია.

ფიზიკური ადგილმდებარეობის მიხედვით, Sig-1R ენდოპლაზმური ბადის მემბრანაზე, MAM-ზე მდებარეობს და ურთიერთობს ისეთ კომპონენტებთან როგორცაა, IP₃R, BiP, ან სხვა ენდოპლაზმური ბადის სტრესზე მორეაგირე ცილები (Hayashi and Su 2007; Su et al. 2010). IP₃R ინტერაქციით, Sig-1R უზრუნველყოფს Ca²⁺ მიმოცვლის მოდულაციას მიტოქონდრისა და ენდოპლაზმურ ბადეს შორის და კერძოდ ბრადიკინინის მიერ ინდუცირებულ IP₃R აქტივობის პოტენციაციას ახდენს ზარის ფორმის მრუდის შესაბამისად (Hayashi et al. 2010). IP₃R-ის მიერ გაშუალებული Ca²⁺ ინფლუქსი ცვლის მიტოქონდრიული Ca²⁺-ის კონცენტრაციას და ATP წარმოქმნას (Willems et al. 2008).

IP₃R მაკრომოლეკულურ კომპლექსს წარმოადგენს, რომელიც მდებარეობს VDAC1 მიმდებარედ მიტოქონდრიის გარე მემბრანაზე (Rizzuto et al. 2012). MAM-ზე ამ ელემენტების სტაბილიზაცია ხორციელდება მიტოფუზინის (MFN1/MFN2) ხიდაკებით მაგრამ ასევე მაკრომოლეკულური ცილების კომპლექსებით. ერთ-ერთი მათგანი არის GRP75, ასევე ცნობილია როგორც mt-HSP70, რომელიც ახდენს IP₃R/VDAC1/MCU არქიტექტურის სტაბილიზაციას (Rizzuto et al. 2012). Sig-1R-ისა და mt-HSP70 ინტერაქცია ჯერ ნანახი არ არის, რაც დადასტურებულია HSP70/BiP შემთხვევაში.

Sig-1R აგონისტების მიერ მიტოქონდრიის I კომპლექსის ფერმენტული აქტივობის შერჩევითი მატების მექანიზმის დასადგენად Sig-1R-სა და IP₃R-ის ურთიერთკავშირის გათვალისწინებით, I კომპლექსის აქტივობა განვსაზღვრეთ Ca²⁺ ქელატორ EGTA-ს

თანაობისას. თუმცა, საგულისხმოა ის ფაქტი, რომ მიტოქონდრიულ უბეშ ფრაქციაში, ER მხოლოდ ფრაგმენტებად არის წარმოდგენილი, რომელიც შესაძლოა სრულად ფუნქციური არ იყოს. პრეპარატში EGTA-ს არსებობამ, I კომპლექსის აქტივობაზე PRE-084-ის ეფექტის პრევენცია მოახდინა. ეს მონაცემი ადასტურებს რომ Sig-1R ეფექტები I კომპლექსზე Ca^{2+} დამოკიდებულია. გარდა ამისა EGTA-მ მაღალ კონცენტრაციებში დათრგუნა I კომპლექსის ბაზალური აქტივობაც. Ca^{2+} ი ახდენს იზოციტრატდეჰიდროგენაზას და α -კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას, კრებსის ციკლის ფერმენტების მოდულაციას, რომლებიც NADH-ის, I კომპლექსის სუბსტრატის დაგროვებაში მონაწილეობენ (Glancy and Balaban 2012).

IP₃R-ზე ზემოქმედების გარდა, Sig-1R შესაძლოა მიტოქონდრიული Ca^{2+} -ის რეგულაციის არაპირდაპირ მექანიზმში იყოს ჩართული. მაგალითად, Sig-1R აგონისტები ჰიპოკამპის პრეპარატებში ახდენენ SK არხების გაღების პრევენციას (Martina et al. 2007). ეს არხები მიტოქონდრიული Ca^{2+} ათვისებაში არიან ჩართულები (Honrath et al. 2017). SK არხებმა დააქვეითეს მიტოქონდრიული Ca^{2+} -ის ათვისება, I კომპლექსის აქტივობა და რესპირაცია. Sig-1R და მიტოქონდრიული SK არხების ურთიერთქმედება ჯერჯერობით ექსპერიმენტულად ნანახი არ არის.

მიტოქონდრიული კალციუმი ასევე იზრდება სამარაგო Ca^{2+} -ის შედინებით (store operated Ca^{2+} entry SOCE) და სარკოპლაზმური რეტიკულუმიდან Ca^{2+} -ის გაჟონვით (Collins and Thomas 2001). Sig-1R ლიგანდებს შეუძლიათ SOCE-ს მოდულირება პირდაპირი თუ არაპირდაპირი მექანიზმებით, რაც დამატებით კვლევას საჭიროებს (Brailoiu et al. 2016).

ჩვენი დაკვირვებებით და უკვე გამოქვეყნებულ მონაცემებზე დაყრდნობით, Sig-1R აქტივაცია იწვევს Ca^{2+} დამოკიდებულ I კომპლექსის აქტივობის ცვლილებას და შესაბამისად ROS-ის გენერაციას ფიზიოლოგიურ პირობებში.

NADH უბიქვინონ ოქსიდორედუქტაზა მიტოქონდრიული ელექტრონების ტრანსპორტში პირველი რეაქციის კატალიზს ახდენს. I კომპლექსის სუბერთეულების შემადგენლობა ბირთვული და მიტოქონდრიული DNA-ით არის კოდირებული, ასე რომ ფერმენტის სწორი ასამბლეა მნიშვნელოვანია მისი ფუნქციონირებისათვის. ვინაიდან და

რადგანაც Sig-1R სხვადასხვა ცილებთან დაკავშირების უნარი გააჩნია, ჩვენ გამოვიყენეთ კომერციული I კომპლექსის შემზოჭავი ანტისხეული, რათა შეგვემოწმებინა Sig-1R-ისა და I კომპლექსის ურთიერთკავშირი. Sig-1R ლიგანდებს კოიმუნოპრეციპიტაციაზე ეფექტი არ მოუხდენიათ, თუმცა, საბოლოო დასკვნების გამოტანამდე საჭიროა შესაძლო ურთიერთკავშირის უფრო დეტალურად შესწავლა, I კომპლექსის შემადგენელი სუბერთეულების დონეზე.

მიტოქონდრიების დინამიკა მნიშვნელოვან ფაქტორს წარმოადგენს ნეიროდეგენერაციული დაავადებების დროს. მიტოქონდრიის მიერ ტრიგირებული ოქსიდაციური სტრესი და NOX-ის აქტივობის ცვლილება მონაწილეობენ ნეიროდეგენერაციული დაავადებების პათოგენეზში. კერძოდ, ალცჰაიმერის დაავადების შემთხვევაში მიტოქონდრია ER სტრესის და MAM-ის დესტაბილიზაციის გამო სხვადასხვა სახის ამილოიდის დაგროვების სამიზნეს წარმოადგენს (Area-Gomez et al. 2018; Leal et al. 2016). შესწავლილია ადგილობრივად ამილოიდური ცილების პროდუქცია MAMs-ზე (Schreiner et al. 2015) და პირდაპირი ეფექტი მიტოქონდრიულ სუნთქვით ჯაჭვზე (Giachin et al. 2016).

ამილოიდის სახეობები წარმოიქმნებიან APP-ის პათოლოგიური მეტაბოლიზმის შედეგად. სხვადასხვა სახეობებთან ერთად, $A\beta_{1-42}$ გამორჩეულია ტოქსიკური თვისებებით (Selkoe 2004). ამ კვლევით, დავადასტურეთ რომ $A\beta_{1-42}$ მიტოქონდრიულ პრეპარატზე პირდაპირი დამატება წარმოქმნის ROS-ს და ცვლის I და IV კომპლექსების აქტივობას, რაც ასევე ვლინდება უშუალოდ, ალცჰაიმერის პათოლოგიის დროსაც. ოქსიდაციური ფოსფორილირების დათრგუნვა ხშირად აღნიშნება ად პაციენტებსა და დაავადების სხვადასხვა ტრანსგენურ თუ უჯრედულ მოდელებში (Hroudova, Singh, and Fisar 2014) I და IV კომპლექსების დათრგუნვით. სუნთქვითი ჯაჭვიდან ელექტრონების გაჟონვის გაძლიერებით, ამილოიდის სახეობებმა გაამწვავეს მიტოქონდრიული დისფუნქცია და ოქსიდაციური სტრესი. Sig-1R აგონისტებმა (PRE-084, AN1-41) შეამცირეს $A\beta_{1-42}$ მიერ ინდუცირებული მიტოქონდრიული ROS-ის ზრდა. ამ შედეგმა დაადასტურა, რომ პათოლოგიურ მდგომარეობაში Sig-1R აგონისტებს პირდაპირი ანტიოქსიდაციური პოტენციალი გააჩნიათ. იმის დასადგენად, ეს ეფექტი სუნთქვითი ჯაჭვის ნორმალური

ფუნქციონირების აღდგენის შედეგად მოხდა თუ არა, ჩვენ შევისწავლეთ ოქსიდაციური რესპირაცია და ვნახეთ, რომ PRE-084, AN1-41, და AN2-73 $A\beta_{1-42}$ მიერ გამოწვეული RCR-ის ცვლილებები შეამცირეს ან მნიშვნელოვანი პრევენცია მოახდინეს, რაც იმას ნიშნავს რომ ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვმა Sig-1R თანაობისას უფრო ეფექტურად იმუშავა. გარდა ამისა, მიტოქონდრიულ პრეპარატზე $A\beta_{1-42}$ აპლიკაციამ შეცვალა I და IV კომპლექსების ფერმენტული აქტივობა. ამ ეფექტების მნიშვნელოვანი პრევენცია მოახდინა PRE-084 I და IV კომპლექსების აქტივობის შემთხვევაში და ANAVEX-ის ნაერთებმა IV კომპლექსის შემთხვევაში. Sig-1R ანტაგონისტებს ეფექტი არ მოუხდენიათ. ამ მონაცემებმა დაადასტურეს Sig-1R აგონისტების მიტოქონდრიული პროტექციის ეფექტი. აღსანიშნავია ის ფაქტი, რომ Sig-1R ნოკაუტირებული თაგვების გულის მიტოქონდრიების კვლევით დადგინდა, რომ Sig-1R გარკვეულ როლს თამაშობს კარდიული მიტოქონდრიის ნორმალურ ორგანიზაციაში და ზომის შენარჩუნებაში. Sig-1R-ის დანაკარგმა მიტოქონდრიული დისფუნქცია, მიტოქონდრიის ანომალური არქიტექტურა და გულის რემოდელირება გამოიწვია, რამაც კარდიული კუმშვადობის დისფუნქციაში იჩინა თავი (Abdullah et al. 2018).

ჩვენს მიერ მიღებულ შედეგებზე დაყრდნობით, Sig-1R შესაძლოა ზოგადი ეფექტი ჰქონდეს კრებლის ციკლზე. ამილოიდური ცილების ტოქსიკურობა იწვევს კრებლის ციკლში შემავალი ფერმენტების დათრგუნვას, იზოციტრატდეჰიდროგენაზასა და α -კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას ჩათვლით (Mastrogiacomio et al. 1996; Ko et al. 2001). ასე, რომ Ca^{2+} -ის დინების შაპერონირებით და შესაბამისად Ca^{2+} -დამოკიდებული კრებლის ციკლის ფერმენტების ბალანსირებით, Sig-1R აგონისტები შესაძლოა ინარჩუნებდნენ NADH რაოდენობას მიტოქონდრიის მატრიქსში. ამ ჰიპოთეზის დასადასტურებლად აუცილებელია კრებლის ციკლში შემავალი ფერმენტების აქტივობის შემოწმება. Sig-1R აგონისტები ნაჩვენებია რომ ახდენენ უჯრედული ანტი-ოქსიდაციური სისტემების, მაგალითად NF- κ B სიგნალის მოდულირებას (Meunier and Hayashi 2010), რაც მიუთითებს რეცეპტორის უჯრედულ ანტიოქსიდაციურ მექანიზმებში ჩართულობაზე.

ამ კვლევით დავადასტურეთ ის ფაქტი, რომ Sig-1R აქტივობა ახლო კავშირშია მიტოქონდრიულ პათოფიზიოლოგიასთან. ფიზიოლოგიურ პირობებში, Sig-1R

აგონისტები იწვევენ მსუბუქ ოქსიდაციურ სტრესს, I კომპლექსის აქტივობის მატებით. პათოლოგიურ პირობებში, ისეთი როგორიცაა A β -პეპტიდით გამოწვეული სტრესი, Sig-1R აქტივობამ შესაძლოა მიტოქონდრიული ფუნქციის სწრაფ აღდგენაში გარკვეული წვლილი შეიტანოს. ამ ეტაპზე საჭიროა Sig-1R ლიგანდების მიტოქონდრიის სხვა ფუნქციებსა და მორფოლოგიურ ცვლილებებზე ზეგავლენის შესწავლა.

დასკვნები

1. შესწავლილია სიგმა1-რეცეპტორის და მისი ლიგანდების გავლენა მიტოქონდრიების ფუნქციურ აქტივობაზე. გამოვლინდა, რომ მიტოქონდრიებთან ასოცირებულ მემბრანებზე (MAM-ზე) Sig-1R ერთ-ერთ პარტნიორ ცილას Rac1 წარმოადგენს. Sig-1R-Rac1 კომპლექსის ჩამოყალიბება ლიგანდ დამოკიდებული პროცესია და მატულობს სიგმა-1 აგონისტების თანაობისას. აღსანიშნავია, რომ ამ ცილების ურთიერთდაკავშირება ხორციელდება მხოლოდ აქტიური Rac1-ის თანაობისას.
2. ნანახია, რომ Sig-1R-ის აგონისტებით სტიმულაცია იწვევს Rac1-ის დადმავალი ეფექტორის PAK-ის აქტივაციას, რაც მიტოქონდრიული Bad-ცილის ფოსფორილირებას და მიტოქონდრიებიდან მის დისოციაციას განაპირობებს. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ Bad-ის ასეთი რელოკაცია შესაძლოა მნიშვნელოვანი იყოს აპოპტოზისა და ავტოფაგის პროცესების პრევენციისათვის.
3. დადგინდა, რომ Sig-1R აგონისტები იწვევენ მიტოქონდრიული ROS-ის მატებას, რაც შერჩევითად გამოწვეულია აგონისტების მიერ მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსის ფერმენტული აქტივობის მატებით. აგონისტების ეს ეფექტი Ca^{2+} დამოკიდებულ ხასიათს ატარებს. Sig-1R- IP_3 R-Rac1 მრავალკომპონენტური კომპლექსის ფორმირება, ჩვენი ვარაუდით, განაპირობებს ენდოპლაზმურ ბადესა და მიტოქონდრიას შორის Ca^{2+} -ის მიმოცვლის ცვლილებებს.
4. ნანახია, რომ $A\beta$ -პეპტიდის აპლიკაცია თავის ტვინის მიტოქონდრიებზე იწვევს ოქსიდაციურ სტრესს, სუნთქვითი კონტროლის (State3/State2) - RCR-ის დაქვეითებას და სუნთქვითი ჯაჭვის I და IV კომპლექსების აქტივობის დათრგუნვას. Sig-1R აგონისტები იცავენ მიტოქონდრიას $A\beta$ -პეპტიდით გამოწვეული დაზიანებისაგან.
5. გაირკვა ფარმაცევტული კომპანია ANAVEX-ის მიერ დასინთეზირებული ნაერთების მოქმედების მექანიზმი ROS-ის პროდუქციაზე, მიტოქონდრიების

სუნთქვითი ჯაჭვის აქტივობაზე და სიგმა-რეცეპტორის სპეციფიკურობაზე, ნორმალურ მიტოქონდრიებსა და მიტოქონდრიებზე ამილოიდური პეპტიდების ზემოქმედების შედეგად. დადგინდა, რომ მხოლოდ AN1-41, და AN2-73 შეამცირეს ამილოიდებით გამოწვეული ტოქსიკურობა.

გამოყენებული ლიტერატურა

- Abdullah, C. S., S. Alam, R. Aishwarya, S. Miriyala, M. Panchatcharam, M. A. N. Bhuiyan, J. M. Peretik, A. W. Orr, J. James, H. Osinska, J. Robbins, J. N. Lorenz, and M. S. Bhuiyan. 2018. "Cardiac Dysfunction in the Sigma 1 Receptor Knockout Mouse Associated With Impaired Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics." *J Am Heart Assoc* 7 (20): e009775. <https://doi.org/10.1161/jaha.118.009775>.
- Anandatheerthavarada, H. K., G. Biswas, M. A. Robin, and N. G. Avadhani. 2003. "Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells." *J Cell Biol* 161 (1): 41-54. <https://doi.org/10.1083/jcb.200207030>.
- Angelova, P. R., and A. Y. Abramov. 2016. "Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology." *Free Radic Biol Med* 100: 81-85. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.005>.
- . 2017. "Alpha-synuclein and beta-amyloid - different targets, same players: calcium, free radicals and mitochondria in the mechanism of neurodegeneration." *Biochem Biophys Res Commun* 483 (4): 1110-1115. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.103>.
- Ankarcrona, M., F. Mangialasche, and B. Winblad. 2010. "Rethinking Alzheimer's disease therapy: are mitochondria the key?" *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2: S579-90. <https://doi.org/10.3233/jad-2010-100327>.
- Antonini, V., A. Marrazzo, G. Kleiner, M. Coradazzi, S. Ronsisvalle, O. Prezzavento, G. Ronsisvalle, and G. Leanza. 2011. "Anti-amnesic and neuroprotective actions of the sigma-1 receptor agonist (-)-MR22 in rats with selective cholinergic lesion and amyloid infusion." *J Alzheimers Dis* 24 (3): 569-86. <https://doi.org/10.3233/jad-2011-101794>.
- Area-Gomez, E., A. de Groof, E. Bonilla, J. Montesinos, K. Tanji, I. Boldogh, L. Pon, and E. A. Schon. 2018. "A key role for MAM in mediating mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease." *Cell Death Dis* 9 (3): 335. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0215-0>.
- Babior, B. M. 2004. "NADPH oxidase." *Curr Opin Immunol* 16 (1): 42-7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.12.001>.
- Baines, C. P., R. A. Kaiser, T. Sheiko, W. J. Craigen, and J. D. Molkentin. 2007. "Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death." *Nat Cell Biol* 9 (5): 550-5. <https://doi.org/10.1038/ncb1575>.
- Behensky, A. A., I. E. Yasny, A. M. Shuster, S. B. Seredenin, A. V. Petrov, and J. Cuevas. 2013. "Stimulation of sigma receptors with afobazole blocks activation of microglia and reduces toxicity caused by amyloid-beta25-35." *J Pharmacol Exp Ther* 347 (2): 458-67. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208348>.
- Billups, B., and I. D. Forsythe. 2002. "Presynaptic mitochondrial calcium sequestration influences transmission at mammalian central synapses." *J Neurosci* 22 (14): 5840-7. <https://doi.org/20026597>.
- Bolisetty, S., and E. A. Jaimes. 2013. "Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology." *Int J Mol Sci* 14 (3): 6306-44. <https://doi.org/10.3390/ijms14036306>.
- Boo, J. H., J. H. Sohn, J. E. Kim, H. Song, and I. Mook-Jung. 2008. "Rac1 changes the substrate specificity of gamma-secretase between amyloid precursor protein and Notch1." *Biochem Biophys Res Commun* 372 (4): 913-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.153>.

- Brailoiu, G. C., E. Deliu, L. M. Console-Bram, J. Soboloff, M. E. Abood, E. M. Unterwald, and E. Brailoiu. 2016. "Cocaine inhibits store-operated Ca^{2+} entry in brain microvascular endothelial cells: critical role for sigma-1 receptors." *Biochem J* 473 (1): 1-5. <https://doi.org/10.1042/bj20150934>.
- Butterworth, P. J. 2005. "Lehninger: principles of biochemistry (4th edn) D. L. Nelson and M. C. Cox, W. H. Freeman & Co., New York, 1119 pp (plus 17 pp glossary), ISBN 0-7167-4339-6 (2004)." *Cell Biochemistry and Function* 23 (4): 293-294. <https://doi.org/10.1002/cbf.1216>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbf.1216>.
- Cadenas, E., and K. J. Davies. 2000. "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." *Free Radic Biol Med* 29 (3-4): 222-30. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00317-8).
- Cenini, G., C. Rub, M. Bruderek, and W. Voos. 2016. "Amyloid beta-peptides interfere with mitochondrial preprotein import competence by a coaggregation process." *Mol Biol Cell* 27 (21): 3257-3272. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-05-0313>.
- Cho, D. H., T. Nakamura, J. Fang, P. Cieplak, A. Godzik, Z. Gu, and S. A. Lipton. 2009. "S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury." *Science* 324 (5923): 102-5. <https://doi.org/10.1126/science.1171091>.
- Chua, B. T., C. Volbracht, K. O. Tan, R. Li, V. C. Yu, and P. Li. 2003. "Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction." *Nat Cell Biol* 5 (12): 1083-9. <https://doi.org/10.1038/ncb1070>.
- Collins, R. O., and R. C. Thomas. 2001. "The effect of calcium pumpinhibitors on the response of intracellular calcium to caffeine in snail neurones." *Cell Calcium* 30 (1): 41-48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1054/ceca.2001.0209>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014341600190209X>.
- Csordás, György, Christian Renken, Péter Várnai, Ludivine Walter, David Weaver, Karolyn F. Buttle, Tamás Balla, Carmen A. Mannella, and György Hajnóczky. 2006. "Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria." *The Journal of Cell Biology* 174 (7): 915. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604016>. <http://jcb.rupress.org/content/174/7/915.abstract>.
- Decuypere, J. P., G. Monaco, G. Bultynck, L. Missiaen, H. De Smedt, and J. B. Parys. 2011. "The IP(3) receptor-mitochondria connection in apoptosis and autophagy." *Biochim Biophys Acta* 1813 (5): 1003-13. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2010.11.023>.
- Erlich, S., L. Mizrachy, O. Segev, L. Lindenboim, O. Zmira, S. Adi-Harel, J. A. Hirsch, R. Stein, and R. Pinkas-Kramarski. 2007. "Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members." *Autophagy* 3 (6): 561-8. <https://doi.org/10.4161/auto.4713>.
- Ferreiro, E., C. R. Oliveira, and C. M. Pereira. 2008. "The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway." *Neurobiol Dis* 30 (3): 331-42. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.02.003>.
- Filadi, R., N. S. Leal, B. Schreiner, A. Rossi, G. Dentoni, C. M. Pinho, B. Wiehager, D. Cieri, T. Cali, P. Pizzo, and M. Ankarcona. 2018. "TOM70 Sustains Cell Bioenergetics by Promoting IP3R3-Mediated ER to Mitochondria Ca^{2+} Transfer." *Curr Biol* 28 (3): 369-382.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.047>.
- Fisher, A., I. Bezprozvanny, L. Wu, D. A. Ryskamp, N. Bar-Ner, N. Natan, R. Brandeis, H. Elkon, V. Nahum, E. Gershonov, F. M. LaFerla, and R. Medeiros. 2016. "AF710B, a Novel M1/sigma1 Agonist with Therapeutic Efficacy in Animal Models of Alzheimer's Disease." *Neurodegener Dis* 16 (1-2): 95-110. <https://doi.org/10.1159/000440864>.
- Francardo, V., F. Bez, T. Wieloch, H. Nissbrandt, K. Ruscher, and M. A. Cenci. 2014. "Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in

- experimental parkinsonism." *Brain* 137 (Pt 7): 1998-2014.
<https://doi.org/10.1093/brain/awu107>.
- Giachin, G., R. Bouverot, S. Acajjaoui, S. Pantalone, and M. Soler-Lopez. 2016. "Dynamics of Human Mitochondrial Complex I Assembly: Implications for Neurodegenerative Diseases." *Front Mol Biosci* 3: 43. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00043>.
- Gilbert, P. E., and W. R. Martin. 1976. "Sigma effects of nalorphine in the chronic spinal dog." *Drug Alcohol Depend* 1 (6): 373-6. [https://doi.org/10.1016/0376-8716\(76\)90001-6](https://doi.org/10.1016/0376-8716(76)90001-6).
- Giorgi, Carlotta, Saverio Marchi, and Paolo Pinton. 2018. "The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (11): 713-730. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8>. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8>.
- Glancy, Brian, and Robert S. Balaban. 2012. "Role of Mitochondrial Ca²⁺ in the Regulation of Cellular Energetics." *Biochemistry* 51 (14): 2959-2973. <https://doi.org/10.1021/bi2018909>.
<https://doi.org/10.1021/bi2018909>.
- Goedert, M., and M. G. Spillantini. 2006. "A century of Alzheimer's disease." *Science* 314 (5800): 777-81. <https://doi.org/10.1126/science.1132814>.
- Hansson Petersen, Camilla A., Nyosha Alikhani, Homira Behbahani, Birgitta Wiehager, Pavel F. Pavlov, Irina Alafuzoff, Ville Leinonen, Akira Ito, Bengt Winblad, Elzbieta Glaser, and Maria Ankarcrona. 2008. "The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (35): 13145-13150.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0806192105>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18757748>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2527349/>.
- Hayashi, T., Z. Justinova, E. Hayashi, G. Cormaci, T. Mori, S. Y. Tsai, C. Barnes, S. R. Goldberg, and T. P. Su. 2010. "Regulation of sigma-1 receptors and endoplasmic reticulum chaperones in the brain of methamphetamine self-administering rats." *J Pharmacol Exp Ther* 332 (3): 1054-63. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.159244>.
- Hayashi, T., T. Maurice, and T. P. Su. 2000. "Ca(2+) signaling via sigma(1)-receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca(2+) concentration." *J Pharmacol Exp Ther* 293 (3): 788-98.
- Hayashi, T., R. Rizzuto, G. Hajnoczky, and T. P. Su. 2009. "MAM: more than just a housekeeper." *Trends Cell Biol* 19 (2): 81-8. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.12.002>.
- Hayashi, T., and T. P. Su. 2007. "Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival." *Cell* 131 (3): 596-610.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.036>.
- Hedskog, Louise, Catarina Moreira Pinho, Riccardo Filadi, Annica Rönnbäck, Laura Hertwig, Birgitta Wiehager, Pia Larssen, Sandra Gellhaar, Anna Sandebring, Marie Westerlund, Caroline Graff, Bengt Winblad, Dagmar Galter, Homira Behbahani, Paola Pizzo, Elzbieta Glaser, and Maria Ankarcrona. 2013. "Modulation of the endoplasmic reticulum–mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (19): 7916-7921.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1300677110>.
<https://www.pnas.org/content/pnas/110/19/7916.full.pdf>.
- Hellewell, S. B., and W. D. Bowen. 1990. "A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (PC12) cells: decreased affinity for (+)-benzomorphans and lower molecular weight suggest a different sigma receptor form from that of guinea pig brain." *Brain Res* 527 (2): 244-53.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91143-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91143-5).
- Hernandez-Zimbron, L. F., J. Luna-Munoz, R. Mena, R. Vazquez-Ramirez, C. Kubli-Garfias, D. H. Cribbs, K. Manoutcharian, and G. Gevorkian. 2012. "Amyloid-beta peptide binds to

- cytochrome C oxidase subunit 1." *PLoS One* 7 (8): e42344.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042344>.
- Hildeman, David A., Thomas Mitchell, Bruce Aronow, Sara Wojciechowski, John Kappler, and Philippa Marrack. 2003. "Control of *Bcl-2* expression by reactive oxygen species." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (25): 15035-15040.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1936213100>.
<https://www.pnas.org/content/pnas/100/25/15035.full.pdf>.
- Honrath, B., L. Matschke, T. Meyer, L. Magerhans, F. Perocchi, G. K. Ganjam, H. Zischka, C. Krasel, A. Gerding, B. M. Bakker, M. Bunemann, S. Strack, N. Decher, C. Culmsee, and A. M. Dolga. 2017. "SK2 channels regulate mitochondrial respiration and mitochondrial Ca²⁺ uptake." *Cell Death Differ* 24 (5): 761-773. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.2>.
- Hroudova, J., N. Singh, and Z. Fisar. 2014. "Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: relevance to Alzheimer's disease." *Biomed Res Int* 2014: 175062.
<https://doi.org/10.1155/2014/175062>.
- Huesa, G., M. A. Baltrons, P. Gomez-Ramos, A. Moran, A. Garcia, J. Hidalgo, S. Frances, G. Santpere, I. Ferrer, and E. Galea. 2010. "Altered distribution of RhoA in Alzheimer's disease and AbetaPP overexpressing mice." *J Alzheimers Dis* 19 (1): 37-56.
<https://doi.org/10.3233/jad-2010-1203>.
- Hyrskyluoto, A., I. Pulli, K. Tornqvist, T. H. Ho, L. Korhonen, and D. Lindholm. 2013. "Sigma-1 receptor agonist PRE084 is protective against mutant huntingtin-induced cell degeneration: involvement of calpastatin and the NF-kappaB pathway." *Cell Death Dis* 4: e646.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2013.170>.
- Infanger, D. W., R. V. Sharma, and R. L. Davisson. 2006. "NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function." *Antioxid Redox Signal* 8 (9-10): 1583-96.
<https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1583>.
- Janikiewicz, J., J. Szymanski, D. Malinska, P. Patalas-Krawczyk, B. Michalska, J. Duszynski, C. Giorgi, M. Bonora, A. Dobrzyn, and M. R. Wieckowski. 2018. "Mitochondria-associated membranes in aging and senescence: structure, function, and dynamics." *Cell Death Dis* 9 (3): 332. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0105-5>.
- Johnson, K., and S. R. D'Mello. 2005. "p21-Activated kinase-1 is necessary for depolarization-mediated neuronal survival." *J Neurosci Res* 79 (6): 809-15.
<https://doi.org/10.1002/jnr.20415>.
- Johnston, P. A. 2011. "Redox cycling compounds generate H₂O₂ in HTS buffers containing strong reducing reagents--real hits or promiscuous artifacts?" *Curr Opin Chem Biol* 15 (1): 174-82.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.022>.
- Kasahara, A., and L. Scorrano. 2014. "Mitochondria: from cell death executioners to regulators of cell differentiation." *Trends Cell Biol* 24 (12): 761-70.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.08.005>.
- Kiviluoto, Santeri, Haidar Akl, Tim Vervliet, Geert Bultynck, Jan B. Parys, Ludwig Missiaen, and Humbert De Smedt. 2012. "IP3 receptor-binding partners in cell-death mechanisms." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling* 1 (2): 201-210.
<https://doi.org/10.1002/wmts.5>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wmts.5>.
- Ko, Li-wen, Kwan-Fu Rex Sheu, Howard T. Thaler, William R. Markesbery, and John P. Blass. 2001. "Selective loss of KGDHC-enriched neurons in alzheimer temporal cortex." *Journal of Molecular Neuroscience* 17 (3): 361-369. <https://doi.org/10.1385/JMN:17:3:361>.
<https://doi.org/10.1385/JMN:17:3:361>.
- Lahmy, V., R. Long, D. Morin, V. Villard, and T. Maurice. 2014. "Mitochondrial protection by the mixed muscarinic/sigma1 ligand ANAVEX2-73, a tetrahydrofuran derivative, in Abeta25-35

- peptide-injected mice, a nontransgenic Alzheimer's disease model." *Front Cell Neurosci* 8: 463. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00463>.
- Lahmy, V., J. Meunier, S. Malmstrom, G. Naert, L. Givalois, S. H. Kim, V. Villard, A. Vamvakides, and T. Maurice. 2013. "Blockade of Tau hyperphosphorylation and Abeta(1)(-)(4)(2) generation by the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX2-73, a mixed muscarinic and sigma(1) receptor agonist, in a nontransgenic mouse model of Alzheimer's disease." *Neuropsychopharmacology* 38 (9): 1706-23. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.70>.
- Lane, C. A., J. Hardy, and J. M. Schott. 2018. "Alzheimer's disease." *Eur J Neurol* 25 (1): 59-70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>.
- Leal, N. S., B. Schreiner, C. M. Pinho, R. Filadi, B. Wiehager, H. Karlstrom, P. Pizzo, and M. Ankarcrona. 2016. "Mitofusin-2 knockdown increases ER-mitochondria contact and decreases amyloid beta-peptide production." *J Cell Mol Med* 20 (9): 1686-95. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12863>.
- Lee, Sang Hun, Kyung-Ran Kim, Shin-Young Ryu, Sungmin Son, Hyun Seok Hong, Inhee Mook-Jung, Suk-Ho Lee, and Won-Kyung Ho. 2012. "Impaired Short-Term Plasticity in Mossy Fiber Synapses Caused by Mitochondrial Dysfunction of Dentate Granule Cells Is the Earliest Synaptic Deficit in a Mouse Model of Alzheimer's Disease." *The Journal of Neuroscience* 32 (17): 5953-5963. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0465-12.2012>. <https://www.jneurosci.org/content/jneuro/32/17/5953.full.pdf>.
- Leuner, K., T. Schutt, C. Kurz, S. H. Eckert, C. Schiller, A. Occhipinti, S. Mai, M. Jendrach, G. P. Eckert, S. E. Kruse, R. D. Palmiter, U. Brandt, S. Drose, I. Wittig, M. Willem, C. Haass, A. S. Reichert, and W. E. Muller. 2012. "Mitochondrion-derived reactive oxygen species lead to enhanced amyloid beta formation." *Antioxid Redox Signal* 16 (12): 1421-33. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4173>.
- Li, G., J. Zhou, A. Budhreja, X. Hu, Y. Chen, Q. Cheng, L. Liu, T. Zhou, P. Li, E. Liu, and N. Gao. 2015. "Mitochondrial translocation and interaction of cofilin and Drp1 are required for erucin-induced mitochondrial fission and apoptosis." *Oncotarget* 6 (3): 1834-49. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2795>.
- Linseman, D. A., and F. A. Loucks. 2008. "Diverse roles of Rho family GTPases in neuronal development, survival, and death." *Front Biosci* 13: 657-76. <https://doi.org/10.2741/2710>.
- Lustbader, J. W., M. Cirilli, C. Lin, H. W. Xu, K. Takuma, N. Wang, C. Caspersen, X. Chen, S. Pollak, M. Chaney, F. Trinchese, S. Liu, F. Gunn-Moore, L. F. Lue, D. G. Walker, P. Kuppusamy, Z. L. Zewier, O. Arancio, D. Stern, S. S. Yan, and H. Wu. 2004. "ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease." *Science* 304 (5669): 448-52. <https://doi.org/10.1126/science.1091230>.
- Marrazzo, A., F. Caraci, E. T. Salinaro, T. P. Su, A. Copani, and G. Ronsisvalle. 2005. "Neuroprotective effects of sigma-1 receptor agonists against beta-amyloid-induced toxicity." *Neuroreport* 16 (11): 1223-6. <https://doi.org/10.1097/00001756-200508010-00018>.
- Martina, M., M. E. Turcotte, S. Halman, and R. Bergeron. 2007. "The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus." *J Physiol* 578 (Pt 1): 143-57. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.116178>.
- Maru, Y., T. Nishino, and K. Kakinuma. 2005. "Expression of Nox genes in rat organs, mouse oocytes, and sea urchin eggs." *DNA Seq* 16 (2): 83-8. <https://doi.org/10.1080/10425170500069734>.
- Mastrogiacomo, Frank, J. Gordon Lindsay, Lucien Bettendorff, Jacqueline Rice, and Stephen J. Kish. 1996. "Brain protein and α -ketoglutarate dehydrogenase complex activity in alzheimer's disease." *Annals of Neurology* 39 (5): 592-598. <https://doi.org/10.1002/ana.410390508>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ana.410390508>.

- Matsuoka, Y., M. Picciano, J. La Francois, and K. Duff. 2001. "Fibrillar beta-amyloid evokes oxidative damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *Neuroscience* 104 (3): 609-13. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00115-4).
- Matus, A. 2000. "Actin-based plasticity in dendritic spines." *Science* 290 (5492): 754-8. <https://doi.org/10.1126/science.290.5492.754>.
- Maurice, T., and T. P. Su. 2009. "The pharmacology of sigma-1 receptors." *Pharmacol Ther* 124 (2): 195-206. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.07.001>.
- Maurice, T., J. N. Volle, M. Strehaiano, L. Crouzier, C. Pereira, N. Kaloyanov, D. Virieux, and J. L. Pirat. 2019. "Neuroprotection in non-transgenic and transgenic mouse models of Alzheimer's disease by positive modulation of sigma1 receptors." *Pharmacol Res* 144: 315-330. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.04.026>.
- Mavylutov, T., X. Chen, L. Guo, and J. Yang. 2018. "APEX2- tagging of Sigma 1-receptor indicates subcellular protein topology with cytosolic N-terminus and ER luminal C-terminus." *Protein Cell* 9 (8): 733-737. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0468-5>.
- Meunier, J., and T. Hayashi. 2010. "Sigma-1 receptors regulate Bcl-2 expression by reactive oxygen species-dependent transcriptional regulation of nuclear factor kappaB." *J Pharmacol Exp Ther* 332 (2): 388-97. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.160960>.
- Mishina, M., M. Ohyama, K. Ishii, S. Kitamura, Y. Kimura, K. Oda, K. Kawamura, T. Sasaki, S. Kobayashi, Y. Katayama, and K. Ishiwata. 2008. "Low density of sigma1 receptors in early Alzheimer's disease." *Ann Nucl Med* 22 (3): 151-6. <https://doi.org/10.1007/s12149-007-0094-z>.
- Mori, T., T. Hayashi, E. Hayashi, and T. P. Su. 2013. "Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival." *PLoS One* 8 (10): e76941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076941>.
- Ohayagi, Y., T. Yamada, K. Nishioka, N. J. Clarke, A. J. Tomlinson, S. Naylor, Y. Nakabeppu, J. Kira, and S. G. Younkin. 2000. "Selective increase in cellular A beta 42 is related to apoptosis but not necrosis." *Neuroreport* 11 (1): 167-71. <https://doi.org/10.1097/00001756-200001170-00033>.
- Parks, Janice K., Trisha S. Smith, Patricia A. Trimmer, James P. Bennett Jr, and W. Davis Parker Jr. 2001. "Neurotoxic A β peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro." *Journal of Neurochemistry* 76 (4): 1050-1056. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00112.x>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1471-4159.2001.00112.x>.
- Penzes, P., and M. E. Cahill. 2012. "Deconstructing signal transduction pathways that regulate the actin cytoskeleton in dendritic spines." *Cytoskeleton (Hoboken)* 69 (7): 426-41. <https://doi.org/10.1002/cm.21015>.
- Pera, Marta, Delfina Larrea, Cristina Guardia-Laguarta, Jorge Montesinos, Kevin R. Velasco, Rishi R. Agrawal, Yimeng Xu, Robin B. Chan, Gilbert Di Paolo, Mark F. Mehler, Geoffrey S. Perumal, Frank P. Macaluso, Zachary Z. Freyberg, Rebeca Acin-Perez, Jose Antonio Enriquez, Eric A. Schon, and Estela Area-Gomez. 2017. "Increased localization of APP-C99 in mitochondria-associated ER membranes causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease." *The EMBO journal* 36 (22): 3356-3371. <https://doi.org/10.15252/embj.201796797>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29018038> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5731665/>.
- Pertz, O. 2010. "Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now?" *J Cell Sci* 123 (Pt 11): 1841-50. <https://doi.org/10.1242/jcs.064345>.
- Petratos, S., Q. X. Li, A. J. George, X. Hou, M. L. Kerr, S. E. Unabia, I. Hatzinisiriou, D. Maksel, M. I. Aguilar, and D. H. Small. 2008. "The beta-amyloid protein of Alzheimer's disease

- increases neuronal CRMP-2 phosphorylation by a Rho-GTP mechanism." *Brain* 131 (Pt 1): 90-108. <https://doi.org/10.1093/brain/awm260>.
- Pugazhenth, Subbiah, Albina Nesterova, Purevsuren Jambal, Gerald Audesirk, Marcey Kern, Leigh Cabell, Eva Eves, Marsha R. Rosner, Linda M. Boxer, and Jane E.-B. Reusch. 2003. "Oxidative stress-mediated down-regulation of bcl-2 promoter in hippocampal neurons." *Journal of Neurochemistry* 84 (5): 982-996. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01606.x>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1471-4159.2003.01606.x>.
- Radi, E., P. Formichi, C. Battisti, and A. Federico. 2014. "Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases." *J Alzheimers Dis* 42 Suppl 3: S125-52. <https://doi.org/10.3233/jad-132738>.
- Ray, Katrina. 2010. "Amyloid- β plaques and glucose metabolism in early-onset AD." *Nature Reviews Neurology* 6 (3): 123-123. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.10>. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.10>.
- Ridge, P. G., and J. S. K. Kauwe. 2018. "Mitochondria and Alzheimer's Disease: the Role of Mitochondrial Genetic Variation." *Curr Genet Med Rep* 6 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1007/s40142-018-0132-2>.
- Rigoulet, M., E. D. Yoboue, and A. Devin. 2011. "Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H(2)O(2) signaling." *Antioxid Redox Signal* 14 (3): 459-68. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3363>.
- Rizzuto, R., D. De Stefani, A. Raffaello, and C. Mammucari. 2012. "Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 13 (9): 566-78. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>.
- Rossner, S., M. Sastre, K. Bourne, and S. F. Lichtenthaler. 2006. "Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression--implications for Alzheimer's disease." *Prog Neurobiol* 79 (2): 95-111. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.06.001>.
- Rusinol, A. E., Z. Cui, M. H. Chen, and J. E. Vance. 1994. "A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins." *J Biol Chem* 269 (44): 27494-502.
- Santos, R. X., S. C. Correia, X. Wang, G. Perry, M. A. Smith, P. I. Moreira, and X. Zhu. 2010. "Alzheimer's disease: diverse aspects of mitochondrial malfunctioning." *Int J Clin Exp Pathol* 3 (6): 570-81.
- Schmidt, H. R., S. Zheng, E. Gurpinar, A. Koehl, A. Manglik, and A. C. Kruse. 2016. "Crystal structure of the human sigma1 receptor." *Nature* 532 (7600): 527-30. <https://doi.org/10.1038/nature17391>.
- Schmidt, Hayden R., Robin M. Betz, Ron O. Dror, and Andrew C. Kruse. 2018. "Structural basis for σ_1 receptor ligand recognition." *Nature Structural & Molecular Biology* 25 (10): 981-987. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0137-2>. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0137-2>.
- Schreiner, B., L. Hedskog, B. Wiehager, and M. Ankarcrona. 2015. "Amyloid-beta peptides are generated in mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes." *J Alzheimers Dis* 43 (2): 369-74. <https://doi.org/10.3233/jad-132543>.
- Seelert, H., D. N. Dani, S. Dante, T. Hauss, F. Krause, E. Schafer, M. Frenzel, A. Poetsch, S. Rexroth, H. J. Schwassmann, T. Suhai, J. Vonck, and N. A. Dencher. 2009. "From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes." *Biochim Biophys Acta* 1787 (6): 657-71. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.02.028>.
- Selkoe, Dennis J. 2004. "Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases." *Nature Cell Biology* 6 (11): 1054-1061. <https://doi.org/10.1038/ncb1104-1054>. <https://doi.org/10.1038/ncb1104-1054>.

- Sena, L. A., and N. S. Chandel. 2012. "Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species." *Mol Cell* 48 (2): 158-67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>.
- Shirao, T., and C. Gonzalez-Billault. 2013. "Actin filaments and microtubules in dendritic spines." *J Neurochem* 126 (2): 155-64. <https://doi.org/10.1111/jnc.12313>.
- Shoffner, J. M. 1997. "Oxidative phosphorylation defects and Alzheimer's disease." *Neurogenetics* 1 (1): 13-9.
- Sims, N. R., and M. F. Anderson. 2008. "Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation." *Nat Protoc* 3 (7): 1228-39. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.105>.
- Srivastava, S. 2016. "Emerging therapeutic roles for NAD(+) metabolism in mitochondrial and age-related disorders." *Clin Transl Med* 5 (1): 25. <https://doi.org/10.1186/s40169-016-0104-7>.
- Stankiewicz, T. R., and D. A. Linseman. 2014. "Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration." *Front Cell Neurosci* 8: 314. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00314>.
- Stram, A. R., and R. M. Payne. 2016. "Post-translational modifications in mitochondria: protein signaling in the powerhouse." *Cell Mol Life Sci* 73 (21): 4063-73. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2280-4>.
- Su, T. P., T. Hayashi, T. Maurice, S. Buch, and A. E. Ruoho. 2010. "The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator." *Trends Pharmacol Sci* 31 (12): 557-66. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.08.007>.
- Su, T. P., T. C. Su, Y. Nakamura, and S. Y. Tsai. 2016. "The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems." *Trends Pharmacol Sci* 37 (4): 262-278. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.01.003>.
- Tahara, Erich B., Felipe D. T. Navarete, and Alicia J. Kowaltowski. 2009. "Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation." *Free Radical Biology and Medicine* 46 (9): 1283-1297. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.008>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584909000811>.
- Tsukada, H., S. Nishiyama, H. Ohba, M. Kanazawa, T. Kakiuchi, and N. Harada. 2014. "Comparing amyloid-beta deposition, neuroinflammation, glucose metabolism, and mitochondrial complex I activity in brain: a PET study in aged monkeys." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 41 (11): 2127-36. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2821-8>.
- Turens, J. F. 2003. "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." *J Physiol* 552 (Pt 2): 335-44. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>.
- Vasington, F. D., and J. V. Murphy. 1962. "Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation." *J Biol Chem* 237: 2670-7.
- Velaithan, R., J. Kang, J. L. Hirpara, T. Loh, B. C. Goh, M. Le Bras, C. Brenner, M. V. Clement, and S. Pervaiz. 2011. "The small GTPase Rac1 is a novel binding partner of Bcl-2 and stabilizes its antiapoptotic activity." *Blood* 117 (23): 6214-26. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-301283>.
- Villard, V., J. Espallergues, E. Keller, T. Alkam, A. Nitta, K. Yamada, T. Nabeshima, A. Vamvakides, and T. Maurice. 2009. "Antiamnesic and neuroprotective effects of the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX1-41 against amyloid beta(25-35)-induced toxicity in mice." *Neuropsychopharmacology* 34 (6): 1552-66. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.212>.
- Villard, V., J. Espallergues, E. Keller, A. Vamvakides, and T. Maurice. 2011. "Anti-amnesic and neuroprotective potentials of the mixed muscarinic receptor/sigma 1 (sigma1) ligand ANAVEX2-73, a novel aminotetrahydrofuran derivative." *J Psychopharmacol* 25 (8): 1101-17. <https://doi.org/10.1177/0269881110379286>.

- Wang, P. L., T. Niidome, A. Akaike, T. Kihara, and H. Sugimoto. 2009. "Rac1 inhibition negatively regulates transcriptional activity of the amyloid precursor protein gene." *J Neurosci Res* 87 (9): 2105-14. <https://doi.org/10.1002/jnr.22039>.
- Wang, X., W. Wang, L. Li, G. Perry, H. G. Lee, and X. Zhu. 2014. "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta* 1842 (8): 1240-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.015>.
- White, C., C. Li, J. Yang, N. B. Petrenko, M. Madesh, C. B. Thompson, and J. K. Foskett. 2005. "The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R." *Nat Cell Biol* 7 (10): 1021-8. <https://doi.org/10.1038/ncb1302>.
- Willems, P. H., F. Valsecchi, F. Distelmaier, S. Verkaart, H. J. Visch, J. A. Smeitink, and W. J. Koopman. 2008. "Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency." *Cell Calcium* 44 (1): 123-33. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2008.01.002>.
- Xie, Hong, Jisong Guan, Laura A. Borrelli, Jing Xu, Alberto Serrano-Pozo, and Brian J. Bacskai. 2013. "Mitochondrial alterations near amyloid plaques in an Alzheimer's disease mouse model." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33 (43): 17042-17051. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1836-13.2013>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24155308>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3807029/>.
- Yang, N., O. Higuchi, K. Ohashi, K. Nagata, A. Wada, K. Kangawa, E. Nishida, and K. Mizuno. 1998. "Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization." *Nature* 393 (6687): 809-12. <https://doi.org/10.1038/31735>.
- Yano, H., A. Bonifazi, M. Xu, D. A. Guthrie, S. N. Schneek, A. M. Abramyan, A. D. Fant, W. C. Hong, A. H. Newman, and L. Shi. 2018. "Pharmacological profiling of sigma 1 receptor ligands by novel receptor homomer assays." *Neuropharmacology* 133: 264-275. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.042>.
- Ye, D. Z., S. Jin, Y. Zhuo, and J. Field. 2011. "p21-Activated kinase 1 (Pak1) phosphorylates BAD directly at serine 111 in vitro and indirectly through Raf-1 at serine 112." *PLoS One* 6 (11): e27637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027637>.
- Zha, J., H. Harada, E. Yang, J. Jockel, and S. J. Korsmeyer. 1996. "Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)." *Cell* 87 (4): 619-28. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81382-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81382-3).
- Zhao, L., Q. L. Ma, F. Calon, M. E. Harris-White, F. Yang, G. P. Lim, T. Morihara, O. J. Ubeda, S. Ambegaokar, J. E. Hansen, R. H. Weisbart, B. Teter, S. A. Frautschy, and G. M. Cole. 2006. "Role of p21-activated kinase pathway defects in the cognitive deficits of Alzheimer disease." *Nat Neurosci* 9 (2): 234-42. <https://doi.org/10.1038/nn1630>.
- Zorov, Dmitry B., Charles R. Filburn, Lars-Oliver Klotz, Jay L. Zweier, and Steven J. Sollott. 2000. "Reactive Oxygen Species (Ros-Induced) Ros Release." *A New Phenomenon Accompanying Induction of the Mitochondrial Permeability Transition in Cardiac Myocytes* 192 (7): 1001-1014. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1001>.
<http://jem.rupress.org/content/jem/192/7/1001.full.pdf>.