

Vízoldható antioxidánsok kéz a kézben: C-vitamin és Glutation

MTA doktori értekezés tézisei

Szarka András

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék

2016.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. C-vitamin anyagcsere és transzport a sejtben és a mitokondriumban

1.1.1. C-vitamin bioszintézis és reciklálás

A C-vitamint, vagy más néven aszkorbinsavat mellékveséből, narancsból és káposztából elsőként Szent-Györgyi Albert izolálta 1928-ban. A tiszta formájában fehér kristályos anyag több fontos biokémiai reakció résztvevője. Kiemelkedő szereppel bír a sejtek antioxidáns kapacitásának biztosításában, mind a növények, mind az állatok esetében, illetve számos enzim kofaktora.

Az ember néhány más emlőssel (pl.: tengeri malac, gyümölcssevő denevér) és a verébalakú madarakkal egyetemben elveszítette az aszkorbinsav bioszintézisének képességét, ezért megszerzésére külsődleges, elsősorban növényi, forrásokra szorulunk. Érdekes, hogy az aszkorbát szintézisére képes állatokban folyó reakciók mintegy öt évtizede ismeretesek, addig a növényekben folyó aszkorbát bioszintézis útvonala 1998-ig ismeretlen volt.

Az útvonalat jellegzetes közttermékeiről D-Mannóz/L-Galaktóz, vagy felfedezőiről Smirnof-Wheeler útvonalnak nevezték el (Wheeler és mtsai 1998). Röviddel a Smirnof-Wheeler útvonal leírását követően egyértelművé vált, hogy nem ez az egyetlen aszkorbinsav bioszintetikus útvonal, alternatív, kisebb jelentőségű útvonalak is léteznek. Az alternatív útvonalakból származó aszkorbát, azonban nem képes a fő útvonal mutációiból fakadó alacsony aszkorbát szintet kompenzálni (Dowdle és mtsai 2007, Szarka és mtsai 2012). A Smirnof-Wheeler útvonal lépései, az utolsó kivételével, a citoszolban játszódnak le. Az utolsó lépést katalizáló enzim, az L-galaktono- γ -lakton dehidrogenáz (GLDH) a mitokondrium belső membránjában található, szoros kapcsolatban a mitokondriális elektrontranszfer láncsal (Bartoli és mtsai 2000).

A megfelelő aszkorbát szint fenntartásában, a bioszintézis mellett, fontos szerepet kap az aszkorbát (oxidált formáiból történő) reciklálása (Szarka és mtsai 2012). A bioszintetikus útvonal megismerésével nagyjából azonos időben, a glutation (GSH) függő aszkorbát regenerációs útvonal, az aszkorbát-glutation ciklus, mind a négy enzimének (aszkorbát peroxidáz, monodehidroaszkorbát reduktáz, dehidroaszkorbát reduktáz, glutation reduktáz)

Wheeler GL, Jones MA, Smirnof N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365-369, 1998.

Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, Smirnof N. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J* 52: 673-689, 2007.

Szarka A, Tomasskovics B, and Banhegyi G. The ascorbate-glutatione-a-tocopherol triad in abiotic stress response. *Int J Mol Sci* 13: 4458-4483, 2012.

Bartoli CG, Pastori GM, Foyer CH. Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol* 123: 335-344, 2000.

mitokondriális (és peroxiszómális) jelenléte is leírásra került (Jimenez és mtsai 1997).

Mindezen megfigyelések egyértelműen arra utaltak, hogy a mitokondrium központi szerepet tölt be a növényi aszkorbát anyagcserében.

1.1.2. C-vitamin transzport a növényi sejtekben

Növényekben az aszkorbát minden szövetben és sejtorganelumban megtalálható (Zechmann és mtsai 2011). Tekintve, hogy mind a négy aszkorbát bioszintetikus útvonal utolsó lépése a mitokondriális belső membránhoz kötött ez csak úgy képzelhető el, hogy az aszkorbát a többi sejtorganelumba szállítódik (Horemans és mtsai 2000). Ezen kívül az aszkorbát szétoztása a növényen belül, a forrás szövetektől a felhasználó szövetek felé a phloemen keresztül történik (Franceschi és Tarlyn, 2002). Növényekben a plazmamembránon keresztüli aszkorbát transzport folyamatok ismertek a legrészletesebben, azonban egyetlen vizsgált növény esetében sem volt egyértelműen eldönthető a transzportált forma redox státusza.

Kísérletes munkánk kezdetekor a szubcelluláris aszkorbát transzport folyamatok meglehetősen kevésbé voltak ismertek. Egyedül a kloroplaszt C-vitamin transzportját jellemezték részletesebben. 2015 év elejéig egyetlen aszkorbát transzportert sem sikerült növényi sejtekben egyértelműen azonosítani. Így igazi áttörésnek számított, amikor az *Arabidopsis thaliana* foszfát transzporter 4 egyik családtagjáról, az AtPHT4;4-ről kimutatták, hogy membránpotenciál- és Cl⁻-függő módon szállítja az aszkorbátot (Miyaji és mtsai 2015).

1.1.3. C-vitamin transzport a humán sejtekben

C-vitamin szükségletünket természetes források és étrend kiegészítők fogyasztásából fedezzük. A C-vitamin, étrendben található leggyakoribb formája, az aszkorbinsav és annak oxidált formája, a DHA. Mindkettő az emberi bélrendszer teljes hosszában felszívódik (Malo és Wilson 2000). A redukált forma, az aszkorbinsav, felvétele aktív mechanizmus során valósul meg, két nátrium-függő C-vitamin transzporter (SVCT1 és SVCT2) segítségével (Savini és mtsai 2008). A DHA felvétele kis affinitású nátrium-független facilitált diffúzióval történik (Wilson 2005).

Jimenez A, Hernandez JA, Del Rio LA, and Sevilla F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* 114: 275–284, 1997.

Zechmann B, Stumpe M, Mauch F. Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta* 233, 1–12. 2011.

Horemans N, Foyer CH, Potters G, Asard H. Ascorbate function and associated transport systems in plants *Plant Physiol. Biochem.* 38 531–540 2000.

Franceschi VR, Tarlyn NM. l-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiology* 130, 649–656. 2002.

Miyaji, T., Kuromori, T., Takeuchi, Y., Yamaji, N., Yokosho, K., Shimazawa, A., Sugimoto, E., Omote, H., Ma, J.F., Shinozaki, K., et al. AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 6:5928. 2015.

Malo, C., Wilson, J.X.: Glucose modulates vitamin C transport in adult human small intestinal brush border membrane vesicles. *J. Nutr.*, 130, 63-69. 2000.

Savini, I., Rossi, A., Pierro, C., et al.: SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids*, 2008, 34, 347-355.

A GLUT és SVCT transzporterek endomembránokban való eloszlásáról vajmi keveset tudunk. A szubcelluláris transzportfolyamatok közül a mitokondriális belső membránon keresztül zajló C-vitamin transzportra fókuszáltunk. A közelmúltig úgy gondoltuk, hogy a DHA, a C-vitamin transzportformája és a GLUT transzporterek felelősek a C-vitamin mitokondriális transzportjáért. 2013-ban azonban az SVCT2 transzporter mitokondriális kifejeződéséről számoltak be, ami felvetette az aszkorbát mitokondriális belső membránon keresztüli transzportjának lehetőségét (Azzolini és mtsai 2013).

1.2. A páros másik fele: a glutation

A GSH igen jellemző sajátossága, a többi sejtben található tiol vegyülethez képest mérhető magas koncentrációja. Általában elmondhatjuk, hogy milliomol koncentrációban fordul elő. A sejtes glutation másik jellegzetes sajátossága nagyfokú redukáltsága. (Mhamdi és mtsai 2010, Noctor és mtsai 2011). Nem véletlenül tartják a C-vitamin mellett a legfontosabb vízoldható antioxidánsnak. A két vízoldható antioxidáns anyagcseréje gyakorlatilag egymástól elválaszthatatlan számos esetben láthatunk például a C-vitamin és a GSH szinergikus hatására (pl. aszkorbát-glutation ciklus, Szarka és mtsai 2012). Szerepét az antioxidáns háztartásban igen gyakran hiányán keresztül vizsgálják, amely a γ -glutamilcisztein szintáz gátló BSO alkalmazásával, illetve az extrém mértékű GSH felhasználó acetaminofen (APAP) kezeléssel érhető el.

1.3. Tiol – diszulfid átalakulás a fehérjékben: oxidatív folding

A cisztein oldalláncok tiol csoportjai között létrejövő kovalens kötés (diszulfid híd) a legerősebb kapcsolat, amely a fehérjék harmadlagos szerkezetét stabilizálja. A fehérjék diszulfid kötése elsősorban az eukarióta sejtek endoplazmás retikulumában (ER) és a bakteriális periplazmás térben alakulnak ki. A cisztein oldalláncok tiol csoportjainak oxidációja folyamatos, a végső elektronakceptor(ok) irányába, folyó elektronáramot kíván meg. Ez az elektronáram egy elektrontranszfer láncon keresztül valósul meg, amely fehérjékből illetve kis mol súlyú komponensekből áll (Szarka és Bánhegyi 2011, Szarka és Lőrincz 2014). 10 évvel ezelőtt igen nagy meglepetést okozott a felfedezés, amely szerint számos mitokondriális

Wilson J.X.: Regulation of vitamin C transport. *Annu. Rev. Nutr.*, 25, 105-125. 2005.

Azzolini C, Fiorani M, Cerioni L, Guidarelli A, Cantoni O Sodium-dependent transport of ascorbic acid in U937 cell mitochondria. *IUBMB Life* 65:149-153. 2013.

Mhamdi, A.; Hager, J.; Chaouch, S.; Queval, G.; Han, Y.; Taconnat, L.; Saindrenan, P.; Gouia, H.; Issakidis-Bourguet, E.; Renou, J.P.; et al. *Arabidopsis glutathione reductase1* plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *J. Plant Physiol.* 153, 1144–1160. 2010.

Noctor, G.; Mhamdi, A.; Chaouch, S.; Han, Y.; Neukermans, J.; Marquez-Garcia, B.; Queval, G.; Foyer, C.H. Glutathione in plants: An integrated overview. *Plant Cell Environ.* 2, 454–484. 2011.

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

Szarka A., Lőrincz T., The role of ascorbate in protein folding, *Protoplasma* 251 (3) 489–497. 2014.

membránközti térben található, vagy arrafelé néző fehérje rendelkezik diszulfidkötéssel (Deponte és mtsai 2009). A membránközti térben található oxidatív folding gépezet a MIA40 és az ERV1 (ALR) fehérjékből áll. A fehérje tiol csoportokról származó elektronokat pedig a citokróm c-n, majd a citokróm c oxidázon keresztül molekuláris oxigénre juttatja.

2. Célkitűzések

A növényekben folyó C-vitamin bioszintetikus út felderítése több kérdést és lehetőséget vetett fel, mint amennyit megválaszolt, lezárt. Így kiemelt jelentőséget kapott a növényi (és állati) sejteken belüli C-vitamin transzportrendszer, az aszkorbát reciklálásának, annak GSH és alapanyagcserével való kapcsolatának vizsgálata. Ezeket figyelembe véve kutatási célkitűzéseimet két fő részre osztottam:

1. A mitokondriális C-vitamin anyagcsere és transzport vizsgálata

- 1.1. A mitokondriális C-vitamin transzportrendszer leírása, jellemzése
- 1.2. A mitokondriális C-vitamin transzport növényi plazmamembránon keresztüli transzporttal való összevetése
- 1.3. A mitokondriumba jutott dehidroaszkorbát reciklálásának vizsgálata
- 1.4. A mitokondriális C-vitamin, illetve a hozzá szorosan kapcsolódó glutation anyagcsere jellemzése sérült mitokondriális komplex III-mal rendelkező növények esetében
- 1.5. A humán mitokondriális C-vitamin transzport *in silico* vizsgálata
- 1.6. A mitokondriális glükóz transzport hátterének feltárása, az így felfedezett mitokondriális invertáz aktivitás, illetve a hozzá kapcsolódó cukortranszport folyamatok részletes jellemzése

2. A glutation anyagcsere jellemzése

- 2.1. A glutation hiányos állapotok (BSO és acetaminofen kezelés) szerepe a sejthalál folyamatában
- 2.2. Fehérje tiol – diszulfid átalakulások vizsgálata
- 2.3. A mitokondriális légzési elektrontranszfer lánc oxidatív folding apparátusra gyakorolt hatásának tanulmányozása

Deponte M, Hell K. Disulphide bond formation in the intermembrane space of mitochondria. J Biochem 146: 599–608. 2009.

3. Kísérleti módszerek

Növényi sejteken végzett kísérleteinket dohány BY2 (*Nicotiana tabacum*) és lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) szuszpenziós sejt kultúrákon végeztük. A zöld növényi szöveteken végzett kísérleteinkhez kontrollált körülmények között nevelt lúdfű (*Arabidopsis thaliana*), a nem zöld szöveteken végzett kísérleteinkhez pedig lúdfű gyökereket, illetve csicsóka (*Helianthus tuberosus*) gumókat használtunk.

Állatkísérleteinket a Semmelweis Egyetem etikai normáinak megfelelően tartott hím CD-1-es egereken, illetve Wistar patkányokon végeztük a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében.

Emlős sejtes kísérleteinket HepG2 humán máj karcinóma, MCF7 humán mell adenokarcinóma és SH-SY5Y humán neuroblasztóma vonalakon végeztük. Az mtDNS fosztott ρ^0 -sejtvonalakat az előző sejtvonalak hosszú távú etídium-bromid kezelésével hoztuk létre. A primer egér májsejtek izolálása hím NMRI egerekből az MTA TTK-ban történt.

A mitokondriális frakció izolálása egy hetes BY2, ppr-40, vagy Columbia lúdfű sejtenyészetekből, zöld növényből, illetve csicsóka gumókból differenciál és gradiens centrifugálással történt. A szubmitokondriális partikulák preparálása, az így készült mitokondriális frakció, különböző ozmotikus nyomású oldatokkal történő tovább frakcionálásával zajlott.

Az állati eredetű mikroszóma és mitokondrium izolálása hím Wistar patkányok és CD1-es egerek májszövetből differenciálcentrifugálással történt.

A kis molsúlyú anyagok transzportjának meghatározása mitokondrium és mikroszóma eredetű vezikulákon gyorsszűrési módszerrel zajlott.

A sejtes és a mikroszómális glutation meghatározást monoklorobimánnal történő derivatizálást követően fluoreszcens detektorral felszerelt HPLC-vel végeztük. Az aszkorbát koncentráció mérését kétféle fotometriás (OPDA, α, α' -dipiridil), illetve UV-HPLC-vel hajtottuk végre.

A tiol-diszulfid redox állapot meghatározását fehérje minták esetében AMS jelöléssel végeztük.

Az invertáz aktivitás vizsgálatát a képződött monoszacharidok enzimes, illetve RI-HPLC detektálásával hajtottuk végre. A mitokondriumok intaktságának ellenőrzését citokrom c oxidáz aktivitás latenciájának vizsgálatával végeztük. A Galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz, illetve az aszkorbát-glutation ciklus enzimeinek (aszkorbát peroxidáz, monodehidroaszkorbát reduktáz, dehidroaszkorbát reduktáz, glutation reduktáz) aktivitását fotometriás módszerekkel határoztuk meg.

A mitokondriális légzési vizsgálatokat Clark elektród segítségével végeztük. Az aszkorbil gyök meghatározása, elektron spin rezonancia spektroszkópia segítségével történt.

A sejt életképesség vizsgálatokat 96 lyukú lemezek MTT-t teszttel végeztük. Az apoptózis detektálása TUNEL reakcióval történt. A nekrozis mértékét hematoxilin-eozin festett májszeletekből két patológus egymástól függetlenül határozta meg.

A Galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz, az ALR és a CYP2E1 mRNS expresszió vizsgálata real-time PCR-rel zajlott. A mitokondriális oxidatív folding apparátus elemeinek kifejeződését Western blot technikával vizsgáltuk.

A C-vitamin transzporterek mitokondriális lokalizációjának *in silico* vizsgálatát 8 különböző lokalizációt jósoló eszközzel (Target P, Mitoprot II, Predotar, Psort II, MultiLoc/TargetLoc, ngLOC, YLoc, CELLO) végeztük el

A minták fehérjetartalmának mérését Comassie Protein Assay kittel, a gyártó utasításai alapján végeztük.

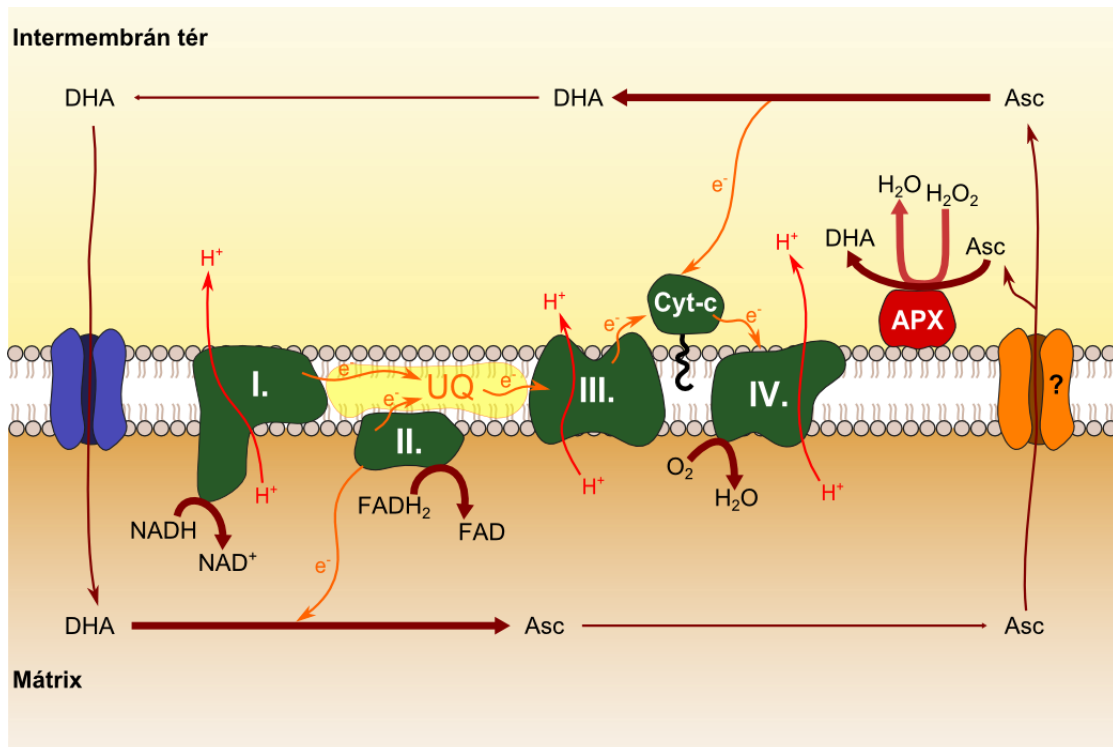
4. Tézispontok (új tudományos eredmények)

1. Leírtuk, hogy a növényi mitokondrium mind az aszkorbátot, mind a dehidroaszkorbátot (DHA) felveszi. Enzimes és nem enzimes oxidálószeres fokozzák a felvett C-vitamin mennyiségét, tehát az oxidált forma, a DHA felvétele preferált. A transzport idő- és hőmérsékletfüggő, telítési kinetikát mutat és specifikus gátlószerekkel gátolható. Mindezen sajátságok alapján kijelenthető, hogy a felvétel, fehérje mediált transzport.
2. Kimutattuk, hogy a növényi mitokondrium, a DHA transzport mellett, kétirányú, idő és hőmérsékletfüggő, specifikus gátlószerekkel gátolható glükóz transzportot is mutat. A GLUT gátlószer genistein, DHA és glükóz transzportra gyakorolt erős gátló hatása, illetve a glükóz, DHA transzport esetében tapasztalt, gátló hatása arra utal, hogy a két molekula ugyanazon transzporter ligandjai lehetnek. A mitokondriális DHA és glükóz transzport mitoplasztok esetében is megfigyelhető, tehát a belső membránban lokalizált transzporter mediálja, amely működése a mitokondriális membránpotenciáltól (légzéstől) független.
3. Igazoltuk, hogy a mitokondriális elektrontranszfer lánc részt vesz a DHA mitokondriális redukciójában. Légzési szubsztrátokkal és gátlószerekkel végzett kísérletek alapján a légzési elektrontranszfer lánc-függő DHA redukció helyszíne a mitokondriális mátrix, elektron donor a komplex II. Komplex II szubsztráttal millimol aszkorbát koncentráció érhető el a mitokondriális mátrixban. A mátrixban a DHA redukció során keletkezett aszkorbát kijut a mitokondriumból és a membránközi térben hozzájárul a komplex IV elektronellátásához, amelynek fontos szerepe lehet stresszhelyzetben a növények életképességének fenntartásában. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a növényi mitokondriális légzési elektrontranszfer lánc nemcsak a C-vitamin bioszintézisében, hanem a (DHA-ból történő) reciklálásában is fontos szerepet játszik.
4. Meghatároztuk a komplex II és a glutation (GSH) függő folyamatok mitokondriális DHA redukcióhoz való hozzájárulásának mértékét növényi sejtekben. A mitokondriális DHA redukcióhoz a GSH függő folyamatok mintegy 20%-ban járulnak hozzá, míg a

komplex II függő redukció ettől lényegesen nagyobb mértékű. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a mitokondriális elektrontranszfer lánc szerepét a mitokondriális aszkorbát reciklálásban eddig jelentősen alábecsülték.

5. Kimutattuk, hogy a mitokondriális III-as komplex mutáns ppr-40 lúdfűben, a III-as komplexnél bekövetkező elektron áramlási blokk, csökkent mértékű légzést (elektrontranszfert) okoz, amely egy kompenzációs mechanizmust indít el. A kompenzációs mechanizmus eredményeként fokozódik a IV-es komplex (citokróm c oxidáz, CCO) és az alternatív oxidáz (AOX) aktivitása, illetve jelentős mértékben megnő a IV-es komplex alternatív elektrondonoraként viselkedő aszkorbát fogyása. Így az aszkorbát nemcsak antioxidánsként, de az alap anyagcsere részeként is hozzájárul a (komplex III) sérült növények életképességének növeléséhez.
6. Kimutattuk, hogy a ppr-40 növényeket mind mitokondriális, mind sejtszinten jóval alacsonyabb és oxidáltabb C-vitamin szint jellemzi. Az aszkorbát (DHA-ból történő) regenerációjáért felelős GSH függő folyamat, az aszkorbát-glutation ciklus minden enzimének aktivitása megemelkedik a ppr-40 mutáns növényekben és az azokból izolált mitokondriumokban, a vad típusú növényekhez viszonyítva. A ciklus enzimeinek emelkedett aktivitása együtt jár a redukcióhoz elektronokat szolgáltató (elektrondonor) GSH mitokondriális szintjének emelkedésével a mutáns növényekben. A C-vitamin bioszintézis utolsó lépését katalizáló, mitokondriális L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz enzim mRNS szintje nem változik meg a ppr-40 mutáns növényekben, azonban aktivitása mintegy 25%-kal megemelkedik, feltehetően az oxidáltabb redox állapotú elektronakceptor citokróm c miatt. A ppr-40 növényekben mérhető jelentősen alacsonyabb teljes C-vitamin szint és a még jelentősebb mértékben csökkent és oxidáltabb mitokondriális C-vitamin szint azt jelzi, hogy a megnövekedett regenerációs és szintetikus kapacitás is kevésnek bizonyult a III-as komplexnél bekövetkező elektronáramlási blokk következtében kialakuló oxidatív stressz és fokozott aszkorbát fogyasztás kompenzálására.
7. Kimutattuk, hogy növényi sejtek esetében a plazmamembránon keresztüli C-vitamin transzport esetében lineáris összefüggés van a külső inkubációs közeg DHA tartalma és a transzportra kerülő DHA mennyisége között, amely egyértelműen bizonyítja a sejtek, a C-vitamin oxidált formája, a DHA irányába mutatott transzport preferenciáját. 100-szoros glükóz és 10-szeres DHA felesleget alkalmazva sem mutatható ki kompetíció a két anyag plazmamembránon keresztüli transzportja között. Ez, valamint az eltérő inhibíciós profil bizonyítja, hogy a növényi sejtekben két különböző típusú nagy affinitású DHA transzportrendszer létezik: a mitokondriális, amely nagy valószínűség szerint hasonló a glükóz transzporterekhez, illetve a plazmamembránban található, amely egyértelműen különbözik a glükóz transzporterektől.

8. Eredményeink alapján valószínűsítjük, a növényi mitokondriumban egy aszkorbát/DHA redox párból álló komplex III-at megkerülő elektrontranszfer út létezését (1. ábra). Az útvonal képes lehet stresszhelyzetekben az elektrontranszfer lánc elemeinek redukáltságát csillapítani, ami egyrészt direkt módon csökkenti a reaktív oxigénvegyületek keletkezését, másrészt az aszkorbát szint fokozásával növeli az antioxidáns védelem hatásfokát. A kerülőút limitáló lépése nagy valószínűség szerint az aszkorbát mátrixból történő kijutása. Ezt bizonyítja, hogy a DHA redukció eredményeként keletkező aszkorbát a mátrixhoz képest jelentős késedelemmel jelenik csak meg az extramitokondriális térben (mitokondriális membránközti térben).



1. ábra Az aszkorbát/DHA kör hipotetikus összefoglaló modellábrája

9. Kimutattuk, hogy a növényi mitokondriumban invertáz aktivitás található. A mitokondrium szubfrakcionálását követően megállapítottuk, hogy az invertáz aktivitás (a mátrix markerenzim fumarázzal együtt) a mitokondriális mátrixhoz volt egyértelműen köthető. Az enzimaktivitás pH optimuma, kinetikai paramétereit, valamint inhibitor profilja alapján az újonnan leírásra került enzim a neutrális invertázok családjába sorolható.
10. Igazoltuk, hogy a mitokondriális invertáz aktivitás kiszolgálására kétirányú, telíthető, valamint mitokondriális membránpotenciáltól független szacharóz, glukóz és fruktóz transzport található a mitokondriális belső membránban. A különböző kinetikai paraméterek, valamint a kereszt-gátlás hiánya arra utalnak, hogy a transzportfolyamatokat három egymástól független transzporter mediálja.

A *Zymomonas mobilis* baktériumban meglévő hasonló szacharóz-glükóz/fruktóz útvonal, amely fontos szerepet játszik a baktérium ozmoregulációjában és a mitokondrium bakteriális eredete alapján könnyen elképzelhető, hogy a magasabb rendű növényekben általunk leírt mitokondriális invertáz rendszer az ozmotikus stressz adaptációs mechanizmus egyik kulcs eleme lehet a mitokondriumban, vagy akár az egész sejtben. A mitokondriális invertáz termékei kiindulási állapot adhatnak az igen kiváló ozmolitek, a cukoralkoholok termelésének, amely által a növények könnyebben birkózhatnak meg a szárazság és a szikes talajok jelentette ozmotikus stresszel.

11. Kimutattuk, hogy az emlős mikroszómális membránon keresztül kétirányú FAD transzport bonyolódik. A transzport a mitokondriális FAD transzport gátló atraktiloziddal, illetve az anion transzporter gátló 4,4'-Diizotiociano-2,2'-stilbén diszulfonsavval gátlható. A FAD felvétel atraktiloziddal történő gátlása megakadályozza a FAD kiváltotta fehérje tiol oxidációt, amely igazolja a FAD szerepét a fehérje tiolok oxidációjában emlős mikroszómális vezikulák esetében.
12. Igazoltuk, hogy *in vivo* acetaminofen (APAP) és butionin-szulfoximin (BSO) kezelés hatására a mikroszómális GSH szint markánsan csökken. A redukált GSH és fehérje tiolok részaránya APAP kezelést követően lényegesen alacsonyabbnak bizonyult, a BSO kezelés ugyanakkor a mikroszómákban lényeges mértékben nem változtatta meg a redukált/teljes GSH arányt. APAP kezelés hatására jelentős mértékben megnövekedett az apoptotikus sejtek száma, azonban a nekrozis mennyiségileg jóval jelentősebb mértékű volt.
13. Kimutattuk, hogy a nekroptózis és az apoptózis mellett egy harmadik programozott sejthalál típus, a ferroptózis is szerepet kap az APAP kiváltotta sejthalál folyamatában primer egér májsejtekben. Eredményeink alapján a ferroptózis gátlószer, ferrostatin-1 védőhatása, nem a csökkent APAP-NAPQI metabolizmusból és nem a megváltozott GSH-val történő NAPQI konjugációból fakad. Az APAP kiváltotta sejthalál folyamatát gátolta a C- és E-vitamin. A C-vitamin, valamint a C- és E-vitamin kombinációjának védőhatása meghaladta a kizárólag önmagában adagolt E-vitaminét.
14. Kimutattuk, hogy a mitokondriális DNS hiányának hatására, a mitokondriális oxidatív folding apparátus fontos eleme, az ALR (Augmenter of Liver Regeneration) fehérjeszintje jelentős mértékben megnő. Az ALR mennyisége nem mutatott változást a sejtek légzési komplex gátló és szétkapcsoló szerekkel történő kezelésére, ezért az ATP, illetve ROS szintek ALR fehérjeszintet szabályozó szerepe nem valószínű. Az ALR részt vesz a mitokondriumok biogenezisében és fenntartásában, ezért könnyen elképzelhető, hogy szintjének megemelkedése a ρ^0 sejtek adaptív válaszában egy része lehet, amely segít a mtDNS-ben kódolt fehérjék kiesése ellenére a mitokondriális belső membrán integritásának és a membránpotenciál megőrzésében. Így az ALR a mtDNS hiánya, a mitokondriális betegségekben és az öregedés során előforduló mtDNS mutációk esetében is hozzájárulhat a mitokondriális funkciók fenntartásához.

Eredményeink alapján, az ALR a gépezet egy fontos alkotója lehet, a mtDNS pedig fontos szabályozó szerepet tölthet be az ALR fehérjeszintjének szabályozásában.

15. A GLUT (SLC2), illetve az SVCT (SLC23) transzporter családok *in silico* lokalizációjának vizsgálatával megerősítettük a GLUT1 és az SVCT2 transzporterek mitokondriális lokalizációját, ugyanakkor megkérdőjeleztük a GLUT10 mitokondriális jelenlétét. Ezen túl valószínűsítjük két újabb, GLUT családtag, a GLUT9 és a GLUT11 mitokondriális elhelyezkedését, illetve felvetjük DHA transzportban való részvételüket.

A kutatás jelentősége, felhasználási lehetőségei

C-vitamin igényünket elsősorban gyümölcsök és zöldségek fogyasztásával elégítjük ki. Kezdetben ez ösztönözte a C-vitamin szintet befolyásoló faktorok kutatását. A skorbut visszaszorulásával, azonban kizárólag privát cégek támogatják az élelmezési célból folytatott kutatásokat, rétegpiacon megszerzése céljából. Az aszkorbát növényi sejtekben betöltött széles szerepköre igencsak indokoltá tette/teszi anyagcseréjének minél alaposabb megismerését. A növényi sejt egyik (ha nem a legfontosabb) redox puffere és számtalan enzim kofaktora: a fotoprotekcióban betöltött szerepe alaposan körbejárt, vitathatatlan (Muller-Moule és mtsai 2002, 2004). Újabban feltárt szerepei a sejt növekedésében, a hormon válaszreakciókban (Pignocchi és Foyer 2003), a programozott sejthalál, az öregedés és a patogéntámadásra adott válaszfolyamatokban (Barth et al. 2004, Chen és Gallie 2004, Conklin 2001, Pastori és mtsai 2003, Vacca és mtsai 2004) egyértelműen megerősítik, hogy fontos faktor biotikus (pl. patogéntámadás) és abiotikus (pl. szárazság, só stressz, meleg és hideg stressz, túlzott napsütés) stressz esetén. Az aszkorbinsav tehát életről és halálról dönthet stresszhelyzetben, ami a növényi biotechnológia egyik kulcsvegyületévé teszi. Általa elérhetjük, hogy az előbb ismertetett stressz hatásoknak ellenállóbb növényeket fejlesszünk ki, amely a szélsőséges időjárási és talajviszonyok jelentette kockázatot, kárt jelentős mértékben mérsékli. Minden aszkorbát metabolizmussal és szintjének szabályozásával kapcsolatos ismeret fontos szerepet játszhat szintjének, általunk, tudatosan kontrollált befolyásolásában. Érdekes módon minden

Muller-Moule P, Conklin PL, Niyogi KK Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiol* 128: 970–977. 2002.

Muller-Moule P, Golan T, Niyogi KK Ascorbate deficient mutants of *Arabidopsis* grow in high light despite chronic photooxidative stress. *Plant Physiol* 134: 1163–1172. 2004.

Pignocchi C, Foyer CH Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Curr Opin Plant Biol* 6: 379–389. 2003.

Barth C, Moeder W, Klessig DF, Conklin PL The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vitamin vtc1. *Plant Physiol* 134: 1784–1792. 2004.

Chen Z, Gallie DR The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell* 16: 1143–1162. 2004.

Conklin PL Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant Cell Environ* 24: 383–394. 2001.

Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer CH Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* 15: 939–951. 2003.

Vacca RA, de Pinto MC, Valenti D, Passarella S, Marra E, De Gara L Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiol* 134: 1100–1112. 2004)9.

eddig a C-vitamin szintjébe történő tudatos mérnöki beavatkozás (amelyek elsősorban a bioszintetikus utat érintették) csak mérsékelt sikert értek el. Ezért különösen fontos szerepet játszhatnak a terület fejlődésében az általunk is leírt transzportfolyamatok. Ettől még jelentősebb szerepet kaphatnak a C-vitamin reciklálásában elért eredményeink. Az oxidált formából történő reciklálás ugyanis igen hatékony módja a C-vitamin szint befolyásolásának (Chen és mtsai 2003, Szarka és mtsai 2012). Jelenleg minden eredmény arra utal, hogy a reciklálás lehet a kulcs a C-vitaminszint tudatos befolyásolásában.

A neutrális invertázok azon túl, hogy kapcsolatot teremtenek a növények szénhidrát és redox háztartása között egyértelműen részt vesznek a növények ozmotikus és vízháztartásának szabályozásában. Az általunk leírt mitokondriális invertáz rendszer az ozmotikus stressz adaptációs mechanizmus egyik kulcs eleme lehet a mitokondriumban, vagy akár az egész sejtben. A mitokondriális invertáz termékei kiindulási alapot adhatnak az igen kiváló ozmolitek, a cukoralkoholok termelésének, amely által a növények könnyebben birkózhatnak meg a szárazsággal és a szikes talajok jelentette ozmotikus stresszel.

Akár közvetlen módon is felhasználhatóak az acetaminofen túladagolás során nyert eredményeink, amelyek alapján a C- és E-vitamin adott arányú kombinációja javasolható bizonyos májat károsító anyagok hatásának tompítására.

Az értekezés a következő 15 publikációra épül

A 15 publikáció összesített impakt faktora: 48.337

1. Balogh T, Lőrincz T, Stiller I, Mandl J, Bánhegyi G, **Szarka A.** (2016) The Level of ALR is Regulated by the Quantity of Mitochondrial DNA. *Pathol Oncol Res.* 22:431-437. IF: 1.855 (Levelező szerző)
2. **Szarka A,** Balogh T (2015) In silico aided thoughts on mitochondrial vitamin C transport *J Theor Biol* 365: pp. 181-189. IF: 2.116 (Levelező szerző)
3. Balogh T, **Szarka A** (2016) A Comparative Study: Methods for the determination of ascorbic acid in small and middle sized food analytic laboratories *Acta Alimentaria* x:(x) Paper 10.1556/AAlim.2015.0017. IF: 0.274 (Levelező szerző)
4. Lőrincz T, Jemnitz K, Kardon T, Mandl J, **Szarka A** (2015) Ferroptosis is involved in acetaminophen induced cell death *Pathol Oncol Res.* 21:1115-21 IF: 1.855 (Levelező szerző)

Chen, Z.; Young, T.E.; Ling, J.; Chang, S.C.; Gallie, D.R. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 3525–3530. 2003.

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

5. **Szarka A** (2013) Quantitative data on the contribution of GSH and Complex II dependent ascorbate recycling in plant mitochondria *Acta Physiol Plant* 35: 3245-3250. IF: 1.524 (Levelező szerző)
6. **Szarka A**, Bánhegyi G, Asard H. (2013) The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration. *Antioxid Redox Signal*, 19(9):1036-44. IF: 7,667 (Levelező szerző)
7. 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 (Levelező szerző)
8. Nagy G, **Szarka A**, Lotz G, Dóczy J, Wunderlich L, Kiss A, Jemnitz K, Veres Z, Bánhegyi G, Schaff Z, Sümegi B, Mandl J. BGP-15 inhibits caspase-independent programmed cell death in acetaminophen-induced liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010 Feb 15;243(1):96-103. IF: 3.993
9. **Szarka A**, Horemans N, Passarella S, Tarcsay Á, Örsi F, Salgó A, Bánhegyi G. (2008) Demonstration of an intramitochondrial invertase activity and the corresponding sugar transporters of the inner mitochondrial membrane in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Planta* 228:765-775. IF: 3,06 (Levelező szerző)
10. Horemans N, **Szarka A**, De Bock M, Raeymaekers T, Potters G, Levine M, Bánhegyi G, Guisez Y. (2008) Dehydroascorbate and glucose are taken up into *Arabidopsis thaliana* cell cultures by two distinct mechanisms. *FEBS Lett*. 582:2714-2718. IF: 3,263
11. Zsigmond L, Rigó G, **Szarka A**, Székely Gy, Ötvös K, Darula Zs, Medzihradszky KF, Koncz Cs, Koncz Zs, Szabados L (2008) The *Arabidopsis* PPR domain protein PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport *Plant Physiol*. 146:1721-1737. IF: 6,11
12. **Szarka A.**, Horemans N., Kovács Z., Gróf P., Mayer M., Bánhegyi G. (2007) Dehydroascorbate reduction is coupled to the respiratory electron transfer chain. *Physiol. Plant*. 129: 225-232. IF: 2,192 (Levelező szerző)
13. Nagy G., Kardon T., Wunderlich L., **Szarka A.**, Kiss A., Schaff Z., Bánhegyi G., Mandl J. (2007) Acetaminophen induces ER dependent signaling in mouse liver *Arch. Biochem. Biophys*. 459: 273-279. IF: 2.578

14. **Szarka A.**, Horemans N., Bánhegyi G., Asard H. (2004) Facilitated glucose and dehydroascorbate transport in plant mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 428: 73-80. IF: 2,657
15. Varsanyi M, **Szarka A**, Papp E, Makai D, Nardai G, Fulceri R, Csermely P, Mandl J, Benedetti A, Bánhegyi G. (2004) FAD transport and FAD-dependent protein thiol oxidation in rat liver microsomes. *J Biol Chem.* 279: 3370-3374. IF: 6,355

Az értekezés témakörében, a Ph.D. fokozat megszerzését követően megjelent további publikációk

1. Balogh T, **Szarka A** (2015) Egy multifunkcionális fehérje: az ALR *Orvosi Hetilap* 156:(13) pp. 503-509. (Levelező szerző)
2. Bánhegyi G, Benedetti A, Margittai E, Marcolongo P, Fulceri R, Nemeth CE, **Szarka A** (2014) Subcellular compartmentation of ascorbate and its variation in disease states. *Biochim Biophys Acta. Mol Cell Res* 1843:(9) pp. 1909-1916. IF: 5.019
3. **Szarka A**, Lőrincz T (2014) The role of ascorbate in protein folding *Protoplasma* 251:(3) pp. 489-497. IF: 2.651 (Levelező szerző)
4. **Szarka A**, Bánhegyi G, Sümegi B (2014) Mitokondrium, oxidatív stressz és öregedés *Orvosi Hetilap* 155:(12) pp. 447-452. (Levelező szerző)
5. Tomasskovics B, Horváth V, Balla J, Örsi F, **Szarka A** (2014) Determination of sorbitol in the presence of high amount of mannitol from biological samples *Per Polytech-Chem Eng* 58:(1) pp. 1-6. IF: 0.296 (Levelező szerző)
6. Balogh T, **Szarka A** (2013) Napfény és C-vitamin *Élelmiszer - Tudomány Technológia* LXVII:(3) pp. 27-28.
7. Csécsy K, **Szarka A** (2013) A növények napirendje: A cirkadián óra és a növényélettani folyamatok kapcsolata *Élelmiszer - Tudomány Technológia* LXVII:(4) pp. 26-29.
8. **Szarka A**, Lőrincz T (2013) A C-vitamin celluláris, intracelluláris transzportja: Fiziológiai vonatkozások *Orvosi Hetilap* 154:(42) pp. 1651-1656. (Levelező szerző)
9. **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: 2.464 (Levelező szerző)
10. **Szarka A**, Bánhegyi G (2011) Oxidative folding: recent developments *BioMol Concepts* 2: 379-390.

11. Tomasskovics B, **Szarka A** (2011) Comparison of mannitol and xylitol as osmolytes in preparation of mitochondria IFMBE Proc 37: 1362-1365. (Levelező szerző)
12. Mandl J, **Szarka A**, Bánhegyi G (2009) Vitamin C: update on physiology and pharmacology. Br J Pharm 157: 1097-1110. IF: 5.204
13. **Szarka A.** (2008) A mitokondrium új szerepkörben. Magyar Kémiai Folyóirat 114: 131-136 (Levelező szerző)
14. **Szarka A.**, Bánhegyi G, Mayer M. (2006) A mitokondrium szerepe a növényi sejt C-vitamin bioszintézisében és redox állapotának szabályozásában. Biokémia, 30: 33–38. (Levelező szerző)

Az értekezés témaköréhez közvetlenül nem kapcsolódó, a Ph.D. fokozat megszerzését követően megjelent további publikációk

1. **Szarka A** (2015) A béta-amiloid és a mitokondriális diszfunkció szerepe az Alzheimer-kór pathogenesisében Ideggyógyászati Szemle-Clinical Neuroscience 68:(7-8) pp. 222-228. IF: 0.386 (Levelező szerző)
2. Bánhegyi G, Margittai E, **Szarka A**, Mandl J, Csala M. (2012) Crosstalk and Barriers Between the Electron Carriers of the Endoplasmic Reticulum. Antioxid Redox Signal, 16: 772-780. IF: 7.189
3. Margittai E, Löw P, **Szarka A**, Csala M, Benedetti A, Bánhegyi G. (2008) Intraluminal hydrogen peroxide induces a permeability change of the endoplasmic reticulum membrane. FEBS Lett. 582: 4131-4136. IF: 3.263
4. **Szarka A.**, Kovács Z., Salgó A.: A Sybr Green I interkalálódó festék és a TaqMan próba összehasonlítása GMO vizsgálatokban. (2006) Élelmezési Ipar LX/4 115-117. (Levelező szerző)
5. **Szarka András**, Bánhegyi Gábor; **Szarka András (ed.)** Pathobiochemistry (Hung) Budapest: Typotex Kiadó, 2014. 78 p. (ISBN:978-963-279-178-4)
6. **Szarka András**, Keszler Gergely; **Szarka András (ed.)** Clinical Chemistry: Laboratory diagnostics (Hung) Budapest: Typotex, 2014. 198 p. (ISBN:978-963-279-176-0)
7. **Szarka András:** Biochemistry II: Biochemical regulation (Hung) Budapest: Typotex, 2014. 126 p. (ISBN:978-963-279-170-8)

8. **Szarka András:** Basic biochemistry Budapest: Typotex, 2014. 149 p. (ISBN:978-963-279-169-2)
9. **Szarka A:** Photosynthesis in Wunderlich L (ed), Szarka A: Basic biochemistry (Hung) Budapest: Typotex, 2014. 237 p. (ISBN:978-963-2791-68-5)
10. **Szarka A:** Glyoxalate cycle in Wunderlich L (ed), Szarka A: Basic biochemistry (Hung) Budapest: Typotex, 2014. 237 p. (ISBN:978-963-2791-68-5)
11. **Szarka A:** The special problems of nutrition: free radicals in Salgó A (ed) Nutritional biochemistry (Hung) National Textbook Publisher Budapest 2011
12. **Szarka A:** The special problems of nutrition: GMOs in Salgó A (ed) Nutritional biochemistry (Hung) National Textbook Publisher Budapest 2011
13. Pézsa N., Kovács Z., **Szarka A.**, Salgó A.: Die Anwendung von real-time-PCR-Methoden zum Nachweis gentechnischer Veränderungen in Sojabohnen, Wissenschaftliche Mitteilungen der 17. Frühlingsakademie (2005), ISBN 963 866 97 3X pp.: 108-112 (Levelező szerző)
14. Pézsa N., **Szarka A.**, Salgó A.: DNA-basierte Identifikation von genetisch modifizierten Lebensmitteln, Wissenschaftliche Mitteilungen der 16. Frühlingsakademie (2004), ISBN 963 8669705, pp.: 95-99 (Levelező szerző)

Összes közlemények száma: 44

Összes SCI közlemények száma: 32

Összesített impakt faktor: 89,5

Összes/független/ disszertációk nélkül független idézés: 730/572/539

h-index: 14