



---

**BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM  
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR  
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA**

## **A mitokondriális DNS és az oxidatív fehérje folding apparátus kapcsolata**

Tézisfüzet

Szerző: Balogh Tibor  
Témavezető: dr. Szarka András

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem  
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék  
Molekuláris Biológia és Biokémia Laboratórium

2016



## 1 Bevezetés

A fehérjék biológiai aktivitását háromdimenziós (3D) szerkezetük határozza meg, amelyet alapvetően aminosav sorrendjük definiál. A natív szerkezetet tovább stabilizálhatják a fehérjék cisztein egységei között oxidáció hatására kialakuló diszulfidhidak. Sokáig úgy tűnt, hogy a stabil diszulfidkötések enzim-mediált kialakítása csak a prokarióták periplazmás terében és az eukarióták endoplazmás retikulumának lumenében lehetséges. A közelmúltban azonban világossá vált, hogy a mitokondriumok intermembrán terében is lejátszódnak fehérjeoxidáló folyamatok.

A hibás fehérje folding speciális esetekben mitokondriális rendellenességekre vezethető vissza. Már viszonylag régóta ismert, hogy a mitokondriális DNS mutációk leginkább az idegrendszeret érintő nagyon súlyos, akár fatális tünetekkel is manifestálódhatnak. Tekintve, hogy a mitokondriális elektrontranszport lánc az oxidatív fehérje folding végső elektron akceptora is, felmerült annak lehetősége, hogy a mitokondriális DNS károsodása során a fehérjék foldingja is sérül, ez pedig hibás struktúrák felhalmozódásával tovább súlyosbíthatja a helyzetet.

A C-vitamin legoxidáltabb formája, a dehidroaskorbinsav (DHA) az endoplazmás retikulumban képes oxidálni a protein diszulfid izomeráz (PDI) enzimet, mely a kompartmentben működő diszulfid közvetítő rendszer egyik központi tagjának tekinthető. Ezzel a DHA tulajdonképpen hozzájárul az oxidatív fehérje folding megfelelő hatásfokának fenntartásához.

Kísérleteink során elsődlegesen a mitokondriális DNS károsodásának oxidatív foldingra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Ehhez modellként mesterségesen mitokondriális DNS fosztott, úgynevezett  $\rho^0$ -sejtvonalakat használtunk. Emellett azt is vizsgáltuk, hogy az endoplazmás retikulum esetében sikerrel alkalmazott dehidroaskorbinsav képes lehet-e elektron akceptorként bekapcsolódni a mitokondriális oxidatív folding folyamatába. Tekintve, hogy kísérleteink során nagyszámú minta DHA-tartalmának meghatározására volt szükség, különböző spektrofotometriás és fluorimetriás módszerek analitikai teljesítményjellemzőit vizsgáltuk meg annak érdekében, hogy objektív képet kapjunk azok alkalmazhatóságáról.

## 2 Irodalmi háttér

### 2.1 Az oxidatív fehérje folding jelentősége

Bár többféle oxidatív módosítás lehet hatással a fehérjék hajtogatódására, az oxidatív folding kifejezés használata hagyományosan a diszulfid hidak kialakítására korlátozódik. A cisztein egységek közötti diszulfidkötések ugyanis jelentős mértékben hozzájárulnak a fehérjék termodinamikailag stabil szerkezetének kialakításához.<sup>1</sup> A kötések csökkentik a hajtogatatlan állapot entrópiáját, és a natív állapotot stabilizáló kölcsönhatásokat eredményeznek.<sup>2</sup> Ez a hatás az exportra kerülő, vagy szekretált fehérjék esetében inmagasló jelentőséggel bír, hiszen segít fenntartani azok natív struktúráját az intracellulárisól lényegesen eltérő, általában oxidáló jellegű extracelluláris környezetben is.

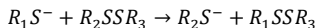
---

<sup>1</sup> Betz SF (1993). *Protein Sci* 2:1551–8.

<sup>2</sup> Narayan M, Welker E, Wedemeyer WJ, Scheraga H a (2000). *Acc Chem Res* 33:805–12.

A közelmúltban fedezték fel, hogy a mitokondriumok intermembrán terében (IMS) is lejátszódnak fehérjeoxidáló folyamatok.

A diszulfidkötések létrejöttének legfontosabb kémiai reakciója a tiol-diszulfid cserereakció:



A reakció lényege, hogy az  $R_1S^-$  tiolát anion kiszorít egy kénatomot az  $R_2SSR_3$  molekula diszulfidkötéséből. Ennek feltétele, hogy a tiolát anion olyan szoros kapcsolatba kerüljön a diszulfidkötéssel, hogy töltése a három kénatomon delokalizálódhasson. A fehérje diszulfidok kialakulásához két ilyen tiol-diszulfid cserereakcióra van szükség egy megfelelő redox partnerrel. Az első reakcióban egy kevert diszulfid jön létre a fehérje és a redox reagens között, majd ezzel reagál a fehérje újabb tiol csoportja. Ennek következtében felbomlik az intermolekuláris keresztkötés, és intramolekuláris diszulfidkötés keletkezik.<sup>2</sup> Az oxidatív folding folyamatában a szubsztrát fehérjét rendszerint valamilyen oxidoreduktáz aktivitású enzim oxidálja, mely tulajdonképpen annyit tesz, hogy az elsődlegesen szulfhidril-oxidáz enzimek által létrehozott diszulfidokat átadja a célfehérjének. Mindehhez az oxidáló erőt általában az oxigén biztosítja.<sup>3</sup>

## 2.2 A mitokondriális DNS szerepe a sejtben

A sejtben belül - a növényi sejtek kloroplasztiszait leszámítva - egyedül a mitokondriumok tartalmaznak extra-kromoszómális DNS szálakat. A mitokondriális genom több kópiában jelenlévő cirkuláris dupla szálú (ds) DNS molekula (emberben 16,6 kilóbázis), mely kódolja az oxidatív foszforilációs (OXPHOS) rendszer 13 alapvető polipeptidjét, és az organellumban történő translációjukhoz szükséges RNS „gépezetet” (2 rRNS és 22 tRNS). A légzési elektrontranszport lánc többi fehérje alegysége, valamint a mtDNS karbantartásáért felelős fehérjék a nukleáris DNS-en kódoltak, a citoplazma riboszómáin szintetizálódnak, és speciális mechanizmusokkal rendeződnek a rendeltetési helyükre az organellumon belül.<sup>4</sup> Történetileg a mitokondriumok diszkrét, nonkommunikatív egységeknek tekinthetők, gyakran bekövetkező fúziójuk és hasadásuk azonban lehetővé teszi a genetikai információcserét közöttük.<sup>5</sup>

A mtDNS-t érintő mutációk a sejtek biokémiai zavarainak széles spektrumát okozhatják, mely élő szervezetben akár szervek vagy egész szervrendszerek működésére is kihathat. A mtDNS defektusok okozta biokémiai zavarok tanulmányozására létrehozhatunk olyan sejtvonalatokat, melyekből a teljes endogén mtDNS állomány hiányzik. Ezeket a sejtvonalatokat  $\rho^0$ -sejtvonalatoknak nevezzük.<sup>6</sup>

A  $\rho^0$ -sejtvonalak létrehozásának „klasszikus” módja a sejtek hosszú távú, alacsony koncentrációjú etidium-bromidos kezelése. Az etidium-bromid egy fenantridin festék, mely preferáltan interkalálódik a kettős szálú DNS molekulák szálai közé. A vegyület a mtDNS replikációjának hatékony inhibitora, a sejtmagi DNS sokszorozódását ugyanakkor nem gátolja.<sup>7</sup>

<sup>3</sup> Riemer J, Bulleid N, Herrmann JM (2009). Science 324:1284–7.

<sup>4</sup> Taylor RW, Turnbull DM (2005). Nat Rev Genet 6:389–402.

<sup>5</sup> McFarland R, Turnbull DM (2009). J Intern Med 265:210–28.

<sup>6</sup> Armand R, Channon JY, Kintner J, et al. (2004). Toxicol Appl Pharmacol 196:68–79.

<sup>7</sup> Horwitz HB, Holt CE (1971). J Cell Biol 149:546–53.

### 2.3 Oxidatív folding a mitokondriumban

A 13 mtDNS-en kódolt elektrontranszport lánc fehérje kivételével a mitokondriális fehérjék többsége bonyolult import folyamatok segítségével éri el rendeltetési helyét a megfelelő szubmitokondriális kompartmentek valamelyikében.<sup>8</sup>

A mitokondriális diszulfidkövetítő rendszer szubsztrátjainak többsége kis méretű (7 – 15 kDa), és jellegzetes hélix-turn-hélix szerkezetet hordoz, melyben a két hélixet két párhuzamos diszulfidhíd köti össze. Az oxidatív folding folyamat főszereplője a MIA40 (Mitochondrial Import and Assembly) fehérje, mely gombákban membránköött, növényekben és állatokban pedig szolubilis állapotban van jelen az IMS-ben. A fehérje aktív helyén jelenlévő konzervált redox-aktív diszulfidkötés képes az IMS-be belépő polipeptid láncok cisztein egységeinek oxidálására.<sup>3</sup> A MIA40 eközben redukálódik, így annak újbóli oxidációja szükséges, hogy visszanyerje funkcióképességét. A reoxidációért az ALR (Augmenter of Liver Regeneration) nevű fehérje felel, mely a szulfhidril-oxidáz aktivitású flavoproteinek közé tartozik. A folyamatból származó elektronokat az ALR citokróm c-reduktáz aktivitása révén képes a citokróm c közvetítésével a citokróm c-oxidáz aktivitással rendelkező KOMPLEX IV-re átadni.<sup>9</sup> A KOMPLEX IV pedig a terminális oxidációból származó többi elektronnal együtt a légzési oxigén vízzel redukálására használja fel.

### 2.4 Mitokondriális dehidroaszorbinsav transzport

A C-vitamin mitokondriális transzportját több mint 30 éve írták le először, azonban a rendszer számos részlete csak a közelmúltban vált ismertté.

Izolált mitokondriumokban olyan sztereospecifikus D-glükóz felvételt mutattak ki, mely a dehidroaszorbinsav transzportjával kompetitív viszonyban áll. Előbb *in silico*, majd molekuláris biológiai módszerekkel a GLUT (glükóz transzporter) család GLUT1 tagjának mitokondriális lokalizációját igazolták.<sup>10</sup> Néhány éve pedig a GLUT10 transzporter mitokondriális jelenlétéről is beszámoltak egér aorta eredetű sima izomban és inzulinnal stimulált zsírszövetekben.<sup>11</sup>

Bár egészen a közelmúltig a DHA-t tekintették a C-vitamin mitokondriális belső membránján keresztül transzportálható formájának, újabb vizsgálatokban a nátriumdependens SVCT2 aszorbinsav transzporterek jelenlétét mutatták ki előbb U937, majd HEK-293 sejtek mitokondriumaiban.<sup>12,13</sup>

### 2.5 A dehidroaszorbinsav szerepe az oxidatív fehérje foldingban

Az endoplazmás retikulum oxidatív fehérje folding rendszerének oxidoreduktáza, a protein diszulfid izomeráz (PDI) enzim izolálásával egy hő-stabil faktort is leírtak, mely részt vesz a diszulfid kötések kialakításában. Ez a hő-stabil faktor pedig helyettesíthető a C-vitamin legoxidáltabb formájával, a dehidroaszorbinsavval (DHA).<sup>14</sup> Ezen megfigyelés alapján a DHA az oxidatív fehérje folding potenciális elektron akceptorának tekinthető.

<sup>8</sup> Sideris DP, Tokatlidís K (2010). *Antioxid Redox Signal* 13:1189–204.

<sup>9</sup> Allen S, Balabanidou V, Sideris DP, et al. (2005). *J Mol Biol* 353:937–44.

<sup>10</sup> KC S, Cárcamo JM, Golde DW (2005). *FASEB J* 19:1657–67.

<sup>11</sup> Lee Y-C, Huang H-Y, Chang C-J, et al. (2010). *Hum Mol Genet* 19:3721–33.

<sup>12</sup> Azzolini C, Fiorani M, Cerioni L, et al. (2013). *IUBMB Life* 65:149–53.

<sup>13</sup> Muñoz-Montesino C, Roa FJ, Peña E, et al. (2014). *Free Radic Biol Med* 70:241–54.

<sup>14</sup> Venetianer P, Straub FB (1964). *Biochim Biophys Acta* 89:189–90.

### **3 Kísérleti módszerek**

#### **3.1 Sejtfenntartás**

A HepG2 humán máj karcinóma, az MCF7 humán mell adenokarcinóma, és az SH-SY5Y humán neuroblasztóma eredetű sejtvonalakat a Sigma cégtől szereztük be, és 37 °C-on, 5 % CO<sub>2</sub>-t tartalmazó atmoszférában, a forgalmazó által ajánlott médiumokban szaporítottuk őket.

#### **3.2 p<sup>0</sup>-sejtvonalak létrehozása és fenntartása**

A p<sup>0</sup>-sejteket a King és Attardi által leírt protokoll<sup>15</sup> alapján, a sejtek hosszú távú etídium-bromidos kezelésével hoztuk létre. SH-SY5Y sejtek esetében a protokollt Trimmer és munkatársai ajánlásai<sup>16</sup> alapján módosítottuk.

A mDNS elminációját real-time PCR technikával igazoltuk. A PCR reakcióhoz szükséges DNS-t Wizard SV (Promega) genomi DNS tisztító kit segítségével, a gyártó utasításai alapján izoláltuk.

#### **3.3 A mitokondriális respirációs komplexek inhibeálása**

A különböző mitokondriális respirációs komplexek blokkolása céljából a HepG2 sejteket 24 óráig inkubáltuk a megfelelő inhibitorral kiegészített médiumban. A következő inhibitor koncentrációkat alkalmaztuk: 0,025 µM rotenont a KOMPLEX I, 200 µM teonil-trifluoro-acetont (TTFA) a KOMPLEX II, 0,0025 µM antimicin A-t a KOMPLEX III, és 250 µM nátrium-azidot a KOMPLEX IV blokkolására. Ezen kívül egy jól ismert szétkapcsoló szert, a 2,4-dinitrofenolt (DNP) használtuk 100 µM-os végkoncentrációban a mitokondriális ATP-szintáz (KOMPLEX V) ATP-produkciójának gátlására. Az inhibitor-kezelések eredményességét a sejtek légzési oxigén felvételének oxigráffal történő mérése alapján igazoltuk.

#### **3.4 A mitokondriális oxidatív folding enzimek expressziójának meghatározása Western blot technikával**

A sejteket a plate-ekről szuszpendáltuk, ülepítettük, majd teljes fehérjetartalmukat lízis puffer (150 mM NaCl; 1 % NP40; 0.1 % SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 8) segítségével izoláltuk.

A fehérje mintákból 50 µg-os mennyiségeket vittünk fel 15 %-os poliakrilamid géltre, redukáló körülményeket alkalmazva. A méret szerint elválasztott fehérjéket ezután a gélről 0,45 µm pórusátmérőjű nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat 2 órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoltuk. A blokkolás után a membránokat 4 °C-on, overnight elsődleges antitesttel, majd szobahőmérsékleten, 1 órán át HRP-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. A specifikus jelölést fényérzékeny filmen, ECL reagens alkalmazásával detektáltuk.

---

<sup>15</sup> King MP, Attardi G (1996). *Methods Enzymol* 264:304–13.

<sup>16</sup> Trimmer PA, Keeney PM, Borland MK, et al. (2004). *Neurobiol Dis* 15:29–39.

### 3.5 Az ALR mRNS szintjének meghatározása RTqPCR analízissel

A sejtek teljes RNS-tartalmát innuPREP RNA Mini Kit (Analytikjena) segítségével izoláltuk és tisztítottuk. 2 µg-nyi mennyiségeket írtunk át DNS-re Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) alkalmazásával. Az ALR és a belső kontrollként alkalmazott 18S rRNS transzkriptumainak mennyiségi elemzését real-time PCR technikával végeztük.

### 3.6 C-vitamin transzporterek mitokondriális lokalizációjának *in silico* vizsgálata

A GLUT és SVCT transzport fehérjék, valamint négy különböző, egyértelműen mitokondriálisan lokalizálódó szállító fehérje (Mitochondrial pyruvate carrier 2, MPC2; Mitochondrial phosphate carrier protein, MPCP; Dicarboxylate carrier, DIC; Carnitine O-palmitoyltransferase 2, CPT2) aminosav szekvenciáját az Uniprot adatbázisból töltöttük le (<http://www.uniprot.org>).

A transzporterek predikciós analíziséhez a fehérjék első 60 aminosav egységét használtuk fel.

A fehérjék (GLUT1-14; SVCT1,2) szubcelluláris lokalizációját összesen nyolc különböző predikciós szoftverrel elemeztük: Target P, Mitoprot II, Predotar, Psort II, MultiLoc/TargetLoc, ngLOC, YLoc, CELLO v2.5.

### 3.7 mtDNS-deficiens HepG2 sejtek dehidroaszcorbinsav-felhasználásának meghatározása

A DHA törzsoldat készítéséhez 100 mM koncentrációjú L-aszcorbinsav oldatot brómmal oxidáltunk.

Mind a  $\rho^0$ , mind a normál tenyésztési körülmények között fenntartott kontroll HepG2 sejteket négy órán keresztül, 1 mM végkoncentrációjú DHA-val kiegészített tápoldattal kezeltük. Az így elkészített tápoldatot a sejteken félóránként frissre cseréltük. A kezelés során óránként mintát vettünk a tápoldatokból. A minták DHA-tartalmát HPLC technikával határoztuk meg.

### 3.8 Növényi minták preparálása C-vitamin meghatározási módszerek teszteléséhez

Összesen négyféle, ételmezésben fontos zöldség és gyümölcs C-vitamintartalmát elemeztük, hogy különböző aszcorbinsav meghatározási módszerek alkalmazhatóságát ellenőrizzük. A vizsgált minták a következők voltak: citrom (*Citrus medica*), narancs (*Citrus sinensis*), paprika (*Capsicum annuum*), paradicsom (*Solanum lycopersicum*).

A minta extraktumok elkészítéséhez a mintákat apró darabokra vágtuk, folyékony nitrogénnel fagyasztottuk, majd porcelán mozsárban porítottuk. Ezután ismert tömegű mintát 5 %-os ecetsavban homogenizáltunk. A mintatérfogatokat feljegyeztük, majd a mintákat 16500 g-n 5 percig 4 °C-on centrifugáltuk.

### 3.9 $\alpha,\alpha'$ -dipiridiles módszer C-vitamin meghatározására

75 µl 85 %-os ortofoszforsavat, 750 µl 1 %-os  $\alpha,\alpha'$ -dipiridilt (absz. etanolban oldva) és 300 µl 1 %-os  $\text{FeCl}_3$  oldatot adtunk 300 µl aszcorbinsavat tartalmazó mintához mikrocentrifuga-csőben. Az így elkészített mintákat 60 percig

szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 5 percig 16500 g-n centrifugáltuk őket. Ezután a felülúszókból 350 µl-es mennyiségeket mikrotiter lemez well-jeibe pipettáztunk. Minden mintából 3-3 párhuzamos bemérést végeztünk. A minták abszorbanciáját ezután 525 nm-en határoztuk meg.

### **3.10 Aszkorbinsav-oxidáz enzimés módszer C-vitamin meghatározására (OPDA, OPDA-fluori)**

300 µl 4,6 mM-os OPDA oldatot (0,1 M foszfát pufferben) és 15 µl 10 U/ml aszkorbinsav oxidáz enzimet (0,1 M foszfát pufferben) adtunk 37,5 µl C-vitamin tartalmú mintához mikrotiter lemezen. Félperces rázás, és 10 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után 340 nm hullámhosszon mértük a minták abszorbanciáját. Alternatív módon, fluoriméterrel a minták fluoreszcenciája is mérhető. Ehhez egy Jasco FP-8200 spektrofluorimétert használtunk 340 nm excitációs és 420 nm emissziós hullámhossz beállítással.

### **3.11 HPLC (referencia) módszer C-vitamin meghatározására**

Az elválasztást Waters 2690 folyadékkromatográfiai készülékkel, Teknokroma TR-011349 Nucleosil 100 C18 fordított fázisú kolonnán végeztük, Szarka és munkatársai által publikált módszer<sup>17</sup> alkalmazásával. Az izokratikus mozgófázis összetétele 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 3,1 (ortofoszforsavval beállítva) volt, és 1 ml/perc áramlási sebességet alkalmaztunk. Az aszkorbinsavat SPD-10A UV-VIS detektorral 254 nm-en detektáltuk.

## **4 Eredmények**

### **4.1 A mitokondriális DNS mennyiségének hatása az ALR fehérje expressziójára**

Kísérleteink kezdeti fázisában humán máj karcinóma eredetű HepG2 sejtvonalból hoztunk létre mtDNS-mentes  $\rho^0$ -ás sejteket. A mtDNS hiányát és a respirációs lánc funkcióképtelenségét real-time PCR módszerrel, és a sejtek oxigénfelvételének mérésével is igazoltuk.

Tekintve, hogy az ALR a májregeneráció folyamatában is fontos szerepet játszik, két másik, nem májeredetű (MCF7 humán mell adenokarcinóma, és az SH-SY5Y humán neuroblasztóma eredetű) sejtvonalból is létrehoztunk  $\rho^0$ -sejteket.

Megállapítottuk, hogy a vizsgált sejtvonalakban az mtDNS hiánya nem okozott detektálható különbséget az ALR mRNS expressziójában. Ezzel szemben fehérje szinten markáns különbséget mutatott az ALR expressziója a mtDNS depléciónak hatására. Ez az effektus biztosan nem lehet máj specifikus, hiszen a jelenséget a másik két, nem májeredetű (MCF7 és SH-SY5Y) sejtvonalon is kimutattuk. Azt is megállapítottuk, hogy a mitokondriális diszulfidközvetítő rendszer másik tagja, a MIA40 fehérje szintje nem emelkedett együtt az ALR-rel.

Az ezt követő kísérletekben arra próbáltunk választ találni, hogy milyen szabályozó faktor állhat az ALR expresszió szignifikáns növekedésének hátterében.

---

<sup>17</sup> Szarka A, Stadler K, Jenei V, et al. (2002). J Bioenerg Biomembr 34:317–23.



Az egyik lehetséges válasz az ATP szint lehet. Az már jól ismert tény, hogy az ALR hiánya az ATP szint csökkenéséhez vezet.<sup>18</sup> Ebből kiindulva lehet arra esély, hogy a  $\rho^0$ -sejtekben működőképes respirációs lánc hiányában lecsökkent ATP szint az ALR fehérje szintjének emelkedését idézi elő. Ahhoz, hogy ezt leellenőrizzük, a normál sejteket az ATP szint csökkentése céljából különböző légzési inhibitorokkal és szétkapcsoló szerrel kezeltük. A kezelések hatására azonban nem tapasztaltunk semmilyen változást az ALR fehérje szintjében, így az ATP szint ALR expressziót szabályozó szerepét kizártuk.

Az ALR szintjét befolyásoló faktor szerepére a második jelöltünk a reaktív oxigénvegyületek szintje volt, hiszen a  $\rho^0$ -sejtekben az elektrontranszport lánc funkcióképtelensége a ROS termelés jelentős növekedésével jár együtt.<sup>19</sup> Azonban sem a KOMPLEX III blokkolásából eredő ROS szint emelkedés, sem a 2,4-dinitrofenol kezelés hatására kialakuló ROS szint csökkenés nem volt hatással az ALR fehérje szintjére.

Az ALR gén csendesítésének vagy kiütésének hatására megfigyelt kaszpáz-3 aktiváció<sup>20</sup> egy harmadik lehetőséget vet fel, miszerint az ALR anti-apoptotikus hatással bír a  $\rho^0$ -sejtekben. Ezt az eshetőséget a  $\rho^0$ -sejtek apoptózissal szemben megfigyelt emelkedett ellenálló képessége is támogatja.<sup>21</sup>

Az a megfigyelés, hogy a mitokondriális diszulfidközvetítő rendszer másik tagjának, a MIA40-nek nem változott együtt a szintje az ALR-rel, felveti annak lehetőségét, hogy az ALR szint emelkedése független lehet a mitokondriális oxidatív folding folyamatától, de az sincs kizárva, hogy az ALR szint növekedés megoldja a problémát azzal, hogy több elektront képes átvenni a MIA40-től, így annak expressziós növekedése szükségtelen.

Úgy tűnik, hogy a mtDNS és/vagy egyes géntermékei szerepet játszanak az ALR fehérje szabályozásában. Tekintve, hogy az ALR részt vesz a mitokondriumok biogenezisében és fenntartásában<sup>18</sup>, az ALR májtól független pozitív irányú szabályozása a  $\rho^0$ -sejtek adaptív válasza lehet, melynek segítségével a mtDNS-en kódolt fehérje komponensek kiesése ellenére is meg tudják őrizni a mitokondriális belső membrán integritását és a membrán két oldala közötti elektrokémiai gradienst is.

## 4.2 C-vitamin transzporterek mitokondriális lokalizációja, *in silico* vizsgálatok alapján

A vizsgálatok során négy, biztosan a mitokondriumban lokalizálódó szállító fehérjét választottunk ki, melyeket mitokondriális standardként használtunk. Ez a négy fehérje nyolc predikciós szoftvertől magasabb pontszámot kapott a mitokondriális lokalizáció valószínűségére, mint a GLUT és az SVCT család bármelyik tagja.

A predikciós szoftverek (az ngLOC kivételével) a mitokondriális etalonként vizsgált fehérjékhez hasonlóan a GLUT1 mitokondriális lokalizációjára is nagy esélyt jósoltak. Ezek az eredmények jól összecsengnek KC és munkatársai korábbi, GFP-fűzés és immunoblot módszerekkel tett megfigyeléseivel.<sup>10</sup>

A GLUT2, 3, 4 és 8, mind DHA transzporterként számon tartott fehérjék, azonban mitokondriális lokalizációjuk nem valószínű, hiszen azt sem a predikciós

<sup>18</sup> Gandhi CR, Chaillat JR, Nalesnik M a., et al. (2015). *Gastroenterology* 148:379–391.

<sup>19</sup> Miranda S, Foncea R, Guerrero J, Leighton F (1999). *Biochem Biophys Res Commun* 258:44–49.

<sup>20</sup> Polimeno L, Pesetti B, De Santis F, et al. (2012). *Cell Death Dis* 3:e289.

<sup>21</sup> Lee MS, Kim JY, Park SY (2004). *Ann N Y Acad Sci* 1011:146–153.

szoftverektől kapott pontszámok, sem korábbi kísérleti eredmények nem támasztják alá.

A nyolc predikciós szoftver közül öt magas pontszámot adott a GLUT9 izoformáinak mitokondriális lokalizációjára. Bár a GLUT9 (más néven SLC2A9) a GLUT családba tartozik, újabban elsődlegesen nagy kapacitású hűgysav (urát) transzporter szerepkörét emelik ki, melynek segítségével glükózt és fruktózt képes hűgysavra cserélni a membrán két oldala között.<sup>22</sup> Feltételezésünk szerint az SLC2A9a a mitokondriális membránban lokalizálódik, és hűgysavat transzportál a mátrixból a citoszol felé, ezzel pedig glükóz, vagy a glükózzal rokon vegyület, DHA felvételét váltja ki.

A GLUT10 mitokondriális lokalizációjára kapott alacsony pontszámok nagy meglepetést okoztak, hiszen ez az eredmény több, korábbi kísérletes megfigyelésnek ellentmond.<sup>11</sup> Egy újabb, HEK-293 sejteken végzett tanulmányban a GLUT10 expresszió hiányát írták le, ezzel megkérdőjelezték a GLUT10 részvételét a mitokondriális DHA transzportban.<sup>13</sup> Ezzel együtt az *in silico* vizsgálatunkból nyert nagyon alacsony predikciós pontszámok is kérdésessé teszik a GLUT10 mitokondriális (C-vitamin) transzporter szerepét.

A MultiLoc és ngLoc kivételével minden predikciós szoftver magas pontszámot adott a GLUT11 mitokondriális lokalizációjára. Immunfehérjés vizsgálatok alapján a GLUT11 a sejtek felszínén, valamint egy intracelluláris kompartmentben lokalizálódik.<sup>23</sup> Nem lehet kizárni, hogy a megfigyelt intracelluláris kompartment akár a mitokondrium is lehet.

A GLUT 12 nem kapott magas pontszámot mitokondriális lokalizációjára. Eredményeinkkel összhangban, úgy tűnik, hogy inkább a Golgi-apparátusban és a plazmamembránban lokalizálódik.<sup>24</sup>

A GLUT13 (HMIT) összes izoformája nagy eséllyel lokalizálódik a mitokondriumban, mivel erre a legtöbb predikciós szoftver magas pontszámokat adott. A GLUT13 vagy más néven HMIT egy H<sup>+</sup> - mio-inozitol kotranszporter.<sup>25</sup> Bár a mitokondriumok esetében adott lenne a hajtóerő (H<sup>+</sup>-gradiens), a HMIT mitokondriális C-vitamin transzportban történő részvétele nem valószínű, tekintve, hogy cukor transzport aktivitása nem detektálható.<sup>26</sup>

Valószínűsítik, hogy a GLUT14 a GLUT3-t kódoló gén duplikációjával keletkezett.<sup>27</sup> Így nem meglepő, hogy mitokondriális lokalizációja, a GLUT3-hoz hasonlóan, nem valószínű.

A korábbi kísérletes eredményekkel összhangban az SVCT1-gyel ellentétben az SVCT2 jó pontszámokat kapott mitokondriális lokalizációjának valószínűségére.<sup>13</sup> A mitokondriális ionkoncentrációs viszonyok lehetővé teszik, hogy az SVCT2 (alacsony affinitású) aszkorbinsav transzporterként működjön a mitokondriális membránban.

---

<sup>22</sup> Caulfield MJ, Munroe PB, O'Neill D, et al. (2008). PLoS Med 5:e197.

<sup>23</sup> Scheepers A, Schmidt S, Manolescu A, et al. (2005). Mol Membr Biol 22:339–61.

<sup>24</sup> Flessner LB, Moley KH (2009). Traffic 10:324–33.

<sup>25</sup> Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, et al. (2001). EMBO J 20:4467–77.

<sup>26</sup> Di Daniel E, Mok MH, Mead E, et al. (2009). BMC Cell Biol 10:54.

<sup>27</sup> Augustin R (2010). IUBMB Life 62:315–33.

### 4.3 A mtDNS depléciójának hatása a sejtek dehidroaszorbinsav-felvételére

Kísérletünkben a légzési lánc deficienciával rendelkező HepG2 sejtek DHA-fogyasztását vizsgáltuk. Az elektrontranszport lánc funkcióvesztését a korábbi kísérleteinknél is alkalmazott, mesterségesen mtDNS-fosztott  $\rho^0$ -sejtekkel modelleztük.

Eredményeink szerint a négyórás kezelés alatt a  $\rho^0$ -sejtek DHA-felvétele a második órában jelentősen megnőtt, majd egy közepes szintre állt be. Az általunk vizsgált kontroll sejtek a  $\rho^0$ -sejteknel hamarabb elérték ezt a maximális értéket.

A kontroll és  $\rho^0$ -sejtek DHA-felvétele között egyértelmű különbség rajzolódik ki. A jövőben tervezzük kontroll és  $\rho^0$ -sejtek esetében az IMS-ben lokalizálódó szubsztrátfehérjék redox állapotának AMS jelöléssel történő vizsgálatát.

### 4.4 C-vitamin meghatározási módszerek alkalmazhatóságának jellemzése

Összesen három C-vitamin meghatározási módszer analitikai teljesítményjelzőit vizsgáltuk meg, és vetettük össze az általunk alkalmazott HPLC módszerrel, hogy elfogulatlan képet alakíthassunk ki azok felhasználási lehetőségeiről.

Teszteltük az  $\alpha,\alpha'$ -dipiridiles, valamint aszorbinsav-oxidáz enzimet és OPDA-t alkalmazó módszert, utóbbit abszorbancia és fluoreszcencia detektálással (jelölése: OPDA, ill. OPDA-fluori) egyaránt.

Méréseink és számításaink alapján a tesztelt módszerekkel kapcsolatban az alábbi következtetéseket vontuk le:

Az OPDA-fluori módszert alacsony C-vitamintartalmú minták meghatározására tudjuk ajánlani, mivel kellően alacsony LoD és LoQ értékekkel rendelkezik. Jóllehet, ez a módszer jellemezhető a legszűkebb lineáris tartománnyal is. Emellett azt is fontos megemlíteni, hogy a különböző gyümölcs és zöldség minták C-vitamintartalmát ez a módszer kissé alulbecsülte, valószínűleg az aszorbinsav származékképzése miatt.

Sajnos a spektrofotometriás detektálással kombinált OPDA módszer analitikai tulajdonságai messze elmaradtak a többi módszerétől. Emiatt alkalmazását nem tudjuk ajánlani.

Az  $\alpha,\alpha'$ -dipiridiles módszer viszont minden tesztben kiegyensúlyozott teljesítményt nyújtott. Ráadásul a zöldség és gyümölcs minták esetében ezzel a módszerrel mért értékek közelítették meg leginkább a HPLC-vel mért C-vitamintartalmakat. Az is bebizonyosodott, hogy a módszer specifitási problémái ortofoszorsav alkalmazásával jól kezelhetők.

Az OPDA-fluori módszerhez hasonlóan az  $\alpha,\alpha'$ -dipiridiles módszer áteresztőképessége jelentősen megnövelhető, ha az abszorbanciát vagy fluoreszcenciát plate reader-rel határozzuk meg.

A fenti tapasztalatokat összegezve a tesztelt módszerek közül az  $\alpha,\alpha'$ -dipiridiles módszer tűnik a legmegfelelőbbnek kis- és közepméretű laboratóriumok számára, ahol a napi mintamennyiség nem haladja meg a néhány százat.

Alaputatást végző laboratóriumokban, a legtöbb esetben nagyon változatos koncentrációjú és összetételű minták meghatározására van szükség. Ilyen körülmények között a vizsgált módszerek közül kizárólag a HPLC képes megfelelő szelektivitást, érzékenységet és megbízhatóságot nyújtani.

## 5 Tézisek

- 1) Kimutattuk, hogy különböző humán sejtvonalak sejtjeiben a mitokondriális DNS depléciójának hatására az ALR (Augmenter of Liver Regeneration) expressziója fehérje szinten jelentősen megemelkedik, míg mRNS szinten változatlan marad. Az effektus nem szövet specifikus, mivel a vizsgált sejtípusok szöveti eredete különböző volt (HepG2 májkarcinóma, MCF7 mell adenokarcinóma, és SH-SY5Y neuroblasztóma eredetű) [1].
- 2) Kizártuk a sértült mitokondriális elektrontranszport lánc hatására megváltozó ATP vagy ROS szintek ALR expressziót befolyásoló szerepét, mivel az ALR mennyisége nem mutat változást a sejtek specifikus respirációs komplex blokkoló, és mitokondriális szétkapcsoló szerekkel történő kezelésének hatására sem [1].
- 3) Dehidroaskorbinsav transzporterek mitokondriális lokalizációjának *in silico* vizsgálatával megerősítettük a GLUT1 transzporter kompartmentben való lokalizációját, ugyanakkor a GLUT10 mitokondriális jelenlétét megkérdőjelezzük [2].
- 4) *In silico* vizsgálataink eredményei alapján valószínűsíthető két újabb, eddig nem ellenőrzött GLUT típusú transzporter, a GLUT9 és GLUT11 mitokondriális dehidroaskorbinsav transzportban való részvétele [2].
- 5) Predikciós szoftverek alkalmazásával megerősítettük az SVCT2 aszkorbinsav transzporter korábbi kísérletes eredmények alapján is feltételezett mitokondriális lokalizációját [2].
- 6) Megállapítottuk, hogy az aszkorbinsav-oxidáz enzimet, orto-feniléndiamin komplexképzőt és fluoreszcens detektálást alkalmazó C-vitamin meghatározási módszer pontosság és precizitás tekintetében felülmúlja az elterjedten alkalmazott reverz fázisú HPLC módszert. Alkalmazását viszont szűk lineáris tartománya, és az aszkorbinsav-dehidroaskorbinsav egyensúly megbontásából fakadó torzítottsága korlátozza [3].
7. Vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy az aszkorbinsav redukáló hatását kihasználó, vas(III)-klorid és  $\alpha,\alpha'$ -dipiridil reagenst alkalmazó spektrofotometriás C-vitamin meghatározási módszer kiegyensúlyozott analitikai teljesítménye (5 - 1000  $\mu\text{mol/l}$  terjedelmű lineáris tartomány, a teljes mérési tartományán belül átlagosan 8,16 %-os pontosság és 9,67  $\mu\text{mol/l}$ -es precizitás, 1,34  $\mu\text{mol/l}$ -es kimutatási és 4,46  $\mu\text{mol/l}$ -es meghatározási határ) mellett megbízható mérési eredményeket szolgáltat. A módszer ideálisan alkalmazható kis és közepes méretű élelmiszeranalitikai laboratóriumokban [3].

## 6 Alkalmazási lehetőségek

A rekombináns DNS technológiával előállított fehérjék megfelelő hajtogatódása legalább annyira fontos, mint translációjuk. A monoklonális antitestek előállítása során az egyik legnagyobb kihívást a poszttranszlációs módosítások (folding) jelentik. A fehérjék megfelelő funkciójának előfeltétele a megfelelő folding. Az emlős (mitokondriális) folding apparátus különböző körülmények között történő vizsgálata ezért mind ipari (biotechnológia) mind egészségügyi szempontból előnyös. A megfigyelés, hogy mtDNS mentes sejtekben megemelkedik ALR fehérje expressziója, tovább gazdagítja a témában elért tudásanyagot. Ehhez hasonlóan, a mitokondriális C-

vitamin transzport *in silico* módszerekkel történő vizsgálatának is fontos klinikai jelentősége van, különösen a kanyargós artéria szindrómával kapcsolatos kutatások szempontjából. A különböző C-vitamin meghatározási módszerek összehasonlításából nyert eredményeinket pedig a kis és közepes méretű élelmiszer analitikai laboratóriumok akár közvetlenül is hasznosíthatják.

## 7 Közlemények

*Közlemények az értekezés témájában:*

- 1) **Balogh Tibor**, Lőrincz Tamás, Stiller Ibolya, Mandl József, Bánhegyi Gábor, Szarka András: The Level of ALR is Regulated by the Quantity of Mitochondrial DNA; Pathology and Oncology Research, DOI: 10.1007/s12253-015-0020-y (2015), IF: 1,855
- 2) Szarka András, **Balogh Tibor**: In silico aided thoughts on mitochondrial vitamin C transport; Journal of Theoretical Biology 365, 181-189, DOI: 10.1016/j.jtbi.2014.10.015 (2015), IF: 2,116
- 3) **Balogh Tibor**, Szarka András: A comparative study: Methods for the determination of ascorbic acid in small and middle sized food analytic laboratories; Acta Alimentaria, DOI: 10.1556/AAlim.2015.0017 (2015), IF: 0,427
- 4) **Balogh Tibor**, Szarka András: Egy multifunkcionális fehérje: az ALR; Orvosi Hetilap 156 (13), 503-509, DOI: 10.1556/OH.2015.30119 (2015)

*Előadások az értekezés témájában:*

**Balogh Tibor**, Lőrincz Tamás: Mitokondriális genom és fehérje folding; Kutás-fejlesztés és innováció a Műegyetemen 2013; Biotechnológia, egészség- és környezetvédelem; Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem; 2013. június 21.

**Balogh Tibor**, Szarka András: Gyors analitikai módszerek élelmiszerminták C-vitamin tartalmának meghatározására; Táplálkozástudományi Kutatások II. Workshop; Innováció – Táplálkozás – Egészség – Marketing; Kaposvári Egyetem; 2012. december 10.

*Poszter az értekezés témájában:*

**Balogh Tibor**, Lőrincz Tamás, Mandl József, Szarka András: ALR: kapocs a mitokondriális DNS és oxidatív folding között; MedInProt konferencia 3.; Eötvös Lóránd Tudományegyetem; 2015. november 14.

*Egyéb közlemény:*

**Balogh Tibor**, Szarka András: Napfény és C-vitamin; Élelmiszer - Tudomány Technológia 67 (3), 27-28 (2013)

*Egyéb poszter:*

Hajdinák Péter, Czobor Ádám, Deák Veronika, **Balogh Tibor**, Szarka András: The effect of HrpWpto and HrpZpto treatment on ascorbate metabolism; 9th International Conference for Plant Mitochondrial Biology; Wrocław; 2015. május 17-22.