

A mitokondriális szénhidrát és aszkorbinsav transzport és anyagcsere szerepe az ozmotikus és oxidatív stresszadaptációban.

Kutatásunk kezdetekor 3 fő célkitűzésünk volt:

1. A mitokondriális szorbitképződés, illetve ennek lehetséges ozmoregulációs vonatkozásának vizsgálata
2. A mitokondriális aszkorbát szintézis/felhasználás (oxidáció), illetve a képződött oxidált forma (DHA) reciklálásának (redukciójának) vizsgálata
3. A mitokondriális aszkorbát/dehidroaszkorbát anyagcsere vizsgálata, különös tekintettel a redox folyamatokra emlős/humán sejteken

1. A mitokondriális szorbitképződés, illetve ennek lehetséges ozmoregulációs vonatkozásának vizsgálata

Kutatásaink alapját saját 2008-ban publikált eredményeink adták, mely szerint a növényi mitokondriumok mátrixában invertáz aktivitás található. A mitokondriális invertázt a mitokondriális belső membránban található szacharóz transzporter látja el szubsztráttal. A reakció termékei a glukóz és fruktóz. Így felmerül – részben a bakteriális analógia alapján – hogy a mitokondrium aldóz reduktáz aktivitással rendelkezik, mely az invertáz által katalizált reakció termékeit tovább alakítja az ozmotikum szorbittá, melynek szerepe lehet a növények ozmotikus stressz-tűrésében.

Kísérletes vizsgálatainkat megelőzendő *in silico* kutatásokat végeztünk, melyek során, az alkalmazott predikációs algoritmusok 2 különböző aldóz-reduktáz mitokondriális lokalizációját is igen erősen valószínűsítette.

Rögtön a kísérletes munka elején szembesültünk vele, hogy a legnagyobb problémát a mitokondriális szorbitképződés vizsgálata terén az jelenti, hogy a funkcióképes mitokondrium izolálásához, minden izoláló oldatnak, az izoozmotikus körülményeket biztosítandó, nagy mennyiségű ozmotikumot kell tartalmaznia. Két szénhidrátot szoktak erre a célra alkalmazni: szacharózt és mannitot. Szacharóz ozmotikumként történő alkalmazása nem lehetséges, mivel a mitokondrium invertáz aktivitása révén metabolizálja azt. Az izolálást ezért mannit ozmotikum alkalmazásával kell végeznünk.

Vizsgálatainkat csicsóka, burgonya mitokondriális frakciókon végeztük el. A kísérletek során az izolált mitokondriális frakciót a megfelelő szubsztráttal (szacharóz, glukóz, fruktóz) együtt inkubáltuk. A vizsgálatok analitikai kiértékeléséhez kezdetben gázkromatográfiás módszert alkalmaztunk. A cukrok, cukoralkoholok gázkromatográfiás méréséhez származékképzés szükséges, méréseinkhez a szililezést választottuk. A képződött szilil származékokat ezután lángionizációs detektor (GC-FID) segítségével határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy a nagy

mennyiségű mannit egyértelműen zavaró hatással volt a szorbit meghatározására. Sajnos a mannit és szorbit molekula közti igen kis különbség (enantiomerek) nem elegendő az alkalmazott GC-FID detektálás esetén a megfelelő mértékű elválasztásukhoz.

Lehetséges megoldásként felmerült, hogy az öt szénatomos cukoralkohol xilitet alkalmazzuk ozmotikumként a mitokondrium preparálások során. A molekulát előszeretettel alkalmazzák ozmotikumként (és édesítőszerként) az élelmiszeriparban. Így tökéletes jelöltnek ígérkezett. Az ozmotikumcsere mindazonáltal egy teljesen új preparálási eljárást jelent, melyről igazolni kellett, hogy a célnak megfelelő minőségű mitokondriumot eredményez. A bizonyítási eljárásához két különböző forrásból (állati: egér máj, növényi: édes burgonya) mitokondriumot izoláltunk. Az izolálási eljárások végén a mitokondriális frakciót két részre bontottuk, majd egyik felét a széles körben elfogadott (de a szorbit meghatározást zavaró) mannit tartalmú oldatban, a másik felét az új vizsgálandó ozmotikum (de szorbit meghatározást lehetővé tevő) xilit tartalmú oldatban szuszpendáltuk. Ezt követően megvizsgáltuk az így elkészített mitokondrium preparátum épségét. (Az ozmotikumok jóságát.) A vizsgálatot egy intermembrán térben található, mitokondriális markerenzim, a citokróm c oxidáz latenciája alapján végeztük el. Az állati és a növényi eredetű mitokondriumok esetében abszolút összecsengő eredményt kaptunk. Sajnos mindkét esetben a mannit jelentősen jobb ozmotikumként viselkedett. Mannit tartalmú oldat esetében a mitokondriumok 90-95%-a épp maradt az izolálás során, míg xilit tartalmú ozmotikum oldat esetében ez az arány csak 50% körül mozgott. Így sajnos a xilit nem használható ozmotikumként mitokondrium preparálás esetén. A két ozmotikum összehasonlítása során nyert tapasztalatainkat az International Federation for Medical and Biological Engineering proceedings-ben közzeltük (Tomasskovics, Szarka 2011).

Ekkor visszatértünk a GC-FID módszerhez, hosszas küzdelem után, a nagy mennyiségű mannit egyértelmű zavaró hatása mellett is, kimutatható volt a szorbit képződése, jelenléte. Eredményeink bizonyítására gázkromatográfiás - tömegspektrometriás (GC-MS) készülékkel is megvizsgáltuk mintáinkat. A tömegspektrometriás detektor szerkezeti információval is szolgál az egyes mintákban előforduló komponensekről. Az eredmények szintén a keletkezett szorbit jelenlétét bizonyították. A szorbit pontos mennyiségi meghatározásánál azonban a mannit nagy mennyiségű jelenléte egyértelműen problémát okozott mind a származékképzésnél, mind a műszeres meghatározásánál egyaránt, így el kellett vetnünk a szililezés alkalmazását. A problémák kiküszöbölésére folyadékromatográfiás módszerek alkalmazása jelenthette a megoldást. Kezdetben UV/VIS detektorral kapcsolt készülékkel (LC-UV/VIS) végeztük vizsgálatainkat. Ebben az esetben a cukoralkoholok méréséhez szintén származékképzés szükséges, a benzoilálás mellett döntöttünk. Sajnos a módszert el kellett vetnünk, ugyanis a nagy mennyiségű mannit jelenlétében nem volt mérhető a kis mennyiségű szorbit. Tekintve, hogy több oldalról körbejártuk a témát, konstatálnunk kellett, hogy a mérések megvalósításához elkerülhetetlen a direkt, származékképzés nélküli módszer, illetve a jelölt standard anyagok és szubsztrátok alkalmazása. A szükséges mérési feltételek ezek alapján folyadékromatográfiás – tömegspektrometriás készülékkel (HPLC-MS-MS) biztosíthatóak. A szubsztrátok, valamint a referencia anyagok ¹³C izotóppal jelöltek, így a szelektív tömegspektrometriás meghatározás is kivitelezhető. A nehezebb tömegszámú

izotópok beszerzését követően a mérések megerősítették korábbi eredményeinket: a jelölt $^{13}\text{C}_6$ szubsztrátokból $^{13}\text{C}_6$ tartalmú szorbit keletkezett. A szokásos és korábban az invertáz méréseknél általunk is alkalmazott 100 mM-os koncentrációjú szubsztrátok hozzáadásával 0,1-1 mM nagyságrendű mitokondriális szorbitképződést tudtunk kimérni.

Sajnos a rendkívül sok analitikai kudarc (és egy előre nem kalkulált költözés) miatt ezzel elértünk 2013 tavaszára. A kezdeti analitikai nehézségek ellenére, azonban a mitokondriális szorbitképződés terén elért eredményeink biztatóak: az alaphipotézisünket sikerült igazolnunk. Valóban képződik szorbit a növényi mitokondriumban. A pályázat támogatott időtartamán túl is mindenképpen tovább folytatjuk vizsgálatainkat. Jelenleg zajlik a szorbitképződés kinetikai paramétereinek, inhibíciós profiljának leírása. Ezt követően kerül sor a stressz vizsgálatok elvégzésére. Az LC-MS-MS alkalmazása rendkívüli mértékben meggyorsította a kísérletek menetét, reményeink szerint még ebben az évben közreadhatjuk eredményeinket.

Szénhidrátok terén folytatott kutatásainkat a mitokondrium mellett kiterjesztettük a Golgi apparátus nukleotid-cukor transzportereire is. A Golgiban történő glikozilációhoz szükség van nukleotid-cukor transzportra, hogy a cukrok beépüljenek a glikoproteinekbe. Lengyel együttműködő partnereinkkel az UDP-galaktóz transzporterét vizsgáltuk, MDCK (kutya vese) és CHO (hörcsög ovárium) sejteken. Ezen sejtek esetében ismert azok UDP-galaktóz transzporter mutánsuk (MDCK-RCAr, illetve CHO-Lec8). Kimutattuk, hogy mindkettőben 2 splicing variáns létezik (ez idáig csak egy volt ismert, MDCK-ban az UGT1-ről, CHO-ban az UGT2-ről). Így feltételezhető, hogy emlősökben általánosan mindkét variáns megtalálható (emberben már leírásra is került). A mutáns sejtek kismértékben kondroitin-szulfát alultermelőnek bizonyultak, amit mindkét variáns overexpressziójával javítani tudtunk. Az MDCK-RCAr sejtek nem termelnek keratán-szulfátot, de ezt nem lehetett komplementálni overexpresszióval. Feltételezhető, hogy ezek a sejtek valami másra is mutánsok. Eredményeinkből sikeres publikáció született (Maszczak-Seneczko et al 2011).

2. A mitokondriális aszkorbát szintézis/felhasználás (oxidáció), illetve a képződött oxidált forma (DHA) reciklásának (redukciójának) vizsgálata

Tekintve, hogy az aszkorbát bioszintézise a mitokondriális elektrontranszfer lánchoz kapcsolt folyamat, így mind a bioszintézis, mind a reciklás vizsgálatára kiváló lehetőséget ad a ppr-40 mutáns *Arabidopsis thaliana* növény. Ez a mutáns az egyetlen jelenleg ismert mitokondriális III-as komplex mutáns. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a III-as komplexnél bekövetkező elektron áramlási blokk igen jelentős mértékű reaktív oxigénvegyület szint emelkedéssel, lipidperoxidációval jár együtt. A csökkent mértékű III-as komplexen keresztüli elektronáramlás fokozott IV-es komplexen bekövetkező aszkorbátfogyást eredményez. Az aszkorbátfogyás sebessége tehát több ok miatt is megnő a mutáns növényekben.

Így nem meglepő, hogy az aszkorbát (dehidroaszkorbátból történő) regenerációjáért felelős folyamat, Foyer-Halliwell-Asada ciklus minden enzimének emelkedet aktivitását tapasztaltuk

a mutáns növényekben és az azokból izolált mitokondriumokban a vad típusú növényekhez viszonyítva. A ciklus enzimeinek emelkedett aktivitása együtt járt a redukcióhoz elektronokat szolgáltató (elektron donor) glutation mitokondriális szintjének emelkedésével a mutáns növényekben. A dehidroaszorbát redukció glutationfüggő folyamatai, tehát emelkedett aktivitást mutattak a mutáns növények mitokondriumaiban.

Mindezen kompenzációs mechanizmus ellenére jelentősen alacsonyabb össz C-vitamin szint jellemezte a ppr-40 mutáns növényeket. A mutáns növényekből izolált mitokondriumban még jelentősebb mértékben csökkent a C-vitamin szintje, illetve a mitokondriumokban, a teljes növényi szövettel ellentétben, az aszkorbát redox statusa is jelentősen eltolódott az oxidált forma dehidroaszorbát irányába.

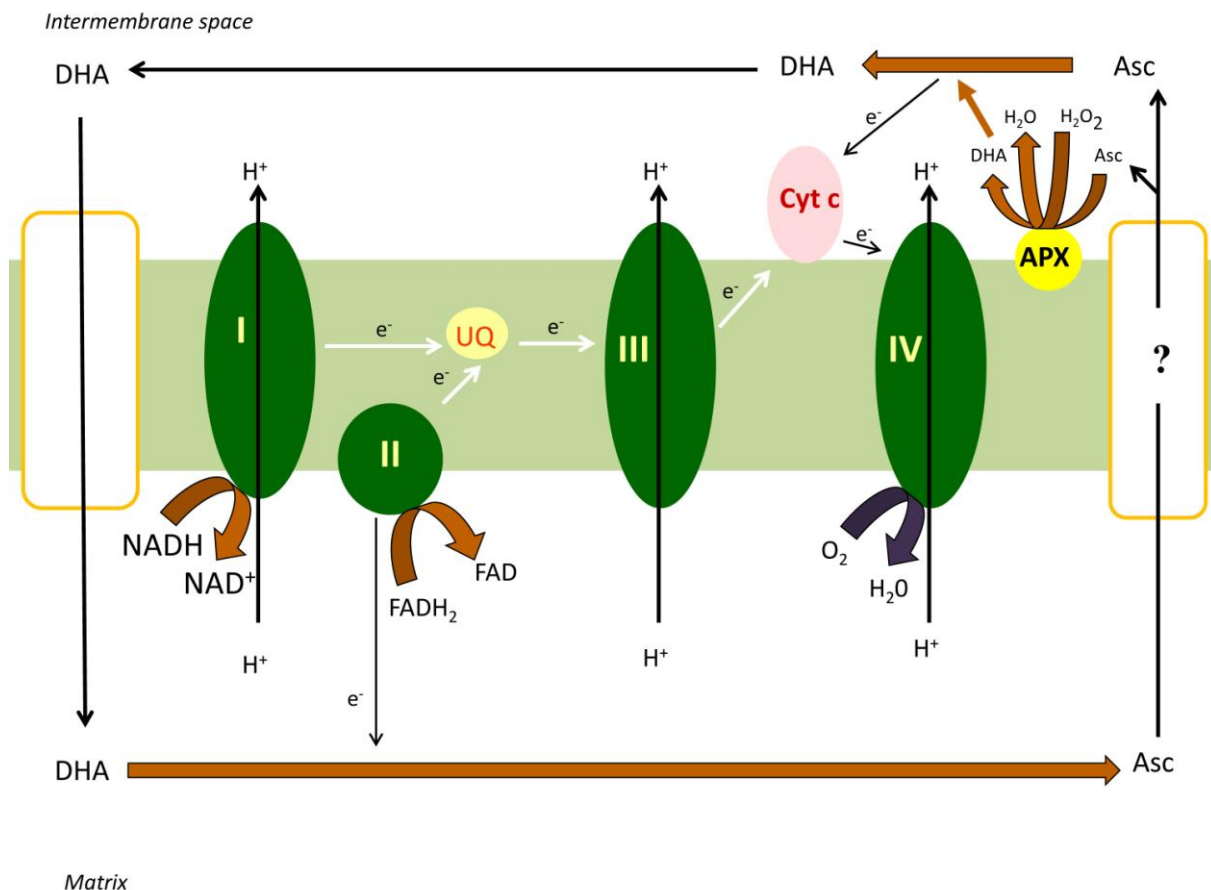
Tekintve, hogy az aszkorbinsav szint három folyamat eredője: szintézis, fogyasztás, regeneráció mindhárom folyamat együttes vizsgálata vezethet eredményre. Így a fokozott fogyás, illetve regenerációt követően megvizsgáltuk a C-vitamin bioszintézis mitokondriumhoz kapcsolt lépésének az L-galaktono-1,4-laktonnak aszkorbáttá történő oxidációját mutáns és vad típusú növényekben.

Az átalakítást végző L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz enzim mRNS szintje nem változott meg. Ezzel szemben 25%-os enzimaktivitás fokozódást tapasztaltunk. Ez a komplex III hiányos mutánsban magyarázható a citokrom c magasabb oxidáltsági fokával. Hisz az L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz kizárólag oxidált citokrom c-t használ elektronakceptorként.

A modellrendszeren kapott eredményeinket a Plant Physiology and Biochemistry (IF 2.838) folyóiratban megjelent cikkünkben (Zsigmond et al 2011) közzeltük.

Túlélő – dehidroaszorbát-aszkorbát redox páron keresztül zajló – elektron kerülőút vonal a növényi mitokondriumban

Laboratóriumunk 2007-ben számolt be a növényi mitokondriumban található dehidroaszorbát-aszkorbát ciklusról. A ciklus értelmében a dehidroaszorbát transzporterén keresztül bejut a mitokondriumba, ahol a II-es komplexről származó elektronok redukálják a komplex mátrix felé eső oldalán. Az akkumulálódott, redukált aszkorbinsav egy része jelenleg még nem tisztázott módon kijut a mitokondriumból, ahol egy hányada oxidálódik elektronokat juttatva a IV-es komplexnek. A leírásra került – III-as komplexet kikerülő – elektron transzfer út vonal a mitokondriális respirációs lánc esetleges sérülése esetén képes lehet annak erősen redukált állapotát csillapítani, így a fokozott ROS képződést mérsékelni. Az elektron kerülőút vonal szintén túlélési lehetőséget biztosíthat a III-as komplex esetleges sérülése esetén, azt megkerülve elektronokat juttathat a IV-es komplexre (1. ábra).

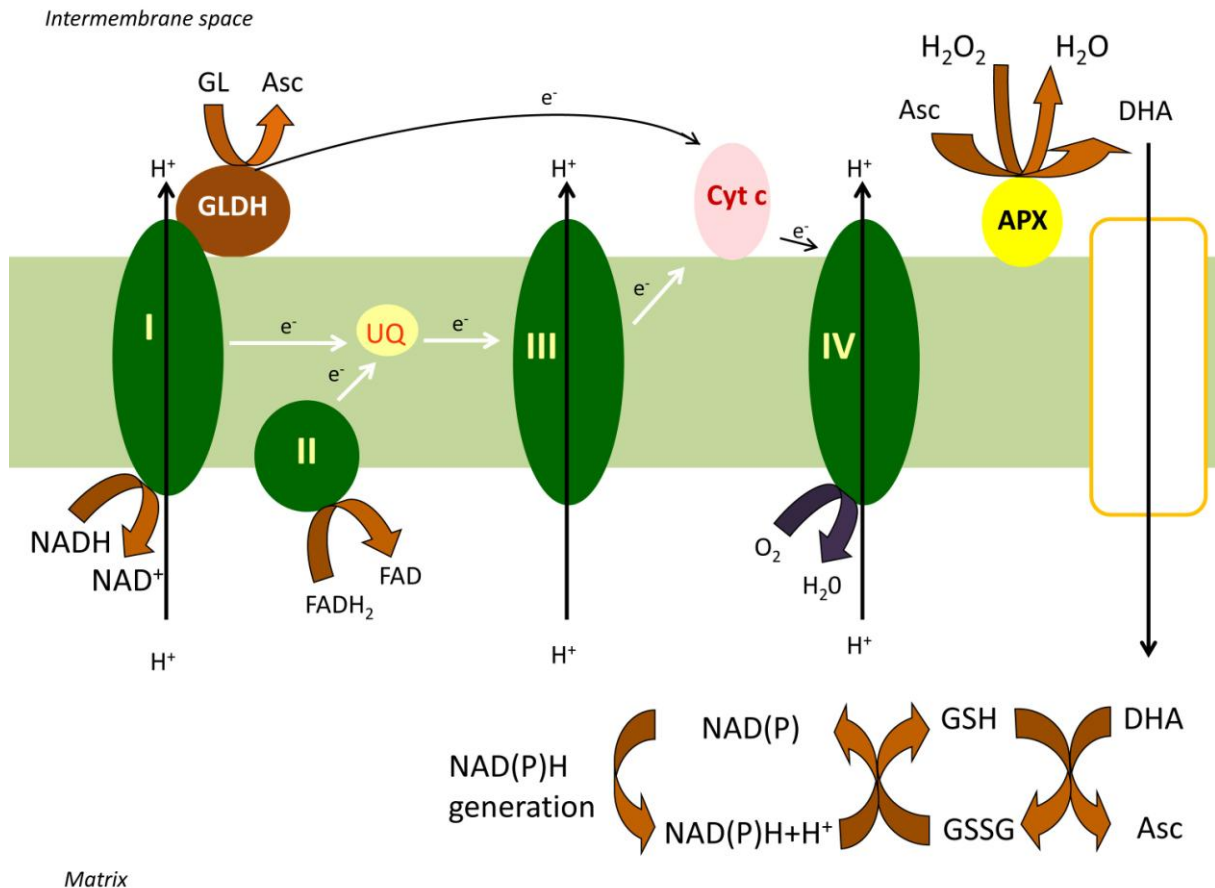


1. ábra. A DHA respirációs elektronok terhére történő mitokondriális redukciója

Az útvonal legkevésbé ismert része a mitokondriális mátrixból kifelé irányuló aszkorbinsav transzport volt. Ezen transzportfolyamat feltérképezése azért fontos, hogy eldönthessük, a II. komplex által regenerált aszkorbát képes lehet-e elektront biztosítani a IV. komplex számára (1. ábra). A kísérletek során az izolált mitokondriumhoz szukcinátot (II. komplex szubsztrát) és dehidroaszkorbinsavat adtunk, majd a II-es komplex közreműködésével regenerált aszkorbát extramitokondriális megjelenését vizsgáltuk az idő függvényében. 5, 10 illetve 30 perc után termináltuk a reakciót, mind a mátrix frakció, mind pedig az extramitokondriális frakció esetében. Érdekes módon a mátrix frakcióban a dehidroaszkorbát adagolását követően szinte azonnal megjelenik a redukált aszkorbát, azonban a mitokondriumból csak meglehetősen hosszú latencia után jut ki. Vizsgálataink kiegészítettük a respiráció oxigraphos vizsgálatával is, mely során azt tapasztaltuk, hogy bár aszkorbáttal sikerült újraindítani a légzést a III-as komplex gátlását követően, azonban dehidroaszkorbáttal nem. Mindezek alapján azt valószínűsítjük, hogy a regenerált aszkorbát mitokondriumból kifelé irányuló transzportja a szűk keresztmetszet, ez lehet a sebesség meghatározó lépés, ami megakadályozza a folyamat fiziológiás jelentőségű lejátszódását. A folyamatot, illetve az aszkorbinsav növényi mitokondrium és kloroplaszt között betöltött közvetítő szerepével kapcsolatos elképzeléseinket az antioxidáns szakterület vezető folyóiratában az *Antioxidants and Redox Signalling*-ben (IF 8.456) közzöltük 2013-ban (Szarka et al 2013).

Mitokondriális DHA regenerációs mechanizmusok azonosítása

A DHA redukciójához különböző elektrondonorok jöhetnek számításba (eddig növényi mitokondrium esetében a GSH és a mitokondriális elektrontranszfer lánc szerepe igazolt (1. és 2. ábra)). A jelöltek redox státusának, valamint fogyásának részletes analízise alapján eldönthető, hogy az egyes jelöltek milyen mértékben járulnak hozzá a dehidroaszorbát mitokondriális redukciójához.



2. ábra. A DHA GSH terhére történő mitokondriális redukciója

Arabidopsis sejtekből izolált mitokondriumot nagy DHA dózissal tettünk ki légzési szubsztrátok és különböző respirációs inhibitorok jelenlétében, illetve távollétében. Az ASC/DHA belső koncentrációját, és az ezzel együtt járó DHA aszkorbáttá történő redukciójának sebességét HPLC-vel követtük nyomon. Így ezen vizsgálatokból meghatározhatjuk a mitokondriális elektron transzfer lánc hozzájárulását a mitokondriális DHA reciklációhoz (redukcióhoz).

A DHA redukciós vizsgálatokat elvégeztük BSO kezelt, GSH-depletált sejtekből izolált mitokondriumokon is. Így meghatározhatjuk a GSH (Foyer-Halliwell-Asada ciklus) hozzájárulását a mitokondriális DHA reciklációhoz (redukcióhoz) (2. ábra). Ebben az esetben érdekes módon azt találtuk, hogy a BSO szinte teljes (90%-os koncentrációcsökkenés) GSH depléciót idézett elő celluláris szinten, addig a mitokondriális GSH szint mindössze 45%-kal csökkent a kezeltlen vonalakkhoz képest. A mitokondrium tehát akkumulálja a GSH-t. Továbbá a BSO kezelés hatására mindössze 15%-os DHA redukciós kapacitáscsökkenés

következett be. Ez nem meglepő, hisz a DHA redukciója összetett folyamat (ahogy említettük a respirációs elektrontranszfer láncról is érkeznek elektronok). A kísérleti eredmények alapján meghatároztuk a két jelenleg ismert mitokondriális DHA reciklálási folyamat, a GSH függő Foyer-Halliwell-Asada ciklus és a mitokondriális elektrontranszfer lánc (1. és 2. ábra) hozzájárulását, egymáshoz viszonyított arányát a mitokondriális DHA redukcióban. Eredményeinkből kéziratot készítettünk, amely jelenleg elbírálás alatt áll (Szarka 2013 közlésre benyújtva).

A növényi sejtek stressz-tűrő képességében három egymással szoros kapcsolatban levő antioxidáns kiemelt szereppel bír. Ezek az aszkorbinsav, a glutation és az α -tokoferol. A három antioxidáns stressz alatt betöltött szerepével, illetve interakciójával kapcsolatos elképzeléseinket egy összefoglaló dolgozat keretében közöltük az International Journal of Molecular Sciences (IF 2.598) folyóiratban (Szarka et al 2012.).

A mitokondriális aszkorbát/dehidroaszkorbát szerepe biotikus stresszben

Kutatásainkat kiterjesztve, vizsgáltuk a növényi sejtek biotikus stresszválaszát is. Kitüntetett figyelmet szenteltünk a mitokondrium szerepének a növényi sejtek ún. hiperszenzitív reakciójában. A folyamatra összetett, sejten belüli és sejtek közötti szignaling jellemző, melyben a mitokondrium mint az egyik legjelentősebb szignál (ROS) forrása, illetve mint a különféle szignálok integráló sejtorganellum központi szereppel bírhat. A módszerek nagy részét *Arabidopsis thaliana* Col-0 szuszpenziós sejt kultúrán beállítottuk. A stressz modellezésére szalicilsav kezelést alkalmaztunk. Kimutattuk, hogy a sejtek oxigén-fogyasztására, AOX1a expressziójára, illetve aszkorbinsav koncentrációjára/redox státuszára sajátos időbeli lefutás jellemző, az alkalmazott kezelési koncentráció függvényében.

Növénypatogén baktériumokból származó elicitor fehérjékkel stressz-modellt állítottunk fel. Jelenleg több konstrukció is rendelkezésünkre áll, melyek *Erwinia amylovora* és *Pseudomonas syringae* pv. tomato eredetű harpin fehérjék *E. coli*-ban történő termeltetésére alkalmasak. Néhány fehérjét már sikerült nagy mennyiségben termelnünk és affinitás kromatográfiával nagy tisztaságban kinyernünk.

3. A mitokondriális aszkorbát/dehidroaszkorbát anyagcsere vizsgálata, különös tekintettel a redox folyamatokra emlős/humán sejteken

A DHA redukciós kísérleteket mitokondriális DNS fosztott Rho0-ás sejtek esetében is elvégeztük. Ezek a sejtek a teljes egészében magban kódolt II-es komplex kivételével egyik respirációs komplexet sem fejezik ki. Így ezen a modellen a II-es komplex DHA redukcióban betöltött szerepe elegánsan vizsgálható. A vizsgálatokhoz szükséges Rho0-ás sejt vonalat öt egymástól független kísérlet során sikeresen állítottuk elő HepG2 sejtek felhasználásával. A sejtek anaerobicitását, mind real-time PCR, mind oxigráfós mérésekkel igazoltuk. A Rho nullás sejtek esetében a DHA adagolás kezdetén (1 órát követően) lényegesen kisebb mértékű (harmad akkora) DHA felvételt tapasztaltunk a kontroll sejtekhez képest. Azonban a 2. óra

után a kontroll sejtekétől jelentősebbet (másfélszeresét), majd a két sejtvonal a 3. és 4. órában teljesen szinkron vették fel a DHA-t.

A DHA redukció folyamatát számos esetben összefüggésbe hozták tiol vegyületek oxidációjával, mint a Foyer-Halliwell-Asada ciklus vagy az oxidatív folding az endoplazmatikus retikulumban (ER). A közelmúltban fény derült arra, hogy az oxidatív fehérje folding, mint elektron átmenettel lejátszódó redox reakció az ER-en kívül a mitokondriális intermembrán térben (IMS) is lejátszódhat.

mtDNS-fosztott rho0-sejteken vizsgáltuk a mitokondriális respirációs lánc inaktiválásának hatását az oxidatív foldingban szerepet játszó (enzim, ill. szubsztrát) fehérjék expressziójára és redox állapotának változására. Az expressziós különbségeket RNS és fehérje szinten is vizsgáltuk RT-PCR illetve Western-blot technikával. Megfigyeltük, hogy a folyamatban kulcsfontosságú ERV1 szulfhidril-oxidáz aktivitású enzim expressziója a rho0 kezelés hatására egyértelmű növekedést mutat HepG2 sejtekben. Később ezt az expressziós különbséget két másik humán sejtvonal (HELA, SK-mel) esetében is kimutattuk. Az expressziós különbségek mellett a fehérjék redox állapotának változásait is detektáltuk a fehérjék redukált tiol-csoportjainak alkilálását követő Western-blot analízissel.

A légzési elektrontranszport lánc komplexekének specifikus inhibitorokkal történő blokkolásával igyekeztünk megbizonyosodni arról, hogy az ERV1 enzim mennyiség növekedése valóban az oxidatív folding blokkolásához köthető, és nem a rho0 kezelés aspecifikus hatása. Ezen kívül megvizsgáltuk a működésképtelen légzési láncsal rendelkező illetve kontroll sejtek DHA redukáló képességét.

Eredményeinkből jelenleg folyik a kézirat elkészítése.

Drog indukálta oxidatív stressz hatása emlős mitokondrium antioxidáns háztartására, élettani funkcióira

Kísérleti állatok májsejtjeiben subletális acetaminofen dózissal (450 mg/tkg, 12 órás kezelés) markáns oxidatív stresszt váltottunk ki. Az állatok máját eltávolítottuk, majd a májsejtekből különböző sejtfrakciókat izoláltunk: mitokondrium, mikroszóma, citoplazma. Az egyes sejtfrakciókból meghatároztuk az antioxidáns glutation szintjét. A kontroll (nem kezelt) állatokból származó sejtfrakciókhoz képest legmarkánsabb glutation szint csökkenést a mitokondriális frakcióban mértük. A mitokondriumok oxidatív stressz következtében bekövetkező funkcionális változását (romlását) a mitokondriális membránpotenciál meghatározásával követtük nyomon. (A mitokondriális membránpotenciál meghatározásához szükséges fluoreszcens módszert olasz partnerlaboratóriumunk (Campobasso Egyetem) segítségével meghonosítottuk laboratóriumunkban.) Az (acetaminofen kiváltotta) oxidatív stressz a mitokondriális funkció (membránpotenciál) igen jelentős (80%-t meghaladó) csökkenését eredményezte. A membránpotenciál összeesésével párhuzamosan a kaspáz független apoptotikus útvonal egyik jellemző momentuma az AIF (apoptosis inducing factor) mitokondriumból sejtmagba történő áthelyeződése is bekövetkezett. Az oxidatív túlsúly ellen hathat a fontos vízzoldható antioxidáns, aszkorbát. Így megvizsgáltuk az acetaminofen kiváltotta oxidatív stressz modellünkben, hogy változik meg az aszkorbát regenerációs ciklus. Eredményeink értelmében – a növényi sejtekben tapasztaltakhoz hasonlatosan – az aszkorbát regenerációja több részfolyamatra bontható: a glutation függő aszkorbát regenerációra és a mitokondriális respirációs lánc-függő regenerációra. A IV-es komplex állati mitokondriumok

esetében is jelentékeny aszkorbát fogyasztónak bizonyult, amelyet a IV-es komplex gátlószer kálium-cianiddal elvégzett kísérleteink igazoltak.

Az állati modellrendszeren kapott eredményeink döntő részét 2010-ben az Applied Toxicology and Pharmacology (IF 3.993) folyóiratban megjelent cikkünkben (Nagy, Szarka et al 2010) közzeltük.

Aszkorbinsav meghatározással kapcsolatos módszerfejlesztések

A jelentős aszkorbát meghatározási igény miatt különböző C-vitamin meghatározási módszerek optimalizálásával is foglalkoztunk. Két egyszerűen és gyorsan kivitelezhető, fotometriás aszkorbinsav meghatározási módszer fejlesztését, és validálását végeztük el, majd analitikai jellemzőiket összevetettük egymással, illetve referenciaként egy általánosan alkalmazott folyadékkromatográfiás technikával. Az egyik módszer a minta aszkorbinsav tartalmától is függő redukáló erővel arányos jelet szolgáltat, míg a másik módszer esetében az aszkorbinsavból aszkorbinsav-oxidáz enzim katalizálta folyamatban keletkező dehidroaszkorbinsav mennyiségét detektáljuk. Az összehasonlítás során növényi élelmiszerminták parallel meghatározásával is foglalkoztunk. A meghatározási módszerekkel kapcsolatos eredményeket, következtetéseket és tapasztalatokat egy analitikai jellegű kéziratban foglaljuk össze, melyet a közeljövőben kívánunk benyújtani.

Az OTKA támogatás feltüntetésével született folyóirat közlemények

Szarka A, Bánhegyi G, Asard H. The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration. *Antioxid Redox Signal*, doi:10.1089/ars.2012.5059. IF: 8,456

Szarka A, Tomasskovics B and Bánhegyi G (2012) The ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 4458-4483. IF: 2.598

Szarka A, Bánhegyi G (2011) Oxidative folding: recent developments *BioMol Concepts* 2: 379-390.

Zsigmond L, Tomasskovics B, Deák V, Rigó G, Szabados L, Bánhegyi G, Szarka A (2011) Enhanced activity of galactono-1,4-lactone dehydrogenase and ascorbate – glutathione cycle in mitochondria from Complex III deficient *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 49: 809-815. IF: 2,838

Tomasskovics B, Szarka A (2011) Comparison of mannitol and xylitol as osmolytes in preparation of mitochondria *IFMBE Proc* 37: 1362-1365.

Maszcak-Seneczko D, Olczak T, Wunderlich L, Olczak M. (2011) Comparative analysis of involvement of UGT1 and UGT2 splice variants of UDP-galactose transporter in glycosylation of macromolecules in MDCK and CHO cell lines, *Glycoconjugate Journal* 28: 481-492,. IF: 2,700

Nagy G, Szarka A, Lotz G, Dóczy J, Wunderlich L, Kiss A, Jemnitz K, Veres Z, Bánhegyi G, Schaff Z, Sümegi B, Mandl J. (2010) BGP-15 inhibits caspase-independent programmed cell death in acetaminophen-induced liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 243: 96-103. IF: 3,993