Az agyi mitokondriumok bioenergetikája és a reaktív oxigénszármazék-termelő képességének vizsgálata

Doktori értekezés

dr. Komlódi Tímea

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola
Funkcionális Idegtudományok

Témavezető: Dr. Tretter László, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Bay Péter, DSc., egyetemi tanár
Dr. Rónai Zsolt, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Molnár Mária Judit, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szarka András, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kardon Tamás, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2018

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke....4
2. Bevezetés....6
2.1. A mitokondriumok eredete....6
2.2 A mitokondriumok szerepe az energiatermelésben....7
2.3. A mitokondriális ATP termelő folyamatok....13
2.4. A mitokondriális szubsztrát-szintű foszforiláció jelentősége....13
2.5. A metilénkék mitokondriális hatásai - régi gyógyszer, új indikáció....15
2.5.1. Történelmi áttekintés....15
2.5.2. A metilénkék főbb tulajdonságai....16
2.5.3. A metilénkék mitokondriális hatásai....17
2.6 A mitokondriális reaktív oxigénszármazékok....19
2.7 A mitokondriális ROS forrásai....21
2.8 A mitokondriális ROS eltávolítása és semlegesítése....29
2.9 A mitokondriális ROS képzés befolyásolásának lehetőségei....31
2.9.1. Mitokondriális gátlószerek....31
2.9.2 Metilénkék....32
2.9.3 A mitokondriális membránpotenciál....33
2.9.4 A transzmembrán pH grádiens....35
2.9.5 Anorganikus foszfát....35
3. Célkitűzés....36
4. Módszerek....37
4.1 Mitokondriumok izolálása....37
4.2 Agy mitokondrium....37
4.3 Szív mitokondrium....37
4.4 A mitokondriális oxigénfogyasztás meghatározása....38
4.5 A mitokondriális ATP szintézis sebességének meghatározása....38
4.6 A mitokondriális membránpotenciál meghatározása safranin fluoreszcencia detektálásával....39
4.7 A mitokondriális membránpotenciál meghatározása meghatározása TPP^+ elektród segítségével....39
4.8 A mitokondriális reaktív oxigén származék képződésének meghatározása....40
4.9 Az intramitokondriális pH meghatározása....40
4.10 A NAD(P)H autofluoreszcencia meghatározása....41
4.11 A metilénkék abszorbanciájának meghatározása....41
4.12 Oldatok....42

4.13 Statisztika 42
4.14 Vegyszerek 43
5. Eredmények 44
5.1 A metilénkék hatása a mitokondriális szubsztrát-szintű foszforilációra 44
5.1.1 Az adenilát-kináz hozzájárulása a mitokondriális ATP termeléshez 44
5.1.2 A metilénkék hatása a szubsztrát-szintű foszforilációra izolált agyi mitokondriumokban 47
5.1.3 A metilénkék hatása a mitokondriális oxigénfogyasztásra izolált agyi mitokondriumokban 51
5.1.4 A metilénkék hatása a NAD(P)H-szintre 54
5.1.5 A metilénkék hatása a mitokondriális membránpotenciálra ($\Delta\psi_m$) 55
5.1.6 A metilénkék mitokondriális hatásának összefoglalása 58
5.1.7 A metilénkék hatása komplex I és ATP-szintáz gátolt mitokondriumok működésére 59
5.1.8 A metilénkék felhalmozódása a mitokondriumban 62
5.2 A protonmotoros erő komponenseinek, a mitokondriális membránpotenciál és a transzmembrán pH grádiens hatása a mitokondriális reverz elektron transzport által támogatott H_2O_2 termelésre agyi és szív mitokondriumokon 64
5.2.1 A nigericin hatása a pH_{in}-re, ΔpH-ra, a $\Delta\psi_m$-ra és a mitokondriális H_2O_2 termelésre, ha mérőoldat pH = 7.0 agyi mitokondriumokban 64
5.2.2 A valinomycin hatása a pH_{in}-re, ΔpH-ra, a $\Delta\psi_m$-ra és a mitokondriális H_2O_2 termelésre, ha a mérőoldat pH = 7.0 agyi mitokondriumokban 69
5.2.3 A pH_{extra} hatása a pH_{in}-re, ΔpH-ra, a $\Delta\psi_m$-ra és a mitokondriális H_2O_2 termelésre agyi mitokondriumokban 71
5.2.4 Szervspecificitás. A nigericin hatása a pH_{in}-re, ΔpH-ra, a $\Delta\psi_m$-ra és a mitokondriális H_2O_2 termelésre izolált szív mitokondriumban 73
6. Megbeszélés 76
6.1. A metilénkék hatása a mitokondriális szubsztrát-szintű foszforilációra 76
6.1.1 A metilénkék mitokondriális célpontja 77
6.1.2 A metilénkék hatása az α-ketoglutaráttal energetizált mitokondriumokra 77
6.1.3 A metilénkék hatása az szukcináttal energetizált mitokondriumokra 78
6.1.4 A metilénkék hatása a glutamáttal energetizált mitokondriumokra 79
6.1.5 A metilénkék hatása a maláttal energetizált mitokondriumokra 79
6.1.6 A metilénkék, az oxigénfogyasztás és az ATP termelés közötti kapcsolat oligomycinnel gátolt mitokondriumban 80
6.1.7 A metilénkék jótékony hatása komplex I és az ATP-szintáz együttes gátlása esetén 81
6.2 A protonmotoros erő komponenseinek hatása a reverz elektron transzport által támogatott H_2O_2 termelésre 82

6.2.1 Nigericin 83
6.2.2 Valinomycin 83
6.2.3 Az extramitokondriális pH hatása a H_2O_2 termelésre 84
6.2.4 Hogyan befolyásolja a $\Delta\psi_m$ és ΔpH a H_2O_2 termelést? 84
6.2.5 Eredményeink jelentősége: „mild uncoupling” vagy enyhe szétkapcsolás 85
7. Következtetések 87
8. Összefoglalás 88
9. Summary 89
10. Irodalomjegyzék 90
11. Saját publikációk jegyzéke 114
12. Köszönetnyilvánítás 116

1. Rövidítések jegyzéke

α-GP: α-glicerofoszfát

α-GPDH: α-glicerofoszfát dehidrogenáz

AK: adenilát-kináz

ARE: antioxidant response element

α-KG: alfa-ketoglutarát

α-KGDH: alfa-ketoglutarát dehidrogenáz

α-KGDHc: alfa-ketoglutarát dehidrogenáz komplex

ANT: adenin nukleotid transzlokáz, ADP/ATP transzporter

AP5: P^1,P^5-Di(adenosine-5′) pentaphosphate

BCECF-AM: 2’,7’-bisz(2-karboxietil)-5,6-karboxifluoreszcein acetoxi-metilészter

BCKDH: elágazó aminosavakat lebontó 2-oxosav dehidrogenáz (branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase

BSA: marha szérum albumin (bovine serum albumine)

CI: mitokondriális komplex I, NADH-koenzim Q oxidoreduktáz

CII: mitokondriális komplex II, szukcinát dehidrogenáz

CIII: mitokondriális komplex III, koenzim Q-citokróm c reduktáz

CIV: mitokondriális komplex IV, citokróm c oxidáz

CAT: karboxiatraktilát

ΔpH: a mitokondrium belső membránjának két oldala közötti pH gradiens

$\Delta\psi_m$: membránpotenciál

EGTA: etilén-glikol- tetraecetsav

FET: forward electron flow; előre irányuló elektronáram

FCCP: karbonilcianid-p-trifluorometoxifenilhidrazin

GDH: glutamát dehidrogenáz

GSH: glutation

H_2O_2: hidrogén peroxid

HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav

Keap: Kelch-like ECH-Associating protein 1

KoA: koenzim-A

MB: metilénkék

MBH_2: leukometilénkék

MnSOD: mangán- szuperoxid diszmutáz

Nrf2: nuclear factor erythroid 2 related factor 2-antioxidant response element

OXPHOS: oxidatív foszforiláció

PDH: piruvát dehidrogenáz

pH_{extra}: extramitokondriális pH

pH_{in}: intramitokondriális pH

P_i: anorganikus foszfát

pmf: protonmotoros erő

Prx: peroxiredoxin

RET: reverz elektrontranszport

ROS: reaktív oxigénszármazék

SDH: szukcinát dehidrogenáz, komplex II

SSF: szubsztrát-szintű foszforiláció

SLP: substrate level phosphorylation

TPP^+: trifenil-foszfónium ion

TRIS: trisz(hidroximetil)-aminometán

2. Bevezetés

2.1. A mitokondriumok eredete

A mitokondriumok, a sejtjeink erőművei, külső és belső membránnal határolt sejtszervecskék. A külső membrán nagyobb molekulák számára is átjárható a porin fehérjéknek köszönhetően, míg a belső membrán kevésbé permeábilis ionok számára, transzportjukhoz specifikus transzporterekre van szükség [1]. A belső membrán jellegzetes lipid-alkotója a kardiolipin (a baktériumokhoz hasonlóan); itt helyezkedik el az energiaátalakításban szerepet játszó légzési lánc is [1]. A mitokondriumok mennyisége nagyságrendekkel különbözhet, sejttípustól függően. A nagy energiaigényű sejtekben, így agyban, szívben, májban vagy a harántcsíkolt izomban számuk elérheti a több ezret is.

A mitokondriumok felfedezése az 1800-as évek végére nyúlik vissza [2, 3]. A német Richard Altmann a sejtben található granulumokat az élet nélkülözhetetlen elemeinek tekintette, bioblasztoknak nevezte őket [4]. Úgy vélte, hogy a bioblasztok a sejt egyetlen „élő részei" és a sejten belül szoros kapcsolatban állnak egymással, részt vesznek a sejtmembrán alkotásában; amit azonban sokan kétségbe vontak. A bioblaszt, kondrioszóma, eklektoszóma, hisztomér vagy plasztoszóma szavak mögött ugyanaz a sejtszervecske, a mitokondrium áll. Ezekre a sejtszervecskékre 1897-ben Carl Benda megalkotta a mai is használt elnevezést, a mitokondriumot, amely a görög *mitos* = thread (mitos=fonalak) és a *chondrin* szóból származik (chondrin= small grain=kis granulum) [5]. 1949-ben Eugene Kennedy és Albert Lehninger bebizonyították, hogy a mitokondriumok a sejtlégzésért felelős szervecskék [2, 3]. Altmann teóriája a bioblasztokról azonban nem vált népszerűvé a későbbiekben sem. Sokan úgy vélték, hogy a mitokondriumok ősei az α-proteobaktériumok voltak, amelyeket az eukarióta sejt bekebelezett és az évmilliók folyamán a sejt és a baktérium között szoros szimbiózis alakult ki, a sejt részévé váltak. Innen származik a ma is elfogadott *endoszimbionta elmélet* a mitokondriumok eredetére vonatkozóan [3, 6]. Mi sem mutatja jobban a mitokondriumok bakteriális eredetét, mint Lynn Margulis 1970-ben napvilágot látott feltételezése, miszerint a mitokondriumok saját DNS-sel és RNS-sel rendelkező sejtszervecskék [6]. Ma már tudjuk, hogy a mitokondriumokban a baktériumokhoz hasonlóan duplaszálú cirkuláris DNS van, ami emlősökben 37 gént kódol; ebből 13

mitokondriális fehérje, 22 tRNS (transzfer=szállító RNS) és 2 mitokondriális riboszóma RNS [7, 8]. Jól mutatja a mitokondrium és a sejtmag közötti szoros kapcsolatot továbbá az is, hogy a többi mitokondriális fehérjét (30-40000) a sejtmag kódolja [3]. Vannak olyan transzkripciós faktorok (például Tfam- mitochondrial transcription factor A), amelyek a sejtmagi eredetűek, azonban jelenlétük elengedhetetlen a mitokondriális fehérjék átírásához [9].

Az utóbbi évtizedekben kiderült, hogy a mitokondriumok nemcsak az energiatermelésben töltenek be központi szerepet, hanem a Ca^{2+} háztartás szabályozásában [10-15], az apoptózisban [16, 17] és az oxidatív stressz kialakulásában szerepet játszó reaktív oxigénszármazékok (ROS) termelésében is [18, 19]. A sejtet ért oxidatív károsodás számos betegségben megjelenik és vannak olyan nézetek is, amelyek az öregedést is a fokozott ROS képződésnek [20] és mitokondriális károsodásnak [21] tulajdonítják [22, 23]. Számos neurodegeneratív betegségben [24-27], így Alzheimer- [28-30], Parkinson- [31-34] és Huntington-kórban [32, 35, 36], 2-es típusú cukorbetegségben [37-39], daganatok kialakulásában [40-42], iszkémia-reperfúzióban [43-46] bizonyított a mitokondriális károsodás. Így az utóbbi évtizedekben olyan vegyületek kutatása és előállítása, amelyek a mitokondriumokon is hatnak, rohamosan nőtt [45, 47, 48]. Munkánk során így célul tűztük ki egyrészt a mitokondriális célponttal is rendelkező vegyület, a metilénkék (MB) hatásának tanulmányozását a mitokondrium egyik ATP termelő folyamatára, a szubsztrát-szintű foszforilációra (SSF). Másrészt vizsgáltuk a légzési lánc károsodást gyakran kísérő mitokondriális ROS termelés befolyásolásának lehetőségét; ezen belül is egy speciális állapot a reverz elektron transzport (RET) által támogatott ROS protonmotoros erőtől (*pmf*) való függését.

2.2 A mitokondriumok szerepe az energiatermelésben

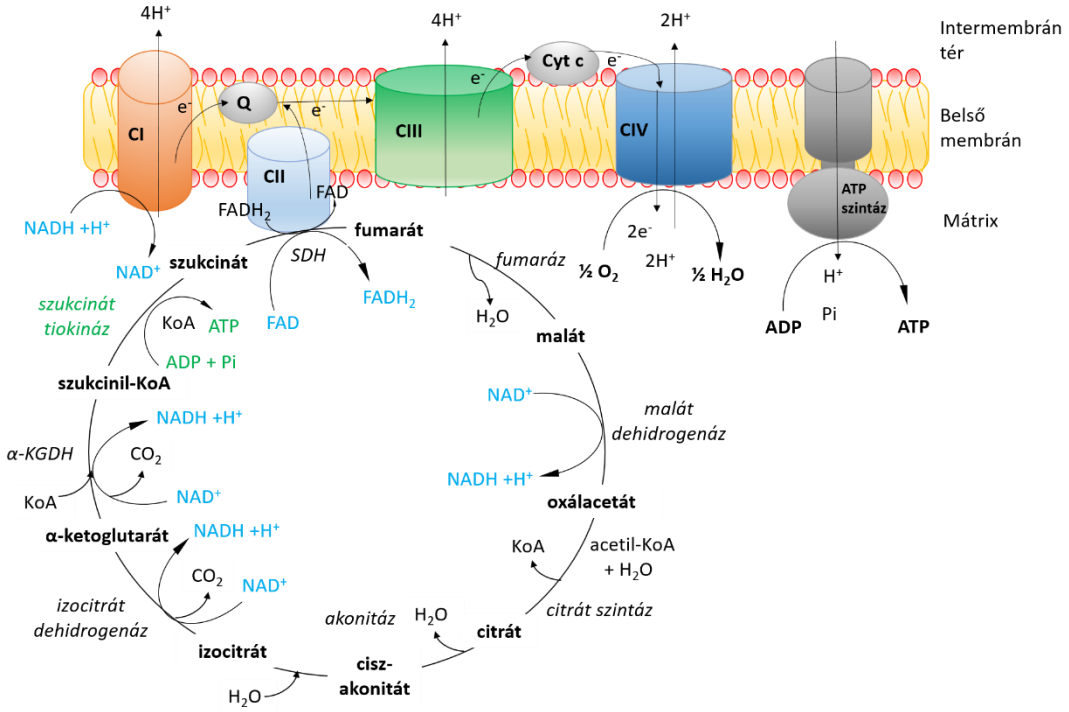
A mitokondriumok központi szerepet töltenek be az energiatermelésben. A mitokondriumokban történik a belélegzett oxigén redukciója, amely a mitokondrium belső membránjában elhelyezkedő légzési lánc révén szorosan kapcsoltan működik az ATP termeléssel. Szervezetünk az energiát a bevitt tápanyagok (főként szénhidrátok, zsírok, fehérjék) lebontásából nyeri. A *szénhidrátok*ból döntően glukóz képződik, amely a glikolízis során a citoplazmában piruváttá bomlik és NADH keletkezése mellett nettó 2

ADP molekula foszforilálódik ATP-vé. A citoplazmatikus NADH a malát-aszpartát ingán, vagy az α-glicerofoszfát dehidrogenáz (α-GPDH) ingarendszeren keresztül jut be a mitokondriumba, az oxidatív foszforiláció (OXPHOS) helyére. A glikolízis mellett egy másik jelentős energiatermelő folyamat a *zsírsavak* mitokondriális ß-oxidációja, amely során acetil-Koenzim A (acetil-KoA), NADH illetve $FADH_2$ keletkezik. Az acetil-KoA a citrátkörbe belépve alakul át, a NADH-t a komplex I (CI) oxidálja, míg a $FADH_2$ molekula az elektronjait az elektron transzfer flavoprotein komplexnek adja le, amely a koenzim Q molekulán keresztül a komplex III (CIII)-ra kerül, támogatva ezzel a légzési láncot elektronokkal (lásd később). A *ketontestek* (acetoacetát, ß-hidroxibutirát) éhezés során a májban szintetizálódnak, oxidációjuk pedig az extrahepatikus szervekben megy végbe. Lebomlásuk során a ß-hidroxibutirátból acetoacetát képződik NADH felszabadulás mellett, amely az elektrontranszportláncnak adja át az elektronokat. Az acetoacetát ezt követően szukcinil-KoA-val reagálva átalakul, végeredményként 2 mol acetil-KoA és szukcinát képződik, amelyek belépve a citrátkörbe eloxidálódnak, energiát biztosítva ezzel a szerveknek. Továbbá éhezésben a glukoplasztikus aminosavak (mint az alanin, treonin, glicin, szerin, cisztein, stb.) lebomlása során glikolitikus vagy citrátköri intermedier képződik, amelyek végül a citrátkörben oxidálódnak tovább. A gluko-és ketoplasztikus aminosavak nemcsak glikolitikus vagy citrátköri intermedierré, hanem ketontestekké is átalakulhatnak éhezésben (fenilalanin, izoleucin, tirozin, triptofán).

A glikolízis végterméke, a piruvát a mitokondriumban acetil-KoA-vá alakul át a piruvát dehidrogenáz (PDH) által katalizált reakcióban (piruvát + koenzim-A + NAD^+ → acetil-KoA + CO_2 + NADH + H^+). Az acetil-KoA a citrátkörben oxidálódik, és további három redukált NADH és egy $FADH_2$ molekula képződik a citrátköri dehidrogenázok, így az izocitrát dehidrogenáz, az α-ketoglutarát dehidrogenáz (α-KGDH), a szukcinát dehidrogenáz (SDH; FAD redukció) és a malát dehidrogenáz által katalizált reakcióban *(1. ábra).* A NADH-t a CI, míg a $FADH_2$-t a komplex II (CII) oxidálja. Az elektronok ezt követően a CI-en vagy CII-n keresztül a lánc lipidoldékony elektronszállító molekulájára a koenzim Q-ra (vagy más néven ubikinon) kerülnek, amely a CIII felé szállítja az elektronokat. A CIII és a komplex IV (CIV) között az elektronok transzportját a belső

membrán külső részén elhelyezkedő citokróm c végzi. Az elektronok a CIV-en keresztül a lánc végső elemére az oxigénre (O_2) kerülnek azt vízzé redukálva.

A légzési lánc komplexei a redoxpotenciáljuknak megfelelően növekvő sorrendben helyezkednek el, így az elektronok áramlása közben energia szabadul fel. Ez az energia fedezi a protonok mitokondriális mátrixból az intermembrán térbe történő kipumpálását. A CI és CIII egy NADH + H^+ oxidációja során 4-4 proton kipumpálására képesek, míg a CIV 2 protont távolít el a mitokondriális mátrixból. A CII nem képes protonok kipumpálásra, következésképpen, egy NADH molekula oxidációja során 10 proton, míg egy $FADH_2$ oxidációja során (a CII oxidálja) 6 proton kerül ki az intermembrán térbe. Ennek következtében a belső membrán két oldala között proton koncentrációkülönbség és ennek megfelelően pH-különbség alakul ki.



1. ábra: A légzési lánc és a citrátkör felépítése és működése. Rövidítések: α-KGDH: α-ketoglutarát dehidrogenáz, Cyt c: citokróm c, KoA: koenzim A, CI: komplex I, CII: komplex II, CIII: komplex III, CIV: komplex IV, Pi: anorganikus foszfát. SDH: szukcinát dehidrogenáz = CII, Q: kinol, ubikinol, koenzim Q. A citrátkör részét képező enzimek

nevét dőlt betűvel tüntettem fel. Zöld színnel jelöltem a citrátkörben a szubsztrát-szintű foszforilációt, amit a szukcinil-tiokináz katalizál.

Az ionok töltése következtében az intermembrán tér pozitívabb töltésű és alacsonyabb pH-jú lesz, mint a mátrix, tehát elektromos potenciálkülönbség is létrejön. Az így kialakuló elektrokémiai potenciálkülönbség a protonmotoros erő (*pmf*) biztosítja az ATP szintézishez szükséges energiát. Ezek a fentebb említett folyamatok adják a vázát a kemiozmotikus elméletnek [49, 50], melyért 1978-ben Peter D. Mitchell brit kémikus kémiai Nobel-díjat kapott. Mitchell felfedezései a következő 4 posztulátumban foglalhatók össze [50]:

1. A belső membránban elhelyezkedő ATP-szintáz katalizálja az ADP foszforilációját, amelyhez szükséges a protonok intermembrán térből a mitokondriális mátrixba történő szállítása.
2. A mitokondrium belső membránjában helyezkednek el az elektrontranszportlánc enzimkomplexei, amelyek biztosítják, hogy az elektronok áramlása és a protonok a mátrixból az intermembrán térbe történő transzlokációja egymással kapcsoltan működjön.
3. Az elektrontranszportláncban olyan transzportrendszer helyezkedik el, amely lehetővé teszi a OH^- áramlását az anionokkal szemben és a H^+ transzportját a kationokkal szemben. Így az elektrontranszportlánc normál működése során a belső membrán két oldala között

protongrádiens alakul ki, amely pH-különbség és potenciálkülönbség kialakulásához vezet.

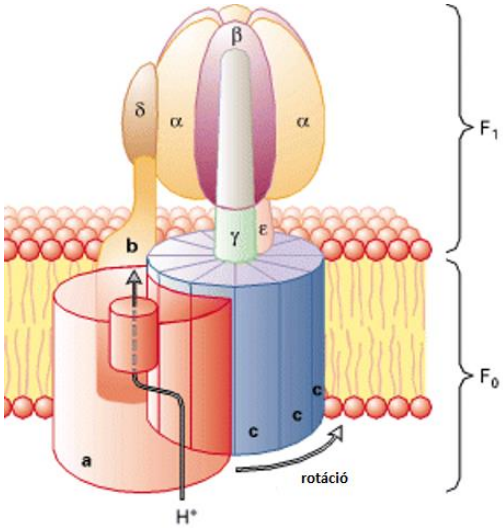
4. Az 1., 2. és 3. posztulátum olyan rendszerekre igaz, amelyek intakt membránnal rendelkeznek, és alacsony a membrán áteresztőképességük protonokra, kationokra és anionokra nézve.

Kloroplasztokban a *pmf* jórészt csak a ΔpH-ból áll, míg ezzel szemben a mitokondriumokban a mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\psi_m$) a domináns komponens [1, 51]. A *pmf*-t a következőképpen lehet kiszámítani [1]:

$$\Delta\mu_{H+}=\Delta\psi_m+\frac{2.3RT}{F}\Delta pH$$

$\Delta\mu_{H+}$= *pmf*, R= egyetemes gázállandó (8,314 J/mol·K), F= Faraday állandó (96485,3399 C/mol), T= abszolút hőmérséklet.

Az intermembrán térből a protonok az ATP-szintáz protoncsatornáján keresztül visszajutnak a mátrixba. Az ATP-szintáz az F_1 katalitikus és F_o motoros alegységből épül fel *(2. ábra)*.



2. ábra: Az ATP-szintáz felépítése emlősökben (forrás: http://www.cella.cn/book/07/01.htm) F_o: motoros alegység, amely részei az *a* alegység a félprotoncsatornával, 8 darab alegységből felépülő *c* alegység. F_1: katalitikus alegység, amely részei: $\alpha_3 ß_3 \gamma_1 \varepsilon_1$ alegység. γ: perifériás alegység vagy szár. Az F_1 alegység a mátrix felé néz.

A perifériás alegység vagy szár (γ) köti össze a F_1 és F_o alegységet egymással. A F_o domén az ún. félprotoncsatornát alkotó *a* alegységből és *c* gyűrűből épül fel. Emlősökben 8 proton szükséges ahhoz, hogy az ATP-szintáz F_o alegységének *c* gyűrűje 360°-os fordulatot tegyen és mozgásba hozza a katalitikus alegységet (F_1), ahol megtörténik az ATP szintézise [52]. 8 proton átáramlása során 3 mol ATP keletkezik, így egy NADH molekula oxidációja ~3 mol, egy $FADH_2$ molekula pedig ~2 mol ATP szintézisét fedezi. A mitokondriumban keletkezett ATP és a szintézishez szükséges ADP szállítása a belső membránban elhelyezkedő adenin nukleotid transzlokáz (ANT) cseretranszporteren keresztül történik. Fiziológiás pH-értéken az ATP^{-4}, míg az ADP^{-3} töltéssel rendelkezik és 1 H^+ közreműködése szükséges a transzporthoz, amely a $\Delta\psi_m$ terhére megy végbe, azaz cserénként egy negatív töltéssel csökken a $\Delta\psi_m$. Később még említésre kerül, de itt is érdemes megjegyezni, hogy bizonyos mátrix ADP és ATP koncentráció mellett,

valamint kellően alacsony $\Delta\psi_m$ esetén, az ATP-szintáz és az ANT is képes fordított irányban működni (2.4 fejezet).

2.3. A mitokondriális ATP termelő folyamatok

A mitokondriumokat méltón hívják a sejtek energiatermelő szerveinek [53], hiszen három helyen is történhet ATP termelés. Ezek közül a legnagyobb jelentőséggel - a fent leírt- OXPHOS bír, amely a Peter Mitchell által 1961-ben leírt kemiozmotikus teória értelmében kapcsoltan működik a terminális oxidációval [49].

Jelentős mennyiségű ATP keletkezhet továbbá a mitokondriumban található adenilát-kináz (AK) izoenzimek által katalizált reakcióban (2 ADP (GDP) ←→ AMP (GMP) + ATP (GTP)). Egy 2014-ben megjelent összefoglaló cikk 9 AK izoformát sorol fel [54], amelyek lokalizációban, molekulatömegben, kinetikai tulajdonságaikban, szöveti eloszlásban és szubsztrát specificitásban térnek el egymástól. Az AK2 izoforma a mitokondrium belső membrán külső részén helyezkedik el, az AK3 és AK4 a mitokondrium mátrixában foglalnak helyet [54-56].

A harmadik mitokondriális energiatermelő folyamat a szubsztrát-szintű foszforiláció (SSF) [57], amely a citrátkör részét képezi. A reakciót a szukcinát-tiokináz (vagy szukcinil-KoA-ligáz) enzim katalizálja, amelynek két izoformája létezik [58]: az ATP-t termelő izoenzim: szukcinil-KoA + ADP + Pi (foszfát) → szukcinát + KoA + ATP (EC: 6.2.1.5), illetve a GTP-t termelő enzim: szukcinil-KoA + GDP + Pi (foszfát) → szukcinát + GTP + KoA (EC: 6.2.1.4). A SSF során az ATP a légzési lánctól és a *pmf*-től függetlenül keletkezik [57]. Így jelentősége kiemelkedő légzési lánc károsodással járó patológiás állapotokban [59, 60], illetve anoxiában azaz oxigén hiányos állapotokban [61]. Fiziológiás körülmények között a *barna zsírszövetben* a SSF során keletkezett ATP-nek például fontos szerepe van a hőtermelésben [62, 63]. A folyamatban a termogenin nevű fehérje szétkapcsolja egymástól az OXPHOS-t a terminális oxidációtól, így az OXPHOS csökken, az energia hőtermelésre fordítódik.

2.4. A mitokondriális szubsztrát-szintű foszforiláció jelentősége

Az utóbbi évtizedben a mitokondriális SSF egyre nagyobb szerepet kapott, ugyanis légzési lánc károsodás során képes a $\Delta\psi_m$ megtartására. Így megakadályozva a

citoszolikus ATP mitokondriális felhasználását az ANT fordított irányú működésének gátlásával [60, 64]. Hogyan történik mindez? Régóta tudott tény, hogy a mitokondriumok nemcsak ATP szintézisére képesek, hanem az ATP hidrolizálására is [59, 64-66]. A hidrolízis esetén a mitokondrium a glikolízis során keletkezett citoszolikus ATP-t használja fel a $\Delta\psi_m$ megtartása érdekében, ami a citoszolikus ATP-szint nagymértékű csökkenéséhez vezethet. Logikusan az ATP mitokondriális lebontása csak akkor mehetne végbe, ha az ANT és ATP-szintáz is megfordultak [59]. Azt a $\Delta\psi_m$ értéket, amikor az ATP-szintáz vagy ANT megfordul, reverz potenciálnak nevezzük. Az ANT és ATP-szintáz fordított irányú működését egyrészt a $\Delta\psi_m$, másrészt a mitokondriális ATP/ADP arány szabja meg [59]. De ezen kívül az ATP-szintáz és az ANT irányultságára számos tényező hatással lehet, ilyen például a citoszolikus ATP és ADP koncentráció, kis mértékben az intramitokondriális pH (pH_{in}), az extramitokondriális (pH_{extra}), vagy az anorganikus foszfát (Pi) és a magnézium koncentráció is befolyásolhatja. Az ATP-szintáz és az ANT egymástól függetlenül, nem egyszerre fordulnak meg. Légzési lánc károsodás során a $\Delta\psi_m$ csökken, ami először az ATP-szintáz megfordulását vonja maga után. Ha a $\Delta\psi_m$ tovább csökken, akkor értéke eléri azt a $\Delta\psi_m$-értéket, amikor az ANT is megfordul. Ennek következtében a citoszolikus ATP bejut a mitokondrium mátrixába, miközben az ADP kifelé áramlik és az ATP-t az ATP-szintáz elkezdi hidrolizálni. (Olyan állapot sosem fordulhat elő, amikor az ANT fordítva működik és az ATP-szintáz normál módon.) Lényegében háromféle állapotról beszélhetünk: A) ATP-szintáz és ANT normál módon működik; B) ATP-szintáz fordított módon, míg az ANT normál módon funkcionál és C) az ATP-szintáz és az ANT is fordított módon látja el a funkcióját [59]. Azonban légzési lánc károsodás során, amikor még csak az ATP-szintáz működik fordítottan, a mitokondriális mátrixban a SSF révén keletkezhet elegendő mennyiségű ATP, ami megakadályozhatja az ANT megfordulását a $\Delta\psi_m$ megtartásával, ezzel a citoszolikus ATP mitokondriális felhasználást [67]. Kiss és munkatársai α-KGDH mutáns egereken végzett vizsgálataikkal bizonyították, hogy a neurodegeneratív betegségekben előforduló α-KGDH mutáció esetén kevesebb szukcinil-KoA képződik. (Az enzim a következő reakciót katalizálja: α-KG + KoA + NAD^+ → szukcinil-KoA + CO_2 + NADH + H^+.) Ennek következtében a citrátkör következő lépésében a SSF-t katalizáló szukcinát-tiokináz számára nem áll elegendő szubsztrát (szukcinil-KoA) rendelkezésre, így a SSF is csökken. Kísérleteik során az α-KGDH mutáns egerek májából és agyából izolált

mitokondriumokból csökkent ATP kiáramlást és fokozott citoszolikus ATP felhasználást detektáltak a vad típusú mitokondriumokhoz képest. Ezek a kísérletek arra utalnak, hogy mind az ANT, mind az ATP-szintáz fordított módon működött, és α-KGDH károsodás során az egyik mentő ATP termelő folyamat kiesik. Vizsgálataik jól mutatják a SSF jelentőségét légzési lánc vagy citrátköri enzimdefektus esetén.

2.5. A metilénkék mitokondriális hatásai - régi gyógyszer, új indikáció

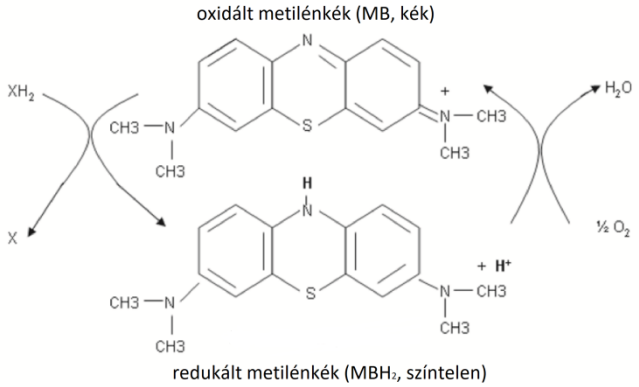
2.5.1. Történelmi áttekintés

A metilénkéket (MB) a 19. század végén állították elő [68, 69], amelyet kezdetben textilipari festékként alkalmaztak, később pedig mikroorganizmusok megfestésére használták [69]. *Paul Ehrlich* és *Guttman* először 1891-ben alkalmazta malária kezelésében abból a tulajdonságából kiindulva, hogy a mikroorganizmusokba bejutva, nemcsak megfesti azokat, hanem károsíthatja is [70, 71]. Azóta felismerték, hogy a MB a malária terjesztéséért felelős egyik protozoon faj, a *Plasmodium falciparum* glutation-reduktázát szelektíven gátolja, ezzel csökkentve az oxidatív stressz elleni védelmet, ami a sejt pusztulásához vezet [72, 73]. A MB elsődleges antimaláriás szernek számított a II. világháború végéig [73]. Azonban használata során a vizelet és a sclera elszíneződött, így használata visszaszorult. Közben az 1920-as években felismerték, hogy a cianid mérgezés során kialakuló károsodás a MB-kel kivédhető [74]. Az 1900-as évek második felében a fenotiazinváz nitrogénatomjának alifás oldalláncának módosításával hozták létre az első antidepresszáns vegyületet, amely a klórpromazin nevet kapta [75, 76]. Emellett sikeresen alkalmazták methemoglobinémia [77], ifoszfamid (Holoxan)-indukálta enkefalopátia [78] és szeptikus sokk kezelésében is [79]. Az utóbbi évtizedben egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak neuroprotektív hatásának Alzheimer- és Parkinson-kór modellekben [80-83], illetve memóriaserkentő és öregedést lassító tulajdonságának is [82]. Ma a MB-t a methemoglobinémia gyógyításában világszerte sikerrel alkalmazzák [84]. A methemoglobinémia során a hemoglobin Fe^{2+} ionjai Fe^{3+} ionokká oxidálódnak methemoglobint eredményezve, ami együtt jár az oxigénszállító kapacitás csökkenésével. MB hatására a NADPH-függő methemoglobin reduktáz a MB-t MBH_2-vé redukálja; a keletkezett MBH_2 pedig leadja az elektronokat a methemoglobinnak hemoglobint eredményezve [85]. Hazánkban forgalmazott készítmény: METILÉNKÉK Pharmamagist

1%-os oldatos injekció [86]. Az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer Ellenőrző Hatóság (U.S. Food and Drug Agency) által engedélyezett készítmény: PROVAYBLUE™ [87].

3. ábra: A metilénkék oxidált (MB) és redukált (MBH_2) formájának képlete. Forrás: [88].

A MB kiváló redox indikátor: a MB kék színét a glukóz egy levegőtől elzárt pohárban



képes elszínteleníteni, majd a poharat kinyitva az oldat a levegő oxigénjével érintkezve ismét kék színű lesz ("blue bottle experiment") [73]. Ezen tulajdonsága miatt még ma is használják a MB-t a redukáló mikroorganizmusok (tejsavas baktériumok) kimutatására, illetve mikróba metabolizmus termékek (tejsav, borostyánkősav) meghatározására.

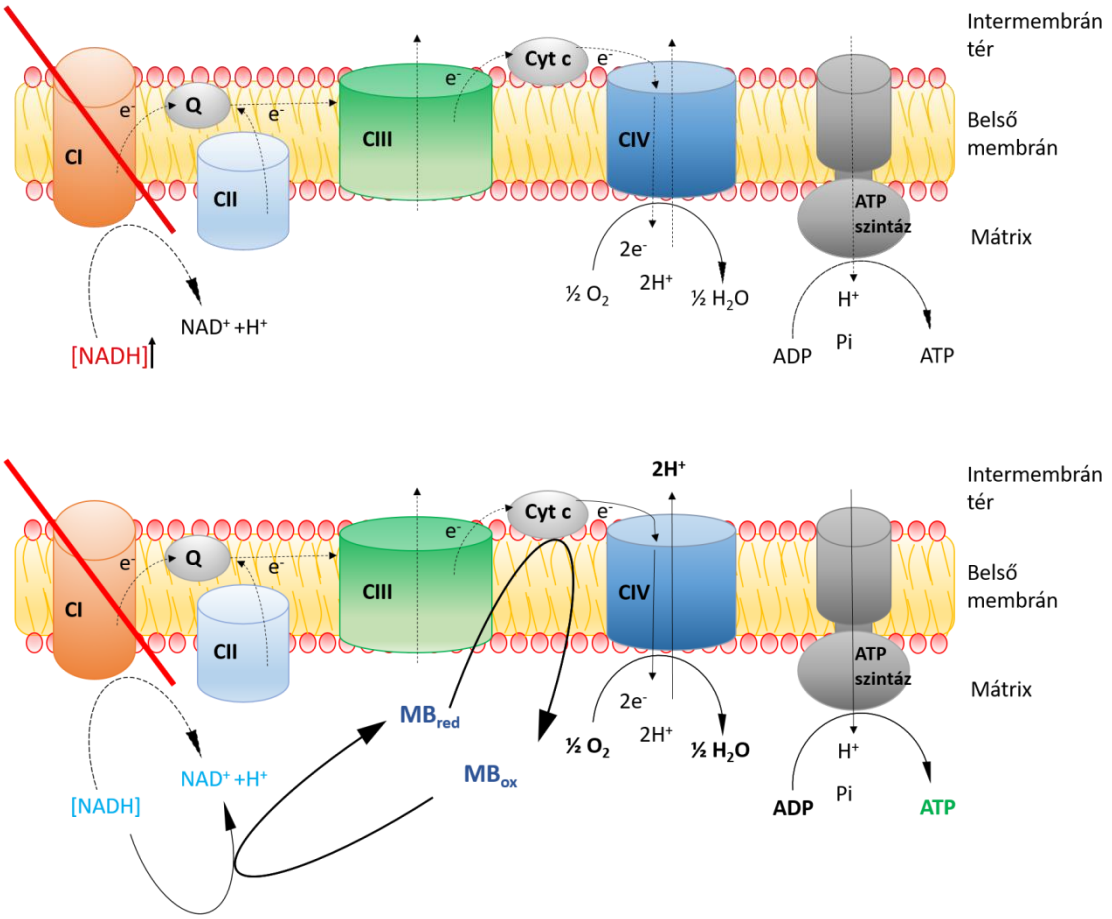
2.5.2. A metilénkék főbb tulajdonságai

A MB vagy más néven tetrametiltioninium-klorid ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) heteroaromás fenotiazinszármazék *(3. ábra)*. Oxidált formája (metilénkék; MB) kék színű, ami azzal magyarázható, hogy a molekula 600-700 nm-en a látható fényt elnyeli és 350-600 nm-en átengedi a fényt. Redukált formája (leukometilénkék; MBH_2) azonban színtelen, nem nyeli el a fényt a látható hullámhossztartományban [89]. Alacsony redoxpotenciáljának köszönhetően (~ 10 mV) oxidált és redukált formája a szervezetben egy reverzibilis oxido-redukciós párt alkot és elektron felvételével képes redukálódni, majd azt leadva különféle molekuláknak, oxidálódni. A MB „hormetikus" hatása is oxidoredukciós tulajdonságával magyarázható [88]. A hormézis (hormein görögül: mozgásba hoz, serkent) során egy bizonyos szintig emelve a MB koncentrációját a biológiai hatás lineárisan fokozódik, majd a dózis további emelésével a biológiai hatás csökken, egy bizonyos ponton túl már káros, gátló [90]. Példának okáért a mitokondriumba bejutva alacsony koncentrációban (<2 μM) egy alternatív elektrontranszport biztosítása révén a NADH és $FADH_2$ molekuláról átveszi az elektronokat és az elektronszállító molekulára, a citokróm c-re szállítja. Míg magasabb koncentrációban aggregátumokat képezve a

légzési lánc komplexeitől elektronokat vesz el, ezzel csökkentve azok aktivitását [88]. A MB „hormetikus” hatása mind viselkedés vizsgálatokban, mind pszichológiai teszteknél, mind pedig más biokémiai hatásban megmutatkozott [82, 88, 91].
Heterociklusos gyűrűrendszerének köszönhetően erősen lipofil vegyület, amely könnyen jut át a biológiai membránokon [92]. A hatás kialakulásának feltétele a molekula sejtekbe vagy sejtorganellumokba történő bejutása; hatását nem receptorokhoz kötve fejti ki [93]. A MB fényérzekenyítő hatása miatt alkalmazzák rák terápiájában is, illetve fény hatására növekszik antifungális és antibakteriális hatása is [94]. Képes különféle fényforrásokból energiát felvenni és ezt az energiát átadja a molekuláris O_2-nek létrehozva a szinglet oxigént ($^1O_2$). A szinglet oxigén elektrofil molekula, amely oxidálja a különböző makromolekulák (nukleotidok, lipidek) és biológiai membránok nagy elektronsűrűségű kettős kötéseit. Így megnövelve a lipidperoxidációt és csökkentve a membránintegritást, ami a membrán fluiditásának és különféle ioncsatornák, transzporterek funkciójának elvesztéséhez vezethet [95].

2.5.3. A metilénkék mitokondriális hatásai

A MB egy ún. alternatív elektrontranszport révén az elektronokat a NADH-ról [81] és a $FADH_2$-ről [96] a citokróm c-re [97, 98] szállítja a légzési lánc károsodása esetén [93, 98] *(4.ábra).* A NAD^+/NADH redoxpotenciálja -320 mV [99, 100], míg a FAD^+/$FADH_2$ [100] redox párnak -220 mV (szabad koenzimként és -40 mV flavoproteinek alkotójaként), így negatívabb standard redoxpotenciáljuk miatt át tudják adni az elektront a MB-nek, amely standard redoxpotenciálja +10 mV [101]. A CI, CII és CIII gátlás során az elektronok nem tudnak tovább áramlani a légzési láncban, a NADH-t a CI, míg a $FADH_2$-t a CII nem tudja oxidálni, így a redukáló ekvivalensek felhalmozódnak.



4. ábra: A metilénkék hatása a terminális oxidációra és az oxidatív foszforilációra komplex I gátlás esetén. Felső ábra a komplex I gátlószer jelenlétében kialakuló energiadeficitet és mitokondriális károsodást mutatja. Alsó ábra komplex I gátlás esetén a metilénkék jótékony hatását ábrázolja. Rövidítések: Cyt c: citokróm c, CI: komplex I, CII: komplex II, CIII: komplex III, CIV: komplex IV, Q: koenzim Q, ubikinol, kinol, MB_{red}: redukált metilénkék, leukometilénkék, MB_{ox}: oxidált metilénkék.

Következményesen csökken az ATP termelés és a mitokondriális oxigénfogyasztás. A felhalmozódott NADH gátolja a citrátkör sebesség-meghatározó lépését katalizáló enzimet, az α-KGDH-t, ami citrátkör lassulásához vezet. A MB azonban oxidálja a NADH-t és a $FADH_2$-t, az elektronokat MBH_2-ként a citokróm c-re szállítja. Az elektronok a CIV keresztül a molekuláris oxigénre kerülnek és redukálják azt. Így a MB fokozza a mitokondriális oxidációt és az ATP termelést NADH-függő (glutamát és malát) és $FADH_2$-függő szubsztrátok jelenlétében CI, CII, CIII gátlása esetén. Ugyanilyen körülmények között a MB helyreállítja a $\Delta\psi_m$-t és növeli a mitokondriumok kalcium

retenciós kapacitását [98]. A NAD^+/NADH arány növekedése pedig az α-KGDH-t és a citrátkört felszabadítja a gátlás alól. A MB további mitokondriális hatásai:

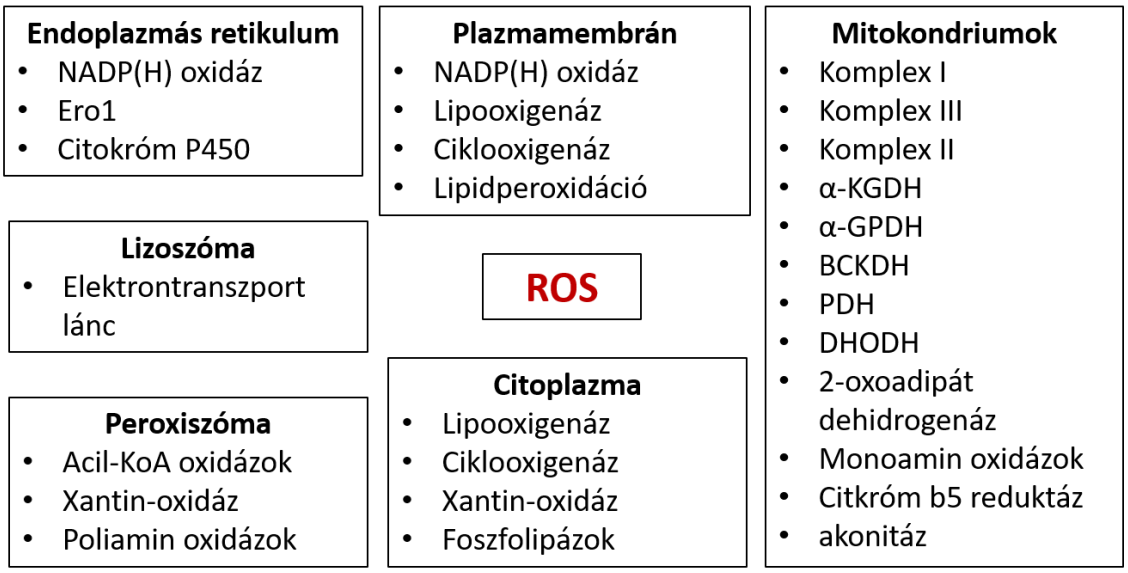
1. A MB fokozza a mitokondriális hem szintézist a vasionok felvételének elősegítésével [82], a vas a hem porfiringyűrűjének közepén helyezkedik el Fe^{2+} formában.
2. A MB fokozza a CIV vagy más néven citokróm c oxidáz aktivitását [82, 91, 102]. A CIV egy hemet tartalmazó enzim, így a MB képes a hem szintézis elősegítése révén fokozni a CIV aktivitását [82]. Ennek nagy jelentősége van például Alzheimer-kórban, amikor az amiloid ß-fehérje aggregátumok a CIV hem csoportjához kötődnek [83, 103]. Emellett az amiloid ß-fehérjék kötődnek citrátköri enzimekhez [28], így nem keletkezik elegendő mennyiségű szukcinil-KoA a hem szintézishez. A folyamat során a CIV aktivitása csökken, ami mitokondriális diszfunkcióhoz és csökkent energiatermeléshez vezet.

2.6 A mitokondriális reaktív oxigénszármazékok

A reaktív oxigénszármazékok (röviden: ROS) oxigén tartalmú reaktív vegyületek, amelyek az oxigén természetes metabolizmusa során keletkeznek a szervezetben. A légzési láncban normál körülmények között az O_2 4 elektron felvételével vízzé alakul a CIV által katalizált reakcióban. Azonban előfordulhatnak olyan állapotok, amikor az O_2 redukciója tökéletlen. Oxigénből (O_2) egy elektron redukciójával szuperoxid képződik ($O_2^{\cdot-}$), amely viszonylag stabil vegyület, spontán vagy a mitokondriális mangán-szuperoxid-diszmutáz vagy a citoszolikus zink-szuperoxid diszmutáz által katalizált reakcióban átalakul hidrogén peroxiddá (H_2O_2) [104]. A H_2O_2 a következő reakciókban alakulhat tovább: 1) $H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^- + {}^{\cdot}OH$ (hidroxilgyök; ez a folyamat mehet végbe a Haber-Weiss reakció során- lásd alább; 2) $2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$, amelyet a kataláz enzim katalizál [105]. A ${}^{\cdot}OH$ a legerősebb természetben előforduló reaktív vegyület, amely keletkezését például vasionok is katalizálhatják a Haber-Weiss-reakcióban: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\cdot}OH + OH^-$ [106], majd még egy H_2O_2 molekulával reagálva: $Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + HOO^{\cdot}$ (hidroperoxil gyök) + H^+ [107], amit Fenton-reakciónak is hívnak. A $HOO^{\cdot}$ a $O_2^{\cdot-}$ protonált formája: $O_2^{\cdot-} + H_2O \rightarrow HOO^{\cdot} + OH^-$, amely erős prooxidáns hatással rendelkezik, így fontos szerepe van a lipidperoxidációban [108]. A $O_2^{\cdot-}$ azonban reagálhat nitrogén tartalmú vegyületekkel, például nitrogén oxiddal peroxinitritet ($ONOO^-$)

eredményezve, amely igencsak reaktív vegyületnek számít [109]. Jelen disszertációban nem térek ki a reaktív nitrogénszármazékok tárgyalására.

A sejten belül számos ROS termelő sejtszervecskét tartanak számon [110] *(5. ábra)*. Először az 1970-es években írták le az izolált mitokondriumok ROS-képző tulajdonságát [18, 111]. Azóta számos betegségben figyeltek meg fokozott ROS képződést és bizonyították be a ROS szignalizációban betöltött fontos szerepét[112].



5. ábra: A reaktív oxigénszármazékok lehetséges celluláris forrásai Görlach és mtsai 2015-ös illetve Andreyev és mtsai 2005-ös, valamint Brand M.D. 2016-os összefoglaló cikkei alapján. Rövidítések: α-KGDH: α-ketoglutarát dehidrogenáz, α-GPDH: α-glicerofoszfát dehidrogenáz, BCKDH: elágazó szénláncú 2-oxosav dehidrogenáz, DHODH: dihidroorotát dehidrogenáz, PDH: piruvát dehidrogenáz.
Források: [19, 110, 112]

Az aerob szervezet nem tud O_2 nélkül működni, azonban az O_2 erős elektron felvevő képessége miatt, ahogy már az előző bekezdésben kifejtettem, a ROS keletkezése elkerülhetetlen [113]. A ROS-ok keletkezésének és hatásaiknak csökkentésére megfelelő elimináló, antioxidáns rendszer is létezik. Normál körülmények között a ROS képző és ROS elimináló rendszerek között steady-state állapot áll fenn, tehát a képződés és elimináció egymással egyensúlyban vannak. Ha az egyensúly a ROS képződés növekedésének vagy a ROS eltávolítás csökkenésének irányába eltolódik, oxidatív stresszről beszélünk [112, 114]. A mitokondriális ROS termelő helyek definiálása és az

elimináló rendszer tagjainak ismerete adhat képet arról, hogy mi áll az oxidatív stressz hátterében. A ROS-szint megemelkedése maga után vonja számos makromolekula (DNS, proteinek) és membrán károsodását (lipidperoxidáció), ami patológiás állapotok kialakulásához vezet. Izolált mitokondriumon a ROS termelést elsősorban a szubsztrát koncentrációja és az ATP szükséglet szabja meg [112]. Irodalmi adatok alapján a mitokondriális légzés 1-2%-a fordítódik ROS termelésre [115]. Azonban ez nem tekinthető univerzálisnak. Goncalves és mtsai azt mérték, hogy vázizomban nyugalmi állapotban a légzés 0.1-0.5%-a, míg izommunka során kevesebb, 0.01-0.03%-a fordítódik ROS szintézisre [116].

2.7 A mitokondriális ROS forrásai

Számos betegség velejárója, vagy kiváltója a mitokondriumok diszfunkciója, ami sok esetben – főleg légzési lánc gátlás esetén – következményesen fokozott ROS képződéshez vezethet. A kialakuló oxidatív stressz pedig a citrátkör enzimeinek [117, 118] és a légzési lánc kompleinek ROS-érzékenysége miatt további mitokondriális károsodáshoz vezet [119]. A mitokondriumban a legfrissebb összefoglalók szerint 13 ROS termelő helyet különítenek el, amelyek vagy a mitokondriális mátrix felé, vagy az intermembrán tér felé vagy mindkét térbe szintetizálnak ROS-t [112]. A továbbiakban szeretném ismertetni a mitokondriális ROS legfőbb forrásait Andreyev és mtsai 2005-ben [19] és Brand M.D. 2016-ban [112] megjelent összefoglaló cikkeit alapul véve.

a. akonitáz (EC: 4.2.1.3): Az akonitáz a citrátköri citrát→izocitrát átalakulást katalizáló enzim, amelyről kimutatták, hogy a citrátköri enzimek közül a legérzékenyebb H_2O_2-re [118]. Azonban az enzim maga is képes ROS-indukálta ROS termelésre. A $O_2^{\cdot-}$ oxidálja az akonitáz [4Fe-4S](2+) centrumát, ami az enzim inaktiválódásához vezet. Az oxidáció során [3Fe-4S](+) jön létre Fe^{2+} és H_2O_2 keletkezése mellett, amelyek a Fenton-reakcióban egymással reagálva Fe^{3+} + $^{\cdot}OH$ + OH^- képződéséhez vezetnek. Így elmondható, hogy az akonitáz $O_2^{\cdot-}$ által történő inaktivációja közvetlenül H_2O_2, közvetetten pedig $^{\cdot}OH$ képződéséhez vezet, ami a molekuláris O_2-nel reagálva $O_2^{\cdot-}$-t eredményez [120].

b. 2-oxosav dehidrogenáz enzimcsalád

A 2-oxosav dehidrogenáz típusú enzimek csoportjába négy enzim tartozik: 1) α-KGDH, 2.) PDH, 3.) 2-oxoadipát dehidrogenáz és 4.) az elágazó szénláncú aminosavak lebontását katalizáló 2-oxosav dehidrogenáz.

α-KGDH komplex (EC 1.2.4.2): A 2000-es években írták le, hogy a citrátkör sebesség-meghatározó lépését katalizáló enzim, az α-KGDH, amely α-KG + NAD^+ + KoA → szukcinil-KoA + NADH + H^+ + CO_2 átalakulást katalizálja, ROS termelő tulajdonsággal rendelkezik [121, 122]. Az enzimkomplex három enzimből épül fel: E1= α-ketoglutarát-dehidrogenáz, E2= dihidrolipoamind-szukciniltranszferáz, E3= lipoamid-dehidrogenáz vagy dihidrolipoamid-dehidrogenáz [123]. A flavin-tartalmú E3 alegységnek tulajdonítják a fokozott $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ termelődést, ami NAD^+ hiányában figyelhető meg [121]. NAD^+ koncentrációjának emelésével az α-KGDH ROS termelése csökken és a katalitikus aktivitása kerül előtérbe; míg NADH jelenlétében fokozódik a ROS képződés. Tehát az enzim ROS termelését a NADH/NAD^+ arány szabja meg, amire hatással van a citrátkör működése is. Így például légzési lánc károsodás során a NADH oxidáció zavart szenved, felhalmozódva pedig a citrátkör reakcióinak lassulását és az α-KGDH fokozott $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ termelését vonja maga után. Ugyanis a flavincsoport redoxpotenciálja (-280 mV) elegendően negatív ahhoz, hogy az elektronok nagy eséllyel redukálják a molekuláris oxigént [124]. Alzheimer- vagy Parkinson-kórban szenvedő betegek agyából *post mortem* csökkent α-KGDH aktivitást mértek, ami hozzájárulhat az enzim H_2O_2 termelésének növekedéséhez a katalitikus aktivitás kárára [125].

piruvát dehidrogenáz (PDH; EC 1.2.4.1): A PDH a mitokondrium mátrixában lokalizálódó enzim, amely a piruvát + NAD^+ + KoA →acetil-KoA + NADH + H^+ irreverzibilis átalakulását katalizálja. A keletkező acetil-KoA a citrátkörben alakul tovább oxálacetáttal kondenzálódva; ezzel lehetővé téve a glikolízis és a citrátkör összekapcsolását. Az enzim az α-KGDH-hoz hasonlóan 3 enzimből áll: E1= piruvát dehidrogenáz, E2= dihidrolipoil-transzacetiláz és E3 = dihidrolipoil-dehidrogenáz. Az E3 alegység azonos az α-KGDH E3 alegységével, így itt is feltételezhető a PDH E3 alegységének fokozott ROS termelése magas NADH/NAD^+ arány mellett, hasonlóan α-KGHD-nél leírtakhoz [122, 126].

2-oxoadipát dehidrogenáz (EC 1.1.1.172): A 2-oxoadipát dehidrogenáz a mitokondriális mátrixban és a sejtmagban helyezkedik el [127]. Az esszenciális aminosavak, így a triptofán, a hidroxilizin és a lizin lebontásában játszik szerepet, amelyek bomlási termékeként 2-oxoadipát keletkezik. A reakció a következőképpen játszódik le: 2-oxoadipát + NAD^+ + KoA= glutaril-KoA + NADH + H^++ CO_2. A folyamat során keletkező NADH visszaoxidálását a CI végzi. A többi 2-oxosav dehidrogenáz enzimhez hasonlóan E3 alegység felelős a ROS képződésért, elsősorban az ott található flavin-oldallánc [128]. Az ebbe a csoportba tartozó enzimek közül rotenon jelenlétében, az 2-oxoadipát dehidrogenáz képes a legnagyobb mértékű ROS termelésre [129, 130].

elágazó aminosavakat lebontó 2-oxosav dehidrogenáz (branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase; BCKDH; EC 1.2.4.4.): Az enzim az elágazó szénláncú aminosavak, tehát a leucin, izoleucin és valin katabolizmusában játszik szerepet; a mitokondrium belső membránjában helyezkedik el [131]. Bomlástermékeiket a BCKDH oxidálja tovább NADH és a megfelelő acil-KoA képződése mellett. A ROS képződés mechanizmusa az előző pontnál leírtakkal megegyezik; magas NADH/NAD^+ arány esetén fokozott [129].

c. dihidroorotát dehidrogenáz (EC 1.3.3.1 vagy 1.3.99.11): Az enzim a mitokondrium belső membránjának külső részén helyezkedik el, a dihidroorotát → orotát átalakulást katalizálja, ami a pirimidin nukleotidok szintézisében játszik fő szerepet. Az elektron akceptor a légzési lánc részét képező koenzim Q (ubikinon). Megfigyelések alapján az enzim *in vitro* koenzim Q nélkül, redukált formában képes H_2O_2 termelésre [132].

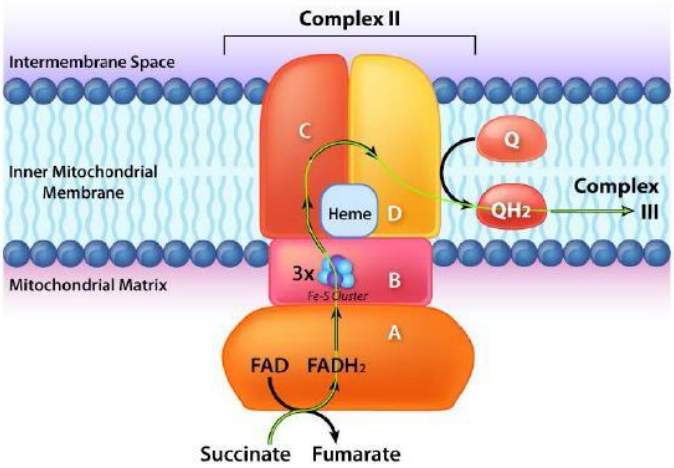
d. α-glicerofoszfát dehidrogenáz (EC 1.1.99.5): Az α-GPDH szintén a mitokondrium belső membránjának külső részén elhelyezkedő, FAD^+ prosztetikus csoporttal rendelkező enzim, ami egyben az α-glicerofoszfát (α-GP) inga részét képezi. A glicerol-3-foszfát → dihidroxiaceton-foszfát átalakulást katalizálja, miközben a FAD^+ redukálódik, majd onnan az elektronok a koenzim Q molekulára kerülnek. A α-GP-tal lélegeztetett izolált mitokondriumok fokozott ROS képzését figyelték meg, ami több mitokondriális forrásból származhat [133, 134]. Az elektronok egyrészt a koenzim Q-ra

kerülnek a $FADH_2$-ről, majd innen három irányba áramolhatnak [134, 135]. 1.) A koenzim Q-ról a CI felé, ha elég magas a $\Delta\psi_m$ [134, 135]. (Ezt a folyamatot reverz elektron transzportnak- RET-nek hívjuk, amiről a későbbiekben részletesen lesz szó.) 2.) A koenzim Q-ról a CIII irányába, ami CIII gátlószer, antimycin jelenlétében nagymértékben fokozható [134]. 3.) A koenzim Q-ról a CII-re és így az α-GPDH-tal asszociált ROS termelés részleges forrása a CII [135]. Tengerimalac agy mitokondriumban az α-GP-vel támogatott ROS képzés ~ 60%-a a RET-hez köthető. Ha gátoljuk a RET-t szétkapcsolószerrel (a $\Delta\psi_m$ csökken), myxothiazol hatására (CIII gátlószer) növekszik a ROS termelés. Ebből arra lehet következtetni, hogy a ROS forrás az α-GPDH volt [134]. Orr és munkacsoportja szerint a CI, CII és CIII együttes gátlása esetén mért ROS termelés tulajdonítható kizárólag az α-GPDH-nak [135, 136]. Az α-GPDH jórészt (80%) vagy teljesen $O_2^{\cdot-}$-t termel, ami átalakulhat H_2O_2-vé és könnyen detektálhatóvá válik [135].

e. monoamin oxidáz (MAO) (EC 1.4.3.4): A mitokondrium külső membránjában elhelyezkedő flavin-tartalmú enzim, aminek két formája MAO-A és MAO-B létezik. A biogén aminok oxidatív deaminálásában vesz részt, miközben H_2O_2 szabadul fel [137]. Az agyban expresszálódó izoenzim H_2O_2 termelése nagyságrendekkel meghaladja a CIII inhibitor, antimycin jelenlétében detektált mitokondriális ROS termelést [137]. Parkinson-kórban [138] és iszkémiás károsodás során [139] fokozott ROS-képző tulajdonsága miatt egyre nagyobb figyelem övezi.

f. NADH:citokróm b5 reduktáz: A mitokondrium külső membránjában helyezkedik el, ami a citoszolikus NADH-t oxidálja a következő reakció szerint: NADH + H^+ + 2 ferri(Fe^{3+})cytochrome b_5 = NAD^+ + 2 ferro(Fe^{2+})cytochrome b_5 [140]. Skizofréniában szenvedő betegekben megemelkedett citokróm b5 reduktáz szintet és ehhez kapcsolódóan fokozott H_2O_2 képződést mértek, ami a betegség kialakulásában szerepet játszhat [141]. Érdemes kiemelni, hogy a mitokondriális p66Shc oxidálja elektronok átvételével az intermembrán térben redukált ferro (Fe^{2+})cytochrome b_5-t, majd a O_2-t redukálva H_2O_2 termelést indukál [142]. Így elmondható, hogy a NADH-citokróm b5 reduktáz indirekt módon is hozzájárul a H_2O_2-szint fokozásához.

g. komplex II (szukcinát-dehidrogenáz; SDH vagy szukcinát-ubikinon-oxidoreduktáz) (EC 1.3.5.1): A CII a mitokondrium belső membránjának mátrix felőli részén elhelyezkedő FAD^+ prosztetikus csoportot tartalmazó enzim, ami a szukcinát + FAD^+ → fumarát + $FADH_2$ átalakulást katalizálja. A SDH egyetlen olyan citrátköri enzim, amely a mitokondriális membránhoz horgonyzott és a légzési lánc részét is képezi. Az oxidáció során az elektronok a FAD^+ tartalmú A alegységről (II_F) a B alegységére jutnak, amelyek 3 vas-kén centrumot tartalmaznak, majd a hem tartalmú C és D alegységen át a végső elektronakceptorra, az koenzim Q-ra (ubikinonra) kerülnek *(6. ábra)*.

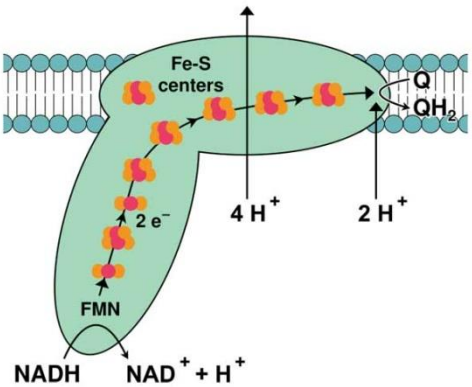


***6. ábra*: A szukcinát dehidrogenáz felépítése**

Rövidítések: Q: oxidált koenzim Q, QH_2: redukált koenzim Q

Forrás:https://bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A_Biochemistry_Free_For_All_(Ahern%2C_Rajagopal%2C_and_Tan)/5%3A_Energy/5.2%3A_Electron_Transport_and_Oxidative_Phosphorylation

In vitro körülmények között az izolált enzim elektronakceptor hiányában fokozott ROS képzésre képes, ami a FAD^+ csoporthoz köthető (II_F alegység) [143]. Izolált vázizom mitokondriumon CI és CIII gátlása mellett jelentős mennyiségű ROS termelés mutatható ki kis mennyiségű szukcinát esetében [144]. Ilyenkor a ROS képzés malonáttal gátolható, így a ROS forrása ugyancsak a SDH II_F alegysége [144]. *Siebels* és kollégája is megerősítették, hogy a SDH telítési koncentrációnál alacsony szukcinát jelenlétében és II_Q-alegység (CII koenzim Q-t kötő alegysége) gátlószerével, atpenin5-tel, nagy mennyiségű ROS-t termel II_F-alegységen keresztül szívből izolált szubmitokondriális partikulumokban [145]. Azonban ennél sokkal nagyobb jelentőséggel bír *in vitro* a CIII felé irányuló (forward irányú elektrontranszport; FET) és visszafelé, a CI felé áramló (reverz irányú elektrontranszport; RET; lásd alább) elektronokból származó ROS, telítő mennyiségű szukcinát koncentráció esetén (SDH K_m értéke szukcinátra >1mM; [146, 147]. Iszkémia-reperfúziós károsodás során *in vivo* egér szívben kimutatták, hogy iszkémia alatt a SDH megfordul, a szukcinát felhalmozódik. Reperfúzió alatt a SDH visszafordul, oxidálja a felhalmozódott szukcinátot, ami fokozott ROS képzéshez vezet a RET-en keresztül [43].



7. ábra: **A komplex I felépítése**

Forrás: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e2/Complex_III.png

Rövidítések: Fe-S: vas-kén fehérje, Q: oxidált koenzim Q, QH_2: redukált koenzim Q

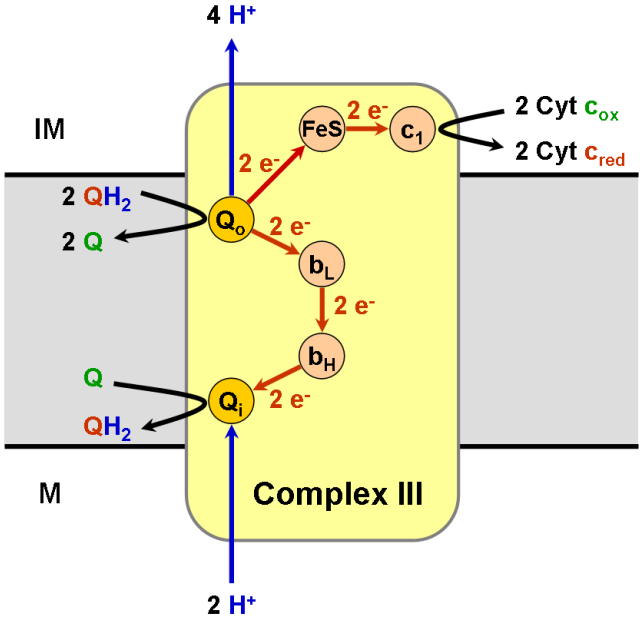
h. komplex I (NADH-ubikinon oxidoreduktáz; CI):

A mitokondriális légzési lánc első integrális komplexe a mitokondrium belső membránjában helyezkedik el, amely a NADH + H^+-t oxidálja NAD^+ -dá, miközben az elektronokat a FMN (Em=-320 mV) veszi fel, majd innen az elektronok a vas-kén

centrumokkal rendelkező fehérjékre kerülnek, amelyek növekvő redoxpotenciáljuknak megfelelően helyezkednek el *(7. ábra).* Az utolsó vas-kén fehérjének, az N2-nek a többi vas-kén fehérjéhez képest jóval magasabb redoxpotenciál értéke van (-150 mV). A legnagyobb redoxpotenciál-csökkenés a N2 alegység és a ubikinon (oxidált koenzim Q) (+ 90 mV) között van, amelyek interakciója konformáció-változást idéz elő, ami fedezi a protonok kipumpálásához szükséges energiát [99, 148]. A konformáció-változás megváltoztatja a CI-t alkotó fehérjék pKa értékét, így lehetővé válik, hogy a mátrix oldalon felvegyék a protont, amit aztán az intermembrán térben adnak le [149]. A CI-en belül több ROS termelő helyet feltételeznek a kísérleti körülményektől függően: 1.) ROS termelés NADH-függő szubsztrát esetén nyugalmi körülmények között; 2.) ROS termelés NADH-függő szubsztrát esetén CI gátlószer, rotenon jelenlétében; 3.) $FADH_2$-függő szubsztrátok által támogatott RET magas $\Delta\psi_m$ mellett. A CI jórészt $O_2^{\cdot-}$-t termel [150, 151]. A CI ROS termelését kétféle teória magyarázza. Az „egyoldalas" (one-site) modell szerint a ROS termelés helye a CI flavin csoportja mind FET, mind RET esetén [152, 153]. A „kétoldalas" (two-sites) modell értelmében RET során a ROS a CI koenzim Q-kötő régióban termelődik (I_Q-régió), míg FET esetén a CI flavin csoportja a felelős a ROS képződéséért [148, 154, 155].

i. **A RET** során az elektronok a $FADH_2$-t termelő szubsztrátokról (szukcinátról, α-GP-ról) az ubikinonra kerülnek, ami az elektronokat a CI–hez szállítja [156]. A folyamat energiaigényes, így magas $\Delta\psi_m$ szükséges az elektronok ellentétes irányú szállításhoz. A RET képződés mértéke a nagy energia igénye miatt erősen függ a $\Delta\psi_m$-től; 10%-os csökkenés a $\Delta\psi_m$-ben 90% csökkenést idéz elő a ROS termelésben [157, 158]. A RET során keletkezett ROS-t befolyásolja a $\Delta\psi_m$ mellett a *pmf* másik komponense, a ΔpH (lásd később) [159]. Kísérletek azt bizonyítják, hogy a RET gátolható rotenonnal, tehát az alapján feltételezhető, hogy a rotenon kötőhelye az I_Q-régió közelében helyezkedik el [134]. Míg NADH-függő szubsztrátok esetén a keletkező ROS nagymértékben fokozható rotenonnal [160, 161] és a ROS termelést a $NADH/NAD^+$ arány befolyásolja, ami nem mondható el RET esetén [162]. Több munkacsoport is igazolta, hogy a legnagyobb ROS termelést rágcsálóból izolált mitokondriumban szukcinát jelentlétében, ADP nélkül lehetett detektálni, ami ilyen körülmények között a RET-hez köthető [157, 161, 163-165].

j. komplex III (koenzim Q-citokróm c reduktáz; CIII): A CIII a mitokondriális légzési lánc harmadik komplexe, amely proton pumpa aktivitással rendelkezik. Az elektronszállító ubikinolt (redukált koenzim Q) oxidálja és az elektronokat a másik elektronszállító molekulának a citokróm c-nek adja át. Az ubikinolt a CIII Q_o-oldala megköti, majd az egyik elektron az ISP-n (iron-sulfur protein, vas-kén fehérje), a Rieske-proteinen keresztül a citokróm c-re kerül *(8. ábra)* [166, 167].



8. ábra: A komplex III felépítése

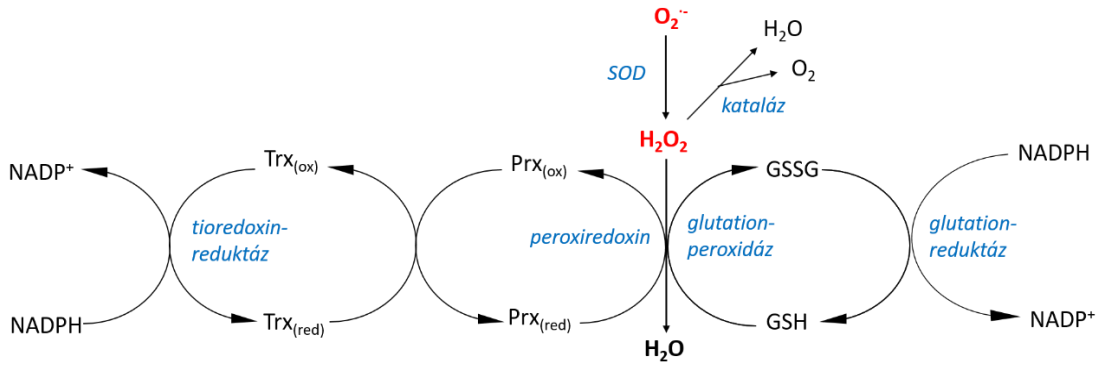
Forrás: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e2/Complex_III.png

Rövidítések: Q: ubikinon, oxidált koenzim Q, QH_2: ubikinol, redukált koenzim Q, Qo: a QH_2 oxidációs helye, Qi: ubikinont redukáló alegység

Az ottmaradó szemikinon ($SQ^{\cdot-}$) nem stabil, a másik elektront az alacsony redoxpotenciállal rendelkező citokróm b-nek adja át a Q_i-oldal felé, ahol az elektronok egy újabb ubikinont (oxidált koenzim Q) redukálnak. Az ubikinon teljes redukálásához két elektronra van szükség, ezért a ciklus teljes megtételéhez a Q_o-oldalnak két oxidálásra váró ubikinolt kell megkötnie. Ezt a folyamatot Q-ciklusnak is szokták nevezni [166, 167]. A Q_i vagy Q_o-oldalon keletkező $SQ^{\cdot-}$-t teszik felelőssé a CIII ROS termeléséért, amire specifikus inhibitorok alkalmazásával lehet következtetni [104, 168, 169]. Bővebben erről az 1. táblázatban lehet olvasni.

2.8 A mitokondriális ROS eltávolítása és semlegesítése

Számos új elmélet szerint az oxidatív stressz kialakulásához nem a fokozott ROS képződés, hanem sokkal inkább a ROS termelés és eltávolítás közötti egyensúly megbomlása járul hozzá [114]. Így kísérleteinkben nemcsak a sejt vagy mitokondrium által szintetizált ROS mennyiségét és a szintézis helyét kellene detektálni, hanem a ROS eliminálásában részt vevő enzimeket, kompartmenteket megkülönböztetni. A teljesség igénye nélkül a mitokondriumban 8-9 ROS eltávolító enzimet vagy molekulát lehet elkülöníteni, ezek közül a legfontosabbakat említem itt.



9. ábra: **Az antioxidáns enzimrendszer vázlatos működése.** Rövidítések: GSH: glutation, GSSG: oxidált glutation, Prx(ox): peroxiredoxin oxidált formája, Prx(red): peroxiredoxin redukált formája, SOD: szuperoxid diszmutáz. Trx(ox): tioredoxin oxidált formája, Trx(red): tioredoxin redukált formája

a. Mangán-szuperoxid diszmutáz (MnSOD) (EC 1.15.1.1): A mitokondrium mátrixában elhelyezkedő MnSOD a $O_2^{\bullet-}$ -t alakítja át H_2O_2-vé ($2\ O_2^{\bullet-} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) [170], ezáltal védi a mitokondrium vas-kén centrumait a $O_2^{\bullet-}$ hatásától [171]. A H_2O_2 $O_2^{\bullet-}$-dal ellentétben képes apoláris tulajdonságának köszönhetően átjutni a mitokondriális membránon. Az enzim működéséhez a fémionon kívül nem igényel semmilyen kofaktort, így aktivitását csak a szubsztrátok jelenléte befolyásolja [172]. A citoszolban található a cink-szuperoxid-diszmutáz, amely a citoplazmában keletkező $O_2^{\bullet-}$-t hatástalanítja [173]. A SOD1 enzim mutációja figyelhető meg a familiáris amiotrófiás laterálszklerózis során, amely a motorneuronok károsodásával járó betegség [174].

b) Kataláz (EC 1.11.1.6): A kataláz jórészt a májban, a vesében, a tüdőben, a szívben és az agyban található meg [175]. A szívben csak a mitokondriumokban fordul elő és a mitokondriális fehérjetartalom 0,025%-át teszi ki [176]. A kataláz által katalizált reakcióban a H_2O_2 átalakul H_2O-vé és O_2-vé. Egyes irodalmi adatok szerint azonban a többi mitokondriális detoxifikáló rendszerhez képest a kataláz jelentősége elhanyagolható, ugyanis sok szervben nem mutatható ki [177].

c) Glutation (GSH, L-gamma-glutamyl-L-cyteinylglycine): A GSH egy ciszteinből, glicinből és glutamátból felépülő tripeptid, amely a citoplazmában szintetizálódik [178] és megfelelő GSH [179], dikarboxilát- és α-KG-transzportereken [180] keresztül jut be a mitokondriumba. A mitokondriális GSH teszi ki a sejt teljes GSH készletének 10-12 %-át [181]. A redukált és oxidált forma aránya a mitokondrium metabolikus állapotától, a szövettől és az életkortól függ [182]. A GSH vagy nem-enzimatikus úton semlegesíti a $O_2^{\cdot-}$-t és hidroxil gyököket vagy elektron donor szubsztrátot szolgáltat [183]. Végeredményképpen a GSH oxidálódik GSSG-vé, ami nem tud a citoszólba transzportálódni [184].

d) Glutation peroxidáz (GPx; EC 1.11.1.9): A $2\ GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2\ H_2O$ reakciót katalizáló enzim számos sejtalkotóban, így a mitokondrium mátrixában és az intermembrán térben is megtalálható [185]. A különféle izoformák szövet specifikus előfordulása jellemző; májban, vesében és szívben nagyobb mértékben expresszálódik [186]. Érdekes módon a GPx1 génkiütött egerek egészségesek, fertilisek és jól fejlettek voltak, nem volt jele fokozottabb ROS képződésnek [187], azonban sokkal érzékenyebbnek bizonyultak különféle oxidatív stresszt okozó toxinokra [188].

e) Glutation reduktáz (EC 1.8.1.7): Az enzim nagy szerepet játszik a megfelelő GSH-szint biztosításában; specifikusan a GSSG GSH-vá visszaalakulását katalizálja a mitokondriális mátrixban ($GSSG + NADPH \rightarrow 2\ GSH + NADP^+$), amihez NADPH szolgáltatja a redukáló ekvivalenst. A NADPH forrást a mitokondriumban a mitokondriális izocitrát dehidrogenáz, az almasav enzim [189] és a nikotinamid nukleotid transzhidrogenázok biztosítják [190]. Így a különféle szubsztrátok oxidációja során

keletkező energia egyben hozzájárul a mitokondriumok természetes védekező mechanizmusaihoz a ROS ellen [19].

f) Peroxiredoxinok (Prx; EC 1.11.1.15) **vagy tioredoxin-függő peroxid reduktázok:** A Prx a H_2O_2 eliminálásában vesznek részt a következő reakció szerint: Prx (redukált) + H_2O_2 → Prx (oxidált) + 2 H_2O [191, 192]. Az Prx (oxidált) formájának visszaalakításához, így aktiválásához NADPH-függő tioredoxin reduktáz (TrxR) szükséges [193] *(9.ábra).* Így a mitokondriális Prx3 és Prx5 aktivitását a GSH-rendszerhez hasonlóan a mitokondrium metabolikus állapota határozza meg [194].

2.9 A mitokondriális ROS képzés befolyásolásának lehetőségei

2.9.1. Mitokondriális gátlószerek

A ROS termelés monitorozása során kísérleteinkben gyakran alkalmazunk különféle mitokondriális gátlószereket, amelyek elsősorban a légzési lánc különböző pontjait gátolva információt adnak a ROS termelés milyenségéről, mennyiségéről és a ROS termelés helyéről. Az alábbi táblázatban a gyakorlatban használt gátlószereket és azok ROS-ra kifejtette hatását foglalom össze.

1. táblázat: A gátlószerek hatása a mitokondriális ROS termelésre NADH-termelő szubsztrátok jelenlétében (3. oszlop) vagy reverz elektron transzportot (RET) támogató szukcinát/α-glicerofoszfát esetén ADP nélkül. Rövidítések: CI: komplex I, CII: komplex II, CIII: komplex III, I_Q alegység: CI ubikinol-kötő alegysége, II_F -alegység: a CII flavinkötő alegysége, III_{Qo}: a CIII redukált koenzim Q/ubikinont kötő alegysége- oxidáció oldal, III_{Qi}: a CIII-n belül az ubikinolt redukáló oldala, Q: ubikinol, oxidált koenzim Q10, QH_2: ubikinon, redukált koenzim Q.

Gátlószer	Gátlás helye	Hatása a NADH-függő szubsztrátokra	Hatása a RET-re

Rotenon	CI I_Q-alegység NADH és Q illetve NAD^+ és QH_2 között [195, 196]	fokozás [18, 157, 158, 161]	gátlás [18, 111, 157, 161, 195, 197, 198]
Piericidin	CI I_Q-alegység [199]	fokozás [150, 200, 201]	gátlás [159]
Atpenin5	CII II_Q-alegység [202]	nincs hatással [203]	gátlás [144]
Malonát	CII II_F-alegység [204, 205]	nincs hatással	gátlás [144]
Mucidin	CIII Q_o-alegység	gátlás [200]	gátlás [150, 206]
Myxothiazol	CIII Q_o-alegység (QH_2 oxidációs oldal)	gátlás [161] fokozás [201, 207]	gátlás [161, 206, 208, 209] fokozás [207]
Stigmatellin	CIII Q_o-alegység, (QH_2 oxidációs oldal)	gátlás [200, 201]	gátlás [203, 207] *202: myxothiazol után
Antimycin	CIII III_{Qi}- alegység	fokozás [160, 164, 210]	fokozás [197, 208, 209]

2.9.2 Metilénkék

A MB ROS képződésre kifejtett hatását tekintve az irodalmi adatok nem egységesek. Több munkacsoport számolt be a MB H_2O_2-indukálta sejthalállal szemben mutatott védő hatásáról különféle primer sejttenyészeteken és sejtkultúrákon [81]. Ezzel szemben munkacsoportunk korábbi, izolált mitokondriumokon végzett vizsgálatai nem bizonyították a MB antioxidáns hatását [98]. A MB ép és károsodott mitokondriumon is egyaránt nagymértékben fokozta a H_2O_2 termelését és csökkentette annak eliminációját. A diszkrepancia okai a következők lehetnek. i) A MB redox tulajdonságainak következtében elektronokat nem csak a NADH-ról, hanem a légzési lánc komplexeiről is képes átvenni, miközben MBH_2-vé redukálódik. A MBH_2 nemcsak a citokróm c-t, hanem a molekuláris O_2-t is tudja redukálni $O_2^{\bullet-}$-t eredményezve, ami átalakulhat H_2O_2-vé. ii) Vörösvérsejtekben leírták, hogy a MB képes oxidálni a glutationt, ami a H_2O_2 eliminációs rendszer részét képező molekula [211]. iii) MB-kel kezelt P301S típusú mutáns tau

fehérjét kódoló Alzheimer–kór egér modellekből származó cortex és a hippocampus területén csökkent oxidált DNS (8-hydroxy-2′-deoxyguanosine) szintet mértek, ami az oxidatív stressz hiányára utal [212]. Emellett MB jelenlétében fokozódott az antioxidáns enzimrendszerek, így a tioredoxin reduktáz és a glutation reduktáz enzimrendszerek expressziója. Feltételezik, hogy a folyamat hátterében az antioxidáns védelmet beindító Keap/Nrf2 útvonal MB általi aktiválása áll [82, 212]. Stresszmentes állapotban a Keap az Nrf2 transzkripciós faktorhoz kapcsolódik, elősegítve ezzel az Nrf2 ubikvitinációját és proteoszómális degradációját. Azonban oxidatív stressz estén a keletkező H_2O_2 és $O_2^{\cdot -}$ módosíthatja a Keap cisztein oldalláncait, ami az Nrf2-Keap komplex széteséséhez vezet. Az Nrf2 bejutva a sejtmagba a DNS ARE (antioxidant response element) régiójához kötődve antioxidáns gének átírását fokozza [213]. Így valószínűsíthető, hogy a MB habár direkt módon oxidatív stresszt indukál, indirekt módon csökkenti a ROS-szintet az antioxidáns enzimek expressziójának növelése révén a Keap/Nrf2 útvonalon keresztül.

2.9.3 A mitokondriális membránpotenciál

Már régóta elfogadott tény, hogy a mitokondriális ROS termelés nagy mértékben függ a *pmf* komponenseitől, a $\Delta\psi_m$-től és a ΔpH-tól [159, 161, 214, 215]. A legnagyobb mértékű ROS termelést szukcinát által támogatott RET során lehet mérni, ami a legérzékenyebb a $\Delta\psi_m$-változásra [161]. Ha a $\Delta\psi_m$ csökken, azaz a mitokondriális belső membrán depolarizálódik, akkor a szukcináttal vagy α-GP-vel előidézett RET által támogatott ROS termelés csökken emlősökben [160] és Drosophila mitokondriumban [136]. Ez következik be például ADP hozzáadása esetén vagy szétkapcsolószer (lásd később) hatására. A RET nagy mértékű érzékenységét bizonyítja, hogy a $\Delta\psi_m$ 10%-os csökkenése (szétkapcsolószer hatására) 90%-kal csökkentette a RET által előidézett ROS termelés mértékét szukcinát jelenlétében patkányból izolált szív mitokondriumban [157], illetve hasonlóan agy mitokondriumban is [161]. A fennmaradó (~10%) ROS termelés pedig független a $\Delta\psi_m$-változástól [216]. Fontos megjegyezni, hogy a rotenon hatására bekövetkező csökkenés a RET-ben ADP nélkül nem a $\Delta\psi_m$-változásra vezethető vissza. Hiszen rotenon hatására szukcinát jelenlétében a $\Delta\psi_m$ magas marad, csak az elektronok áramlásának útja akadályozott [161]. Fiziológiás körülmények között az ADP hatására bekövetkező ATP szintézis miatt fellépő depolarizáció gátolja a ROS termelést [161]. A NADH-függő szubsztrátok, így a glutamát és malát jelentlétében detektált ROS termelés

sokkal alacsonyabb a szukcináttal mért ROS termeléshez képest. Azonban a CI gátlásával (például rotenonnal) a ROS termelés szignifikánsan növekszik és mértéke csaknem megegyezik a szukcináttal mért RET által támogatott ROS termelés mértékével [157, 163]. Míg a RET által támogatott ROS termelés $\Delta\psi_m$ függése több munkacsoport által egyértelműen bizonyított [134, 157, 161, 216], addig a NADH-függő szubsztrátok esetében az irodalmi adatok nem egyértelműek. *Votyakova és Reynolds* [161] arra a következtetésre jutottak patkány agyból izolált mitokondriumokon végzett kísérleteik alapján, hogy a NADH-függő szubsztrátokkal rotenon vagy antimycin jelenlétében detektált ROS termelés nem függ a $\Delta\psi_m$-tól. Hasonló következtetésre jutott *Ádám-Vizi* munkacsoportja, akik szinaptoszómák H_2O_2 termelését vizsgálták, ahol jórészt a mitokondriumok felelősek a ROS termelésért [217]. *Starkov* és *Fiskum* ezzel szemben azt tapasztalták, hogy gátlószerek hiányában a NADH-függő szubsztrátokkal támogatott ROS termelése $\Delta\psi_m$-függő, és a szétkapcsolószerrel gátolt H_2O_2 termelés 30%-a független a $\Delta\psi_m$-tól [158]. Hasonló konklúzióra jutott *Gyulkhandanyan* és *Pennefather* is patkány agy mitokondriumokon végzett vizsgálataik során, amikor a glutamáttal és maláttal lélegeztetett mitokondriumok ROS termelésének szignifikáns csökkenését látták a mitokondriális belső membrán teljes depolarizációja során. [218] *Tretter* és *Ádám-Vizi* glutamát-maláttal lélegeztetett tengerimalac agyból izolált mitokondriumokon a H_2O_2 termelés mérsékelt $\Delta\psi_m$-függését figyelték meg: a $\Delta\psi_m$ teljes depolarizációja során a H_2O_2 termelés 40%-kára csökkent, míg a maradék 60% független maradt a $\Delta\psi_m$-tól [160]. Fontos megjegyezni, hogy az izolált mitokondrium ROS termelését nagy mértékben befolyásolja a mérőoldat, az alkalmazott mérőrendszer és az izolálási módszer. Például az izolálás során gyakran használt BSA (bovine serum albumin) jelenlétében a mitokondriumok kapcsoltsága nő, ami megmutatkozik a légzésben is [160, 216]. Ez azzal magyarázható, hogy BSA jelenlétében a mitokondriális membrán hiperpolarizáltabb, ami jobb kapcsoltságot eredményez. Ugyanis a BSA megakadályozza a zsírsavak [219] és egyéb szétkapcsolást előidéző komponensek (amelyek az izolálás során szabadulnak fel) depolarizációt előidéző hatását [216]. *Tretter* és *Ádám-Vizi* megállapították, hogy a NADH-függő szubsztrátok által támogatott ROS termelés $\Delta\psi_m$-függése csak akkor figyelhető meg, ha a membrán erősen polarizált, amit BSA jelenlétében lehet elérni [160].

2.9.4 A transzmembrán pH grádiens

A *pmf* másik komponense, a ΔpH befolyásoló szerepe a RET-re és a RET által támogatott ROS termelésre több munkacsoport által bizonyított [154, 159, 215, 220]. Azt, hogy a *pmf* melyik komponense van nagyobb hatással a RET-re már vita tárgyát képezi. *Brand* és *Zoccorato* munkacsoportjai [159, 220] úgy vélik, hogy a RET sokkal nagyobb mértékben függ a ΔpH-tól, mint a $\Delta\psi_m$ -től. Míg *Selivanov* és csoportja szerint nem a ΔpH, hanem a mitokondriális mátrix abszolút pH értéke van nagyobb hatással a RET-re [215]. Méréseik során a mérőoldat lúgosításával a szukcináttal támogatott ROS képződés növekedett foszfát jelenlétében és anélkül patkány agy mitokondriumon, míg a $\Delta\psi_m$ a pH emelésével változatlan maradt. Azonban nemcsak a RET által támogatott ROS képződés, hanem a NADH-szubsztrátokkal előidézett ROS termelés is pH-függő [221, 222]. *Bahn* és *Treberg* glutamáttal és maláttal vagy csak maláttal lélegeztetett agyi mitokondriumokban a mérőoldat pH-értékének emelésével növekedett a ROS termelés [221], ami megegyezik *Selivanov* és kollégái által mért eredményekkel szukcináttal energetizált mitokondriumokon [215]. Ugyanezt figyelte meg *Lambert* és munkacsoportja patkány vázizomból izolált mitokondriumon is glutamát és malát jelenlétében [222].

2.9.5 Anorganikus foszfát

A mitokondriális anorganikus foszfát (Pi) koncentráció meghatározó szerepet tölt be a mitokondriális ROS termelésben és *pmf* befolyásolásában is. Ugyanis *in vivo* elég magas Pi koncentráció [223] mellett a ΔpH igen alacsony [51]. *In vitro* Pi nélkül a mitokondriális mátrix a leglúgosabb. A Pi a Pi/OH^- cseretranszporteren keresztül [224] bejutva a mitokondriális mátrixba savanyodást idéz elő. A mátrix pH-értékének csökkenése pedig a RET gátlásához vezet [215]. Így a Pi koncentráció emelésével a mátrix tovább savanyodik, ami a ROS termelés további csökkenését idézi elő. Azonban *Kowaltowski* és társai [225] glutamát és maláttal lélegeztetett mitokondriumban a foszfátkoncentráció emelkedésével párhuzamosan a ROS termelés növekedését figyelték meg patkány agyból, szívből és májból izolált mitokondriumokon.

3. Célkitűzés

Munkám célja a mitokondriális légzési lánc károsodás során fellépő elégtelen ATP termelés és a mitokondriális ROS termelés befolyásolásának vizsgálata. Így tanulmányoztuk a mitokondriális célponttal rendelkező vegyület, a metilénkék (MB) hatását a mitokondrium egyik alternatív ATP termelő folyamatára, a szubsztrát-szintű foszforilációra (szukcinil-KoA+ ADP + Pi = szukcinát + ATP + acetil-KoA) tengerimalac agyból izolált mitokondriumokon; elsősorban a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen hatást fejt ki a MB a mitokondriális szubsztrát-szintű foszforilációra, amelyet a citrátköri enzim, a szukcinát-tiokináz katalizál?
- Milyen hatással van a MB az oxigénfogyasztásra, NAD(P)H autofluoreszcenciára és a $\Delta\psi_m$-ra az ATP-szintáz gátlása esetén?
- Hogyan változik az oxigénfogyasztás, a NADH autofluoreszcencia és a $\Delta\psi_m$ MB hatására az ATP-szintáz és a komplex I együttes gátlása esetén? Képes-e a MB a mitokondriális károsodást követően a $\Delta\psi_m$-t helyre állítani?

Másrészt vizsgáltuk egy speciális ROS termelő folyamat, a reverz elektron transzport (RET) által támogatott ROS befolyásolásának lehetőségét. Munkánk célja a *pmf* komponenseinek hatásának vizsgálata a RET által támogatott ROS termelésre tengerimalac agyból és szívből izolált mitokondriumokon. A következő kérdéseket szerettük volna megválaszolni:

- A *pmf* melyik komponense (ΔpH és $\Delta\psi_m$) gyakorol nagyobb hatást a szukcinát vagy az α-GP jelenlétében mért RET által támogatott ROS-ra?
- Hogyan függ a szukcináttal és az α-GP-vel támogatott H_2O_2 termelés az extramitokondriális pH értékétől?
- Hogyan változik a ΔpH a pH_{extra} függvényében?
- Megfigyelhető-e szervspecifikus hatás a RET-tel támogatott H_2O_2 termelés befolyásolásának tekintetében?

4. Módszerek

4.1 Mitokondriumok izolálása

Méréseink során tengerimalac agykéregből és szívből izolált mitokondriumokat használtunk az állat lefejezését követően. Az állatok tartása és kezelése a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Bizottságának szabályzatában foglaltaknak megfelelően történt. A fehérjekoncentrációt módosított biuret-módszerrel határoztuk meg [226].

4.2 Agy mitokondrium

A tengerimalac lefejezését követően az agyat kivettük, majd a fehérállományt eltávolítva az agykérget használtuk fel. A mintát a preparálás során végig jégen tartottuk. Az agyat jéghideg *A* pufferben (225 mM mannitol, 75 mM szukróz, 5 mM HEPES, 1 mM EGTA, pH= 7.0) apró darabokra vágtuk éles ollóval, majd Potter-Elvehjem homogenizátorral homogenizáltuk és centrifugáltuk (3 perc; 1,300 *g*). A felülúszót ezt követően tovább centrifugáltuk 10 percen át 20,000 *g*-n, majd a csapadékot 15% Percoll oldatban szuszpendáltuk. Egy másik centrifugacsőben Percoll-grádienst készítettünk alulról felfelé csökkentve a rétegek koncentrációját: 40%, 23% és erre került a 15% Percoll oldatban szuszpendált minta. Ezután következett a gradiens 8 percig 30,700 *g*-n történő centrifugálása (fékezés nélkül). Az alsó mitokondriális frakciót szuszpendáltuk *A* pufferben és további 10 percen át 16,600 *g*-n centrifugáltuk eltávolítva ezzel a maradék Percoll oldatot. A felülúszót kiöntöttük, a csapadékot szuszpendáltuk *A* pufferben és centrifugáltuk (10 perc; 6,300 *g*). Végül a felülúszó eltávolítása után a csapadékot EGTA-t tartalmazó *B* pufferben szuszpendáltuk (225 mM mannitol, 75 mM szukróz, 5 mM HEPES; pH= 7.4) [227].

4.3 Szív mitokondrium

A szív mitokondriumok izolálása Korshunov módszere alapján történt [157]. Az állat lefejezését követően a szívet a homogenizáló pufferben mostuk (200 mM mannitol, 50 mM szukróz, 5 mM NaCl, 5 mM MOPS, 1 mM EGTA és 0.1% BSA; pH= 7.15), majd ollóval apró darabokra vágtuk 2.5 ml homogenizáló pufferben, amibe előzőleg 10 U

proteázt (Protease from Bacillus licheniformis; Type VIII) tettünk. Az oldatot 20 ml-re kiegészítve Potter-Elvehjen homogenizátorral homogenizáltuk és az így keletkezett homogenátumot centrifugáltuk 10 percen át 10,500 *g*-n. A felülúszó eltávolítása után a csapadékot szuszpendáltuk 25 ml homogenizáló pufferben és újracentrifugáltuk 10 percig 3,000 *g*-n. Végezetül a felülúszót centrifugáltuk 10,500 *g*-n 10 percig és a csapadékot felszuszpendáltuk a homogenizáló pufferben. Az így keletkezett mitokondriális szuszpenziót használtuk a kísérleteinkhez.

4.4 A mitokondriális oxigénfogyasztás meghatározása

A mitokondriális oxigénfogyasztást Clark-típusú elektród alapú műszerrel határoztuk meg (Oroboros O2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria). Az elektródot az ún. „kétpontos" módszerrel kalibráltuk. A kamrákban lévő mérőoldatot a levegő oxigénjével telítettük elérve ezzel a 100%-os O_2 koncentrációt; míg a kamrában a 0%-os O_2 mennyiséget vagy diotionit (megköti az oldott O_2-t), vagy nagyobb koncentrációjú (0.2-0.3 mg/ml) mitokondriális szuszpenzió hozzáadásával értük el. A méréseket a mérőoldat A-ban végeztük el (mM-ben kifejezve): 0.1 EGTA, 125 KCl, 20 HEPES, 2 K_2HPO_4, 1 $MgCl_2$ és 0.025% BSA; pH = 7.0.
A mérések során 0.1, esetenként 0.05 mg/ml mitokondriumot használtunk. A mérések digitalizáláshoz és kiértékeléséhez DatLab 4 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria) szoftvert használtunk.

4.5 A mitokondriális ATP szintézis sebességének meghatározása

A mitokondriális ATP termelést online módon, egy kapcsolt enzimrendszer segítségével határoztuk meg, amit először Williamson és munkatársai írtak le [228]. A mérések során használt mérőoldat A-ba (lásd *Oldatok* fejezet) előzőleg a következő anyagokat tettük: 3 mM $NADP^+$, 5 mM glukóz, 1.5 U hexokináz, 0.5 U glukóz-6 foszfát-dehidrogenáz, 200 μM P^1,P^5-Di(adenosine-5′) pentaphosphate (AP5; adenilát-kináz gátló). A kísérletek folyamán 0.05 mg/ml vagy 0.1 mg/ml mitokondriumot és 2 mM ADP-t használtunk. A mitokondrium és a légzési szubsztrát jelenlétében az ADP ATP-vé alakult át. A mitokondriumból kilépő ATP a hexokináz enzim által katalizált

reakcióban reagált a glukózzal és glukóz-6-foszfát képződött. A keletkezett glukóz-6-foszfát a glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz által katalizált reakcióban 6-foszfoglukonáttá alakult át, miközben a $NADP^+$ NADPH-vá redukálódott. A képződött NADPH abszorbanciája egyenesen arányos a mitokondriumban keletkezett ATP mennyiségével. Az abszorbanciát 340 nm-en, 37 ^oC-on detektáltuk JASCO-V650 spektrofotométerrel (ABL&E-JASCO, Tokió, Japán).

4.6 A mitokondriális membránpotenciál meghatározása safranin fluoreszcencia detektálásával

A mitokondriális membránpotenciált ($\Delta\psi_m$) egy pozitív töltésű, piros fluoreszcens festékkel, safraninnal detektáltuk, amely $\Delta\psi_m$-függően felhalmozódhat a mitokondriális mátrixban [229, 230]. A $\Delta\psi_m$ növekedése esetén a safranin a mátrixban oligomerizálódik és a monomerek által kibocsájtott fényt az oligomerek elnyelik, ezáltal csökkentve a detektált fluoreszcencia intenzitását. A safranin fluoreszcenciáját 495 nm excitációs és 585 nm emissziós hullámhosszon detektáltuk 37 ^oC-on Hitachi F4500 spektrofluoriméterrel (Hitachi High Technologies, Maidenhead, UK). A mérőoldat összetétele megegyezik az oxigénfogyasztás mérése során alkalmazottal. A mérések során 0.1 mg/ml mitokondriális szuszpenzióhoz 2 μM safranint használtunk.

4.7 A mitokondriális membránpotenciál meghatározása meghatározása TPP^+ elektród segítségével

A $\Delta\psi_m$ meghatározása az oldat és a mitokondrium közötti tetrafenilfoszfónium ion (TPP^+) megoszlása alapján történt egy TPP^+-érzékeny elektród segítségével [231]. A mitokondriális membrán hiperpolarizációja során, a mitokondriális mátrix negatívabb lesz, ami kedvez a pozitív töltéssel rendelkező TPP^+ mátrixba történő bejutásának, majd felhalmozódásának. Ennek eredményeként az oldatban csökken a TPP^+-érzékeny elektród által is detektálható TPP^+-ionok mennyisége. A TPP^+-elektród feltöltése 10 mM TPP^+ és 2 mM NaCl oldat keverékével történt. A referencia elektródként Ag/AgCl (ezüst/ezüstklorid) elektródot használtunk, amely tömény KCl-dal töltött agar „hídon” kapcsolódott a TPP^+-elektródhoz. Az elektród kalibrációjához minden mérés elején

négyszer 0.5 μM TPP^+-t adagoltuk. A Nernst-egyenlet alapján agy mitokondriumra korábban leírt korrekciós faktor alapján kiszámoltuk a $\Delta\psi_m$-t mV-ban kifejezve [232, 233]. A számolást Rottenberg módszerével végeztük [232]. A mitokondriális mátrix térfogatát 1 μl/mg proteinnek vettünk [234]. Méréseink során nem vettük figyelembe a TPP^+ nem membránpotenciál-függő kötődését. A TPP^+-elektród érzékenysége alacsony $\Delta\psi_m$ értéken csökken (< 120 mV) [158].

4.8 A mitokondriális reaktív oxigén származék képződésének meghatározása

A mitokondriális H_2O_2 meghatározásához Amplex UltraRed (3 μM) és tormaperoxidáz (HRP; 5U/2 ml) esszét használtuk. A mitokondriumban keletkező szuperoxid gyökök ($O_2^{\cdot -}$) gyorsan átalakulnak a mitokondriális mangán-szuperoxid-diszmutáz enzim által katalizált reakcióban H_2O_2-vé, ami a mitokondriumból kilépve detektálható válik. A H_2O_2 reagál a tormaperoxidáz által katalizált reakcióban az Amplex® UltraReddel egy fluoreszcens anyagot, Amplex UltroxRedet eredményezve, amelyet 550 nm excitációs és 585 nm emissziós hullámhosszon 37 °C-on PTI Deltascan fluoriméterrel (Photon Technology International; Lawrenceville, New Jersey) detektáltunk. A kísérletek során 0.05 mg/ml szív vagy agy mitokondriumot használtunk. Minden mérés végén a fluoreszcens jelet 100 pmol H_2O_2-vel kalibráltunk két lépésben. A mérések során kétféle mérőoldatot használtunk annak megfelelően, hogy nigericin vagy valinomycin hatását vizsgáltuk-e (lásd később *Oldatok* fejezet).

4.9 Az intramitokondriális pH meghatározása

Az intramitokondriális pH (pH_{in}) meghatározása 2,7-biszkarboxietil-5(6)-karboxifluoreszcein acetoximetilészterrel (BCECF-AM) történt [216, 235, 236], amely nem rendelkezik töltéssel, így képes könnyedén bejutni a mitokondriumba. A mitokondriális mátrixban az észtercsoportot a mitokondriális észterázok lehasítják, kialakítva a pH_{in}-ra érzékeny BCECF fluoreszcens molekulát. A BCECF előnye, hogy excitációs spektrumában pH-érzékeny és nem-pH-érzékeny régiókat lehet elkülöníteni. 100 μl mitokondriumot (35-40 mg/ml fehérje) inkubáltunk 50 μM BCECF/AM tartalmú C oldatban (mM-ben kifejezve: 225 mannitol, 75 szukróz, 5 HEPES, 0.1 EGTA, 0.1 ADP,

pH 7.4) 10 percig 25 ^{o}C-on. Ezt követően 325 µl jéghideg C oldathoz 0.1 mM ADP-t adtunk. A BCECF/AM-mel töltött mitokondriumokat 2 percig 13,000 *g* centrifugáltuk. Majd eltávolítottuk a felülúszót és a csapadékot 450 µl C oldatban szuszpendáltuk és újracentrifugáltuk 2 percig 13,000 g fordulatszámon. Az így keletkezett csapadékot szuszpendáltuk 450 µl ADP-t nem tartalmazó C oldatban, majd 10 percig állni hagytuk jégen. Ezt követően centrifugáltuk 2 percig 13,000-*es* fordulatszámon. Minden centrifugálási lépést 4 ^{o}C-on hajtottunk végre. A felülúszót a végén eltávolítottuk és a csapadékot 13 µl C oldatban szuszpendáltuk. A BCECF-fel töltött mitokondrium 90 percig használható fel. A fluoreszcens mérések során 3 ul töltött mitokondriumot hígítottunk 2 ml mérőoldatban ('A' vagy 'B'). A fluoreszcenciát PTI Deltascan fluoriméterrel (440 és 505 nm excitációs hullámhosszon, 540 nm emissziós hullámhosszon) detektáltuk. A BCECF bizonyos százaléka a mérés folyamán „kifolyik" a mitokondriumból; ennek mennyiségét a következőképpen határoztuk meg: a töltött mitokondriumból centrifugálást követően maradt felülúszó fluoreszcenciáját mértük és az így kapott értéket kivontuk az adott mérési eredményekből. Az pH_{in} és pH_{extra} kiegyenlítéséhez egy ún. koktélt alkalmaztuk, amely 8 µM nigericint (K^+/H^+ antiporter), 2.5 µM gramicidint (Na^+ és K^+ ionofór) és 8 µM monensint (Na^+/H^+ antiporter) tartalmazott [237]. A fluoreszcens jel kalibráláshoz KOH-t használtunk.

4.10 A NAD(P)H autofluoreszcencia meghatározása

A NAD(P)H autofluoreszcenciájának meghatározása 344 nm excitációs és 460 nm emissziós hullámhosszon történt 37 ^{o}C-on PTI Deltascan fluoriméterrel (Photon Thechnology International; Lawrenceville, NJ) a mitokondriális oxidációnál leírt mérőoldat *A*-t használva. Az ábrákon a NAD(P)H-szint változásait a következő mértékegységgel fejeztük ki: fotonok száma * 10^3.

4.11 A metilénkék abszorbanciájának meghatározása

A MB oxidált és redukált formájának abszorbanciáját 660 nm-en detektáltuk JASCO V-650 spektrofotométerrel (ABL&E-JASCO, Tokió, Japán) [238]. Az abszorbancia növekedése a MB oxidációjára utal, míg csökkenése a MB redukcióját jelöli. A mérések során 0.1 mg/ml mitokondriumot használtunk. A kísérletekhez használt

mérőoldat összetevője a következő volt: 0.1 mM EGTA, 125 mM KCl, 20mM HEPES, 2 mM K_2HPO_4, 1 mM $MgCl_2$ és 0.025 % BSA (zsírsav-mentes); pH 7.0. MB-t (2 μM) a mérés kezdetekor adtuk az oldathoz.

4.12 Oldatok

A MB-kel végzett kísérleteknél a következő összetételű oldatot használtuk, amit a továbbiakban *mérőoldat A*-nak hívok (mM-ben kifejezve): 0.1 EGTA, 125 KCl, 20 HEPES, 2 K_2HPO_4, 1 $MgCl_2$ és 0.025% BSA; pH = 7.0.

A *pmf* komponenseinek „szétválasztásához" két ionofórt használtunk: valinomycin és nigericin. A megfelelő hatás elérése érdekében a két ionofórhoz különböző K^+ koncentrációjú oldatot készítettünk.

A nigericinnel végzett kísérletek esetén az alapoldat magas K^+ tartalmú volt és megegyezett a metilénkékes mérések során használt oldattal, így ezt továbbiakban is *mérőoldat A*-nak hívom.

Mérőoldat B: A valinomycinnel végzett mérések során alacsonyabb K^+ koncentrációjú oldatot használtunk, hogy elkerüljük a mitokondrium duzzadását. Az oldat összetétele a következő volt (mM-ben kifejezve): 240 szaharóz, 10 TRIS, 2 KH_2PO_4, 4 KCl, 0.1 EGTA, 1 $MgCl_2$ és 0.025 % BSA. A kísérletek során a KCl-t utólag adtuk az oldathoz. Az oldatok pH-értékét mitokondrium nélkül, mérés előtt állítottuk be HCl-val és NaOH-dal a következő értékekre 6.4, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6 és 8.0. Az pH_{in} mérések alapján a mérőoldat pH-elektróddal beállított pH-ja (mitokondrium nélkül) nem egyezik meg a mitokondrium és légzési szubsztrát jelenlétében mért pH-értékekkel, ugyanis a mitokondrium és a szubsztrátok a médiumhoz adva eltolják annak pH-értékét. A ΔpH helyes kiszámításához a mitokondrium jelenlétében mért pH értéket vettem alapul.

4.13 Statisztika

A statisztikai számításokat egytényezős varianciaanalízis (ANOVA= Analysis Of Variancia; SigmaPlot™, Version 11, Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) segítségével hajtottuk végre. Az adatokat minimum négy független mérésből számoltuk

és a következőképpen adtuk meg: az átlag ± az átlag hibája (standard error of mean), ahol a szignifikanciaszint $*p < 0.05$ vagy $***p < 0.001$.

4.14 Vegyszerek

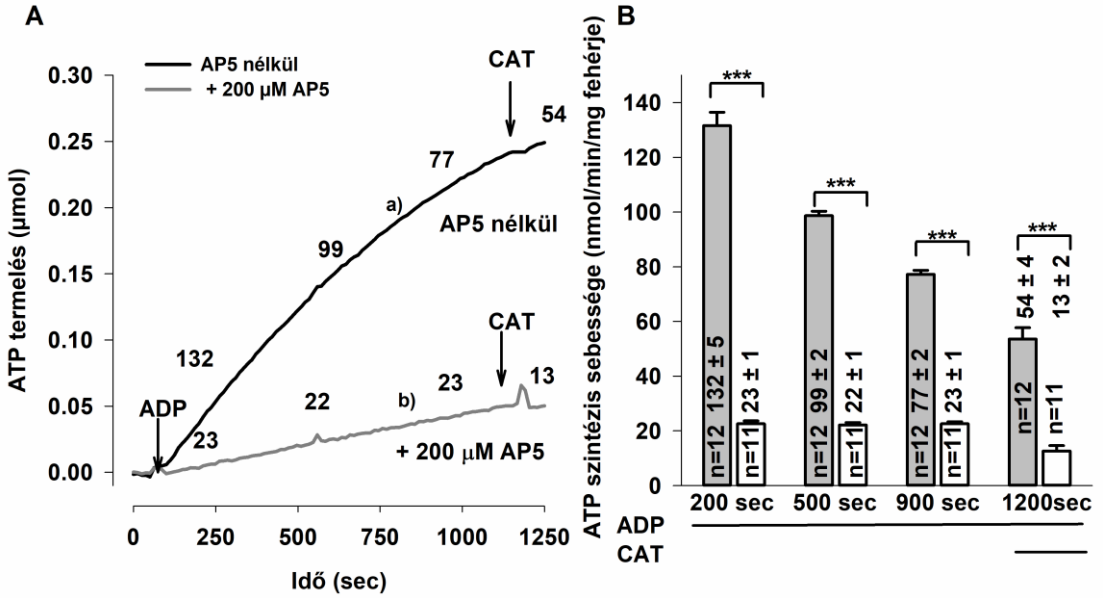
Az összes laboratóriumi vegyszer a Sigma Aldrich (St. Loius, MO, USA) cégtől származik. Az ADP-t a Merck (Darmstadt, Németország) cégtől szereztük be. Az Amplex UltraRed és a BCECF-AM festéket a ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) cégtől rendeltük.

5. Eredmények

5.1 A metilénkék hatása a mitokondriális szubsztrát-szintű foszforilációra

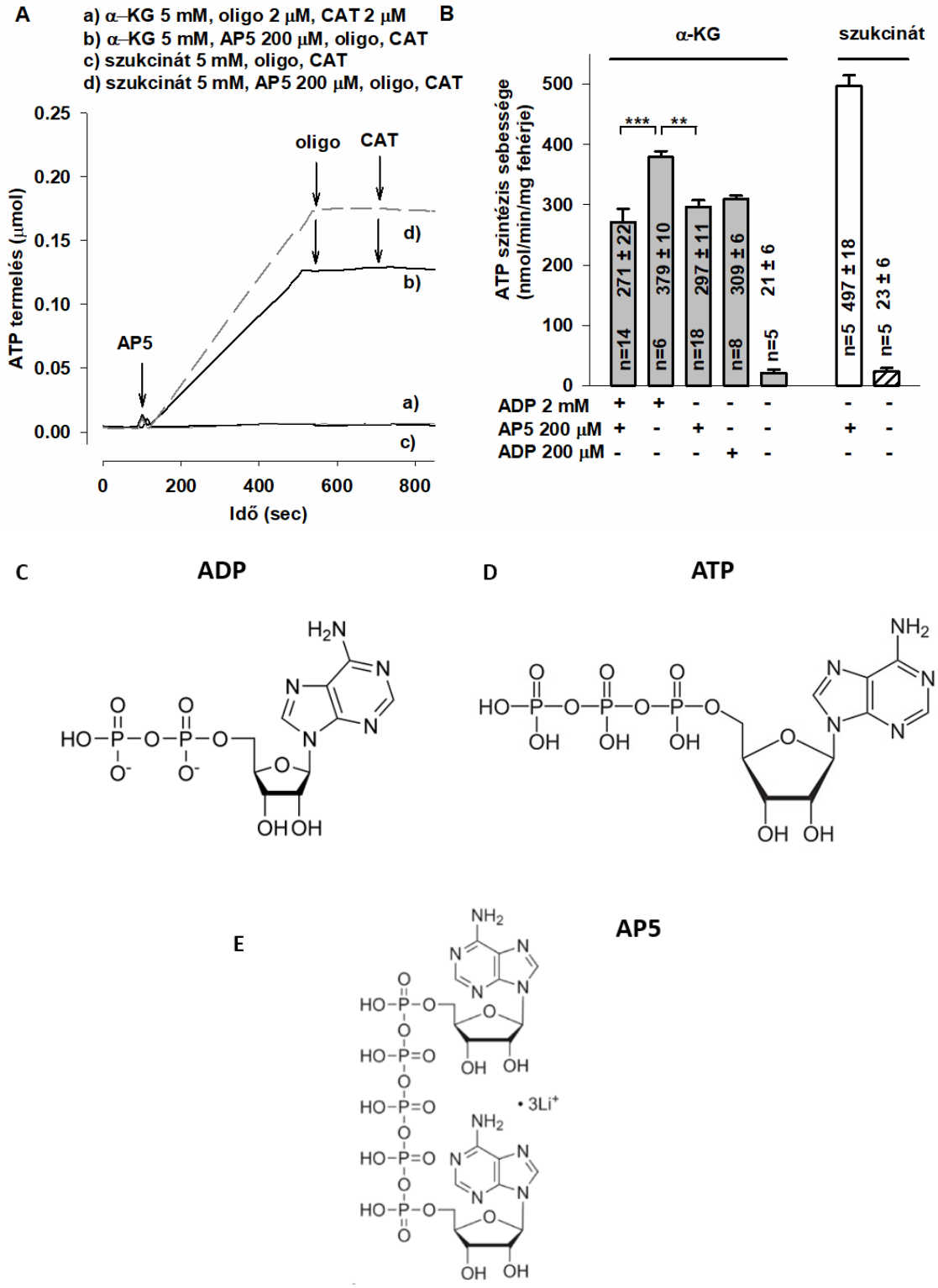
5.1.1 Az adenilát-kináz hozzájárulása a mitokondriális ATP termeléshez

Az adenilát-kináz (AK) enzim mitokondriális altípusai -mint ahogy már a bevezetőben kifejtettem- nagy mértékben hozzájárulnak a mitokondriális ATP termeléshez az OXPHOS és a SSF mellett. Az AK enzim jelentőségét úgy bizonyítottuk, hogy izolált mitokondriumokhoz ADP-t adtunk és légzési szubsztrát hozzáadása nélkül is jelentős mértékű ATP termelést detektálunk. Az AK által szintetizált ATP így nagymértékben hozzájárul a kapcsolt enzimrendszerrel detektált mitokondriális ATP termeléshez, ezért az AK aktivitását specifikus gátlószerével, AP5-tel csökkentettük. A mérések során 200 µM AP5-t alkalmaztunk, ami hatékonyan gátolta az enzimet, de nem befolyásolta az OXPHOS-t. Ez az AP5 koncentráció 83%-kal gátolta az AK-függő ATP termelést a mérés első 3 percében (*10. ábra*). A fennmaradó ATP termelés (22-23 nmol/min/mg protein) még tovább volt gátolható AP5-tel, de az AP5 nagyobb koncentrációban alkalmazva a mitokondriumra nézve toxikus volt. Az ADP/ATP transzporter (adenin nukleotid transzlokáz; ANT) specifikus inhibitora, a karboxiatraktilát (CAT) kismértékben csökkentette az ATP szintézis sebességét AP5 jelenlétében és anélkül is, ami arra utal, hogy jórészt a belső membrán külső részén elhelyezkedő AK által termelt ATP járul hozzá a detektált ATP termeléshez (*10. ábra, A és B*), nem pedig a mitokondriális mátrixban vagy az intermembrán térben jelenlévő AK izoformák.



10. ábra: Az ATP termelés sebessége az idő függvényében izolált agyi mitokondriumokon az adenilát-kináz gátló, AP5 (200 μM) jelenlétében és hiányában, légzési szubsztrátok hozzáadása nélkül. A mitokondriumokat (0.1 mg/ml) az Anyagok és módszerek fejezetnél leírt mérőoldat A-ban szuszpendáltuk. A mitokondriumokhoz a megjelölt időpontban ADP-t (2 mM) adtunk. Az ábrán látható számok az ATP termelés sebességét jelölik nmol/min/mg fehérje egységben. Eredeti mérési görbét az A) ábrán tüntettünk fel: az **a** görbe az ATP szintézis sebességét mutatja AP5 nélkül, míg a **b** görbe 200 μM AP5 jelenlétében. A B) ábrán az eredmények 4 mérés átlagát ± az átlag standard hibáját jelölik (n>4) nmol/min/mg fehérje egységben az oszlopokra írva. A *** a szignifikáns különbséget jelöli a kontrollhoz képest ($p < 0.001$).

Méréseink során azonban az AP5 további, nem-specifikus hatásaira is fény derült. A *11. ábrán* látható mérések során az AP5-t hatását vizsgáltuk légzési szubsztrátok, szukcinát és α-KG jelenlétében. 2 mM ADP jelenlétében magasabb ATP szintézist lehetett detektálni, mint 2 mM ADP és 200 μM AP5-tel (az AP5 már előzőleg a küvettában volt) α-KG jelenlétében (*11. ábra, B panel*). Ha megváltoztattuk a reagensek hozzáadásának sorrendjét és az AP5-t a szukcinát vagy az α-KG után adtuk a mitokondriumhoz, akkor az ATP termelés jelentősen emelkedett, habár ADP nem volt a küvettában (*11. ábra, A panel, d és b görbe;* és *B panel*).



11. ábra: Az AP5 hatása az ATP termelésre α-ketoglutaráttal (A; b görbe) és szukcináttal (A; d görbe) energetizált mitokondriumokban NADPH abszorbancia-változását követve (lásd Anyagok és módszerek). A mitokondriumokat (0.05 mg/ml) az Anyagok és módszerek fejezetnél leírt mérőoldat A-ban inkubáltuk. Az AP5 (200 μM), az α-

ketoglutarát (α-KG;5 mM), a szukcinát (5 mM), az oligomycin (2 μM) és a karboxiatraktilát (CAT; 2 μM) hozzáadását nyilak jelölik. Eredeti mérésekből készült reprezentatív görbéket az A) ábra mutatja. A B) ábrán látható eredmények 4 mérés átlagát ± az átlag standard hibáját jelölik (n>4) nmol/min/mg fehérje egységben az oszlopokra írva. A ** és a *** a szignifikáns különbséget jelöli a kontrollhoz képest (**p <0.01; ***p <0.001). A C) ábrán az ADP, a D) ábrán az ATP és a C) ábrán az AP5 képlete látható.

Forrás: ADP:https://hu.m.wikipedia.org/wiki/Fájl:ADP_chemical_structure.png;
ATP: https://biologydictionary.net/atp/;
AP5:http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d6392?lang=hu&region=HU.

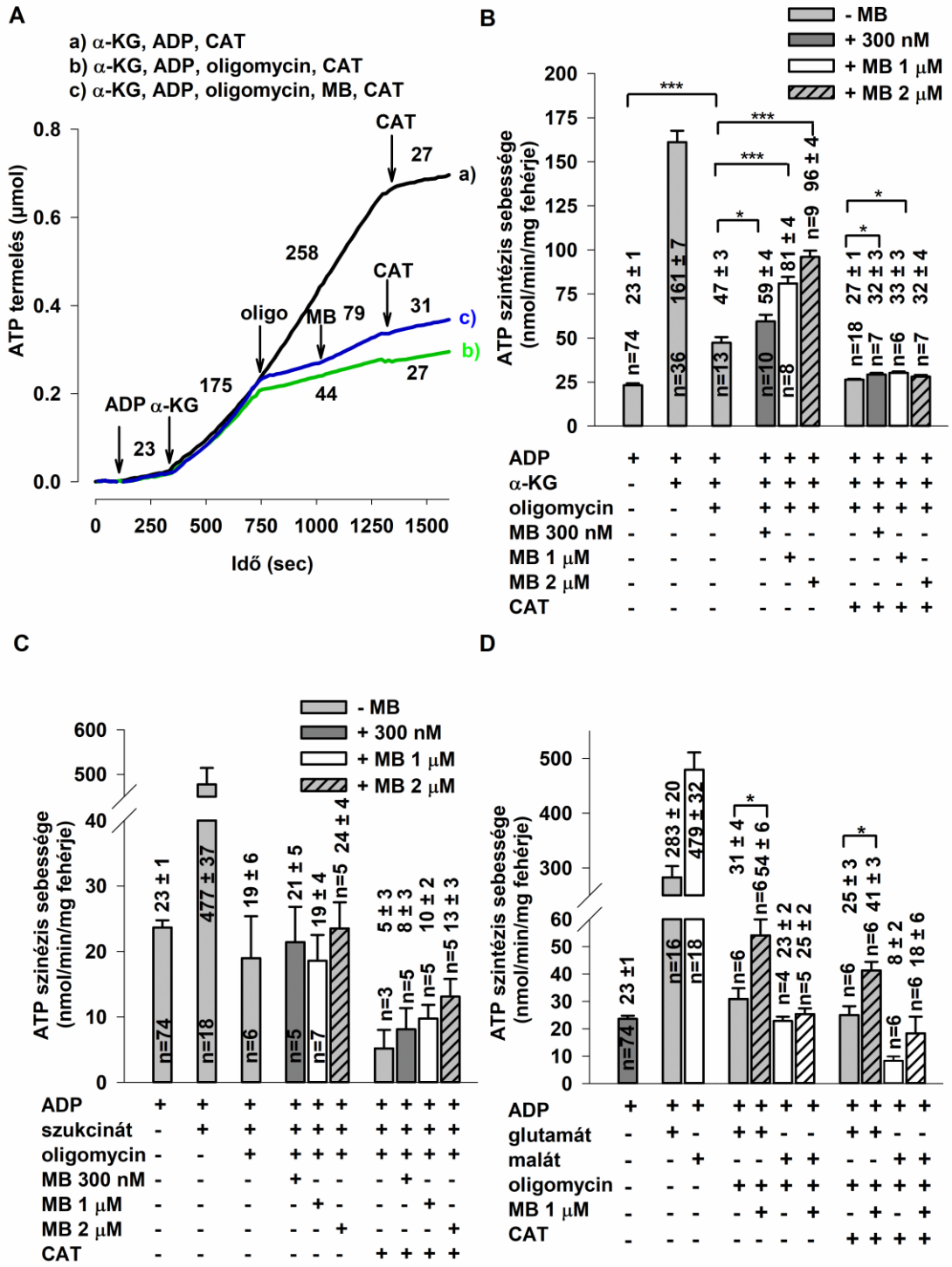
Oligomycin hatására csökkent a NADPH termelődése, azaz az ATP termelés sebessége, ami az ATP-szintáz közreműködésére utal. Az AP5 NADPH szintet fokozó hatása magyarázható azzal, hogy az AP5 szerkezetéből adódóan *(11. ábra E)* ADP-re *(11. ábra C)* és ATP-re *(11. ábra D)* bomlik el. A felszabaduló ADP pedig átalakul ATP-vé az ATP-szintáz által katalizált reakcióban a mitokondriális OXPHOS során légzési szubsztrát jelenlétében. Az ATP-szintáz K_m-értéke ADP-re 6-10 μM [239], ami azt mutatja, hogy akár a 200 μM AP5-ből felszabaduló ADP is nagy mértékű ATP szintézishez vezethet. A kísérleteink során azonban minden esetben nagy mennyiségű ADP-t alkalmaztunk, ami telítette az ATP-szintázt, így az AP5-ből felszabaduló kis mennyiségű ADP már nem befolyásolta a méréseket.

5.1.2 A metilénkék hatása a szubsztrát-szintű foszforilációra izolált agyi mitokondriumokban

Munkacsoportunk korábbi tanulmányaiból kiderül, hogy a MB légzési lánc károsodás esetén MB 1 és 2 μM koncentrációban alkalmazva fokozta az ATP termelést a CI gátlása esetén glutamát és maláttal vagy CIII gátlása esetén szukcináttal energetizált mitokondriumban, viszont hatástalannak tűnt egészséges, teljesen működőképes, kontroll mitokondriumokban [98]. Így felmerült a MB hatásának vizsgálata a szukcinát-tiokináz enzim által katalizált citrátköri reakcióban, amely a mitokondriális SSF-t támogatja. Ugyanis a SSF-nek nagy jelentősége van légzési lánc károsodás során, mivel az enzim a

pmf-től függetlenül képes ATP termelésre. Munkám során a korábbi méréseink alapján hatásosnak bizonyult 300 nM, 1 μM és 2 μM MB hatását vizsgáltuk a SSF-ra ATP-szintáz gátlása esetén agyi mitokondriumokon.

Mint ahogy a bevezetésben említésre került, három fő mitokondriális ATP forrást lehet elkülöníteni: 1.) OXPHOS, 2.) SSF és 3.) AK által katalizált reakcióban keletkezik ATP. Az előző fejezetben leírtak alapján az AK ATP termeléshez történő hozzájárulását ~80%-kal csökkentettük 200 μM AP5 hozzáadásával. Az OXPHOS-t oligomycinnel, az ATP-szintáz (F_o, F_1 ATP-szintáz) specifikus gátlószerével gátoltuk, így az ATP termelés kizárólag a SSF-nak és AK enzimaktivitásából származó ATP-nek tulajdonítható (~20%). A SSF bruttó ATP termeléshez való hozzájárulását a légzési szubsztrátok, ADP és oligomycin jelenlétében detektált ATP szintézisének (alapszintű SSF), valamint a légzési szubsztrátok és ADP jelenlétében mért ATP termelés különbségeként számítottuk ki.



12. ábra: A MB hatása az ATP szintézis sebességére α-ketoglutaráttal (A,B), szukcináttal (C), glutamáttal (D) és maláttal (D) energetizált izolált agyi mitokondriumokban. Minden mérés AP5 (200 µM) jelentlétében készült. A mitokondriumokat (0.05 mg/ml) az

Anyagok és módszerek fejezetnél leírt mérőoldat A-ban inkubáltuk. Az ADP (2 mM), az oligomycin (2 μM), a MB (300 nM, 1 μM, 2 μM) és a karboxiatraktilát (CAT; 2 μM) hozzáadását nyilak jelölik. Az eredeti mérési görbék az A) ábrán láthatók. A számok az adott mérésekre jellemző ATP szintézis sebességét fejezik ki nmol/min/mg fehérje egységben. A B), C) és D) ábrán látható eredmények 4 mérés átlagát ± az átlag standard hibáját jelölik (n>4) nmol/min/mg fehérje egységben az oszlopokra írva. A * és a *** a szignifikáns különbséget jelöli a kontrollhoz képest (*p <0.05; ***p <0.001).

Az α-KG-tal energetizált agyi mitokondriumokban az alapszintű SSF, azaz oligomycin jelenlétében, de MB nélkül mért ATP szintézis sebessége (47±3)-(23±1)=24±2 nmol/min/mg fehérje (*12. ábra A,B*) volt. A MB ATP termelésre kifejtett fokozó hatása α-KG esetén koncentráció-függő (*12. B ábra*). Az oligomycin, ADP és α-KG jelenlétében mért mitokondriális ATP termelés 26%-kal (47±3-ról 59±4 nmol/min/mg fehérjére), 72%-kal (47±3-ről 81±4 nmol/min/mg fehérjére) és 104%-kal (47±3-ről 96±4 nmol/min/mg fehérjére) növekedett 300 nM, 1 μM és 2 μM MB hatására (*12. B ábra*). Az ANT gátlószerét, CAT-t hozzáadva az ATP szintézis közel a kontroll szintre csökkent (ADP, α-KG és oligomycin jelenlétében). Ez a jelenség azt bizonyítja, hogy a termelődött ATP jórészt mitokondriális forrásból származott.

A glutamáttal energetizált mitokondriumokban alacsony alapszintű SSF-t ((31±4)-(23±1)=8±2 nmol/min/mg fehérje) lehetett mérni. Azonban a MB (1 μM) az α-KG-nál tapasztaltakhoz hasonlóan jelentős mértékben emelte az ATP szintézist 31±4-ről 54±6 nmol/min/mg fehérje egységre *(12. D ábra)*.

A szukcináttal lélegeztetett mitokondriumokban nem volt detektálható alapszintű SSF, és MB hatására sem növekedett az ATP termelés oligomycin jelenlétében (*12.C ábra*). MB hiányában az ATP szintézis sebessége 19±6 nmol/min/mg fehérje volt, ami nem változott szignifikánsan MB hozzáadására sem: 300 nM MB-kel 21±5 nmol/min/mg fehérje; 1 μM MB-kel 19±4 nmol/min/mg fehérje és 2 μM MB-kel 24±4 nmol/min/mg fehérjét mértünk. Ezek alapján elmondható, hogy a szukcinát nem támogatja a citrátköri SSF-t.

Malát jelenlétében a szukcináthoz hasonlóan nem volt mérhető alapszintű SSF izolált agyi mitokondriumban. Továbbá a MB (1 μM) nem serkentette az ATP termelés

sebességét az ATP-szintáz gátlása esetén maláttal lélegeztetett mitokondriumokban (*12. D ábra*). Ezek a megfigyelések ugyancsak arra utalnak, hogy a malát nem támogatja a mitokondriális SSF-t.

Rigoulet [240] és mtársai 1985-ben megjelent cikkükben a szétkapcsolószerek mitokondriális SSF-t fokozó hatásáról számolnak be. Így kontrollként mi is megvizsgáltuk a szétkapcsolószer, FCCP hatását az α-KG-tal energetizált, oligomycinnel kezelt agyi mitokondriumok ATP termelésére. α-KG és oligomycin jelenlétében, 50 nM FCCP (MB nélkül) az ATP szintézis sebességét 47±3 nmol/min/mg fehérjéről 103±13 nmol/min/mg fehérjére növelte (az eredményeket nem ábrázoltuk).

5.1.3 A metilénkék hatása a mitokondriális oxigénfogyasztásra izolált agyi mitokondriumokban

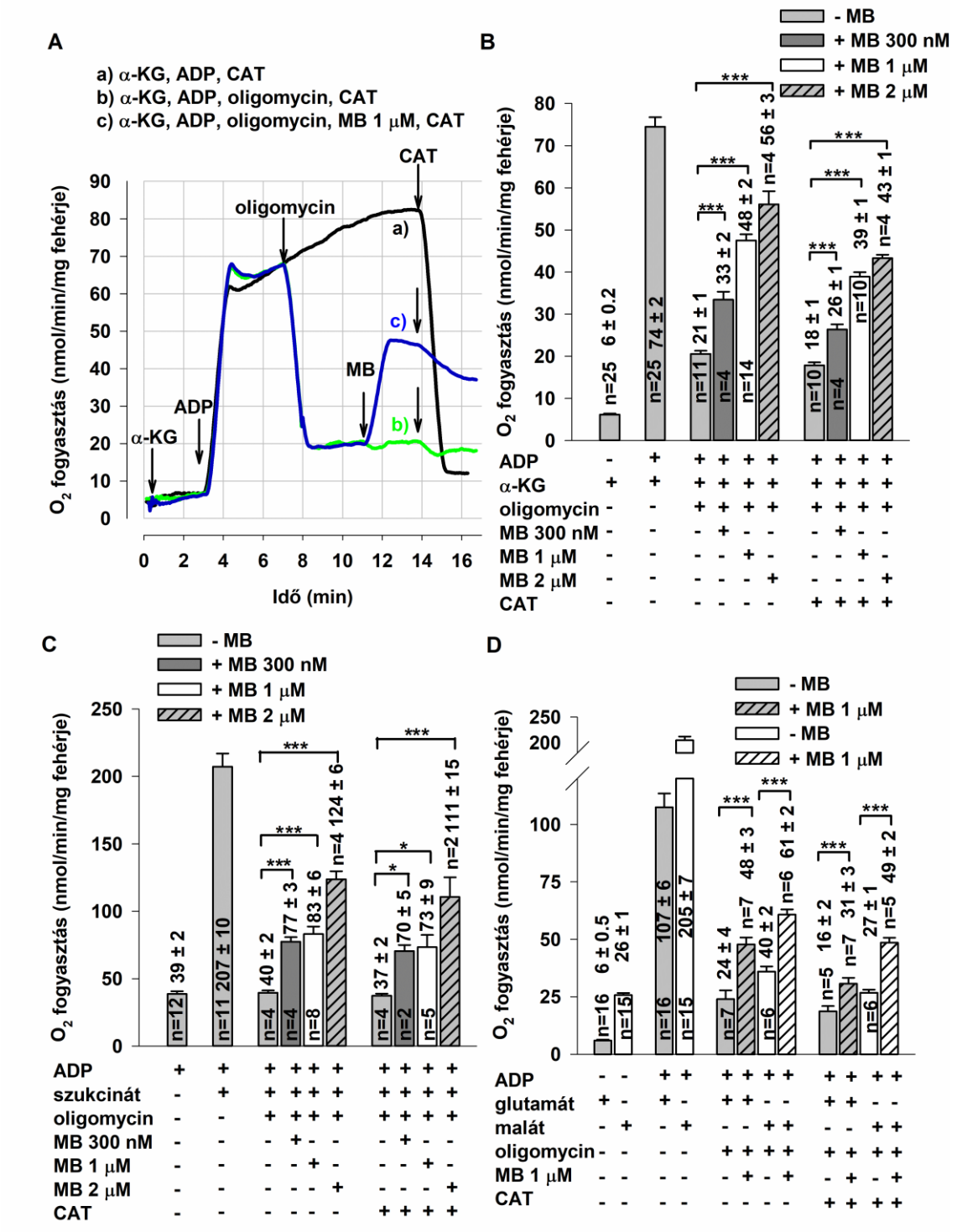
Korábbi méréseink alapján elmondhatjuk, hogy a MB egészséges, intakt agyi mitokondriumok O_2 fogyasztását nem befolyásolja, míg légzési lánc károsodás esetén a MB mentőútvonalat biztosítva fokozza a mitokondriális légzést [98]. A MB *hormetikus* farmakológiai dózis-hatás görbéjét figyelembe véve a MB-t alacsony dózisban (300 nM, 1 μM és 2 μM) alkalmaztuk, ugyanis magasabb dózisban gátló hatást fejt ki. Az O_2 fogyasztásnál alkalmazott mérési körülmények kisebb módosításokkal megegyeztek az ATP termelés mérésénél leírtakkal (lásd: Anyagok és módszerek).

Az izolált agyi mitokondriumhoz először alaplégzést indukálva légzési szubsztrátot adtunk, majd ADP (2 mM) hatására a légzés és az OXPHOS jelentősen megemelkedett. A folyamatot az ATP-szintáz gátlószerének, oligomycinnek a hozzáadásával gátoltuk, ami a redukáló ekvivalensek, a NADH és a $FADH_2$ (szukcinát esetén) felhalmozódásához vezetett. A MB hatására a NADH-($FADH_2$) szint csökkent, ugyanis a MB eltávolítja az elektronokat a NADH-ról (vagy a $FADH_2$-ről) és az elektronszállító molekulára, a citokróm c-re szállítja. A mérések végén CAT-ot adtunk, ami gátolja az ADP bejutását és így a mitokondriális légzést.

A MB az α-KG-tal energetizált, oligomycinnel kezelt mitokondriumokban koncentráció-függően serkentette a légzést (*13. A,B ábra*). 300 nM MB 57%-kal, 1 μM MB 129%-kal, míg 2 μM MB 167%-kal fokozta az oxigénfogyasztást oligomycin jelenlétében. CAT hatására csökkent az intramitokondriális ADP mennyisége, ami a légzés gátlásához vezetett.

A szukcináttal lélegeztetett agyi mitokondriumok oxigénfogyasztását 300 nM MB 93%-kal, 1 μM MB 108%-kal, míg 2 μM MB 210%-kal fokozta az ATP-szintáz gátlása esetén (*13.C ábra*). Azonban a CAT nem csökkentette a légzést, ami a SSF hiányára utalhat.

A MB a glutamáttal energetizált mitokondriumok oxigénfogyasztását 100%-kal fokozta (24±4-ről 48±3 nmol/min/mg fehérjére) oligomycin jelenlétében (*13.D ábra*). Az ANT gátlása CAT-tal, gátolta az oxigénfogyasztást 48±3-ról 31±3 nmol/min/mg fehérjére a MB-kel kezelt mitokondriumban (adatokat nem ábrázoltuk). Ahogy a *13. D ábrán* látható a maláttal lélegeztetett mitokondriumok oxigénfogyasztása 52%-kal nőtt 40±2-ról 61±2 nmol/min/mg fehérjére. A CAT, a szukcinát jelenlétében tapasztaltakhoz hasonlóan, nem csökkentette a légzést maláttal sem, ami ugyancsak a SSF hiányára utalhat (az adatokat nem ábrázoltuk).

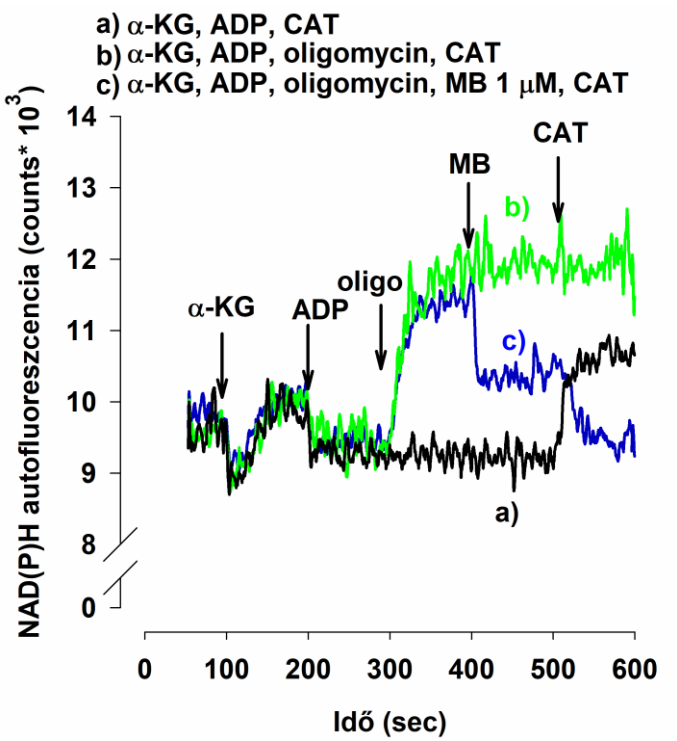


13. ábra: A MB hatása az oxigénfogyasztásra az α-ketoglutaráttal (α-KG; A, B), szukcináttal (C), glutamáttal (D) és maláttal (D) energetizált izolált agyi mitokondriumokban. Minden mérés AP5 (200 μM) jelentlétében készült. A

mitokondriumokat (0.1mg/ml) az Anyagok és módszereknél leírt mérőoldat A-ban inkubáltuk. Az ADP (2 mM), oligomycin (2 μM), MB (300 nM, 1 μM, 2 μM) és karboxiatraktilát (CAT; 2 μM) hozzáadását nyilak jelölik. Az eredeti mérési görbék az A) ábrán láthatók. A MB hatását (**c** görbe) hasonlítottuk össze a kontroll görbékkel (**a** görbe: oligomycin és MB nélkül; **b** görbe: MB nélkül). A számok az adott mérésekre jellemző ATP szintézis sebességét fejezik ki nmol/min/mg fehérje egységben. A B), C) és D) ábrán látható eredmények 4 mérés átlagát ± az átlag standard hibáját jelölik (n>4) nmol/min/mg fehérje egységben az oszlopokra írva. A * és a *** a szignifikáns különbséget jelöli a kontrollhoz képest (*p <0.05; ***p <0.001).

5.1.4 A metilénkék hatása a NAD(P)H-szintre

A NAD(P)H autofluoreszcencia mérésénél ugyanazt a protokollt alkalmaztuk, mint az előző bekezdésben. Az alaplégzést α-KG-tal indukáltuk, ami a NAD(P)H-szint emelkedéséhez vezetett (*14. ábra*). ADP hozzáadásával az oxigénfogyasztás és az OXPHOS növekedett, ami a NAD(P)H-szint csökkenésében nyilvánult meg. Oligomycin hatására azonban emelkedett a NAD(P)H-szint, majd a MB (1 μM) szignifikánsan csökkentette a NAD(P)H autofluoreszcenciát (*14.ábra, c görbe*). MB-kel és oligomycinnel kezelt mitokondriumban a CAT tovább csökkentette a NAD(P)H-szintet, míg MB nélkül a CAT nem fejtett ki hatást a NAD(P)H-szintre ATP-szintáz gátlása esetén α-KG-tal (*14.ábra, b görbe*). Ezek a kísérletek azt bizonyítják, hogy a MB képes oxidálni az intramitokondriális NAD(P)H-t.

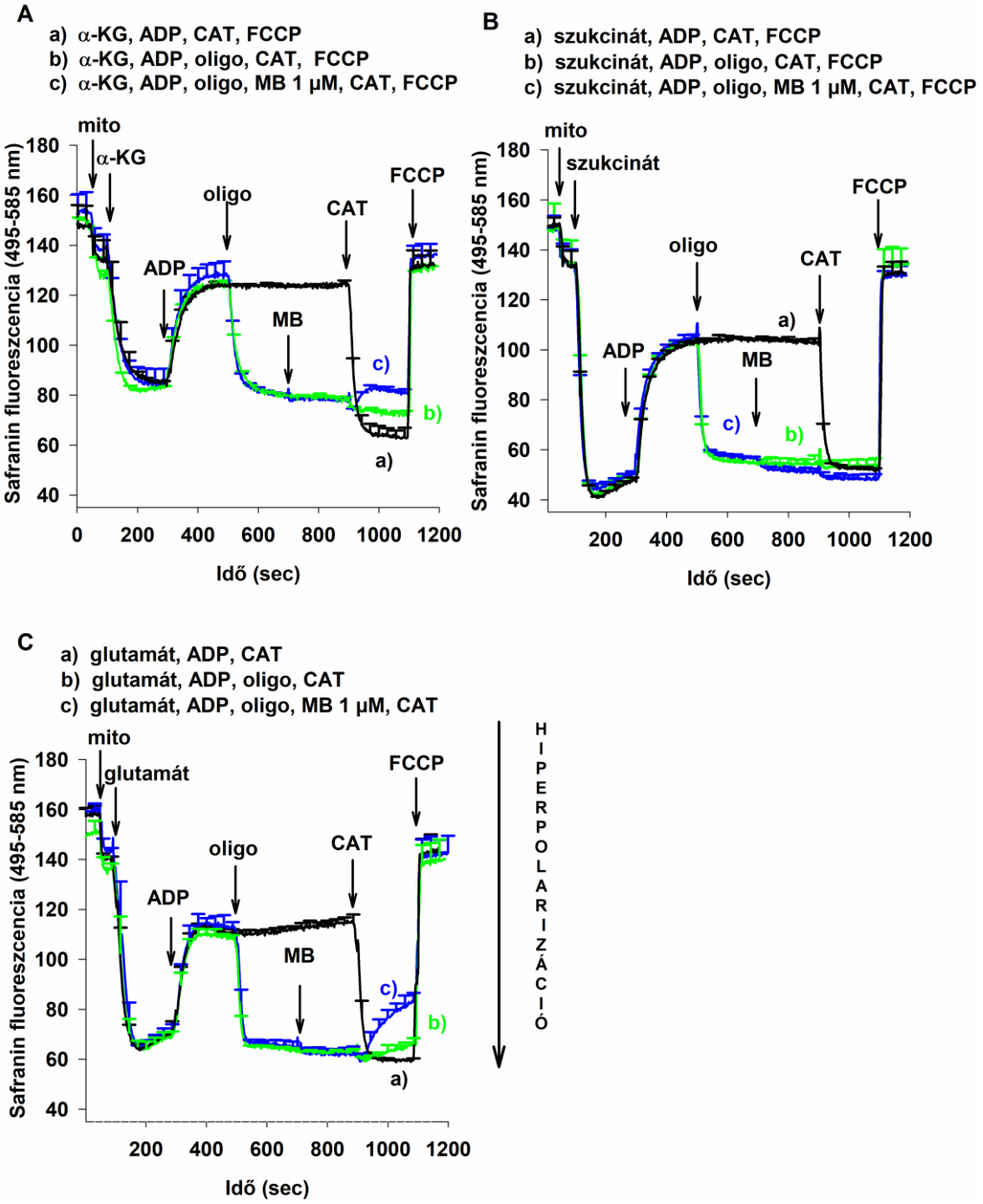


14. ábra: A MB hatása a NAD(P)H autofluoreszcenciára az α-ketoglutaráttal energetizált izolált agyi mitokondriumokban. Minden mérés AP5 (200 μM) jelentlétében készült. A mitokondriumokat (0.1 mg/ml) az Anyagok és módszereknél leírt mérőoldat A-ban inkubáltuk. Az ADP (2 mM), oligomycin (2 μM), MB (1 μM,) és karboxiatraktilát (CAT; 2 μM) hozzáadását nyilak jelölik. A MB hatását (**c** görbe) hasonlítottuk össze a kontroll görbékkel (**a** görbe: oligomycin és MB nélkül; **b** görbe: MB nélkül).

5.1.5 A metilénkék hatása a mitokondriális membránpotenciálra ($\Delta\psi_m$)

A $\Delta\psi_m$-t egy fluoreszcens festék, safranin-O segítségével határoztuk meg α-KG-tal, glutamáttal és szukcináttal energetizált izolált agyi mitokondriumokban *(15. ábra).* A mérési körülmények megegyeztek az előző fejezetekben leírtakkal. Légzési szubsztrát hiányában a mitokondriális membrán hiperpolarizált. ADP hatására a $\Delta\psi_m$ csökken, mivel a protonok az ATP-szintáz protoncsatornáján keresztül visszakerülnek az intermembrán térből a mitokondriális mátrixba, csökkentve ezzel a *pmf*-t. Az oligomycin, gátolva az ATP-szintázt, hiperpolarizálta a mitokondriális membránt, ugyanis a protonok felhalmozódtak az intermembrán térben. α-KG-tal energetizált mitokondriumban a MB nem okozott szignifikáns változást, míg a CAT hatására a $\Delta\psi_m$ csökkent *(15.A ábra, c*

görbe). Azonban MB hiányában a CAT nem volt hatással a $\Delta\psi_m$-ra *(15.A ábra, b görbe).* Szukcináttal lélegeztetett mitokondriumban oligomycin jelenlétében a MB nem befolyásolta a $\Delta\psi_m$-t *(15.B ábra, c görbe)*. Ellentétben az α-KG-tal látottakkal, a CAT nem változtatta a $\Delta\psi_m$-t szukcináttal energetizált, oligomycinnel kezelt mitokondriumban *(15. B ábra, görbe b)*. Hasonlóan az előző két szubsztrátnál, a MB glutamát esetén sem befolyásolta a $\Delta\psi_m$-t oligomycinnel jelenlétében *(15.C ábra, görbe c).* Azonban CAT hozzáadásakor a membrán depolarizálódott hasonlóan az α-KG-tal támogatott mitokondriumban MB jelenlétében *(15.C ábra, görbe c).*



15. ábra: A MB hatása a mitokondriális membránpotenciálra α-ketoglutaráttal (α-KG, A), szukcináttal (B) és glutamáttal (C) energetizált izolált agyi mitokondriumokban safranin fluoreszcens festékkel meghatározva. Minden mérés AP5 (200 μM) jelentlétében készült. A mitokondriumokat (0.1 mg/ml) az Anyagok és módszereknél leírt mérőoldat A-ban inkubáltuk. Az ADP (2 mM), oligomycin (2 μM), MB (1 μM), karboxiatraktilát (CAT; 2 μM) és FCCP (250 nM) hozzáadását nyilak jelölik. A MB hatását (**c** görbe) hasonlítottuk össze a kontroll görbékkel (**a** görbe: oligomycin és MB nélkül; **b** görbe: MB

nélkül). Mindegyik görbe 3 egymástól független mérés átlagát ± az átlag standard hibáját mutatja.

5.1.6 A metilénkék mitokondriális hatásának összefoglalása

Az alábbi táblázat a MB oxigénfogyasztásra és ATP termelésre gyakorolt hatását foglalja össze α-KG-tal, glutamáttal, szukcináttal és maláttal energetizált mitokondriumban *(2. táblázat).*

2. táblázat A MB hatása a mitokondriális légzésre, az ATP termelésre és a szubsztrát-szintű foszforilációra (SSF) α-KG-tal, glutamáttal, szukcináttal és maláttal energetizált izolált agyi mitokondriumokban. Az eredmények és következtetések az adenilát-kináz gátló, AP5 (200 μM), az ATP-szintáz gátló oligomycin (2 μM) és ADP jelentlétében végrehajtott kísérletekből származnak.

Légzési szubsztrát	**Mitokondriális légzés**	**ATP termelés**	**SSF-t támogató szubsztrát**
α-KG	növekszik	növekszik	igen
glutamát	növekszik	növekszik	igen
szukcinát	növekszik	nincs hatás	nem
malát	növekszik	nincs hatás	nem

A következő összefoglaló táblázatban tüntettem fel a különféle vegyületek hatását a mitokondriális légzésre, ATP termelésre és $\Delta\psi_m$-ra α-KG-tal energetizált mitokondriumban *(3. táblázat).*

3. táblázat Az ADP (2 mM), az oligomycin (2 μM), a metilénkék (MB) és a karboxiatraktilát (CAT; 2 μM) hatása a mitokondriális légzésre, ATP termelésre és $\Delta\psi_m$-ra α-ketoglutaráttal (α-KG) energetizált mitokondriumban. Az első oszlopban a vegyületek a hozzáadás sorrendjében vannak felsorolva (a vastagon szedett betűk mutatják azt a vegyületet, amely végső hatását a táblázat többi oszlopában feltüntettem), míg a reagens hatását az adott mitokondriális funkcióra az ezt követő oszlopok jelölik. Rövidítések: α-KG: α-ketoglutarát, CAT: karboxiatraktilát, MB: metilénkék, SSF: szubsztrát-szintű foszforiláció.

Mitokondrium-hoz adott reagensek	**Mitokondriális légzés**	**ATP termelés**	**$\Delta\psi_m$**
α-ketoglutarát	alaplégzés	minimális növekedés	hiperpolarizáció
α-KG+**ADP**	légzés (OXPHOS)	növekedés	depolarizáció
α-KG+ ADP+**oligomycin**	gátlás	gátlás	hiperpolarizáció
α-KG+ ADP+oligomycin +**MB**	növekedés	csak SSF fokozódás	nincs hatás
α-KG+ADP+ oligomycin+**MB+ CAT**	csökkenés	csökkenés	depolarizáció
α-KG +ADP+ **CAT**	csökkenés	csökkenés	hiperpolarizáció

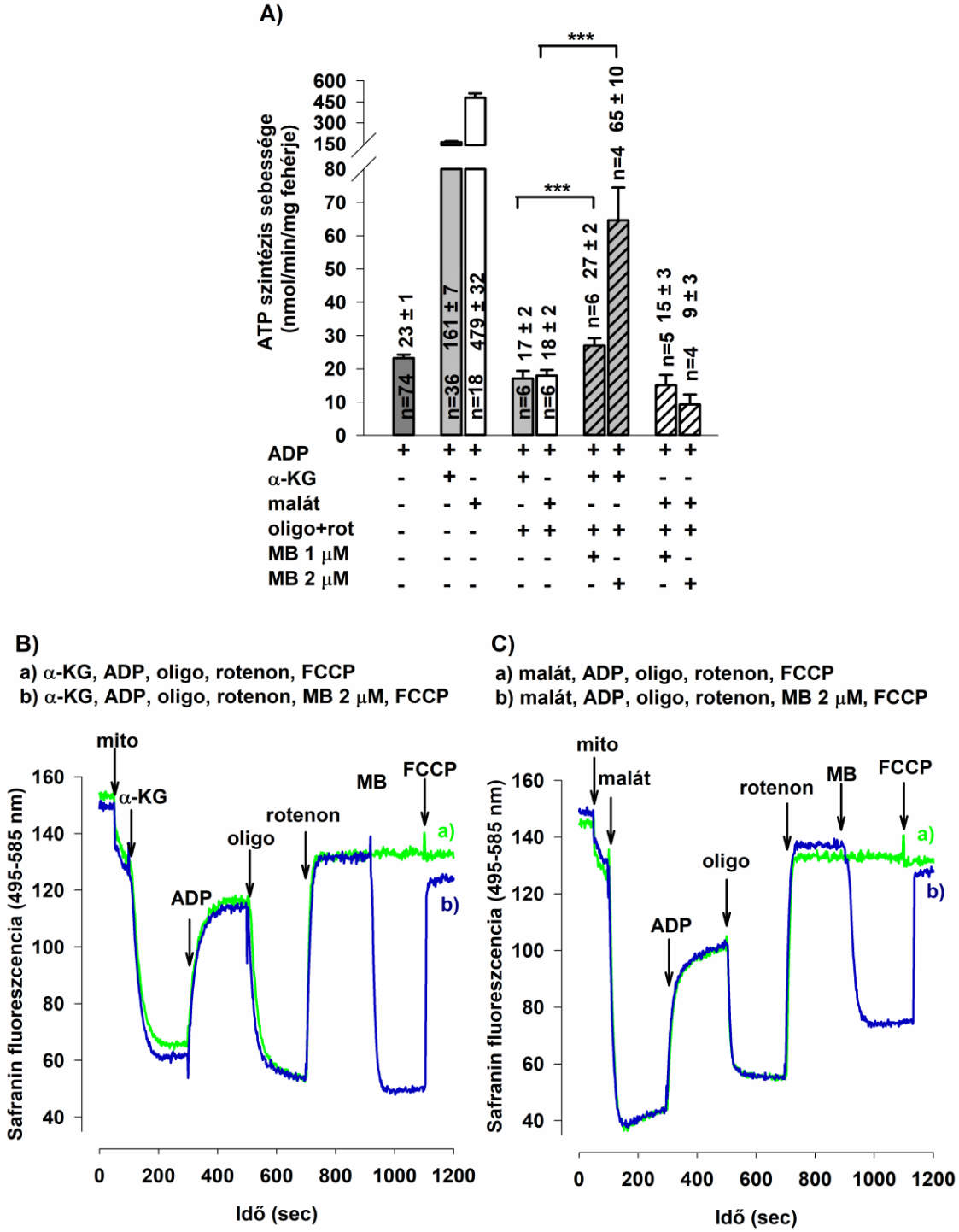
5.1.7 A metilénkék hatása komplex I és ATP-szintáz gátolt mitokondriumok működésére

Ma már elfogadott tényként tartják számon a neurodegeneratív kórképek, mint például Parkinson- vagy Alzheimer-kór mitokondriális érintettségét [25, 27]. A mitokondriális károsodás következtében kialakuló energiadeficitnek és oxidatív stressznek szerepet tulajdonítanak a betegség progressziójának felgyorsításában. A CI-ben bekövetkező mutáció több neurodegeneratív kórképben fellelhető [34, 36], ami többek között a mitokondriális oxigénfogyasztás deprivációjával jár együtt.

Munkacsoportunk korábbi tanulmánya alapján, a MB CI és CIII gátlás során javította a mitokondriális funkciót: fokozta a légzést, növelte az ATP termelést, helyreállította a $\Delta\psi_m$-t és fokozta a kalcium felvételt [98]. Jelen munkánkban arra voltunk kíváncsiak, hogy CI gátlás esetén a MB-kel fokozott SSF-val keletkezett ATP javíthatja-e a mitokondrium funkciót. Kísérleteinkben a mitokondriumokat a CI gátlószer, rotenon mellett az ATP-szintáz gátlása érdekében oligomycinnel.

A α-KG-tal és maláttal energetizált mitokondriumokhoz először ADP adásával fokoztuk az OXPHOS-t. Majd rotenon és oligomycin együttes adásakor csökkent az ATP szintézis és a légzés *(16.A ábra).* Ha ezt követően az α-KG-tal lélegeztetett mitokondriumokat 1 μM MB-kel kezeltük, akkor az ATP-szintézis 59%-kal emelkedett (17±2-ról 27±2 nmol/min/mg fehérjére), míg 2 μM MB-kel 282%-os növekedés volt megfigyelhető (17±2-ról 65±10 nmol/min/mg fehérjére). Azonban a MB hatástalannak bizonyult az ATP termelésre maláttal energetizált, rotenonnal és oligomycinnel kezelt mitokondriumok esetén *(16. A ábra).*

Ahogy már a korábbi $\Delta\psi_m$ mérések során is megfigyeltük, α-KG-tal vagy maláttal energetizált mitokondriumokban a légzési szubsztrát hozzáadására hiperpolarizálódott a membrán, majd ADP hatására depolarizálódott és az oligomycin növelte a $\Delta\psi_m$-t *(15. ábra).* A rotenon gátolva a CI-t, gátolta az elektronok áramlását a légzési láncban, így csökkentve a $\Delta\psi_m$-t. Ha ezután 2 μM MB-kel kezeltük a mitokondriumokat, akkor a $\Delta\psi_m$ helyreállt mind α-KG-tal *(16.A ábra)*, mind maláttal *(16.B ábra)* lélegeztetett mitokondriumban. A mérések végén a $\Delta\psi_m$-t FCCP adásával sötöttük ki.



16. ábra: A mitokondriális komplex I és az ATP-szintáz együttes gátlásának hatása a SSF-ra és a mitokondriális membránpotenciálra ($\Delta\psi_m$) α-KG-tal és maláttal energetizált agyi mitokondriumokban. A MB hatását az ATP szintézis sebességére az A) ábra, míg a MB hatását a $\Delta\psi_m$ -ra α-KG-tal és maláttal energetizált mitokondriumokban a B) és C) ábra mutatja. Minden mérés AP5 (200 μM) jelentlétében készült. A mitokondriumokat (0.1 mg/ml) az Anyagok és módszerek fejezetnél leírt mérőoldat A-ban inkubáltuk. Az

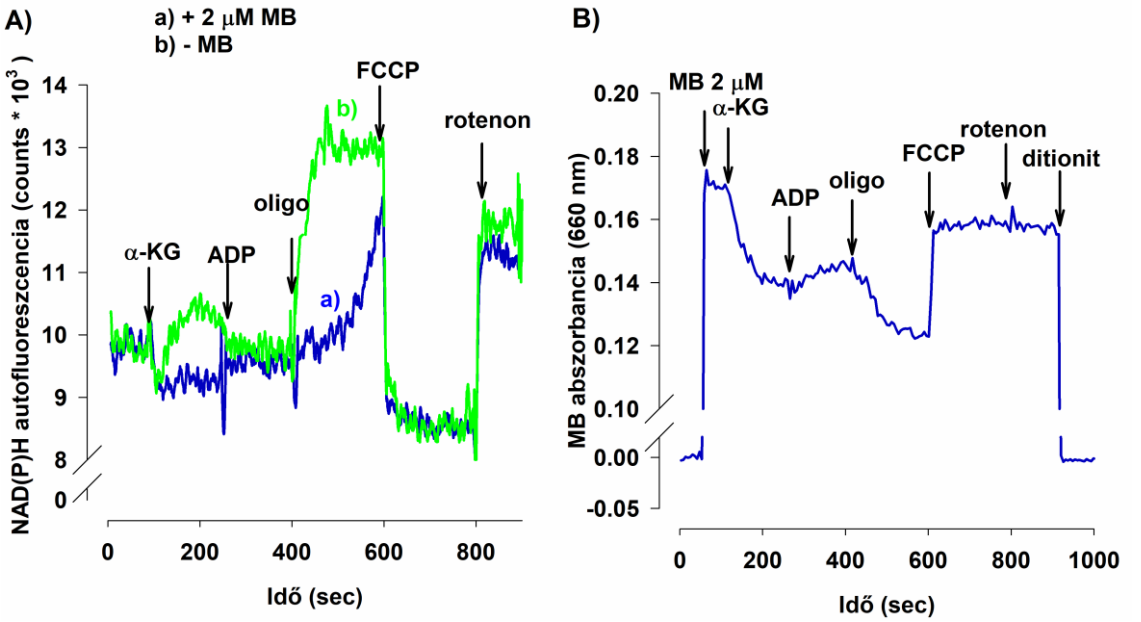
ADP (2 mM), az oligomycin (2 μM), a rotenon (1 μM), a MB (1 μM, 2 μM), a karboxiatraktilát (CAT; 2 μM) és a FCCP (250 nM) hozzáadását nyilak jelölik. A A) ábrán látható eredmények a mérések átlagát ± az átlag standard hibáját jelölik nmol/min/mg fehérje egységben az oszlopokra írva. A *** a szignifikáns különbséget jelöli a kontrollhoz képest (***p <0.001). A B) és C) ábrán feltüntetett ábrák egy-egy reprezentatív mérési görbét mutatnak MB nélkül (A) és MB jelenlétében (B).

Ezt követően a MB hatását vizsgáltuk a NAD(P)H autofluoreszcenciára oligomycin és rotenon együttes alkalmazása során. A mérési körülmények megegyeztek a korábbi fejezetben leírtakkal (5.1.4 fejezet). A MB-kel kezelt *(17.A ábra, a görbe)* és nem-kezelt *(17.A ábra, b görbe)* mitokondriumok NAD(P)H-szint változásait hasonlítottuk össze. Ahogy már korábban leírtuk, az α-KG emelte a NAD(P)H fluoreszcenciáját, míg ADP csökkentette azt és oligomycin ismételten fokozta a NAD(P)H-szintet. Az FCCP adására a NAD(P)H oxidálódott. Rotenon hatására a CI gátlás következtében a NAD(P)H felhalmozódott. Azonban a MB (2 μM) módosította a mitokondriális NAD(P)H autofluoreszcenciát. MB jelenlétében oligomycin hatására a NAD(P)H-szint csak enyhén emelkedett *(17.A ábra, a görbe),* ami azt bizonyítja, hogy a MB képes oxidálni a NAD(P)H-t.

5.1.8 A metilénkék felhalmozódása a mitokondriumban

A MB aromás gyűrűrendszerének és pozitív töltésének köszönhetően képes átjutni a mitokondriális membránokon és felhalmozódni a negatív töltésű mitokondriális mátrixban [92]. Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a MB mitokondriális felvételét, mértük az oxidált MB abszorbancia-változását izolált agyi mitokondriumokon *(17.B ábra).* A MB-t (2 μM) mindig a kísérlet elején adtuk az oldathoz. Ezt követően α-KG-t adtunk hozzá, ami csökkentette a MB abszorbanciáját, utalva a MB redukálódására és mitokondriális felvételére. Az OXPHOS-t ADP hozzáadásával indukáltuk, ami kis mértékben növelte az oxidált MB szintjét. Oligomycin hatására a mitokondriális membrán hiperpolarizálódott (*15.A ábra*), a NAD(P)H-szint emelkedett (*14. ábra*), a redukált MB koncentrációja megnőtt *(17.B ábra),* ugyanis átvette az elektronokat az oligomycin következtében felhalmozódott NAD(P)H-ról. Szétkapcsolószer, FCCP esetén

az abszorbancia maximálisan megemelkedett, ami a MB teljes mértékű oxidálódására utal. Rotenon hatására FCCP jelenlétében azonban nem történt további változás a MB abszorbanciájában. A MB teljes redukálódásához a kísérletek végén ditionitot adtunk.



17. ábra: A MB hatása a NAD(P)H autofluoreszcenciára és a metilénkék (MB) abszorbanciája intakt agyi mitokondriumokon. A MB hatását a NAD(P)H autofluoreszcenciára α-ketoglutaráttal (α-KG) lélegztetett agyi mitokondriumokon az A) ábra mutatja. Minden mérés AP5 (200 μM) jelentlétében készült. A mitokondriumokat (0.1 mg/ml) az Anyagok és módszerek fejezetnél leírt mérőoldat A-ban inkubáltuk. Az α-KG (5 mM), az ADP (2 mM), az oligomycin (2 μM), a rotenon (1 μM), a MB (2 μM), a karboxiatraktilát (CAT; 2 μM) és a FCCP (1 μM) hozzáadását nyilak jelölik. Az A) ábrán az a) görbe (kék) esetén a MB-t már a mérőoldat tartalmazta, míg a b) görbe (zöld) esetén az oldatban nem volt MB. A B) ábra a MB oxidációját mutatja α-KG-tal energetizált agyi mitokondriumban 660 nm-n mérve. Az abszorbancia növekedése a MB oxidációjára utal, míg csökkenése a MB redukcióját jelöli. A mitokondriumok a 16.A ábra a) görbéjénél leírt körülmények között voltak inkubálva. A ditionitot 900 s-nél adtuk hozzá.

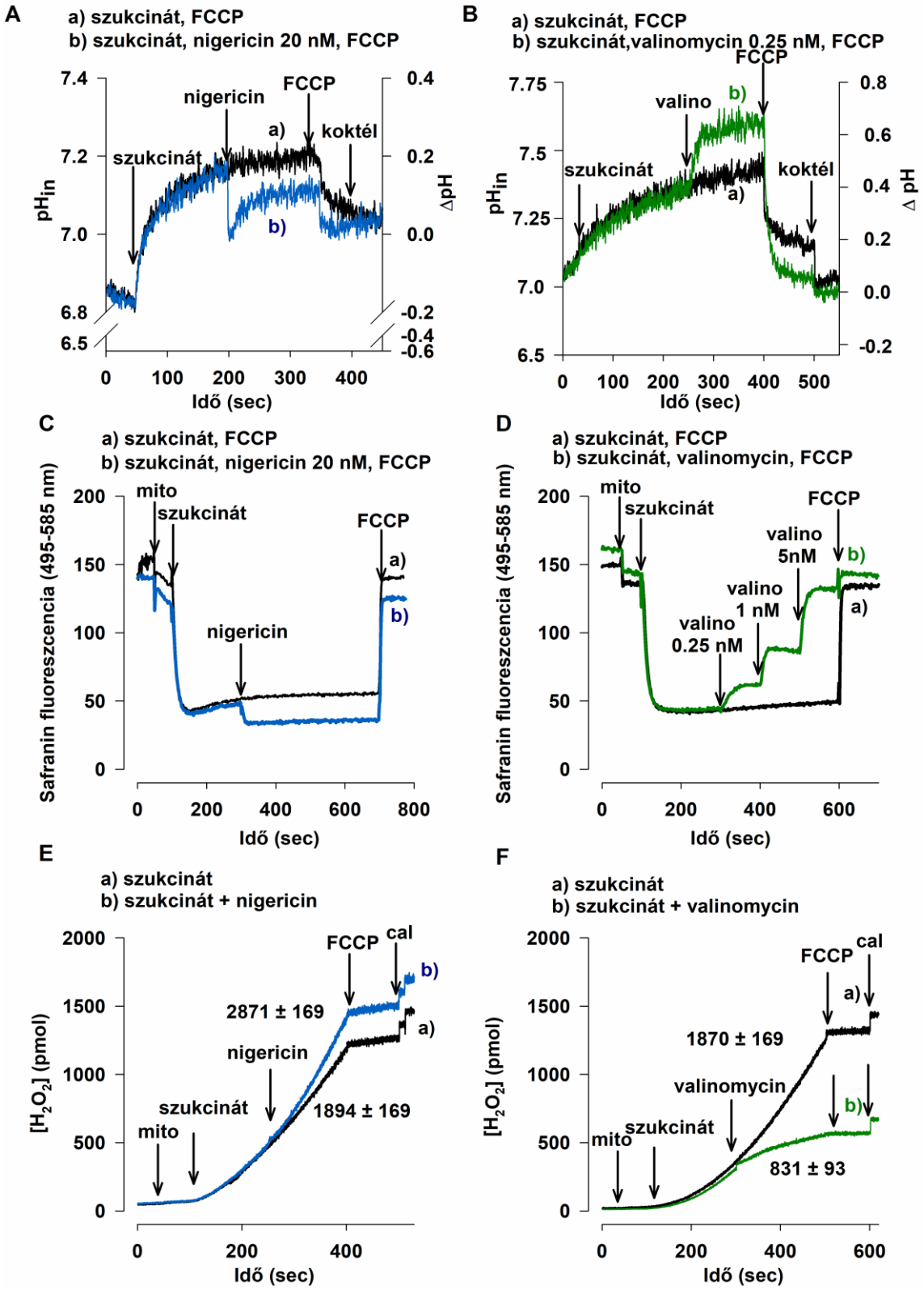
5.2 A protonmotoros erő komponenseinek, a mitokondriális membránpotenciál és a transzmembrán pH grádiens hatása a mitokondriális reverz elektron transzport által támogatott H_2O_2 termelésre agyi és szív mitokondriumokon

A *pmf* komponenseinek a szétválasztása szükséges ahhoz, hogy külön-külön tudjuk vizsgálni a két komponens, ΔpH és $\Delta\psi_m$ hatását a szukcinát és α-GP jelenlétében mért RET által támogatott H_2O_2 termelésre. A két tag elkülönítése ionofórok azaz nigericin illetve valinomycin segítségével történt. A két ionofór hatása nagymértékben függ a mérőoldat K^+ koncentrációjától. Így ennek megfelelően az Anyagok és Módszerek fejezetnél leírtak szerint a 125 mM KCl-t, azaz a magas K^+-t tartalmazó *mérőoldat A*-t használtuk a nigericin jelenlétében végzett mérésekhez. A valinomycinnel végrehajtott mérésekhez 4 mM KCl-t tartalmazó (alacsony K^+ koncentrációjú) *mérőoldat B*-t használtunk. Mindkét mérőoldat tartalmazott a megfelelő foszfátkoncentráció biztosítása érdekében 2 mM K_2HPO_4-t. Minden mérés végén szétkapcsolószert, FCCP-t adtunk a mitokondriumokhoz a $\Delta\psi_m$ csökkentése érdekében, ami egyidejűleg gátolta a szukcinát és az α-GP indukálta RET-t.

A RET magas $\Delta\psi_m$ igénye miatt a méréseket ADP nélkül végeztük el a szukcináttal vagy α-GP-vel lélegeztetett mitokondriumokban biztosítva ezzel az elektronok áramlását a CII felőle a CI irányába. Fontos megjegyezni, hogy a szukcináttal lélegeztetett mitokondriumban NADH nemcsak RET során, hanem a szukcinát citrátköri oxidációjakor is keletkezhet. Így ennek megelőzése érdekében egy másik légzési szubsztrátot, α-GP-t is alkalmaztunk, ami nem oxidálódik a citrátkörben, hanem a mitokondriális belső membrán külső részén elhelyezkedő α-GPDH oxidálja. Kísérletinkben a rotenon gátolta mind a szukcináttal, mind az α-GP-tal energetizált mitokondrium H_2O_2 termelését, ami egyben utal a RET jelenlétére is [161]. Ha nem alkalmaztunk sem rotenont, sem ADP-t a szukcinát illetve az α-GP oxidációja során az elektronok képesek a CII-ről a CIII és a CI felé is áramlani.

5.2.1 A nigericin hatása a pH_{in}-re, ΔpH-ra, a $\Delta\psi_m$-ra és a mitokondriális H_2O_2 termelésre, ha mérőoldat pH = 7.0 agyi mitokondriumokban

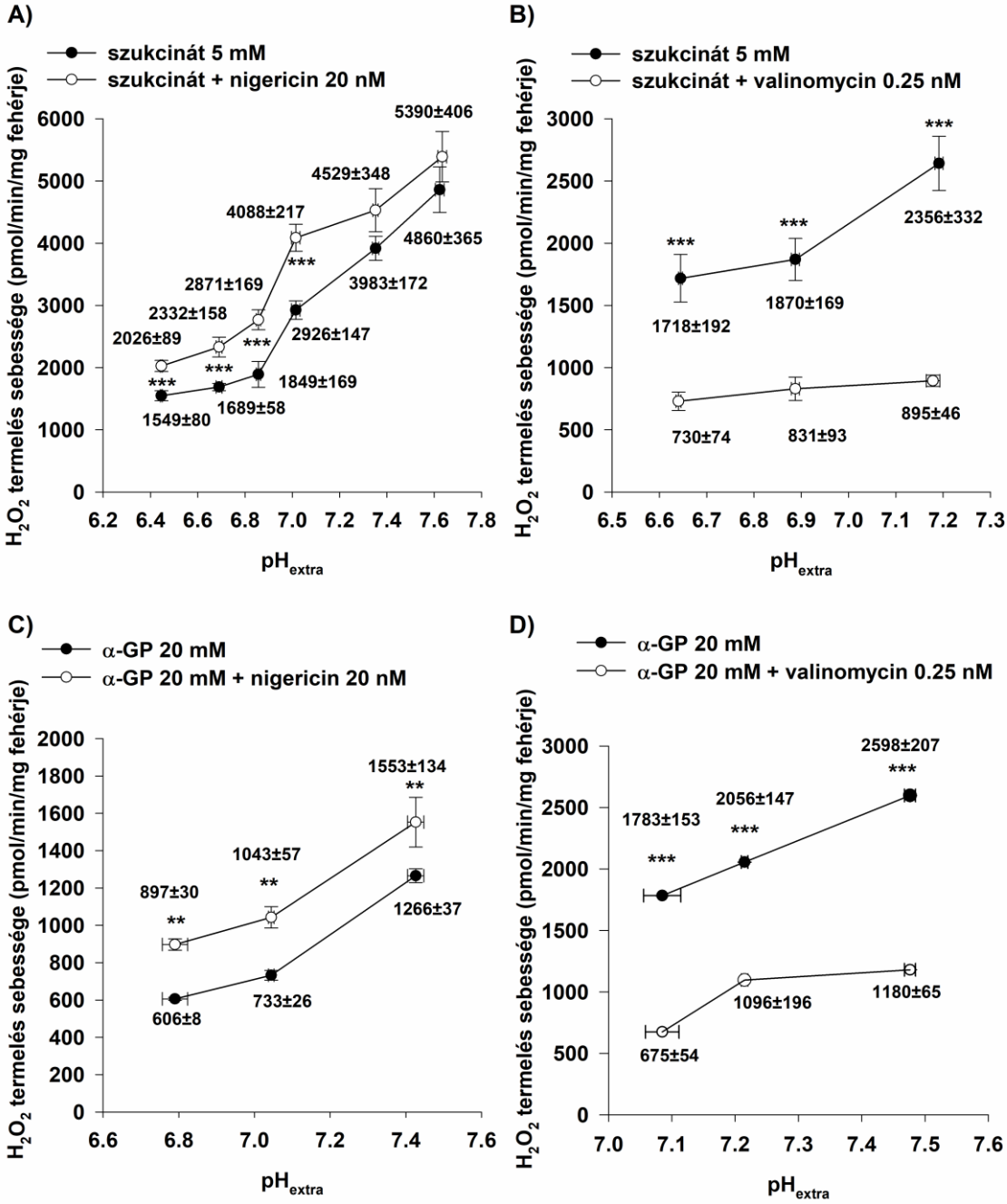
A nigericin egy K^+/H^+ antiporter, amely a két iont az ellentétes irányba szállítja a K^+ koncentráció grádiensétől függően. Esetünkben 125 mM KCl jelenlétében a K^+-t az intermembrán térbe, míg a H^+-t a mitokondrium mátrixába szállította. Méréseink során 20 nM nigericint használtunk, ami csökkentette a pH_{in}-t *(18.A ábra)* és ezzel együtt a ΔpH-t *(18. A ábra)* is, ami a $\Delta\psi_m$ kompenzatorikus növelésével járt együtt *(18. B ábra.).* A nigericin csökkentette a pH_{in} -t 0.13±0.04 pH egységgel (7.08±0.06-ről 6.95±0.02-re) és a ΔpH-t 0.23±0.06-ról 0.089±0.02-re pH_{extra}=6.84±0.01 esetén, ha a pH-elektróddal mért pH 7.00 volt *(20. A. ábra).* A nigercin hiperpolarizálta a mitokondriális membránt 7.78±2.5 mV-tal (-190.4±2 mV-ról -199±3 mV-ra; lásd *18.C ábra, b görbe).* Ha tovább emeltük a nigericin koncentrációját, nem láttunk további $\Delta\psi_m$ emelkedést. Lamberttel ellentétben [159] azonban nigericin hatására szukcináttal lélegeztetett agyi mitokondriumban a H_2O_2 termelés sebessége csökkent 56±11%-kal (1894±169-ról 2871±169 pmol/min/mg fehérjére) *(18.E ábra, b görbe és 19. A ábra).*



18. ábra: A nigericin *(A,C,E)* és a valinomycin *(B,D,E)* hatása az intramitokondriális pH (pH_{in})-ra és a transzmembrán pH gradiensre (ΔpH) *(A,B)*, a $\Delta\psi_m$-ra *(C,D)* és a H_2O_2 termelés sebességére *(E,F)* szukcináttal energetizált agyi mitokondriumon. A

mitokondriumokat (0.05 vagy 0.1 mg/ml) az Anyagok és Módszerek fejezetnél leírtak értelmében két különböző mérőoldatban inkubáltuk attól függően, hogy nigericint (mérőoldat *A*) vagy valinomycint (mérőoldat *B*) használtunk. A szukcinát (5 mM), a FCCP (250 nM), a valinomycin (0.25 nM), a nigericin (20 nM) és a koktél (gramicidin, monensin, nigericin) hozzáadását nyilak jelölik. A nigericin *(A,C,E ábra, b görbe)* hatását hasonlítottuk össze a kontroll görbékkel *(A,C,E ábra, a görbe)* és a valinomycin *(B,D,F ábra, b görbe)* hatást hasonlítottuk a kontroll görbéhez *(B,D,F ábra, a görbe).* ΔpH-t *(A,B)* a pH_{in} és extramitokondriális (pH_{extra}) különbségéből számoltuk ki. A pH_{in} mérése során *(A, B)* a fluoreszcenciát KOH hozzáadásával kalibráltuk. Az *E* és *F* ábrán az értékeket pmol/min/mg fehérjében adtuk meg és mindegyik kísérlet végén a kalibráláshoz 100 pmol H_2O_2-t használtunk. Mindegyik ábrán egy eredeti mérési görbe látható legalább négy egymástól független mérésből kiválasztva.

A nigericin RET-re kifejtett hatását nemcsak szukcináttal, hanem α-GP jelenlétében is vizsgáltuk. Kísérleteinkben azt láttuk, hogy a nigericin α-GP-val energetizált agyi mitokondriumban szukcináthoz hasonlóan csökkentette a pH_{in}-t *(19.C ábra)*, növelte a $\Delta\psi_m$-t (az ábra nincs feltüntetve) és fokozta a H_2O_2 termelés sebességét, ami ADP hiányában a RET-nek tulajdonítható. A nigericin 42±4%-kal fokozta az α-GP-vel indukált H_2O_2 termelés sebességét (733±26-ról 1043±57 pmol/min/mg fehérjére), míg a pH_{in}-t 0.18±0.02 pH egységgel csökkentette (7.29±0.03-ról 7.11±0.02-re; *19.C ábra és 20.C ábra).*

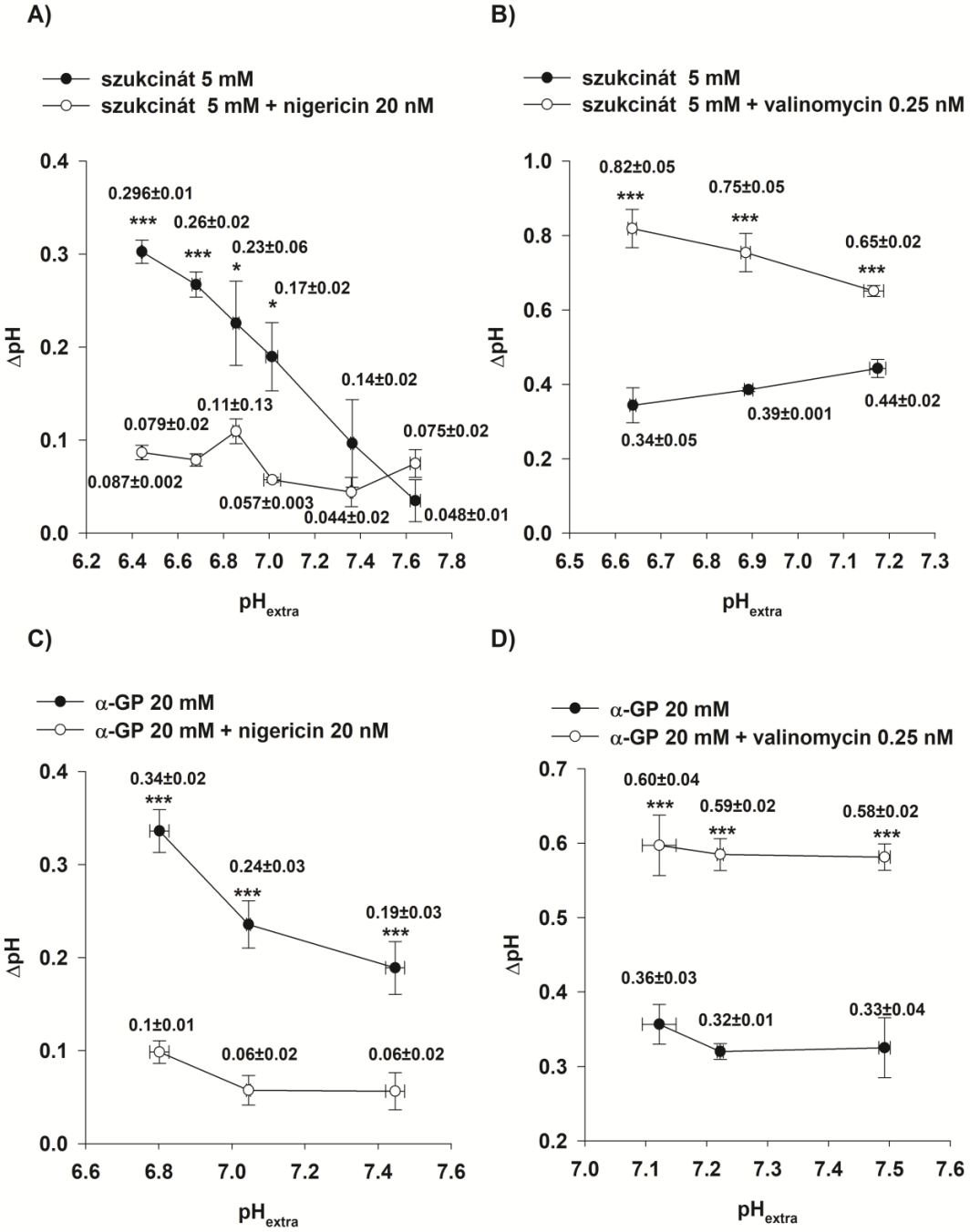


19. ábra: A nigericin *(A,C)* és valinomycin *(B,D)* hatása a H_2O_2 termelés sebességére szukcináttal és α-glicerofoszfáttal energetizált agyi mitokondriumokban az extramitokondriális pH (pH_{extra}) függvényében. A mitokondriumokat (0.05 mg/ml) az Anyagok és Módszerek fejezetnél leírtak értelmében két különböző mérőoldatban inkubáltuk attól függően, hogy nigericint (mérőoldat *A*) vagy valinomycint (mérőoldat *B*) használtunk. A szukcinát (5 mM), az α-glicerofoszfát (α-GP; 20 mM), a FCCP (250 nM), a valinomycin (0.25 nM) és a nigericin (20 nM) hozzáadását nyilak jelölik. A nigericin *(A,C ábra, fehér körök)* hatását hasonlítottuk össze a kontroll görbékkel *(A,C ábra, fekete*

körök) és a valinomycin *(B,D ábra, fehér körök)* hatást hasonlítottuk a kontroll görbéhez *(B,D ábra, fekete körök).* Az értékeket pmol/min/mg fehérjében ± az átlag standard hibája (n>4) és pH_{extra} ± az átlag standard hibája (n>4) adtuk meg; ***p<0.001; **p<0.01.

5.2.2 A valinomycin hatása a pH_{in}-re, ΔpH-ra, a $\Delta\psi_m$-ra és a mitokondriális H_2O_2 termelésre, ha a mérőoldat pH = 7.0 agyi mitokondriumokban

A valinomycin egy K^+ ionofór, ami a K^+-t elektrokémiai grádiensüknek megfelelően szállítja a mitokondrium belső membránján keresztül. Méréseink során 0.25 nM valinomycint használtunk 4 mM KCl és 2 mM KH_2PO_4 jelenlétében, ami koncentrációtól függően depolarizálta a $\Delta\psi_m$-t *(18.D ábra)* és emelte a pH_{in}-t 0.38±0.04 pH egységgel (7.27±0.01-ről 7.64±0.04-re), *(18.B ábra)* és a ΔpH-t 0.39±0.001-ról 0.75±0.04-re *(19. B és 20. B ábra)* szukcináttal lélegeztetett agyi mitokondriumokban. Korábban már említésre került, hogy a valinomycin mitokondriumra gyakorolt hatása nagy mértékben függ a mérőoldat K^+ koncentrációjától. Érdekességképpen, a szukcináttal energetizált agyi mitokondriumban ADP nélkül a 0.25 nM valinomycin 5 mM KCl jelenlétében növelte legjobban a pH_{in}-t, míg 20 mM KCl esetén már a mitokondriális mátrix elkezdett savanyodni (az ábra nincs feltüntetve). 0.25 nM valinomycin 4 mM KCl és 2 mM KH_2PO_4 jelenlétében csökkentette a szukcináttal indukált H_2O_2 termelés sebességét 44.5±4%-kal (1870±169-ről 831±93 pmol/min/mg fehérjére) *(18.F ábra és 19.B ábra).* Hasonlóképpen a valinomycin az α-GP-indukált H_2O_2 termelést 45±14%-kal csökkentette a kontrollhoz képest (2056±147-ről 1096±196 pmol/min/mg fehérjére) *(19.D ábra)*. Ezen a pH_{extra} értéken a valinomycin alkalizálta a mitokondriális mátrixot 0.26±0.02 pH egységgel (7.54±0.01-ről 7.80±0.02-re), míg a ΔpH-t emelte 0.32±0.01-ról 0.59±0.02-re *(20.D ábra).*



20. ábra: A nigericin *(A,C)* és valinomycin *(B,D)* hatása a transzmembrán pH gradiensre (ΔpH) szukcináttal és α-glicerofoszfáttal energetizált agyi mitokondriumokban az extramitokondriális pH (pH_{extra}) függvényében. A mitokondriumokat az Anyagok és Módszerek fejezetnél leírtak értelmében két különböző mérőoldatban inkubáltuk attól függően, hogy nigericint (mérőoldat *A*) vagy valinomycint (mérőoldat *B*) használtunk. A szukcinát (5 mM), az α-glicerofoszfát (α-GP; 20 mM), a FCCP (250 nM), a valinomycin (0.25 nM) és a nigericin (20 nM) hozzáadását nyilak jelölik. A nigericin *(A,C ábra, fehér*

körök) hatását hasonlítottuk össze a kontroll görbékkel*(A,C ábra, fekete körök)* és a valinomycin *(B,D ábra, fehér körök)* hatást hasonlítottuk a kontroll görbéhez *(B,D ábra, fekete körök).* Az eredményeket a pH értékben ± az átlag standard hibája (n=4) adtuk meg; ***p<0.001; *p<0.05.

5.2.3 A pH_{extra} hatása a pH_{in}-re, ΔpH-ra, a $\Delta\psi_m$-ra és a mitokondriális H_2O_2 termelésre agyi mitokondriumokban

Ahogy már az Anyagok és Módszerek fejezetnél leírtam, a mérőoldat pH-ját pH-elektróddal a mérés napján 6.4, 6.8,7.0,7.4,7.6 és 8.0 értékekre állítottuk be. Azonban a mitokondrium és a légzési szubsztrátok (szukcinát vagy α-GP) hozzáadása során a mérőoldat pH-ja megváltozott. Így a ΔpH pontos kiszámításához a mitokondrium és szubsztrátok jelenlétében detektált pH értéket vettük pH_{extra}-nak, amit akkor kaptunk, amikor a „koktél" hozzáadását követően a pH_{in}=pH_{extra}. A nigericinnel végzett mérésekhez a magasabb K^+ tartalmú mérőoldat *A*-t használtuk, míg a valinomycin hatását az alacsonyabb K^+ koncentrációjú mérőoldat *B*-ben tanulmányoztuk (lásd: Anyagok és Módszerek).

H_2O_2 termelés sebessége: A *19.A* és *C* ábrán jól látható, hogy a pH_{extra} emelésének függvényében a H_2O_2 termelés sebessége meredeken nő mind szukcináttal, mind pedig α-GP-tal energetizált agyi mitokondriumokban nigericin jelenlétében *(19.A,C ábra, fehér körök)* és anélkül *(19.A,C ábra, fekete körök).* Selivanovhoz [215] hasonlóan mi is azt láttuk, hogy a nigericin szignifikánsan fokozta a H_2O_2 termelés sebességét pH_{extra}=6.45±0.004 és pH_{extra}=7.03±0.02 között *(19.A ábra)*. Azonban lúgosabb pH_{extra} értékeken a nigericin nem emelte szignifikánsan a H_2O_2 termelés sebességét. Hasonlóképpen ahhoz, amit a szukcináttal energetizált agyi mitokondriumokban mértünk, α-GP-val lélegeztetett mitokondriumokban is a nigericin növelte a H_2O_2 termelés sebességét 48±3%-kal pH_{extra}=6.81±0.01-n, 42±4%-kal pH_{extra}=7.05±0.05-n és 21±11%-kal pH_{extra}=7.45±0.02-n *(19.C ábra)*. A valinomycin csökkentette a H_2O_2 termelés sebességét a szukcináttal és az α-GP-vel lélegeztetett agyi mitokondriumokban az összes vizsgált pH_{extra} értéken *(19.B,D ábra).* Ha a pH_{extra}=6.45±0.004 volt, a valinomycin 59±1%-kal csökkentette a szukcináttal energetizált mitokondriumban a H_2O_2 termelés sebességét, 55±4%-kal pH_{extra}=6.88±0.01-n és 59±6%-kal, ha a

pH_{extra}=7.20±0.02 volt *(19.B ábra).* A valinomycin hasonlóan befolyásolta az α-GP-vel energetizált agyi mitokondriumok H_2O_2 termelését is *(19.D ábra).*

$\Delta\psi_m$: A TPP^+-elektróddal végzett vizsgálataink alapján elmondható, hogy a nigericin minden mért pH_{extra} értéken hasonló mértékig emelte a $\Delta\psi_m$-t (~-195 - -200 mV) szukcináttal energetizált agyi mitokondriumon *(4. táblázat)*. Nigericin nélkül a legalacsonyabb $\Delta\psi_m$ értéket pH_{extra}=6.45±0.004-n lehetetett mérni. Összefoglalásképpen megállapítható, hogy a legmagasabb $\Delta\psi_m$ értéket és a legnagyobb mértékű H_2O_2 termelést nigericin jelenlétében a leglúgosabb pH_{extra} értéken detektáltuk szukcináttal lélegeztetett agyi mitokondriumon.

4. táblázat: A nigericin hatása a szukcináttal lélegeztetett agyi mitokondrium membránpotenciáljára ($\Delta\psi_m$) TPP^+-elektróddal mérve. A mitokondriumokat (0.1 mg/ml) az Anyagok és Módszerek fejezetnél leírtak szerint a mérőoldat *A*-ben inkubáltuk. A mérések során szukcinátot (5 mM) és nigericint (20 nM) használtunk. Az eredményeket 4 mérés $\Delta\psi_m$ -nak átlagát ± az átlag standard hibájaként adtuk meg mV-ban kifejezve adott pH_{extra} értéken 4 mérés pH_{extra} értékének átlagát ± az átlag standard hibáját feltüntetve.

	$\Delta\psi_m$ (mV)	
pH_{extra}	**szukcinát**	**nigericin**
6.45±0.004	-184.4±4	-196.9±3
6.84±0.01	-190.4±2	-199±3
7.30±0.05	-195.2±2	-203.7±3

pH_{in} és ΔpH: A pH_{in} pH_{extra}-tól való függésének vizsgálata során megállapítottuk, hogy a pH_{in} mindig magasabb, mint a pH_{extra}. A pH_{in} mérések során a mitokondriumokat BCECF-AM festékkel töltöttük, mértük a pH_{in} változást és meghatároztuk a mitokondrium és a légzési szubsztrátok jelenlétében detektált pH_{extra} értékét a koktél hozzáadása után (pH_{in}=pH_{extra}). Majd a pH_{in} és pH_{extra} különbségéből kiszámoltuk a ΔpH értéket (lásd Anyagok és Módszerek). A pH_{extra} növelésének függvényében a ΔpH

csökkent mind szukcinát, mind α-GP jelenlétében *(20. A és C. ábra).* Nigericin hatására a pH_{in} csökkent, ami a ΔpH érték csökkenésében is megnyilvánult *(20. A ábra).* A leglúgosabb pH_{extra} értéken (7.45±0.02) a nigericin nem csökkentette sem a pH_{in}-t, sem a ΔpH-t szukcináttal energetizált agyi mitokondriumban. α-GP-vel lélegeztetett mitokondriumban a nigericin csökkentette az összes mért pH_{extra} értéken a pH_{in}-t és a ΔpH-t is *(20.C ábra).* Valinomycin kezelés hatására mind a szukcináttal, mind az α-GP-tal energetizált agyi mitokondriumban a mitokondriális mátrix lúgosodott, ami együtt járt a ΔpH növekedésével is *(20. B,D ábra).* Tehát összefoglalásképpen elmondható, hogy agyi mitokondriumban a pH_{extra} emelésének függvényében fokozódott a H_2O_2 termelés sebessége, a mitokondriális mátrix lúgosodott, miközben a ΔpH csökkent.

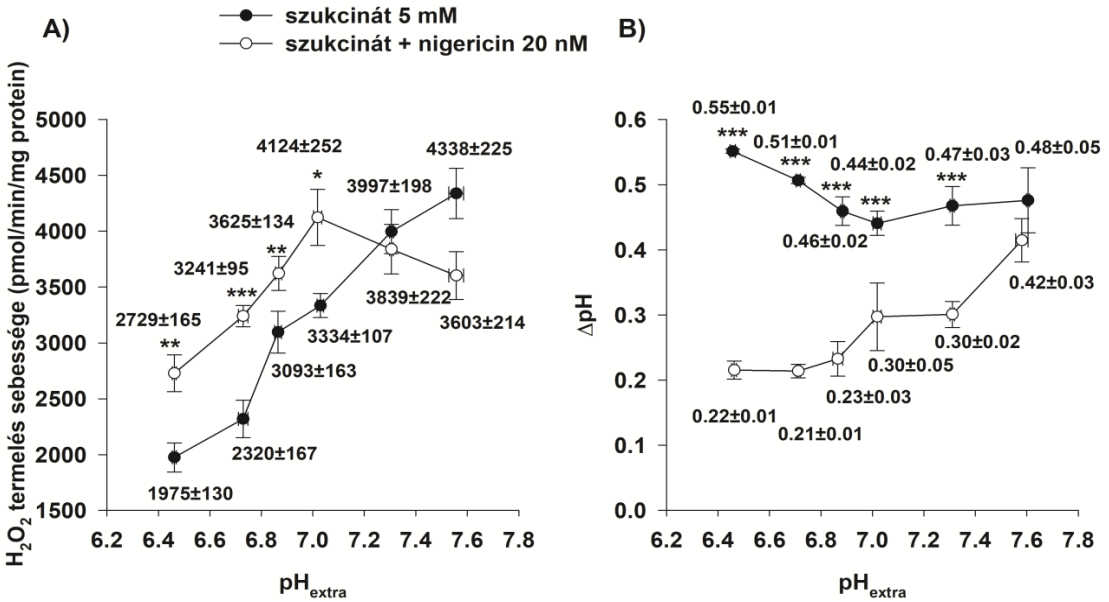
5.2.4 Szervspecificitás. A nigericin hatása a pH_{in}-re, ΔpH-ra, a $\Delta\psi_m$-ra és a mitokondriális H_2O_2 termelésre izolált szív mitokondriumban

A *pmf* komponenseinek hatása a RET-re nem csak agyból izolált mitokondriumban releváns, hanem olyan szervekben is, mint például a szív, ami patológiás körülmények között -például iszkémia-reperfúzió során- oxidatív károsodásnak van kitéve [43]. Annak érdekében, hogy még többet tudjunk meg a ΔpH-nak és a $\Delta\psi_m$-nek a szukcináttal támogatott RET-ra gyakorolt hatásáról, kísérleteinket elvégeztük tengerimalac szívből izolált mitokondriumokon is. Hasonlóan az agyhoz, a nigericin (20 nM) szukcináttal energetizált szív mitokondriumokban is hiperpolarizálta a mitokondriális membránt különböző pH_{extra} értékeken *(5. táblázat).* Nigericin nélkül a szukcináttal lélegeztetett szív mitokondriumban a különböző pH_{extra} értékeken a $\Delta\psi_m$ értéke hasonló volt ahhoz, amit agynál detektáltunk. Azonban szukcináttal energetizált szív mitokondriumban a nigericin csak pH_{extra}=6.46±0.005 és 7.03±0.008 között fokozta a H_2O_2 termelés sebességét *(21. A ábra).* A legmagasabb pH_{extra} értéken (7.54±0.002), a nigericin gátolta a H_2O_2 termelés sebességét *(21. A ábra).* Nigericin hiányában a pH_{extra} emelkedésének függvényben a szukcináttal indukált H_2O_2 termelés meredeken emelkedett *(21. A ábra).* A ΔpH mérésekből azt láttuk, hogy ha a pH_{extra}=6.46±0.005 és 7.03±0.008 volt, a nigericin hiányában a ΔpH kismértékben csökkent, míg pH_{extra}=7.03±0.008 felett a ΔpH kissé emelkedni kezdett szukcinát jelenlétében *(21. B ábra, fekete körök).* Azonban nigericin jelenlétében a ΔpH csökkenő tendenciát mutatott a pH_{extra} növelésének függvényében *(21. B ábra fehér körök).* A leglúgosabb pH_{extra} (7.54±0.002) értéken nem volt különbség a

ΔpH-ban a nigericinnel kezelt és nemkezelt szukcináttal energetizált mitokondriumok között. A mérések alapján elmondhatjuk, hogy a nigericinnek nincs szervspecifikus hatása és a RET által támogatott H_2O_2 termelés hasonló tendenciát mutat különféle szervekben.

5. táblázat: A nigericin hatása a szukcináttal lélegeztetett szív mitokondrium membránpotenciál-változására ($\Delta\psi_m$) TPP^+-elektróddal mérve. A mitokondriumokat (0.1 mg/ml) az Anyagok és Módszerek fejezetnél leírtak szerint a mérőoldat *A*-ban inkubáltuk. A mérések során szukcinátot (5 mM) és nigericint (20 nM) használtunk. Az eredményeket 4 mérés $\Delta\psi_m$ -nak átlagát ± az átlag standard hibájaként adtuk meg mV-ban kifejezve adott pH_{extra} értéken 4 mérés pH_{extra} értékének átlagát ± az átlag standard hibájának függvényében.

	$\Delta\psi_m$ (mV)	
pH_{extra}	**szukcinát**	**nigericin**
6.45±0.004	-187.3±4	-195.6±3
6.84±0.01	-191±3	-208±4
7.30±0.05	-192.4±5	-202.6±3



21. ábra: A nigericin hatás a szukcináttal energetizált tengerimalac szívből izolált mitokondriumok H_2O_2 termelés sebességére *(A)* és a transzmembrán pH gradiensre (ΔpH) különböző extramitokondriális pH (pH_{extra}) értéken. A mitokondriumokat (0.1 mg/ml) az Anyagok és Módszerek fejezetnél leírtak szerint a mérőoldat *A*-ban inkubáltuk. A méréseket 5 mM szukcináttal és 20 nM nigericinnel végeztük. Az A) ábrán a fehér körök a H_2O_2 termelés sebességét, a B) ábrán a fehér körök a ΔpH-t mutatják nigericin jelenlétében, míg a fekete körök *(A,B)* nigericin nélkül. Az A) ábrán feltüntetett eredmények a H_2O_2 termelés sebességét jelölik pmol/min/mg fehérje egységben kifejezve ± az átlag standard hibája adott pH_{extra} értéken ± az átlag standard hibája (n=4). A B) ábrán az eredmények a 4 mérésből számolt ΔpH értékének átlagát ± az átlag standard hibáját mutatják; ***$p<0.001$; **$p<0.01$; *$p<0.05$.

6. Megbeszélés

6.1. A metilénkék hatása a mitokondriális szubsztrát-szintű foszforilációra

Jelen PhD-munkám egyik célja a MB hatásának vizsgálata a mitokondriális SSF-ra különböző légzési szubsztrátok esetén. A mitokondriális SSF-t a citrátköri enzim, a szukcinát-tiokináz katalizálja. A szubsztrát, a szukcinil-KoA az α-KGDH által katalizált reakcióban keletkezik, ami a citrátkör sebesség-meghatározó lépése. SSF során ATP és szukcinát képződik a *pmf*-től függetlenül például légzési károsodás során [67] és hipoxiás valamint anoxiás körülmények között is, azaz amikor nincs elegendő mennyiségű oxigén vagy teljes mértékben hiányzik [61]. A SSF megfelelő működéséhez elengedhetetlenül fontos az alacsony $NADH/NAD^+$ arány a mitokondriális mátrixban. A NADH felhalmozódása az α-KGDH gátlásához vezet [241], ami így nem tud elegendő mennyiségű szukcinil-KoA-t a SSF számára biztosítani. Légzési lánc károsodás során vagy anoxiában az α-KGDH működéséhez elegendő mennyiségű NAD^+-t például a diaforáz nevű enzimek biztosítják [242]. Általánosságban a diaforázok (vagy DT-diaforázok, NAD(P)H:quinone oxidoreduktáz; NQO) olyan flavintartalmú enzimek, amelyek a redukált piridinnukleotidok (NADH; D vagy NADPH;T) oxidációját katalizálják endogén vagy mesterséges elektronakceptorok segítségével [243, 244]. Elektronakceptorokként szolgálnak a különféle mitokondriális kinon-származékok, mint például a menadion, amelyek visszaoxidálásban a CIII vesz részt [242]. α-KGDH enzimrendszer károsodása gyakran megfigyelhető neurodegeneratív kórképekben is [24], ami ugyancsak a szukcinil-KoA mennyiségének csökkenéséhez és a SSF gátlásához vezet. *Chinopoulos* és munkacsoportja kimutatták, hogy légzési lánc károsodás során a SSF elegendő mennyiségű ATP-t tud biztosítani a sejt túléléséhez, és működésével megakadályozza az ANT megfordulását és a citoszolikus ATP mitokondriális felhasználását [67, 245].

A SSF mérése során figyelembe kell venni az összes mitokondriális ATP termelő folyamatot, amelyek a mérést befolyásolhatják. Már a bevezetőben említésre került, hogy a mitokondriumban három ATP termelő folyamat létezik. Ezek közül az AK enzim jelentősen befolyásolta a méréseinket *(10. ábra)*, így hozzájárulását ~80%-kal csökkentettük specifikus gátlószerével, AP5-tel [246]. Emellett az OXPHOS gátlását az ATP-szintáz inhibitorával, oligomycinnel biztosítottuk.

6.1.1 A metilénkék mitokondriális célpontja

A MB mitokondriális hatásának kifejtése érdekében be kell jutnia a mitokondriumba. A MB a mitokondriális membránt $\Delta\psi_m$-függő módon képes átlépni és képes a mitokondriális mátrixban felhalmozódni [92]. Munkánk során bizonyítottuk a MB mitokondriális felhalmozódását a MB abszorbanciájának detektálásával *(17. B ábra)*. Oligomycin hatására a redukált MB abszorbanciája növekedett; majd szétkapcsolószer, FCCP hatására a redukált MB aránya csökkent, ugyanis az FCCP hatására bekövetkező $\Delta\psi_m$ depolarizációja miatt csökkent a MB mitokondriális felvétele. Oligomycin hatására ugyanezen körülmények között a NAD(P)H autofluoreszcencia is növekedett (*14. ábra*), tehát a NAD(P)H-szint és a MB oxido-redukáltsági állapota között egyenes arányosság van. Ez az arány azonban megszűnik FCCP hatására, ugyanis a $\Delta\psi_m$ csökken, ami lassítja a MB mitokondriális felvételét. Rotenon (CI gátlószer) jelenlétében, habár növekedett a NAD(P)H-szint, a MB nem redukálódott *(17. ábra)*. Ezt azzal a jelenséggel magyarázhatjuk, hogy a MB alacsony koncentrációban (0.5-2 μM) átveszi az elektronokat a NAD(P)H-ról és a $FADH_2$-ről és egy alternatív elektrontranszportutat biztosítva az elektronokat a citokróm c-nek adja át gátolt légzési lánc (jelen esetben rotenon jelenlétében) [81, 82]. Ez az alternatív útvonal a CI és CIII átlépésével csökkenti a proton kipumpálás hatékonyságát: NADH oxidálása esetén 10 H^+ helyett csak 2 H^+ kerül kipumpálásra, míg $FADH_2$ oxidálása során 6 H^+ helyett 2 H^+ távozik a mitokondriális mátrixból [98].

Munkánk célja volt a MB hatásának vizsgálata a mitokondriális SSF-ra az ATP termelés, az oxigénfogyasztás, a $\Delta\psi_m$ és a NAD(P)H autofluoreszcencia mérésével különböző légzési szubsztrátok (α-KG, szukcinát, glutamát és malát) jelenlétében tengerimalac agykéregből izolált mitokondriumon.

6.1.2 A metilénkék hatása az α-ketoglutaráttal energetizált mitokondriumokra

Az α-KG-tal energetizált mitokondriumokban oligomycin jelenlétében közel kétszer akkora ATP szintézist lehetett mérni (47 nmol/min/mg protein), mint α-KG

nélkül, de 2 mM ADP hozzáadása után (23 nmol/min/mg protein). A két érték különbsége adja meg az α-KG által fokozott SSF értékét *(12. A, B ábra)*. Oligomycin után MB-t adtunk, ami koncentráció függően fokozta a SSF-t α-KG jelenlétében. A többi szubsztráttal összehasonlítva a MB α-KG esetén fokozta legnagyobb mértékben a SSF-t *(12.ábra)*. Oligomycin hatására fokozott NAD(P)H-szintet detektáltunk, ami MB hatására csökkent, majd CAT hozzáadásakor a NAD(P)H autofluoreszcencia tovább csökkent *(14. ábra, c görbe)*. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy az ANT gátlásakor a SSF során keletkezett ATP nem tudott távozni a mitokondriumból, így a felhalmozódott ATP gátolta a NADH-termelő α-KGDH-t [247], ami a NAD(P)H autofluoreszcencia csökkenésében mutatkozott meg. Azonban fontos megjegyezni, hogy MB hiányában a CAT adása nem vezetett a NAD(P)H-szint csökkenéséhez *(14. ábra, b görbe)*. Ez rámutat arra a jelenségre, hogy SSF nélkül nem keletkezik elég ATP, ami gátolná az α-KGDH enzimkomplexet. Továbbá ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelésünk is, miszerint MB nélkül a CAT nem gátolta tovább a légzést. Míg oligomycin és MB jelenlétében a CAT hozzáadásakor az α-KG-val támogatott légzés csökkent *(13. B ábra)*. Összefoglalásképpen elmondható, hogy a SSF során keletkezett ATP gátolhatja az α-KGDH enzimkomplexet [247]. Ezt a hipotézisünket támasztják alá a $\Delta\psi_m$ méréseink is. MB jelenlétében a CAT depolarizálta a mitokondriális membránt, ami szintén arra utal, hogy a SSF során keletkezett ATP gátolja az α-KGDH-t, ami csökkent NADH-szintet eredményez *(15. ábra A, c görbe)* és az ANT fordított irányú működésére utal. Ilyenkor a mitokondrium citoszolikus ATP-t vesz fel és ADP-t pumpál ki. MB hiányában CAT hatására a membrán kismértékben hiperpolarizálódott, ugyanis az ANT normál -forward- működése a proton grádiens csökkenéséhez vezet *(15. ábra A, c görbe)* [248-251].

6.1.3 A metilénkék hatása az szukcináttal energetizált mitokondriumokra

Az α-KG-tal ellentétben a szukcináttal energetizált mitokondriumok máshogy reagáltak a MB-kel történő kezelésre. MB nem fokozta a SSF-t az oligomycinnel kezelt szukcináttal lélegeztetett mitokondriumokban *(12.C ábra)*. Ez a megfigyelésünk összhangban van egy 2013-as publikációval [67], miszerint a szukcinát nem támogatja a SSF-t. Habár a MB fokozta oligomycin jelenlétében a légzést *(13.C ábra)*, ez a fokozás nem mutatkozott meg az ATP termelésben *(12.C ábra)*. Ezen kívül a CAT nem gátolta a

légzést ugyanilyen körülmények között, ami arra utal, hogy SSF során nem keletkezett ATP. A MB nem csökkentette szignifikánsan a NAD(P)H-szintet, CAT hatására MB jelenlétében nem csökkent tovább a NAD(P)H autofluoreszcencia, illetve CAT nem depolarizálta MB hozzáadása után a $\Delta\psi_m$-t *(15. B ábra)*. Mindezen méréseink azt bizonyítják, hogy a MB nem fokozza a SSF-t szukcináttal energetizált mitokondriumokban.

6.1.4 A metilénkék hatása a glutamáttal energetizált mitokondriumokra

Glutamáttal energetizált mitokondriumokban kis mértékű alapszintű SSF-t detektáltunk (31±4-23±1=8±2 nmol/min/mg fehérje), amit a MB tovább fokozott oligomycinnel kezelt mitokondriumokban *(12. D ábra)*. Az α-KG-val összehasonlítva alacsonyabb mértékű SSF-t mértük, amit azzal magyarázhatunk, hogy a glutamát kétlépésben oxidálódik szukcinil-KoA-vá. Először a glutamát dehidrogenáz enzim által katalizált reakcióban α-KG keletkezik, amely tovább oxidálódik szukcinil-KoA-vá a citrátkörben az α-KGDH enzim segítségével. 1 mol NADH oxidációja során 1 mol szukcinil-KoA képződik α-KG esetén, míg glutamát oxidációjakor keletkezett 1 mol NADH oxidációja során 0.5 mol szukcinil-KoA keletkezik. Tehát, a glutamát oxidációja során kevesebb szukcinil-KoA képződik, ami magyarázza a csökkent mértékű SSF-t az α-KG-val lélegeztetett mitokondriumokhoz képest *(12. D ábra)*. A glutamáttal végzett $\Delta\psi_m$ *(15. C)* és oxigénfogyasztás *(13. D)* mérések során ugyanazt a tendenciát láthatjuk MB jelenlétében, mint α-KG esetén. Ez alapján elmondhatjuk, hogy SSF tekintetében csak kvantitatív különbség van a glutamáttal és α-KG-val energetizált mitokondriumok között.

6.1.5 A metilénkék hatása a maláttal energetizált mitokondriumokra

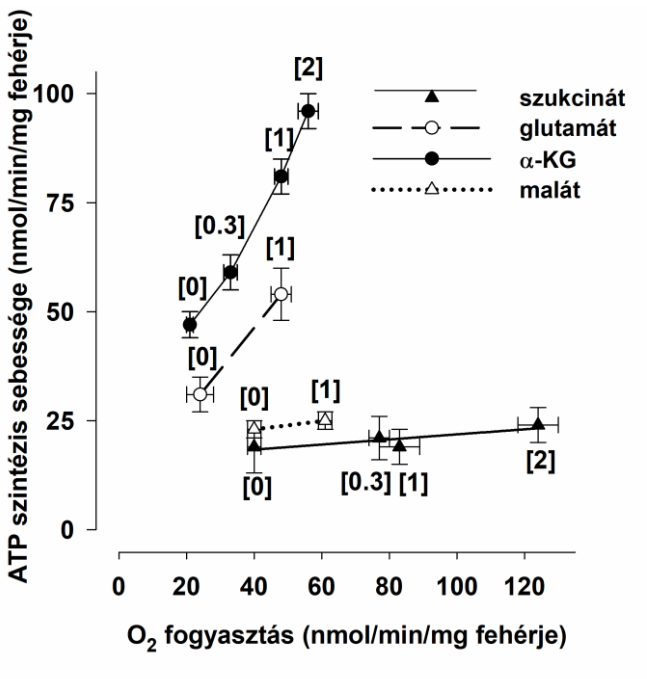
A maláttal energetizált mitokondriumokban nem detektálunk SSF-t sem MB jelenlétében, sem annak hiányában *(12.D ábra)*. Ez azzal magyarázható, hogy a citrátkörben a malát oxidációja során a szukcinil-KoA képződésének esélye kicsit és így a SSF igen alacsony [67]. Hasonlóan a többi légzési szubsztráthoz, a MB fokozta a

maláttal energetizált, oligomycinnel kezelt mitokondriumok oxigénfogyasztását *(13. D ábra)*. Azonban ugyanezen körülmények között a MB nem növelte a SSF-t *(12. D ábra)*.

6.1.6 A metilénkék, az oxigénfogyasztás és az ATP termelés közötti kapcsolat oligomycinnel gátolt mitokondriumban

Az előző fejezetekben jól látható, hogy a mitokondriális SSF mértéke nagyban függ az alkalmazott légzési szubsztráttól. A szubsztrátok oxidációjának mértéke azonban különböző lehet, ezért összehasonlítottuk a SSF által szabályozott ATP termelést az oxigénfogyasztás függvényében. Ehhez a bioenergetikában gyakran használt fogalmat a mitokondriális P/O hányadost használtuk, ami az ATP termelést adja meg az oxigénfogyasztás függvényében [252-254]. A számolások során nanogramm oxigén helyett 1 nanomol oxigént használtunk és a következő eredményeket kaptuk 2 μM MB kezelést követően α-KG esetén: $\Delta P/\Delta O=(96-47)/(2*(56-21)= 0.7$, míg szukcinát esetén $(24-19)/(2*124-40)=0.03$. A számolás során vettük a MB kezelést követően detektált ATP termelés és az alapszintű SSF között különbséget és ezt osztottuk el az oxigénfogyasztás sebességének változásával, amit a következőképpen számoltunk ki: a MB-kel történő kezelést követően mért oxigénfogyasztás sebessége és az oligomycin hozzáadása után mért oxigénfogyasztás sebességének hányadosa. A P/O hányados oligomycin nélkül 1 lenne. A teoretikus 1 és a valós 0.7 közötti különbség azzal magyarázható, hogy az ATP termelés detektálásának hatékonysága kevesebb, mint 100%. Ez utóbbi két okból adódhat; egyrészt a mitokondriumok kis mennyiségű ATP-t fogyasztanak, másrészt az oxigén egy része ROS termelésre fordítódik [98].

A *22. ábrán* az ATP termelés sebességét ábrázoltuk az oxigénfogyasztás sebességének függvényében MB-kel történő kezelést követően, amihez az adatokat a 12. és 13. ábráról vettünk. Ez alapján is jól látható, hogy a MB az α-KG-tal és glutamáttal energetizált mitokondriumokban fokozta a SSF keresztül az ATP termelést. Azonban szukcinát és malát esetén MB hatására csak az oxigénfogyasztás növekedett, az ATP termelés nem változott MB hozzáadása után *(22. ábra).*



22. ábra: Az ATP szintézis és az oxigénfogyasztás kapcsolata metilénkék kezelés mellett és anélkül, oligomycin kezelést követően α-ketoglutaráttal (fekete körök, folytonos vonal), szukcináttal (fekete háromszögek, folytonos vonal), glutamáttal (fehér körök, hosszú szaggatott vonal) és maláttal (fehér háromszögek, pontozott vonal) energetizált agyi mitokondriumokban. A mitokondriumokat az Anyagok és Módszerek résznél leírt mérőoldat *A*-ban inkubáltuk. A mérések során 2 mM ADP-t, 2 μM oligomycint és 0-2 μM metilénkéket alkalmaztunk. A metilénkék koncentrációkat szögletes zárójelekben tüntettük fel μM-ban kifejezve. Az adatok a 12. és 13. ábrából származnak. Az eredményeket nmol/min/mg fehérjében fejeztük ki 4 mérés átlagaként ± az átlag hibájaként (n>4).

6.1.7 A metilénkék jótékony hatása komplex I és az ATP-szintáz együttes gátlása esetén

A MB számos neurodegeneratív betegség modellben jótékony hatással bír [82, 255], amelyeket gyakran kísér mitokondriális károsodás is [27]. Általában a bioenergetikailag fontos ATP szintézis szenved zavart, illetve a mitokondriális károsodás befolyásolja a sejt ionháztartását is. CI gátlás/mutáció során nem épül fel a $\Delta\psi_m$ és az OXPHOS károsodott [1]. Ez a két mitokondriális paraméter egymással szorosan kapcsoltak: $\Delta\psi_m$ nélkül nem jön létre OXPHOS, mitokondriális károsodás során az ATP-

szintáz megfordul és a mitokondriumok ATP-t kezdenek el hidrolizálni a $\Delta\psi_m$ újbóli kiépítése miatt [64]. Méréseinkben a MB a CI és ATP-szintáz gátlása esetén képes volt részben biztosítani az ATP termelődését és visszaállítani a $\Delta\psi_m$-t a SSF-n keresztül. Ez a jelenség hozzájárul a MB neuroprotektív hatásához különféle neurodegeneratív kórképekben. A MB hatására emelkedett az ATP-szintézis és az oxigénfogyasztás CI és ATP-szintáz gátlása esetén α-KG-tal lélegeztetett mitokondriumokban *(16. ábra)*, míg fokozás nem volt megfigyelhető malát jelenlétében *(16. ábra)*. A MB szubsztrát specifikus hatása ellenére képes volt az oligomycin és rotenon hatása kialakuló $\Delta\psi_m$ károsodást visszaállítani; még a maláttal energetizált mitokondriumokban is részben repolarizálta a mitokondriális membránt *(16. ábra, C).* A MB által okozott membrán repolarizáció megakadályozta az ANT megfordulását és ezáltal a citoszolikus ATP felhasználását.

6.2 A protonmotoros erő komponenseinek hatása a reverz elektron transzport által támogatott H_2O_2 termelésre

Munkám második részében a *pmf* komponenseinek hatását vizsgáltuk a szukcináttal vagy α-GP-tal támogatott H_2O_2 termelésre. Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a $\Delta\psi_m$ nagyobb mértékben befolyásolja a RET által indukált H_2O_2 termelést, mint a *pmf* másik komponense, a ΔpH. Az irodalomban erről ellentétes adatok állnak rendelkezésre [159, 215]; így célunk volt a körülmények tisztázása. A témával kapcsolatban megjelent publikációkkal ellentétben mi nemcsak a $\Delta\psi_m$-t és a H_2O_2 termelést mértük, hanem a mitokondriális mátrix pH-értéket (intramitokondriális pH), amelyből az pH_{extra} tudatában ki tudtuk számolni a ΔpH-t. Fiziológiás körülmények között általában a mitokondriális membrán depolarizációját a ΔpH csökkenése kíséri, ami együtt jár a mátrix savanyodásával. Olyan körülmény létrehozása, amikor a $\Delta\psi_m$ és a ΔpH ellentétes irányban változik csak ionofórok hozzáadásával lehetséges.

A $\Delta\psi_m$ emelkedését nigericin hozzáadásával értük el, ami csökkentette a ΔpH-t és növelte a H_2O_2 termelést *(18. A,C, E ábra, 19. A,C és 20. A,C ábra)*. Ha a ΔpH-nak lenne meghatározóbb szerepe, akkor a H_2O_2 termelés nigericin jelenlétében csökkent volna. A ΔpH növelése érdekében egy másik ionofórt, valinomycint adtunk a mitokondriumokhoz, amely emellett csökkentette a $\Delta\psi_m$-t és a H_2O_2 termelést *(18. B,D,E ábra, 19. B,D és 20.*

B,D ábra). Ha a ΔpH-nak lenne meghatározó szerepe, akkor a H_2O_2 képződés párhuzamosan változott volna a ΔpH-val, tehát növekedett volna. Mindkét ionofórral egyértelműen jól bizonyítható a $\Delta\psi_m$ meghatározó szerepe a RET által támogatott H_2O_2 termelésben, amely egyben ellentmond az irodalmi adatoknak is. Emellett megfigyeltük, hogy ha nem is a ΔpH, de a pH_{extra} emelésével párhuzamosan emelkedik a H_2O_2 termelés, tehát lúgosabb körülmények között növekedett ROS termelést lehet detektálni.

6.2.1 Nigericin

A nigericin egy H^+/K^+ cseretranszporter, amely a H^+ és K^+ ionok ellentétes irányú elektroneutrális transzportjáért felelős [256, 257]. Előkísérleteink alapján azt a nigericin koncentrációt használtuk, amely maximálisan hiperpolarizálta (20 nM) a mitokondriális membránt safraninnal mérve (adatokat nem tüntettem fel). Ezzel ellentétben Lambert és munkacsoportja [159] illetve *Selivanov* és csoportja [215] 100 nM nigericint használt a mérések során, ami azonban a mi esetükben nem csökkentette nullára a ΔpH-t, hanem egy másik egyensúlyt hozott létre, amelyet tovább lehetett csökkenteni szétkapcsolószer és ionofór hozzáadásával (lásd Anyagok és Módszerek fejezet). Annak érdekében, hogy csökkentsük egyéb faktorok, így a szukcinát transzporter vagy a szukcinát további oxidációja miatt fellépő zavaró faktorok befolyását a ROS termelésre, egy másik szubsztrátot, α-GP-t is használtunk. α-GP jelenlétében hasonló eredményeket kaptunk, mint a szukcináttal energetizált mitokondriumok esetén *(19. és 20. ábra)*. Továbbá vizsgáltuk az ionofórok szervspecifikus hatását a RET által támogatott ROS termelésre. Szív mitokondriummal végzett méréseink során hasonló eredményeket kaptunk, mint agy mitokondriumokon *(21.ábra).* Szív mitokondriumokban magasabb pH_{extra} értékeken a H_2O_2 termelés csökkent nigericinnel *(21. A ábra)*. Ez azt is mutatja, hogy lúgos környezetben a szív mitokondriumok szukcináttal támogatott ROS termelése nem a $\Delta\psi_m$ függvénye.

6.2.2 Valinomycin

Valinomycin jelenlétében a mitokondriális belső membrán átjárhatóvá válik K^+-ra. A valinomycin hatása nagy mértékben függ az oldat K^+ koncentrációjától és az

alkalmazott valinomycin koncentrációjától. Példának okáért magas K^+ koncentráció és 2 mM KH_2PO_4 jelenlétében mitokondriális duzzadás figyelhető meg [257, 258]. Közismert tény, hogy a legnagyobb ΔpH-t alacsony K^+ koncentráció mellett lehet elérni izolált mitokondriumban [259-261]. Érdemes megemlíteni, hogy a ΔpH alacsony K^+ koncentráció mellett 0.6-0.8 egységnyi, míg magas K^+ koncentráció esetén 0.3. Kísérleteinkben a valinomycin hozzáadására a mitokondriális mátrix lúgosodott és a ΔpH növekedett, ami azzal magyarázható, hogy a valinomycin által indukált K^+ beáramlást H^+ kiáramlás és Pi^-/OH^- csere kísér [262]. A H^+ kiáramlás pedig $\Delta\psi_m$ csökkenését *(18. B,D,F ábra)*, illetve a mitokondriális légzés fokozását vonja maga után szukcináttal és α-GP-vel lélegeztetett mitokondriumokon.

6.2.3 Az extramitokondriális pH hatása a H_2O_2 termelésre

Szukcináttal vagy α-GP-val energetizált mitokondriumokban a mátrix savanyodásakor a ΔpH emelkedik *(20. ábra)*, a ROS termelés pedig csökken *(19. ábra)* hasonlóan ahhoz, amit *Selivanov* és munkacsoportja is látott [215]. A ΔpH és a H_2O_2 termelés között fordított arányosság áll fent, ami ellentétben áll *Lambert* és kollégái feltételezésétől, miszerint a ΔpH szerepe a meghatározó a RET által támogatott ROS termelésben [159]. Azonban mi mértük a pH_{in}-t és ebből kiszámoltuk a ΔpH-t, ami arra utal, hogy a ΔpH magasabb alacsonyabb pH_{extra} esetén és pH_{extra} növekedésével csökken *(20. ábra)*.

6.2.4 Hogyan befolyásolja a $\Delta\psi_m$ és ΔpH a H_2O_2 termelést?

Ennek megértéshez a CI működésének és ROS termelő képességének ismerete szükséges, amit a bevezetésben (2.7 fejezet h) pont) részletesen ismertettem.

$\Delta\psi_m$: A CI-n belül az elektronok áramlásuk során egyre nagyobb redoxpotenciállal rendelkező komponensekre kerülnek, az így felszabaduló energiát használják fel a protonok kipumpálására. Az utolsó vas-kén fehérje (N2) és az kinol között a legnagyobb a redoxpotenciál-különbség, így ez az energia elegendő a protonok kipumpálásra (lásd: 2.7. fejezet h) pont) [99, 148]. Azonban ha a $\Delta\psi_m$ elég magas, az elektrontranszport lelassul, a protonok kipumpálása lassabb lesz a magasabb „backpressure”, tehát a CI-re

visszaható nyomás miatt [263]. Ez lehetővé teszi hosszú élet idejű szemikinonok ($SQ^{\cdot-}$) keletkezését, amelyek O_2-vel reagálva $O_2^{\cdot-}$ -t képeznek. Szétkapcsolószer hatására csökken a $\Delta\psi_m$, ami az előbb említett folyamat miatt fokozza a CI protonpumpa aktivitását és az elektrontranszportot [263].

ΔpH és pH_{extra}: A méréseink nem támogatják azt a feltételezést, miszerint a RET által indukált ROS termelést a ΔpH jobban befolyásolná, mint a $\Delta\psi_m$. A ROS termelés pH függésében a CI I_Q-alegységén (kinonkötő) termelődő $SQ^{\cdot-}$-nak van szerepe [150, 155]. A CI I_Q-alegységén a kinon reagál egy elektronnal $SQ^{\cdot-}$-t képezve, amely ezt követően két irányban alakulhat tovább [215]: (1) egy elektronnal és két protonnal kinollá redukálódik ($SQ^{\cdot-} + e^- + 2\,H^+ \leftrightarrow QH_2$), vagy (2) oxigénnel reagálva $O_2^{\cdot-}$ -t képez ($SQ^- + O_2 \leftrightarrow Q + O_2^{\cdot-}$). Alacsony pH-n (magas H^+ koncentráció) az (1) reakció a kinolképződésének irányába van eltolva a Le Chatelier elv alapján, tehát alacsonyabb pH-n kevesebb ROS képződik [215].

6.2.5 Eredményeink jelentősége: „mild uncoupling” vagy enyhe szétkapcsolás

Az „enyhe” szétkapcsolás egy olyan speciális állapot, amikor az OXPHOS még működik és a mitokondriális belső membrán protonáteresztő képessége megemelkedik. Emiatt a $\Delta\psi_m$ kismértékben csökken, ami a ROS termelés csökkenését vonja maga után, emellett a légzés kismértékben nő és a *pmf* csökken [113, 136, 157, 264]. Eredményeink támogatják ezt a hipotézist, ugyanis a $\Delta\psi_m$ kismértékű csökkenése nagymértékben gátolja a szukcináttal vagy α-GP-vel előidézett ROS termelést. Szétkapcsolófehérjék (uncoupling protein; UCP1-3) és az ANT is részt vesznek az enyhe szétkapcsolásban [265, 266]. Érdekességképpen a $O_2^{\cdot-}$ aktiválhatja a szétkapcsolófehérjéket zsírsavak jelenlétében, így saját maga is indukálhat enyhe szétkapcsolást [267]. *In vivo* fiziológiás körülmények között az ATP szintézis miatt fellépő depolarizáció elegendő a ROS termelés csökkentésére [158, 161]. Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy enyhe szétkapcsolás a magas $\Delta\psi_m$ mellett kialakuló oxidatív stresszel járó állapotok, mint például iszkémia-reperfúzió esetén lehet hatékony [268]. Egyes tanulmányok szerint [43] iszkémia során a SDH megfordul, aminek következtében a szukcinát felhalmozódik. Reperfúzió során pedig a SDH visszafordul, a felhalmozódott szukcinát oxidálódik és a RET révén fokozza a ROS termelést.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy adatink alapján a szukcináttal és α-GP-vel támogatott H_2O_2 termelést a $\Delta\psi_m$ jobban befolyásolja, mint a *pmf* másik komponense a ΔpH. Továbbá érdemes megfontolni az enyhe szétkapcsoláson alapuló módszerek, mint például mitokondrium célzott antioxidánsok, terápiás alkalmazását.

7. Következtetések

Munkánk során bebizonyítottuk, hogy a MB az ún. alternatív elektrontranszport révén képes fokozni a citrátköri szubsztrát-szintű foszforilációt. A folyamat során annyi ATP keletkezhet, amely elegendő a mitokondriális légzési lánc gátlása során (CI, CII, CIII) a $\Delta\psi_m$ visszaállítására. Tanulmányunk megerősítette a MB neuroprotekcióban betöltött fontos szerepét, így ígéretes vegyületként merül fel a légzési lánc károsodással járó kórképek terápiájában.

További eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a RET által támogatott H_2O_2 termelés befolyásolásában a meghatározó szerepet a *pmf* domináns komponense, a $\Delta\psi_m$ játssza. Így a RET által támogatott H_2O_2 termelés csökkentése érdekében érdemes olyan módszerek/vegyületek alkalmazását megfontolni, amelyek a $\Delta\psi_m$ csökkentése által hatnak a főbb mitokondriális funkciók károsítása nélkül. Ilyen például az enyhe szétkapcsoláson alapuló mitokondrium célzott antioxidánsok alkalmazása.

8. Összefoglalás

Jelen disszertációban vizsgáltuk egy mitokondriális célponttal rendelkező vegyület, a MB hatását a szubsztrát-szintű foszforilációra tengerimalac agyból izolált mitokondriumokon. Munkacsoportunk korábbi munkáiból kiderül, hogy a MB a mitokondriális légzési lánc gátlása (CI, CII és CIII) miatt felhalmozódott NADH-ról eltávolítja az elektronokat, és a citokróm c-re szállítja.

Új eredményeink a következők:

- A MB fokozta a citrátköri SSF-t α-KG-val és glutamáttal energetizált agyi mitokondriumokban, ha az AK-t (~80%-kal) és az ATP-szintázt oligomycinnel gátoltuk, de nem volt megfigyelhető ez a hatás szukcinát és malát esetén.
- A MB fokozta minden egyes vizsgált szubsztráttal oligomycin jelenlétében a mitokondriális oxigénfogyasztást. Ugyanezen körülmények között csökkentette a NAD(P)H autofluoreszcenciát α-KG esetén.
- A MB a CI és az ATP-szintáz együttes gátlása esetén fokozta az oxigénfogyasztást és visszaállította a $\Delta\psi_m$-t α-KG-val és maláttal energetizált agyi mitokondriumokban.

A mitokondriális ROS termelés egyik speciális állapota a RET által támogatott ROS képződés. Jelen disszertációmban azt vizsgáltuk, hogy a *pmf* komponensei ($\Delta\psi_m$ és ΔpH) hogyan befolyásolják a RET által támogatott ROS termelést szukcinát és α-GP jelenlétében; illetve a *pmf* két komponense közül melyiknek van nagyobb hatása a RET által támogatott ROS termelésre.

Munkánk során bebizonyítottuk:

- A RET által támogatott H_2O_2 termelés sokkal nagyobb mértékben függ a $\Delta\psi_m$-tól, mint a ΔpH-tól mind szukcinát, mind α-GP jelenlétében.
- A pH_{extra} emelésével párhuzamosan nőtt a RET által támogatott H_2O_2 termelés ionofórok jelenlétében és anélkül szukcináttal vagy α-GP-vel energetizált mitokondriumokban.
- A RET által támogatott H_2O_2 termelés fordított arányban változott a ΔpH-val. A pH_{extra} növelésével nőtt a H_2O_2 termelés, míg csökkent a ΔpH.
- A RET szabályozása nem szervspecifikus: $\Delta\psi_m$ nagyobb hatással van a RET-re, mint ΔpH a szív mitokondriumok esetén is.

9. Summary

In my thesis we have elucidated the effect of a neuroprotective compound, methylene blue (MB) on substrate level phosphorylation (SLP) using brain mitochondria isolated from guinea-pig. It is well-known that MB provides an alternative way of electron transport from NADH and $FADH_2$ to cytochrome c during impairment of complex I, complex II or complex III. Our new findings are the following:

- MB initiated mitochondrial SLP catalysed by succinyl-CoA ligase in α-KG and glutamate respiring mitochondria under conditions, when the other ATP producing enzymes, adenylate kinase and the ATP synthase were inhibited. This phenomenon was not observed with succinate and malate.
- MB increased the oxygen consumption with each substrate in oligomycin-inhibited mitochondria. Under the same conditions, it decreased the NAD(P)H autofluorescence after the addition of oligomycin with α-KG.
- MB increased the oxygen consumption and restored $\Delta\psi_m$ in CI and ATP synthase inhibited, α-KG or malate respiring mitochondria.

The reverse electron transfer (RET) supported ROS is a special condition of mitochondrial ROS formation, when the electrons are transferred from complex II and α-glycerophosphate towards complex I in hyperpolarised mitochondria. In this thesis we have investigated the effect of the components of the protonmotive force (*pmf*) ($\Delta\psi_m$ and ΔpH) on the RET-initiated H_2O_2 production, with succinate and α-glycerophosphate (α-GP). The aim was to determine which component of the *pmf* displays the more dominant effect on RET-provoked H_2O_2 generation.

Our findings are listed in the following points:

- $\Delta\psi_m$ has a greater role in the modulation of RET supported H_2O_2 production than ΔpH in succinate or α-GP respiring mitochondria.
- Upon elevation of pH_{extra} RET-supported H_2O_2 formation was increasing in succinate or α-GP energised mitochondria.
- There is an inverse relationship between the RET-supported H_2O_2 formation and ΔpH: upon elevation of pH_{extra} ΔpH decreased, while the H_2O_2 generation increased.
- In heart mitochondria the RET-supported H_2O_2 generation was also more dependent on $\Delta\psi_m$ than ΔpH.

10. Irodalomjegyzék

1. Nicholls DG, Ferguson SJ. Bioenergetics 4. Academic Press, Elsevier, Oxford, 2013: 3-8, 53-58,.
2. Ernster L., Schatz G. (2013) Mitochondria: a historical review. J Cell Biol, 91: 227-255.
3. Lane N. Power, Sex, Suicide: Mitochondria and a meaning of life. Oxford University Press, 2005: 3-18.
4. Altmann R. Die Elementarorganismen und ihre Beziehung zu den Zellen. Verlag von VEIT and COMP., 1890.
5. Benda C. Über die Spermatogenese der Vertebraten und höhere Vertebraten II. Teil: Die Histiogenese der Spermien. Arch Anal Physiology. 1898: 393-398.
6. Margulis L. Origins of Sex. Three Billion Years of Genetic Recombination. . New Haven: Yale University Press., 87, 1986: 69-71.
7. Anderson S. Bankier AT, Barrell BG, de Brujin MH,Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature, 290(5806):457-465.
8. Homo Sapiens mitochondrion, c.g., Revised Cambridge Reference Sequence (rCRS):accession NC_012920. National center for Biotechnology Information 2017.
9. Leigh-Brown S, Enriquez JA, Odom DT. (2010) Nuclear transcription factors in mammalian mitochondria. Genome Biol, 11(7): 215.
10. Duchen, M.R. (2000) Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. J Physiol, 529, : 57-68.
11. Chinopoulos C, Adam-Vizi V. (2006) Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. FEBS J, 273(3): 433-450.
12. Starkov AA, Chinopoulos C, Fiskum G. (2004) Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. Cell Calcium, 36(3-4): 257-264.

13. Lehninger AL. (1970) Mitochondria and calcium ion transport. Biochem J, 119(2): 129-138.
14. Nicholls DG. (2005) Mitochondria and calcium signaling. Cell Calcium, 38(3-4): 311-317.
15. Rizzuto R, Bastianutto C, Brini M, Murgia M, Pozzan T. (1994) Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in intact cells. J Cell Biol, 126(5): 1183-1194.
16. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer,26(4):239-257.
17. Green DR,Reed JC. (1998) Mitochondria and apoptosis. Science, 281(5381): 1309-1312.
18. Boveris A Chance B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J, 134(3):707-716.
19. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Biochemistry (Mosc), 70(2): 200-214.
20. Harman D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol, 11(3): 298-300.
21. Harman D. (1972) The biologic clock: the mitochondria? J Am Geriatr Soc, 20(4): 145-147.
22. Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson Jr JE. (1980) Mitochondrial role in cell aging. Exp Gerontol, 15(6): 575-591.
23. Barja G. (2013) Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts. Antioxid Redox Signal, 19(12): 1420-1445.
24. Gibson GE, Park LC, Sheu KF, Blass JP, Calingasan NY.(2000) The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegeneration. Neurochem Int, 36(2): 97-112.
25. Beal MF. (1996) Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. Curr Opin Neurobiol, 6(5),: 661-666.
26. Gotz ME, Kunig G, Rederer P, Youdim MB.(1994) Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. Pharmacol Ther, 63(1):37-122.
27. Chaturvedi RK, Beal FM. (2013) Mitochondrial diseases of the brain. Free Radic Biol Med, 63: 1-29.

28. Bubber P, .Haroutunian V, Fisch G, Blass JP, Gibson GE. (2005) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. Ann Neurol, 57(5): 695-703.
29. Starkov AA, Beal FM. (2008) Portal to Alzheimer's disease. Nat Med, 14(10): 1020-1021.
30. Parker WD Jr, Parks J, Filley CM, Kleinschmidt-Demasters BK. (1994) Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. Neurology, 44(6): 1090-1096.
31. Bose A, Beal FM. (2016) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. J Neurochem, 139: 216-231.
32. Chaturvedi R, Beal FM. (2013) Mitochondria targeted therapeutic approaches in Parkinson's and Huntington's diseases. Mol Cell Neurosci, 55: 101-114.
33. Bindoff LA, Birch-Machin M, Cartlidge NE, Parker Jr WD, Turnbull DM. (1989) Mitochondrial function in Parkinson's disease. Lancet, 2(8653): 49.
34. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D,. Jenner P, Clark JB, Marsden CD.(1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. Lancet, 1(8649): 1269.
35. Brennan WA Jr, Bird ED, Aprille JR. (1985) Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. J Neurochem, 44(6): 1948-1950.
36. Parker Jr WD, Boyson SJ, Luder AS, Parks JK. (1990) Evidence for a defect in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) in Huntington's disease. Neurology, 40(8): 1231-1234.
37. Lowell BB, Shulman GI. (2005) Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. Science, 307(5708): 384-387
38. Parish R, Petersen KF. (2005) Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. Curr Diab Rep, 5(3): 177-183.
39. Sivitz WI, Yorek MA. (2010) Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal, 12(4): 537-577.
40. Wallace DC. (2012) Mitochondria and cancer. Nat Rev Cancer, 12(10),: 685-698.
41. Carew JS, Huang P. (2002) Mitochondrial defects in cancer. Mol Cancer, 1: 9.

42. Jezek J, Cooper KF, Strich R. (2018) Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. Antioxidants (Basel), 7(1):e13.
43. Chouchani ET, Pell R, Gaude E, Aksentijevic D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord EN, Smith AC,.Eyassu F, Shirley R,. Hu CH,. Dare AJ, James AM, Rogatti S, Hartley RC, Eaton S, Costa AS, Brookes PS, Davidson SM, Duchen MR, Saeb-Parsy K, ShattockMJ, Robinson AJ, Work LM, Frezza C, Krieg T, Murphy MP. (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. Nature, 515(7527): 431-435.
44. Granger DN, Kvietys PR. (2015) Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. Redox Biol, 6: 524-551.
45. Hausenloy DJ, Yellon DM. (2008) Time to take myocardial reperfusion injury seriously. N Engl J Med, 359(5): 518-520.
46. Di Lisa F, Bernardi P. (2006) Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. Cardiovasc Res, 70(2): 191-199.
47. Skulachev VP. (2012) Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. J Alzheimers Dis, 28(2): 283-289.
48. Dong LF, Neuzil J. (2014) Mitochondria in cancer: why mitochondria are a good target for cancer therapy. Prog Mol Biol Transl Sci, 127: 211-227.
49. Mitchell P. (1960) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, 191: 144-148.
50. Mitchell P. (2011) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. 1966. Biochim Biophys Acta, 1807(12): 1507-1538.
51. Klingenberg M, Rottenberg H. (1977) Relation between the gradient of the ATP/ADP ratio and the membrane potential across the mitochondrial membrane. Eur J Biochem, 73(1), 1977:125-1230.
52. Walker JE. (2013) The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. Biochem Soc Trans, 41(1): 1-16.
53. Siekevitz P. (1953) Powerhouses of the cell. Scientific American, 197:131-144.
54. Panayiotou C, Solaroli N, Karlsson A. (2014) The many isoforms of human adenylate kinases. Int J Biochem Cell Biol, 49: 75-83.

55. Bruns GA, Regina VM. (1977) Adenylate kinase 2, a mitochondrial enzyme. Biochem Genet, 15(5-6): 477-486.
56. Nobumoto M, Yamada M, Song S, Inouye S, Nakazawa A.(1998) Mechanism of mitochondrial import of adenylate kinase isozymes. J Biochem, 123(1): 128-135.
57. Heldt HW, Schwalbach K. (1967) The participation of GTP-AMP-P transferase in substrate level phosphate transfer of rat liver mitochondria. Eur J Biochem, 1(2): 199-206.
58. Johnson JD, Mehus JG, Tews K, Milavetz BI,. Lambeth DO.(1998) Genetic evidence for the expression of ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in multicellular eucaryotes. J Biol Chem, 273(42): 27580-27586.
59. Chinopoulos C. (2011) The "B space" of mitochondrial phosphorylation. J Neurosci Res, 89(12): 1897-1904.
60. Chinopoulos C. (2011) Mitochondrial consumption of cytosolic ATP: not so fast. FEBS Lett, 585(9): 1255-1259.
61. Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Nissim I.(2000) Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(6): 2826-2831.
62. Smith RE, Roberts JC, Hittelman KJ. (1966) Nonphosphorylating respiration of mitochondria from brown adipose tissue of rats. Science, 154(3749): 653-654.
63. Rafael J, Wiemer G, Hohorst HJ. (1974) Mitochondria from brown adipose tissue: influence of albumin, guanine nucleotides and of substrate level phosphorylation on the internal adenine nucleotide pattern. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 355(3): 341-352.
64. Chinopoulos C, Adam-Vizi V. (2010) Mitochondria as ATP consumers in cellular pathology. Biochim Biophys Acta, 1802(1): 221-227.
65. Rouslin W, Erickson JL, Solaro RJ. (1986) Effects of oligomycin and acidosis on rates of ATP depletion in ischemic heart muscle. Am J Physiol, 250(3 Pt 2): H503-H508.
66. Walker JE. (1994) The regulation of catalysis in ATP synthase. Curr Opin Struct Biol, 4(6): 912-918.

67. Kiss G, Konrad C, Doczi J, Starkov AA, Kawamata H, Manfredi G, Zhang SF, Gibson GE, Beal FM, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. (2013) The negative impact of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex deficiency on matrix substrate-level phosphorylation. FASEB J, 27(6): 2392-2406.
68. Caro, H., Engl.Pat. 3751 9/10. 1877.
69. Barcia JJ. (2007) The Giemsa stain: its history and applications. Int J Surg Pathol, 15(3): 292-296.
70. Guttman P, Ehrlich P. (1891) Ueber die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. Berliner Klinische Wochenschrift, 39: 953-956.
71. Ehrlich P. (1886) Über die Methylenblaureaktion der lebenden Nervensubstanz. Dtsch.Med. Wochenschr., 12: 49-52.
72. Farber PM, Arscott LD, Williams CH, Jr., Becker K, Schirmer RH. (1998) Recombinant Plasmodium falciparum glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue. FEBS Lett, 422(3): 311-314.
73. Schirmer RH, Coulibaly B, Stich A, Scheiwein M, Merkle H, Eubel J,. Becker K, Becher H, Muller O, Zich T, Schiek W, Kouyate B.(2003) Methylene blue as an antimalarial agent. Redox Rep, 8(5): 272-275.
74. Draize JH. (1933) Sodium Tetrathionate and Methylene Blue in Cyanide and Carbon Monoxide Poisoning. Science, 78(2016):145.
75. Naylor GJ, Dick DA, Johnston BB, Hopwood SE, Dick EG, Smith AH, Kay D.(1981) Possible explanation for therapeutic action of lithium, and a possible substitute (methylene-blue). Lancet, 2(8256): 1175-1176.
76. Naylor GJ, Smith AH, Connelly P. (1987) A controlled trial of methylene blue in severe depressive illness. Biol Psychiatry, 22(5): 657-659.
77. Wendel WB. (1939) The Control of Methemoglobinemia with Methylene Blue. J Clin Invest, 18(2):179-185
78. Kupfer A, Aeschlimann C, Wermuth B, Cerny T. (1994) Prophylaxis and reversal of ifosfamide encephalopathy with methylene-blue. Lancet, 343(8900): 763-764.
79. Preiser JC, Lejeune P, Roman A, Carlier E, De Backer D, Leeman M, Kahn RJ, Vincent JL. (1995) Methylene blue administration in septic shock: a clinical trial. Crit Care Med, 23(2): 259-264.

80. Wischik CM, Edwards PC, Lai RY, Roth M, Harrington CR. (1996) Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(20): 11213-11218

81. Wen Y, Li W, Poteet EC, Xie L, Tan C, Yan LJ, Ju X, Liu R, Qian H, Marvin MA, Goldberg MS, She H, Mao Z, Simpkins JW, Yang SH. (2011) Alternative mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection. J Biol Chem, 286(18): 16504-16515.

82. Atamna H, Nguyen A, Schultz C, Boyle K, Newberry J, Kato H, Ames BN. (2008) Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. FASEB J, 22(3): 703-712.

83. Atamna H, Kumar R. (2010) Protective role of methylene blue in Alzheimer's disease via mitochondria and cytochrome c oxidase. J Alzheimers Dis, 20:. 439-452.

84. Mansouri A, Lurie AA. (1993) Concise review: methemoglobinemia. Am J Hematol, 42(1): 7-12.

85. Al-Lawati A, Murch N. (2012) Acquired methemoglobinaemia. Sultan Qaboos Univ Med J, 12(2): 237-241.

86. https://www.ogyei.gov.hu/kiseroirat/ah/ah_0000022585_20110826101534.doc.

87. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/204630s000lbl.pdf.

88. Bruchey AK, Gonzalez-Lima F. (2008) Behavioral, Physiological and Biochemical Hormetic Responses to the Autoxidizable Dye Methylene Blue. Am J Pharmacol Toxicol, 3(1): 72-79.

89. Lee SK, Mills A. (2003) Novel photochemistry of leuco-Methylene Blue. Chem Commun (Camb), 18: 2366-2367.

90. Calabrese EJ,. Bachmann KA,. Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, Cedergreen N, Cherian MG, Chiueh CC, Clarkson TW, Cook RR, Diamond DM, Doolittle DJ, Dorato MA, Duke SO, Feinendegen L, Gardner DE, Hart RW, Hastings KL, Hayes AW, Hoffmann GR, Ives JA, Jaworowski Z, Johnson TE, Jonas WB, Kaminski NE, Keller JG, Klaunig JE, Knudsen TB, Kozumbo WJ, Lettieri T, Liu SZ, Maisseu A, Maynard KI, Masoro EJ, McClellan RO, Mehendale HM, Mothersill C, Newlin DB, Nigg HN, Oehme FW, Phalen RF, Philbert MA, Rattan SI, Riviere JE, Rodricks J, Sapolsky RM, Scott BR, Seymour C, Sinclair DA,

Smith-Sonneborn J, Snow ET, Spear L, Stevenson DE, Thomas Y, Tubiana M, Williams GM, Mattson MP. (2007) Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. Toxicol Appl Pharmacol, 222(1): 122-128.

91. Callaway NL, Riha PD, Bruchey AK, Munshi Z, Gonzalez-Lima F. (2004) Methylene blue improves brain oxidative metabolism and memory retention in rats. Pharmacol Biochem Behav, 77(1): 175-181.

92. Gabrielli D, Belisle E, Severino D, Kowaltowski AJ, Baptista MS. (2004) Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. Photochem Photobiol, 79(3): 227-232.

93. Rojas JC, Bruchey AK, Gonzalez-Lima F. (2012) Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue. Prog Neurobiol, 96(1): 32-45.

94. Wainwright M, Crossley KB. (2002) Methylene Blue-a therapeutic dye for all seasons? J Chemother, 14(5): 431-443.

95. Tardivo JP, del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, Severino D, de Fatima Turchiello R, Baptista MS. (2005) Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2(3): 175-191.

96. Dixon M. (1971) The acceptor specificity of flavins and flavoproteins. II. Free flavins. Biochim Biophys Acta, 226(2): 259-268.

97. McCord JM, Fridovich I. (1970) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. J Biol Chem, 245(6): 1374-1377.

98. Tretter L, Horvath G, Holgyesi A, Essek F, Adam-Vizi V. (2014) Enhanced hydrogen peroxide generation accompanies the beneficial bioenergetic effects of methylene blue in isolated brain mitochondria. Free Radic Biol Med, 77: 317-330.

99. Brandt U. (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). Annu Rev Biochem, 75: 69-92.

100. Voet DV, Pratt CW. Fundamentals of Biochemistry. John Wiley & Sons, New York, 2013: 585

101. Zoski CG. Handbook of Electrochemistry. Elsevier, Oxford. 2007: 821.

102. Callaway NL, Riha PD, Wrubel KM, McCollum D, Gonzalez-Lima F. (2002) Methylene blue restores spatial memory retention impaired by an inhibitor of cytochrome oxidase in rats. Neurosci Lett, 332(2): 83-86.
103. Atamna H, Frey WH. (2004) A role for heme in Alzheimer's disease: heme binds amyloid beta and has altered metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(30): 11153-11158.
104. Turrens JF. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol, 552(Pt 2): 335-344.
105. Loew O. (1900) A New Enzyme of General Occurrence in Organismis. Science, 11(279): 701-702.
106. Haber F, Weiss J. (1932) Über die Katalyse des Hydroperoxides. Naturwissenschaften, 20(51): 948-950.
107. Fenton HJH. (1894) Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. J.Chem. Soc. Trans., 65(65): 899-911.
108. Aikens J, Dix TA. (1991) Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. J Biol Chem, 266(23): 15091-15098.
109. Beckman JS, Koppenol WH. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol, 271(5 Pt 1): C1424-C1437.
110. Gorlach A, Dimova EY, Petry A, Martinez-Ruiz A, Hernansanz-Agustin P, Rolo AP, Palmeira AM, Kietzmann T. (2015) Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? Redox Biol, 6: 372-385.
111. Boveris A, Oshino N, Chance B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem J, 128(3): 617-630.
112. Brand MD. (2016) Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. Free Radic Biol Med, 100: 14-31.
113. Skulachev VP. (1996) Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. Q Rev Biophys, 29(2): 169-202.
114. Andreyev AY, Kushnareva YE, Murphy AN, Starkov AA. (2015) Mitochondrial ROS Metabolism: 10 Years Later. Biochemistry (Mosc), 80(5): 517-31.

115. Chance B, Sies H, Boveris A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev, 59(3): 527-605.
116. Goncalves RL, Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Brand MD. (2015) Sites of superoxide and hydrogen peroxide production by muscle mitochondria assessed ex vivo under conditions mimicking rest and exercise. J Biol Chem, 290(1): 209-227.
117. Humphries KM, Szweda LI. (1998) Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. Biochemistry, 37(45): 15835-15841.
118. Tretter L, Adam-Vizi V. (2000) Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. J Neurosci, 20(24): 8972-8979.
119. Bindoli A. (1988) Lipid peroxidation in mitochondria. Free Radic Biol Med, 5(4): 247-261.
120. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Kennedy MC. (2000) Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation. J Biol Chem, 275(19): 14064-14069.
121. Tretter L, Adam-Vizi V. (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. J Neurosci, 24(36): 7771-7778.
122. Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. J Neurosci, 24(36): 7779-7788.
123. Sheu KF, Blass JP. (1999) The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. Ann N Y Acad Sci, 893: 61-78.
124. Kunz WS, Kunz W. (1985) Contribution of different enzymes to flavoprotein fluorescence of isolated rat liver mitochondria. Biochim Biophys Acta, 841(3): 237-246.
125. Gibson GE, Sheu KF, Blass JP, Baker A, Carlson KC, Harding B, Perrino P. (1988) Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. Arch Neurol, 45(8): 836-840.

126. Ambrus A, Nemeria NS, Torocsik B, Tretter L, Nilsson M, Jordan F, Adam-Vizi V. (2015) Formation of reactive oxygen species by human and bacterial pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complexes reconstituted from recombinant components. Free Radic Biol Med, 89: 642-650.

127. Bunik VI, Degtyarev D. (2008) Structure-function relationships in the 2-oxo acid dehydrogenase family: substrate-specific signatures and functional predictions for the 2-oxoglutarate dehydrogenase-like proteins. Proteins, 71(2): 874-890.

128. Goncalves RL, Bunik VI, Brand MD. (2016) Production of superoxide/hydrogen peroxide by the mitochondrial 2-oxoadipate dehydrogenase complex. Free Radic Biol Med, 91: 247-255.

129. Quinlan CL, Goncalves RL, Hey-Mogensen M, Yadava N, Bunik VI, Brand MD. (2014) The 2-oxoacid dehydrogenase complexes in mitochondria can produce superoxide/hydrogen peroxide at much higher rates than complex I. J Biol Chem, 289(12): 8312-8325.

130. Nemeria NS, Gerfen G, Yang L, Zhang X, Jordan F. (2018) Evidence for functional and regulatory cross-talk between the tricarboxylic acid cycle 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and 2-oxoadipate dehydrogenase on the l-lysine, l-hydroxylysine and l-tryptophan degradation pathways from studies in vitro. Biochim Biophys Acta, 1859(9): 932-939.

131. Indo Y, Kitano A, Akaboshi I, Endo F, Matsuda I. (1987) A structural abnormality of E1 component of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex in maple syrup urine disease. J Inherit Metab Dis, 10(3): 281-283.

132. Loffler M, Becker C, Wegerle E, Schuster G. (1996) Catalytic enzyme histochemistry and biochemical analysis of dihydroorotate dehydrogenase/oxidase and succinate dehydrogenase in mammalian tissues, cells and mitochondria. Histochem Cell Biol, 105(2): 119-128.

133. Drahota Z, Chowdhury SK, Floryk D, Mracek T, Wilhelm J, Rauchova H, Lenaz G, Houstek J. (2002) Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide. J Bioenerg Biomembr, 34(2): 105-113.

134. Tretter L, Takacs T, Hegedus V, Adam-Vizi V. (2007) Characteristics of alpha-glycerophosphate-evoked H_2O_2 generation in brain mitochondria. J Neurochem, 100(3): 650-663.

135. Orr AL, Quinlan CL, Pereshchikova IV, Brand MD. (2012) A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. J Biol Chem, 287(51): 42921-42935.

136. Miwa S, Brand MD. (2003) Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. Biochem Soc Trans, 31(Pt 6): 1300-1301.

137. Hauptmann N, Grimsby J, Shih JC, Cadenas E. (1996) The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. Arch Biochem Biophys, 335(2): 295-304.

138. Kumar MJ, Nicholls DG, Andersen JK. (2003) Oxidative alpha-ketoglutarate dehydrogenase inhibition via subtle elevations in monoamine oxidase B levels results in loss of spare respiratory capacity: implications for Parkinson's disease. J Biol Chem, 278(47): 46432-46439.

139. Kunduzova OR, Bianchi P, Parini A, Cambon C: (2002) Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia/reperfusion. Eur J Pharmacol, 448(2-3): 225-230.

140. Nishino H, Ito A. (1986) Subcellular distribution of OM cytochrome b-mediated NADH-semidehydroascorbate reductase activity in rat liver. J Biochem, 100(6): 1523-1531.

141. Whatley SA, Curti D, Marchbanks RM.(1996) Mitochondrial involvement in schizophrenia and other functional psychoses. Neurochem Res, 21(9): 995-1004.

142. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, Pelliccia G, Luzi L, Minucci S, Marcaccio M, Pinton P, Rizzuto R, Bernardi P, Paolucci F, Pelicci PG. (2005) Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. Cell, 122(2): 221-233.

143. Zhang L, Yu L, Yu CA. (1998) Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. J Biol Chem, 273(51): 33972-33976.

144. Quinlan CL, Orr AL, Perevoshchikova IV, Treberg JR, Ackrell BA, Brand MD. (2012) Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. J Biol Chem, 287(32): 27255-27264.
145. Siebels I, Drose S. (2013) Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates. Biochim Biophys Acta, 1827(10): 1156-1164.
146. Ackrell BA, Kearney EB, Singer TP. (1978) Mammalian succinate dehydrogenase. Methods Enzymol, 53: 466-483.
147. Palmieri F, Prezioso G, Quagliariello E, Klingenberg M. (1971) Kinetic study of the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. Eur J Biochem, 22(1): 66-74.
148. Treberg JR, Brand MD. (2011) A model of the proton translocation mechanism of complex I. J Biol Chem, 286(20): 17579-17584.
149. Belogrudov G, Hatefi Y. (1994) Catalytic sector of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase): subunit stoichiometry and substrate-induced conformation changes. Biochemistry, 33(15): 4571-4576.
150. Ohnishi ST, Ohnishi T, Muranaka S, Fujita H, Kimura H, Uemura K, Yoshida K, Utsumi K. (2005) A possible site of superoxide generation in the complex I segment of rat heart mitochondria. J Bioenerg Biomembr, 37(1): 1-15.
151. Grivennikova VG, Vinogradov AD. (2006) Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. Biochim Biophys Acta, 1757(5-6): 553-561.
152. Pryde KR, Hirst J. (2011) Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. J Biol Chem, 286(20): 18056-18065.
153. Galkin A, Brandt U. (2005) Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from Yarrowia lipolytica. J Biol Chem, 280(34): 30129-30135.
154. Brand MD. (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production. Exp Gerontol, 45(7-8): 466-472.
155. Treberg JR, Quinlan CL, Brand MD. (2011) Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). J Biol Chem, 286(31): 27103-27110.

156. Hinkle PC, Butow RA, Racke ER, Chance B. (1967) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XV. Reverse electron transfer in the flavin-cytochrome beta region of the respiratory chain of beef heart submitochondrial particles. J Biol Chem, 242(22): 5169-5173.

157. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. FEBS Lett, 416(1): 15-18.

158. Starkov AA, Fiskum G. (2003) Regulation of brain mitochondrial H_2O_2 production by membrane potential and NAD(P)H redox state. J Neurochem, 86(5): 1101-1107.

159. Lambert AJ, Brand MD. (2004) Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. Biochem J, 382(Pt 2): 511-517.

160. Tretter L, Adam-Vizi V. (2007) Moderate dependence of ROS formation on DeltaPsim in isolated brain mitochondria supported by NADH-linked substrates. Neurochem Res, 32(4-5): 569-575.

161. Votyakova TV, Reynolds IJ. (2001) DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. J Neurochem, 79(2): 266-277.

162. Krishnamoorthy G, Hinkle PC. (1988) Studies on the electron transfer pathway, topography of iron-sulfur centers, and site of coupling in NADH-Q oxidoreductase. J Biol Chem, 263(33): 17566-17575.

163. Kwong LK, Sohal RS. (1998) Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. Arch Biochem Biophys, 350(1): 118-126.

164. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. J Neurochem, 80(5): 780-787.

165. Zoccarato F, Miotto C, Cavallini L, Alexandre A. (2011) The control of mitochondrial succinate-dependent H_2O_2 production. J Bioenerg Biomembr, 43(4): 359-366.

166. Trumpower BL. (1990) The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex. J Biol Chem, 265(20): 11409-11412.

167. Crofts AR, Barquera B, Gennis RB, Kuras R, Guergova-Kuras M, Berry EA. (1999) Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc(1) complex: different domains of the quinol binding pocket and their role in the mechanism and binding of inhibitors. Biochemistry, 38(48): 15807-15826.

168. Turrens JF. (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Biosci Rep, 17(1): 3-8.

169. Quinlan CL, Gerencser AA, Treberg JR, Brand MD. (2011) The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle. J Biol Chem, 286(36): 31361-31372.

170. McCord JM, Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem, 244(22): 6049-6055.

171. Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, White CW. (1995) Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. J Biol Chem, 270(22): 13399-13405.

172. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. J Biol Chem, 279(47): 49064-49073.

173. Field LS, Furukawa Y, O'Halloran TV, Culotta VC. (2003) Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. J Biol Chem, 278(30): 28052-28059.

174. Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP. (1993) Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. Science, 261(5124): 1047-1051.

175. Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. (2004) Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. J Biol Chem, 279(31): 32804-32812.

176. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. J Biol Chem, 266(32): 22028-22034.

177. Antunes F, Han D, Cadenas E. (2002) Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H_2O_2detoxification in in vivo conditions. Free Radic Biol Med, 33(9): 1260-1267.

178. Griffith OW, Meister A. (1985) Origin and turnover of mitochondrial glutathione. Proc Natl Acad Sci U S A, 82(14): 4668-4672.
179. Martensson J, Lai JC, Meister A. (1990) High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. Proc Natl Acad Sci U S A, 87(18): 7185-7189.
180. Chen Z, Lash LH. (1998) Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. J Pharmacol Exp Ther, 285(2): 608-618.
181. Wahllander A, Soboll S, Sies H, Linke I, Muller M. (1979) Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases. FEBS Lett, 97(1): 138-140.
182. Rebrin I, Kamzalov S, Sohal RS. (2003) Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. Free Radic Biol Med, 35(6): 626-635.
183. Dringen R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. Prog Neurobiol, 62(6): 649-671.
184. Olafsdottir K, Reed DJ. (1988) Retention of oxidized glutathione by isolated rat liver mitochondria during hydroperoxide treatment. Biochim Biophys Acta, 964(3): 377-382.
185. Panfili E, Sandri G, Ernster L. (1991) Distribution of glutathione peroxidases and glutathione reductase in rat brain mitochondria. FEBS Lett, 290(1-2): 35-37.
186. Esposito LA, Kokoszka JE, Waymire KG, Cottrell B, MacGregor GR, Wallace DC. (2000) Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. Free Radic Biol Med, 28(5): 754-766.
187. Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, Funk CD. (1997) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. J Biol Chem, 272(26): 16644-16651.
188. de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, Zheng SS, Beart PM, Hertzog PJ, Kola I. (1998) Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. J Biol Chem, 273(35): 22528-22536.

189. Vogel R, Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R. (1999) The regeneration of reduced glutathione in rat forebrain mitochondria identifies metabolic pathways providing the NADPH required. Neurosci Lett, 275(2): 97-100.

190. Hoek JB, Rydstrom J. (1988) Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. Biochem J, 254(1): 1-10.

191. Fujii J, Ikeda Y. (2002) Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. Redox Rep, 7(3): 123-130.

192. Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. Trends Biochem Sci, 28(1): 32-40.

193. Gromer S, Urig S, Becker K. (2004) The thioredoxin system-from science to clinic. Med Res Rev, 24(1): 40-89.

194. Chae HZ, Kim HJ, Kang SW, Rhee SG. (1999) Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. Diabetes Res Clin Pract, 45(2-3): 101-112.

195. Grivennikova VG, Maklashina EO, Gavrikova EV, Vinogradov AD. (1997) Interaction of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase with rotenone as related to the enzyme active/inactive transition. Biochim Biophys Acta, 1319(2-3): 223-232.

196. Palmer G, Horgan DJ, Tisdale H, Singer TP, Beinert H. (1968) Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. XIV. Location of the sites of inhibition of rotenone, barbiturates, and piericidin by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy. J Biol Chem, 243(4): 844-847.

197. Cino M, Maestro RF. (1989) Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: the effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia. Arch Biochem Biophys, 1989. 269(2): 623-638.

198. Loschen G, Flohe L, Chance B. (1971) Respiratory chain linked H_2O_2production in pigeon heart mitochondria. FEBS Lett, 18(2): 261-264.

199. Gutman M. (1980) Electron flux through the mitochondrial ubiquinone. Biochim Biophys Acta, 594(1): 53-84.

200. Fato R, Bergamini C, Bortolus M, Maniero AL, Leoni S, Ohnishi T, Lenaz G. (2009) Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. Biochim Biophys Acta, 1787(5): 384-392.

201. Lambert AJ, Brand MD. (2004) Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). J Biol Chem, 279(38): 39414-39420.

202. Miyadera H, Shiomi K, Ui K, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Miyoshi H, Osanai A, Kita K, Omura S. (2003) Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). Proc Natl Acad Sci U S A, 100(2): 473-477.

203. Korge P, Calmettes G, John SA, Weiss JN. (2017) Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: The role of complex III. J Biol Chem, 292(24): 9882-9895.

204. Thorn MB. (1953) Malonate inhibition of succinic dehydrogenase. Biochem J, 53(1): i-2 -ix-1

205. Thorn MB. (1953) Inhibition by malonate of succinic dehydrogenase in heart-muscle preparations. Biochem J, 54(4): 540-547.

206. Ksenzenko M, Konstantinov AA, Khomutov GB, Tikhonov AN, Ruuge EK. (1983) Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome bc1 site of the mitochondrial respiratory chain. FEBS Lett, 155(1): 19-24.

207. Starkov AA, Fiskum G. (2001) Myxothiazol induces H_2O_2 production from mitochondrial respiratory chain. Biochem Biophys Res Commun, 281(3): 645-650.

208. Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. Arch Biochem Biophys, 237(2): 408-414.

209. Tahara EB, Navarete FD, Kowaltowski AJ. (2009) Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. Free Radic Biol Med, 46(9): 1283-1297.

210. Turrens JF, Boveris A. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem J, 191(2): 421-427.

211. Kelner MJ, Alexander NM. (1985) Methylene blue directly oxidizes glutathione without the intermediate formation of hydrogen peroxide. J Biol Chem, 260(28): 15168-15171.

212. Stack C, Jainuddin S, Elipenahli C, Gerges M, Starkova N, Starkov AA, Jove M, Portero-Otin M, Launay N, Pujol A, Kaidery NA, Thomas B, Tampellini D, Beal MF, Dumont M. (2014) Methylene blue upregulates Nrf2/ARE genes and prevents tau-related neurotoxicity. Hum Mol Genet, 23(14): 3716-3732.

213. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. (2011) Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. Genes Cells, 16(2): 123-140.

214. Liu SS. (1997) Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. Biosci Rep, 17(3): 259-272.

215. Selivanov VA, Zeak JA, Roca J, Cascante M, Trucco M, Votyakova TV. (2008) The role of external and matrix pH in mitochondrial reactive oxygen species generation. J Biol Chem, 283(43): 29292-29300.

216. Tretter L, Mayer-Takacs D, Adam-Vizi V. (2007) The effect of bovine serum albumin on the membrane potential and reactive oxygen species generation in succinate-supported isolated brain mitochondria. Neurochem Int, 50(1): 139-147.

217. Tretter L, Adam-Vizi V (2007) Uncoupling is without an effect on the production of reactive oxygen species by in situ synaptic mitochondria. J Neurochem, 103(5): 1864-1871.

218. Gyulkhandanyan AV, Pennefather PS. (2004) Shift in the localization of sites of hydrogen peroxide production in brain mitochondria by mitochondrial stress. J Neurochem, 90(2): 405-421.

219. Korshunov SS, Korkina OV, Ruuge EK, Skulachev VP, Starkov AA. (1998) Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O_2.- and H_2O_2 by mitochondria in the resting state. FEBS Lett, 435(2-3): 215-218.

220. Zoccarato F, Cavallini L, Bortolami S, Alexandre A. (2007) Succinate modulation of H_2O_2 release at NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) in brain mitochondria. Biochem J, 406(1): 125-129.

221. Banh S, Treberg JR. (2013) The pH sensitivity of H_2O_2 metabolism in skeletal muscle mitochondria. FEBS Lett, 587(12): 1799-1804.

222. Lambert AJ, Buckingham JA, Brand MD. (2008) Dissociation of superoxide production by mitochondrial complex I from NAD(P)H redox state. FEBS Lett, 582(12): 1711-1714.

223. Veech RL, Gitomer WL, King MT, Balaban RS, Costa JL, Eanes ED. (1986) The effect of short chain fatty acid administration on hepatic glucose, phosphate, magnesium and calcium metabolism. Adv Exp Med Biol, 194: 617-646.

224. Kaplan RS, Pratt RD, Pedersen PL. (1986) Purification and characterization of the reconstitutively active phosphate transporter from rat liver mitochondria. J Biol Chem, 261(27): 12767-12773.

225. Oliveira GA, Kowaltowski AJ. (2004) Phosphate increases mitochondrial reactive oxygen species release. Free Radic Res, 38(10): 1113-1118.

226. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248-254.

227. Komary Z, Tretter L, Adam-Vizi V. (2008) H_2O_2 generation is decreased by calcium in isolated brain mitochondria. Biochim Biophys Acta, 1777(7-8): 800-807.

228. Williamson JR, Corkey BE. (1979) Assay of citric acid cycle intermediates and related compounds-update with tissue metabolite levels and intracellular distribution. Methods Enzymol, 55: 200-222.

229. Figueira TR, Melo DR, Vercesi AE, Castilho RF. (2012) Safranine as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. Methods Mol Biol, 810: 103-117.

230. Akerman KE, Wikstrom MK. (1976) Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. FEBS Lett, 68(2): 191-197.

231. Kamo N, Muratsugu M, Hongoh R, Kobatake Y. (1979) Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. J Membr Biol, 49(2): 105-121.

232. Rottenberg H. (1984) Membrane potential and surface potential in mitochondria: uptake and binding of lipophilic cations. J Membr Biol, 81(2): 127-138.

233. Rolfe DF, Hulbert AJ, Brand MD. (1994) Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. Biochim Biophys Acta, 1188(3): 405-416.

234. Nicholls, D.G., Personal communications.

235. Jung DW, Davis MH, Brierley GP. (1989) Estimation of matrix pH in isolated heart mitochondria using a fluorescent probe. Anal Biochem, 178(2): 348-354.

236. Han J, Burgess K. (2010) Fluorescent indicators for intracellular pH. Chem Rev, 110(5): 2709-2728.

237. Sipos H, Torocsik B, Tretter L, Adam-Vizi V. (2005) Impaired regulation of pH homeostasis by oxidative stress in rat brain capillary endothelial cells. Cell Mol Neurobiol, 25(1): 141-511.

238. Gorman ES, Shnider MR. (1988) Effect of methylene blue on the absorbance of solutions of haemoglobin. Br J Anaesth, 60(4): 439-444.

239. Matsuno-Yagi A, Hatefi Y. (1986) Kinetic modalities of ATP synthesis. Regulation by the mitochondrial respiratory chain. J Biol Chem, 261(30): 14031-14038.

240. Rigoulet M, Velours J, Guerin B. (1985) Substrate-level phosphorylation in isolated yeast mitochondria. Eur J Biochem, 153(3): 601-607.

241. Smith CM, Bryla J, Williamson JR. (1974) Regulation of mitochondrial alpha-ketoglutarate metabolism by product inhibition at alpha-ketoglutarate dehydrogenase. J Biol Chem, 249(5): 1497-1505.

242. Kiss G, Konrad C, Pour-Ghaz I, Mansour JJ, Nemeth B, Starkov AA, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. (2014) Mitochondrial diaphorases as NAD^+ donors to segments of the citric acid cycle that support substrate-level phosphorylation yielding ATP during respiratory inhibition. FASEB J, 28(4): 1682-1697.

243. Ernster L, Danielson L, Ljunggren M. (1962) DT diaphorase. I. Purification from the soluble fraction of rat-liver cytoplasm, and properties. Biochim Biophys Acta, 58: 171-188.

244. Conover TE, Ernster L. (1962) DT diaphorase. II. Relation to respiratory chain of intact mitochondira. Biochim Biophys Acta, 58: 189-200.

245. Chinopoulos C, Gerencser AA, Mandi M, Mathe K, Torocsik B, Doczi J, Turiak L, Kiss G, Konrad C, Vajda S, Vereczki V, Oh RJ, Adam-Vizi V. (2010) Forward

operation of adenine nucleotide translocase during F0F1-ATPase reversal: critical role of matrix substrate-level phosphorylation. FASEB J, 24(7): 2405-2416.

246. Melnick RL, Rubenstein CP, Motzkin SM. (1979) Measurement of mitochondrial oxidative phosphorylation: selective inhibition of adenylate kinase activity by P1,P5-di-(adenosine-5')-pentaphosphate. Anal Biochem, 96(1): 7-11.

247. Lawlis VB, Roche TE. (1981) Inhibition of bovine kidney alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by reduced nicotinamide adenine dinucleotide in the presence or absence of calcium ion and effect of adenosine 5'-diphosphate on reduced nicotinamide adenine dinucleotide inhibition. Biochemistry, 20(9): 2519-2524.

248. Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, Cornwall EJ. (2005) The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. Biochem J, 392(Pt 2): 353-362.

249. Chinopoulos C, Vajda S, Csanady L, Mandi M, Mathe K, Adam-Vizi V. (2009) A novel kinetic assay of mitochondrial ATP-ADP exchange rate mediated by the ANT. Biophys J, 96(6): 2490-2504.

250. Klingenberg M. (2008) The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. Biochim Biophys Acta, 1778(10): 1978-2021.

251. Villiers C, Michejda JW, Block M, Lauquin GJ, Vignais PV. (1979) The electrogenic nature of ADP/ATP transport in inside-out submitochondrial particles. Biochim Biophys Acta, 546(1): 157-170.

252. Chance B, Williams GR. (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv Enzymol Relat Subj Biochem, 17: 65-134.

253. Lee CP, Gu Q, Xiong Y, Mitchell RA, Ernster L. (1996) P/O ratios reassessed: mitochondrial P/O ratios consistently exceed 1.5 with succinate and 2.5 with NAD-linked substrates. FASEB J, 10(2): 345-350.

254. Lehninger AL, Smith SW. (1949) Efficiency of phosphorylation coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen. J Biol Chem, 181(1): 415-429.

255. Poteet E, Winters A, Yan LJ, Shufelt K, Green KN, Simpkins JW, Wen Y, Yang SH. (2012) Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives. PLoS One, 7(10): e48279.

256. Henderson PJ, McGivan JD, Chappell JB. (1969) The action of certain antibiotics on mitochondrial, erythrocyte and artificial phospholipid membranes. The role of induced proton permeability. Biochem J, 111(4): 521-535.

257. Bernardi P. (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. Physiol Rev, 79(4): 1127-1155.

258. Ligeti E, Fonyo A. (1977) Competitive inhibition of valinomycin-induced K^+-transport by Mg^{2+}-ions in liver mitochondria. FEBS Lett, 79(1): 33-36.

259. Mitchell P, Moyle J. (1968) Proton translocation coupled to ATP hydrolysis in rat liver mitochondria. Eur J Biochem, 4(4): 530-539.

260. Nicholls DG. (1974) The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. Eur J Biochem, 50(1): 305-315.

261. Nicholls DG. (2005) Commentary on: 'old and new data, new issues: the mitochondrial Deltapsi' by H. Tedeschi. Biochim Biophys Acta, 1710(2-3): 63-65; discussion 66.

262. Garlid KD, Paucek P. (2003) Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle. Biochim Biophys Acta, 1606(1-3): 23-41.

263. Dlaskova A, Hlavata L, Jezek J, Jezek P. (2008) Mitochondrial Complex I superoxide production is attenuated by uncoupling. Int J Biochem Cell Biol, 40(10): 2098-2109.

264. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N. (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. Free Radic Biol Med, 37(6): 755-767.

265. Andreyev A, Bondareva TO, Dedukhova VI, Mokhova EN, Skulachev VP, Volkov NI. (1988) Carboxyatractylate inhibits the uncoupling effect of free fatty acids. FEBS Lett, 226(2): 265-269.

266. Jezek P. (2002) Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins-UCPn. Int J Biochem Cell Biol, 34(10): 1190-1206.

267. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD. (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. Nature, 415(6867): 96-99.

268. Kadenbach B, Ramzan R, Moosdorf R, Vogt S. (2011) The role of mitochondrial membrane potential in ischemic heart failure. Mitochondrion, 11(5): 700-706.

11. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció alapját képező tudományos közlemények:

Komlódi T, Geibl FF, Sassani M, Ambrus A, Tretter L

Membrane potential and delta pH dependency of reverse electron transport-associated hydrogen peroxide production in brain and heart mitochondria:

Journal of Bioenergetics and Biomembranes

DOI: 10.1007/s10863-018-9766-8

Folyóirat/Szakcikk/Tudományos

IF: 2.914 (2017)

Komlódi T, Tretter L.

Methylene blue stimulates substrate-level phosphorylation catalysed by succinyl-CoA ligase in the citric acid cycle.

Neuropharmacology. 123:pp. 287-298. (2017)

Folyóirat/Szakcikk/Tudományos

IF: 4.249

Egyéb -nem az értekezés témájában megjelent- tudományok közlemények:

Komlódi T, Sobotka O, Krumschnabel G, Bezuidenhout N, Hiller E, Doerrier C, Gnaiger E

Comparison of Mitochondrial Incubation Media for Measurement of Respiration and Hydrogen Peroxide Production.

In. Carlos M Palmeira, Antonio J Moreno (szerk.) Mitochondrial Bioenergetics. 19.p.

New York: Springer Science+Business Media, 2018 pp. 137-155.

(Methods Mol Biol. ; 1782)

Könyvrészlet/Könyvfejezet

Mikulás K, Hermann P, Gera I, Komlódi T, Horváth G, Ambrus A, Tretter L Triethylene glycol dimethacrylate impairs bioenergetic functions and induces oxidative stress in mitochondria via inhibiting respiratory Complex I.

Dental Materials 34: (7) pp. e166-0181. (2018) .

Folyóirat/Szakcikk/Tudományos
IF: 4.039

Koncsos G, Varga ZV, Baranyai T, Boengler K, Rohrbach S, Li L, Schlüter KD, Schreckenberg R, Radovits T, Oláh A, Mátyás C, Lux Á, Al-Khrasani M, Komlódi T, Bukosza N, Máthé D, Deres L, Barteková M, Rajtík T, Adameová A, Szigeti K, Hamar P, Helyes Z, Tretter L, Pacher P, Merkely B, Giricz Z, Schulz R, Ferdinandy P. Diastolic dysfunction in prediabetic male rats: Role of mitochondrial oxidative stress. American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology. ;311:(4):H927-H943.
Folyóirat/Szakcikk/Tudományos
IF: 3.348

12. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani elsősorban témavezetőmnek, Tretter László Professzor Úrnak, aki nélkül valószínűleg nem kezdtem volna el a PhD-képzést és a kutatást. Sokat tanultam tőle szakmailag, és emberileg is példát mutatott. A munkacsoportunkban egy olyan légkört teremtett meg, amiért mindig szeretettem bejárni. Szeretnék köszönetet mondani Ádám Veronika Professzor Asszonynak, aki a háttérből biztosította PhD munkám megvalósítását. Továbbá szeretném hálámat kifejezni a Neurobiokémiai Munkacsoport tagjainak, Takács Katalinnak, Várnagy Andreának és Zölde Katalinnak, akik nagy tapasztalattal segítettek a kísérletek kivitelezésében. Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, akik tanulmányaim során mindig biztosítottak támogatásukról.