

Válasz Prof. Dr. Záray Gyula bírálatára

Szeretném megköszönni Záray Gyula professzor úr minden részletre kiterjedő, alapos bírálatát.

Professzor úr, a rövidítések és kémiai nevek következetes használatát érintő kritikáját jogosnak tartom. Bár törekedtem a következetességre, a dolgozat irodalmi része számtalan irodalom felhasználásával készült, amelyekben különbözőképpen alkalmazták az elnevezéseket, valószínűleg legjobb szándékom ellenére ezért és a nem kellő figyelem miatt kerültek a dolgozatba az eltérő változatok. Szintén sajnálom, hogy néhány rövidítés feloldása elkerülte a figyelmemet, illetve nem túl elegáns, labor szlenget is tartalmazó mondatok kerültek a módszerek ismertetésébe.

A 12, 13 és 14. táblázatok N-terminális szekvenciára vonatkozó adatai valóban nagyon nehezen olvashatóak. A táblázat rendkívül sok információt hivatott közölni, annak érdekében, hogy az eredményeket tartalmazó rész jól olvasható legyen, az aminosav sorrendre vonatkozó részeket 6-os betűmérettel szedtem. Valószínűleg szerencsésebb lett volna ezeket a részeket külön függelék táblázatban közölni.

Az ábrák aláírásaiból, az eredeti közleményekkel ellentétben, valóban hiányzik a mintaszámra vonatkozó adat, ami a figyelmetlenségemnek tudható be. Ezért elnézést kérek.

A 32A ábra esetében annyira kicsinek bizonyult a szórás, hogy a hibaszávok nem látszanak. A 35A és B ábra esetében valóban csak a kontroll méréseknél lett feltüntetve, mindkét esetben a mért mintaszám $n=6$. A hiányosságokért elnézést kérek.

Egyetértek a Professzor úrral, hogy a pontos metodikai ismertetés alapvető fontossággal bír. Igyekeztem minden mérést olyan pontosan leírni, hogy az bármikor, bárki számára megismételhető legyen. A protokollok elvi megfontolásait nem tartalmazza a leírás, ezt a dolgozat terjedelmi korlátai nem tették lehetővé (így is mindössze 6 oldallal maradt el a felső terjedelmi korláttól). A feltáró és mosó pufferek különbségét eltérő funkciójuk indokolja. A feltáró oldat ozmotikum tartalma (szacharóz, vagy mannit) fenntartja a mitokondrium szerkezetét, megakadályozza, a mitokondrium duzzadását, zsugorodását, a membránok károsodását, kiszakadását. A feltáró oldat nagyobb pufferkapacitása (nagyobb koncentrációjú MOPS) megakadályozza a felszakadó vakuolák miatti elsavasodást, a kelátorok, mint az EDTA gátolja a foszfolipázok és proteázok működését, a redukálószer (cisztein) a szövetekben előforduló, illetve homogenizáláskor keletkező oxidánsok okozta károsodások ellen védenek. A BSA adagolása (megköti) eltávolítja a szabad zsírsavakat, a polivinilpirolidon (PVP) pedig a fenolokat az oldatból, amelyek az elsődleges homogenátumban károsítanák a sejtorganellumokat. A mosó oldat ezzel szemben az organellum pellet újrasszuspendálására, illetve a gradiens centrifugálást követően a gradienst alkotó anyagok eltávolítására szolgál, ezért összetételük jóval egyszerűbb.

Sajnálatos módon a 2.9 és 2.10 fejezetekben a protokollból kimaradt a hőmérsékletadat. Természetesen, ahogy az minden organellum preparálásánál történik és a többi fejezetben is említésre került 4°C-on történt a centrifugálás.

Az organellumok, vezikulák intaktságának meghatározásakor 90%-os enzim latencia érték fogadható el. Amennyiben ez alatti értéket kaptunk, abban az esetben a transzportméréseket nem tekintettük elfogadhatónak.

A HPLC mérések során minden esetben végeztünk vakérték meghatározást, minden 5. minta pedig a meghatározandó komponens sztenderd oldata volt (a biológiai mintákhoz hasonlatos koncentrációban). Ezen kívül sztenderd sort és belső sztenderdet is alkalmaztunk.

Válaszaim az eredményekkel kapcsolatban feltett kérdésekre:

A redukált forma, aszkorbát esetében igen alacsony affinitású (K_M : 36.1 mM) mitokondriális transzportfolyamatot találtunk. Az alacsony affinitás mellett a transzport igen kis aktivitást is mutatott, amelyet olyan oxidálószeres adagolásával, amelyek az aszkorbátot dehidroaszkorbáttá oxidáltak növelni tudtunk. Mindezek és számos irodalmi analógia alapján megkérdőjeleztük a redukált forma mitokondriális membránon keresztüli transzportját. A problémát az jelenti, hogy jelenleg, csak az általunk leírt transzportfolyamat (a jelenség) ismert, a mögötte álló transzportfehérje ismeretlen. A fehérje ismeretében azt elő lehetne állítani, proteoliposzómában rekonstruálni és meghatározni a fehérje paramétereit. Sajnos egyetlen egy közelmúltban leírásra került kloroplaszt aszkorbát transzporter (Miyaji és mtsai 2015) kívül egyetlen növényi szubcelluláris aszkorbát transzporter sem ismert jelenleg. Így csak a folyamat ismert, amely kis affinitása és aktivitása miatt megkérdőjelezhető. Humán mitokondriumok esetében is évekig úgy gondoltuk, hogy kizárólag az oxidált forma, a dehidroaszkorbát felelős a mitokondriális C-vitamin transzportért, sőt kizárták a redukált forma transzportját, azonban a közelmúltban leírásra került az SVCT2 transzporter mitokondriális jelenléte, szerepe a mitokondriális C-vitamin transzportban (Azzolini és mtsai 2013, Muñoz-Montesino és mtsai 2014). Így nem kizárt, hogy a transzportfehérje megtalálásával a növények esetében is árnyaltabbá válik a mitokondriális aszkorbát transzport jelensége.

A második és a harmadik kérdések összefüggnek, ezért összevontam az azokra adott válaszokat is.

Valóban nem túl szerencsés, hogy a mitokondriumba és a mitoplasztba történő dehidroaszkorbát és glükóz felvétel értékeit nem egy táblázatban ismertettem, mint ahogy azt a későbbiek során a 3.8.1. alfejezet 9. táblázatában tettem a fruktóz, a szacharóz és glükóz mitokondriális és mitoplaszt felvétel adataival, illetve ahogyan azt az aszkorbát, dehidroaszkorbát és glükóz mitokondriális és mitoplaszt felvétel adataival az eredeti (Szarka és mtsai 2004) közleményben is tettem. Így a dehidroaszkorbát és glükóz felvételre vonatkozó adatokat a 3. és 4. táblázatból, illetve az aszkorbát mitokondriális felvétel adatot a 10. ábráról

és a 4. táblázatból kell leolvasni külön-külön. Ezért most szeretném ezt a nehézséget megkönnyíteni és egymás mellett, egy táblázatban bemutatni a mitokondriumba és a mitoplasztba történő aszkorbát, dehidroaszkorbát és glükóz felvételre vonatkozó adatokat.

Ligand	Felvétel (nmol/min/mg protein)	
	mitokondrium	mitoplaszt
Aszkorbát	0.10 ± 0.02 (3)	0.13 ± 0.02 (3)
DHA	0.41 ± 0.11 (3)	0.34 ± 0.07 (3)
Glükóz	1.46 ± 0.20 (3)	1.02 ± 0.16 (3)

A mitoplasztokat frissen izolált BY2 dohány mitokondriumokból preparáltuk. Az egyes ligandok felvételét 1mM aszkorbát, vagy dehidroaszkorbát, illetve 1,65 mM glükóz és radioaktív jelölt változatának adagolásával indítottuk. Az aszkorbát és dehidroaszkorbát esetében 5 perces a glükóz esetében 2,5 perces inkubációs időket alkalmaztunk. A szobahőmérsékleten történő inkubációt követően 0,1 ml mintát szűrtünk nitrocellulóz membránon keresztül. Párhuzamos mintákat alameticin pórus képző anyaggal inkubáltunk együtt. Az ezekkel a mintákkal asszociált radioaktivitást aspecifikus kötődésnek vettük és levontuk a teljes radioaktivitás értékéből. Az adatok átlagértékek±SD (n).

Ha összevetjük a mitokondrium és a mitoplaszt esetében mért transzport aktivitásokat megállapíthatjuk, hogy azok gyakorlatilag azonosak, ugyanezt a megfigyelést tehetjük a 3.8.1. alfejezet 9. táblázat fruktóz, szacharóz és glükóz mitokondriális és mitoplaszt felvételét tartalmazó adataival kapcsolatban. A Professzor úr igen találóan jegyezte meg bírálatában, hogy mindez „arra enged következtetni, hogy a külső mitokondriális membránon keresztül a kis mólsúlyú anyagcsere termékek egyszerűen átjutnak, ezért azonos felvételt mutatnak a vizsgált alkotókra.”

A mitoplasztok és a mitokondriumok esetében tapasztalt igen hasonló felvételi aktivitás értékek, minden bizonnyal a külső membránban található porin csatornáknak köszönhetőek, amelyek a külső membránon keresztül utat biztosítanak a kis molekulatömegű (kisebb, mint 5000 Da) anyagok számára (Colombini 1979). Emiatt a transzportereink szinte biztosan a mitokondriális belső membránban helyezkednek el, így a transzportfolyamatok kinetikai paramétereinek megállapítása során kizárólag intakt mitokondriumokat használtunk. Ha összevetjük a BY2 dohánysejtekből (1. táblázat), illetve a csicsóka gumókból izolált (9. táblázat) mitokondriumok esetében meghatározott kinetikai paramétereket, akkor megállapíthatjuk, hogy az egyetlen egyező vizsgált transzportált ligand a glükóz esetében igen hasonló K_M értéket tudtunk meghatározni (dohány: 9,2 mM, csicsóka: 10.4 mM). Ez alapján könnyen elképzelhető, hogy azonos, vagy közeli rokonságban álló transzporterek állnak a transzportfolyamatok hátterében. A V_{max} esetében tapasztalható különbség (dohány: 28.1 nmol/min/mg protein, csicsóka: 2.89 nmol/min/mg protein) magyarázata lehet az eltérő mitokondrium forrás, illetve a két esetben eltérő mitokondrium tisztítási módszer. A dohány

sejtekből egy diszkrét, egymásra rétegzett Percoll gradienssel történt a mitokondrium frakció tisztítása, míg a csicsóka esetében egy öngeneráló Percoll gradienssel. Előbbi minden bizonnyal tökéletesebb tisztítást, nagyobb fajlagos transzport aktivitású mitokondriális frakciót eredményez. A $V_{\max}$ értékek különbsége, mivel nem transzporter tulajdonság nem jellemző a transzporterre, ezért nem feltétlenül utal eltérő transzporterek jelenlétére.

Válaszaim a tézispontokkal kapcsolatos megjegyzésekre:

6. tézispont:

Egyetértek Professzor úr javaslatával. Valóban csak valamihez viszonyítva lehet alacsonyabb, oxidáltabb a C-vitamin szintje. A 6. tézispont tehát helyesen:

„Kimutattuk, hogy a ppr-40 növényeket mind mitokondriális, mind sejtszinten jóval alacsonyabb és oxidáltabb C-vitamin szint jellemzi a vad típusú növényekhez viszonyítva. 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.”

7. tézispont:

Egyetértek Professzor úr javaslatával. A szóismétlést elkerülve a 7. tézispont:

„Kimutattuk, hogy növényi sejtekben a plazmamembránon keresztüli C-vitamin transzport esetében lineáris összefüggés van...”

8. tézispont:

A 8. tézispont esetében csak részben értek egyet a Professzor úr kritikájával:

„Eredményeink alapján valószínűsítjük, a növényi mitokondriumban egy aszkorbát/DHA redox párból álló komplex III-at megkerülő elektrontranszfer út létezését (1. ábra).”

Az első mondat állításait kísérletekkel igazoltuk: A mitokondriális II-es komplexnél bekövetkezik a dehidroaszkorbát aszkorbáttá történő redukciója (kísérletekkel bizonyítva Szarka és mtsai 2007, Szarka 2013). Az aszkorbát kijut a mitokondriális mátrixból (Szarka és mtsai 2013), ahol a IV-es komplexnek elektronokat juttatva dehidroaszkorbáttá oxidálódik (Szarka és mtsai 2007, Zsigmond és mtsai 2008, 2011).

„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.”

Ez a rész valóban feltételez, mivel közvetlen stresszhelyzetben aszkorbát adagolására nem vizsgáltuk az elektrontranszfer lánc komponenseinek redukáltsági fokának megváltozását. A dehidroaszkorbát redukálása azonban jó eséllyel csökkenti az elektrontranszfer láncban torlódó elektronok mennyiségét (mivel onnan származnak a redukáláshoz szükséges elektronok), (Szarka és mtsai 2007, Szarka 2013), az aszkorbát szint növekedése pedig 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 membránközi térben).”

Ahogy arról korábban már szó esett a redukált forma az aszkorbát mitokondriális membránon keresztüli transzportja meglehetősen kis aktivitással rendelkező, lassú folyamat. Ezt mérésekkel is alátámasztottuk (Szarka és mtsai 2013), az aszkorbát a mátrixhoz képest mintegy 30 perces késéssel jelenik csak meg a mitokondriális membránközi térben, tehát az oxidációja helyszínén. A 8. tézispontban szereplő kerülőút meglétét időközben oxigráfos mérésekkel ellenőriztük. A dehidroaszkorbát adagolására csak igen kismértékű légzésgyorsulást tapasztaltunk komplex III. blokk esetében, ami a redukált forma mitokondriumból történő igen lassú kijutásával magyarázható és összevág azzal.

10. tézispont:

A 10. tézispont második fele valóban feltételezésen alapul. Az ozmoregulációs mechanizmus feltárását megkezdtük, sóstressz esetében igazoltuk a szorbit mitokondriális képződését, de részletesebb karakterizálására valóban nem került még sor.

14. tézispont:

A kérdéses tézispont részlet és a hozzá fűzött indoklás:

„Az ALR részt vesz a mitokondriumok biogenezisében és fenntartásában” Ez a rész több munkacsoport által megerősített eredményeken nyugszik (Lisowsky 1992, 1994, Di Fonzo és mtsai 2009, Thirunavukkarasu és mtsai 2008, Gandhi és mtsai 2015).

„, ezért könnyen elképzelhető, hogy szintjének megemelkedése a ρ^0 sejtek adaptív válaszána egy része lehet, amely segít a mtDNS-ben kódolt fehérjék kiesése ellenére a mitokondriális belső membrán integritásának és a membránpotenciál megőrzésében.” A ρ^0 sejtek esetében a mitokondriális DNS-ben kódolt fehérjék nem fejeződnek ki, mégis a mitokondriális belső membrán integritása és a mitokondriális membránpotenciál megtartott

marad, illetve a mitokondriumok biogenezise is folytonos, amely megfigyeléseket szintén több független forrás bizonyított (Miranda és mtsai1999, Holmuhamedov és mtsai 2003, Li és mtsai 1995).

„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.”

Az ALR szint megemelkedését mi kizárólag az mtDNS hiányában írtuk le. Mitokondriális betegségekben és öregedésben csak a mtDNS hiánya, sérülése került leírásra az ALR szint emelkedése nem. Az ALR szintet eredményeink szerint egyértelműen megemelte a mtDNS hiánya, más független laborok pedig bizonyították az ALR szerepét a mitokondrium fenntartásában, biogenezisében. Mindezekből következtettünk arra, hogy más mtDNS hiányos állapotokban is szerepet kaphat az ALR a mitokondriumok fenntartásában, biogenezisében. A tézispont második fele tehát jelentős részben kísérletes megfigyeléseken, megállapításokon alapul, de kis mértékben ezeket kapcsolatba hozó feltételezéseket is tartalmaz.

Végezetül szeretném még egyszer megköszönni Záray Gyula Professzor úr értékes, rendkívül alapos bírálatát.

Tisztelettel kérem az opponensi véleményre adott válaszom elfogadását.

Budapest, 2017. március 6.



Szarka András

Referencia lista

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

Colombini M (1979) A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature* 279:643–645

Di Fonzo A, Ronchi D, Lodi T, et al. (2009) The mitochondrial disulfide relay system protein GFER is mutated in autosomalrecessive myopathy with cataract and combined respiratory-chain deficiency. *Am J Hum Genet* 84:594–604. doi:[10.1016/j.ajhg.2009.04.004](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.04.004)

Gandhi CR, Chaillet JR, Nalesnik M a, et al. (2015) Liver-specific deletion of augmenter of liver regeneration accelerates development of steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in mice. *Gastroenterology* 148:379–391.e4. doi:[10.1053/j.gastro.2014.10.008](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.10.008)

Holmuhamedov E, Jahangir A, Bienengraeber M, et al. (2003) Deletion of mtDNA disrupts mitochondrial function and structure, but not biogenesis. *Mitochondrion* 3:13–19. doi:[10.1016/S1567-7249\(03\)00053-9](https://doi.org/10.1016/S1567-7249(03)00053-9)

Li K, Neuffer PD, Williams RS (1995) Nuclear responses to depletion of mitochondrial DNA in human cells. *Am J Physiol* 269: C1265–C1270

Lisowsky T (1992) Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet* 232:58–64

Lisowsky T (1994) ERV1 is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 26:15–20

Miranda S, Foncea R, Guerrero J, Leighton F (1999) Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 258:44–49. doi:[10.1006/bbrc.1999.0580](https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0580)

Miyaji T, Kuromori T, Takeuchi Y, Yamaji N, Yokosho K, Shimazawa A, Sugimoto E, Omote H, Ma JF, Shinozaki K, Moriyama Y. AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in *Arabidopsis*. *Nat Commun*. 2015 Jan 5;6:5928. doi: 10.1038/ncomms6928.

Muñoz-Montesino, C., Roa, F.J., Peña, E., González, M., Sotomayor, K., Inostroza, E.,A., Muñoz, C., González, I., Maldonado, M., Soliz, C., Reyes, A.M., Vera, J.C., Rivas, C. I., 2014. Mitochondrial ascorbic acid transport is mediated by a low-affinity form of the sodium-coupled ascorbic acid transporter-2. *Free Radical Biol. Med.* 70, 241–254

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.

Szarka A, Banhegyi G, Asard H. (2013) The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration. *Antioxid Redox Signal*, 19(9):1036-44

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.

Thirunavukkarasu C, Wang LF, Harvey S a K, et al. (2008) Augmenter of liver regeneration: an important intracellular survival factor for hepatocytes. *J Hepatol* 48:578–588. doi:[10.1016/j.jhep.2007.12.010](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.12.010)

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.

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