

Az agy bioenergetikájának vizsgálata különböző mitokondriális modelleken

Doktori értekezés

dr. Horváth Gergő

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Tagozat



Témavezető: Dr. Tretter László, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Gál Anikó, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Márk László, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Mandl József az MTA rendes tagja,
professzor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Molnár Miklós, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Bognár Zita, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2023

BEVEZETÉS

A mitokondriumok fontos szerepet játszanak a sejtek energia homeosztázisban. A mitokondrium számos jelentős metabolikus útvonal helyszíne (a mitokondriális belső membránhoz kötődik az oxidatív foszforiláció (az elektrontranszport és az ATP szintézis), míg a citromsavciklus döntő része, béta-oxidáció legtöbb lépése és a hem szintézis első lépése a mitokondriális mátrixban zajlik). A citromsav, trikarbonsav (TCA)- avagy a Szent-Györgyi- Krebs ciklus negyedik reakcióját az α -ketoglutarát dehidrogenáz enzimkomplex (KGDHC) katalizálja. A reakció a TCA ciklus sebességmeghatározó lépése, amely során az α -ketoglutarát (α -KG) szukcinil-CoA-vá alakul át egy oxidatív dekarboxilezési reakcióban, redukálva a NAD^+ -ot $\text{NADH} + \text{H}^+$ -vá, CO_2 felszabadulásával koenzim-a felhasználásával. A KGDHC három alegységből áll: α -ketoglutarát/2-oxoglutarát dehidrogenáz (KGDH/OGDH, E1; EC 1.2.4.2), dihidrolipoil-szukciniltranszferáz (DLST; E2 EC 2.3.1.61) és dihidrolipoil-dehidrogenáz (DLD, E3 EC 1.8.1.4). Az α -KG fontos intermedier a TCA-ciklusban, mert számos reakcióban képződhet a sejtben. Amellett, hogy hozzájárul a terminális oxidációhoz szükséges NADH képződéséhez (ami a mitokondriális légzési komplex I szubsztrátja), a KGDHC reakció terméke a szukcinil-CoA is, ami mitokondriális szubsztrát szintű foszforiláció (SLP) során hozzájárul az ATP vagy GTP termeléshez. A SLP oxidatív foszforiláció hiányában a mitokondriális ATP fő forrása lehet. Az

α -ketoglutarát dehidrogenáz egy erősen szabályozott enzim, amely a Szent-Györgyi-Krebs ciklus metabolikus fluxusának meghatározásában jelentős szerepet játszik. A KGDHC szabályozása összetett, magában foglalja a magas ATP/ADP és a magas NADH/NAD⁺ arányt gátló, valamint a kalcium aktiváló hatását illetve a szubsztrát elérhetőségét a mitokondriumokban.

A reaktív oxigén származékok (ROS) és a KGDH kapcsolata kétarcú; egyrészt ROS-ok képesek gátolni az enzimet, másrészt kimutatták, hogy maga a KGDHC enzim is képes ROS-t termelni, ezáltal hozzájárulhat a mitokondriális oxidatív stresszhez. A megnövekedett mitokondriális ROS termelést számos krónikus neurodegeneratív kórképben (Alzheimer-, Parkinson-, Huntington-kór) illetve az agy vagy a szív ischaemiás/reperfúziós károsodásában is leírták. Az iszkémia során jelentős mennyiségű szukcinát halmozódik fel az agyban, vagy egyéb szövetekben, amelyet a reperfúzió során a mitokondriumok oxidálhatnak, elindítva ezzel a reverz elektrontranszportot, az elektronok áramlását a komplex II-ről a komplex I-en keresztül a mátrixba, amely folyamat patológiás mértékű mitokondriális ROS termeléssel is jár.

A KGDHC ROS termelése jelentősebb, amennyiben a fiziológiás elektronakceptor, a NAD⁺ nem áll rendelkezésre kellő mennyiségben, vagy ha a NADH/NAD⁺ arány nő. Vizsgálataink során az agyi KGDHC mitokondriális bioenergetikában betöltött

szerepét vizsgáltuk a mitokondriális oxigénfogyasztás, ROS termelés illetve az antioxidáns enzimek expressziójának tekintetében. A kísérletek során felhasznált egértörzsek heterozigóta mutációt hordoztak a dihidrolipoil-szukciniltranszferáz (DLST^{+/-}) vagy a dihidrolipoil-dehidrogenáz (DLD^{+/-}) génben. Bármelyik gén homozigóta knock-out állatai életképtelenek. A heterozigóták bár nem mutattak fenotípusbeli eltéréseket de érzékenyebbek voltak a mitokondriális toxinokkal szemben. Vizsgálatainkban a különböző KGDHC alegység hiányos (DLST^{+/-} vagy DLD^{+/-}) állatok szukcinát vagy α -glicerofoszfát által indukált mitokondriális ROS-termelésének összehasonlítására összpontosítottunk a reverz elektrontranszport (RET) során. A metilénkéket (MB) először a 19. század végén állították elő. A MB-et elsőként Ehrlich és Guttman használta fel a malária kezelésére. Az 1920-as évektől a cianidmérgezés ellenszereként használták. Emellett a MB-t sikeresen alkalmazzák szén-monoxid-mérgezés, ifoszfamid (Holoxan) által kiváltott encephalopathia és methemoglobinémia kezelésére is. Az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb szerepet kapott a neuroprotektív hatásának vizsgálata az Alzheimer- és Parkinson-kór modellekben.

Heterociklusos gyűrűrendszerének köszönhetően erősen lipofil vegyület, amely könnyen átjut a biológiai membránokon, ezáltal bejut mitokondriumba is. Alacsony redox potenciálja (~ 10 mV) miatt oxidált és redukált formája egyaránt megtalálható a

mitokondriumokban. A mitokondriumba való bejutását követően a MB a NADH illetve FADH molekulákból elektronokat tud a citokróm c-re alternatív elektron transzferrel átvinni, ami növeli a IV komplex aktivitását és hatékonyan elősegíti a mitokondriális aktivitást, miközben csökkenti az oxidatív stresszt. A mitokondriális légzési lánc gátlása, károsodása számos neurodegeneratív kórképben jelenik meg, aminek következtében felhalmozódnak a redukáló ekvivalensek (NADH és FADH), csökken a mitokondriális ATP szintézis és oxigénfogyasztás illetve fokozódik a ROS termelés. A felhalmozódott NADH továbbá gátolja a citrát ciklus NAD koenzimmel működő enzimeit. Azonban ilyen körülmények között is képes a MB oxidálni a NADH-t és a FADH-t, az elektronok MB-vel szállítódnak a citokróm c-re. A MB-k elsődleges mechanizmusa így a komplex IV aktiválása, de hozzájárul a hem szintézisének fokozásához is. Fiziológias körülmények között az MB szintén fokozza az Nrf2/ARE transzkripció út vonal aktivitását, ami védi a sejtet az oxidatív stressz okozta károsodástól.

Kutatásunkban a MB hatását vizsgáltuk a mitokondriális bioenergetikára: O₂ fogyasztásra, ATP termelésre, kalcium-homeosztázisra illetve mitokondriális ROS termelésre izolált tengerimalac agymitokondriumokon.

CÉLKITŰZÉS

A PhD időszakban kutatásaim során több témával is foglalkoztam. PhD disszertációmban ezek közül kettőt emelnék ki, az α -KGDHC E2 vagy E3 alegységének heterozigóta KO-ja következtében bekövetkező változásokat a mitokondriumok bioenergetikájában, elsődlegesen az ROS homeosztázisukban, illetve a MB hatásait a mitokondriális bioenergetikára, illetve a ROS homeosztázisra.

1. Vizsgálatunk célja a KGDHC szerepének vizsgálata volt az agy mitokondriális bioenergetikájában: oxigénfogyasztásában, ROS termelésében és antioxidáns expressziójában. A kísérletek során felhasznált egértörzsek heterozigóta mutációt hordoztak a dihidrolipoil-szukciniltranszferáz (DLST^{+/-}) vagy a dihidrolipoil-dehidrogenáz (DLD^{+/-}) génben.

Céljaink között szerepelt az alábbi kérdések megválaszolása:

- Milyen szerepet töltenek be a KGDHC DLST és DLD alegységei a mitokondriális ROS termelésben?
- Hogyan befolyásolja a DLD alegység hiánya a szukcinát vagy α -glicerofoszfát által indukált reverz elektrontranszport ROS képződését?
- Hogyan változik a mitokondriális glutation-peroxidáz expressziója transzgenikus egerekben?

2. Disszertációm második részében a metilénkék (MB) mitokondriumokra gyakorolt hatását vizsgáltuk, különös tekintettel a bioenergetikai paraméterekre és a ROS homeosztázisra, azzal a

céllal, hogy leírjuk, mely folyamatok lehetnek felelősek jótékony hatásaiért számos kórállapot esetén:

- Hogyan befolyásolja a MB a mitokondriális oxigénfogyasztását a glutamát-malát légúti szubsztrátok jelenlétében?
- Hogyan befolyásolja a MB az ATP-termelést légzésükben gátolt mitokondriumokban?
- Milyen hatása van a MB-nek a mitokondriális membránpotenciálra normál és légzési lánc gátolt mitokondriumokban?
- Mi okozza a metilénkék megnövekedett ROS-termelését a különböző szubsztrátok jelenlétében mind az energizált, mind a légzés gátlószer alkalmazását követően?

MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

A heterozigóta $DLD^{+/-}$ ($DLD^{+/-}$, C57BL/6) egereket és a vad típusú (WT) alomtársakat a Jackson Laboratory-tól (JAX egerek; Jackson Laboratory Repository, Bar Harbor, ME, USA) szereztük be. A DLST alegységben hiányos egereket ($DLST^{+/-}$; C57BL/6 és 129SV/EV hibrid) és vad típusú alomtársaikat a Lexicon Pharmaceuticals-tól (The Woodlands, TX, USA) kaptuk. A WT egereket mind a $DLD^{+/-}$ és mind a $DLST^{+/-}$ keresztezésével reprodukáltuk. A vizsgálatunkban használt állatok 3 és 6 hónap közöttiek voltak.

Mitokondriumok izolálása

A mitokondriumokat felnőtt egér és tengerimalac agyából izoláltuk nem folyamatos Percoll gradiens segítségével. Az agyakat az eltávolítást követően jéghideg "A" pufferben homogenizáltuk (mM-ben: 225 mannitol, 75 szacharóz, 5 HEPES, 1 EGTA; pH 7,4). Majd centrifugálást követően a felülúszóból a mitokondriumokat percoll grádiens segítségével izoláltuk. A keletkező mitokondriális pelletet újra szuszpendáltuk B pufferben (mM-ben: 225 mannitol, 75 szacharóz, 5 HEPES, pH 7,4). A mitokondriális fehérjekoncentrációt módosított Biuret reakcióval határoztuk meg. A kísérletekben általában a mitokondriumokat 0,1 mg/ml koncentrációban használtuk.

Mitokondriális oxigénfogyasztás

A mitokondriumok oxigénfelvételét nagy felbontású respirométerrel (Oroboros O2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria) 37 °C-on 2 ml-es kamrákban, folyamatos kevertetés mellett vizsgáltuk. Az oxigénkoncentrációt a polarográfiás oxigénérzékelő (POS) detektálta, és az oxigénáramot az oxigénkoncentráció negatív időbeli deriváltjaként számítottuk ki. A kísérleteinkben felhasznált vizsgálati médium összetétele: 125 mM KCl, 20 mM HEPES, 2 mM K_2HPO_4 , 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EGTA, pH=7.0 (KOH), kiegészítve 0.025% marha szérum albuminnal (BSA). A mitokondriumokat α -KG-val (5 mM), α -glicerofoszfáttal (α -GP; 20 mM) vagy szukcináttal (5 mM) energizáltuk.

Mitokondriális H₂O₂ képződés

A mérőrendszer a keletkező H₂O₂ Amplex Red fluoreszcens festékkel történő kimutatásán alapul. Az inkubációs pufferhez torma peroxidáz (5 U) és Amplex Ultrared reagens (1 μM) hozzáadását követően vizsgáltuk a mitokondriumok ROS termelését. A fluoreszcenciát 37°C-on a PTI Deltascan fluoreszcens spektrofotométerrel (Photon Technology International, PTI, Lawrenceville, NJ, USA) mértük. Az excitációs hullámhossz 550 nm volt, a fluoreszcens emissziót 585 nm-en detektáltuk. A kísérletek végén ismert mennyiségű H₂O₂ (100 pmol) hozzáadásával kalibráltunk.

A NAD(P)H steady state koncentrációjának mérése

Az intramitokondriális NAD(P)H autofluoreszcenciáját párhuzamosan mértük az Amplex-es mérésekkel kettős gerjesztés és kettős emissziós módban a PTI Deltascan fluoreszcens spektrofotométeren. Mitokondriumokat ugyanúgy inkubáltuk 37°C-on mint a H₂O₂ mérés során. A NAD(P)H fluoreszcenciát méréséhez a 344 nm gerjesztési és 460 nm emissziós hullámhosszt használtunk. A NAD(P)H szint változásait az emittált fotonok száma mutatta.

A mitokondriális ATP szintézis mérése

Az ATP szintézist egy kapcsolt enzimszisztémával mértük. A standard mérési médiumhoz a következő anyagokat adtuk hozzá: 1.5 mM NADP, 2 μl hexokináz (2 U/ml), 2 μl glukóz-6-foszfát

dehidrogenáz, 2.5 mM glukóz, 20 μ M (2R)-amino-5-foszfonovalériánsav (AP5, az adenilát-kináz inhibitora). A mitokondriálisan szintetizált ATP-t az adenin nukleotid transzlokátor (ANT), kijuttatja a médiumba, ahol az ATP reakcióba lép a glukózzal hexokináz által katalizált folyamat során. A reakció terméke a glukóz-6-foszfát pedig a glukóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim hatására tovább oxidálódik 6-foszfoglukonáttá, amit a NADP^+ NADPH -vá történő redukciója kíséri. A NAD(P)H abszorbanciát 340 nm-en a GBC UV/VIS 920 spektrofotométeren detektáltuk. A rendszer külső és belső kalibrációját ismert koncentrációjú NADPH -val és ATP -vel végeztük.

A mitokondriális membránpotenciál mérése

A $\Delta\Psi_m$ meghatározásához egy kationos festéket, a safranin O használtunk, ami akkumulálódik az energetizált mitokondriumok belső membránjában és csökken az emissziója. A mérések során 2 μ M festékkoncentrációt használtunk. Az excitációs és emissziós hullámhosszak 495 és 586 nm voltak. A kísérleteket 37 °C-on 0.1 mg/ml mitokondriális protein koncentráció mellett a Hitachi F-4500 spektrofluoriméterrel (Hitachi High Technologies, Maidenhead, UK) végeztük.

A mitokondriális Ca^{2+} felvétel mérése

A mitokondriumokat ADP és légzési szubsztrátokkal egyetemben az inkubációs médiumhoz adtuk. A szabad Ca^{2+} koncentrációt

minden egyes Ca^{2+} hozzáadás után kiszámoltuk a Chelator szoftverrel és mértük az alább leírt módszerrel. A mitokondriális Ca^{2+} felvételt Calcium green fluoreszcenciával mértük 505 nm excitációs és 535 nm emissziós hullámhosszon 37°C-on a Hitachi F-4500 spektrofluoriméterrel.

Western blot

A mérésekhez az izolált mitokondriumok fagyasztott-felolvasztott, szuszpendált mintáit használtuk fel. A mitokondriális pelleteket nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottuk el. Az elválasztott fehérjéket metanollal aktivált polivinilidén-difluorid membránra vittük át. Az immunblot vizsgálatot az antitestek gyártói által javasoltak szerint végeztük. Egér monoklonális anti-ciklofilin D (cypD; Mitosciences, Eugene, OR, USA), nyúl poliklonális anti-OGDH, anti-DLST, anti-DLD, anti-VDAC1, anti-CypD, anti-GR, anti-GPX1, anti- A TRX és anti-PRX3 (Abcam, Cambridge, UK) primer antitesteket 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban, míg a nyúl poliklonális anti-mangán szuperoxid-diszmutáz (MnSOD; Abcam) 0,2 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban alkalmaztuk. egy peroxidáz-kapcsolt másodlagos antitest segítségével(számár – antinyúl/antieger) történt és fokozott kemilumineszcenciás detektáló reagenssel. A denzitometriás értékeléshez Fiji szoftvert használtunk.

Anyagok

Minden laboratóriumi vegyszert a Sigma Aldrichtól (St. Louis, MO, USA) szereztünk be, kivéve az ADP-t (Merck Group, Darmstadt, Németország), az α -GP-t (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) és az Amplex UltraRed-et (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok).

Statisztika

Az adatokat általában átlag \pm S.E.M. A normál eloszlást az F-próbával teszteltük. A statisztikai különbségeket felbecsülésére több szempontos varianciaanalízis (SIGMASTAT; Systat Software Inc., San Jose, CA, USA), majd Bonferroni-korrekciót használtunk. A $p < 0.05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

1. Vizsgálatainkban az KGDHC alegységeinek heterozigóta mutációit hordozó egértörzsekben monitoroztuk az oxigénfogyasztást, a ROS termelést és a fehérje expressziót. α -KG légzési szubsztrát jelenlétében ADP nélkül nem volt szignifikáns eltérés a különböző csoportok között. Az ADP hozzáadásával a légzés mértéke fokozódott, azonban mindkét transzgenikus csoportban az oxigénfogyasztás növekedése kisebb volt, mint a kontroll csoportban. Szukcinát és α -glicerofoszfát szubsztrátok jelenlétében nem tapasztaltunk eltérést az oxigénfogyasztásban az KGDHC alegység hiányos illetve kontroll csoportok között.

A ROS termelésben α -KG esetében a következő tendenciát tapasztaltuk: WT > DLST^{+/-} > DLD^{+/-}, de szignifikáns különbséget a WT és a transzgenikus csoportok között csak az ADP hatása után az ANT-t gátló karboxyatractylat (CAT) jelenlétében mértünk. Az ANT CAT általi gátlását követően a $\Delta\Psi_m$ hiperpolarizációja miatt emelkedik a H₂O₂ képződés mértéke. A DLD^{+/-} csoportban a H₂O₂ képződés CAT hozzáadása után szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest. CI gátló rotenon hatására minden csoportban fokozott H₂O₂ termelést tapasztaltunk, de szignifikáns eltéréseket mértünk a kontroll és a transzgenikus csoportok között (a transzgenikus csoportok ROS képzése kisebb mértékben emelkedett rotenon hatására, mint a kontrollé). A rotenon után hozzáadott antimycin A-val a III-as komplex gátlása csak kismértékben stimulálta a H₂O₂ képződést. Továbbra is

szignifikánsan kisebb ROS termelés volt mérhető a kontrollhoz képest az összes transzgenikus csoportban antimycin A jelenlétében.

A szukcinát által kiváltott ROS képződés során (ADP hiányában) a szukcinátból származó elektronok a komplex II felől visszafelé áramolhatnak az I. komplexen át és a NAD^+ -ot $\text{NADH} + \text{H}^+$ -vá redukálják. Ezt az utat reverz elektrontranszportnak (RET) nevezik, ahol a ROS képződés sebessége kb. egy nagyságrenddel nagyobb, mint a fiziológiás, a II. komplex felől a III. és IV. komplex felé irányuló elektronáramlásban. Ilyen körülmények között a vad típusú mitokondriumok mutatták a legnagyobb H_2O_2 termelést szukcinát jelenlétében. A KGDHC alegység hiányos csoportban a $\text{DLD}^{+/}$ ROS képződés szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll csoporté. Az ADP hozzáadása megszüntette a RET-hez szükséges feltételeket, ezáltal csökkent a H_2O_2 termelés. Ilyen körülmények között nem volt szignifikáns eltérés a vizsgált csoportok között. Az α -GP is képes támogatni a RET-et az agyi mitokondriumokban, ez azonban erősen függ a szubsztrát és az exogén Ca^{2+} koncentrációjától. Az α -GP jelenlétében mért H_2O_2 termelés α -GP hasonló eredményeket mutatott mint a szukcinátos mérések esetében.

Ezt követően a különböző állatcsoportokban vizsgáltuk a KGDHC alegységek mitokondriális fehérje expresszióját. A KGDHC alegység expressziós szintjeit a SOD2 expressziójára

normalizáltuk. Az összes transzgenikus konstrukcióban az E1 alegység (OGDH) expressziója csökkent volt a vad típushoz képest. Ahogy az várható volt, az E2 (DLST) alegység expressziós szintje alacsonyabb volt a DLST^{+/-} mitokondriumokban a kontrollhoz képest. Az E3 (DLD) alegység expressziója csökkent volt a DLD^{+/-} állatokban.

A disszertáció második felében a metilénkék (MB) mitokondriumokra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A vizsgálatokban MB-et olyan koncentráció-tartományban (100 nM – 1 μ M) használtuk, amely koncentrációk esetén a sejtes vizsgálatokban releváns, neuroprotektív hatásokról számoltak be. A glutamát-malát szubsztrátkombinációval energetizált agyi mitokondriumok oxigénfogyasztása ADP hiányában 375 \pm 20,6-ról 618,3 \pm 36,2 pmol/s/mg emelkedett 1 μ M MB hozzáadása után. Azonban az ADP-stimulált légzést a MB nem befolyásolta. A rotenonnal (komplex I) gátolt mitokondriumokban a metilénkék fokozta az oxigénfogyasztást.

A fiziológias körülmények során a mitokondriális ATP képződését a MB nem befolyásolta, viszont szignifikáns fokozta az ATP termelést a rotenonnal gátolt mitokondriumokban.

A glutamát-maláttal légző mitokondriumokon a rotenon a mitokondriális membránpotenciál gyors depolarizációját idézte elő, amely 1 μ M MB hozzáadását követően helyreállt. Ezek a

mitokondriumok, hasonlóan a kompetens, ATP-t szintetizáló mitokondriumokhoz, depolarizációval reagáltak az ADP hozzáadására. A MB hatását a mitokondriális Ca^{2+} felvételre normál és rotenonnal kezelt mitokondriumokban vizsgáltuk. A Ca^{2+} felvétel sebessége $1 \mu\text{M}$ MB jelenlétében csökkent glutamát plusz maláttal energizált kontroll mitokondriumokban. Ezzel ellentétben a rotenonnal kezelt mitokondriumokban csökkent Ca^{2+} felvételt a MB javította, összhangban a hasonló körülmények között megfigyelt, részben helyreállított membránpotenciállal. A továbbiakban a H_2O_2 képződést vizsgáltuk agyi mitokondriumokban MB jelenlétében. A MB figyelemremélően nagymértékben stimulálta a H_2O_2 termelést glutamát és malát jelenlétében. A H_2O_2 képződés MB általi stimulálása mind ADP hiányában, mind jelenlétében szignifikáns volt, bár ADP jelenlétében az emelkedés kisebb mértékű. A rotenonnal kezelt mitokondriumokban a H_2O_2 képződés tovább növekedett MB hozzáadása után. Hasonló eredményeket kaptunk más légzési szubsztrátok (szukcinát és α -GP) alkalmazása esetén is, MB hozzáadása tovább növelte a H_2O_2 képződését különböző körülmények között (ADP jelenlétében és hiányában, valamint a komplex I rotenonnal történő gátlása esetén is).

KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink rávilágítanak a KGDHC alegységek kulcsfontosságú szerepére a mitokondriális ROS képződés

tekintetében. Csökkent mitokondriális ROS termelést észleltünk DLST^{+/-} és DLD^{+/-} KO állatokban, nemcsak az α -KG mint szubsztrát jelenlétében, hanem a reverz elektrontranszportot támogató szubsztrátok (szukcinát és α -glicerofoszfát) esetében is. Ez utóbbi eredményeink rávilágítanak a KGDHC alegységek fontosságára az ischemia-reperfúzió által közvetített oxidatív szövetkárosodásban. A vizsgált transzgenikus állatok mitokondriumaiban nemcsak a ROS termelése csökkent, hanem a vizsgált antioxidáns enzimek expressziós szintje is mérséklődött. Vizsgálataink során a metilénkek számos, a mitokondriumok bioenergetikai paramétereire kifejtett hatását figyeltük meg. Kísérletekben a MB izolált agyi mitokondriumokban stimulálta a légzést. Az oxigénfogyasztásból nyert eredményeink szerint a MB csak a nyugalmi oxigénfogyasztást stimulálta; az ADP-stimulált légzést nem befolyásolta. A MB szignifikánsan növelte az oxigénfogyasztást a rotenonnal gátolt mitokondriumokban, ami alátámasztja azt a feltételezést, hogy az MB részben helyreállíthatja a légzési lánc működését, amennyiben a légzési lánc elektronjainak áramlása az I komplexnél gátolt. Az oxigénfogyasztás mellett a MB a mitokondriumok számos egyéb bioenergetikai paraméterét is pozitívan befolyásolta. Így kísérleteink során a légzési komplexgátlókkal kezelt, károsodott mitokondriumokban megnövekedett ATP termelést, magasabb membránpotenciált illetve jobb Ca²⁺-felvevő kapacitást mértünk a

MB hatására. Ugyanakkor azonban fokozott H₂O₂ felszabadulást és csökkent eliminációt is mértünk a MB hatására.

A MB jótékony hatását elsősorban légzésgátolt illetve károsodott mitokondriumokban fejté ki.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Horváth G, Sváb G, Komlódi T, Ravasz D, Kacsó G, Doczi J, Chinopoulos C, Ambrus A, Tretter L. Reduced Mitochondrial ROS Production In α -ketoglutarate Dehydrogenase (α -KGDH) Subunit (E2 and/or E3) Heterozygote Knock Out Animals. Reverse Electron Flow- Induced H₂O₂ Formation Is Also Modified In The Heterozygote ko Animals. *Antioxidants* 2022, 11(8), 1487. Impact factor: 6.313 (2020)

Tretter L, **Horvath G**, Hölgyesi A, Essek F, Adam-Vizi V. Enhanced hydrogen peroxide generation accompanies the beneficial bioenergetic effects of methylene blue in isolated brain mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 2014 Dec;77:317-30. Impact factor: 5.736

Egyéb, a disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények:

Daradics N, **Horvath G**, Tretter L, Paal A, Fulop A, Budai A, Szijarto A. The effect of Cyclophilin D depletion on liver regeneration following associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy. PLoS One. 2022 Jul 14;17(7):e0271606. Impact factor: 3.240 (2021)

Fard-Aghaie M.H, Budai A, Daradics N, **Horvath G**, Idhafer K.J, Szijarto A, Fulop A. The effects of physical prehabilitation: Improved liver regeneration and mitochondrial function after ALPPS operation in a rodent model. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences 2021, 28 (8), 692-702 Impact factor: 7.027

Mikulás K, Komlódi T, Földes A, Sváb G, **Horváth G**, Nagy ÁM, Ambrus A, Gyulai-Gaál S, Gera I, Hermann P, Varga G, Tretter L. Bioenergetic Impairment of Triethylene Glycol Dimethacrylate-(TEGDMA-) Treated Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) and Isolated Brain Mitochondria are Amended by Redox Compound Methylene Blue Materials (Basel). 2020 Aug 6;13(16):3472. Impact factor: 3.601

Budai A. **Horváth G**, Tretter L, Radák Z, Koltai E, Bori Z, Torma F, Lukács Á, Röhlich P, Szijártó A, Fülöp A. Mitochondrial function after associating liver partition and portal vein ligation for

staged hepatectomy in an experimental model. *Br J Surg.* 2019 Jan;106(1):120-131. Impact factor: 5.676

Chinopoulos C, Batzios S, van den Heuvel LP, Rodenburg R, Smeets R, Waterham HR, Turkenburg M, Ruiter JP, Wanders RJA, Doczi J, **Horvath G**, Dobolyi A, Vargiami E, Wevers RA, Zafeiriou D. Mutated *SUCLG1* causes mislocalization of *SUCLG2* protein, morphological alterations of mitochondria and an early-onset severe neurometabolic disorder. *Mol Genet Metab.* 2019 Jan;126(1):43-52. Impact factor: 3.666

Tóth E, Maléth J, Závogyán N, Fanczal J, Grassalkovich A, Erdős R, Pallagi P, **Horváth G**, Tretter L, Bálint ER, Rakonczay Z Jr, Venglovecz V, Hegyi P. Novel mitochondrial transition pore inhibitor N-methyl-4-isoleucine cyclosporin is a new therapeutic option in acute pancreatitis. *J Physiol.* 2019 Dec;597(24):5879-5898. Impact factor: 4.547

Hujber Z, **Horváth G**, Petővári G, Krencz I, Dankó T, Mészáros K, Rajnai H, Szoboszlai N, Leenders WPJ, Jeney A, Tretter L, Sebestyén A. GABA, glutamine, glutamate oxidation and succinic semialdehyde dehydrogenase expression in human gliomas. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018 Nov 7;37(1):271. Impact factor: 5.622

Fischer MJ, **Horvath G**, Krismer M, Gnaiger E, Goebel G, Pesta DH. Evaluation of mitochondrial function in chronic myofascial trigger points - a prospective cohort pilot study using high-resolution respirometry. *BMC Musculoskelet Disord.* 2018 Oct 30;19(1):388. Impact factor: 2.098

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. *Dent Mater.* 2018 Jul;34(7):e166-e181. Impact Faktor: 4.44

Nagy AM, Fekete R, **Horvath G**, Koncsos G, Kriston C, Sebestyen A, Giricz Z, Kornyei Z, Madarasz E, Tretter L. Versatility of microglial bioenergetic machinery under starving conditions. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2018 Mar;1859(3):201-214.
Impact factor: 4.441

Harami-Papp H, Pongor LS, Munkácsy G, **Horváth G**, Nagy ÁM, Ambrus A, Hauser P, Szabó A, Tretter L, Györffy B. TP53 mutation hits energy metabolism and increases glycolysis in breast cancer. *Oncotarget.* 2016 Oct 11;7(41):67183-67195. Impact factor: 5.168

Németh B, Doczi J, Csete D, Kacso G, Ravasz D, Adams D, Kiss G, Nagy AM, **Horvath G**, Tretter L, Mócsai A, Csépanyi-Kömi R, Iordanov I, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Abolition of mitochondrial substrate-level phosphorylation by itaconic acid produced by LPS-induced Irg1 expression in cells of murine macrophage lineage. *FASEB J.* 2016 Jan;30(1):286-300. Impact factor: 5.498