

I thank Prof. Tózsér for the comments.

My responses inline (>Response).

Some of the figures are in much worse quality than the others (e.g. Fig 5.1 is fairly blurred, text in Fig 5.2C or Fig 6.4.A is unreadable.)

>Response: I acknowledge that the aforementioned figures are of lesser quality than the rest; I don't have an excuse as of how did this happen, especially in view of the fact that I actually had figures 5.1, 5.2 and 6.4 in sufficiently high quality, attached hereby. Fig. 6.4.A seems to be of sufficient quality in the printed version of the dissertation (page 83).

Glutamine appears to be a very important fuel for supporting mSLP. However, its conversion to alpha-ketoglutarate releases ammonia which is known to cause ROS production and damage of mitochondria. What is the fate of this ammonia in heavily glutamine-utilizing mitochondria?

>Response: Ammonia detoxification in relation to glutamine catabolism and its role in mSLP and cancer is a topic that we have not addressed yet, but is high up in our list of future projects because of the following reason: in the pathway glutamine \rightarrow glutamate \rightarrow α -ketoglutarate \rightarrow succinyl-CoA \rightarrow succinate encompassing mSLP, ammonia generated by glutaminase acting on glutamine and NAD(P)⁺-dependent glutamate dehydrogenase converting glutamate to α -ketoglutarate (or any other reaction generating NH₃, such as conversion of 2-oxoglutarate to α -ketoglutarate or tetrahydrofolate metabolism) is consumed by only two reactions in the mitochondrial matrix: i) carbamoyl-phosphate synthetase 1 (CPS1) and ii) the reverse operation of glutamate dehydrogenase isoform 1 (GLUD1). In healthy tissues, CPS1 is expressed only in the liver and intestinal epithelial cells; however, many tumor cells also express this enzyme (Keshet et al. 2018). Apparently, in tumors the expression of CPS1 assists not only in NH₃ detoxification but also in maintaining the bioavailability of carbamoyl phosphate for *de novo* pyrimidine synthesis required for tumor growth (Kim et al. 2017). Indeed, a CPS1 inhibitor shows promise in managing tumors expressing this enzyme (Taguchi et al. 2020). However, CPS1 reaction requires 2 moles of ATP hydrolyzed (converted to 2 ADP + Pi) per one mole NH₃ incorporated in carbamoyl phosphate. In the presence of OXPHOS defects, mSLP can only provide one mole of ATP per glutamate entering the citric acid cycle. This negative net ATP balance is further exacerbated if we consider that two moles of NH₃ are released from glutamine entering the citric acid cycle because of the sequential action of GLS and GLUD1 requiring 4 moles of ATP by CPS1 for every mole of ATP made by succinyl-CoA synthase through mSLP starting from glutamine. GLUD1 in forward mode (i.e. incorporating NH₃ to α -ketoglutarate forming glutamate), obviously, is not a valid consideration in seeking how to balance the net ATP between NH₃ detoxification and mSLP, as it was deemed to operate in the direction of producing NH₃ and α -ketoglutarate towards mSLP. Although this seems to be at odds with the concept that glutamine utilization -which is known to occur heavily in most cancers- and mSLP as a promising target, these two phenomena need not take place in the same mitochondria, let alone in the same cell(s); NH₃ is a diffusible molecule and it can be envisaged that within tumor heterogeneity, some cells assume the function of NH₃ detoxification and exhibit little -if any- OXPHOS defects, thus are capable of robust ATP generation, while this NH₃ originated from other cancer cells that do exhibit OXPHOS defects but are most critical to the tumor tissue because of some other reason, i.e. stem cell clonality. The notion that within the same tumor tissue cancer cells with greater potential for rapid division but also exhibiting OXPHOS defects has

been documented (Gaude and Frezza 2014). We plan to address these considerations in more depth within the next few years.

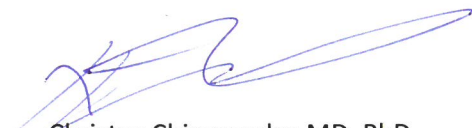
Two forms of SUCL is known, and they either produce GTP or ATP directly. Although these forms are interconvertible, are there any metabolic basis of their differential expression, for example in the light of GLUD 1 inhibition by GTP which also may influence the glutamine use. Diaphorases appear to be important to provide NAD for mSLP. Vitamin K reductase also belongs to the diaphorases. Is there any relevance of the Vitamin K status of the cells regarding the mSLP capacity. Could this be medically relevant?

>Response: Regarding the differential expression of GTP- and ATP-forming SUCL, this has been puzzling me ever since we performed a triple immunocytochemistry decorating in situ human fibroblast mitochondria with Mitotracker orange (delineating the mitochondrial network), subunit SUCLA2 (present only in the ATP-forming SUCL) and SUCLG2 (present only in the GTP-forming SUCL), which was published in (Chinopoulos et al. 2019) and (Chinopoulos 2020). The aforementioned previous two manuscripts are not part of the dissertation. As shown in figure 2 of (Chinopoulos 2020) (I am attaching this reference in my response), SUCLA2 and SUCLG2 were simultaneously present in most of the mitochondrial network within the same cells. There is no cross-reactivity between the anti-SUCLA2 and anti-SUCLG2 antibodies nor any similarities in their epitopes either; the presence of either subunit strongly implies corresponding enzymatic activity, there is no possibility for subunit lingering in the matrix without incorporation to a fully functional holoenzyme complex. The co-presence of both ATP-forming and GTP-forming SUCL in the same mitochondrion is further perplexing by the simultaneous presence of NME4, a mitochondrial nucleoside diphosphokinase interconverting $ATP+GDP \leftrightarrow ADP+GTP$ (Lacombe et al. 2018). To this day, I have not been able to explain this apparent redundancy, i.e. the co-presence of ATP-forming SUCL, GTP-forming SUCL and NME4 in the same mitochondrion, thus I cannot comment on the specific notion regarding GLUD1 inhibition by GTP which could influence glutamine use. I would address that by looking into the expression of ATP-forming SUCL, GTP-forming SUCL and GLUD1 in specific cell types where a reciprocal expression of SUCLG2 or SUCLA2 vs GLUD1 may shed light. Regarding a potential relevance of vitamin K status as a substrate of the diaphorase vitamin K reductase, possibly influencing mSLP capacity by providing NAD^+ : indeed, there is a potential medical relevance in vitamin K availability and whenever a cell/mitochondrion is subject to circumstances that may benefit from mSLP. There are two aspects by which this can be investigated, and we are actually engaged in one of them: in Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON), mitochondrial complex I is dysfunctional due to mutations in several of its subunits (Yu-Wai-Man et al. 2002). Cells exhibiting complex I deficiency could benefit from mSLP. Currently, idebenone is an FDA-approved drug for the treatment of LHON (Kerr 2010). However, idebenone also exhibits significant side effects because it favors ROS formation through its metabolism (Jaber and Polster 2015). We initiated a project by which we attempt to bioenergetically rescue fibroblasts obtained from human subjects suffering from LHON using quinones that can be used by diaphorases, such as vitamin K (proceedings and ethical permission of this project are attached to this response). The other aspect regarding vitamin K and mSLP concerns a prospective diminished vitamin K availability by means of dietary restriction, but this is rare in adults.

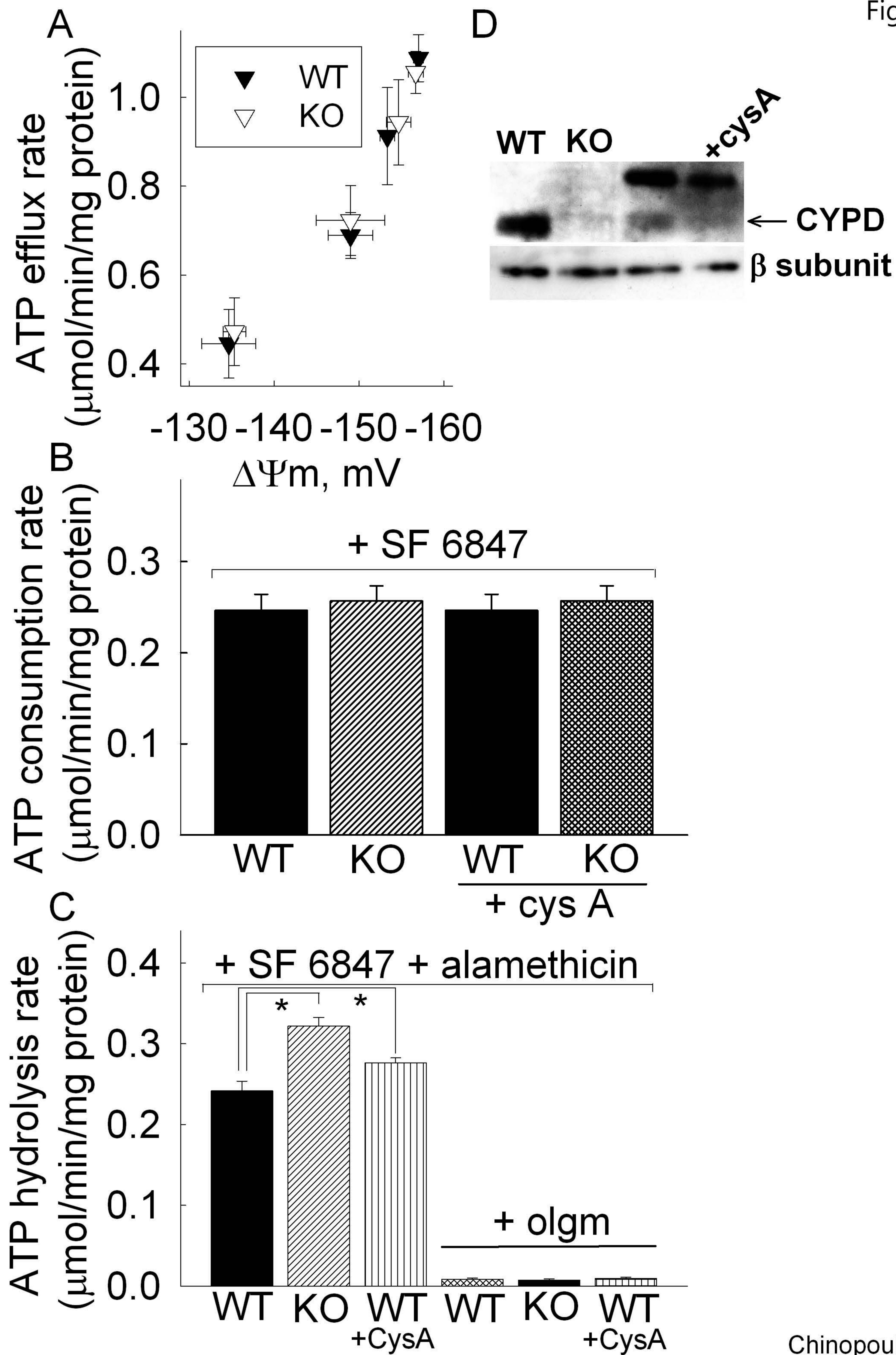
REFERENCES CITED

- Chinopoulos C. 2020. Quantification of mitochondrial DNA from peripheral tissues: Limitations in predicting the severity of neurometabolic disorders and proposal of a novel diagnostic test. *Mol Aspects Med.* Feb;71:100834. Epub 20191116.
- Chinopoulos C, Batzios S, van den Heuvel LP, Rodenburg R, Smeets R, Waterham HR, Turkenburg M, Ruiten JP, Wanders RJA, Doczi J, et al. 2019. Mutated SUCLG1 causes mislocalization of SUCLG2 protein, morphological alterations of mitochondria and an early-onset severe neurometabolic disorder. *Mol Genet Metab.* Jan;126:43-52. Epub 20181116.
- Gaude E, Frezza C. 2014. Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Metab.*2:10. Epub 20140717.
- Jaber S, Polster BM. 2015. Idebenone and neuroprotection: antioxidant, pro-oxidant, or electron carrier? *J Bioenerg Biomembr.* Apr;47:111-118. Epub 20140928.
- Kerr DS. 2010. Treatment of mitochondrial electron transport chain disorders: a review of clinical trials over the past decade. *Mol Genet Metab.* Mar;99:246-255. Epub 20091126.
- Keshet R, Szlosarek P, Carracedo A, Erez A. 2018. Rewiring urea cycle metabolism in cancer to support anabolism. *Nat Rev Cancer.* Oct;18:634-645.
- Kim J, Hu Z, Cai L, Li K, Choi E, Faubert B, Bezwada D, Rodriguez-Canales J, Villalobos P, Lin YF, et al. 2017. CPS1 maintains pyrimidine pools and DNA synthesis in KRAS/LKB1-mutant lung cancer cells. *Nature.* Jun 1;546:168-172. Epub 20170524.
- Lacombe ML, Tokarska-Schlattner M, Boissan M, Schlattner U. 2018. The mitochondrial nucleoside diphosphate kinase (NDPK-D/NME4), a moonlighting protein for cell homeostasis. *Lab Invest.* May;98:582-588. Epub 20180228.
- Taguchi A, Fahrman JF, Hanash SM. 2020. A Promising CPS1 Inhibitor Keeping Ammonia from Fueling Cancer. *Cell Chem Biol.* Mar 19;27:253-254.
- Yu-Wai-Man P, Turnbull DM, Chinnery PF. 2002. Leber hereditary optic neuropathy. *J Med Genet.* Mar;39:162-169.

March 01, 2023



Christos Chinopoulos MD, PhD



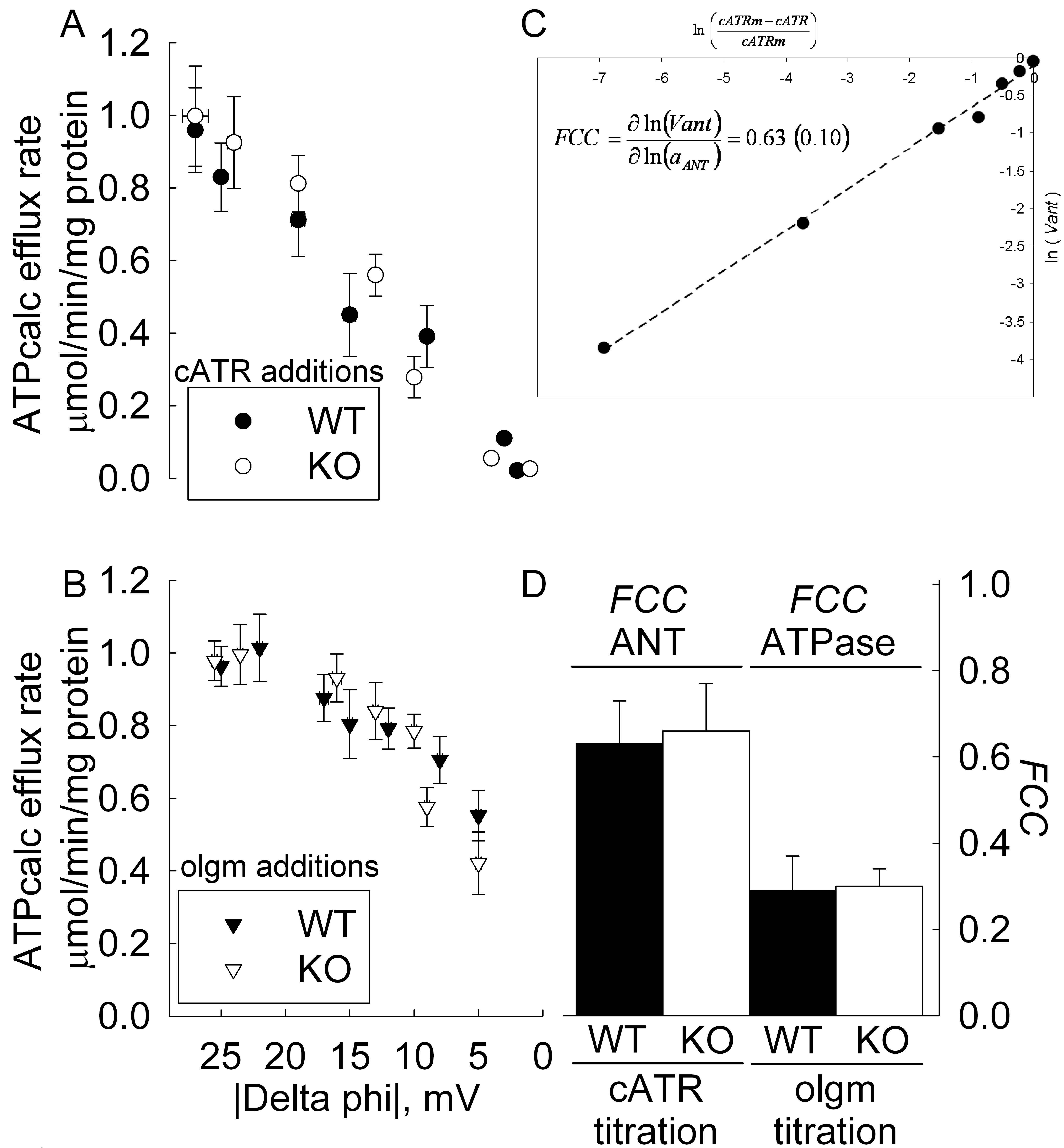


Figure 5.2

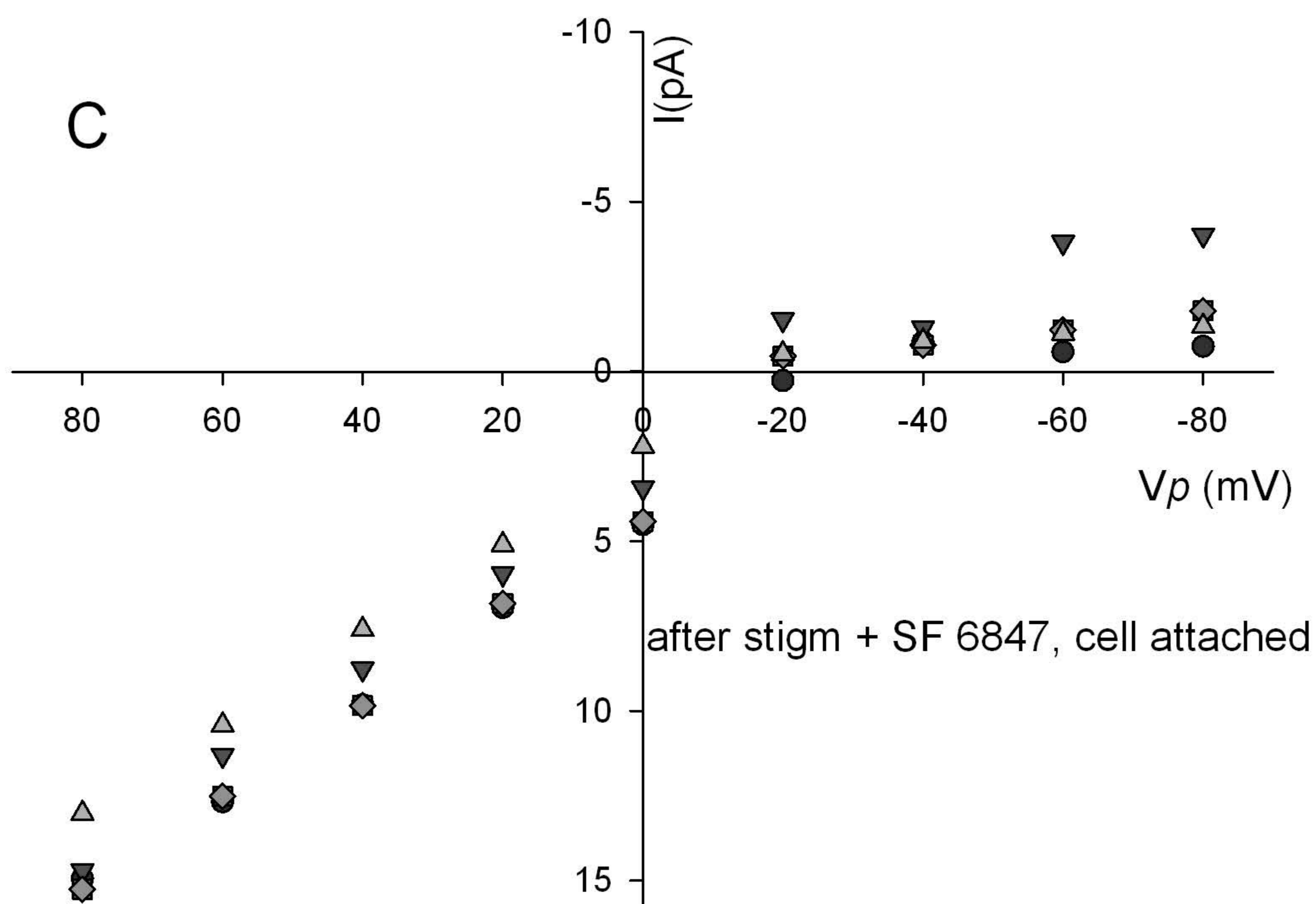
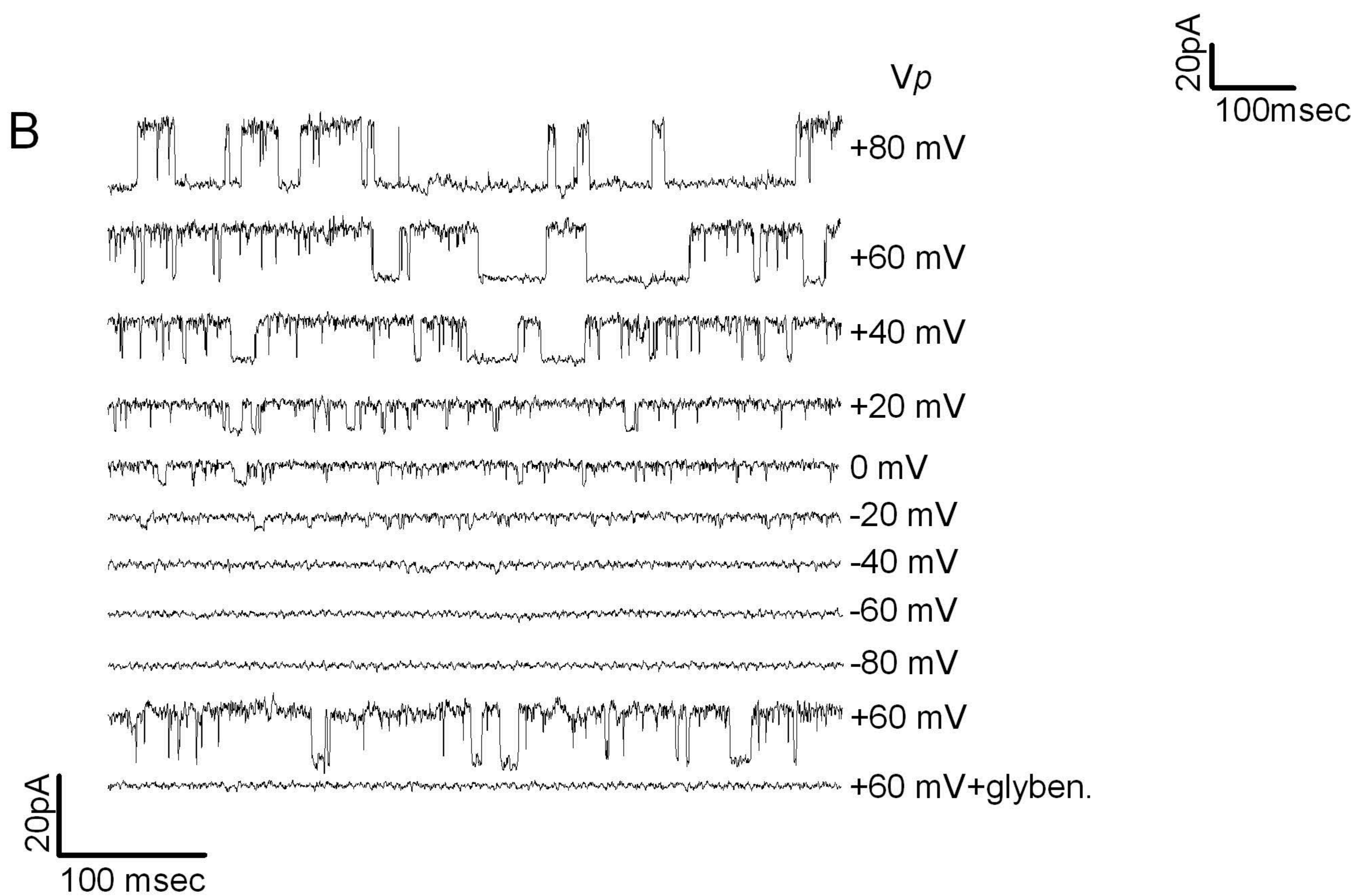
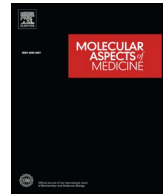


Figure 6.4



Quantification of mitochondrial DNA from peripheral tissues: Limitations in predicting the severity of neurometabolic disorders and proposal of a novel diagnostic test

Christos Chinopoulos

Department of Medical Biochemistry, Semmelweis University, Tuzolto St. 37-47, Budapest, 1094, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Fibroblast
Blood
Lymphocyte
Oxidative phosphorylation
Neuropathology
Ragged-blue fibers

ABSTRACT

Neurometabolic disorders stem from errors in metabolic processes yielding a neurological phenotype. A subset of those disorders encompasses mitochondrial abnormalities partially due to mitochondrial DNA (mtDNA) depletion. mtDNA depletion can be attributed to inheritance, spontaneous mutations or acquired from drug-related toxicities. In the armamentarium of diagnostic procedures, mtDNA quantification is a standard for disease classification. However, alterations in mtDNA obtained from peripheral tissues such as skin fibroblasts and blood cells do not often reflect the severity of the affected organ, in this case, the brain. The purpose of this review is to highlight the pitfalls of quantitating mtDNA from peripheral –and not limited to– tissues for diagnosing patients suffering from a variety of mtDNA depletion syndromes exhibiting neurologic abnormalities. In lieu, a qualitative test of mitochondrial substrate-level phosphorylation –even from peripheral tissues– reflecting the ability of mitochondria to rely on glutaminolysis in the presence of respiratory chain defects is proposed as a novel diagnostic assessment of mitochondrial functionality.

1. Neurometabolic disorders

Stated simply, neurometabolic disorders are those due to enzyme or cofactor deficiencies leading to significant alterations in metabolism to the extent of affecting the developing brain. Enzyme deficiencies may be caused by genetic mutations inherited from the parents or acquired during the fetal stage (Willemsen et al., 2016), (El-Hattab and Scaglia, 2013), (Suomalainen and Battersby, 2018). Even though mtDNA is maternally inherited (see section 2) the diseases mentioned below follow Mendelian inheritance since all mutations affect nuclear-encoded proteins. These disorders encompass a wide variety of conditions including organic acidurias, amino-acidopathies (including defects of the urea cycle), lipofuscinoses, leukodystrophies, and disorders of the peroxisomes, lysosomes and mitochondria. In the vast majority of cases there is no cure and treatment remains palliative, highly dependent on the diagnostic workup of patients. To this end, “five new things” have emerged in the literature reviewed in (Willemsen et al., 2016), specifically: i) next-generation sequencing combined with next-generation metabolic screening; ii) recognition of disease-specific MRI patterns; iii) realization that some neurometabolic disorders do not follow a classic autosomal recessive mode of inheritance in all families; iv) gene therapy may soon be an option for treatment; v) neurometabolic disorders also emerge in the adult life of some patients, thus future

professionals should be aware and prepared. The above “five new things” not only shorten the time for definite diagnosis but also protect the patients from unnecessary, often invasive procedures as well as decreasing costs.

There are a number of mitochondrial disorders that may yield a neurometabolic phenotype; among them, depletion of mitochondrial DNA (mtDNA) –due to a variety of reasons, see section 4 is a potential underlying cause which has rightfully earned own entries in the Mendelian inheritance in Man, termed mtDNA depletion syndromes (MDS). Before exploring this further, a background on mtDNA is warranted.

2. Mitochondrial DNA

In humans, mtDNA is a 16,589 base-pair long, double-stranded circular DNA sequence coding for 13 polypeptides of electron transport chain components, the 12S and 16S ribosomal RNAs and 22 transfer RNAs critical for mitochondrial protein synthesis. Its two strands exhibit different sedimentation rates due to enrichment of guanine in one of them, thus they are referred to as “heavy” and “light” strand.

Nucleated cells harbor hundreds or thousands of mtDNA copies (Ylikallio and Suomalainen, 2012), (Miller et al., 2003); furthermore, mtDNA content may vary over time within the same cell (Moraes, 2001). It is a recurrent question how many mtDNA copies are present

E-mail address: chinopoulos.christos@eok.sote.hu.

<https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.11.004>

Received 12 September 2019; Received in revised form 7 November 2019; Accepted 12 November 2019

Available online 16 November 2019

0098-2997/ © 2019 The Author. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

per mitochondrion, but it is best to consider mitochondria as a highly dynamic intracellular network (Chan, 2006); thus, it is perhaps more correct to report mtDNA copies per cell per some other mitochondrial marker rather than mitochondrial count number. These copies are bound to specific proteins forming so-called nucleoids in the shape of foci or puncta attached to the inner mitochondrial membrane (Hensen et al., 2014), (Spelbrink, 2010). The mtDNA/nucleoid molecule ratio in cultured human cells is 1.4 (Kukat et al., 2011), thus, it is probably safe to assume that one nucleoid binds to one mtDNA molecule (Johnston et al., 2015).

In one end of the mtDNA content spectrum, the human oocyte contains hundreds of thousands of mtDNA copies. However, following fertilization, mtDNA replicates only after the blastocyst stage; until this occurs, zygote mtDNA copies are being distributed to all blastocyst cells. Consequently, each female primordial germ cell harbors a relatively small number of mtDNA copies. The reduction of mtDNA copies in the primordial germ cells is known as “bottleneck”, a phenomenon that we now know to exist in other cell types as well, reviewed in (Zhang et al., 2018). The number of mtDNAs transmitted through this bottleneck in humans has been estimated to vary from ~9 (Li et al., 2016) to ~30–35 (range 9–141) (Rebolledo-Jaramillo et al., 2014). The time elapsed for one round of mtDNA replication is about 1 h (Clayton, 1982) and it takes place independently from cell division, obviously also occurring in post-mitotic cells. During fetal life, mtDNA amount increases but not appreciably (Suomalainen and Isohanni, 2010); energy provision by glycolysis is more prevalent thus, even the most severe mitochondrial abnormalities do not yet manifest (Suomalainen and Isohanni, 2010). mtDNA content as well as respiratory chain subunits increase dramatically in the first year of life, a period coinciding with the manifestation of several mtDNA depletion syndromes (Morten et al., 2007).

Up until recently it was believed that mtDNA is exclusively maternally inherited; however, it was recently shown that mtDNA can also be inherited from the father (Luo et al., 2018), although this seems to be a very rare event, and currently contested (Lutz-Bonengel and Parson, 2019). In any case, paternal contribution of mtDNA to the fertilized egg is expected to be negligible, because the number of mtDNA molecules in the oocyte outnumber those in the sperm by a factor of 10,000 (Pyle et al., 2015). Furthermore, it was postulated that the results of (Luo et al., 2018) could be explained by the presence of multicopies of mtDNA in the nuclear genome termed “Mega-NUMT” that segregate in an autosomal dominant manner regardless of parental origin (Balciuniene and Balciunas, 2019). Thus, in the vast majority –if not all- of cases the notion that male and female mtDNAs don't recombine imply that the mtDNA sequence can only be altered by accumulating mutations along the lineage.

3. mtDNA maintenance

mtDNA is maintained by securing a sufficiently high number of healthy copies (a phenomenon termed “homoplasmy”, see below in this section), rather than proofreading a single copy; this is because mitochondria harbor only one DNA polymerase as opposed in the nucleus. This, and in addition to the fact that DNA in mitochondria are devoid of protective histones while being in proximity to reactive oxygen species emanating from the electron transport chain, substantiate the reasons why mtDNA is ~10 times more prone to uncorrected mutagenesis. It is not the subject of the present work to review mtDNA maintenance mechanisms, though some background is hereby outlined so as to assist the reader, focusing on processes that are associated with neurometabolic diseases. mtDNA maintenance mechanisms are exhaustively reviewed elsewhere (Gustafsson et al., 2016), (Suomalainen and Battersby, 2018), (El-Hattab et al., 2017), (Viscomi and Zeviani, 2017).

Pathways known to be directly involved in mtDNA maintenance are shown in Fig. 1 (reproduced by permission from (El-Hattab et al., 2017)). From this figure it is apparent that mtDNA maintenance

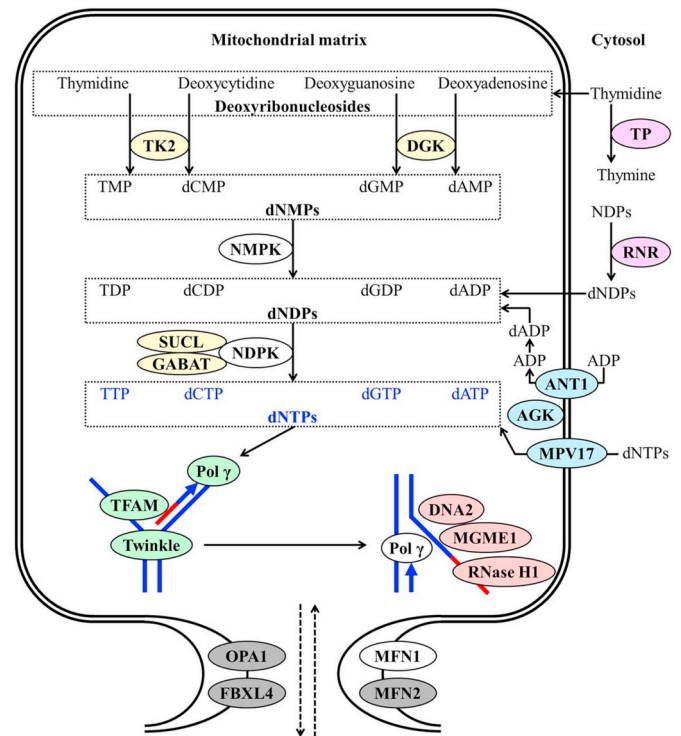


Fig. 1. Obtained from (El-Hattab et al., 2017), by permission. A diagram showing the proteins that are involved in mtDNA maintenance and known to be associated with MDMDs: 1) Enzymes of mitochondrial nucleotide salvage pathway that convert the deoxyribonucleosides (thymidine, deoxycytidine, deoxyguanosine, and deoxyadenosine) to deoxyribonucleotide monophosphates (dNMPs: thymidine monophosphate (TMP), deoxycytidine monophosphate (dCMP), deoxyguanosine monophosphate (dGMP), and deoxyadenosine monophosphate (dAMP)), then to deoxyribonucleotide diphosphates (dNDPs: thymidine diphosphate (TDP), deoxycytidine diphosphate (dCDP), deoxyguanosine diphosphate (dGDP), and deoxyadenosine diphosphate (dADP)), then to deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs: thymidine triphosphate (TTP), deoxycytidine triphosphate (dCTP), deoxyguanosine triphosphate (dGTP), and deoxyadenosine triphosphate (dATP)). Thymidine kinase 2 (TK2; encoded by TK2) and deoxyguanosine kinase (DGK; encoded by DGUOK) convert the deoxyribonucleosides to dNMPs. Nucleotide monophosphate kinase (NMPK) converts dNMPs to dNDPs. Nucleotide diphosphate kinase (NDPK) converts dNDPs to dNTPs. NDPK forms complex with both succinyl-CoA ligase (SUCL composed of an alpha subunit encoded by SUCLG1 and a beta subunit encoded by either SUCLA2 or SUCLG2) and gamma-aminobutyrate transaminase (GABAT; encoded by ABAT). 2) Enzymes of cytosolic nucleotide metabolism: ribonucleotide reductase (RNR; composed of 2 catalytic subunits and two small subunits either R2 or p53-inducible small RNR subunit (p53R2; encoded by RRM2B)) converts ribonucleotide diphosphates (NDPs) to dNDPs. Thymidine phosphorylase (TP; encoded by TYMP) converts thymidine to thymine. 3) Proteins involved in mitochondrial nucleotide transport: adenine nucleotide translocator 1 (ANT1; encoded by SLC25A4), acylglycerol kinase (AGK; encoded by AGK), and MPV17 protein (encoded by MPV17). 4) Enzymes involved in mtDNA synthesis: Twinkle (encoded by TWNK) which is a DNA helicase that separates the DNA strands (presented as blue lines), DNA polymerase γ (pol γ ; consisting of catalytic subunit encoded by POLG and two accessory subunits encoded by POLG2) which needs RNA primer (presented as red lines) to initiate DNA synthesis (presented as blue arrows), and mitochondrial transcription factor A (TFAM; encoded by TFAM) that is required for the generation RNA primer (presented as red lines). 5) Nucleases removing RNA primers and flap intermediate (presented as red and blue lines): RNase H1 (encoded by RNASEH1), DNA helicase/nuclease 2 (DNA2; encoded by DNA2), and mitochondrial genome maintenance exonuclease 1 (MGME1; encoded by MGME1). 6) Proteins involved in mitochondrial fusion: mitofusin 1 (MFN1; encoded by MFN1), mitofusin 2 (MFN2; encoded by MFN1), dynamin-related GTPase OPA1 (encoded by OPA1), and F-box and leucine-rich repeat 4 (FBXL4; encoded by FBXL4). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

depends on many nuclear gene-encoded proteins. Furthermore, uninterrupted provision of nucleotides –achieved by intramitochondrial recycling as well as import from the cytosol–is required. In addition, mtDNA maintenance also depends on regulated exchange of intramitochondrial contents through mitochondrial fission/fusion and bioenergetic parameters that affect protein or other metabolite import, critical for mtDNA. Perturbations in one or more of the above mechanisms may impact mtDNA by conferring depletion or large fragment deletions. In rarer circumstances an excess of mtDNA can be observed to lead to disease, see section 4.

4. Mitochondrial DNA maintenance defects (MDMDs)

Defects in mtDNA maintenance are due to mutations in nuclear genes coding for proteins involved in mtDNA synthesis, nucleotide pool maintenance, mitochondrial fission/fusion or regulating basic bioenergetic processes, rendering them among the most common of the inherited disorders of metabolism, reviewed in (Schaefer et al., 2004). Originally reported in 1988 (Holt et al., 1988) and (Wallace et al., 1988) and considered rare, we now know that the prevalence of mitochondrial diseases can be as high as 1 in 2,000 individuals (Suomalainen and Battersby, 2018). Secondary causes of mtDNA depletion are reviewed in (Nogueira et al., 2014), (Niyazov et al., 2016), (Rotig and Poulton, 2009).

The mechanisms by which mtDNA gets depleted are incompletely understood: until recently, two theories have been formulated, i) the “slipped-strand model” (Shoffner et al., 1989) a consequence of the guanine-cytosine bias of the heavy and light strand, and ii) a second model proposing that deletions are caused by double strand breaks followed by DNA repair (Krishnan et al., 2008). Most recently though, evidence was put forward suggesting that mtDNA deletions are formed by copy-choice recombination during active DNA synthesis of the light strand (Persson et al., 2019), arguing against both previously proposed models.

mtDNA depletion can also be drug-induced (Arnaudo et al., 1991), as it occurs during anti-retroviral treatment (Montaner et al., 2004), (Casula et al., 2007), (Morse et al., 2012), (Lewis et al., 2003), (Young, 2017). One-fifth of patients undergoing anti-retroviral treatment develop a phenotype stemming from mtDNA depletion, although in most cases this is reversible upon cessation of treatment (Lewis et al., 2003), (Young, 2017), (Dagan et al., 2002), (Lewis et al., 2001). Whatever the cause of damaging mtDNA maintenance, the result may be quantitative (mtDNA depletion) or qualitative (multiple mtDNA deletions). mtDNA deletion syndromes are caused by large-scale deletions of mtDNA on the order of several thousand base pairs and are usually sporadic (Holt et al., 1988). This author supports the classification by El-Hattab, Craigen and Scaglia, including the concept that defects in mtDNA maintenance genes result in mtDNA depletion *and* multiple mtDNA deletions, both representing the spectrum of a single disease group (El-Hattab et al., 2017), thus adopting the term of mitochondrial DNA maintenance defects (MDMDs). Rarely, mtDNA maintenance defects may be because of an excess: by supplementing HeLa cells with surplus thymidine for just 4 h, mitochondrial dTTP and dGTP pools increased to such an extent that multiple mtDNA deletions were apparent after 8 months of culture (Song et al., 2003); furthermore, a very high mtDNA copy number was associated with several pathologies associated with mtDNA maintenance defects in transgenic mice (Ylikallio et al., 2010); in humans, this possibility remains unexplored.

When inherited, MDMDs do so in an autosomal recessive or dominant manner and can basically manifest in any organ at any time (Suomalainen and Battersby, 2018). Pathogenic variants for all nuclear genes depicted in Fig. 1 have been reported to yield an MDMD. mtDNA depletion syndromes are reported and periodically updated in the OMIM database; currently, the search string [“mtDNA depletion” OR “mitochondrial DNA depletion”] in OMIM database yields 65 entries. What is important to realize is that the knowledge of a specific defect in

mtDNA due to one reason or another, does not afford the investigator with the capacity of predicting the severity of disease, simply because the latter depends on at least three parameters: i) the severity of mutation, partially dictated by its position in the affected gene, ii) percentage of variable mtDNA content, and iii) likelihood for disease manifestation (phenotype). The latter parameter also depends on the affected organ; furthermore, with lesser amount of mtDNA, chances for pathogenic mtDNA depletion increases. Thus, these three parameters are strongly interrelated.

Despite that MDMDs may appear in any organ at any time, on the basis of an apparent preponderance for tissue-specific manifestation these disorders are usually classified as myopathic, encephalomyopathic, hepatocerebral or neurogastrointestinal (El-Hattab and Scaglia, 2013). In most cases it is thought that because adequate amount of mtDNA is required for the production of subunits of mitochondrial respiratory chain complexes and therefore energy-harnessing through oxidative phosphorylation (OXPHOS), mtDNA depletion results in energy-shortage (Morales et al., 1991), (Sarzi et al., 2007), (Spinazzola et al., 2009). Notably though, MDMDs leading to respiratory chain dysfunction let subunits of complex II intact, simply because they are all nuclear-encoded. However, mindful that mitochondria participate in calcium homeostasis, biosynthesis of heme and steroid hormones, apoptosis, cell cycle regulation –to name a few–it must be pointed out that exactly because they do so many things, it is oversimplifying to consider that mtDNA depletion –or any mitochondrial problem for that matter–yields phenotypes exclusively from issues regarding OXPHOS. Indeed, mitochondria require ~1,500 proteins for proper operation (Pagliarini et al., 2008), (Calvo and Mootha, 2010) out of only ~100 of are directly involved in oxidative phosphorylation and the production of ATP (Gorman et al., 2016). This concept is critical for understanding the novel diagnostic test outlined below in which mitochondria are challenged to benefit from glutaminolysis in the absence of an active respiratory chain, see section 6.

5. Insufficient correlation between mtDNA quantification and neurometabolic disease severity

When a neurometabolic disease is suspected of having a mitochondrial origin a host of clinical assessments and multitude of investigations are at hand which differ for pediatric vs adult patients (Bernier et al., 2002), (Walker et al., 1996). Historically, serum creatine kinase, alanine and lactate levels have been used as indices of mitochondrial diseases, but these measures are known to be nonspecific and somewhat insensitive (Debray et al., 2007). Muscle biopsy followed by histologic and functional assessment are the “gold standard” (Mitochondrial Medicine Society's Committee on et al., 2008), (Suomalainen, 2011), (Viscomi and Zeviani, 2017), (Nishigaki et al., 2003), (Nishino et al., 1999), (Nolden et al., 2005), (Ostergaard et al., 2007a), (Chretien et al., 1998), however, carrying a number of uncertainties (Tucker et al., 2011). Functional assays encompass respiratory chain component activities including that of the F₀-F₁ ATP synthase, blue-native gel electrophoresis, semi-quantitation of the various protein components within complexes and supercomplexes via western blots and gel electrophoresis, oxygen consumption rate estimations and their alterations in the presence of various specific inhibitors. However, a muscle biopsy is invasive, exhibits high false-negative and false-positive rates and a disappointingly high irreproducibility among laboratories evaluating respiratory chain enzyme activities (Rodenburg et al., 2013), (Medja et al., 2009). In addition, in muscle homogenate the activity of respiratory chain components may vary from normal to about 50% of the controls' mean (Servidei et al., 1991). Despite that MDMDs were discovered by measuring enzymatic activities of the respiratory chain complexes in affected tissues based on measurements prone to inaccuracies, exactly because of the complexity and high degree of irreproducibility, Viscomi and Zeviani have tactfully suggested that “these assays should be

carried out in specialized centers, as they require ad hoc expertise and standardized, verified and complex technologies and diagnostic protocols" (Viscomi and Zeviani, 2017). Finally, the costs of surgical procedures especially for children are considerable, since they require anesthesia (Suomalainen, 2011). On the other hand, new biomarkers show promise in diagnosing mitochondrial diseases, such as measuring the serum levels of fibroblast growth factor 21 (FGF21) and growth/differentiation factor 15 (GDF15) (Suomalainen et al., 2011), (Davis et al., 2013), (Yatsuga et al., 2015).

Mindful that normal respiratory chain activities in muscle do not exclude respiratory chain deficiency in another tissue, an under-appreciated factor for diagnosis of mitochondrial diseases is tissue selection. As stated above, the amount of depleted mtDNA may vary among cells and therefore within and between tissues. In general, tissues harboring the highest levels of mtDNA depletion tend to be those that are difficult or almost impossible to obtain such as the brain, heart, retina and cochlea whereas more accessible tissues such as skin fibroblasts and blood cells exhibit low mutation levels (Sue et al., 1998). It is considered prudent to culture fibroblasts obtained from a skin biopsy from a patient who donated muscle for diagnostic procedures under the impression that fibroblasts may harbor the deficiency in oxidative phosphorylation as shown in skeletal muscle and serving as a much easier tissue for diagnostic workup regarding assigning pathogenicity to new mutations (Gorman et al., 2016). This may assist in the following: once an index case has been identified, relatives can also be tested in a much less invasive manner by providing buccal, urine and blood DNA samples (Gorman et al., 2016). However, reports of classical MDMDs are outlined below in which mtDNA was not found to be depleted in several tissues. In almost all cases, mtDNA was quantified by Southern blot analysis or real-time PCR (Gourlain et al., 2003). In both approaches, mtDNA amount is compared to a specific nuclear reference gene, and always examined using age- and tissue-matched controls as well (Clay Montier et al., 2009), (Hakonen et al., 2007), (Gotz et al., 2008). An extent of mtDNA decrease of more than 35–40% compared to controls is deemed pathologic (Poulton and Holt, 2009).

In (Tzoulis et al., 2014) it was shown that autosomal recessive mutations in POLG (see also Fig. 1) mtDNA depletion and secondary mtDNA mutations were cell- and tissue-specific. In (Nishino et al., 1999) and (Nishino et al., 2000), only half of the patients exhibiting mutations in TP causing mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) syndrome harbored mtDNA depletions. In patients with deoxyguanosine kinase (DGUOK) mutations, mtDNA depletion was observed in liver but not in muscle (Mandel et al., 2001), even though this disease affects the muscle as well (Freisinger et al., 2006). The effect of DGUOK mutations on mtDNA content obtained from fibroblasts is variable (Morten et al., 2007). In (Gauthier-Villars et al., 2001), it was shown that patients suffering from Alpers-Huttenlocher syndrome usually exhibit respiratory chain defects and mtDNA depletion in liver, but not always in skeletal muscle; fibroblasts were shown to be mosaic in nature in respect of their mtDNA content. Finally, mtDNA depletion was found to be brain-specific in patients with infantile-onset spinocerebellar ataxia (IOSCA) syndrome while no alterations were found in muscle (Hakonen et al., 2008). In (Ostergaard, 2008), it was shown that in patients with mutations in SUCLG1 and SUCLA2 a combined respiratory chain defect was observed in liver or muscle, but not in skin fibroblasts. Likewise, in muscle of SUCLA2-deficient individuals mtDNA content was reduced to 20–60% compared to age-matched controls (Elpeleg et al., 2005), (Carrozzo et al., 2007), (Ostergaard et al., 2007b), (Carrozzo et al., 2016). In patients suffering from TK2 deficiency, only 66% of those exhibited a greater than 30% mtDNA depletion (Garone et al., 2018).

In the same line of thought, i.e. that mtDNA depletion may not be necessarily leading to mitochondrial pathology in humans, the MPV17^{-/-} mouse with severe mtDNA depletion in liver failed to demonstrate an appreciable decrease in respiratory chain activities, not even overt liver failure with age, only grey hair early in adulthood and

focal segmental glomerulosclerosis with massive proteinuria and cochlear lesions (Viscomi et al., 2009).

Overall, mtDNA depletion in a tissue does not imply depletion in another; by the same token, mtDNA depletion is not necessarily associated with respiratory chain defects.

6. Mitochondrial substrate-level phosphorylation (mSLP) in the absence of electron transport and its use as a mitochondrial diagnostic marker

It has been firmly established that when the respiratory chain is pharmacologically inhibited or in the presence of anoxia, mitochondria are still able to utilize downstream metabolites of glutamine (glutamate, α -ketoglutarate) using NAD^+ obtained from sources other than complex I (Chinopoulos, 2019), (Ravasz et al., 2018), (Kiss et al., 2013), (Chinopoulos et al., 2010), a concept which is likely to be exploited in cancer cells thriving in adverse tumor microenvironments (Chinopoulos and Seyfried, 2018). This serves the purpose of generating high-energy phosphate nucleotides within the mitochondrial matrix through the process of mitochondrial substrate-level phosphorylation (mSLP) for i) fueling a reverse-operating $\text{F}_0\text{-F}_1$ ATP synthase (Chinopoulos, 2011b) and ii) maintaining the ANT in forward mode, thus un-straining glycolysis (Chinopoulos, 2011a). An mSLP test is qualitative (presence vs absence of mSLP, there is no parameter that needs to be quantified) and can be performed in skin fibroblasts requiring no specialized machinery (spectrofluorimetry in plate or cuvette format is standard laboratory equipment). The test that we have devised is based on an "interrogation" of the directionality of succinate-CoA ligase (SUCL), a citric acid cycle enzyme that interconverts succinyl-CoA and ADP (or GDP) to CoASH, succinate and ATP (or GTP) (Johnson et al., 1998), essentially performing mSLP. This enzyme is a heterodimer composed of an invariant α subunit encoded by SUCLG1 and a substrate-specific β subunit, encoded by either SUCLA2 or SUCLG2. This dimer combination results in either an ATP-forming (EC 6.2.1.5) or a GTP-forming SUCL (EC 6.2.1.4). The possibility of co-presence of an ATP- and GTP-forming SUCL in the same mitochondrion has only been recently investigated in human fibroblasts, where it was found that in these cells the majority of *in situ* mitochondria co-express both isoforms (Chinopoulos et al., 2019), see Fig. 2 (reproduced from (Chinopoulos et al., 2019) by permission). This seems redundant, mindful that an intramitochondrial diphosphate kinase (NME4) can transfer the high-energy bond between adenine and guanine nucleotides (Lacombe et al., 2018). In any case, mSLP supports the production of sufficient amounts of [ATP] in the mitochondrial matrix for both a reverse-operating $\text{F}_0\text{-F}_1$ ATP synthase (Chinopoulos, 2011b) and maintain the ANT in forward mode (Chinopoulos, 2011a). Presence of mSLP maintains ANT in forward mode for reasons outlined in (Chinopoulos, 2019), (Ravasz et al., 2018), (Kiss et al., 2013), (Chinopoulos et al., 2010), and this can be easily assessed by checking the effect of a highly-specific ANT inhibitor –carboxyatractyloside- in permeabilized cells with blocked complex I (using rotenone). Under these conditions, mSLP can only occur in the presence of suitable substrates specifically those stemming from glutaminolysis, but not succinate (Kiss et al., 2013). Such a test is depicted in Fig. 3 (obtained from (Tretter et al., 2016), by permission). As shown in figure panel 3A, the test relies on the principle that the ATP-ADP exchange through the ANT is electrogenic, since one molecule of ATP^{4-} is exchanged for one molecule of ADP^{3-} (Klingenberg, 2008). If the ANT operates in forward mode, abolition of its operation by carboxyatractyloside (cATR) will lead to a gain of $\Delta\Psi\text{m}$. If the ANT operates in reverse, abolition of its operation by the inhibitor will lead to a loss of $\Delta\Psi\text{m}$. Note that addition of the ANT inhibitor must take place *after* complex I is inhibited (i.e. by rotenone), thus, it cannot be over-emphasized that the mSLP test addresses the extent of compensation (i.e. remaining mitochondrial functionality) when the electron transport chain is non-functional. It does not yield any information regarding the respiratory chain, it only provides information if the *in situ*

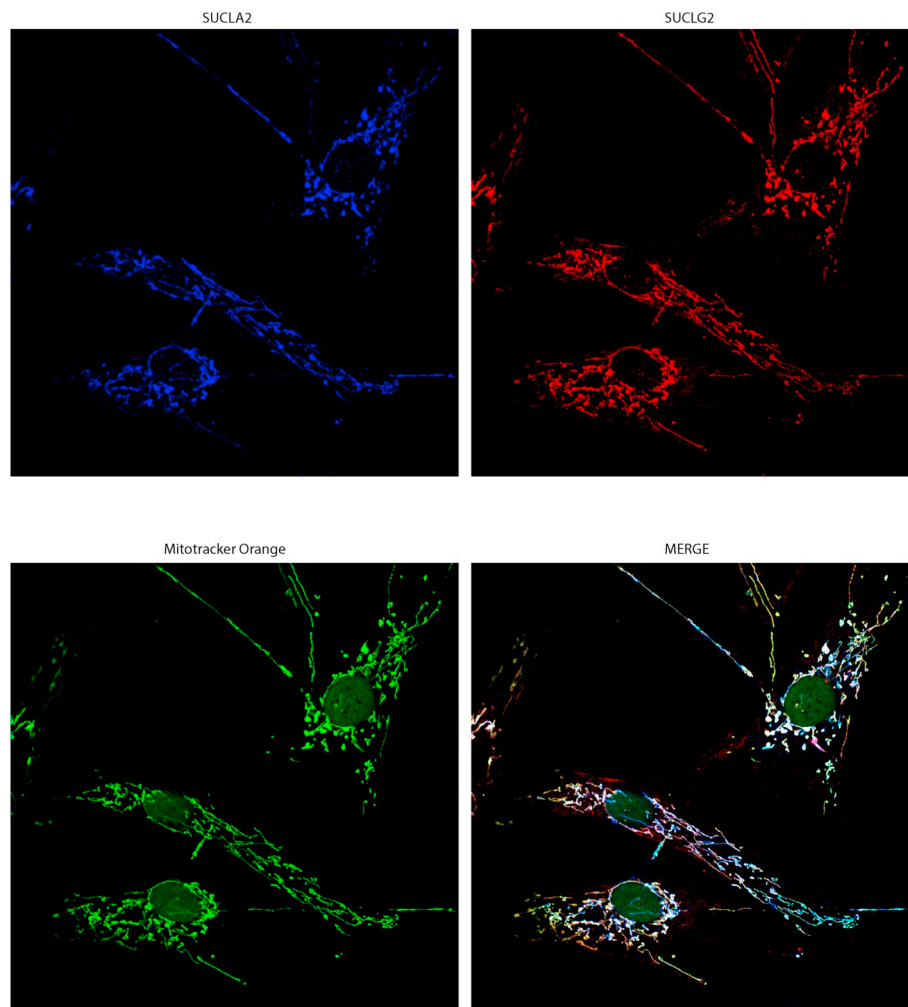


Fig. 2. Confocal images of immunolabeling of human fibroblasts from healthy subjects. Blue: anti-SUCLA2; Red: anti-SUCLG2; Green: Mitotracker orange (MTO). Reproduced from (Chinopoulos et al., 2019) by permission. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

mitochondria of the examined cells are able to harness energy from glutamine-derived metabolites when the respiratory chain is inhibited. In essence, this test will hint on the ability of mitochondria to cope with a defect in their respiratory chain. By employing this test, we have reported that defects in SUCLA2 and SUCLG1, respectively, yield an mSLP negative test, i.e. no mSLP present. As shown in figure panels 3B and 3C, *in situ* fibroblast mitochondria of a SUCLA2-deficient patient (B) or SUCLG1-deficient patient (C) exhibited no mSLP compared to age-matched controls. Note that patients with defects in SUCLA2 and SUCLG1 exhibit mtDNA depletion in some but not all tissues, while the phenotypes are debilitating leading to life termination at a young age (Ostergaard, 2008). Obviously, this test has been applied in fibroblasts from patients suffering from MDMDs due to mutations in the enzyme directly related to mSLP; efforts are ongoing in our laboratory to verify the validity of this test using fibroblasts from patients suffering from various mtDNA depletion syndromes.

Finally, it may be relevant to ponder on the fact that mSLP relies on a sufficient clearance of succinate, which can occur by increasing succinate dehydrogenase (SDH) activity; it is thus not surprising that in several MDMDs, ragged-blue fibers are observed in histological examination of muscle tissue, which is none other than an increase in SDH activity (DiMauro et al., 1999).

6.1. mSLP protocol

The mSLP protocol can be performed in cultured fibroblasts exactly as in (Kacso et al., 2016) and (Chinopoulos et al., 2019). It is best to compare cultured fibroblasts from the patient and at least three controls. It is not important to age- and gender-match the controls to the patient; the controls serve the purpose of ensuring that the mSLP protocol is being performed correctly; it is not a quantitative test, and for this reason it is also not necessary to normalize results to protein content or a housekeeping protein. Basically, fibroblasts [two 75 cm² (midi) or one 175 cm² (maxi) flask] are cultured to approximately 80% confluence. On the day of the experiment, two buffers need to be prepared: 500 ml of ice-cold buffer “A”, containing 110 mM K-gluconate, 10 mM HEPES (free acid), 10 mM KH₂PO₄, 10 mM mannitol, 10 mM NaCl, 8 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01 mM EGTA, 0.5 mg/ml BSA (essentially fatty acid-free), with the pH adjusted to 7.25 with KOH, and 5 ml of buffer “B” which in addition to the substances mentioned for buffer “A” it contains the following: 5 μM safranin O, 5 mM glutamate, 5 mM malate, 5 mM α-ketoglutarate and 175 μl of 2.5 mM digitonin (purity > 90%, dissolved in DMSO). For exact catalogue numbers of chemicals, the reader is referred to http://antactivity.com/Buffers_chemicals.html. Buffer “B” must be kept at 37 °C. Feeding media are aspirated and cells are washed once with ice-cold buffer “A”, then harvested by scraping in buffer “A” (no need for trypsinization, cells will be eventually permeabilized for the mSLP assay within a few

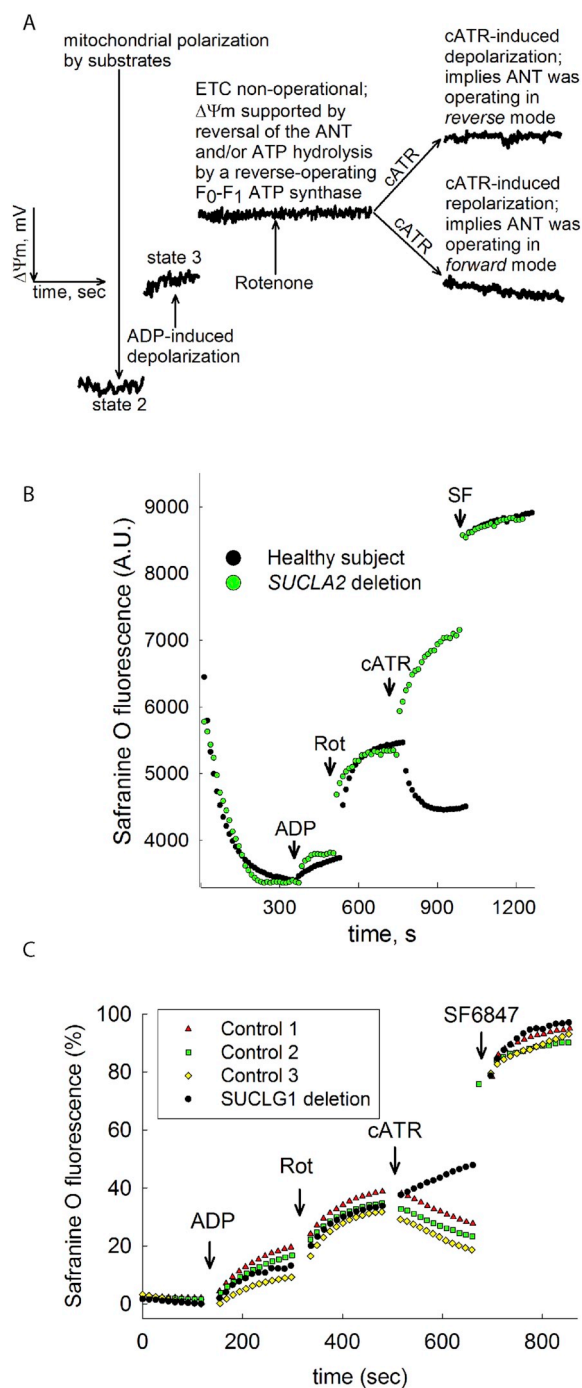


Fig. 3. Reproduced from (Tretter et al., 2016), (Kacso et al., 2016), (Chinopoulos et al., 2019), by permission. A: Explanatory cartoon graph of $\Delta\Psi_m$ measurements of mitochondria regarding the 'biosensor test' addressing the directionality of the ANT, and as an extension of this, the directionality of SUCL. Black trace represents a safranin O signal calibrated to $\Delta\Psi_m$, in mV. B: Reconstructed time course of safranin O signal from permeabilized fibroblasts of a control subject (black dots) and a patient suffering from complete SUCLA2 deletion (green dots). Rot: rotenone, 1 μ M. C: Reconstructed time courses of safranin O signal (expressed as percentage) indicating $\Delta\Psi_m$ from permeabilized fibroblasts of three age-matched control subjects (red triangles, green quadrangles and yellow diamonds) and the patient (IP) exhibiting SUCLG1 defect (black circles). Rot: rotenone, 5 μ M; cATR: carboxyatractylsido, 1 μ M; SF6847 500 nM. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

minutes, it is redundant to maintain high viability of the cells). Pellet cells by centrifugation at 3,500 rpm for 2.5 min using an angular rotor (or at 1,100 rpm for 10 min if a swing-bucket rotor is used) in 50 ml tubes containing at least 40 ml of buffer (to dilute calcium of the feeding media as much as possible). Wash cells once with buffer "A", and repeat the centrifugation step. Resuspend final pellet in 0.7 ml of buffer "B". Use a plate reader for recording safranin O fluorescence (495ex/585em). Split the 0.7 ml pellet in three 0.2 ml (record in triplicates) and add to individual wells of a 96 white plate suitable for fluorescence, and insert into the plate reader. The interior of the plate reader must be kept at 37 °C; possibility for automatic shaking of the plate is imperative (i.e. every 3 s). Acquisitions should be made every 10–15 s. Allow 5 min for adequate polarization of *in situ* mitochondria and cell membrane permeabilization by digitonin. Record baseline for 3 min, add 2 mM ADP (from a 6.9 pH-ed 200 mM stock, see http://antactivity.com/Buffers_chemicals.html), see Fig. 3. Record for 3 more minutes, then add 5 μ M rotenone. Record for an additional 3 min, then add 1 μ M carboxyatractylsido. Record for an additional 3 min, then add 250 nM of the uncoupler SF6847. The volume of each addition to each well should be not less than 1 μ l and no more than 2 μ l. Convert fluorescence traces to percentages and compare the 3 controls with that from the patient cells. If carboxyatractylsido leads to hyperpolarization in the controls but to a depolarization in the patient, mSLP in the patient is impaired. This means that the fibroblasts of the patient are unable to harness ATP from mitochondrial substrate-level phosphorylation from glutaminolysis, thus his/her mitochondria cannot compensate for a potential electron transport chain dysfunction to an appreciable degree.

7. Conclusions

The present review does not make an attempt to indicate how much mtDNA depletion is required for disease manifestation; it merely discusses that quantitating mtDNA on peripheral –but not limited to– tissues is not pathognomonic. Furthermore, the concept of mSLP as a qualitative and not quantitative test for evaluating the extent of mitochondrial functionality in the absence of an electron transport chain is put forward. Having said that, it cannot be overemphasized that the mSLP test cannot be used to differentiate among the numerous defects described in mtDNA translation, or involving a single complex, or secondary to other diseases involving mitochondrial dysfunction; it can only provide an indication if the affected mitochondria are able to energetically compensate and maintain –albeit– minor– ATP production and not act as sinks of cytosolically made ATP.

Funding

This work was supported by grants from NKFIH [FIKP-61822-64888-EATV], [VEKOP 2.3.3-15-2016-00012], [2017-2.3.4-TET-RU-2017-00003] and [KH129567] to C.C.

References

- Arnaudo, E., Dalakas, M., Shanske, S., Moraes, C.T., DiMauro, S., Schon, E.A., 1991. Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy. *Lancet* 337 (8740), 508–510.
- Balciuniene, J., Balciunas, D., 2019. A nuclear mtDNA concatemer (Mega-NUMT) could mimic paternal inheritance of mitochondrial genome. *Front. Genet.* 10, 518.
- Bernier, F.P., Boneh, A., Dennett, X., Chow, C.W., Cleary, M.A., Thorburn, D.R., 2002. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 59 (9), 1406–1411.
- Calvo, S.E., Mootha, V.K., 2010. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 11, 25–44.
- Carozzo, R., Dionisi-Vici, C., Steuerwald, U., Lucio, S., Deodato, F., Di Giandomenico, S., Bertini, E., Franke, B., Kluijtmans, L.A., Meschini, M.C., Rizzo, C., Piemonte, F., Rodenburg, R., Santer, R., Santorelli, F.M., van Rooij, A., Vermunt-de Koning, D., Morava, E., Wevers, R.A., 2007. SUCLA2 mutations are associated with mild methylmalonic aciduria, Leigh-like encephalomyopathy, dystonia and deafness. *Brain: J. Neurol.* 130 (Pt 3), 862–874.

- Carrozzo, R., Verrigni, D., Rasmussen, M., de Coo, R., Amartino, H., Bianchi, M., Buhas, D., Mesli, S., Naess, K., Born, A.P., Woldseth, B., Prontera, P., Batbayli, M., Ravn, K., Joensen, F., Cordelli, D.M., Santorelli, F.M., Tulinius, M., Darin, N., Duno, M., Jouvencel, P., Burlina, A., Stangoni, G., Bertini, E., Redonnet-Vernhet, I., Wibrand, F., Dionisi-Vici, C., Uusimaa, J., Vieira, P., Osorio, A.N., McFarland, R., Taylor, R.W., Holme, E., Ostergaard, E., 2016. Succinate-CoA ligase deficiency due to mutations in SUCLA2 and SUCLG1: phenotype and genotype correlations in 71 patients. *J. Inher. Metab. Dis.* 39 (2), 243–252.
- Casula, M., Vrsekoop, N., Wit, F.W., de Baar, M.P., de Ronde, A., Miedema, F., Reiss, P., 2007. Mitochondrial DNA decline in T cells of HIV-1 seroconverters may be dependent on immune activation. *J. Infect. Dis.* 196 (3), 371–376.
- Chan, D.C., 2006. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125 (7), 1241–1252.
- Chinopoulos, C., 2011a. The "B space" of mitochondrial phosphorylation. *J. Neurosci. Res.* 89 (12), 1897–1904.
- Chinopoulos, C., 2011b. Mitochondrial consumption of cytosolic ATP: not so fast. *FEBS Lett.* 585 (9), 1255–1259.
- Chinopoulos, C., 2019. Succinate in ischemia: where does it come from? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 115, 105580.
- Chinopoulos, C., Seyfried, T.N., 2018. Mitochondrial substrate-level phosphorylation as energy source for glioblastoma: review and hypothesis. *ASN neuro* 10 1759091418818261.
- Chinopoulos, C., Gerencser, A.A., Mandi, M., Mathe, K., Torocsik, B., Doczi, J., Turiak, L., Kiss, G., Konrad, C., Vajda, S., Vereczki, V., Oh, R.J., Adam-Vizi, V., 2010. Forward operation of adenine nucleotide translocase during F0F1-ATPase reversal: critical role of matrix substrate-level phosphorylation. *FASEB J. : Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24 (7), 2405–2416.
- Chinopoulos, C., Batziou, S., van den Heuvel, L.P., Rodenburg, R., Smeets, R., Waterham, H.R., Turkenburg, M., Ruiten, J.P., Wanders, R.J.A., Doczi, J., Horvath, G., Dobolyi, A., Vargiami, E., Wevers, R.A., Zafeiriou, D., 2019. Mutated SUCLG1 causes mislocalization of SUCLG2 protein, morphological alterations of mitochondria and an early-onset severe neurometabolic disorder. *Mol. Genet. Metab.* 126 (1), 43–52.
- Chretien, D., Gallego, J., Barrientos, A., Casademont, J., Cardellach, F., Munnich, A., Rotig, A., Rustin, P., 1998. Biochemical parameters for the diagnosis of mitochondrial respiratory chain deficiency in humans, and their lack of age-related changes. *Biochem. J.* 329 (Pt 2), 249–254.
- Clayton, D.A., 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28 (4), 693–705.
- Dagan, T., Sable, C., Bray, J., Gerschenson, M., 2002. Mitochondrial dysfunction and antiretroviral nucleoside analog toxicities: what is the evidence? *Mitochondrion* 1 (5), 397–412.
- Davis, R.L., Liang, C., Edema-Hildebrand, F., Riley, C., Needham, M., Sue, C.M., 2013. Fibroblast growth factor 21 is a sensitive biomarker of mitochondrial disease. *Neurology* 81 (21), 1819–1826.
- Debray, F.G., Mitchell, G.A., Allard, P., Robinson, B.H., Hanley, J.A., Lambert, M., 2007. Diagnostic accuracy of blood lactate-to-pyruvate molar ratio in the differential diagnosis of congenital lactic acidosis. *Clin. Chem.* 53 (5), 916–921.
- DiMauro, S., Bonilla, E., De Vivo, D.C., 1999. Does the patient have a mitochondrial encephalomyopathy? *J. Child Neurol.* 1 (14 Suppl. 1), S23–35.
- El-Hattab, A.W., Scaglia, F., 2013. Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. *Neurotherapeutics. J. Am. Soc. Exp. Neurotherap.* 10 (2), 186–198.
- El-Hattab, A.W., Craigen, W.J., Scaglia, F., 2017. Mitochondrial DNA maintenance defects. *Biochimica et biophysica acta. Mol. Basis Dis.* 1863 (6), 1539–1555.
- Elpeleg, O., Miller, C., Hershkovitz, E., Bitner-Glindzicz, M., Bondi-Rubinstein, G., Rahman, S., Pagnamenta, A., Eshhar, S., Saada, A., 2005. Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am. J. Hum. Genet.* 76 (6), 1081–1086.
- Freisinger, P., Futterer, N., Lankes, E., Gempel, K., Berger, T.M., Spalinger, J., Hoerbe, A., Schwantes, C., Lindner, M., Santer, R., Burdelski, M., Schaefer, H., Setzer, B., Walker, U.A., Horvath, R., 2006. Hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome caused by deoxyguanosine kinase (DGUOK) mutations. *Arch. Neurol.* 63 (8), 1129–1134.
- Garone, C., Taylor, R.W., Nascimento, A., Poulton, J., Fratter, C., Dominguez-Gonzalez, C., Evans, J.C., Loos, M., Isohanni, P., Suomalainen, A., Ram, D., Hughes, M.I., McFarland, R., Barca, E., Lopez Gomez, C., Jayawant, S., Thomas, N.D., Manzur, A.Y., Kleinstaub, K., Martin, M.A., Kerr, T., Gorman, G.S., Sommerville, E.W., Chinnery, P.F., Hofer, M., Karch, C., Ralph, J., Camara, Y., Madruga-Garrido, M., Dominguez-Carral, J., Ortez, C., Emperador, S., Montoya, J., Chakrapani, A., Kriger, J.F., Schoenaker, R., Levin, B., Thompson, J.L.P., Long, Y., Rahman, S., Donati, M.A., DiMauro, S., Hirano, M., 2018. Retrospective natural history of thymidine kinase 2 deficiency. *J. Med. Genet.* 55 (8), 515–521.
- Gauthier-Villars, M., Landrieu, P., Cormier-Daire, V., Jacquemin, E., Chretien, D., Rotig, A., Rustin, P., Munnich, A., de Lonlay, P., 2001. Respiratory chain deficiency in Alpers syndrome. *Neuropediatrics* 32 (3), 150–152.
- Gorman, G.S., Chinnery, P.F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D.R., Zeviani, M., Turnbull, D.M., 2016. Mitochondrial diseases. *Nature reviews. Dis. Primers* 2, 16080.
- Gotz, A., Isohanni, P., Pihko, H., Paetau, A., Herva, R., Saarenpaa-Heikkila, O., Valanne, L., Marjavaara, S., Suomalainen, A., 2008. Thymidine kinase 2 defects can cause multi-tissue mtDNA depletion syndrome. *Brain: J. Neurol.* 131 (Pt 11), 2841–2850.
- Gourlain, K., Amellal, B., Ait Arkoub, Z., Dupin, N., Katlama, C., Calvez, V., 2003. Quantitative analysis of human mitochondrial DNA using a real-time PCR assay. *HIV Med.* 4 (3), 287–292.
- Gustafsson, C.M., Falkenberg, M., Larsson, N.G., 2016. Maintenance and expression of mammalian mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 133–160.
- Hakonen, A.H., Isohanni, P., Paetau, A., Herva, R., Suomalainen, A., Lonnqvist, T., 2007. Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion. *Brain: J. Neurol.* 130 (Pt 11), 3032–3040.
- Hakonen, A.H., Goffart, S., Marjavaara, S., Paetau, A., Cooper, H., Mattila, K., Lampinen, M., Sajantila, A., Lonnqvist, T., Spelbrink, J.N., Suomalainen, A., 2008. Infantile-onset spinocerebellar ataxia and mitochondrial recessive ataxia syndrome are associated with neuronal complex I defect and mtDNA depletion. *Hum. Mol. Genet.* 17 (23), 3822–3835.
- Hensen, F., Cansiz, S., Gerhold, J.M., Spelbrink, J.N., 2014. To be or not to be a nucleoid protein: a comparison of mass-spectrometry based approaches in the identification of potential mtDNA-nucleoid associated proteins. *Biochimie* 100, 219–226.
- Holt, I.J., Harding, A.E., Morgan-Hughes, J.A., 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331 (6158), 717–719.
- Johnson, J.D., Mehus, J.G., Tews, K., Milavetz, B.I., Lambeth, D.O., 1998. Genetic evidence for the expression of ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in multicellular eucaryotes. *J. Biol. Chem.* 273 (42), 27580–27586.
- Johnston, I.G., Burgstaller, J.P., Havlicek, V., Kolbe, T., Rulicce, T., Brem, G., Poulton, J., Jones, N.S., 2015. Stochastic modelling, Bayesian inference, and new in vivo measurements elucidate the debated mtDNA bottleneck mechanism. *eLife* 4, e07464.
- Kacso, G., Ravasz, D., Doczi, J., Nemeth, B., Madgar, O., Saada, A., Ilin, P., Miller, C., Ostergaard, E., Jordanov, I., Adams, D., Vargado, Z., Araki, M., Araki, K., Nakahara, M., Ito, H., Gal, A., Molnar, M.J., Nagy, Z., Patocs, A., Adam-Vizi, V., Chinopoulos, C., 2016. Two transgenic mouse models for beta-subunit components of succinate-CoA ligase yielding pleiotropic metabolic alterations. *Biochem. J.* 473 (20), 3463–3485.
- Kiss, G., Konrad, C., Doczi, J., Starkov, A.A., Kawamata, H., Manfredi, G., Zhang, S.F., Gibson, G.E., Beal, M.F., Adam-Vizi, V., Chinopoulos, C., 2013. The negative impact of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex deficiency on matrix substrate-level phosphorylation. *FASEB J. : Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27 (6), 2392–2406.
- Klingenberg, M., 2008. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (10), 1978–2021.
- Krishnan, K.J., Reeve, A.K., Samuels, D.C., Chinnery, P.F., Blackwood, J.K., Taylor, R.W., Wanrooij, S., Spelbrink, J.N., Lightowers, R.N., Turnbull, D.M., 2008. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat. Genet.* 40 (3), 275–279.
- Kukat, C., Wurm, C.A., Spahr, H., Falkenberg, M., Larsson, N.G., Jakobs, S., 2011. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (33), 13534–13539.
- Lacombe, M.L., Tokarska-Schlattner, M., Boissan, M., Schlattner, U., 2018. The mitochondrial nucleoside diphosphate kinase (NDPK-D/NME4), a moonlighting protein for cell homeostasis. *Laboratory investigation. J. Tech. Methods Pathol.* 98 (5), 582–588.
- Lewis, W., Copeland, W.C., Day, B.J., 2001. Mitochondrial DNA depletion, oxidative stress, and mutation: mechanisms of dysfunction from nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Laboratory investigation. J. Tech. Methods and Pathol.* 81 (6), 777–790.
- Lewis, W., Day, B.J., Copeland, W.C., 2003. Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nature reviews. Drug discovery* 2 (10), 812–822.
- Li, M., Rothwell, R., Vermaat, M., Wachsmuth, M., Schroder, R., Laros, J.F., van Oven, M., de Bakker, P.I., Bovenberg, J.A., van Duijn, C.M., van Ommen, G.J., Slagboom, P.E., Swertz, M.A., Wijmenga, C., Genome of Netherlands, Kayser, C., Boomsma, M., Zollner, D.L., de Knijff, S., toneking M, P., 2016. Transmission of human mtDNA heteroplasmy in the Genome of The Netherlands families: support for a variable-size bottleneck. *Genome Res.* 26 (4), 417–426.
- Luo, S., Valencia, C.A., Zhang, J., Lee, N.C., Slone, J., Gui, B., Wang, X., Li, Z., Dell, S., Brown, J., Chen, S.M., Chien, Y.H., Hwu, W.L., Fan, P.C., Wong, L.J., Atwal, P.S., Huang, T., 2018. Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (51), 13039–13044.
- Lutz-Bonengel, S., Parson, W., 2019. No further evidence for paternal leakage of mitochondrial DNA in humans yet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116 (6), 1821–1822.
- Mandel, H., Szargel, R., Labay, V., Elpeleg, O., Saada, A., Shalata, A., Anbinder, Y., Berkowitz, D., Hartman, C., Barak, M., Eriksson, S., Cohen, N., 2001. The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 29 (3), 337–341.
- Medja, F., Allouche, S., Frachon, P., Jardel, C., Maigat, M., Mousson de Camaret, B., Slama, A., Lunardi, J., Mazat, J.P., Lombes, A., 2009. Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 9 (5), 331–339.
- Miller, F.J., Rosenfeldt, F.L., Zhang, C., Linnane, A.W., Nagley, P., 2003. Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Res.* 31 (11), e61.
- Mitochondrial Medicine Society's Committee on Haas, D., Parikh, R.H., Falk, S., Saneto, M.J., Wolf, R.P., Darin, N.I., Wong, N., Cohen, L.J., Naviaux, B.H., RK, 2008. The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Mol. Genet. Metab.* 94 (1), 16–37.
- Montaner, J.S., Cote, H.C., Harris, M., Hogg, R.S., Yip, B., Harrigan, P.R., O'Shaughnessy, M.V., 2004. Nucleoside-related mitochondrial toxicity among HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: insights from the evaluation of venous lactic acid and peripheral blood mitochondrial DNA. *Clin. Infect. Dis. : Off. Publ. Infect. Dis. Soc. America* 2 (38 Suppl. 1), S73–79.
- Montier, Clay, Deng, L.L., Bai, Y., J.J., 2009. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J. Genet. Genom. = Yi chuan xue bao* 36 (3), 125–131.
- Moraes, C.T., 2001. What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells? *TIG (Trends Genet.)* 17 (4), 199–205.
- Moraes, C.T., Shanske, S., Tritschler, H.J., Aprille, J.R., Andreetta, F., Bonilla, E., Schon,

- E.A., DiMauro, S., 1991. mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 48 (3), 492–501.
- Morse, C.G., Voss, J.G., Rakocevic, G., McLaughlin, M., Vinton, C.L., Huber, C., Hu, X., Yang, J., Huang da, W., Logun, C., Danner, R.L., Rangel, Z.G., Munson, P.J., Orenstein, J.M., Rushing, E.J., Lempicki, R.A., Dalakas, M.C., Kovacs, J.A., 2012. HIV infection and antiretroviral therapy have divergent effects on mitochondria in adipose tissue. *J. Infect. Dis.* 205 (12), 1778–1787.
- Morten, K.J., Ashley, N., Wijburg, F., Hadzic, N., Parr, J., Jayawant, S., Adams, S., Bindoff, L., Bakker, H.D., Mieli-Vergani, G., Zeviani, M., Poulton, J., 2007. Liver mtDNA content increases during development: a comparison of methods and the importance of age- and tissue-specific controls for the diagnosis of mtDNA depletion. *Mitochondrion* 7 (6), 386–395.
- Nishigaki, Y., Marti, R., Copeland, W.C., Hirano, M., 2003. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J. Clin. Investig.* 111 (12), 1913–1921.
- Nishino, I., Spinazzola, A., Hirano, M., 1999. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 283 (5402), 689–692.
- Nishino, I., Spinazzola, A., Papadimitriou, A., Hammans, S., Steiner, I., Hahn, C.D., Connolly, A.M., Verloes, A., Guimaraes, J., Maillard, I., Hamano, H., Donati, M.A., Semrad, C.E., Russell, J.A., Andreu, A.L., Hadjigeorgiou, G.M., Vu, T.H., Tadesse, S., Nygaard, T.G., Nonaka, I., Hirano, I., Bonilla, E., Rowland, L.P., DiMauro, S., Hirano, M., 2000. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: an autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations. *Ann. Neurol.* 47 (6), 792–800.
- Niyazov, D.M., Kahler, S.G., Frye, R.E., 2016. Primary mitochondrial disease and secondary mitochondrial dysfunction: importance of distinction for diagnosis and treatment. *Mol. Syndromol.* 7 (3), 122–137.
- Nogueira, C., Almeida, L.S., Nesti, C., Pezzini, I., Videira, A., Vilarinho, L., Santorelli, F.M., 2014. Syndromes associated with mitochondrial DNA depletion. *Ital. J. Pediatr.* 40, 34.
- Nolden, M., Ehses, S., Koppen, M., Bernacchia, A., Rugarli, E.I., Langer, T., 2005. The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell* 123 (2), 277–289.
- Ostergaard, E., 2008. Disorders caused by deficiency of succinate-CoA ligase. *J. Inherit. Metab. Dis.* 31 (2), 226–229.
- Ostergaard, E., Christensen, E., Kristensen, E., Mogensen, B., Duno, M., Shoubridge, E.A., Wibrand, F., 2007a. Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am. J. Hum. Genet.* 81 (2), 383–387.
- Ostergaard, E., Hansen, F.J., Sorensen, N., Duno, M., Vissing, J., Larsen, P.L., Faeroe, O., Thorgrinsson, S., Wibrand, F., Christensen, E., Schwartz, M., 2007b. Mitochondrial encephalomyopathy with elevated methylmalonic acid is caused by SUCLA2 mutations. *Brain. J. Neurol.* 130 (Pt 3), 853–861.
- Pagliarini, D.J., Calvo, S.E., Chang, B., Sheth, S.A., Vafai, S.B., Ong, S.E., Walford, G.A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W.K., Hill, D.E., Vidal, M., Evans, J.G., Thorburn, D.R., Carr, S.A., Mootha, V.K., 2008. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134 (1), 112–123.
- Persson, O., Muthukumar, Y., Basu, S., Jenninger, L., Uhler, J.P., Berglund, A.K., McFarland, R., Taylor, R.W., Gustafsson, C.M., Larsson, E., Falkenberg, M., 2019. Copy-choice recombination during mitochondrial L-strand synthesis causes DNA deletions. *Nat. Commun.* 10 (1), 759.
- Poulton, J., Holt, L.J., 2009. In: 163rd NMC International Workshop: Nucleoid and Nucleotide Biology in Syndromes of Mitochondrial DNA Depletion Myopathy 12–14 December 2008, vol 19. NMD, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular disorders*, pp. 439–443 6.
- Pyle, A., Hudson, G., Wilson, L.J., Coxhead, J., Smertenko, T., Herbert, M., Santibanez-Koref, M., Chinnery, P.F., 2015. Extreme-Depth Re-sequencing of mitochondrial DNA finds No evidence of paternal transmission in humans. *PLoS Genet.* 11 (5), e1005040.
- Ravasz, D., Kacso, G., Fodor, V., Horvath, K., Adam-Vizi, V., Chinopoulos, C., 2018. Reduction of 2-methoxy-1,4-naphthoquinone by mitochondrially-localized Nqo1 yielding NAD(+) supports substrate-level phosphorylation during respiratory inhibition. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics* 1859 (9), 909–924.
- Rebolledo-Jaramillo, B., Su, M.S., Stoler, N., McElhoo, J.A., Dickins, B., Blankenberg, D., Korneliusen, T.S., Chiaromonte, F., Nielsen, R., Holland, M.M., Paul, I.M., Nekrutenko, A., Makova, K.D., 2014. Maternal age effect and severe germ-line bottleneck in the inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (43), 15474–15479.
- Rodenburg, R.J., Schoonderwoerd, G.C., Tiranti, V., Taylor, R.W., Rotig, A., Valente, L., Invernizzi, F., Chretien, D., He, L., Backx, G.P., Janssen, K.J., Chinnery, P.F., Smeets, H.J., de Co, I.F., van den Heuvel, L.P., 2013. A multi-center comparison of diagnostic methods for the biochemical evaluation of suspected mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 13 (1), 36–43.
- Rotig, A., Poulton, J., 2009. Genetic causes of mitochondrial DNA depletion in humans. *Biochim. Biophys. Acta* 1792 (12), 1103–1108.
- Sarzi, E., Bourdon, A., Chretien, D., Zarhrate, M., Corcos, J., Slama, A., Cormier-Daire, V., de Lonlay, P., Munnich, A., Rotig, A., 2007. Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. *J. Pediatr.* 150 (5), e531–536 531–534, 534.
- Schaefer, A.M., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Chinnery, P.F., 2004. The epidemiology of mitochondrial disorders—past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta* 1659 (2–3), 115–120.
- Servidei, S., Zeviani, M., Manfredi, G., Ricci, E., Silvestri, G., Bertini, E., Gellera, C., Di Mauro, S., Di Donato, S., Tonali, P., 1991. Dominantly inherited mitochondrial myopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA: clinical, morphologic, and biochemical studies. *Neurology* 41 (7), 1053–1059.
- Shoffner, J.M., Lott, M.T., Voljavec, A.S., Soueidan, S.A., Costigan, D.A., Wallace, D.C., 1989. Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (20), 7952–7956.
- Song, S., Wheeler, L.J., Mathews, C.K., 2003. Deoxyribonucleotide pool imbalance stimulates deletions in HeLa cell mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* 278 (45), 43893–43896.
- Spelbrink, J.N., 2010. Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges. *IUBMB Life* 62 (1), 19–32.
- Spinazzola, A., Invernizzi, F., Carrara, F., Lamantea, E., Donati, A., Dirocco, M., Giordano, I., Meznaric-Petrusa, M., Baruffini, E., Ferrero, I., Zeviani, M., 2009. Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes. *J. Inherit. Metab. Dis.* 32 (2), 143–158.
- Sue, C.M., Quigley, A., Katsabanis, S., Kapsa, R., Crimmins, D.S., Byrne, E., Morris, J.G., 1998. Detection of MELAS A3243G point mutation in muscle, blood and hair follicles. *J. Neurol. Sci.* 161 (1), 36–39.
- Suomalainen, A., 2011. Biomarkers for mitochondrial respiratory chain disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* 34 (2), 277–282.
- Suomalainen, A., Battersby, B.J., 2018. Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nature reviews. Mol. Cell Biol.* 19 (2), 77–92.
- Suomalainen, A., Isohanni, P., 2010. Mitochondrial DNA depletion syndromes—many genes, common mechanisms. *Neuromuscul. Disord.* 20 (7), 429–437.
- Suomalainen, A., Elo, J.M., Pietilainen, K.H., Hakonen, A.H., Sevastianova, K., Korpela, M., Isohanni, P., Marjavaara, S.K., Tyni, T., Kiuru-Enari, S., Pihko, H., Darin, N., Onap, K., Kluijtmans, L.A., Paetau, A., Buzkova, J., Bindoff, L.A., Annunen-Rasila, J., Uusimaa, J., Rissanen, A., Yki-Jarvinen, H., Hirano, M., Tulinius, M., Smeitink, J., Tyynismaa, H., 2011. FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *The Lancet. Neurology* 10 (9), 806–818.
- Tretter, L., Patocs, A., Chinopoulos, C., 2016. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1857 (8), 1086–1101.
- Tucker, E.J., Compton, A.G., Calvo, S.E., Thorburn, D.R., 2011. The molecular basis of human complex I deficiency. *IUBMB Life* 63 (9), 669–677.
- Tzoulis, C., Tran, G.T., Coxhead, J., Bertelsen, B., Lilleng, P.K., Balafkan, N., Payne, B., Miletic, H., Chinnery, P.F., Bindoff, L.A., 2014. Molecular pathogenesis of polymerase gamma-related neurodegeneration. *Ann. Neurol.* 76 (1), 66–81.
- Viscomi, C., Zeviani, M., 2017. mtDNA-maintenance defects: syndromes and genes. *J. Inherit. Metab. Dis.* 40 (4), 587–599.
- Viscomi, C., Spinazzola, A., Maggioni, M., Fernandez-Vizarra, E., Massa, V., Pagano, C., Vettor, R., Mora, M., Zeviani, M., 2009. Early-onset liver mtDNA depletion and late-onset proteinuric nephropathy in Mpv17 knockout mice. *Hum. Mol. Genet.* 18 (1), 12–26.
- Walker, U.A., Collins, S., Byrne, E., 1996. Respiratory chain encephalomyopathies: a diagnostic classification. *Eur. Neurol.* 36 (5), 260–267.
- Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas 2nd, L.J., Nikoskelainen, E.K., 1988. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242 (4884), 1427–1430.
- Willemsen, M.A., Harting, I., Wevers, R.A., 2016. Neurometabolic disorders: five new things. *Neurol. Clin. Pract.* 6 (4), 348–357.
- Yatsuga, S., Fujita, Y., Ishii, A., Fukumoto, Y., Arahata, H., Kakuma, T., Kojima, T., Ito, M., Tanaka, M., Saiki, R., Koga, Y., 2015. Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. *Ann. Neurol.* 78 (5), 814–823.
- Ylikallio, E., Suomalainen, A., 2012. Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann. Med.* 44 (1), 41–59.
- Ylikallio, E., Tyynismaa, H., Tsutsui, H., Ide, T., Suomalainen, A., 2010. High mitochondrial DNA copy number has detrimental effects in mice. *Hum. Mol. Genet.* 19 (13), 2695–2705.
- Young, M.J., 2017. Off-target effects of drugs that disrupt human mitochondrial DNA maintenance. *Front. Mol. Biosci.* 4, 74.
- Zhang, H., Burr, S.P., Chinnery, P.F., 2018. The mitochondrial DNA genetic bottleneck: inheritance and beyond. *Essays Biochem.* 62 (3), 225–234.

Kutatásetikai engedély-kérelem

„Kinon-vegyületek hatásának vizsgálata Leber-féle öröklődő látóideg sorvadással gondozott betegekből származó mitokondriumokon”

címmel végzett vizsgálatához

Kutatásvezetők:

Dr. Christos Chinopoulos PhD

Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet

Tűzoltó utca 37-47., Budapest, 1094

Email: chinopoulos.christos@med.semmelweis-univ.hu

tel.: +36 20 666 0024

Prof. Dr. Nagy Zoltán Zsolt PhD, DSc

Semmelweis Egyetem, Szemészeti Klinika

Mária u. 39., Budapest, 1085

Email: nagy.zoltan_zsolt@med.semmelweis-univ.hu

tel.: +36 20 825 8468

Befogadó intézetek: Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémiai Intézet
Semmelweis Egyetem Szemészeti Klinika

Résztevők: Dr. Vajda Szilvia PhD, szemész szakorvos

Dr. Knézy Krisztina, szemész szakorvos

Dóczi Judit PhD

Kutatási téma felelőse: Dr. Christos Chinopoulos PhD (SE, Orvosi Biokémiai Intézet)

Dr. Christos Chinopoulos PhD.
Semmelweis Egyetem ÁOK
Orvosi Biokémiai Intézet
1094 Budapest
Tűzoltó utca 37-47.
Tel: +36-20-666-0024
email: chinopoulos.christos@med.semmelweis-univ.hu

Semmelweis Egyetem, Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
1091 Budapest, Üllői út 93. fsz. 2.
Elnök: Prof. Sótonyi Péter

Tisztelt Elnök Úr!

A Leber-féle öröklődő látóideg sorvadás (LHON, Leber's Hereditary Optic Neuropathy) egy rapidan progrediáló kétoldali látásvesztéssel járó öröklődő betegség, melyet a retinális ganglionsejtek pusztulása miatti látóideg-atrófia okoz. Háttérében a mitokondriális DNS-t érintő pontmutáció áll, mely miatt a légzési lánc I-es komplexe gátolt.

Az oxidatív foszforiláció gátlása miatt kiemelt jelentősége van azoknak az alternatív energiatermelő folyamatoknak, amelyek nagy energiájú foszfátokat termelnek a mitokondrium mátrixában, ezzel védve a sejtet az ATP kimerüléssel szemben.

Az Orvosi Biokémiai Intézet neurobiokémiai munkacsoportjában az elmúlt években zajlott intenzív kutatómunka középpontjában ezeknek az alternatív energiatermelő útvonalaknak a feltérképezése áll, különös tekintettel azokra a vegyületekre, melyekkel ezek a folyamatok erősíthetők a sejtek túlélésének érdekében. Ezek közül a kinon-származékok az egyik ígéretes vegyületcsoport, melynek tagjai bizonyos kórképekben jelenleg is a terápia részét jelentik.

A LHON jelenleg egyetlen elfogadott terápiáját az idebenon jelenti. Az idebenon egy rövid láncú kinon-vegyület, ami a károsodott légzési komplex megkerülésével segíti az oxidatív foszforilációt, illetve az alternatív energiatermelő folyamatokat. Az Orvosi Biokémiai Intézetben kidolgozott állatkísérletes modellekben több kinon-vegyület hatását is vizsgálták a mitokondriális anyagcsere folyamatokra, eredményeik alapján nem az idebenon a leghatékonyabb vegyület a csoportban.

Ezek alapján felmerül, hogy LHON páciensekből származó mitokondriumokon is megvizsgáljuk a fenti eredményeket. Ehhez géndiagnosztikával igazolt, a SE Szemklinika neuro-ophthalmológiai szakrendelése által gondozott LHON páciensekből punch-bőrbíopszia útján vennénk mintát a Szemészeti Klinikán. A minták az Orvosi Biokémia Intézetben kerülnek feldolgozásra.

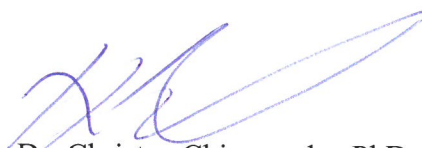
A résztvevőkkel előre ismertetjük a mintavétel menetét és célját, valamint a tájékoztatás után beleegyező nyilatkozatot írnak alá. Beleegyezésüket kérjük a mintavételhez és az adataik tudományos felhasználásához. A vizsgálatban való részvétel önkéntes. Amennyiben a

mintavétel során kóros reakciót tapasztalunk, az eljárás felfüggesztése mellett azonnal a hivatalos szakmai protokolloknak megfelelő kezelést alkalmazunk.

A fentiek alapján kérem Elnök Úr szíves engedélyét, hogy az LHON páciensekből származó mitokondriumokon végzett vizsgálatok elvégzéséhez hozzájáruljon az alábbiakban részletezett protokoll alapján.

2020. március

Tisztelettel:



Dr. Christos Chinopoulos PhD.

Kutatásvezető

Tartalom:

Összefoglaló kísérő levél

Előzetes áttekintő

Vizsgálati protokoll

Betegtájékoztató

Helsinki deklaráció elveinek betartására vonatkozó nyilatkozat

Nyilatkozat a vizsgálat során gyűjtött adatokról

Beleegyező nyilatkozat

Vizitlap

Befogadó nyilatkozat

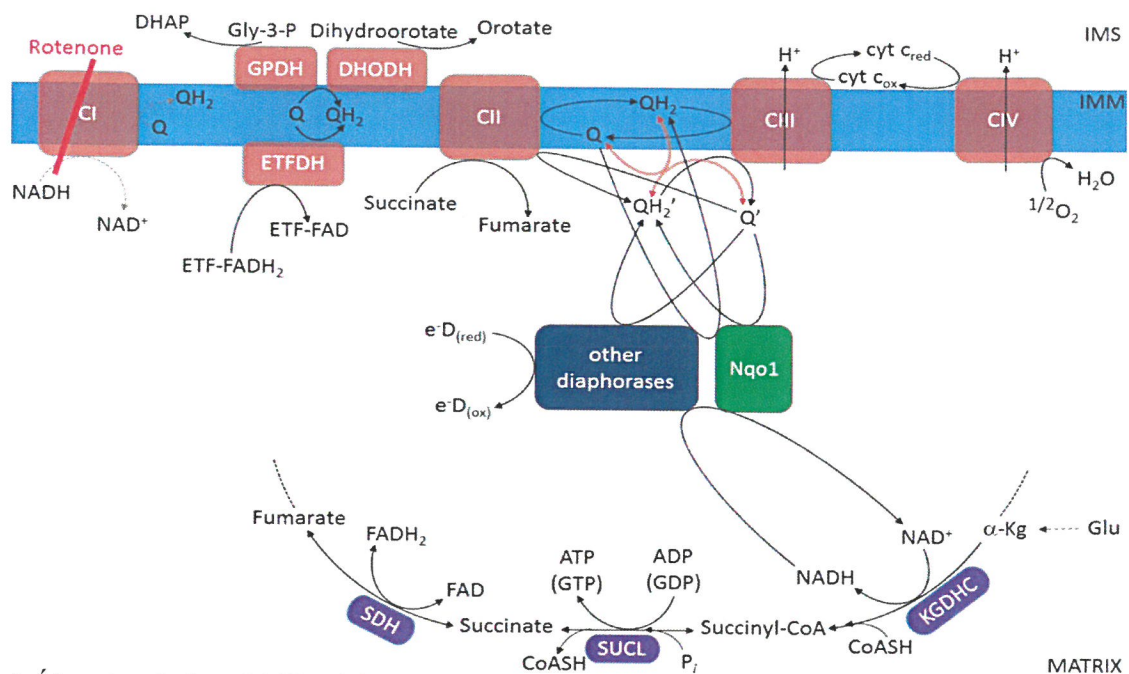
„Kinon-vegyületek hatásának vizsgálata Leber-féle öröklődő látóideg sorvadással gondozott betegekből származó mitokondriumokon”

Előzetes áttekintő:

A Leber-féle öröklődő látóideg sorvadás (Leber's hereditary optic neuropathy, LHON) egy rapidan progrediáló kétoldali látásvesztéssel járó öröklődő betegség, melyet a retinális ganglionsejtek pusztulása miatti látóideg-atrófia okoz. Az anyai ágon öröklődő betegség hátterében a mitokondriális genomban bekövetkezett pontmutáció áll, mely a mitokondriális légzési lánc I-es komplexét érinti. A 3 leggyakoribb mutáció a G11778A, T14484C és G3460A [1]. Az I-es komplex defektusa következtében a sejt ATP termelése lecsökken, mely a sejt pusztulásához vezet [2]. Az ATP termelés csökkenése kulcsfontosságú a mitokondriális betegségek patogenezisében, de nem magyarázza azt teljesen. Az elektrontranszporthoz NADH oxidációja is kapcsolódik. Légzési lánc gátlás esetén redukzív ekvivalensek szaporodnak fel. A NADH/NAD⁺ arány emelkedésével leállnak a NAD⁺-függő folyamatok (többek között a glikolízis, tovább csökkentve a termelődő ATP mennyiségét) és reaktív szabadgyökök szabadulnak fel [3]. A csökkent ATP termelés és a „redukatív stressz” tehát együttesen vezetnek a sejt pusztulásához.

Az utóbbi évek intenzív mitokondriális anyagcsere kutatásai világítottak rá az alternatív energiatermelő folyamatok különleges szerepére azokban a kórfolyamatokban, amikor az oxidatív foszforiláció gátolt. Az Orvosi Biokémiai Intézet neurobiokémiai munkacsoportja (OBI) egy 2010-től datálódó publikáció sorozatban mérte fel a mitokondriális szubsztrát szintű foszforiláció (SzSzF) jelentőségét. Az SzSzF-ban részt vevő enzimek: a szukcinil-KoA ligáz, az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz enzimkomplex, a diaforáz enzimek, a komplex III és a citokróm c. Ezek az enzimek nagyenergiájú foszfátokat termelnek a mitokondriális mátrixban oxidatív foszforiláció hiányában (1. Ábra).

A légzési lánc gátlása esetén az ATPszintáz enzim a SzSzF által termelt ATP-t hidrolizálva („reverse” mód) protonokat pumpál ki a mitokondriális membránok közötti térbe és ezzel képes fenntartani a membránpotenciált egy köztes értéken, hogy az adenin-nukleotid transzlokátor (ANT) továbbra is a citoplazma felé továbbítsa az ATP-t („forward” mód). Ez a mechanizmus védelmet nyújt a citoszolikus/nukleáris ATP kimerüléssel szemben olyan helyzetekben, amikor az elektron transzport lánc működésképtelen [4] [5] [6].



1.Ábra A mitokondriális elektrontranszport lánc (az I-es komplex farmakológiailag gátolt rotenonnal) és a szusztrát szintű foszforiláció enzimei és kapcsolataik

Q és OH₂: lipofil kinon és hidrokinon. Q' és QH'₂: hidrofil kinon és hidrokinon. e⁻D_(red) és e⁻D_(ox): elektron donor redukált vagy oxidált formában. α-Kg: alfa-ketoglutarát; DHAP: dihidroxiaceton-foszfát; DHODH: dihidroorotát-dehidrogenáz; ETFDH: elektron-transzferáló-flavoprotein dehidrogenáz; Gly-3-P: glicerol-3-foszfát; GPDH: glicerol-3-foszfát dehidrogenáz; IMM: mitokondrium belső membrán; IMS: intermembrán tér; Glu: glutamát; KGDHC: α-ketoglutarát dehidrogenáz; SDH: szukcinát-dehidrogenáz; SUCL: szukcinil-KoA-ligáz

A SzSZF működése kvalitatív módon detektálható (SzSZF vagy van, vagy nincs, nincs szükségszerűen kvantifikálható paraméter), standard laboratóriumi eszközpark mellett tesztelhető bőr eredetű fibroblasztokon.

Hogy az ANT “forward módban” működik, vagyis a mitokondrium mátrixból a citoplazma felé továbbítja az ATP-t, egyszerűen igazolható permeabilizált sejteken, a nagy specificitású ANT-gátló szer, a karboxiatraktilozid segítségével. Amennyiben az I-es komplex gátolt, akár farmakológiailag (rotenonnal), akár pl. genetikai mutáció révén (lásd LHON), csak SzSZF tud történni megfelelő szusztrátok jelenlétében [5]. Az ANT-n keresztül zajló ATP-ADP cseré elektrogén folyamat, miután egy molekula ATP⁴⁻ cseréje történik egy molekula ADP³⁻-re [7]. Amennyiben az ANT “forward módban” működik, karboxiatraktiloziddal történő működésgátlás pozitív irányú membránpotenciál változást fog eredményezni. Ha az ANT “reverse módban” működik, működésének gátlása mebránpotenciál csökkenést okoz. Gátolt I-es komplex mellett a SzSZF mérése a kompenzáció mértékét jelzi (a maradék mitokondriális funkciót), ami működésképtelen elektrontranszport lánc esetén elérhető. A légzési láncról nem kapunk információt, csak az *in situ* mitokondriumok azon képességéről, hogy glutamin-eredetű metabolitokból

nyerjenek energiát, ha a légzési lánc gátolt, mint például LHON-ben. Megfelelő kinonmolekulák támogathatják a glutaminolízist, ezzel az alfa-ketoglutarát complex számára NAD^+ -ot szolgáltatva.

A LHON jelenlegi gyógyszeres terápiáját az idebenon jelenti, egy kinon-származék, ami a károsodott légzési komplex megkerülése révén segíti az oxidatív foszforilációt.

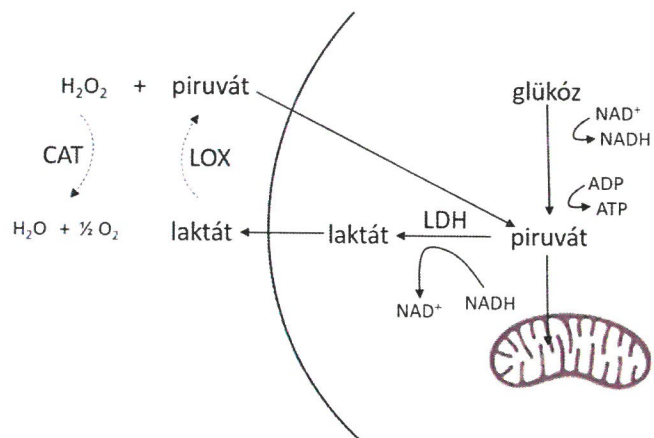
Az OBI-ban kidogozott állatkísérletes modellekben az I-es komplex gátlása mellett különböző kinon-származékokat teszteltek, többek között az idebenont és a 2-metoxi-1,4-naftokinont (MNQ). Az MNQ amellett, hogy a komplex I-et megkerülve hatékonyan képes elektronokat átadni a mitokondriális légzési láncnak, az NQO-diaforáz enzim szubsztrátjaként a SzSzF-t is támogatja [8]. Mindezekkel együtt az MNQ az idebenonnál hatékonyabb kinon-vegyületnek bizonyult az ATP termelő folyamatok fenntartásában gátolt légzési lánc esetén állatkísérletekben [9].

A fenti eredmények tükrében felmerül, hogy LHON páciensek esetében- ahol szintén a légzési lánc I-es komplex genetikai defektusa áll fenn- összehasonlítsuk a különböző kinon-származékok hatásosságát. E célból a Szemészeti Klinika neuro-ophthalmológiai szakrendelése által gondozott, genetikai vizsgálattal igazolt LHON páciensekből punch-bőrbopszia útján vett mintákból tenyésztett fibroblasztokon kívánjuk vizsgálni a különböző kinon-származékok hatását a mitokondriális ATP teremelésre.

Az intracelluláris NADH/NAD^+ aránnyal párhuzamosan változik az extracelluláris laktát és piruvát mennyisége (2. Ábra) [3]. Ezért a mitochondriális légzési láncot érintő betegségekben gyakran mérhető emelkedett laktát/piruvát arány. Ez egyfelől fontos kiegészítő információ a diagnózis felállításához, másrészt terápiás jelentősége is lehet, amennyiben az arány csökkentése az intracelluláris NADH szint csökkenéséhez vezet.

A NADH szint mérhető csökkenését okozó piruvát vérszint elérése piruvát bevitellel gyakorlatilag lehetetlen. Tisztított bakteriális laktát-oxidáz és kataláz enzimek fúziója *in vivo* állatkísérletes modellben sikeresen normalizálta az intracelluláris NADH/NAD^+ arányt és enyhítette a redukív stresszt [10].

LHON betegekben a laktát/piruvát arányról kevés adat áll rendelkezésre, ezért vizsgálatunk keretein belül ezen betegek szérum laktát és piruvát szintjét is ellenőriznénk.



2.Ábra. A extracelluláris laktát-oxidáz és kataláz enzimek hatása az intracelluláris NADH/NAD⁺ arányra (Patgiri és mtsai alapján, lásd[10]).

LOX: laktát-oxidáz; CAT: kataláz; LDH: laktát-dehidrogenáz

Irodalom

- [1] P. Riordan-eva, M. D. Sanders, G. G. Govan, M. G. Sweeney, J. D. Costa és A. E. Harding, „The clinical features of leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation,” *Brain*, 1995 Apr;118 (Pt 2):319-37.
- [2] A. Ghelli, M. Degli Esposti, V. Carelli és G. Lenaz, „Changes in mitochondrial complex I activity and coenzyme Q binding site in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON),” in *Molecular Aspects of Medicine*, 1997;18 Suppl:S263-7.
- [3] Titov DV, Cracan V, Goodman RP, Peng J, Grabarek Z, Mootha VK. „Complementation of mitochondrial electron transport chain by manipulation of the NAD⁺/NADH ratio.,” *Science*. 2016 Apr 8;352(6282):231-5.
- [4] Chinopoulos C, , Doczi J, Turiak L, Kiss G, Konrad C, Vajda S és Vereczki V, Oh RJ, Adam-Vizi V, „Forward operation of adenine nucleotide translocase during F0F1-ATPase reversal: critical role of matrix substrate-level phosphorylation.,” *FASEB J*, pp. 2010 Jul;24(7):2405-16.
- [5] G. Kiss, C. Konrad, J. Doczi, A. A. Starkov, H. Kawamata, G. Manfredi, S. F. Zhang, G. E. Gibson, M. F. Beal, V. Adam-Vizi és C. Chinopoulos, „The negative impact of α -ketoglutarate dehydrogenase complex deficiency on matrix substrate-level phosphorylation,” *FASEB Journal*, 2013 27(6):2392-2406.
- [6] G. Kiss, C. Konrad, I. Pour-Ghaz, J. J. Mansour, B. Németh, A. A. Starkov, V. Adam-Vizi és C. Chinopoulos, „Mitochondrial diaphorases as NAD⁺ donors to segments of the citric acid cycle that support substrate-level phosphorylation yielding ATP during respiratory inhibition,” *FASEB Journal*, 2014 Apr;28(4):1682-97.
- [7] M. Klingenberg, *The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier*, *Biochim Biophys Acta*. 2008 Oct;1778(10):1978-2021.
- [8] S. B. Vafai, E. Mevers, K. W. Higgins, Y. Fomina, J. Zhang, A. Mandinova, D. Newman, S. Y. Shaw, J. Clardy és V. K. Mootha, „Natural product screening reveals naphthoquinone complex i bypass factors,” *PLoS ONE*, 2016 Sep 13;11(9):e0162686
- [9] D. Ravasz, G. Kacso, V. Fodor, K. Horvath, V. Adam-Vizi és C. Chinopoulos, „Reduction of 2-methoxy-1,4-napthoquinone by mitochondrially-localized Nqo1 yielding NAD⁺ supports substrate-level phosphorylation during respiratory inhibition,” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 2018 Sep;1859(9):909-924.
- [10] Patgiri A, Skinner OS, Miyazaki Y, Schleifer G, Marutani E, Shah H, Sharma R, Goodman RP, To TL, Robert Bao X, Ichinose F, Zapol WM, Mootha VK. „An engineered enzyme that targets circulating lactate to alleviate intracellular NADH:NAD⁺ imbalance. *Nat Biotechnol*. 2020 Jan 13. doi: 10.1038/s41587-019-0377-7.”.

Vizsgálati protokoll

A résztvevők toborzásának, beválasztásának, kizárásának rendszere

Bevonási kritériumok:

- Típusos klinikai kép (fiatal felnőtteket érintő hirtelen jelentkező, gyorsan progrediáló látásromlás, centrális látótér kiesés), melynek háttérében a három leggyakoribb LHON mutáció egyikét genetikai vizsgálattal sikerült igazolni
Minden beteg részére - függetlenül a vizsgálatban való részvételtől - egyedi méltányossági kérelem útján idebenon hatóanyag tartalmú készítményt igénylünk a Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelőn keresztül.
- LHON betegek anyai ágú hozzátartozói, igazolt LHON mutációval
- A tervezett kontroll vizsgálatokat a Szemklinika és az Orvosi Biokémiai Intézet dolgozói és azok ismeretségi köréből választjuk ki.

Kizárási kritériumok:

- Genetikai vizsgálattal nem igazolt látásromlás
- Ismert gyógyszerérzékenység az érzéstelenítővel szemben
- Várandósság

Mintavétel (punch biopszia, vérvétel)

Az eljárás során a beteggel megbeszélte a bőrtérületet fertőtlenítjük, majd Lidokainos subcutan infiltráció alkalmazásával érzéstelenítjük. Az előkészített bőrtérületről 6 mm átmérőjű, kör alakú, éles szélű "bőrlyukasztó" eszközzel a szövetmintát eltávolítjuk. A keletkezett sebet steril kötszerrel fedjük. A keletkezett seb várható gyógyulási ideje 5 nap. Varrat a legtöbb esetben nem szükséges. Ha a szakorvos megítélése szerint a seb zárása varrattal szükséges, a mintavétel utáni 7. napon varratszedést végzünk.

Vérvétel és a vérminták szállítása:

A laktát/piruvat arány meghatározása vénás vérből történik. A könyökhajlati felületen vénából a bőr fertőtlenítését követően géles csőbe 2 mL vénás vért veszünk. A vénás vért tartalmazó géles csöveket a SE Szemklinika dolgozója szállítja jégen a SE I.Sz. Gyermekgyógyászati Klinika Anyagcsere Szűrő és Diagnosztikai Központjának laboratóriumába, ahol a szérum laktát/piruvat arány meghatározást végzik.

A kedvezőtlen események és a súlyos nemkívánatos események lehetősége, a bekövetkezésük esetén követendő eljárások

A bőrbopsziás mintavétel során szövődmények előfordulásának esélye csekély. A vizsgálat folyamán vett biológiai minták gyűjtése kismértékű helyi fájdalommal jár. Vérzés, duzzanat, a seb elfertőződése előfordulhat. A punch biopszia helyén kis heg marad. Súlyosabb szövődmény a helyi érzéstelenítéssel kapcsolatban jelentkezhet. A lokális érzéstelenítés szövődménye lehet allergiás reakció, vérnyomás esés, súlyos esetben keringés és/vagy légzésleállás.

A vénás vérvétel szövödménye vérömleny, ritkán a véna gyulladása lehet. Az összes nem kívánatos mellékhatást feljegyezzük a vizsgálat alatt és a szakmai protokolloknak megfelelően ellátjuk.

Szövetminták feldolgozása

A minták szállítása:

A mintákat a Szemkliniká dolgozója szállítja Orvosi Biokémiai Intézetbe. A minták a szállítás alatt 4-6 °C-on vannak.

A minták feldolgozása, fibroblaszt tenyésztés létrehozása:

A bőrmintákat kollagenáz enzimmel kezeljük, majd 70 µm-es szűrőre tesszük. A szűrőn áthaladó sejteket 2-3 napra poly-L-ornitinnel bevont 8-lyukú LabTek II sejttenyésztő kamrába helyezük (Nunc, Rochester, NY, USA) körülbelül $3 \cdot 10^5$ sejtsűrűségben. A tenyésztő médium RPMI1640 (GIBCO, Life technologies, Carlsbad, CA, USA), 10% magzati borjú savóval (fetal bovine serum) és 2 mM glutaminnal kiegészítve. A sejteket 37 °C-on 5%-os CO₂ tartalom mellett tároljuk.

A mitokondriális szubsztrát szintű foszforiláció meghatározásának menete:

A mérésekhez 80% konfluenciájú fibroblaszt tenyésztés szükséges. A teszt nem kvantitatív, ezért nincs szükség az eredmények fehérjetartalomra történő normalizálására. A kísérlet napján két puffer oldatot kell készíteni: 500 ml jéghideg "A" puffert, (összetétel: 110 mM K-glukonát, 10 mM HEPES, 10 mM KH₂PO₄, 10 mM mannitol, 10 mM NaCl, 8 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01 mM EGTA, 0.5 mg/ml BSA (esszenciális zsírsav mentes), pH 7.25-re állítva KOH-dal), és 5 ml "B" puffert, amely az "A" puffer összetevőin felül még a következőket tartalmazza: 5 µM safranin O, 5 mM glutamát, 5 mM malát, 5 mM α-ketoglutarát és 175 µl 2.5 mM-os digitonin (tisztaság > 90%, DMSO-ban oldva). A "B" puffert 37 fokon kell tartani. A tápoldat eltávolítását követően a sejttenyésztetet átmoszuk jéghideg "A" pufferrel, majd összegyűjtjük a sejteket "A" pufferben. 3500 rpm-en 2,5 percig centrifugálva üleptjük a sejteket (50 mL-es csőben, legalább 40 mL pufferrel, a tápoldat kalcium tartalmának hígítása érdekében). "A" pufferrel történő egyszeri átmosást követően a centrifugálást megismételjük. Az így kapott üledéket 0,7 mL "B" pufferben szuszpendáljuk. A Safranin O fluoreszcenciát leolvasással rögzítjük (495ex/585em). A 0,7 mL üledéket három részre osztjuk (háromszori ismételt méréshez), majd egy 96-lyukú fehér plate külön lyukaiba adagoljuk és a leolvasóba helyezzük. Fontos, hogy a leolvasó belseje 37 °C hőmérsékletű legyen, és elengedhetetlen a plate automatikus rázatása. Adatrögzítés 10-15 másodpercenként történik. 5 percet várunk, ennyi idő szükséges, hogy a digitonin permeabilizálja a sejtmembránt és az *in situ* mitokondriumok polarizálódjanak. 3 percig rögzítjük az alapvonalat, majd 2mM ADP-t adunk. 3 perc rögzítést követően 5 µM rotenont adunk. Következő 3 perces rögzítést követően 1 µM karboxiatraktilozidot

adunk. A következő 3 perces rögzítés végén a szétkapcsolószer, 250nM SF6847 következik. Minden hozzáadott vegyület térfogata 1 és 2 μ l között legyen. A fluoreszcencia görbék százalékos konvertálását követően összehasonlítjuk a három kontrollt a beteg eredményekkel. Ha a karboxiatraktilozid hiperpolarizál a kontrollokban, de depolarizál a betegben, az azt jelenti, hogy a beteg mitokondriumban nem működik a SzSzF. Így a beteg fibroblasztok nem juthatnak ATP-hez a glutaminolízis és a SZSZF útján, vagyis az ő mitokondriumaik nem képesek kompenzálni a működésképtelen elektrontranszport lánc kiesését. A SzSzF elégtelensége a diaforáz enzimek működéséhez szükséges szubsztrátok (mint az MNQ) jelenlétével enyhíthető.

Legjobb, ha a betegből származó fibroblasztokat legalább három egészséges kontrollal tudjuk összehasonlítani. Nem szükségszerű, de célunk kor-és nem szerint identikus kontrollt választani.

Betegtájékoztató

„Kinon-vegyületek hatásának vizsgálata Leber-féle öröklődő látóideg sorvadással gondozott betegekből származó mitokondriumokon”

Arra kérjük Önt, vegyen részt egy klinikai vizsgálatban. Mielőtt döntene részvételéről, fontos, hogy megértse, mi a vizsgálat célja, milyen velejárói vannak, hogyan használják fel az Öntől származó adatokat, melyek a lehetséges előnyök, kockázatok és kellemetlenségek. Kérjük, olvassa el figyelmesen az alábbi tájékoztatót.

MI A VIZSGÁLAT HÁTTERE ÉS CÉLJA?

Önnél kezelőorvosa Leber-féle látóideg sorvadás nevű betegséget állapított meg. A betegség hátterében egy öröklődő genetikai hiba áll, melynek következtében a sejtek energiatermelő alkotórészeiben, a mitokondriumokban a fő energiatermelő útvonal gátolt. Az energiadeficit következtében a látóhártya ganglionsejtjei elpusztulnak, ami súlyos fokú látáscsökkenéshez vezet. A Leber-féle betegség eddig egyetlen ismert és elfogadott gyógyszeres kezelését az idebenon nevű hatóanyag jelenti, melynek szedését kezelőorvosa Önnek is javasolta. Az idebenon szerepe a betegségben, hogy a blokkolt fő energiatermelő útvonal helyett alternatív energiatermelő utakat segítsen, ezzel segítve az ideghártya sejtjeinek túlélését, ami a meglévő látás megőrzésének záloga. Vizsgálatunk célja az Ön szervezetéből származó, a Leber-féle betegséget okozó génmutációt hordozó sejtek vizsgálata. Az idebenon vegyületéhez hasonló anyagok hatását kívánjuk vizsgálni a mitokondriális energiatermelés támogatására, azzal a szándékkal, hogy az idebenonnál hatékonyabb vegyületet azonosítsunk.

KÖTELEZŐ-E A RÉSZVÉTEL?

Az Ön döntésén múlik, hogy részt vesz-e. Ha nem kíván részt venni a klinikai vizsgálatban, az semmiféle hátrányt nem jelent Önnek, és továbbra is jogosult marad az Önt megillető gyógyszeres és orvosi kezelésre. Ha úgy határoz, hogy részt vesz a vizsgálatban, alá kell írnia ezt a Betegtájékoztatót és a mellékelt 'Írásos beleegyezési nyilatkozatot' is. Ha a részvétel mellett dönt, a későbbiekben a beleegyezését szóban vagy írásban indoklás nélkül bármikor visszavonhatja. Ez nem befolyásolhatja további egészségügyi ellátásának színvonalát.

MI TÖRTÉNIK, HA RÉSZT VESZ A VIZSGÁLATBAN?

Amennyiben vállalja, hogy vizsgálatunkban részt vesz, egy szemész szakorvos bőrbioopsziás mintát vesz az alkarjából, melyet az Orvosi Biokémiai Intézetbe szállítunk további feldolgozás céljából. Ezen kívül vérvétel történik könyökvénából laboratóriumi vizsgálat céljából.

MELYEK A VIZSGÁLATTAL KAPCSOLATOS LEHETSÉGES MELLÉKHATÁSOK, KOCKÁZATOK ÉS KELLEMETLENSÉGEK?

A bőrbioopsziás mintavétel során helyi érzéstelenítést követően kisméretű (6 mm átmérőjű) bőrdarabot távolítunk el az előzetesen fertőtlenített területről.

A beavatkozással összefüggésben fellépő panaszok lehetnek: a beavatkozás helyén fájdalom, vörösség, duzzanat, kislökű vérzés, hegképződés, seb elfertőződése.

Súlyosabb szövödmény a helyi érzéstelenítéssel kapcsolatban jelentkezhet. A lokális érzéstelenítés szövödménye lehet allergiás reakció, vérnyomás esés, súlyos esetben keringés és/vagy légzésleállás. Ezért kérjük, ismert gyógyszerérzékenységeit minden esetben jelezze kezelőorvosának!

Vérvétel során a könyökhajlati vénákból a bőr fertőtlenítését követően 1 vérvételi csőbe veszünk vér. Ennek szövödménye vérzés, vérömleny, ritkán a véna gyulladása lehet.

MELYEK A RÉSZVÉTELBŐL SZÁRMAZÓ LEHETSÉGES ELŐNYÖK?

A kutatásban való részvétel fontos társadalmi hatása, hogy előmozdítsuk a Leber-féle betegség kezelésének hatékonyságát.

JELENT-E A RÉSZVÉTEL PLUSZ KÖLTSÉGET?

A kutatásban való részvétel Önnek plusz költséggel nem jár.

A vizsgálattal kapcsolatban költségtérítést nem áll módunkban adni.

HOGYAN KEZELIK SZEMÉLYES ADATAIMAT?

Az 'Írásos beleegyező nyilatkozat' című nyilatkozat aláírásával Ön hozzájárul, hogy kezelőorvosa, valamint a vizsgálatban résztvevő személyek az Ön személyes adatait a vizsgálat adminisztrációjához, lebonyolításához, tudományos- és statisztikai elemzéshez kezelje és felhasználja a személyes adatok védelmére vonatkozó jogszabályi rendelkezéseknek megfelelően.

Részvételét köszönjük!

Tájékoztatást végző orvos aláírása

A beteg aláírása

Dátum



SEMMELWEIS UNIVERSITY

Faculty of Medicine

Department of Medical Biochemistry

Director: Professor László Csanády, MD, PhD, DSc

Nyilatkozat

Az emberen végzett orvostudományi kutatások tekintetében a 23/2002. (V.9) EüM rendeletre figyelemmel nyilatkozom, hogy a kutatási terv összeállítása a hatályos jogszabályokban és az Orvosok Világszövetsége Helsinkai Deklarációjában foglaltaknak megfelelően történt. A kutatást a nyilatkozat szellemében fogom végezni.

Budapest, 2020. március 04




Dr. Christos Chinopoulos PhD.
vizsgálatvezető





SEMMEWEIS UNIVERSITY

Faculty of Medicine

Department of Medical Biochemistry


Director: Professor László Csanády, MD, PhD, DSc

Nyilatkozat a vizsgálat során gyűjtött adatokról

A vizsgálatban résztvevő alanyok személyes adatait az információs önrendelkezési jogról és az információszabadságról szóló 2011. évi CXII. törvény, valamint az egészségügyi és a hozzájuk kapcsolódó személyes adatok kezeléséről és védelméről (kiemelten a II. fejezet 21. §. tudományos kutatás céljából történő adatkezelésre) szóló 1997. évi XLVII. törvény rendelkezéseinek megfelelően kezeljük.

2020. március 04




Dr. Christos Chinopoulos PhD.
vizsgálatvezető

Beleegyző nyilatkozat

„Kinon-vegyületek hatásának vizsgálata Leber-féle öröklődő látóideg sorvadással gondozott betegekből származó mitokondriumokon”

Alulírott részt kívánok venni a fenti vizsgálatban. Hozzájárulok, hogy szöveti mintámat és adataimat csak és kizárólag kutatási céllal felhasználják. A vizsgálat megkezdése előtt elolvastam a mellékelt tájékoztatót és tudatták velem a kutatás célját és menetét, felmerülő kérdéseimet megválaszolták. A beleegyezés önkéntes és befolyásolástól mentes. Tudatában vagyok, hogy bármikor, akár szóban, akár írásban indoklás nélkül a beleegyezésemet visszavonhatom, anélkül, hogy ebből hátrányom származna.

Résztvevő neve: _____

Anyja neve: _____

Születési dátum: _____

Lakcím: _____

Aláírás: _____

Vizsgálatot végző személy aláírása: _____

Budapest, 20.....

**„Kinon-vegyületek hatásának vizsgálata Leber-féle öröklődő látóideg sorvadással gondozott betegekből származó mitokondriumokon”
VIZIT ADATLAP**

Név:

Születési dátum:

LHON génmutáció típusa:

Idebenont szed a páciens: igen/nem

Ha igen, mióta?:

Egyéb ismert betegségek:

Rendszeresen szedett gyógyszerek:

Gyógyszerérzékenység:

Autorefraktometria:

od _____ Dsph _____ Dcyl _____ fok

os _____ Dsph _____ Dcyl _____ fok

Látóélesség (Snellen-tábla):

od

os

Goldmann-perimetria történt: *igen/nem*

Papilla OCT-vizsgálat történt: *igen/nem*

Macula OCT-vizsgálat történt: *igen/nem*

Bőrbiopszia történt a vizit során: *igen/nem*

Vérvétel történt a vizit során: *igen/nem*

Kedvezőtlen, nem kívánatos esemény a mintavétel során történt: *igen/nem*

Ha igen, részletezve:

Vizsgáló aláírása

Vizsgálati dátum



SEMMELWEIS UNIVERSITY

Faculty of Medicine

Department of Medical Biochemistry

Director: Professor László Csanády, MD, PhD, DSc

Befogadó nyilatkozat

Alulírott Prof Csanády László, a Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémiai Intézet igazgatójaként a „**Kinon-vegyületek hatásának vizsgálata Leber-féle öröklődő látóideg sorvadással gondozott betegekből származó mitokondriumokon**” című vizsgálatnak intézményi háttérét biztosítom.

Budapest, 2020. 03.04.



Prof. Csanády László





Oktatás, kutatás, gyógyítás: 250 éve
az egészség szolgálatában

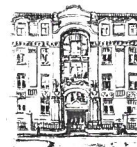
SEMMELWEIS EGYETEM

ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

Szemészeti Klinika

Igazgató

Prof. Dr. Nagy Zoltán Zsolt



Befogadó nyilatkozat

Alulírott Prof. Nagy Zoltán Zsolt, a Semmelweis Egyetem Szemészeti Klinika igazgatójaként a „**Kinon-vegyületek hatásának vizsgálata Leber-féle öröklődő látóideg sorvadással gondozott betegekből származó mitokondriumokon**” című vizsgálatnak intézményi háttérét biztosítom.

Tisztelettel:

Dr. Nagy Zoltán Zsolt
egyetemi tanár, igazgató

Budapest, 2020.