

Vízoldható antioxidánsok kéz a kézben: C-vitamin és Glutathion

MTA doktori értekezés

Szarka András

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék

2016.

„Testünk és környezete között egyik legfontosabb kapocs minden bizonnyal az élelem. Az élelem képében a környezet ténylegesen bekerül testünkbe és átjárja azt. A vitaminok e kapcsolat koordinálásában kétségkívül a legfontosabb tényezők egyikének számítanak. Meg vagyok győződve, hogyha testünket visszahelyeznénk abba a környezetbe, amely számára ez a test kialakult, éppen olyan tökéletesen működnék, mint a többi élőlény teste. A betegség a szervezetünk és a környezetünk közötti diszharmónia kifejeződése.” Szent-Györgyi Albert

Tartalom

Rövidítésjegyzék	6
Bevezetés és célkitűzések.....	10
1. Irodalmi háttér	14
1.1. C-vitamin anyagcsere a növényekben	14
1.1.1. A C-vitamin bioszintézise növényekben	14
1.1.2. Az aszkorbát növényi sejtben betöltött funkciói.....	19
1.1.3. A C-vitamin koncentrációja különböző növényi forrásokban	26
1.1.4. Az aszkorbát reciklálása: aszkorbát-glutation ciklus	27
1.2. C-vitamin transzport	29
1.2.1. C-vitamin transzport a növényi sejtekben.....	29
1.2.2. C-vitamin transzport emlős (humán) sejtekben	32
1.3. A glutation	37
1.3.1. Glutation a növényi sejtekben.....	38
1.3.2. Glutation az emlős sejtekben	43
1.3.3. Acetaminofen kiváltotta sejthalál és májkárosodás az élelmiszer toxikológiában .	47
1.3.4. A GSH deplécio kiváltotta új sejthalál forma, a ferroptózis	52
1.3.5. A fehérje tiolok oxidációja: oxidatív folding.....	53
2. Kísérleti módszerek	59
2.1. Növények termesztése	59
2.2. <i>Nicotiana tabacum</i> sejt kultúra <i>in vitro</i> fenntartása.....	59
2.3. <i>Arabidopsis thaliana</i> sejt kultúra <i>in vitro</i> fenntartása	59
2.4. Állatkísérletek.....	60
2.5. Emlős sejt fenntartás.....	60
2.6. ρ^0 -sejtvonalak létrehozása és fenntartása	60
2.7. Primer egér májsejtek izolálása és fenntartása	61
2.8. Mitokondrium izolálása szuszpenziós sejt kultúrákból	61
2.9. Mitokondrium izolálása zöld növényből	62
2.10. Mitokondrium izolálása csicsókából	63
2.11. Mikroszóma és mitokondrium izolálás májszövetből	63
2.12. Szubmitokondriális partikulák preparálása	64
2.13. Kis molsúlyú anyagok transzportjának meghatározása mitokondrium és mikroszóma eredetű vezikulákon gyors szűrési módszerrel	64
2.14. Mikroszómális glutation meghatározás	65

2.15. Sejtes glutation tartalom meghatározás	65
2.16. Aszkorbát koncentráció meghatározása HPLC-vel	66
2.17. Redukált glutation/teljes glutation koncentráció mérése HPLC-vel	66
2.18. Invertáz aktivitás vizsgálata.....	67
2.19. Fumaráz aktivitás meghatározása	67
2.20. Fehérje tiolok mérése.....	68
2.21. A tiol-diszulfid redox állapot meghatározása fehérjékben AMS jelöléssel	68
2.22. Mitokondriális légzési vizsgálatok	68
2.23. Aszkorbil gyök meghatározása, elektron spin rezonancia mérések	69
2.24. HepG2 és primer májsejtek kezelése	69
2.25. Sejt életképesség vizsgálatok.....	70
2.26. Apoptózis és nekrosis detektálása	70
2.27. Galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz expresszió vizsgálata	70
2.28. A mitokondriumok intaktságának ellenőrzése (citokróom c oxidáz aktivitásának mérése).....	71
2.29. Galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz aktivitás mérése	71
2.30. A Foyer-Halliwell-Asada ciklus enzimeinek aktivitásvizsgálata	72
2.30.1. Dehidroaskorbát reduktáz aktivitásának vizsgálata	72
2.30.2. Monodehidroaskorbát reduktáz aktivitásának vizsgálata.....	72
2.30.3. Aszkorbát-peroxidáz aktivitásának vizsgálata	73
2.30.4. Glutation-reduktáz aktivitásának vizsgálata	73
2.31. Fehérjekoncentráció meghatározása	73
2.32. A mitokondriális respirációs komplexek gátlása	74
2.33. A mitokondriális oxidatív folding enzimek expressziójának meghatározása Western blot technikával.....	74
2.34. Az ALR és a CYP2E1 mRNS szintjének meghatározása RTqPCR analízissel	75
2.35. C-vitamin transzporterek mitokondriális lokalizációjának <i>in silico</i> vizsgálata.....	75
2.36. Élelmiszer minták preparálása C-vitamin meghatározási módszerek teszteléséhez ...	76
2.37. C-vitamin meghatározása α, α' -dipiridiles módszerrel	76
2.38. C-vitamin meghatározása askorbát oxidáz enzimes módszerrel	77
3. Eredmények és értékelésük	78
3.1. Facilitált glükóz és dehidroaskorbát transzport a növényi mitokondriumban	78
3.1.1. A mitokondriális askorbát/DHA transzport inhibitor profilja.....	80
3.1.2. Mitokondriális glükóz transzport	81
3.1.3. A mitokondriális légzés hatása a DHA és glükóz transzportra.....	82
3.1.4. Az askorbát, DHA és glükóz felvétele mitoplasztok esetében.....	83

3.2. A mitokondriális elektrontranszferhez kapcsolt DHA redukció növényi sejtekben	84
3.3. Kvantitatív adatok a glutation és a komplex II függő aszkorbát reciklálásról növényi mitokondriumban.....	89
3.4. Fokozott ROS termelés és aszkorbát fogyasztás a PPR-40 <i>Arabidopsis</i> ban.....	93
3.5. Fokozott GLDH aktivitás és aszkorbát-glutathion ciklus a ppr-40 lúdfűben	95
3.6. Elterő mechanizmusú DHA és glükóz transzport lúdfű szuszpenziós sejt kultúrában...	99
3.7. Hipotetikus modellünk: A mitokondrium, a mitokondriális elektrontranszfer szerepe a C-vitamin szintézisben, regenerációban; az aszkorbát/DHA redox páros szerepe a mitokondriális elektrontranszferben	103
3.8. A mitokondriális glükóz transzport háttere: mitokondriális invertáz aktivitás és a vele összefüggő cukortranszport folyamatok	104
3.8.1. A kapcsolódó cukor transzporterek jellemzése.....	108
3.9. <i>In silico</i> támogatott gondolatok a mitokondriális C-vitamin transzportról	113
3.10. FAD transzport és a FAD szerepe a mikroszómális oxidatív folding elektrontranszfer folyamatában	119
3.11. A mitokondriális oxidatív folding apparátus és az mtDNA kapcsolata	123
3.12. GSH hiány kiváltotta sejthalálformák	127
3.12.1. Nagy dózisú acetaminofen kezelés és a következményes extrém GSH hiány ...	127
3.12.2. A ferroptózis szerepe az APAP kiváltotta sejthalál folyamatában	131
Összefoglalás.....	137
Köszönetnyilvánítás	140
Irodalomlista.....	141

Rövidítésjegyzék

A/A	antibiotikum/antimikotikum oldat
AA	aminosav
ACTB	Béta-aktin
ADP	adenozin-difoszfát
ALR	augmenter of liver regeneration
AMS	4'-acetamido-4'-maleimidilsztilbén-2,2'-diszulfonsav
AOX	alternatív oxidáz
APAP	acetaminofen
APX	aszorbát-peroxidáz
ASC	aszkorbinsav/aszorbát
ATP	adenozin-trifoszfát
BSA	szarvasmarha szérum albumin
BY2	világossárga (dohánynövény sejtvonala)
CAT	kataláz
CCO	citokróm c-oxidáz
cDNS	komplementer DNS
CMS	citoplazmatikus hím sterilitás
CoA	koenzim-A
COX II	citokróm c-oxidáz II alegység
COX	citokróm c oxidáz
CPT2	carnitine o-palmitoyltransferase 2 (mitokondriális karnitin o-palmitoiltranszferáz 2)
CYP450	citokróm P450
CCS	copper chaperone for SOD1 (a szuperoxid dizmutáz 1 dajkafehérjéje)
DEPC	dietil-pirokarbonát
DHA	dehidroaszorbát
DHAR	dehidroaszorbát-reduktáz
DIC	dicarboxylate carrier (mitokondriális dikarbonsav transzport fehérje)
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium (tápoldat)
DNP	2,4-dinitrofenol
DNS	dezoxiribonukleinsav
DPI	difenil-jodonium
DsbA	disulfide bond A (bakteriális periplazma diszulfidhordozó fehérjéje)
DsbB	disulfide bond B (bakteriális periplazma diszulfidgeneráló enzime)
DTNB	5,5'-ditio-bisz-2-nitro-benzoészav
DTT	ditiotritol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
EGF	epidermal growth factor (epidermális növekedési faktor)
EGFP	gerjesztett zölden fluoreszkáló fehérje

EGFR	epidermal growth factor receptor (epidermális növekedési faktor receptor)
EGTA	etilén-glikol-tetraecetsav nátrium sója
EMEM	Eagle's minimum essential medium (tápoldat)
ER	endoplazmás retikulum
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2 (extracelluláris jel-szabályozott kináz)
Ero1	endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 (az endoplazmás retikulum diszulfidgeneráló enzime)
Erv1	essential for respiration and vegetative growth 1 (a mitokondriális intermembrán tér diszulfidgeneráló enzime)
Erv2	essential for respiration and vegetative growth 2 (az endoplazmás retikulum diszulfidgeneráló enzime)
EtOH	etil-alkohol
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FADH ₂	redukált flavin-adenin-dinukleotid
FBS	fötális szarvasmarha szérum
FMN	flavin-mononukleotid
FT	friss tömeg
GDP	guanidin-difoszfát
GFER	growth factor Erv1-like (Erv1/ALR homológ)
GFOR	glükóz-fruktóz oxidoreduktáz
GFP	zölden fluoreszkáló fehérje
GLDH	L-galaktono-1,4-lakton-dehidrogenáz
GLO	gulono-1,4-lakton-oxidáz
GLUT (1-14)	glükóz transzporter 1-14
GR	glutation-reduktáz
GSH	redukált glutation
GSSG	glutation-diszulfid
HGF	hepatocyte growth factor (májsejt növekedési faktor)
HMIT	proton mioinozitol transzporter
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HRP	torma-peroxidáz enzim
HSS	hepatocyte stimulator substance (májregenerációt stimulálni képes fehérje frakció)
IL-1/6	interleukin-1/6
IM	(mitokondriális) belső membrán
IMP	inner membrane peptidase (a mitokondriális belső membrán peptidázai)
IMS	(mitokondriális) intermembrán tér
JAB1	Jun-activating domain-binding protein 1 (Jun-aktivált domén-kötő fehérje)
k-NN	k-nearest-neighbors (k-legközelebbi szomszéd predikciós algoritmus)
LC	folyadékkromatográf
LPS	lipopoliszacharid

MAPK	mitogen-activated protein kinase (mitogén-aktivált fehérje kináz)
MDHA	monodehidroaszorbát/aszkorbil gyök
MDHAR	monodehidroaszorbát-reduktáz
mETL	mitokondriális elektrontranszportlánc
MIA	mitochondrial intermembrane space assembly machinery (a mitokondriális intermembrán tér diszulfidkövetítő rendszere)
MIA40	mitochondrial intermembrane space import and assembly 40 (a mitokondriális intermembrán tér diszulfidhordozó fehérjeje)
MOPS	3-(N-morfolino)-propánszulfonsav
MPC2	mitochondrial pyruvate carrier 2 (mitokondriális piroszölősav transzport fehérje)
MPCP	mitochondrial phosphate carrier protein (mitokondriális foszfát transzport fehérje)
MPP	matrix mitochondrial peptidase (mitokondriális mátrixban lokalizálódó endopeptidáz)
MRM	multiple reaction monitoring: többszörös reakciókövetés
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
MS	Murashige és Skoog (növényi tápsó)
mtDNS	mitokondriális dezoxiribonukleinsav
MTT	3-(4,5-dimetiltiatol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid
NAD(P)H	redukált nikotinsav-adenin-dinukleotid foszfát
NAD ⁺	oxidált nikotinsav-adenin-dinukleotid
NADH	redukált nikotinsav-adenin-dinukleotid
NADP ⁺	oxidált nikotinsav-adenin-dinukleotid foszfát
NADPH	redukált nikotinsav-adenin-dinukleotid foszfát
NDin(NADH)	alternatív rotenon inszenzitív NADH dehidrogenáz mátrix orientációval
NDex(NADH)	alternatív rotenon inszenzitív NADH dehidrogenáz IMS orientációval
nDNS	nukleáris (sejtmagi) dezoxiribonukleinsav
NF-κB	nuclear factor-κB
NRF-1	nuclear respiratory factor (transzkripció faktor)
OM	(mitokondriális) külső membrán
OPDA	orto-fenilén-diamin
OXPHOS	oxidatív foszforiláció
PBS	foszfát puffer (NaCl tartalmú)
PCR	polimeráz láncreakció
PDI	protein diszulfid izomeráz
PMSF	fenilmetánszulfonil fluorid
PPR40	pentatrikopeptid fehérje 40 kDa tömeg
PVP40	polivinil-pirrolidon polimer 40 kDa tömeg
qPCR	mennyiségi polimeráz láncreakció
rhALR	humán rekombináns augmenter of liver regeneration fehérje
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigén vegyületek
RT-PCR	valós idejű polimeráz láncreakció

RTqPCR	reverz transzkripcióval kombinált kvantitatív polimeráz láncreakció
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SOD	szuperoxid-diszmutáz
SOD1	szuperoxid-diszmutáz 1
SSA	szulfoszalicilsav
SVCT (1/2)	nátrium-függő C-vitamin transzporter 1/2
SVM	support vector machine (tartóvektor-gép predikciós algoritmus)
TBS	trisz-puffer (NaCl tartalmú)
TCA	triklórecetsav
TES	Tris-HCl, EDTA, SDS elegye
TFAM	mitochondrial transcription factor A (mitokondriális transzkripciósfaktor)
TGF- α	transforming growth factor-alpha (transzformálódó növekedési faktor)
TIM (22/23)	translocase of the inner membrane (a mitokondriális belső membrán transzlokázai)
Tim (8/9/10/12/13)	a mitokondriális intermembrán tér szolubilis chaperonjai
TNB	2-nitro-5-tiobenzoesav
TOM	translocase of the outer membrane (a mitokondriális külső membrán transzlokáza)
Tris-HCl	trisz (hidroxi-metil)-amino-metán
tRNS	transzfer ribonukleinsav
TTFA	teonil-trifluoro-aceton
UCP	szétkapcsoló fehérje
UV	ultraibolya
vtc	aszkorbinsav (C-vitamin) bioszintézis mutáns
vte	tokoferol (E vitamin) bioszintézis mutáns

Bevezetés és célkitűzések

Talán nincs még egy olyan molekula, amely annyi magyar szállal rendelkezne, mint a C-vitamin. Az erős magyar kötődéshez, amely ma már teljes mértékben vitathatatlan azonban rögzös út vezetett. Szent-Györgyi Albert a biológiai oxidáció folyamatát vizsgálta az 1920-as években, amikor feltűnt neki, hogy a mellékvesekéreg pusztulásával járó Addison-kórban szenvedő betegek bőrén pont olyan barna pigmentáció jelenik meg, mint ami egyes gyümölcsök (pl. alma, körte, banán) esetén figyelhető meg frissességük elvesztésekor (Szent-Györgyi 1937). Szent-Györgyi meg volt róla győződve, hogy az olyan alap biokémiai folyamatok, mint az oxidáció, a növényi és az állati szervezetben nem különböznek. Ezért igyekezett egyszerűbb modellt választani, egy növényen vizsgálta a sérülés és a barnulás közötti összefüggést, a burgonya oxidációs rendszerét kezdte tanulmányozni. A növények tanulmányozása közben sikerült néhány alapvető felfedezést tennie, de a mellékvese működésével kapcsolatban semmilyen új információt sem sikerült feltárnia (Moss 2004). Ezért érdekelní kezdtek azok a növények, amelyek nem barnulnak meg, ha felvágják őket. Ezek minden bizonnyal másféle oxidációs rendszert tartalmaznak. Mindössze annyit tudtak ezekről a növényekről, hogy igen aktív peroxidázt tartalmaznak. Peroxid jelenlétében az enzim, az aromás anyagok egy csoportját színes pigmentekké oxidálja. Peroxidáz távollétében a reakció nem játszódik le. Ha mondjuk benzidint adunk peroxidhoz, peroxidáz jelenlétében, akkor a reakcióközeg, a benzidin oxidációja következtében azonnal kék színűre festődik. A reakció jó indikátora az enzim jelenlétének, ugyanis peroxidáz távollétében nem játszódik le. Ha Szent-Györgyi tisztított peroxidáz helyett narancs-, citrom, vagy káposztalevet használt a reakcióhoz, a kék pigment ugyan megjelent, de csak egy másodperces késéssel. A késedelem okát kutatva rájött, hogy annak hátterében egy igen erőteljes redukálószer jelenléte áll, amely az oxidált benzidint egészen addig redukálta, amíg el nem használódott (Szent-Györgyi 1937, Moss 2004). Szent-Györgyi igencsak izgatott lett, amikor kiderült, hogy az általa vizsgált mellékvesekéreg kivonat, viszonylag nagy mennyiségben ugyanazt a redukáló anyagot tartalmazza. Szent-Györgyit a siker fogékonyabbá tette a probléma kémiájára és rövid időn belül sikerült kivonnia a kérdéses anyagot mellékveséből, illetve különféle növényi forrásokból. Az anyag a $C_6H_8O_6$ összegképlettel volt jellemezhető és szénhidrát sajátságokat mutatott, ezért megkereste W. N. Haworth professzort, akinek felkeltette az érdeklődését és nagyobb mennyiséget kért az anyagból, hogy meghatározhassa annak szerkezetét. Sajnálatos módon Szent-Györgyinek nem sikerült a mellékvese kivételével más forrásból nagy mennyiségben kivonnia a redukáló anyagot. Ebből pedig Angliában, ahol akkor éppen dolgozott nem állt rendelkezésére megfelelő mennyiség. Ekkor a Mayo alapítvány segítségével az Amerikai Egyesült Államokba utazott, ahol hozzáfért a nagy amerikai mézszárszékekből származó nagy mellékvese mennyiséghez. Az egy éves munka eredménye 25 gramm kristályos anyag lett, ami hexuronsavnak nevezett el. A kristályos anyag felét Haworth professzornak küldte, a másik felét megtartotta további vizsgálataihoz. Sajnos az anyag nem bizonyult megfelelőnek a szerkezeti vizsgálatokhoz és a mellékvesék hiányát sem tudta pótolni. 1930-ban Szegedre költözött, a kevés maradék kristályos anyag pedig a polcára került.

Szent-Györgyi egy fiatal kollégájának látogatásáig nem kívánt tovább foglalkozni a C-vitaminnal. Tulajdonképpen nem kedvelte a vitaminokat, különösen taszították a sajtóban velük kapcsolatban megjelent szenzációhajás, fantasztikus történetek. Ő is hajlott (számos más tudóshoz hasonlóan) arra, hogy a táplálkozással kapcsolatos kutatásokat lenézzék. Később el is ismerte, hogy valami megmagyarázhatatlan, gyerekes módon úgy érezte, hogy a vitaminok problémája a szakácsra tartozik (Moss 2004).

Szerencsére 1931 őszén a fiatal, magyar származású, amerikai biokémikus Joseph L. Svirbely besétált Szent-Györgyi formálódó szegedi laboratóriumába. Svirbely nem sokkal korábban szerezte meg PhD fokozatát a vitaminkutatással foglalkozó Charles Glen King laboratóriumában. Így Szent-Györgyi csoportjához egy vitaminkutatásban járatos ember csatlakozott. Az első kísérleteket néhány héten belül elvégezték, amelyek minden kétséget kizárólag igazolták, hogy a hexuronsav igen jelentős skorbut ellenes hatással bír, sőt a gyümölcs- és zöldséglevelek skorbut ellenes hatása jól korrelál azok hexuronsav tartalmával. Az eredményeket a kísérletek megismétlését követően 1932 tavaszán a *Nature* hasábjain közölték (Szent-Györgyi 1937, Moss 2004). Ahogy az lenni szokott a kísérleti sikerek újabb problémát vetettek fel. Az immáron reflektorfénybe került hexuronsav nagyobb mennyiségére keletkezett igény, hiszen szerkezetét fel kellett tárni, illetve vitamin természetét további kísérletek során kellett igazolni. Szent-Györgyiék azonban az általa korábban izolált anyag utolsó kristályait is felhasználták. Ahogy korábban említettem, a mellékveséből történő izolálásra nem volt lehetőségük, más alternatív forrást nagy mennyiségű C-vitamin kivonására pedig még nem találtak. Szent-Györgyit egyik este megihlette a szegedi paprika látványa és levitte a laborba. Még az éjszaka során kiderült, hogy a zöldség hihetetlenül gazdag hexuronsavban, illetve aszkorbinsavban, ahogy Szent-Györgyi, Norman Haworth-szel átkeresztelte. A felfedezésnek köszönhetően, még abban a paprika szezonban fél kilogramm, a következőben pedig 3 kilogramm kristályos aszkorbinsavat tudtak előállítani. Szent-Györgyi így minden érdeklődő kutatónak tudott adni belőle. Kiemelten kezelte P. Karrar és W. N. Haworth kérését, akik meghatározták az anyag szerkezetét és Szent-Györgyi Alberttel egy időben kémiai Nobel-díjat kaptak. Szent-Györgyi Albertet tovább foglalkoztatta az aszkorbát oxidációjának kérdése. Növényi mintákat vizsgálva leírta, hogy az aszkorbinsavat, az aszkorbát oxidáz oxigén jelenlétében reverzibilisen dehidroaszkorbáttá oxidálja, miközben az oxigén egységek az aszkorbátról származó két hidrogén atommal hidrogén-peroxidot képeznek. Ez a peroxid reagál a peroxidázzal és oxidál egy másik aszkorbinsav molekulát. Mindkét dehidroaszkorbát molekula az alap anyagcseréből hidrogént felvéve, feltehetően SH-csoportok közvetítésével redukálódhat (Szent-Györgyi 1937).

Szent-Györgyi Albert mintha a jövőbe látott volna ezzel a megállapításával. Valószínűleg az sem véletlen, hogy egy Szent-Györgyi tanítvány, Straub F. Brúnó és Venetainer Pál jegyzi azt a hatvanas években készült tanulmányt, amely első ízben számol be arról, hogy a C-vitamin oxidált formája, a dehidroaszkorbát részt vehet a fehérje diszulfid kötések kialakulásában, oly módon, hogy a fehérjék cisztein oldalláncainak SH-csoportjai a PDI (protein diszulfid izomeráz) közreműködésével diszulfidkötésekké oxidálódnak, az elektronok a tiol csoportokról pedig a dehidroaszkorbátra kerülnek, aszkorbáttá redukálva azt (Venetainer és Straub 1964). A

folyamat részletesebb tanulmányozása Straub F. Brúnó egykori intézetében a Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani Intézetében kezdődött meg az 1990-es években.

A gerincesekben folyó C-vitamin bioszintetikus útvonalat 1960-ra sikerült teljes mértékben feltárni (Loewus és mtsai 1960, Smirnoff és mtsai 2001). Az aszkorbát glükózból kiindulva a hexuronsav útvonalon szintetizálódik a gulonolakton oxidáz aktivitással rendelkező fajok máj és vese sejtjeiben (Bánhegyi és mtsai 1997). Gyakorlatilag minden a halaktól filogenetikailag magasabb rendű gerincesben megtalálható a gulonolakton oxidáz, amely a C-vitamin bioszintézis utolsó lépését katalizálja. Néhány fajból, köztük a főemlősökből, a tengeri malacból, néhány denevér fajból, a verébalakú madarakból azonban hiányzik ez az enzimaktivitás. A hiány biokémiai oka minden esetben a gulonolakton oxidáz génjében bekövetkezett többszörös mutáció (Bánhegyi és mtsai 1997). Feltehetően ez egy kedvező mutáció volt, mivel a gulonolakton oxidáz működése nemcsak a C-vitamin, hanem ekvimoláris mennyiségű hidrogén-peroxid keletkezésével is együtt jár. A mutáció bekövetkeztekor pedig a C-vitaminban gazdag környezet (táplálék) biztosított volt. Szent-Györgyi szavaival élve „nemcsak a majom ment át a dzsungelen, de a dzsungel is a majmon” (Szent-Györgyi 1978).

Az aszkorbát megszerzésére mind a mai napig külsődleges, elsősorban növényi, forrásokra szorulunk. Ezt figyelembe véve különösen érdekes, hogy míg az aszkorbát szintézisére képes állatokban (pl.: patkány) folyó reakciók 55 éve ismertek, addig a növényekben folyó aszkorbát bioszintézis útvonala az ezredfordulóig ismeretlen volt (Wheeler és mtsai 1998). A növényekben folyó C-vitamin bioszintetikus út felderítése több kérdést és lehetőséget vetett fel, mint amennyit megválaszolt, lezárt. Az útvonal ugyan ismertté vált, de annak pontos lokalizációja, a növényi alap anyagcseréhez való viszonya, kinetikai sajátosságai még mind felderítésre vártak. Ismerete, új lehetőségek tárházát nyitotta meg a biotechnológiában és az élelmiszertudományban, hiszen a C-vitamin bioszintézis és reciklálás befolyásolása által lehetőségünk nyílt a C-vitamin szint befolyásolására, magasabb C-vitamin tartalmú növények létrehozására, amelyek jobban ellenállnak a környezeti stressz hatásoknak, emelt vitamintartalmuk révén jobban eltartható, megnövelt értékű élelmiszereket állíthatunk elő belőlük (Szarka és mtsai 2012).

Ennek megfelelően tűztem ki **kutatási céljaimat** is: A C-vitamin 1998-ban leírt növényi bioszintetikus útvonalának, utolsó lépését katalizáló, galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz enzim a mitokondriumban helyezkedik el, szoros funkcionális kapcsolatban a légzési elektron transzfer láncsal (Bartoli és mtsai 2000). Kísérleteim kezdetekor az enzim topológiája ismeretlen volt. A két orientációs lehetőség, két különböző transzportrendszer meglétét jelentette, amennyiben aktív helye a mitokondriális mátrix felé néz az egyrészt egy L-galaktono-1,4-lakton, másrészt egy aszkorbát transzporter létezését veti fel a mitokondrium belső membránjában, hiszen az enzim szubsztrátjának a mátrixba kell jutnia, termékének pedig ki kell onnan kerülnie. Specifikus aszkorbát transzporterre akkor is szükség van, ha az aktív hely a két membrán közti tér felé néz, hiszen az aszkorbinsav jelenlétét több más sejtservecskével egyetemben a mitokondriumban is leírták (Jimenez és mtsai 1998). Így célul tűztem ki **a mitokondriális C-vitamin transzportrendszer felderítését, jellemzését**. Ez egyértelműen a fő célkitűzésnek tekinthető, hisz az ezt követő munkák céljait már az így kapott

eredmények határozták meg. Így céljaim között szerepelt **a mitokondriumba jutott dehidroaszorbát reciklálásának vizsgálata, a mitokondriális C-vitamin transzport növényi plazmamembránon keresztüli transzporttal való összevetése, sérült mitokondriális komplex III-mal rendelkező növények esetében a mitokondriális C-vitamin, illetve a hozzá szorosan kapcsolódó glutation anyagcsere jellemzése, a humán mitokondriális C-vitamin transzport *in silico* vizsgálata.** A növényi mitokondriális C-vitamin transzport vizsgálata során feltárt **mitokondriális glükóz transzport hátterének feltárása, az így felfedezett mitokondriális invertáz aktivitás, illetve a hozzá kapcsolódó cukortranszport folyamatok részletes jellemzése.** Célul tűztem ki a C-vitaminnal szoros kapcsolatban levő glutation szerepének tanulmányozását, **kiemelten az acetaminofen kiváltotta glutation hiányos állapotok sejthalálban betöltött szerepére.** Végezetül céljaim között szerepelt a **fehérjékben található tiol-diszulfid átalakulások** tanulmányozása.

Szeretném elkerülni annak a látszatát, hogy öntelt módon Szent-Györgyi Albert kutatásaihoz hasonlítom a saját kutatásaimat. Azt gondolom azonban, hogy egy magyar, C-vitaminnal foglalkozó dolgozat bevezetésében hiba lenne a fontos magyar vonatkozásokat elhallgatni. Egy kicsit mégis Szent-Györgyi Albert szellemi örökösének érzem magamat és együttműködő partnereimet. Teszem ezt, mert ugyan jelen dolgozatban összefoglalt kutatásainkat elsősorban a növényi C-vitamin bioszintetikus út felfedezése ihlette, és mint ilyenek növényi biotechnológiával és élelmiszertudománnyal kapcsolatosak, ugyanakkor akad számos kapcsolat, hasonló vonás a nagy tudós munkásságával: 1. A növényi C-vitamin bioszintetikus útvonal és reciklálás ezer szállal kötődik a Szent-Györgyi által is tanulmányozott, mitokondriumban lokalizálódó bioenergetikai folyamatokhoz, 2. A Szent-Györgyi Nobel előadásában említett C-vitamin-tiol vegyület kapcsolat (különösen tekintettel a glutationra) fontos szerepet kapott a mi munkánkban is, 3. Igyekeztünk Szent-Györgyi ars poeticájának megfelelően nemcsak észrevenni dolgokat, hanem arra is rájönni, ami másnak nem jutott eszébe. Ehhez igyekeztünk magunkévá tenni Szent-Györgyi szemléletmódját, ahogy ő tett kirándulást a humán biokémia területéről a növények, élelmiszerek világába, úgy mi a növényi biotechnológia és az élelmiszertudomány területéről tettünk rövidebb kirándulást a humán biokémia világába a táplálkozástudományi szempontból fontos antioxidánsok vizsgálata során. Így az előbbi területen nyert tapasztalatokat kamatoztatni tudtuk az utóbbi esetében is.

Üröm, 2015. augusztus

1. Irodalmi háttér

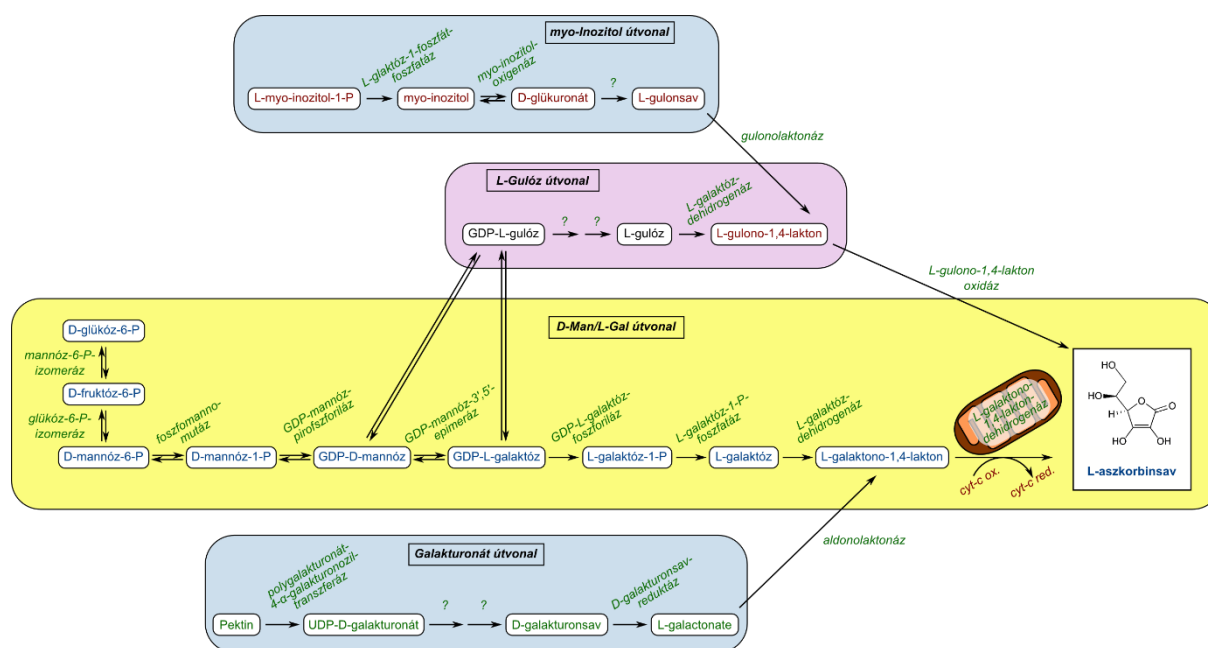
1.1. C-vitamin anyagcsere a növényekben

Soha olyan mértékű anyagi és szellemi ráfordítást nem fektettek egyetlen egy élelmiszer-tudományi, biotechnológiai kutatásba sem, mint a C-vitaminnal kapcsolatos tudományos munkákba. Ahogy azt a bevezetőben is említettük az aszkorbát megszerzésére mind a mai napig külsődleges, elsősorban növényi, forrásokra szorulunk. Élelmiszer-tudományi jelentősége vitathatatlan. A növények elsősorban saját maguk számára szintetizálják a C-vitamint, hiszen fontos szerepet tölt be a növényi sejtek életében, stressz toleranciájában is. Bioszintézise, szintjének szabályozása élettani és különböző stresszhelyzetekben a növényi biotechnológia egyik kiemelt kutatási célpontja is. A következőkben, ezért részletesen szeretnénk ismertetni a növények C-vitamin szintézisével, anyagcseréjével, a növényekben betöltött szerepével és a C-vitamin transzportjával, felszívódásával kapcsolatos ismereteket.

1.1.1. A C-vitamin bioszintézise növényekben

Ahogy arról már a bevezetőben szóltunk az első teljes, növényi sejtekben zajló C-vitamin bioszintetikus útvonalat nem egészen két évtizede, az ezredfordulón írták le. Az útvonalat legfontosabb köztitermékeiről D-mannóz/L-galaktóz útvonalnak, vagy felfedezőiről Smirnov-Wheeler útvonalnak nevezték el (Wheeler és mtsai 1998) (1. ábra). Az azóta eltelt idő alatt az útvonal minden génjét és azok termékeit is sikerült karakterizálni (Linster 2008). A Smirnov-Wheeler útvonal leírását követően nem sokkal egyértelművé vált, hogy alternatív aszkorbát bioszintetikus útvonalak is léteznek. Kiderült, hogy a GDP-mannóz-3'-5'-epimeráz legalább két különböző epimerizációt is katalizál és működésének eredményeként GDP-gulóz is képződik a jól ismert Smirnov-Wheeler útvonal köztitermék GDP-L-galaktózon kívül (1. ábra) (Wolucka és Van Montagu 2003). A GDP-gulóz közvetlenül a C-vitamin bioszintetikus útvonal javasolt L-gulóz ágába csatornázódhat be, amelynek utolsó lépése az L-gulono-1,4-lakton aszkorbáttá történő oxidációja (Wolucka és Van Montagu 2003). (1. ábra). Ezen kívül Arabidopsisban a mioinozitol is, mint aszkorbát bioszintetikus prekursor merült fel, mivel a mioinozitol oxidáz képes UDP-glukuronátot előállítani belőle (Lorence és mtsai 2004). Ez az útvonal, az L-gulóz ághoz hasonlatosan L-gulono-1,4-laktonon keresztül, jut el az aszkorbátig (1. ábra). Végezetül meg kell említenünk, hogy eperben a sejtfal pektinek egyik fő alkotója a D-galakturonsav, a D-galakturonsav reduktáz aktivitás révén járul hozzá az aszkorbát szintéziséhez (Agius és mtsai 2003) (1. ábra). Ez utóbbi útvonal, a klasszikus Smirnov-Wheeler útvonalhoz hasonlóan L-galaktono-1,4-laktont szolgáltat a bioszintetikus útvonal számára (1. ábra). Az alternatív L-gulóz, mioinozitol és galakturonsav útvonalak, azonban meglehetősen kis mértékben járulnak hozzá az aszkorbinsav előállításához. Az alternatív útvonalak ugyanis

nem tudták kompenzálni a Smirnoff-Wheeler útvonal két fontos lépésében bekövetkező mutációból (vtc1 - GDP-mannóz pirofoszforiláz; vtc2 - GDP-L-galaktóz foszforiláz) fakadó alacsony aszkorbát szintet Arabidopsisban (Conklin és mtsai 1999, Dowdle és mtsai 2007). Ezt követően pedig a letális dupla mutáns GDP-L-galaktóz foszforiláz gének (vtc2, vtc5) analízise során egyértelműnek tűnt, hogy Arabidopsisban a Smirnoff-Wheeler útvonal az egyetlen jelentős aszkorbát bioszintetikus út (Linster és mtsai 2007) (1. ábra).

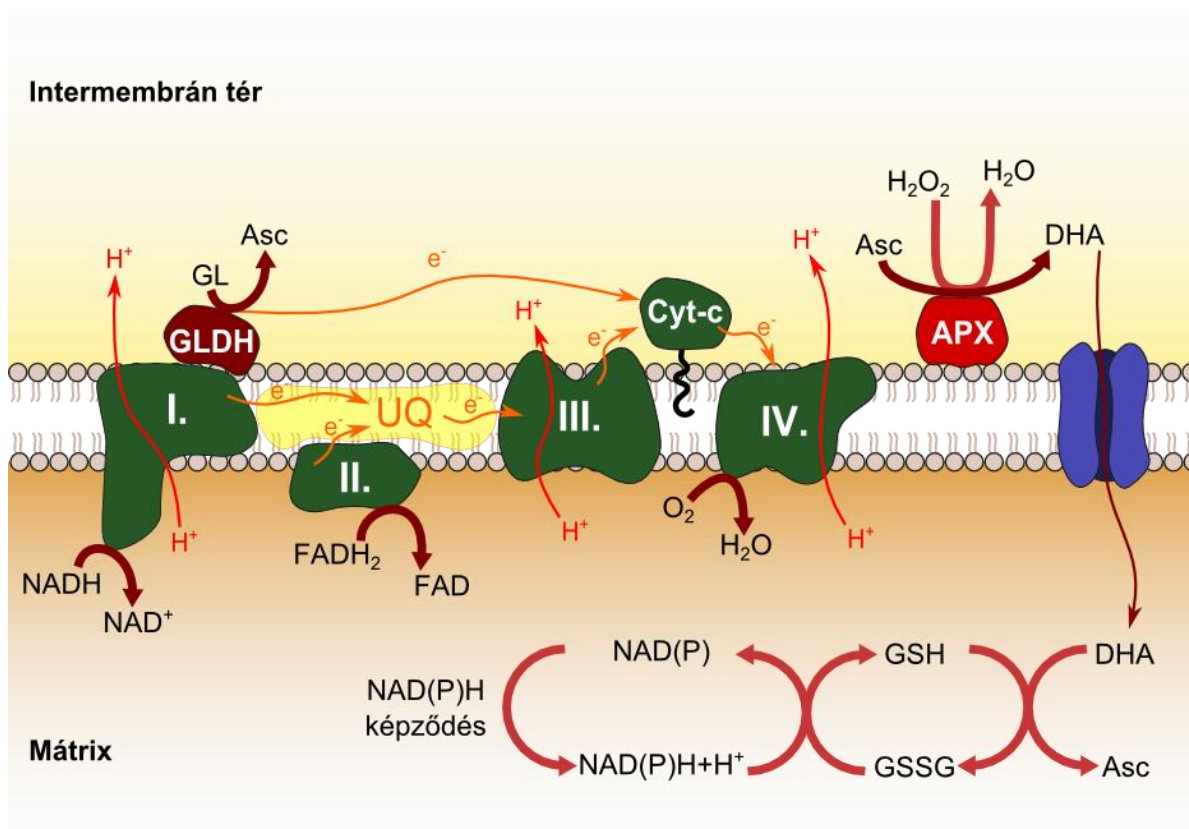


1. ábra. C-vitamin bioszintetikus útvonalak

1.1.1.1. A C-vitamin bioszintézis és a mitokondrium kapcsolata

Mind a Smirnoff-Wheeler, mind a galakturonát útvonal L-galaktono-1,4-lakton köztiterméken keresztül zajlik (1. ábra). Az L-galaktono-1,4-lakton aszkorbáttá történő oxidációját már több mint 50 éve a mitokondriális L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenáznak (GLDH) tulajdonították (Mapson és mtsai 1958). Az enzim és a mitokondriális elektrontranszfer lánc közötti szoros kapcsolatot azonban csak az elmúlt 15-20 évben sikerült igazolni (Bartoli és mtsai 2000). A mitokondrium alfrakciókra bontása révén kiderült, hogy a GLDH leginkább a belső membrán frakcióhoz asszociáltnan fordul elő (Bartoli és mtsai 2000). Az enzim latenciája a citokróm c oxidázéhoz (CCO) hasonló, ami arra utal, hogy az elhelyezkedése is hasonló. A GLDH elektronokat juttat az oxidált citokróm c-re (2. ábra) (Bartoli és mtsai 2000, Leferink és mtsai 2008). Az enzim oxidált citokróm c irányába mutatott abszolút igényét jól demonstrálja a citokróm c reduktáz antimycin A-val történő gátlásának stimulációs hatása (Bartoli és mtsai 2000), illetve a komplex III-nál elektronáramlási blokkal rendelkező Arabidopsis ppr40-1

mutáns esetében tapasztalható emelkedett GLDH aktivitás (Zsigmond és mtsai 2011). Ily módon az L-galaktono-1,4-lakton egyféle légzési szubsztrátként is definiálható növényi sejtek esetében (Bartoli és mtsai 2000, Millar és mtsai 2003) (2. ábra). Habár korábban három transzmembrán régiót is feltételeztek az enzim szerkezetében, egyetlen egyet sem sikerült találni az *Arabidopsis* GLDH esetében (Leferink és mtsai 2008). A komplex I-en átfolyó elektronáram gátlószere, a rotenon jelentős mértékben gátolta az aszkorbát bioszintézist, amely arra utalt, hogy a komplex I és a GLDH között valamilyen szoros kapcsolat állhat fenn (Millar és mtsai 2003). A későbbiek során valóban sikerült kimutatni, hogy a GLDH, a komplex I, egy nagyobb mobilitású, kisebb mértékben előforduló (850 kDa-os) formájának egyik alkotója (Heazlewood és mtsai 2003, Pineau és mtsai 2008). Az 58 kDa-os fehérje azonban nem kapcsolódik a teljes méretű, 1000 kDa-os holokomplexhez, csak annak valamivel kisebb méretű változatához (Millar és mtsai 2003, Pineau és mtsai 2008). Érdekes módon a GLDH mutáns *Arabidopsis* esetében a levél és gyökér mitokondriumok komplex I és a vele asszociált NADH dehidrogenáz aktivitása hiányzott, azonban az összes többi légzési komplex érintetlennek bizonyult. Ez arra utal, hogy a GLDH egyféle összeszerelési faktorként viselkedhet a komplex I biogenezise során (Pineau és mtsai 2008). A citokróm c redukciójával összhangban a GLDH minden bizonnyal az intermembrán térben (IMS), a komplex I membrán karjához kapcsoltan helyezkedik el (Klodmann és mtsai 2010). Egy, a közelmúltban megjelent tanulmány két, kis mennyiségben előforduló, 470 és 420 kDa-os molekula tömegű, GLDH-t tartalmazó fehérje komplexről számolt be *Arabidopsis* mitokondriumok esetében (Schertl és mtsai 2012). Ezek a komplexek, a komplex I membrán karjának részei, illetve összeszerelési intermedierek. A szerzők véleménye szerint, a GLDH a 420 és 470 kDa-os komplex I összeszerelési intermedierekhez köt, amelyek a későbbiek során a 850 kDa-os intermediert alkotják. Az 1000 kDa-os holokomplex kialakulását megelőzi a GLDH leválása (Schertl és mtsai 2012). Ezt a feltevést igazolja a legújabb, 2015 évvégén született kísérletes közlemény is. Ebben megerősítik a két kisebb (~400, ~450 kDa körüli) és a nagyobb ~850 kDa-os (komplex I*) átmeneti, komplex I összeszerelési intermedierekhez való kapcsolódását (Schimmeyer és mtsai 2015). A GLDH kettős szerepével (az aszkorbát bioszintézisben, illetve a komplex I összeszerelésében) kapcsolatban megállapították, hogy azok minden bizonnyal függetlenek egymástól, mivel az aszkorbát deficiens *vtc2* mutáns (amely a vad típus aszkorbát tartalmának mindössze 10%-át tartalmazza) esetében nem változott meg a komplex I mennyisége. Így nem valószínű, hogy az aszkorbát bármilyen szerepet játszana a komplex I összeszerelésében, vagy legalábbis nagyon csekély mennyiségű aszkorbát elegendő ahhoz (Schimmeyer és mtsai 2015). Az alternatív aszkorbát bioszintetikus útvonalak, amelyek nem érintik a GLDH-t, léteznek még a GLDH deficiens vonalban is, biztosítva a nagyon csekély aszkorbát szintet. Mindent összevetve tehát a GLDH komplex I összeszerelésben játszott funkciója látszólag független az aszkorbát bioszintézisben betöltött szerepétől.



2. ábra. A C-vitamin bioszintézis és a mitokondriális elektrontranszfer lánc kapcsolata

A GLDH a vanillil-alkohol oxidáz flavoprotein családba tartozik, amelynek szintén tagja az L-gulonolaktón-oxidáz is. A későbbi enzim felelős az aszkorbinsav bioszintézis utolsó lépéséért számos állatfaj esetében. A folyamat H_2O_2 melléktermék képződéssel jár. A GLDH, ellentétben a rokon aldonolaktón oxidoreduktázokkal azonban egy alanint (Ala-113) tartalmaz a konzervált glicin, vagy prolin helyett az egyik fontos pozícióban, a kofaktor izoalloxazin flavin gyűrűje közelében. Minden bizonnyal ez a csere akadályozza meg, hogy a molekuláris oxigén elérje a redukált flavint, így kerülve el a H_2O_2 képződést (Leferink és mtsai 2008, 2009). A GLDH a FAD-ot nem kovalensen kötött formában tartalmazza, mivel szintén hiányzik belőle a FAD kötésben szerepet játszó konzervált hisztidin (Leferink és mtsai 2008). Az enzim, oxidáz aktivitás helyett meglévő dehidrogenáz aktivitása feltehetően hozzájárul a mitokondriumra nehezedő H_2O_2 nyomás csökkentésében, amely révén elkerülhető, hogy a GLDH redox érzékeny ciszteinjének (Cys-340) oxidációja miatt az enzim inaktiválódjon (Leferink és mtsai 2009b). A rekombináns *Arabidopsis* GLDH az L-galaktono-1,4-laktónon kívül, annak izomerét, az L-gulonolaktont is oxidálja, igaz jóval magasabb K_m értékkel (0.17 mM vs. 13.1 mM) (Leferink és mtsai 2008). Így könnyen elképzelhető, hogy a GLDH szintén szerepet játszik az alternatív, kisebb jelentőségű aszkorbát bioszintetikus útvonalak L-gulonolaktón oxidációjában (1. ábra). Habár a teljesség kedvéért meg kell jegyeznünk, hogy növények esetében is leírtak L-gulonolaktón oxidáz aktivitást (Maruta és mtsai 2010).

1.1.1.2. A C-vitamin szintézis szabályozása, limitáló lépése

Az Arabidopsis levelek jelentős mértékű aszkorbátot akkumulálnak, miután nagy fény intenzitásnak teszik ki őket. A VTC2 kifejeződése és a GDP-L-galaktóz foszforiláz aktivitása (1. ábra) gyorsan növekszik, miután a növényeket nagy fényintenzitású helyre helyezik, azonban a Smirnoff-Wheeler útvonal többi enzimaktivitása csak kis mértékben változik meg. A VTC2, VTC5 páros (1. ábra) kifejeződése szintén kicsúcsosodik a fényciklus elején és a cirkadian óra kontrollja alatt áll. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a GDP-L-galaktóz foszforiláz fontos szerepet játszhat az aszkorbát bioszintézis szabályozásában (Dowdle és mtsai 2007). Ezt a feltételezést alátámasztja az a tény is, hogy a GDP-D-mannóz és a GDP-L-galaktóz nem csupán az aszkorbát szintézisére használdik fel, hanem a sejtfa poliszacharidok szintézisére és/vagy fehérje glikozilációra is (Smirnoff és mtsai 2000, Reuhs és mtsai 2004). A foszforiláz által katalizált reakció a Smirniff-Wheeler útvonal elkötelező lépése és ezért a VTC2, VTC5 páros kiváló célpont a C-vitamin bioszintézis szabályozására is (1. ábra).

Az aszkorbát, az L-galaktono-1,4-lakton és az L-galaktóz nem befolyásolja a VTC2 aktivitását, azt valószínűsítve ezzel, hogy ezek az intermedierek nem gyakorolnak rá negatív visszacsatolós gátlást (Dowdle és mtsai 2007). Az aszkorbát adagolása azonban csökkenti Arabidopsis növényekben a VTC2 kifejeződését, azt valószínűsítve, hogy az aszkorbát transzkripciós szinten gyakorol negatív visszacsatolást a szintézisére (Smirnoff 2000a).

A VTC2, VTC5 párossal szemben a GLDH túltermeltetése dohány növények esetében nem vonta maga után az aszkorbát szint növekedését (Imai és mtsai 2009), ahogyan a paradicsomban történő GLDH csendesítés, a csökkenő mRNS, fehérje és enzimaktivitás ellenére sem befolyásolta az aszkorbát mennyiségét, vagy redox státuszát (Alhag Dow és mtsai 2007). Mindezen megfigyelések alapján igen valószínű, hogy nem a mitokondriális, GLDH által katalizált lépés a sebesség meghatározó, ellenben a VTC2, VTC5 páros döntő szerepet tölt be a C-vitamin bioszintézis szabályozásában. Ezt a vélekedést támasztja alá az a kísérletes megfigyelés is, amely során dohánylevelekben kivi gyümölcsből származó VTC2 homológ tranziens túltermeltetése az aszkorbát tartalom megháromszorozódását eredményezte, egyértelműen arra utalva, hogy valóban ez az enzim a C-vitamin bioszintézis sebesség meghatározó lépése (Laing és mtsai 2007). A VTC2 konstitutív túltermelése szintén sikerrel emelte meg az aszkorbát szintet paradicsomban, eperben és burgonyában is (Bulley és mtsai 2012).

1.1.2. Az aszkorbát növényi sejtben betöltött funkciói

A C-vitaminnal kapcsolatban, még a szakemberek közül is, szinte mindenkinek először az antioxidáns sajátsága jut eszébe. Jelen értekezésben is ennek szentelünk a legnagyobb figyelmet, azonban fontos szót ejtenünk más, növényi sejtben betöltött szerepéről is. Rendkívül sokféle folyamatban kap fontos szerepet, olyanokban, mint például fotoprotekció, különféle esszenciális anyagok bioszintézise, a növények fejlődésének különböző folyamatai és még sorolhatnánk.

Könnyen elképzelhető, hogy kezdetben az aszkorbát viszonylag egyszerűbb feladatokat töltött be majd az evolúció során fokozatosan került bevonásra a teljes sejtszintű anyagcsere szabályozásába. Az aszkorbát feladatkörének kitágulásában szerepet játszhatott az aszkorbát/DHA redox páros mérsékelt redoxpotenciálja (stressz-mentes körülmények között 90 mV körül van (Noctor 2006)). Ez a mérsékelt redox potenciál lehetővé teszi a molekula számára, hogy a biokémiai reakciók garmadájában vehessen részt anélkül, hogy túl reaktív lenne, vagyis túl gyorsan elfogyna, ahhoz, hogy a sejt anyagcseréjének részese legyen. Az aszkorbát növényekben megfigyelt gyakori előfordulása feltételezhetően növeli azon molekulák számát, amelyekkel szemben elektrondonorként viselkedhet.

A másik kevésbé nyilvánvaló ok az aszkorbát különleges reciklálási módja lehet. Az aszkorbát monodehidroaszkorbátból (egy elektronnal), vagy dehidroaszkorbátból (két elektronnal) történő regenerációja NADH, illetve GSH mint elektrondonorok terhére történik. Ezt követően az oxidált GSH, glutation reduktáz segítségével, NADPH elektrondonor felhasználásával regenerálódik (4. ábra, 1.1.4. fejezet). Ez azt jelenti, hogy a MDHAR és a DHAR aktivitások között fennálló egyensúly függvényében az aszkorbát-glutation ciklus NADH, vagy NADPH felhasználó, így NAD^+ , vagy NADP^+ ellátó. Tekintve, hogy ezek a kofaktor párosok eltérő funkcióval rendelkeznek a sejtben meglévő MDHAR/DHAR arány befolyásolhatja a növényi sejtek anyagcseréjét. A peroxiszómák esetében például felmerült, hogy az MDHAR egyik fő funkciója a peroxiszómális anyagcsere NAD^+ -dal történő ellátása lehet (del Rio és mtsai 1998).

Mindezen sajátságok hozzájárulhattak az aszkorbát funkcionális sokszínűségéhez, amelyet az alábbiakban szeretnénk röviden áttekinteni.

1.1.2.1. Az aszkorbát, mint antioxidáns

Mielőtt magával a vitaminnal foglalkoznánk, nézzük meg röviden, mitől is nevezhetünk egy anyagot antioxidánsnak, melyek a legfontosabb antioxidáns sajátságok. Az antioxidánsok védelmet nyújtanak az oxidáció (az elektronok elvesztése) ellen, mint például a reaktív oxigénvegyületek (ROS) oxidáló hatása, azáltal, hogy elektronokat adnak ezeknek a molekuláknak, így redukálják őket és visszaállítják a nem toxikus, nem oxidáló környezetet.

Az antioxidánsok ellensúlyozzák a reaktív oxigénvegyületek elektronrabló sajátságait, amelyek révén ezen vegyületek toxikussá válnak. A folyamat során az antioxidánsok maguk oxidálódnak. Egy jó antioxidáns oxidált formájában sem toxikus és képes más forrásból elektronokat visszaszerezve a reciklálásra, vagy regenerációra (Gest és mtsai 2013).

Az aszkorbátot több ok miatt is kiváló antioxidánsnak tartják. A molekula képes elektronokat átadni azon képessége folytán, hogy az elektronok delokalizálódhatnak az 5 tagú széngyűrűben. Az oxidoredukciós potenciálja révén képes reakcióba lépni a hidroxil gyökkel, a szinglet oxigénnel, valamint a glutation és tokoferil gyökkel is (Noctor és Foyer 1998). Az aszkorbát közvetlen módon is képes a reaktív oxigénvegyületek semlegesítésére, de bizonyos esetekben a glutationtól hatékonyabb módon képes az oxidált szerves molekulák reparálására (Tsuchiya és mtsai 1985, Niki és mtsai 1991) és a glutation gyököktől kevésbé toxikus köztitermékeket képez (Sturgeon és mtsai 1998). Az első oxidációs terméke a monodehidroaszkorbát, amely gyökhöz képest igen stabil, ami igen csak behatárolja a láncreakció kialakulásának valószínűségét. Stabilitásának hátterében az áll, hogy a monodehidroaszkorbát képes a feles elektronokat a központi széngyűrű és ennek három karbonil csoportja körül delokalizálni (Bielski és mtsai 1982). A monodehidroaszkorbát gyök szintén képes egy másik monodehidroaszkorbát gyökkel spontán diszproporcionálódni, amely folyamat eredménye egy aszkorbát és egy dehidroaszkorbát (DHA) (nem gyök) molekula (Smirnoff 2000b). Az aszkorbát oxidált formáiból képes specifikus reduktázok és glutationról, illetve NADH-ról, NADPH-ról származó elektronok segítségével az aszkorbát-glutacion ciklus során regenerálódni (Foyer és Noctor 2011) (4. ábra).

Ami a két legfontosabb, kis molsúlyú vízoldható antioxidáns, az aszkorbát és a glutacion arányát illeti, a növények antioxidáns rendszere jelentős mértékben különbözik a tipikus emlős sejtektől. Egy tipikus emlős sejtben az aszkorbát koncentrációja 0.1-0.8 mM között változik (a plazmában nem éri el a 0.1 mM-os koncentrációt), ezzel szemben a glutacioné egy nagyságrenddel nagyobb (2-5 mM). Ezzel szemben a levél sejtjeiben megközelítőleg 2-5 mM-os aszkorbát koncentráció mérhető, míg ettől valamivel elmarad a glutacioné. Az élesztő sejtekben szintén magasabb a GSH szint, mint az eritroaszkorbáté (Spickett és mtsai 2000). Hogy mi ennek a jelentősége, egyelőre nem tudni. Mindenesetre azt érdemes ismételtén megjegyeznünk, hogy az aszkorbát a glutacionhoz képest bizonyos tekintetben „hatékonyabb” szabadgyök fogó, mivel az oxidált formája, a monodehidroaszkorbát kevésbé reaktív és így kevésbé káros, mint a GSH eredetű gyökök (Sturgeon és mtsai 1998).

1.1.2.2. Az aszkorbát fotooxidatív stresszel kapcsolatos funkciói

Az aerob anyagcsere, valamint a fény kölcsönhatása a pigment molekulákkal nagymennyiségű ROS (szuperoxid, H_2O_2 , hidroxil gyök, szinglet oxigén) keletkezésével jár együtt. Ezek előszeretettel oxidálják a fehérjéket, telítetlen zsírsavakat és a DNS-t, ezáltal károsítják a sejt funkcióit.

Az aszkorbát számos szerepet tölt be a fotoprotekcióban (Smirnoff 2000a) úgy, mint: a H_2O_2 semlegesítése az aszkorbát peroxidáz (APX) aktivitáson keresztül, a ROS direkt semlegesítése, a hidrofób antioxidáns α -tokoferol regenerációja (Foyer és Shigeoka 2011), a luminális aszkorbáton keresztül a fotorendszer II-nek történő elektron átadása, valamint a xantofil körben, mint a violaxantin deepoxidáz kofaktora szerepel. Ez utóbbi kör lehetővé teszi intenzív megvilágítás esetén a fényenergia hő formájában történő disszipálását, a fotoszintetikus apparátus védelme érdekében (nem fotokémiai kioltás) (Deming-Adams 1996). A kör három különféle karotinoid (violaxantin, anteraxantin és zeaxantin) bevonásával zajlik: kis mértékű megvilágítás mellett a violaxantin lehetővé teszi a fényenergia klorofill a irányába történő továbbítását. Nagy fényintenzitás és alacsony pH esetén (amikor nagy a fotoszintetikus aktivitás), a violaxantin a deepoxidáz aktivitás révén anteraxantinná, majd zeaxantinná alakul. Ezen reakciók kofaktorként aszkorbátot igényelnek, továbbá alacsony megvilágítás és 7.5-es pH mellett reverzibilisek. A zeaxantin (intenzív megvilágítás, vagyis alacsony pH esetén) az elnyelt fényenergia egy részét pedig hőenergia formájában újra kisugározza. Így az aszkorbát számos funkciója közvetlenül a fotoszintézissel kapcsolatos, a kloroplaszt magas aszkorbát tartalma, különösen az alpesi növények esetében azt jelezheti, hogy az aszkorbát pufferre nagy szükség van tipikus fotooxidatív stressz, erős fényintenzitás, és hideg esetén. A kloroplasztokban ráadásul az APX enzimek különösen érzékenyek az alacsony aszkorbát koncentrációból fakadó gátlásra.

1.1.2.3. Az aszkorbát, mint enzim kofaktor

Az aszkorbát elektronátadó képessége miatt számos reakcióban kofaktorként szerepel.

Habár az aszkorbát viszonylag könnyedén képes a H_2O_2 nem enzimikus redukciójára, a növények mégis az APX izoenzimek (E.C.1.11.1.11) garmadájával rendelkeznek, amelyek a H_2O_2 aszkorbát függő, vizet és monodehidroaszkorbátot eredményező redukcióját végzik (Asada és Miyake 1992). Az APX hasznát mi sem mutatja jobban, mint a kifejeződésében megváltoztatott transzgenikus növények. Erre jó példa a citoszolikus APX lecsendesítése következtében dohány növényekben kialakuló fokozott ózonérzékenység (Orvar és Ellis 1997), illetve az ózonnak kitett növényekben megfigyelhető fokozott citoszolikus APX kifejeződés (Kubo és mtsai 1995). Az APX aktivitás számos sejtorganelumban megtalálható, így a citoszolban, a kloroplasztban, a mitokondriumban, a glioxiszómában, és a peroxiszómában (Smirnoff 2000b). Ugyan igaz, hogy a fenti sejtorganelumok közül a peroxiszóma, a glioxiszóma és a mitokondrium katalázt is tartalmaz, de ez utóbbi enzim kis affinitással bír a H_2O_2 irányába. Így minden bizonnyal az APX fontos szerepet tölt be a H_2O_2 termelő sejtorganelumokból szivárgó H_2O_2 semlegesítésében. A peroxiszómális elhelyezkedés különösen fontos szerepet tölthet be intenzív fotorespiráció során (Smirnoff 2000a). Az APX aktivitás rendkívül jól reagál a különböző környezeti hatásokra, különösen azokra, amelyek oxidatív stresszel járnak együtt, mint például az intenzív megvilágítás, alacsony hőmérséklet és az olyan légszennyező anyagok, mint az ózon (Smirnoff 1995, Noctor és Foyer 1998). Fontos újfent megemlítenünk, hogy a

transzgenikus növényekben elért csökkent, vagy emelkedett APX aktivitás nagymértékben befolyásolja ezen növények oxidatív stressz tűrését.

Az oxigenázok, hormonok, flavonoidok valamint alkaloidok szintézisében, illetve a sejtfal módosításában szerepet vállaló enzimek. Az ezen reakciókhoz szükséges elektronok forrása a Fe^{2+} ionok Fe^{3+} ionokká történő oxidációja. Az ily módon képződött Fe^{3+} ionok pedig az esetek többségében aszkorbát segítségével redukálódnak (Prescott és John 1996). Álljon itt néhány konkrét példa: a 2-oxoglutarát függő dioxigenázok az enzimek egy olyan osztályát képezik, amely az aktivitásához aszkorbátot igényel, annak érdekében, hogy elkerülje az aktív helyén található vasion túloxidálódását. Ilyen enzim például a prolin hidroxiláz, amely a prolin oldalláncok transzlációt követő hidroxilálásáért felelős, elsősorban a sejtfal hidroxiprolin gazdag glikoproteinjei esetében. Ezen elsősorban extracelluláris fehérjék körébe tartozó extenzinek, a hidroxiprolin gazdag glikoproteinek és az arabinogalaktán fehérjék (Sommer-Knudsen és mtsai 1998). A 2-oxoglutarát függő dioxigenázok ezen túl részt vesznek a flavonoidok (például az antocianinek) bioszintézisében (antocianidin szintáz, flavon-3-hidroxiláz, flavonol szintáz, flavon szintáz 1, és az alkaloid oxigenázok). A növényi szövetek aszkorbát és antocianin tartalma erősen korrelál és az alacsony aszkorbát szint csökkenti az antocianin felhalmozódását (ahogy ez kiválóan megfigyelhető a csökkent aszkorbát tartalmú vtc mutánsok esetében) (Page és mtsai 2012).

Korábban láttuk, hogy az aszkorbát az APX kofaktora, ezen túl egyértelműen bizonyított, hogy a molekula szükséges bizonyos 1-Cys típusú peroxiredoxinok számára (Monteiro és mtsai 2007). Ez utóbbi megfigyelés azt bizonyítja, hogy nemcsak a tiolok képesek a peroxiredoxinok redukálására, hanem az aszkorbát is képes biológiai redukálószerként működni. Ezen túl számos megfigyelés utal arra, hogy az aszkorbát szerepet játszik a Cys típusú peroxiredoxinek kifejeződésének szabályozásában (Baier és mtsai 2000, Horling és mtsai 2003, Groten és mtsai 2006, Shaikhali és Baier, 2010). Az aszkorbát tehát enzim kofaktorként nélkülözhetetlen olyan anyagok bioszintézisében, mint az etilén (L-aminociklopropán-L-karboxilát oxidáz) a gibberelin sav (gibberelin-20-oxidáz), az antocianinek és a flavonoidok (Smirnoff és Wheeler, 2000). Ezen anyagok pedig nélkülözhetetlen szerepet játszanak a gyümölcsök fejlődésében, illetve érésében.

1.1.2.4. Az aszkorbát szerepe a heterotróf szövetekben: a gyümölcsök

Az aszkorbát igen gyakran nagy koncentrációban halmozódik fel a gyümölcsökben, ahol a fotoszintetikus aktivitáshoz látszólag nem kapcsolható szerepet tölt be. Az aszkorbát ubikviter természete lehetővé teszi, hogy más anyagok prekursora legyen, de természetesen prekuzorként viselkedve már nem képes más funkciókat betölteni (Ishikawa és mtsai 2006a). Az aszkorbát tehát olyan szerves savak prekursora (oxálsav, L-treonát, L-tartarát), amelyek igen nagy mennyiségben fordulnak elő a gyümölcsökben (Rassam és Laing 2005, DeBolt és mtsai 2007). Az olyan fajokban, mint például a szőlő a tatarát és az oxalát a domináns szerves

sav és éppen ezért a szőlő meglehetősen szegény aszkorbátban, kivéve a tartarátot nem képző fajok, amelyekben háromszor nagyobb aszkorbát szintet lehet mérni (DeBolt és mtsai 2006). A szőlőben az aszkorbát és a tartarát felhalmozódás minden valószínűség szerint fejlődésileg szabályozott (Melino és mtsai 2009) ahogyan a kiviben az oxalát felhalmozódása (Rassam és Laing, 2005). Számos esetben felvetették, hogy az aszkorbát nemcsak a fotoszintetikus szövetekben tölt be fontos szerepet a stressz-védelemben, hanem az olyan szervekben is, mint a gyümölcs (Hegedűs és mtsai 2010). Ezek a hatások igen gyakran poszt-harveszt szembetűnőek (Hegedűs és mtsai 2011), gyakran az extrém hőmérséklettel kapcsolatosak, ahogy ezt a paradicsom (Malacrida és mtsai 2006, Stevens és mtsai 2008, Gest és mtsai 2010), alma (Davey és Keulemans, 2004, Ioannidi 2009; Davey és mtsai 2006, 2007) és körte (Veltman és mtsai 1999, Cascia és mtsai 2012) esetén láthatjuk. Paradicsom esetében a gyümölcs aszkorbát szintje és a MDHAR aktivitása jól korrelál a hideg stressz elleni toleranciájával, ami a gyümölcs keménységét illeti (Stevens és mtsai 2008, Gest és mtsai 2010). Hasonló megfigyeléseket lehetett só-stressz tolerancia esetén is tenni (Gautier és mtsai 2010). Klimakterikus gyümölcsök esetében maga az érés folyamata közismerten egy oxidatív folyamat, amely magában foglalja mind az antioxidáns tartalom, mind az enzimek szintjének változását (Jimenez és mtsai 2002), a sejtfal szétesését (Fry, 1998, Brummell, 2006), illetve más öregedés-szerű folyamatokat (Faurobert és mtsai 2007). Az apoplastban Cu^{2+} ionok jelenlétében az aszkorbát hozzájárulhat a hidroxil gyökök képződéséhez, ami pedig a pektin nem-enzimes feldarabolódásához vezethet a gyümölcserés során, így hozzájárulhat a gyümölcs puhulásához (Dumville és Fry, 2003). Az érés természetesen szükséges a magvak elszórásához. A magvak védelme vagy elszórása pedig jelentős evolúciós előnyt jelent bármely élőlény számára. A nem klimakterikus növényekben, mint például a borsóban szintén magas kis molssúlyú és fehérje antioxidáns szinteket mértek, amely megfigyelés kiemeli a ROS kontrollját a reproduktív szövetekben (Matamoros és mtsai 2010). A borsó mag érése során a csökkent aszkorbát szint együtt jár a DHAR aktivitás emelkedésével, amely jól mutatja az aszkorbát tartalom megőrzésére és degradációjának késleltetésére tett lépések fontosságát.

1.1.2.5. Az aszkorbát szerepe a mag fejlődésében, tárolásában és csírázásában

Az aszkorbát és az antioxidáns enzimek a mag fejlődésében, öregedésében, illetve csírázásában betöltött szerepe valószínűleg a kiszáradás (Leprince és mtsai 1993, Smirnoff 1993) és a csírázás (Schopfer és mtsai 2001, Lee és mtsai 2010) során természetesen tapasztalható oxidatív stresszt mérséklő sajátságukkal kapcsolatos. Ezen időszak alatt a kis molssúlyú és enzimes antioxidánsok mérséklék a ROS felhalmozódását és így megakadályozzák az enzimek denaturációját, a lipidperoxidációt, illetve a plazmamembrán integritásának elvesztését, ezáltal késleltetik az ionok fokozott szivárgását, a turgor összeesését és a sejthalál kialakulását. Mindezen folyamatokon túl az aszkorbát szerepet játszik a hormonális egyensúly kontrolljában, amelynek fontos szerepe van a magok csírázásának szabályozásában (Ye és mtsai 2012). A hagyományos magvak esetében, amelyek a mag fejlődésének végén kiszáradáson esnek át, a mag fejlődése során változás figyelhető meg az aszkorbát tartalomban, illetve az antioxidáns

fehérjék aktivitásában (Arrigoni és mtsai 1992). Már korábban is gyanították, hogy az aszkorbát szerepet játszhat a magvak konzerválásában. Erre utalt az a megfigyelés, amely szerint a csökkent APX aktivitás és a mag csírázóképeségének elvesztése, vagy a magok fejlődésében tapasztalható anomáliák gyakoriságának növekedése korrelációt mutat (De Gara és mtsai 1991). Közvetlenül a mag kiszáradása előtt a magok képesek lesznek az aszkorbát bioszintézisére, amely arra utal, hogy annak szerepe lehet a maga kiszáradása, illetve csírázása okozta oxidatív stressz kezelésében (Arrigoni és mtsai 1992, Hendry és mtsai 1993). Amikor a magok elkezdenek kiszáradni mind az aszkorbát, mind a DHA tartalmuk drasztikusan lecsökken (Arrigoni és mtsai 1992), tehát az embriók a továbbiakban nem tartalmaznak aszkorbátot és DHA-t is csak igen csekély mennyiségben (például *Pinus pinea*: 0.8, *Vicia faba*: 0.6 és *Avena sativa*: 0.5 $\mu\text{mol (g FT)}^{-1}$) (Arrigoni és mtsai 1992, De Gara és mtsai 1997, Tommasi és mtsai 1999). Az aszkorbáthoz hasonlóan, az aszkorbát rendszer oxidoreduktáz enzimeinek aktivitása is drasztikus mértékben csökken a mag kiszáradása során (Arrigoni és mtsai 1992) (Matamoros és mtsai 2010). Négy napos tárolást követően mind a kis molsúlyú antioxidánsok, mind az antioxidáns enzimek aktivitása csökkent borsószemekben (Matamoros és mtsai 2010).

A szuperoxid diszmutázt és APX-et túltermelő dohány magok hosszabb élettartamot, emelkedett csírázási arányt mutattak ozmotikus-, só- és hideg stressz esetén (Lee és mtsai 2010). Az APX túltermeltetése önmagában elegendő volt ahhoz, hogy kedvezőbb csírázási tulajdonságokat mutasson a dohány mag só- és ozmotikus stressznek kitéve (Sun és mtsai 2010). Érdekes, hogy az aszkorbát és az APX ilyen kritikus szereppel bír csírázáskor, annak ellenére, hogy a száraz magvak sem aszkorbáttal, sem APX aktivitással nem rendelkeznek. Ez az üvegnyak effektus nem sokkal a mag duzzadását (a víz felszívódását) követően oldódik, mivel jelentős aszkorbát akkumuláció történik a magokban (Yamazaki és Piette, 1961). A mag duzzadását követően a DHA reciklálása a leggyorsabb aszkorbát regenerációs lépés. Az embriók DHA-t és számos DHA-t redukáló fehérjét tartalmaznak (Tommasi és mtsai 1999).

A nem kiszáradó, vagy rekalcitráns magok kimondottan érzékenyek a kiszáradásra és rövid tárolási élettartammal jellemezhetőek. A magok kifejlődési szakaszból általában egyből a csírázásba mennek át, így metabolikusan aktívak maradnak. Bár az embriók igen nagy mennyiségű aszkorbátot (*Ginkgo biloba*: 2.1, *Quercus cerris*: 2.4, *Aesulus hippocastanum*: 3.0 $\mu\text{mol (g FT)}^{-1}$) és DHA-t (*Ginkgo biloba*: 0.7, *Quercus cerris*: 1.7, *Aesulus hippocastanum*: 2.7 $\mu\text{mol (g FT)}^{-1}$) tartalmaznak (Tommasi és mtsai 1999), az antioxidáns enzimaktivitás minden bizonnyal nem elegendő ahhoz, hogy a tárolás során fellépő oxidatív stresszel megbirkózzanak. Példaként említhetjük a *G. biloba* magjait, amelyek életképessége csökken, abban az esetben, ha 25°C-on tárolják őket 4 °C helyett (Tommasi és mtsai 2006). A csírázási képesség csökkenése egyértelműen összefüggésbe hozható a 25°C-on tárolt magvakból képződő embriók (4 °C-on tároltakhoz képest) csökkent aszkorbát és glutation szintjével. Ez utóbbi viszont összefügg a csökkent DHAR aktivitással, valamint az aszkorbát szintézis stimulációjának hiányával (az L-galaktóz dehidrogenáz aktivitása 25°C-on stabil, ellenben 4 °C-on emelkedett). A rekalcitráns magok kevesebb DHA redukáló aktivitással bíró fehérjét tartalmaznak az ortodox magokhoz képest (kettőt a *G. biloba*, a *Q. cerris* és egyet az *A. hippocastanum*; Tommasi és mtsai 1999). Ezen kívül az APX aktivitás folyamatosan csökken

a mag tárolása során. Mindez azt mutatja, hogy sem a kis molsúlyú antioxidánsok, sem az enzimek nem nyújtanak kellően hatékony védelmet a kiszáradás okozta lipidperoxidáció elkerüléséhez, így rontva a mag esélyeit a csírázásra és a túlélésre (Gest és mtsai 2013).

1.1.2.6. Az aszkorbát magasabb rendű növények fejlődésében betöltött szerepe

1.1.2.6.1. Növekedés és fejlődés

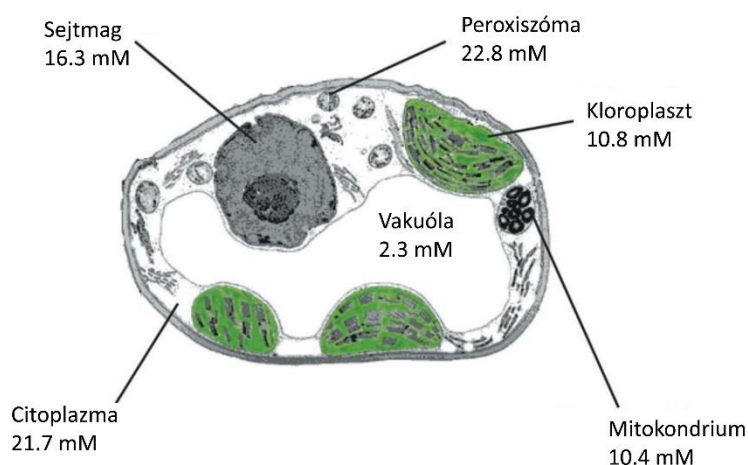
A csökkent aszkorbát tartalmú vtc mutánsok vizsgálata az aszkorbát számos, addig ismeretlen szerepére derített fény a normális növényi fejlődésben. A vtc2, vtc5 duplamutáns esetében különösen szembetűnő volt az aszkorbát szerepe a növényi növekedésben. Ezek a növények, a csírázást követően egyszerűen megálltak a növekedésben, amennyiben nem aszkorbáttal, vagy galaktózzal kiegészített tápközegen nőttek. A sziklevelek, feltehetőleg az aszkorbát fotoprotekcióban betöltött szerepe miatt elvesztették klorofill tartalmukat (Dowdle és mtsai 2007). Ugyan a növekedési problémák pontos okára a mai napig nem derült fény, de az sejthető, hogy a sejtfal komponensek csökkent szintézisének hátterében az aszkorbát függő oxigenázok állnak. Ezen kívül a redox homeosztázis megváltozása minden bizonnyal anyagcserezavarokhoz vezet (Dowdle és mtsai 2007).

1.1.2.6.2. Sejtciklus szabályozás

Az aszkorbát/DHA páros láthatóan szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában. Az aszkorbát, a DHA és a monodehidroaszkorbát képes növelni a G1 fázisból S fázisba lépő sejtek arányát. Az aszkorbát bioszintézist gátló lycorin megakadályozta a sejt osztódását, illetve megnyúlását (Citterio és mtsai 1994). Egyelőre csak elméletek születtek az aszkorbát sejtnövekedést befolyásoló szerepéről. Az egyik legelfogadottabb szerint, a citoplazmában a citokróm b oxidálja az aszkorbátot, az elektronok az apoplaszt monodehidroaszkorbátjára kerülnek, ahol ez aszkorbáttá alakul. A plazmamembránon keresztüli elektrontranszfer egy H^+ ATPáz stimulál, amely képes fokozni a sejt növekedését (Smirnoff és Pallanca 1996). Ennek alternatívája az az elmélet, amely szerint az aszkorbát sejtnövekedést fokozó hatásának hátterében, a sejtfal szintéziséért felelős enzimek aszkorbát kofaktor függése áll (Cooper és mtsai 1994, De Tullio és mtsai 1999).

1.1.3. A C-vitamin koncentrációja különböző növényi forrásokban

A legújabb trendeknek megfelelően érdemes megemlíteni már az algák vitamintartalmát is. Az algák C-vitamin koncentrációja jóval alacsonyabb, mint a magasabb rendű növényeké, hozzávetőlegesen $0.5 \mu\text{mol (g FT)}^{-1}$ (FT: friss tömeg) körül alakul (Shiu és Lee 2005; Mellado és mtsai 2012). Összehasonlításképp a leggyakrabban vizsgált, magasabb rendű növény az *Arabidopsis* C-vitamin tartalma $5 \mu\text{mol (g FT)}^{-1}$ körül alakul (Kotchoni és mtsai 2009). Azt azonban mindenképpen érdemes megjegyeznünk, hogy ezek az értékek erősen függenek a szövet típusától (Lorence és mtsai 2004), a növény korától (Zhang és mtsai 2009), a mintavétel adott napon belüli időpontjától és a fényintenzitástól (Bartoli és mtsai 2006). Nagyjából $2\text{--}20 \mu\text{mol (g FT)}^{-1}$ közötti értékekről szoktak magasabb rendű növényi levelek esetében beszámolni, magasabbról mérsékelt égövi örökzöldek és alpesi fajok esetében (Smirnoff, 2000a, Smirnoff és mtsai 2001, Streb és mtsai 2003). Egy fajon belül, mint például a kínai datolyaszilva (*Diospyros kaki*) esetében igen nagy eltéréseket is lehet találni a levelek aszkorbát koncentrációjában $27\text{--}138 \mu\text{mol (g FT)}^{-1}$ -ig (Li és mtsai 2009). Bizonyos alpesi növények levelei esetében az aszkorbát a levél teljes széntartalmának mintegy 19%-át kiteheti, elérheti a $45 \mu\text{mol (g FT)}^{-1}$ koncentrációt is (Streb és mtsai 2003). Az alpesi növényekben az aszkorbát koncentráció a magassággal is pozitíven korrelál (Wildi és Lütz, 1996). Ezen növények kloroplasztja akár 10-szer akkora aszkorbát mennyiséget is tartalmazhat, mint az alacsonyabban termő növényeké feltehetően a magas fényintenzitás, UV szint és az alacsony hőmérséklet miatt (Streb és mtsai 1997). Az intracelluláris koncentrációviszonyokat, az *Arabidopsis* mint példán szemléltetve elmondhatjuk, hogy a sejtmag viszonylag magas koncentrációban tartalmazza az aszkorbátot (16.3 mM). A legmagasabb koncentráció a citoszolban (21.7 mM) és a peroxiszómában (22.8 mM) mérhető, míg a mitokondrium (10.4 mM) és a kloroplaszt (10.8 mM) csak közepes aszkorbát koncentrációval jellemezhető (Zechmann és mtsai 2011) (3. ábra).



3. ábra. A C-vitamin intracelluláris eloszlása (Gest és mtsai 2013)

Az aszkorbát a növényen belül elsősorban a fotoszintetikus szervekben halmozódik fel, de magas koncentrációt érhet el nem fotoszintetizáló szövetekben is. Az ezekben mérhető C-vitamin koncentráció erősen

függ a környezeti faktoroktól, a genotípustól és a szerv fejlődési állapotától (Davey és mtsai 2000, Dumas és mtsai 2003, Poiroux-Gonord és mtsai 2010, Hegedűs és mtsai 2010, 2011). Az aszkorbát koncentráció általában magas a merisztémában (Loewus és Loewus 1987, Smirnoff és Pallanca, 1996), a virágokban, fiatal gyümölcsökben (Alhagdow és mtsai 2007, Hancock és

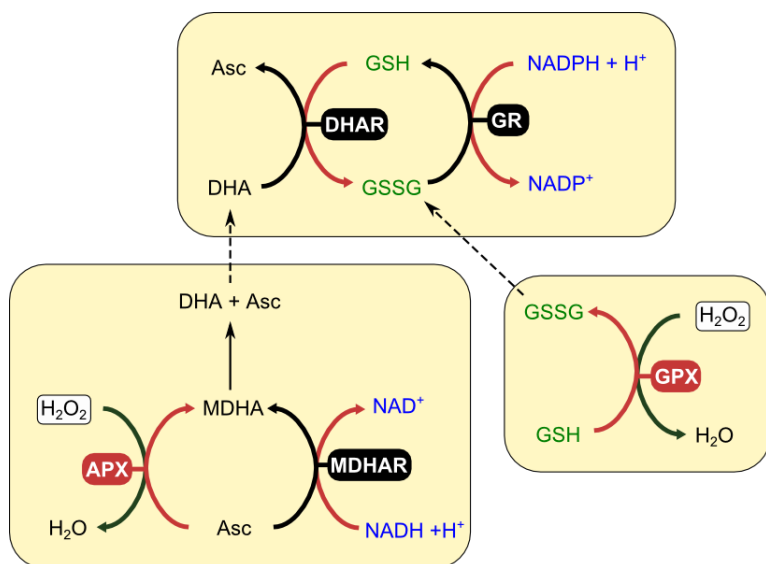
mtsai 2007), a gyökércsúcsokban (Arrigoni 1994) és az indák tenyészőcsúcsaiban, valamint a gumókban (Tedone és mtsai 2004). Egyértelműen a zöldségeket és gyümölcsöket tekintjük a fő C-vitamin forrásunknak. A magasabb rendű növények gyümölcseinek C-vitamin tartalma különösen nagy változatosságot mutat. A vad növények esetében általában magas vitamintartalmat mérhetünk, míg a domesztikáció során ez erősen csökken. A citrusfélék híresei a magas C-vitamin tartalmukról ($\sim 3 \mu\text{mol (g FT)}^{-1}$), ahogyan a kivi is ($7 \mu\text{mol (g FT)}^{-1}$) (Li és 2010). Mindkettőt bőven meghaladó értékről, $170 \mu\text{mol (g FT)}^{-1}$ számoltak be az Amazonas mentén termő camu camu (*Myrciaria dubia*) esetében (Justi és mtsai 2000), ahogyan az Ausztráliában honos kakadu szilva (*Terminalia ferdinandiana*) is hasonlóan magas C-vitamin tartalommal rendelkezik. Az azonos nemzetségen és fajon belül is jelentős eltéréseket lehet megfigyelni. A paradicsom kiváló példát szolgáltat erre. Az eredeti vad fajták, mint például a *Solanum pennellii* több C-vitamint tartalmaz, mint a tradicionálisan termesztett *Solanum lycopersicum*: a termesztett paradicsom $0.5\text{--}2 \mu\text{mol (g FT)}^{-1}$, viszont a *S. pennellii* ennek nagyjából az ötszörösét (Stevens és mtsai 2007). A paradicsom esetében fennálló természetes diverzitást különböző populációk használatával igyekeztek kiaknázni. Keresztezték a vad és a termesztett paradicsomkultúrákat, hogy azonosítani tudják az aszkorbát mennyiségéért felelős lokuszokat. A kísérletek rávilágítottak arra a tényre, hogy a gyümölcs aszkorbát tartalmában tapasztalható változatosság számos genomi részlet által kontrollált (Stevens és mtsai 2007). A gyümölcs aszkorbát tartalmában megfigyelhető különbség mesterségesen is előidézhető etil-metánszulfonáttal, vagy Röntgen-sugárzással kiváltott mutagenézissel. A genom egy, vagy több pontján kiváltott mutáció miatt kialakuló különbségek hasonló mértékűek, mint az a természetes nemesítéssel előállított populációban megfigyelhető (Stevens és mtsai 2006). Érdekes megjegyezni, hogy a domesztikáció a gyümölcs méretének növelését helyezi előtérbe, ami értelemszerűen az aszkorbát hígulását okozza. Itt meg kell jegyeznünk, hogy érdemes lenne megállapítani, hogy vajon a domesztikáció befolyásolta-e a gyümölcsökben zajló aszkorbát szintézis és reciklálás folyamatát.

1.1.4. Az aszkorbát reciklálása: aszkorbát-glutation ciklus

Az aszkorbát szintjét három tényező együttesen határozza meg: a bioszintézis, a metabolizmus és a reciklálás. Az első két tényezőt követően itt az ideje, hogy a harmadikkal a reciklálással is foglalkozzunk!

Az aszkorbát miközben semlegesíti a különböző ROS-et, vagy elektron donorként viselkedik különböző reakciókban monodehidroaszkorbáttá (MDHA), majd DHA-tá oxidálódik. A DHA meglehetősen bomlékony vegyület, továbbá kizárólag az aszkorbát rendelkezik antioxidáns szabadgyök fogó sajátságokkal, ezért a DHA-t meglehetősen gyorsan aszkorbáttá kell redukálni, különben fiziológiás körülmények között percekben belül elvész. Az oxidált aszkorbát reciklálása az aszkorbát-glutation ciklus enzimei (aszkorbát peroxidáz: APX, monodehidroaszkorbát reduktáz: MDHAR, a glutation függő dehidroaszkorbát reduktáz: DHAR és a glutation reduktáz: GR) által katalizált folyamatban glutation, vagy NAD(P)H

terhére történik. A ciklust és egyes elemeit első ízben a kloroplasztban írták le és felfedezői után gyakran Foyer-Halliwell-Asada ciklusnak is nevezik (Szarka és mtsai 2012). A ciklus, az elektronok ciklikus transzferével részt vesz a H_2O_2 eltávolításában, anélkül, hogy aszkorbátot, vagy glutationt fogyasztana (4. ábra) (Noctor és Foyer 1998). Az útvonal résztvevői megtalálhatók az állati sejtekben is. A növényi sejten belül jelenlétüket leírták a citoszolban, a mitokondriumban, a peroxiszómában és a kloroplasztban (Foyer és Noctor 2011).



4. ábra. Az aszkorbát-glutation ciklus és a hozzá kapcsolódó redox folyamatok

Növényi sejtekben egyértelműen a kloroplaszt a ROS fő forrása és (ahogy ezt már korábban is láttuk) az aszkorbát több különféle szerepet játszik eltávolításukban (Asada 1999, Foyer és Halliwell 1976, Müller-Moulé és mtsai 2002, Noguchi és mtsai 2008, Szarka és mtsai 2012). Amennyiben $450 \mu\text{M/s}$ -es

maximális H_2O_2 keletkezési sebességgel és 30 mM -os aszkorbát koncentrációval számolunk, akkor (regeneráció nélkül) mintegy 60 másodperc alatt elfogyna a kloroplaszt teljes aszkorbátartalma (Asada 1999). Ezért nem igazán meglepő, hogy az aszkorbát-glutation ciklust is itt írták le, jóval a bioszintézis felfedezését megelőzve első ízben (Asada 1999, Chew és mtsai 2003, Foyer és Halliwell 1976). A mitokondrium ROS termelése lényegesen alacsonyabb a megvilágított növényi sejten belül, mint a kloroplaszté, vagy a peroxiszómáé, azonban sötétben, vagy nem zöld szövetekben a mitokondrium a legjelentősebb ROS forrás (Szarka és mtsai 2012). Az aszkorbát-glutation ciklus egyes elemeinek mitokondriális jelenlétéről szóló szórványos beszámolókat (Arrigoni és mtsai 1981, Edwards és mtsai 1990) követően a ciklus mind a négy enzimét (APX, MDHAR, DHAR, GR) leírták mitokondrium és peroxiszóma esetében is (Jimenez és mtsai 1997). A mitokondriális elhelyezkedésüket zöld fluoreszcens fehérje segítségével is megerősítették (Chew és mtsai 2003). Ezen kívül az APX, a MDHAR és a GR géntermékek esetében kettős, mitokondriumba és kloroplasztba irányuló importot találtak, míg a DHAR importja kizárólag a mitokondriumba irányult (Chew és mtsai 2003). A mitokondrium további frakcionálásával, illetve enzim latencia mérések segítségével meghatározásra került az egyes enzimek szubcelluláris elhelyezkedése, illetve topológiája is. Az APX és a MDHAR aktivitások elsősorban a belső membrán frakcióhoz kötődtek. Az APX esetében tapasztalt alacsony mértékű latencia arra utal, hogy aktív centruma a két membrán közötti tér felé néz. Míg a MDHAR esetében mérhető nagyfokú latencia elsősorban mátrix oldali elhelyezkedést valószínűsít (Jimenez és mtsai 1997). A GR és a DHAR aktivitások elsősorban a mátrix frakcióra voltak jellemzőek, azonban más szubmitokondriális frakcióban is előfordultak, arra utalva, hogy ezek több szubkompartimentum között oszlanak meg és részben membránkötöttnek lehetnek (Chew és mtsai 2003). A MDHAR, a DHAR és a GR mátrixban

történő elhelyezkedésének hátterében feltehetően a redukáló szerekkel, NADH-val, NADPH-val (citrát körből) történő jó ellátás állhat. Így viszont az APX aktivitás révén a két membrán közötti térben keletkező MDHA-nak és a DHA-nak át kell jutnia a belső membránon, hogy aztán a mátrixban aszkorbáttá redukálódhasson. Mindez egy belső membránban elhelyezkedő transzporter igényét veti fel.

Habár az aszkorbát-glutation ciklus mitokondriális jelenléte egyértelmű, a GSH bizonyosan nem az egyetlen lehetséges elektrondonor, amely a DHA mitokondriális redukciójában részt vesz. Emlős mitokondriumok esetében felmerül a mitokondriális elektrontranszfer lánc, pontosabban a komplex III szerepe a DHA mitokondriális redukciójában (Li és mtsai 2002).

1.2. C-vitamin transzport

1.2.1. 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; Smirnoff és Wheeler, 2000). Ezen kívül az aszkorbát szétosztása a növényen belül, a forrás szövetektől a felhasználó szövetek felé a phloemen keresztül történik (Franceschi és Tarlyn, 2002).

1.2.1.1. Aszkorbát transzport a plazmamembránon keresztül

Növényekben a plazmamembránon keresztüli aszkorbát transzport folyamatok ismertek a legrészletesebben. A növényi sejtek aszkorbát felvételét 1993-ban igazolták első ízben (Mozafar és Oertli 1993), majd később részletekbe menően vizsgálták, árpa (*Hordeum vulgare*) és borsó (*P. sativum*) levelekből származó protoplasztokon (Rautenkranz és mtsai 1994, Foyer és Lelandais 1996), BY2 dohány sejt kultúrán (Horemans és mtsai 1998), illetve bab (*Phaseolus vulgaris*) plazmamembrán vezikulákon (Horemans és mtsai 1996, 1997, 1998b). A protoplasztok és membránvezikulák koncentrációfüggő, Michealis-Menten kinetikát mutató, viszonylag nagy affinitású transzportot mutattak mind az aszkorbát, mind a DHA esetében (Horemans és mtsai 2000). Árpa protoplasztok esetében mind aszkorbát, mind DHA transzportot találtak, igaz a DHA felvétel nagyobb affinitást mutatott, mint az aszkorbát (Rautenkranz és mtsai 1994). Bab plazmamembrán vezikulák és dohány protoplasztok esetében egyértelműen az oxidált forma, DHA felvétele volt preferált (Horemans és mtsai 1997, 1998).

Mindezen megfigyelések azt mutatják, hogy árpa, bab és dohány sejtek esetében az apoplastból a citoplazmába, a C-vitamin oxidált formáját szállító transzportrendszerek találhatóak meg. Ugyanakkor borsó protoplast esetében egyértelmű aszkorbát transzportot írtak le (Foyer és Lelandais 1996), árpa protoplast esetében pedig mind az aszkorbát, mind a DHA transzport kimutatható volt, egyértelmű kompetícióval, ami azonos ligand-kötőhely meglétére utal (Foyer és Lelandais 1996). A plazmamembránon keresztüli aszkorbát és DHA transzport esetében a hajtóerő nem teljesen mértékben tisztázott. Bab plazmamembrán vezikulák esetében a DHA transzport passzívnak, egyszerű facilitált diffúciónak tűnik (Horemans és mtsai 1996, 1998b). Viszont metabolikusan aktív protoplastok esetében úgy tűnik a hajtóerő egy proton-elektrokémiai gradiens (Horemans és mtsai 1998, Rautenkranz és mtsai 1994). Azukibab (*Vigna angularis*) esetében a CCCP (Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone; protonofor) kezelés hatására megváltozott az apoplast aszkorbát és DHA tartalma, azt valószínűsítve, hogy a proton-elektrokémiai gradiens fontos hatást gyakorol a plazmamembrán két oldala között mérhető aszkorbát és DHA koncentrációkülönbségre (Takahama 1996). Tisztított plazmamembrán vezikulák esetében az aszkorbát transzport egy érdekes sajátága a transzstimuláció. Bab és BY2 dohány plazmamembrán vezikulákat mesterségesen aszkorbáttal feltöltve, a DHA felvétel és felhalmozódás nagymértékben stimulálhatónak bizonyult (Horemans és mtsai 1998b). Amennyiben előzetesen [¹⁴C]-jelölt aszkorbáttal előzetesen feltöltött bab membrán vezikulákhoz DHA-t adtak, az a radioaktív aszkorbát molekulák jelentős mértékű kiáramlását okozta (Horemans és mtsai 1998b). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a plazmamembránon keresztüli aszkorbát transzport egy aszkorbát/DHA kicserélődési mechanizmus szerint zajlik.

1.2.1.2. Szubcelluláris aszkorbát transzport

Ahogy azt már korábban megjegyeztük a szubcelluláris aszkorbát transzport megléte minden vitán felül áll, tekintve, hogy keletkezésének helyéről, a mitokondriumból el kell jutnia a többi sejtorganelumba, ahol jelenlétét leírták. A szubcelluláris aszkorbát transzport folyamatok meglehetősen kevésbé voltak ismertek kísérletes munkánk kezdetekor. A kloroplaszt, a tilakoid, a tonoplaszt és a plazmamembránon keresztüli transzportfolyamatokról rendelkezünk bármiféle ismerettel.

A kloroplaszt (envelop) membránon keresztüli transzportfolyamatot korábban kizárólag biokémiai módszerekkel vizsgálták. A kísérleteket spenótból (*Spinacia oleracea*) és borsóból származó intakt kloroplasztokon elvégezve meglehetősen magas, 20 mM K_m értékű, telíthető aszkorbát transzportert találtak, amely glükózt nem szállított (Beck és mtsai 1983, Foyer és Lelandais 1996). Az aszkorbát citoszolból kloroplaszt sztrómába irányuló transzportja tehát egyértelműen egy transzporter mediálta, meglehetősen alacsony, de fiziológiásan releváns affinitással jellemezhető folyamat (Anderson és mtsai 1983, Beck és mtsai 1983, Foyer és Lelandais 1996). A kloroplasztba történő felvétel DHA általi cisz-inhibíciót és transzstimulációt mutat, feltételezhetően facilitatív kicserélődési mechanizmus szerint zajlik. Ezzel

szemben az aszkorbát tilakoid (Foyer és Lelandais 1996), illetve tonoplaszt membránon (Rautenkranz és mtsai 1994) keresztüli átjutása kismértékű, nem telíthető, sem a változó fényintenzitás, sem az ATP adagolása nem befolyásolja. Bár frakcionálással és biokémiai módszerekkel mintegy 4 mM-os aszkorbát koncentrációt tudtak mérni a tilakoid zsákokban (Foyer és Lelandais 1996), később immunológiai módszerekkel (Zechman és mtsai 2011) nem találtak aszkorbátot ugyanott. Mindezek arra utalnak, hogy ha van is bármiféle aszkorbát mozgás a tilakoid membránon keresztül abban transzporter nem vállal szerepet. Ezen kívül a megvilágított tilakoid zsákokban lévő meglehetősen alacsony pH érték inkább az aszkorbát ($pK_1=4.25$) sztrómába történő diffúziójának kedvez, nem pedig az ellenkező irányú mozgásának. Mindezek erősen korlátozzák a violaxantin de-epoxidáz számára hozzáférhető aszkorbát mennyiségét. Egyelőre nem ismert, hogy a növényi sejt miként képes ezzel a problémával megbirkózni.

A közelmúltban lúdfüben (*Arabidopsis thaliana*), rizsben (*Oryza sativa*) (Maurino és mtsai 2006) és paradicsomban (*Solanum lycopersicum*) (Cai 2014) azonosították a nukleotid-aszkorbát transzporter (NAT) génjét. A NAT család tagjai mind a gomba nukleotid bázis transzporterekkel, mind az emlős nátrium-függő aszkorbát transzporterekkel hasonlóságot mutatnak (Gournas és mtsai 2008, Buerzle és mtsai 2013), így bízható aszkorbát transzporter jelölteknek számítanak. Érdekes módon az AtNAT12, az OsNAT10 és a OsNAT11 sejten belüli elhelyezkedését a kloroplasztba jósolták, de a kísérletek az AtNAT12 plazmamembránban történő elhelyezkedését látszanak igazolni (Maurino és mtsai 2006). Fontos megjegyeznünk, hogy a NAT család tagjainak aszkorbát transzport aktivitását mind a mai napig nem igazolták.

2015 év elejéig tehát egyetlen aszkorbát transzportert sem sikerült növényi sejtekben egyértelműen azonosítani. Így igazi áttörésnek számított, amikor az AtPHT4;4-ről az *Arabidopsis thaliana* foszfát transzporter 4 egyik családtagjáról kimutatták, hogy membránpotenciál- és Cl^- -függő módon szállítja az L-aszkorbát redukált formáját (Miayaji és mtsai 2015). Az AtPHT4;4 nagy mennyiségben fejeződik ki a kloroplasztban és ott az envelop membránban helyezkedik el. Az AtPHT4;4 gén kiütése csökkent aszkorbát szintet és a xantofil ciklus csökkent működését eredményezte. Az AtPHT4;4 kiütött növények azonban különösebb fenotípusos eltérést nem mutattak. Érdekes módon a korábban a kloroplaszt aszkorbát transzport esetén megfigyelt DHA cisz-gátlást sem mutatták a proteoliposzómába ültetett transzporterek. Így könnyen elképzelhető, hogy a kloroplaszt (envelop) membránon keresztüli aszkorbát transzport lebonyolításáért nem egyetlen transzporter felelős.

1.2.2. C-vitamin transzport emlős (humán) sejtekben

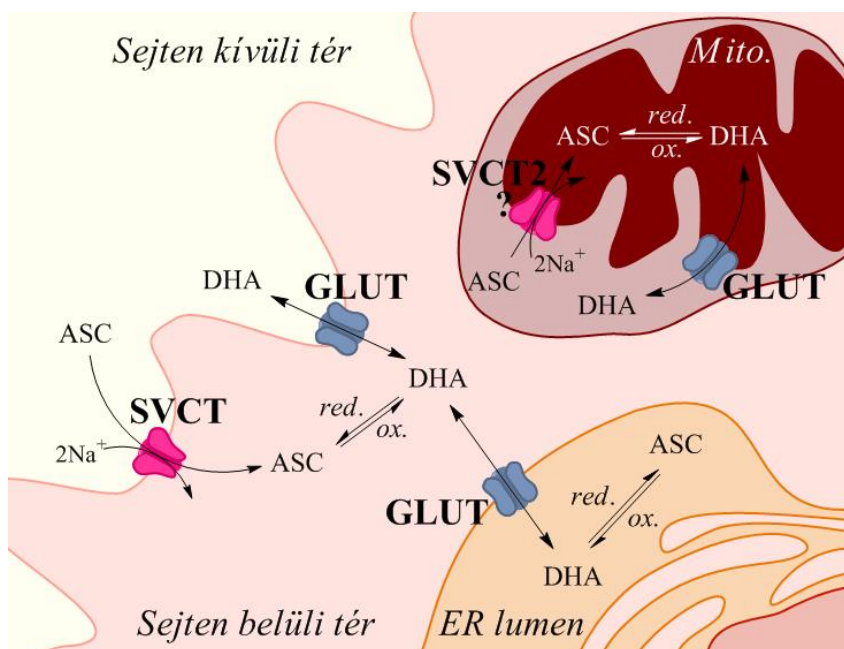
1.2.2.1. A C-vitamin felszívódása, plazmamembránon keresztüli transzportja

Ahogy azt már a bevezetőben megjegyeztük, 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. Luminális oldali (kefeszegélyű) membrán vezikulum transzportaktivitása alapján megállapíthatjuk, hogy az aszkorbát és a DHA egyaránt felszívódik az emberi bélrendszer teljes hosszában (Malo és Wilson 2000). Mind az aszkorbát, mind a DHA felvétel, növekvő szubsztrát koncentráció hatására telíthetőnek bizonyult, amely megfigyelés nagy affinitású ligand-transzporter kölcsönhatásra utal.

A redukált forma, az L-aszkorbinsav, felvétele aktív mechanizmus során valósul meg, két nátrium-függő C-vitamin transzporter (SVCT1 és SVCT2) segítségével (5. ábra), amelyek klónozása először 1999-ben valósult meg (Tsukaguchi és mtsai 1999, Savini és mtsai 2008). Az SVCT1 egy nagy kapacitású, de kis affinitású (K_m : 65-237 μ M) aszkorbát transzporter. Előfordulása igen kifejezett az epitheliális szövetekben, ahol funkcióját, a szervezet C-vitamin homeosztázisának fenntartását, a táplálékkal bevitt aszkorbát felszívása, illetve a vesékben a visszaszívás révén fejt ki. Az SVCT1 transzporter gén kiütése 7-10-szeresére emelte a C-vitamin vizeletbe történő ürítésének mértékét (Corpe és mtsai 2007). Ezzel párhuzamosan a C-vitamin vérszintje 50-70%-kal csökkent homozigóta mutánsok esetén a vad típusú társakhoz képest.

Az SVCT2 egy kis kapacitású, nagy affinitású (K_m : 8-62 μ M) transzporter. Az intracelluláris redox státusz fenntartása érdekében széles körben fejeződik ki, az aktív anyagcserét folytató és specializált sejtekben, szövetekben (Savini és mtsai 2008). Az SVCT2 génkiütött mutánsokkal végzett kísérletek alapján az SVCT2 elengedhetetlen a prenatális aszkorbinsav transzportfolyamatokhoz. Fontos szerepet tölt be a C-vitamin placentán keresztül történő transzportjában. A homozigóta génkiütött mutánsokat légzési elégtelenség és intracerebrális haemorrhagia jellemezte (Sotiriou és mtsai 2002).

A human jejunum luminális oldali membránjának DHA felvételi karakterisztikája egyértelműen különbözött az aszkorbát felvételétől (Wilson 2005). A DHA felvétele kis affinitású ($K_m \approx 0,8$ mM) nátrium-független facilitált diffúzióval valósul meg (5. ábra). A glukóz gátolta az aszkorbát felvételét, de a DHA felvételt nem. Ugyanakkor a transzport gátlási profil kizárta az SGLT1 (nátrium-függő glukóz transzporter) szerepét az aszkorbát transzportban (Malo és Wilson 2000). A bélsatornából történő DHA felszívódásért felelős transzporter fehérjét a mai napig sem sikerült azonosítani.



5. ábra. A C-vitamin (aszorbát, DHA) plazmamembrán és intracelluláris transzport rendszerei, transzportja

A C-vitamin plazma koncentrációja orális bevitel esetén igen feszes szabályozás alatt áll. Ennek következtében növekvő orális dózisok mellett a C-vitamin plazma koncentrációja egy telítési értékhez tart (Padayatty és mtsai 2004). Ennek két fő

oka van: egyrészt, ahogyan arról már az előző bekezdésben szó volt, a transzporter fehérjék kapacitása korlátozott, másrészt pedig a két nátrium-függő transzporter aktivitását, a saját ligandja (az aszkorbát), finomra hangolja. A béllumen megemelkedett aszkorbát koncentrációja az SVCT1 mRNS szintjének leszabályozását eredményezte enterocitákban (MacDonald és mtsai 2002). Az aszkorbát hasonló szabályozó szerepéről számoltak be SVCT2 esetén vérlemezkékben is (Savini és mtsai 2007a). A közelmúltban derült ki, hogy a vázizom sejtek az SVCT2 transzporter expresszióját redox-állapotuk függvényében szabályozzák. Az SVCT2 mRNS és fehérje szintje egyaránt megemelkedett myotubulusok hidrogén-peroxiddal történt kezelését követően, ugyanakkor liponsavas antioxidáns kezelés hatására expressziója csökkent (Savini és mtsai 2007b). Valószínűnek tűnik tehát, hogy a sejt redox állapota befolyásolja az SVCT2 expresszióját, így módon az aszkorbát transzport és intracelluláris koncentráció befolyásolásával reagálni képes a változó körülményekre.

A C-vitamin plazmakoncentrációját nemcsak a felszívódás, de a vesében, az SVCT1 által történő visszaszívás is befolyásolja. Ennek megfelelően a biológiai hasznosíthatósága alacsonyabb dózisoknál majdnem teljes és a dózis növekedtével csökken: 30 mg esetén 87%, 100 mg esetén 80%, 200 mg esetén 72%, 500 mg esetén 63% és 1250 mg esetén kevesebb, mint 50% (Levine és mtsai 1996). Ezt a megfigyelést alátámasztotta a C-vitamin 3-kompartimentum farmakokinetikai modellje is. A modell alapján egyszeri 3 g-os orális dózis – a maximális tolerálható egyszeri dózis – 206 $\mu\text{mol/l}$ csúcs plazmakoncentrációt eredményez, ehhez képest az 1,25 g-os dózis ettől csekély mértékben különböző 187 $\mu\text{mol/l}$ -es plazmakoncentrációt eredményez. Végezetül 200 mg esetén – amely mennyiség egy C-vitaminban gazdag táplálék elfogyasztásából származik – a koncentrációcsúcs 90 $\mu\text{mol/l}$ körül várható (Padayatty és mtsai 2004).

A DHA és a glukóz között fennálló szerkezeti hasonlóság miatt, már korán felmerült a glukóz transzporterek lehetséges szerepe a DHA sejtbe történő felvételében. Valóban *Xenopus* oocita expressziós modellrendszerben igazolták, a GLUT1, GLUT3 és esetlegesen a GLUT4

részvételét a plazmamembránon keresztüli DHA felvételben (5. ábra) (Vera és mtsai 1993, Rumsey és mtsai 1997, 2000). A DHA felvételét a szerkezeti analóg 2-deoxi-glukózzal, illetve a facilitált hexóz transzport gátló cytochalasin B gátolta (Rumsey és mtsai 1997, Vera és mtsai 1994). A látszólagos K_m értékek (GLUT1: 1.1 mM, GLUT3: 1.7 mM, GLUT4: 0.98 mM) az SVCT transzporterekénél kisebb affinitású transzportfolyamatokról tanúskodnak (Rumsey és mtsai 1997, 2000). A gyors intracelluláris DHA redukció egyfelől tekintélyes DHA gradiens fenntartását eredményezi, másfelől egy olyan vegyületet, amely nem szubsztátja a GLUT transzportereknek (Rumsey és mtsai 1997). A DHA formában, GLUT transzportereken keresztül, sejtekbe jutó C-vitamin mennyiségét mindazonáltal rendkívül nehéz megítélni, nehéz, mert normális fiziológiás körülmények között a glukóz jelentős kompetáló partnerként szerepel, ez a kompetíció a magasabb vércukorszinttel járó diabetesben természetesen még fokozottabb mértékben jelentkezhet. Érdemes megemlíteni, hogy a vitamin a plazmában elsősorban redukált formában található (Tsukaguchi és mtsai 1999), ami szintén az SVCT transzporterek hangsúlyosabb transzport szerepét húzza alá. Ugyanakkor fontos megjegyeznünk, hogy a humán diéta a redukált aszkorbát mellett, jelentős mennyiségben DHA-t is tartalmaz, illetve jelentős mennyiségben keletkezik a gasztrointesztinális traktus lumenében az aszkorbát oxidánsokkal történő reakciójában (Wilson 2002). Ezen kívül a DHA extracelluláris koncentrációja jelentős mértékű növekedést mutat olyan patológiás állapotokban, mint például a gyulladás (Wilson 2002). Igen valószínű, hogy ilyen és hasonló állapotokban a lokális prooxidáns produkció fokozza az aszkorbát, DHA átalakulást, mely révén előtérbe kerül a glukóz transzportereken keresztül történő C-vitamin transzport is.

A transzporterek telíthetősége, illetve a redox státusz redukált irányba történő eltolódása (amely szükségszerűen bekövetkezik magas C-vitamin dózisok esetén) következtében fellépő SVCT transzportfehérje szupresszió miatt az orális adagolás révén elérhető plazmakoncentráció erősen korlátos. Gyakorlatilag 200-400 mg/nap orális dózis esetén elérjük a telítési (80 μ M körüli) plazmakoncentrációt (Levine és mtsai 1996). Ennél magasabb plazmakoncentrációt intravénás aszkorbát adagolással lehetséges elérni, ahol az intesztinális korlátok megszűnnek, kizárólag a vesén keresztüli ürüléssel kell komolyan számolnunk. Ezt a módszert alkalmazzák terápiás aszkorbát plazmakoncentráció elérésére (Padayatty és mtsai 2004, 2006).

1.2.2.2. Szubcelluláris aszkorbát transzport

Aszkorbát felhasználó reakciót gyakorlatilag minden egyes sejtorganellumban találni. Az antioxidáns funkciója feltételezhetően mindenhol megjelenik, különös hangsúllyal az olyan oxidatív organellekben, mint a mitokondrium, a peroxiszóma és az endoplazmás retikulum (ER). Aszkorbát-függő enzimek jelenlétéről számoltak be különböző kompartmentumokban, úgy, mint a HIF prolin hidroxilázról a citoszolban, a kollagén prolin/lizil hidroxilázról az ER lumenben (Myllyharju és mtsai 2008, Szarka és Lőrincz 2014), a dopamin β -monooxigenázról és a peptidil glicin α -hidroxiláló monooxigenázról a kromaffin granulákban, szinaptikus és

szekréción vezikulákban (Crivellato és mtsai 2008) hiszton és DNS demetilázokról a sejtmagban.

Habár, ahogy korábban láttuk a különböző GLUT és SVCT transzporterek plazmamembránban való jelenléte és funkciója meglehetősen jól ismert, a transzporterek endomembránokban való eloszlásáról vajmi keveset tudunk. Tekintve, hogy a legtöbb ismeret az ER és a mitokondrium aszkorbát transzportjáról áll rendelkezésünkre, ezekkel fogunk részletesebben foglalkozni.

1.2.2.2.1. Az endoplazmás retikulum aszkorbát transzportja

Az aszkorbát bioszintézisére képes fajokban, a szintézis utolsó lépését az ER membránjában található, lumenális irányultságú aktív hellyel rendelkező L-gulonlakton oxidáz katalizálja (Bánhegyi és mtsai 2014). Így az aszkorbátot szintetizáló fajok esetében szükséges a transzporter megléte, mivel a lumenből ki kell jutnia az ott szintetizálódott aszkorbátnak, a C-vitamin-függő fajok esetében pedig a lumenben található C-vitamint felhasználó enzimek ellátása miatt nélkülözhetetlen az ER membránon keresztüli aszkorbát transzport. Tekintve, hogy a glulonlakton oxidáz döntő részben a májsejtekben fejeződik ki (Mandl és mtsai 2009, Bánhegyi és mtsai 1997) az előző eset igaz a C-vitamint szintetizáló fajok extrahepatikus sejtjei esetében is. Mindezen megfontolások ellenére a mai napig nem sikerült molekuláris szinten leírni egyetlen egy aszkorbát/DHA transzportert sem az ER-ben. Egy, a problémát funkcionális oldalról megközelítő tanulmány emlős ER eredetű vezikulák esetében a DHA preferált felvételét találta. A transzport karakterisztikája arra utalt, hogy a folyamatban GLUT típusú transzporterek vehetnek részt (Bánhegyi és mtsai 1998). Ezzel a feltételezéssel összhangban az ER membránon keresztül alig lehetett aszkorbát áramot megfigyelni (Bánhegyi és mtsai 1998), továbbá az oxidációja (DHA képződése) előfeltétele volt mikroszómális felvételének (Csala és mtsai 2000). Így az ER frakcióval asszociált aszkorbát oxidáz aktivitás a felvétel egyik mozgatója lehet (Szarka és mtsai 2002). A közelmúltban a GLUT10 merült fel, mint lehetséges DHA transzporter az ER-ben (Segade 2010), azonban a tény, amely szerint örökletes hiánya csupán néhány jól meghatározott sejt típusra korlátozódik, arra utal, hogy más ER membránban elhelyezkedő DHA transzporterek is létezhetnek. A teljes képhez hozzátartozik, hogy az SVCT2 részben együttes elhelyezkedést mutatott az ER markerfehérje protein diszulfid izomerázzal. Az együttes elhelyezkedést támogatta az SCVT2 calnexinnel történő együttes tisztítása is (Muñoz-Montesino és mtsai 2014).

1.2.2.2.2. Mitokondriális aszkorbát transzport

A C-vitamin mitokondriális jelenléte kifejezetten logikus, ha belegondolunk, hogy emlős sejtekben a mitokondriumot tartják az első számú ROS forrásnak. Az emelkedett ROS szint a mitokondriális membránpotenciál összeeséséhez, majd az a sejt halálához vezethet. A mitokondrium által elsődlegesen előállított ROS a szuperoxid anion, majd ezt a szuperoxid diszmutáz közreműködésével a stabilabb H₂O₂-vé alakítja (Kowaltowski és mtsai 2009). A

H₂O₂ semlegesítése enzimek, illetve olyan kis molsúlyú antioxidánsok segítségével történik, mint az aszkorbát. A sejtek előzetes DHA-tal történő kezelése képes a mitokondriális membránpotenciál részleges megtartására, illetve megakadályozza a citokróm c felszabadulását H₂O₂ kezelésnek kitett HL-60-as sejtek (Gruss-Fischer és mtsai 2002), FAS ligand kiváltott monociták apoptózisa (Perez-Cruz és mtsai 2003), vagy hipoxia-reperfúzió átesett sejtek esetében (Dhar-Mascreño és mtsai 2005). Ezen kívül az aszkorbát képes megvédeni a mtDNS-t a ROS kiváltotta 8-oxo-dGuanidin szintemelkedéstől és tompítja a mtDNS H₂O₂ kiváltotta szakadását (KC és mtsai 2005). Mindezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az aszkorbát fontos szerepet tölt be a mitokondriális membránpotenciál fenntartásában és ezen túl, ROS elimináló sajátságán keresztül antiapoptotikus és mtDNS védő hatással is rendelkezik.

Ha mindezen előnyös tulajdonságokat figyelembe vesszük, akkor meglepő, hogy a mitokondriális C-vitamin transzport területén az első komolyabb eredményt mindössze 10 éve érték el (KC és mtsai 2005). A növényi mitokondriális DHA transzport (amelynek részleteit az értekezés kísérletes részében ismertetjük) analógiáján elindulva Golde és munkatársai sztereo szelektív mitokondriális D-glükóz transzportot találtak (KC és mtsai 2005). A humán GLUT1-5 és 7-es izoformák N-terminális régiójának számítógépes analízisével összhangban a GLUT1 mitokondriális jelenlétét sikerült igazolniuk a GLUT1-EGFP mitokondriális expressziójával, immunoblot analízissel, illetve sejtes immunolokalizációs kísérletekkel (KC és mtsai 2005). Ugyanezen kísérletsorozat egy további részeként humán vesesejtekből (293T) izolált mitokondriumok esetében a glükózon kívül DHA felvételéről is be tudtak számolni (KC 2005). 5 évvel a GLUT1 mitokondriális jelenlétének leírását követően, a GLUT család egy másik tagjának a GLUT10-nek a mitokondriális elhelyezkedéséről számoltak be egér aorta simaizom és inzulin stimulálta zsírsejtek esetében (Lee és mtsai 2010). A GLUT10 fokozta a jelzett DHA mitokondriumba jutását, ami H₂O₂ kezelt simaizom sejtek esetében a ROS szintjének csökkenését vonta maga után. A védő hatást a simaizom sejtek glükózzal történt előkezelésével, vagy a GLUT10 mRNS kifejeződésének interferenciájával fel lehetett függeszteni (Lee és mtsai 2010). A közelmúltig úgy gondoltuk, hogy a DHA a C-vitamin transzportformája és a GLUT transzporterek felelősek a C-vitamin mitokondriális transzportjáért. A vitamin redukált formájának transzportja igen valószínűtlennek tűnt, mivel annak sem mitokondriális felvételét, sem akkumulációját nem sikerült humán vesesejtekből, illetve patkány májszövetből származó mitokondriumok esetében megfigyelni (Li és mtsai 2001; KC és mtsai 2005). A közelmúltban azonban a nátriumfüggő SVCT2 transzporter mitokondriális kifejeződéséről számoltak be mieloid leukémia sejtekben, ami felvetette az aszkorbát mitokondriális belső membránon keresztüli transzportjának lehetőségét (Azzolini és mtsai 2013, Guidarelli és mtsai 2014). 2014 tavaszán ez a lehetőség újabb kísérletes támogatást nyert. Az SVCT2 fehérje mitokondriumhoz történő asszociációját kolokalizációs, illetve HEK-293 sejtekből származó nagy tisztaságú mitokondriális frakción végzett immunoblot kísérletekkel sikerült megerősíteni (Muñoz-Montesino és mtsai 2014). A transzport fehérje általános mitokondriális lokalizációját 16 különböző humán sejtvonal (normális, neopláziás és primer sejtvonalak) segítségével sikerült bizonyítani. A mitokondriális SVCT2 transzporterek funkcionalitását az SVCT2 kifejeződésének csendesítésével sikerült igazolni. A csendesítés mind a fehérje mitokondriális jelenlétét, mind a mitokondriális aszkorbát transzportot jelentős mértékben csökkentette (Muñoz-Montesino és mtsai 2014). A HEK-293 sejtek esetében azonban nem sikerült a GLUT1

mitokondriális elhelyezkedését megerősíteni, ezért a GLUT1 mitokondriális C-vitamin transzportban játszott szerepe, legalábbis HEK-293 sejtek esetében megkérdőjeleződött. Ugyanezen kutatócsoport semmiféle GLUT10 kifejeződést sem talált a HEK-293 sejtekben (Muñoz-Montesino és mtsai 2014). Így egyfelől bővültek ismereteink a mitokondriális C-vitamin transzporttal kapcsolatban, de ezek az ismeretek valamelyest össze is kuszálódtak. A világosabb kép kialakításához feltétlenül újabb kísérletek szükségesek.

1.3. A glutation

A glutationt (GSH) egymástól függetlenül két tudós fedezte fel, több mint egy évszázaddal ezelőtt (Aoyama és mtsai 2013). 1888-ban J. de Rey-Pailhade egy anyagot azonosított élesztő sejtekben, amit „*philothione*”-nak nevezett el a „*philo*” szeret és a „*thione*” kén görög szavakból, utalva arra, hogy az anyag kénnel reagálva hidrogén-szulfidod képez (De Rey-Pailhade 1888, Meister 1988). Ezt követően igazolta, hogy a *philothion* igen széles körben megtalálható mind állati, mind növényi szövetekben és arra a megállapításra jutott, hogy az anyag ciszteint tartalmaz, ami oxigén jelenlétében reverzibilis módon diszulfid formába oxidálódik (de Rey-Pailhade, 1928). F.G. Hopkins az anyagot nagy mennyiségben vonta ki izomszövetből, megállapította, hogy autooxidációra képes, dipeptidként azonosította, amely glutamátot valamint ciszteint tartalmaz és „glutation”-nak nevezte el (Hopkins 1921), mint később kiderült a glutation valójában glutamátból, ciszteinből és glicinből álló tripeptid (Hopkins 1929, Kendall és mtsai 1930). Hopkins 1929-ben Nobel díjat kapott a glutationnal, illetve a vitaminokkal és más táplálkozási faktorokkal kapcsolatos kutatásaiért. A glutamát γ -karboxil csoportja és a cisztein amino csoportja között kialakuló kötés különleges, eltér a fehérjék peptid kötésétől. Azt feltételezzük, hogy ez kölcsönöz stabilitást a molekulának, mivel kizárólag specifikus aminosav transzferázok bontják. A glutation növényi sejtben betöltött funkcióinak jellemzését, a bevezetőben már említett kísérleteivel Szent-Györgyi Albert kezdte meg. Emlékeztetőül, Szent-Györgyi káposzta szöveteken végzett kísérletei során azt tapasztalta, hogy azok képesek az aszkorbinsavat oxidált formájából redukálni, miközben a glutation oxidálódik (Szent-Györgyi 1931). Valóban, az, az igen korai megfigyelés, ami szerint a terminális oxidázok jelenléte ellenére, az aszkorbát szinte mindig redukált állapotban található a növényekben, vezetett arra a következtetésre, hogy egy redukációs mechanizmusnak is jelen kell lennie. 1936-ban Hopkins és Morgan arra a megállapításra jutott, hogy a redukálószer nem más, mint a glutation (Hopkins és Morgan 1936). A GSH-t a gluténnal való reakciója miatt a sütőiparban a kenyér tésztájának lazítására használták (Aoyama és mtsai 2013). A reaktív oxigénvegyületek biológiai fontosságának felismerésével, a szuperoxid felfedezésével az 1960-as években ismételten megnőtt az érdeklődés a glutation iránt. Ezzel egy időben az aszkorbát és a glutation is fiziológiás kapcsolatba került. Így forrt össze az aszkorbát-glutation ciklus neve a kloroplaszt hidrogén-peroxid védelmével (Foyer és Halliwell 1976), míg a glutationé az általános stressz rezisztenciával (Esterbauer és Grill 1978, Tausz és mtsai 2004). Párhuzamosan a kloroplaszt tiolok enzimszabályozásban betöltött szerepére is fény derült (Wolosiuk és Buchanan, 1977). Ezt követően egyre nagyobb érdeklődés mutatkozott a glutation

bioszintézis, degradáció, transzport és kompartmentalizáció iránt (Rennenberg, 1982; Alscher, 1989).

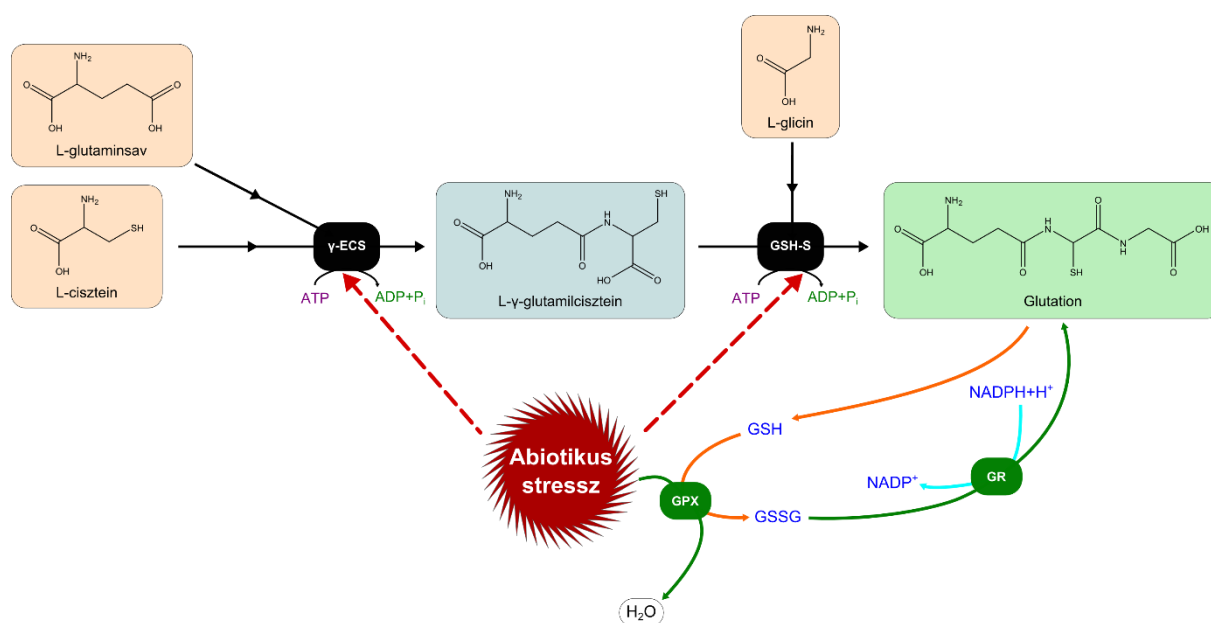
1.3.1. Glutation a növényi sejtekben

A GSH igen jellemző sajátossága, a többi sejtben található tiol vegyülethez képest mérhető magas koncentrációja. Általában elmondhatjuk, hogy millimolós koncentrációban fordul elő. A sejt glutathion másik jellegzetes sajátossága, nagyfokú redukáltsága. Stressz mentes állapotban a növényi szövetek tipikusan legalább 20:1 arányban tartalmazzák a GSH:GSSG-t (Mhamdi és mtsai 2010, Noctor és mtsai 2011). Többek között ez az oka annak, hogy a GSH kiválóan alkalmas lehet az intracelluláris ROS szignálok továbbítására. Ezen túl Foyer és Noctor azért is javasolja a GSH-t a redox szenzor szerepére inkább, mint az aszkorbát/DHA redox párost, mivel a GSH redox státuszát jóval intenzívebben befolyásolja a megemelkedő ROS produkció. Az sem elhanyagolható tényező, hogy a GSSG döntő része a citoszolban található, míg a DHA jelentős mennyisége az apoplaztban, így a növényi sejt egy időben tud alacsony GSH/GSSG és viszonylag magas aszkorbát/DHA arányt fenntartani (Foyer és Noctor 2011).

1.3.1.1. A glutathion bioszintézise növényi sejtekben

A GSH, az öt felépítő aminosavakból szintetizálódik két ATP-függő lépés során. A γ -glutamilcisztein ligáz (γ -ECS, GSH1) katalizálja a glutamát γ -karboxil csoportja és a cisztein amino csoportja között a peptid kötés létrejöttét, γ -glutamilciszteint eredményezve. A második reakcióban, a glutathion szintetáz (GSH-S, GSH2) összekapcsolja a glicint a γ -glutamilciszteinnel, így képezve glutathiont (6. ábra). Mindegyik bioszintetikus enzimet egyetlen gén kódolja. *Arabidopsis* esetében bármely kiütése letális fenotípust eredményez (Noctor és mtsai 2011). A γ -ECS aktivitása igen szoros asszociációt mutat a kloroplaszttal (Noctor és mtsai 2002). Lokalizációs tanulmányok megerősítették, hogy *Arabidopsis*-ban kizárólag a plasztiszokban fordul elő az enzim (Wachter és mtsai 2005). Az *Arabidopsis* GSH-S mind a kloroplasztban, mind a citoszolban megtalálható. Az GSH bioszintézis első lépése a kloroplasztban, a második döntő részben pedig a citoszolban játszódik le (Hossain és Asada 1984). A közelmúltban került leírásra a kloroplaszt belső membránban az a transzporter, amelyik minden valószínűség szerint a γ -glutamilcisztein kloroplaszt membránon keresztüli exportja révén összeköti a plasztisz γ -ECS-ét a citoszol GSH-S-val (Maughan és mtsai 2010). Ezt figyelembe véve különösen érdekes, hogy a mitokondriális GSH tartalom rendre a legmagasabb, míg a kloroplaszté a legalacsonyabb (Zechmann és mtsai 2010). Korábbi tanulmányok szintén ezt a megállapítást erősítették meg, azon túl, hogy a mitokondriális glutathion szint magas és megtartott volt átmeneti és tartós glutathion deficiencia esetén is

(Zechmann és mtsai 2006, Zechmann és mtsai 2008). A peroxiszómális glutation koncentráció a citoszoléhoz hasonló (Maughan és mtsai 2010), amit levél mezofil sejtekben 3-4 mM körülire tesznek (Queval és mtsai 2011). A mitokondriumhoz hasonlóan, ez is a peroxiszómális membránon keresztüli transzport során kerül be a citoszolból. A transzporterek egyik esetben sem kerültek még azonosításra. Megnövekedett GSH igény esetén a bioszintézis első lépése jelenti az elsődleges szabályozási pontot. A közelmúltban *Brassica juncea*-ból származó γ -ECS szerkezetének felderítése során két olyan intramolekuláris diszulfidkötést (CC1, CC2) is találtak, amelyek mindegyike jelentős mértékben befolyásolta az enzim aktivitását *in vitro*. A CC2 ciszteinek részt vesznek egy monomer-dimer átmenetben. A dohány γ -ECS oxidatív körülmények között homodimert képez és több mint háromszorosára nő aktivitása (Gromes és mtsai 2008). Valószínűleg ez egy fontos faktor az oxidatív stressz hatására bekövetkező glutation bioszintézis növekedésben. Fontos megjegyeznünk, hogy a növényi γ -ECS-t (az állatihoz hasonlóan) negatív feedback mechanizmussal gátolja a GSH (Noctor és mtsai 2011).



6. ábra A glutation bioszintézise

1.3.1.1. A GSH funkciói növényekben

1.3.1.1.1. Fitokelatin bioszintézis

Nehézfémek olyan szerves ligandok szintézisét váltják ki, amelyek képesek csökkent biológiai aktivitású fém komplexeket képezni. Ezen vegyületek közül a fitokelatinok (PC) szulfhidril

oldalláncaik révén képesek a kadmiumhoz és más toxikus elemekhez kötődni, majd a vakuólába transzportálódnak (Cobbett és Goldsbrough 2002). A fitokelatinok GSH-ból és más homológ biotiolokból képződnek a fitokelatin szintáz (PCS) közreműködésével (Grill és mtsai 2012, Clemens és mtsai 1999, Vatamaniuk és mtsai 1999, Ha és mtsai 1999). Amikor a növényeket nehézfém szennyezés éri, a PCS az egyik GSH γ -glutamilcisztein részletét kondenzálja egy másik GSH molekula glutaminsav részletével miközben felszabadul egy glicin és meghosszabbodik a PC molekula (Vatamaniuk és mtsai 2004, Clemens 2006). Arabidopsis növények kadmium-, vagy rézkezelés hatására fokozzák a GSH bioszintézisben (γ -ECS, GSH-S) és redukcióban (GR) szerepet játszó gének kifejeződését. Ez a válasz specifikusnak bizonyult azon fémek esetében, amelyek toxicitását ismerten a fitokelatinok tompítják, viszont más toxikus és nem toxikus fémek nem befolyásolták a fenti enzimek mRNS szintjét (Queval és mtsai 2009). A megemelkedő GSH szint ellenére sem a hidrogén-peroxid kiváltotta oxidatív stressz, sem oxidált, vagy redukált GSH hozzáadása nem tudta kiváltani ezen gének transzkripció aktiválását. A jázmonsav kezelés ugyanezen gének aktivitását növeli meg, ami arra utal, hogy részt vehet a kadmium és réz kiváltotta jelátviteli folyamatokban. A jázmonsav kezelés ugyan megnövelte a mRNS szintet és a GSH bioszintézis kapacitását, de nem változtatta meg a GSH szintjét nem stresszelt növényekben.

A γ -ECS és a GSH-S szintén reagál a fényviszonyok megváltozására, illetve néhány stressz állapotra, mint például a szárazság és bizonyos patogének (Queval és mtsai 2009). Azzal az összefüggéssel összhangban, amely szerint az emelkedett cisztein ellátás előmozdítja a GSH szint emelkedését, a GSH bioszintézis emelkedése maga után vonja a cisztein szintézis fokozását is. Így például az oxidatív stressz kiváltotta GSH akkumuláció az adenosin 5'-foszfát reduktáz és a szerin acetiltranszferáz növekedését vonja maga után (Foyer és mtsai 1995, Noctor és mtsai 2011).

1.3.1.1.2. A GSH, mint antioxidáns

A GSH H_2O_2 -vel történő kémiai reakciója meglehetően lassú folyamat, azonban három különböző típusú peroxidáz is alkalmasnak ígérkezik arra, hogy a peroxid redukcióját a GSH oxidációjához kösse. Ezek, az aszkorbát peroxidáz (APX), a peroxiredoxin bizonyos típusai (PRX) és a glutation S-transzferázok (GST). Mindközül, kizárólag a GST tűnik direkt glutation peroxidáznak (GPX): az összes többi legalább még egy fehérje közreműködését igényli, hogy a peroxid redukcióját a GSH oxidációjához kösse. Génexpressziós vizsgálatok egyértelművé tették, hogy bizonyos APX, GPX és GST gének az oxidatív stressz hatására indukálódnak (Wagner és mtsai 2002, Willekens és mtsai 1997, Levine és mtsai 1994, Sappl és mtsai 2009). A GSH oxidációja során keletkező GSSG-t a GR redukálja. A GR és a GSH különböző stresszhelyzetekkel régóta fennálló kapcsolata ellenére (Esterbauer és Grill 1978, Tausz és mtsai 2004) a GR önmagában történő túltermeltetése nem vezetett jelentős mértékű stressz rezisztencia kialakulásához (Foyer és mtsai 1995, 1991, Aono és mtsai 1993, Broadbent és mtsai 1995, Kornyejev és mtsai 2005, Ding és mtsai 2009). A teljesség kedvéért azért meg kell

említenünk, hogy a GR túltermeltetése az aszkorbát-glutation ciklusnak megfelelően elősegítette az aszkorbát redox státuszának redukált irányba történő eltolását (Le Martret és mtsai 2011).

1.3.1.1.3. A glutation szerepe a kén asszimilációban

A GSH a szerves kén egyik fontos formája, ezért tekinthetünk úgy rá, mint a növényi kén státusz egy belső barométerére (Kopriva és Rennenberg 2004). A GSH számos kén asszimilációban szerepet játszó lépést befolyásol. Ezek közé tartozik a szulfát felvétel és asszimiláció, mivel olyan transzportereket és enzimeket gátol, mint az ATP szulfuriláz 1 (APS1) és az 5'-foszfoszulfát reduktáz (APR) (Herschbach és Rennenberg 1994, Lappartient és mtsai 1999, Vauclare és Rennenberg 2002, Buchner és Rennenberg 2004). A GSH kén asszimilációban betöltött szerepe komplex, mivel mindezen reprezentatív hatása mellett az APR-nek is szüksége van GSH-ra, mint redukálószerre, hogy szulfidot készítsen (Leustek 2002). Ebben a folyamatban fontos szerepet kap az APR egyik doménje, amelyik lehetőséget teremt arra, hogy GRX-ként viselkedjen és 1 mM körüli K_m értékkel GSH-t használjon fel (Bick és mtsai 1998). Ezen kívül a tiol-diszulfid státusz is regulációs szerepet tölt be bizonyos APR izoformák esetében (Leustek 2002).

1.3.1.1.4. Glutation S-transzferáz aktivitás

A GST-k által katalizált klasszikus reakció a GSH kén atomja és egy elektrofil anyag között kialakuló kovalens kötés létrejötte. Növényekben a legtöbb GST aktivitása egy, az aktív centrumban található szerin oldalláncától függ, amely a GS-tiolát anion stabilizálásáért felel (Dixon és Edwards 2010). Néhány GST-ben, mint például a dehidroaszkorbát reduktázban (DHAR) ez az oldallánc ciszteinre cserélődött ki. Ez a csere ruházta fel a GSH-val történő reverzibilis diszulfid kötés kialakulásának lehetőségével, amely része a DHAR katalitikus mechanizmusának (Dixon és mtsai 2002). Tehát néhány GST a konjugációs reakció helyett antioxidáns funkcióval rendelkezik. A DHAR típusú GST csak egy példa, mellette számos GST szubtípus peroxidáz aktivitással is bír (Wagner és mtsai 2002, Dixon 2009 és mtsai).

1.3.1.1.5. Glioxaláz és formaldehid metabolizmus

Az oxo-aldehidek, mint a glioxál rendkívül reaktív anyagok, amelyek az érzékeny sejtalkotókkal reagálhatnak. A leggyakoribb toxikus oxo-aldehid a metilglioxál, amely trióz-

foszfátokból keletkezhet, a trióz-foszfát izomeráz reakció köztitermékeként (Maiti és mtsai 1997, Marasinghe és mtsai 2005). A glioxaláz rendszer ezeket az anyagokat, nem toxikus hidroxisavakká, például laktáttá alakítja. A rendszer két egymást követő lépést katalizáló enzimből áll. A glioxaláz I izomerizálja a spontán keletkező GS-adduktot, míg a glioxaláz II végzi a hidrolízist, amelynek eredményeként felszabadul a hidroxisav és a szabad GSH. Azon kívül, hogy a GSH szubsztrátként szolgál a GST-ék és glioxalázok számára részt vesz a formaldehid dehidrogenáz működésében is.

1.3.1.1.6. *A GSH szerepe a növényi fejlődésben, növekedésben*

A GSH deficiens Arabidopsis mutánsok megfigyelése jól mutatja, hogy a GSH nélkülözhetetlen a megfelelő növényi növekedéshez, kritikus szerepet tölt be az embrió és merisztéma fejlődésben (Vernoux és mtsai 2000, Cairns 2006, Reichheld és mtsai 2007, Frottin és mtsai 2009, Bashandy és mtsai 2010). Az *rml1* mutáns, amely GSH tartalma mindössze 5%-a a vad típusénak igen kifejezett növekedési fenotípust mutat, nem funkcionáló gyökér merisztémával, ugyanakkor a hajtás merisztéma viszonylagosan érintetlen maradt (Vernoux és mtsai 2000). Itt kell megemlítenünk, hogy a GSH szintén fontos szerepet tölt be a pollenkeletkezésben és a pollencső növekedésében (Zechmann és mtsai 2011).

A magas GSH szint általában aktív sejtosztódással jár együtt. Például aktívan osztódó gyökér merisztéma sejtek magas redukált GSH szinttel jellemezhetők, míg a quiescens centrum alacsony és oxidált állapotú GSH-val. A GSH szintet BSO-val lecsökkentve a sejtciklus megreked a G1 fázisban (Rouhier és mtsai 2015).

1.3.1.2. *A GSH szint befolyásolása növényekben*

Optimális körülmények között az *E. coli* GSH-S túltermeltetése nem okozott lényegi emelkedést a nyárfá GSH szintjében (Strohm és mtsai 1995, Noctor és mtsai 1996), ugyanakkor az *E. coli* γ -ECS bevitele 2-4-szeresére növelte a levél GSH tartalmát, attól függetlenül, hogy azt a citoszolba, vagy a kloroplasztba irányították (Noctor és mtsai 1996, Arisi és mtsai 1997). Ugyanezt az enzimet dohány kloroplasztokban kifejezve szintén jelentős mértékű GSH szintnövekedést lehetett megfigyelni a növények levelében (Creissen és mtsai 2000). A transzgénikus dohány növények érdekes módon, klorozist és nekrozist mutattak erős fényintenzitás esetén. A jelenség hátterében a megnövekedett oxidatív stressz állt, mind a GSH, mind a γ -EC redox státusza eltolódott az oxidatív irányba a transzgénikus növényekben. Ez pedig megnövekedett H_2O_2 szinttel járt együtt (Creissen és mtsai 2000). Feltételezhetően az eltolódott redox státusz megzavarta a redox érzékelő folyamatokat a kloroplasztban. Érdekes módon ezt a fenotípust fiatal, ugyanezen bakteriális γ -ECS-t túltermelő nyárfák esetében nem

lehetett megfigyelni (Noctor és Foyer 1998), annak ellenére, hogy a GSH szint növekedése hasonló tartományba esett. A jelenség minden bizonnyal a két növény eltérő növekedési habitusával magyarázható (Creissen és mtsai 2000). A közelmúltban Liedschulte és munkatársai egy olyan *Streptococcus thermophilus* eredetű, bifunkcionális γ -glutamilcisztein ligáz-glutation szintáz (StGCL-GS) enzim kifejezését írták le dohányban, amelyik sem redox regulációt, sem GSH feedback gátlást nem mutatott (Liedschulte és mtsai 2010). A StGCL-GS-t, egy konstitutív promoter kontrollja alatt kifejező, dohány növények levelében extrém mértékű GSH akkumulációt lehetett megfigyelni (akár 12 μ mol GSH/g nedves tömeg értéket is elérhettek, fejlődési fázistól függően), ami több mint 20-30-szorosa a vad típusban megfigyelhetőnek és ez további szulfátadagolással még fokozhatónak bizonyult. Érdekes módon ez a drámai GSH szintnövekedés semmiféle hatást sem gyakorolt a növény növekedésére, miközben megnövelte a növény abiotikus stresszel szembeni toleranciáját. A mai napig semmiféle hátrányos hatásról nem számoltak be (Noctor és mtsai 2011). Egy fontos különbséget meg kell említenünk Creissen és munkatársai (2000), illetve Liedschulte és munkatársai (2010) tanulmánya között, az *E. coli* γ -ECS-zal szemben a *streptococcus* fehérje mind γ -ECS, mind GSH-S aktivitással rendelkezik. Számos tanulmány számolt be a γ -ECS túltermelése révén elért magasabb GSH szintből fakadó előnyökről. Ezek közé tartozik a megnövekedett nehézfémekkel és herbicidekkel szemben mutatott rezisztencia (Zhu és mtsai 1999, Gullner és mtsai 2001, Ivanova és mtsai 2011).

1.3.2. Glutation az emlős sejtekben

1.3.2.1. A glutation bioszintézise emlős sejtekben

Noha a GSH magas koncentrációban található meg a különböző élelmiszerekben a bélrendszerben lebomlik és csak igen kis hatásfokkal szívódik fel (Stahl és mtsai 2002, Chatterjee 2013).

A GSH intracellulárisan az öt alkotó három aminosavból (glutamát, cisztein, glicin) két egymást követő lépésben keletkezik, amelyet a γ -glutamilcisztein ligáz (γ -ECS, GCL, vagy γ -glutamilcisztein szintetáz) és a GSH szintetáz (GS) katalizál. A GCL katalizálja az első, ATP-t igénylő, egyben sebesség meghatározó reakciót. A reakció eredményeként a glutamát és a cisztein kapcsolódásával létrejön a dipeptid γ -glutamilcisztein (γ GluCys). Az emlős GCL egy heterodimer enzim, amely a hozzávetőlegesen 73 kDa-os katalitikus (nehéz) alegységből (GCLC) és a hozzávetőlegesen 28 kDa-os modulációs (könnyű) alegységből (GCLM) áll. A GCLC (ellentétben a GCLM-mel) rendelkezik az összes enzimaktivitással és a GSH negatív visszacsatolással regulálja (Richman és Meister 1975). A GCLM nem rendelkezik enzimaktivitással, viszont a GCLC-hez történő asszociációja csökkenti annak glutamát irányába mutatott K_m értékét, valamint növeli a GSH feedback inhibíciós K_i értékét (Chen és

mtsai 2005). A GS katalizálja a második, szintén ATP igényes lépést, amely során a γ GluCys glicinnel kapcsolódva GSH-t képez. A GCL-hez képest jelentősen sekélyesebb ismerettel rendelkezünk a GS aktivitásának szabályozásával kapcsolatban. A GCL cisztein irányába mutatott K_m értéke ~ 0.15 mM, míg a glutamát irányába ~ 1.7 mM, a GS glicin irányába mutatott K_m értéke ~ 0.8 mM (Griffith 1999). A glutamát (1-10 mM) (Erecinska és Silver 1990) és a glicin (2-10 mM) (Roux és Supplisson 2000) intracelluláris koncentrációja jelentős mértékben meghaladja a K_m értéküket, viszont a cisztein koncentrációja a K_m értéke körül alakul (Griffith 1999).

Összességében a GSH bioszintézis mértékét a következő faktorok határozzák meg: 1. a GCL mennyisége, 2. a két alegység relatív aránya (Chen és mtsai 2005), 3. a szűk keresztmetszetet jelentő szubsztráthoz, az L-ciszteinhez való hozzáférés (Bannai 1986, Dall'Asta és mtsai 1983, Meister és Anderson 1983), illetve a GSH GCL-re gyakorolt feedback gátlásának mértéke (Richman és Meister 1975, Taylor és mtsai 1996).

Rekombináns GCL fehérjéket és szöveti lizátumokat alkalmazó komplementációs tanulmányok arról árulkodnak, hogy a GCLC alegység a legtöbb egér szövettípusban feleslegben található meg, tehát a GCLM alegység, amely limitáló faktorként meghatározza a GSH bioszintézis mértékét (legalábbis ezen szövetekben) (Chen és mtsai 2005).

A GSH bioszintézis kizárólagos módon a citoszolban zajlik, mindkét enzim (GCL, GS) itt lokalizálódik. A GSH azonban megtalálható az olyan különböző sejtstruktúrákban, mint az endoplazmás retikulum (ER), a sejtmag és a mitokondrium (Mari és mtsai 2009, 2010). Ezekben a sejtstruktúrákban a GSH a fő vízzoldható antioxidáns, amelyik a redox homeosztázis fenntartásáért felelős. Az ER kivételével az intracelluláris GSH döntő részben redukált formában fordul elő.

Tekintve, hogy a dolgozat többnyire a mitokondriális GSH metabolizmussal foglalkozik, ezt a részt az irodalmi áttekintésben is hangsúlyosabban tárgyaljuk. A teljes celluláris GSH készlet mintegy 10-15%-a a mitokondriumban, 80-85%-a a citoszolban található. Figyelembe véve, hogy a mitokondriális térfogat jóval kisebb, mint a citoplazmatikus, a mitokondriális GSH koncentráció, a maga 9-12 mM-os értékével közel eléri a citoszolét (Griffith és Meister, 1985). A GSH bioszintetikus enzimek hiányában a mitokondriális GSH a citoszolból származik. Így a mitokondriális GSH készlet fenntartása nagymértékben a mitokondriális GSH transzportrendszeren áll, vagy bukik. Fiziológias pH-n a GSH negatív töltésű, anionos formában van jelen. A GSH számára az igazi akadályt a mitokondriális belső membrán jelenti, mivel a külső membrán permeabilis a GSH anionok számára. Szubsztrátspecifitásuk alapján a következő potenciális mitokondriális GSH transzportereket sikerült azonosítani. A 2-oxoglutarát (OGC, SLC25A11) és a dikarboxilát karriert (DIC, SLC25A10; Chen és Lash 1998, Chen és mtsai 2000, Coll és mtsai 2003, Wilkins és mtsai 2012) elsősorban vese és májsejtekben, illetve a trikarboxilát karriert (TTC, SLC25A1) agy mitokondriumokban és astrocitákban (Wadey és mtsai 2009). Az OGC cseretranszportot valósít meg, a citoszolikus GSH ellenében 2-oxoglutarátot és más dikarboxilátokat szállít. Ugyanakkor a DIC dikarboxilátok és GSH elektroneutrális cseréjét mediálja szerves foszfáttal szemben (Mari

és mtsai 2009). A különböző rendszerek GSH transzporthoz történő hozzájárulása sejttípus függő (Ribas és mtsai 2014).

1.3.2.2. *A glutation funkciói az emlős sejtekben*

1.3.2.2.1. *A γ -glutamil ciklus*

A sejtek oxidatív anyagcseréjük során reaktív oxigénvegyületeket (ROS) termelnek. Emlős sejtekben a ROS-ek mintegy 90%-a a mitokondriumban termelődik. A kezdeti megfigyelések arra utaltak, hogy a teljes oxigénfogyasztás mintegy 2%-a ROS termelésre fordítódik (Chance és mtsai 1979), azonban a közelmúltban elvégzett vizsgálatok alapján a fiziológiás ROS termelés mértékét 0.2%-ra korrigálták (Staniek és Nohl 2000, St-Pierre és mtsai 2002). Elsősorban szuperoxid termeléssel számolhatunk a mitokondriális respirációs elektrontranszfer lánc működése során (Collins és mtsai 2012). A szuperoxid, a szuperoxid diszmutázok működése révén hidrogén-peroxiddá alakul. A sejtben két intracelluláris SOD fordul elő: a SOD2, egy mangán-függő enzim a mátrixban, illetve a SOD1, egy réztartalmú enzim elsősorban a citoszolban. Ezt követően a hidrogén-peroxidot a kataláz, vagy glutation peroxidázok (GPx) vízzé és molekuláris oxigénné alakítják. A kataláz kizárólag a hidrogén-peroxiddal reagál, más hidroperoxidokkal nem, a GPx viszont mind hidrogén-peroxiddal, mind más hidroperoxidokkal reakcióba lép. A kataláz meglehetősen magas K_m értéket mutat a hidrogén-peroxid irányába, míg a GPx K_m értéke alacsony (Girotti 1998). Ezért elsősorban a GPx és nem a kataláz birkózik meg fiziológiás körülmények között a hidrogén-peroxid terheléssel. Miközben a GPx eliminálja a hidrogén-, vagy szerves peroxidokat a GSH glutation diszulfiddá (GSSG) oxidálódik (Winterbourn és Metodiewa 1994, Hogg és mtsai 1996). A GSSG a GSH reduktáz (GR) működése révén tud regenerálódni (Dringen és Gutterer 2002). A regenerációhoz a redukált nikotinamid adenin dinukleotid foszfát (NADPH) biztosítja az elektronokat (4. ábra). A NADPH regenerációjáért pedig a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, a 6-foszfoglukonát dehidrogenáz, a NADP⁺-függő izocitrát dehidrogenáz, a malát enzim és a mitokondriális nikotinamid nukleotid transzhydrogenáz felelős (Dringen és mtsai 2005). Habár a GR aktivitását a NADPH ellátás limitálja, a GR kellően aktív szokott lenni, hogy igen gyorsan regenerálja a GSH-t (Dringen és mtsai 1999). A glutation-S-transzferáz (GST), az enzimek egy olyan családja, amely igen különböző elektrofil xenobiotikum detoxifikálására képes GSH-S-konjugáció révén. Most csak röviden érintjük a témát, a reakcióról bővebben az acetaminofen hatásával foglalkozó fejezetben foglalkozunk. Emlősökben hét különböző citoszolikus GST izoformát különböztetünk meg: α , μ , π , σ , θ , ω és ζ (Hayes és mtsai 2005). A GSH, a GSSG és a GSH-S-konjugátumok különféle MRP-k (multidrogo rezisztencia protein) segítségével az extracelluláris térbe kerülnek (Leier és mtsai 1996, Ballatori és mtsai 2009). A GSH és konjugátumainak γ -glutamil és CysGly egységekre történő hasítását követően (amelyet a γ GT végez) a γ -glutamil részlet a megfelelő aminosavra és 5-oxoprolinra bomlik a γ -glutamin

ciklotranszferáz által katalizált reakcióban. Az 5-oxoprolin, ami piroglutamát néven is ismert ezt követően az 5-oxoprolináz által katalizált ATP igényes reakcióban glutamáttá alakul. A GSH a megfelelő aminosavakká metabolizálódik, amelyek a későbbiek során újabb GSH molekula szintéziséhez használnának fel így zárva a γ -glutamil ciklust.

1.3.2.2.2. *GSH és oxidatív stressz*

A GSH az előző fejezetben érintett enzimes mód mellett nem-enzimes reakcióban is reagál az olyan ROS-kel, mint a szuperoxid, az NO, a hidroxil gyök, és a peroxinitrit (Aoyama és mtsai 2008). Ahogy korábban említettük a hidrogén-peroxid a szuperoxid SOD általi bontása során keletkezik. Bár maga a hidrogén-peroxid fiziológiás koncentrációban nem kimondottan toxikus, azonban a belőle képződő hidroxil gyök az egyik legerősebb oxidáló ágens, amely célpontjai a sejt cukor, aminosav, foszfolipid, DNS bázisai és szerves savai lehetnek (Halliwell és Gutteridge 1984). A rendkívül toxikus hidroxil gyökök forrása lehet a peroxinitrit bomlása, vagy a Fenton reakció, amely a hidrogén-peroxid fémionok (elsősorban vas ionok) hatására bekövetkező bomlása (Pacher és mtsai 2007, Szabó és mtsai 2007). Ez idáig semmilyen enzimes hidroxil gyök ellenes védelmi folyamatot sem írtak le. A nagy reaktivitásával együtt járó rövid féléletideje (10^{-9} s) azonban korlátok közé szorítja toxicitását (Sies 1993). A hidroxil gyök így csak igen rövid, a peroxinitrit diffúziós távolságától 10000-szer rövidebb utat tud megtenni, továbbá a Fenton reakció hozzávetőlegesen egymilliószor lassabb, mint a peroxinitrit képződése (Pacher és mtsai 2007, Beckman 1994).

1.3.2.2.3. *S-glutationiláció*

A humán fehérjék mintegy 3%-át adja a cisztein, egyúttal ezen aminosav oldalláncok jelentik a fehérjék legnukleofilebb részeit (Ghezzi 2013). Az oxidatív/nitrozatív károsodások a redox érzékeny fehérjék tiol csoportjain végbemenő reakciók által megváltoztathatják a sejtek redox állapotát. A ROS és RNS vegyületek olyan irreverzibilis fehérje módosulásokat okozhatnak, mint a karboniláció és a nitrálás, amelyek végső soron a fehérje (enzim, receptor, transzporter) funkciójának elvesztését okozhatják (Klatt és Lamas 2000). Ezen túl ezek az irreverzibilis módosulások a fehérjék helyes konformációjának elvesztéséhez, aggregációjához vezethetnek, így az ubikvitin-proteaszóma rendszer célpontjaivá válhatnak (Dalle-Donne és mtsai 2006). A GSH a legfontosabb tiol redox puffer, amely segít az intracelluláris redox homeosztázist fenntartani. Oxidatív stressz esetén a GSH reverzibilis módon a fehérje tiol csoportokkal kevert diszulfidokat képez (S-glutationiláció), annak érdekében, hogy megvédje az irreverzibilis fehérjeoxidációtól (Giustarini és mtsai 2004). A S-glutationiláció egy reverzibilis fehérjemódosulás, amely révén a fehérjék funkciója visszaállítható, ha az intracelluláris redox állapot, az inzultust követően normalizálódik. A diszulfidkötések, különböző normális

fehérjefoldingot elősegítő diszulfid reduktázok, mint például a tioredoxin vagy a glutaredoxin segítségével szintén visszaalakulnak tiol csoportokká (Arner és Holmgren 2000, Berndt és mtsai 2008). A fehérjék S-glutationilációja tehát egy rendkívül fontos sejtes adaptációs mechanizmus, annak érdekében, hogy kritikus fehérje funkciókat megvédjünk.

1.3.2.3. *A tiol redox státusz*

Az intracelluláris GSH/GSSG arány 10-300 közötti értéket vehet fel, állandósult állapotban az arány meghaladja a 100-t, oxidatív stressz esetén átmenetileg 10 körül, vagy akár alacsonyabb értékre is eshet (Gilbert 1984, 1995). A tiol redox státuszt leggyakrabban a GSH/GSSG aránnyal fejezzük ki, amely számos gén kifejeződését is befolyásolja (Arrigo 1999). Számos transzkripció faktor, mint például a c-Jun, NF- κ B és a Fos DNS-hez való kötődését befolyásolja a GSH/GSSG arány (Klatt és mtsai 1999, Pineda-Molina és mtsai 2001, Fratelli és mtsai 2005). A csökkent arány a DNS kötő domének cisztein oldalláncának S-glutationilációját váltja ki, ami csökkent mértékű DNS kötéshez vezet. A GSH bioszintézis gátlása a sejtciklust megállítja az S és a G2 fázisban (Poot és mtsai 1995), ugyanakkor proliferáló sejtek esetében S és G2 fázisban emelkedett nukleáris GSH szintet lehet megfigyelni (Markovic és mtsai 2007). Mindezek alapján igen valószínű, hogy a GSH-ra szükség van a megfelelő periodusban a sejt proliferációjához. A celluláris tiol redox státusz befolyásolja a programozott sejthalál folyamatát is (Voehringer 1999). A csökkent mértékű intracelluláris GSH/GSSG arány kiváltja az anti-apoptotikus fehérje a Bcl-2 csökkenését, a citokróm c mitokondriális felszabadulását és a p38 MAP kináz útvonal általi kaszpáz aktivációt, míg az emelkedett GSH/GSSG arány véd a programozott sejthalál ellen (Filomeni és mtsai 2003).

1.3.3. **Acetaminofen kiváltotta sejthalál és májkárosodás az élelmiszer toxikológiában**

Az acetaminofen (APAP) egy igen széles körben használt fájdalom- és lázcsillapító szer. Habár terápiás dózisban alkalmazva biztonságos, az APAP túladagolása májkárosodást okoz. Leggyakrabban ez áll az akut májelégtelenségek hátterében az Egyesült Államokban, illetve az Egyesült Királyságban (Larson és mtsai 2005).

Az új gyógyszerek és terápiás lehetőségek keresésének egyre népszerűbb módja, hogy különféle természetes növényi kivonatokat, élelmiszeralkotókat is bevonunk a jelöltek körébe (Váli és mtsai 2007). Attól függetlenül, hogy egy extraktumról, vagy annak csak egy alkotójáról van szó, annak farmakológiai hatásosságát vizsgálnunk kell. Potenciális májvédő hatású készítmények esetében az élelmiszer és az általános toxikológiában, az APAP kiváltotta májkárosodás napjaink leginkább elfogadott modellrendszere (Yuan és Kaplowitz 2013, Du és mtsai 2015). A modell előnye, hogy az APAP egy dóziszfüggő hepatotoxikus vegyület, a

kísérleteket relatíve egyszerű technikailag kivitelezni és nem utolsó sorban klinikailag is releváns modell. Az előnyök mellett szólnunk kell a modell hátrányáról is, bő 35 év kísérletes munkát követően az APAP kiváltotta sejthalál és májkárosodás még számos aspektusát mindig homály fedi. Az APAP májkárosító hatása igen komplex, ezért különösen az *in vivo* eredmények interpretációja meglehetősen nehéz.

1.3.3.1. Az APAP metabolikus aktivációja

Az APAP-ot terápiás dózisban alkalmazva a molekula több mint 90%-a a májban glükuronidálódik, illetve szulfatálódik, majd kiválasztódik. Egy kis részét azonban a citokróm P450 2E1 izoformája (kis mértékben az 1A2 és a 3A4) a reaktív N-acetil-p-benzokinoniminné (NAPQI) oxidálja. A NAPQI reagál a GSH-val, majd a GSH addukt szekretálódik. A GSH deplécióját követően azonban a NAPQI a sejten található fehérjékkel reagál és APAP adduktot képez velük (Corcoran és mtsai 1985, Jollow és mtsai 1973, Mitchell és mtsai 1973). Ez a fehérjekötődés tűnik a legkritikusabb momentumnak az APAP kiváltotta sejthalál folyamatában. A mitokondriális oxidatív stressz azonosításával (Jaeschke 1990), illetve azzal a ténnyel, hogy a mitokondriális fehérje addukt képződés korrelál a májkárosodás mértékével (Tirmenstein és Nelson, 1989, Qiu és mtsai 2001) sikerült felállítani a jelenleg általánosan elfogadott elképzelést. A reaktív metabolit képződés és a fehérjéhez való kötődése, különös tekintettel a mitokondriális fehérjékre a sejthalál egy rendkívül fontos kiváltó tényezője, sőt talán önmaga is elegendő hozzá. Azt azonban fontos megjegyeznünk, hogy ez a fehérjekötődés (addukt képződés) mitokondriális oxidatív stresszt és peroxinitrit képződést generál, ami ráerősít az eredeti stressz folyamatra és nekrotikus sejthalálhoz vezet. A mitokondriális oxidatív stressz patofiziológiás jelentőségét dokumentálták azok a megfigyelések, amelyek szerint antioxidánsokkal történt késleltetett kezelés csökkentette a reaktív oxigén és nitrogénvegyületek mennyiségét, de nem befolyásolta a fehérje addukt képződést (Bajt és mtsai 2003, James és mtsai 2003, Knight és Jaeschke 2002, Saito és mtsai 2010b).

Az *in vivo* tapasztalható szöveti GSSG szintemelkedés (mint specifikus H_2O_2 marker) hátterében a mitokondriumban tapasztalható szelektív GSSG akkumuláció áll (Jaeschke 1990, Knight és mtsai 2001). Ez arra utal, hogy az emelkedett mennyiségű H_2O_2 -t a mitokondriális elektrontranszfer lánc generálja, majd az a mátrixba kerül. Ezt a feltevést erősíti az APAP kezelés követően mérhető emelkedett MitoSoxRed fluoreszcencia hepatocita tenyészetek esetében (Yan és mtsai 2010).

A szuperoxid legvalószínűbb származási helye a mitokondriális komplex I (Murphy 2009). Tekintve, hogy a szuperoxid egy anion, amely nem képes elhagyni a mitokondriumot, a nitrogén monoxiddal (NO) történő reakciója is, amely peroxinitritet eredményez minden bizonnyal a mitokondriumban megy végbe (Cover és mtsai 2005). A reaktív oxigén és nitrogén vegyületek közvetlenül károsítják a mitokondriális DNS-t (mtDNS) (Cover és mtsai 2005), illetve kiváltják a c-jun-N-terminális kináz (JNK) korai aktiválódását (Hanawa és mtsai 2008).

Az aktiválódott (foszforilált) JNK (P-JNK) ezt követő mitokondriális transzlokációja (Hanawa és mtsai 2008) tovább fokozza a mitokondriális oxidatív stresszt (Saito és mtsai 2010a). Végül soron a mitokondriális oxidatív stressz és peroxinitrit képződés váltja ki a mitokondriális pórusképződést (MPT), amely a mitokondriális membránpotenciál és az ATP szintézis összeeséséhez, végül nekrotikus sejthalálhoz vezet (Kon és mtsai 2004, Masubuchi és mtsai 2005, Ramachandran és mtsai 2011).

A ROS és különösen a peroxinitrit patofiziológiás fontosságára közvetlen bizonyítékul szolgál ezen reaktív intermedierek felgyorsított celluláris és mitokondriális GSH reciklálása révén történő befogása (Knight és Jaeschke 2002, Saito és mtsai 2010c). Éppen ezért a következő méréseket, meghatározásokat érdemes minden egyes APAP toxicitást csökkentő májvédőszer esetén elvégezni: szöveti és GSH, GSSG szint, nitrotirozin fehérjeaddukt meghatározás (immunhisztokémia, vagy western blot), mtDNS vesztés, mitokondriális fehérje karboniláció, citokróm c felszabadulás, endonukleáz G és apoptózis indukáló faktor (AIF) (western blot), valamint a nukleáris DNS károsodás (TUNEL) vizsgálata.

1.3.3.2. Jelátviteli folyamatok APAP kiváltotta sejthalál esetén

Habár a dolgozat témájához csak lazábban kapcsolódik, de a mitokondriális GSH témakörét érinti, ezért néhány mondat erejéig szeretnénk kitérni az APAP kiváltotta sejthalál jelátviteli folyamataira. Ahogy az a korábbiakban említésre került, a korai mitokondriális oxidatív stressz a JNK aktiváció egyik kiváltó oka (Hanawa és mtsai 2008, Saito és mtsai 2010a). A JNK azonban nem redox-érzékeny kináz (Nakagawa és mtsai 2008). A JNK aktivitás szabályozásában három kritikus felsőbb szintű kináz az apoptózis szignál-regulációs kináz 1-et (ASK1) (Nakagawa és mtsai 2008), a kevert-eredetű kináz 3-at (MLK3) (Sharma és mtsai 2012) és a glikogén szintáz kináz-3 β -át (GSK-3 β) azonosították ez idáig. A közelmúltban került leírásra, hogy az MLK3 az APAP kiváltotta hepatotoxicitás korai fázisában vesz részt a JNK aktivációjában. Az MLK3 kiütött egerek a JNK aktiváció gátlása következtében védettnek bizonyultak az APAP hatásával szemben (Sharma és mtsai 2012). A JNK aktiváció késői szakasza pedig minden valószínűség szerint az ASK1 által mediált. Az ASK1 kiütött, APAP-pal kezelt egér korai JNK aktivációt mutat ugyan, de a JNK aktiváció késői fázisa gátolt, ami megvédte ezeket az átlakat az APAP kiváltotta hepatotoxicitástól (Nakagawa és mtsai 2008). A mitokondriumhoz történő áthelyeződését követően a JNK a Sab SH3 domén kötő fehérjéhez köt. A Sab fehérje a mitokondriális külső membrán egy állványfehérjéje, amely egy kináz interakciós motívumot is tartalmaz (Wiltshire és mtsai 2002). A Sab feltétlenül szükséges az APAP kiváltotta hepatotoxicitáshoz, a Sab csendesítése megvédte az egereket az APAP kiváltotta májkárosodástól még igen nagymértékű mitokondriális GSH depléción és fehérjekötődés esetén is (Win és mtsai 2011). A JNK tehát a mitokondriumhoz helyeződik át, köti és foszforilálja a Sab fehérjét, amely további mitokondriális ROS képződéséhez, megtartott JNK aktivitáshoz, illetve a sérült mitokondrium pórusképződéséhez (MPT) vezet. Úgy tűnik, hogy a JNK elsősorban akkor modulálja a mitokondriális ROS termelést és/vagy az MPT-t,

amennyiben a mitokondriumot előzetesen már stressz érte. Izolált máj mitokondriumok esetében a JNK csak akkor váltotta ki az MPT-t, amennyiben az már korábban NAPQI stressznek volt kitéve (GSH depléció, kovalens kötéssel). Kontroll mitokondriumok esetében mindez elmaradt (Hanawa és mtsai 2008). A normális mitokondrium jóval kisebb érzékenységet mutat a JNK hatásaira, ami egyértelműen arra utal, hogy egy elsődleges mitokondriális stresszorra van szükség. Habár a Sab fehérjét, mint kritikus kapcsolódási partnert azonosították a mitokondriumban, amely rendkívül fontos a károsodás mediálásában, a mechanizmus, amellyel a JNK-Sab az elektron transzfer lánc működését, a mitokondriális ROS képződését és az MPT-t modulálja még jelenleg is vizsgálat tárgyát képezi.

1.3.3.3. Az APAP kiváltotta toxicitás programozott nekrotikus modellje, nekroptózis

A közelmúltban készült klinikai tanulmányok szerint az APAP kiváltotta hepatotoxicitásban szenvedő betegekben a keringő hasított K18 fragmens szintje, amely egy apoptózis marker jóval alacsonyabb volt (15%), mint a teljes hosszúságú K18 (F1K18), amely pedig egy nekrozis marker (85%) (Antoine és mtsai 2012). Ez a megfigyelés alátámasztja azt a vélekedést, amely szerint a súlyos APAP hepatotoxicitás a betegekben elsősorban a máj nekrozisával jár együtt és csak kis mértékben fordul elő apoptotikus sejthalál. A megfigyelés, amely szerint az APAP kiváltotta hepatotoxicitás elsősorban nekrotikus és ezen kívül a JNK bevonásával szabályozott, azt valószínűsíti, hogy az APAP által kiváltott hepatotoxicitás a „programozott nekrozis” egy formája (Han és mtsai 2010). A nekrozist sokáig egy véletlenszerű, nem szabályozott sejthalálformának tartották, azonban a közelmúlt kísérletes eredményei egy új koncepció, a szabályozott nekrozis, vagy más néven a receptor-interaktáló protein kináz (RIPK)-függő nekrozis (vagy nekroptózis) létezésére hívták fel a figyelmet. A sejthalál ezen formájának legfontosabb sajátosságai a következők: 1. RIPK1 kináz aktiváció, amelyet a RIPK1 foszforilációjával követhetünk nyomon; 2. egy olyan sejthalál, amelyet számos RIPK1 inhibitor, mint például a necrostatin-1 segítségével tudunk elnyomni (Galluzzi és mtsai 2012). A nekroptózis a nekroszóma formájában megnyilvánuló RIPK1 és RIPK3 kináz aktivitásának eredménye, amely ubikvitináció és a RIPK1, valamint RIPK3 foszforilációja által szabályozott (Cho és mtsai 2009). A RIPK1-RIPK3 nekroszóma kialakulása, amelyet számos faktor, például a tumor nekrozis faktor vált ki a mitokondriális I-es komplex mediálta ROS túltermeléséhez és mitokondriális diszfunkcióhoz vezet (Vandenabeele és mtsai 2010). Ezen kívül a mitokondriális foszfataz PGAM5 és a mitokondriális hasadási faktor Drp1, amely mitokondriális hasadást és feltehetően a ROS termelődés fokozását váltja ki is jelentős mértékben részesei a RIPK-függő nekroz folyamatának (Wang és mtsai 2012b). A necrostatin-1 allosztérikus blokkolja a RIPK1 kináz aktivitást és gátolja a RIPK-függő nekrozist (Degterev és mtsai 2008, Vandenabeele és mtsai 2010). A necrostatin-1 blokkolja a RIPK1-RIPK3 komplex kialakulását, azt valószínűsítve, hogy a RIPK1 kináz aktivitása szükséges a nekroszóma kialakuláshoz (Degterev és mtsai 2008). A necrostatin-1 sejtvédő szerepét számos kísérletben megerősítették, így például isémiás agykárosodás (Degterev és mtsai 2005),

miokardiális isémia-reperfúzió (Oerlemans és mtsai 2012) és anaplasztikus tireoid és adrenokortikális tumorok sugárzás kiváltotta sejthalála esetében is (Nehs és mtsai 2011).

A nekroptózis két kulcsfehérjéjével és az APAP kezeléssel kapcsolatban egymásnak meglehetősen ellentmondó eredmények láttak napvilágot az elmúlt időszakban. A RIPK3 fehérje indukcióját antiszensz morfolinokkal gátolva vad típusú egerekben, illetve RIPK3 deficiens egereket alkalmazva, azt tapasztalták, hogy egyik esetben sem változott meg a fehérje adduktok képződése, azonban minden más egyéb paraméter, mint például nekrotikus sejthalál mértéke jelentős mértékben csökkent 6 órás APAP kezelést követően (Ramachandran és mtsai 2013). RIPK3 deficiens egerekből származó májsejtek esetében jóval kisebb mértékű májsejtkárosodást lehetett megfigyelni a vad típusúhoz képest 24 órás APAP kezelést követően. Érdekes módon a Drp1 hasadási faktor mitokondriális áthelyeződése is csökkent a csökkent mértékű RIPK3 kifejeződéssel párhuzamosan. Mindezen kedvező hatások azonban elvesztek *in vivo* esetben 24, *in vitro* esetben pedig 48 óra elteltével (Ramachandran és mtsai 2013). Ezek alapján az eredmények alapján valószínűnek tűnik, hogy a RIPK3 a mitokondriális diszfunkció és oxidatív stressz modulációja révén az APAP kiváltotta sejthalál egy korai mediátora. Egy közelmúltban készült tanulmány azonban merőben más eredményre jutott. A JNK és a nekroptózis útvonalak APAP hepatotoxicitásában betöltött szerepét tisztázandó RIPK1 antiszensz kiűtött egereket (belőlük származó sejteket), valamint a RIPK1 inhibitorát a necrostatin-1-et alkalmazták *in vivo* és *in vitro* vizsgálataik során. Érdekes módon az előbb ismertetett vizsgálattal ellentétben, a jelen vizsgálat során nem sikerült RIPK3 kifejeződést kimutatni sem kontroll, sem APAP indukálta körülmények között primer egér hepatocitákban. Ezen túl a RIPK3 hiánya egerekben semmiféle védettséget sem jelentett az APAP toxicitással szemben (Dara és mtsai 2015). A RIPK3 kizárólag nem parenchyma sejtekben fejeződött ki. A RIPK1 kiűtése azonban a vad típusú egerhez hasonló mértékben megvédte a RIPK3^{-/-} egeret is, ami a RIPK1 független szerepére utal. A tanulmány szerzői ettől is továbbmennek, egyenesen kétségbe vonják, hogy az APAP kiváltotta sejthalálban a nekroptózis szerepet játszik egyáltalán. Teszik ezt arra a megfigyelésükre alapozva, hogy az MLKL kiűtött egér esetében nem tapasztaltak semmiféle védőhatást az APAP kezeléssel szemben (Dara és mtsai 2015). A RIPK1 kiűtése csökkentette a JNK aktivációt és a mitokondriumba történő áthelyeződést, valamint megszüntette az ezt követő Drp1 transzlokációt is. Érdekes módon az APAP kiváltotta a RIPK1 mitokondriumba történő áthelyeződését, amely folyamatot nem befolyásolta a JNK dokkoló fehérjéjének a Sab fehérjének előzetes kiűtése (Dara és mtsai 2015). Ezen eredmények értelmében tehát a RIPK1 a JNK feletti szinten részt vesz az APAP kiváltotta sejthalál folyamatában. A korábbi megfigyelésekkel ellentétben a RIPK3 és az MLKL szerepe a folyamatban megkérdőjeleződött, illetve a RIPK1 látszólag független szerepet kap a folyamatban. 2015 év végén az ellentmondásos eredmények és az APAP kiváltotta sejthalál folyamatának tisztázása még ránk váró feladat.

1.3.4. A GSH depléción kiváltotta új sejthalál forma, a ferroptózis

A ferroptózis egy, a közelmúltban leírt sejthalálforma (Dixon és mtsai 2012), amely egyértelmű morfológiai, biokémiai és genetikai különbséget mutat az apoptózishoz, nekrozishoz és az autofágiához képest. Az új sejthalálforma egyértelmű vasfüggése miatt kapta a ferroptózis nevet, ugyanis vaskelátorokkal felfüggeszthetőnek bizonyult (Dixon és mtsai 2012). Első ízben a kis molekulájú erastin onkogén RAS-mutáns sejtekhez történő adagolásával váltották ki (ez a kísérlet áll leírásának háttérében is) (Dixon és mtsai 2012). Az erastin kezelés igen kifejezett GSH szint csökkenést idézett elő a sejtekben. Ez a jelentős mértékű GSH szint csökkenés egyértelműen szükséges volt a sejtek halálához, mivel a ferroptózist ki lehetett védeni, ha a sejtekhez GSH-t, vagy N-acetil ciszteint adagoltak (Yang és mtsai 2014). Az új sejthalálforma másik karakterisztikus jellemzője az igen magas lipid hidroperoxid szint (Yang és mtsai 2014). Az antioxidáns hálózat különböző tagjait, mint például a szuperoxid-diszmutázt (SOD), a tioredoxin reduktázt, vagy a katalázt gátolva nem sikerült a GSH szintet jelentős mértékben csökkenteni, vagy ferroptózist kiváltani, ami arra utal, hogy valamilyen egyedi biokémiai változásnak kell bekövetkeznie a GSH depléciót követően, amely szelektíven váltja ki a ferroptózist (Yang és mtsai 2014). Az egyértelműen kiderült, hogy a GSH szint csökkenése, amely a glutation peroxidáz 4 (GPX4) kofaktora a peroxidok szintjének emelkedését okozza. A lipid ROS keletkezése és a ferroptózis kiváltása megfigyelhető volt a GPX4 közvetlen gátlása, vagy kiütése esetén is (Yang és mtsai 2014). A jelenlegi megfigyelések alapján a ferroptózist kiváltó anyagokat két csoportba sorolhatjuk: az első csoportba a GSH depléciót okozó anyagok, a második csoportba pedig a GPX4 gátlása révén ferroptózis kiváltó anyagok tartoznak (Friedmann Angeli és mtsai 2014). A közelmúltban derült fény arra, hogy a transferrin (vashordozó fehérje) és a glutamin, valamint annak metabolizmusa fontos szerepet kap a ferroptózis folyamatában (Gao és mtsai 2015).

A tumor sejtek erastin kiváltotta sejthalálán kívül patkány agyszeletek glutamát kiváltotta sejthalálát is gátolni lehetett a ferroptózis gátlószer ferrostatin-1 molekulával (Dixon és mtsai 2012). Ez utóbbi megfigyelés nem igazán meglepő, mivel a nagy extracelluláris koncentrációjú glutamátoknak hosszú ideig kitett sejtekben toxikus mértékű oxidatív stressz alakul ki a cisztin/glutamát antiporter gátlása miatt (Murphy és mtsai 1989) a csökkenő cisztin felvétel miatt leeső intracelluláris GSH szint miatt, ahogy az megfigyelhető volt az erastinnel kezelt tumorsejtek esetében is (Dixon és mtsai 2012). A közelmúltban pedig újabb megfigyelés támasztotta alá, hogy nem kizárólag a tumor sejteket érinti az új sejthalál típus. A GPX4 képes volt a ferroptotikus gépezet visszatartására, ezáltal megakadályozta a vese tubulus sejtek idő előtti elhalását (Friedmann Angeli és mtsai 2014).

1.3.5. A fehérje tiolok oxidációja: oxidatív folding

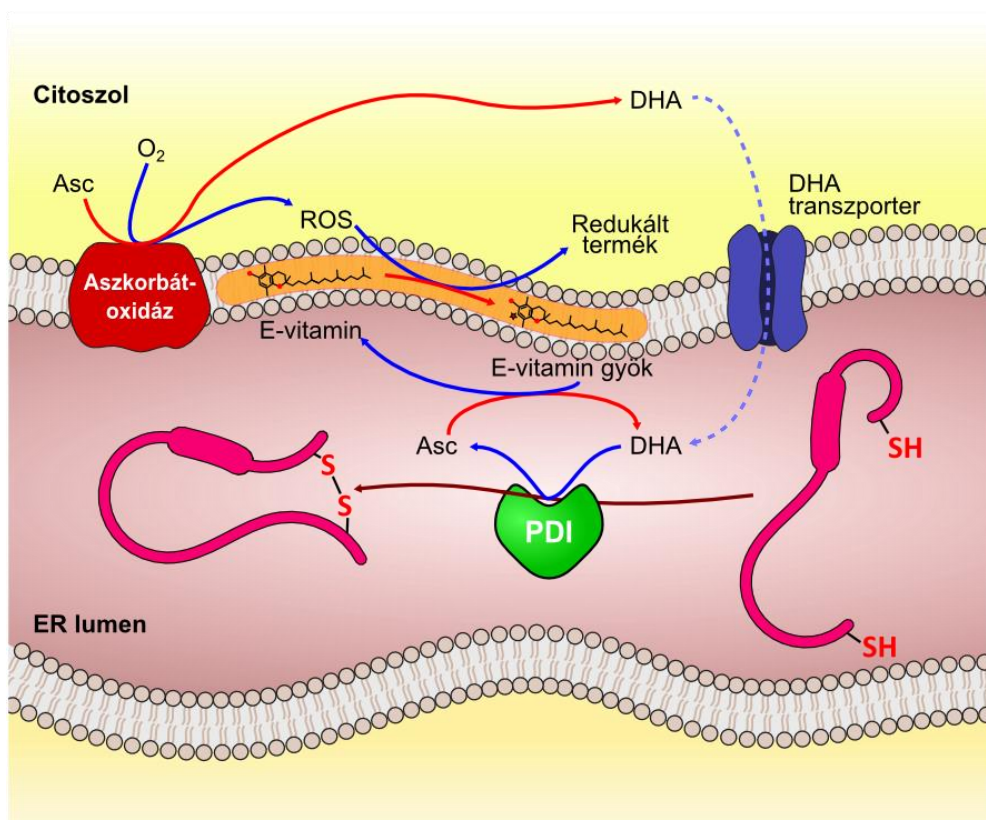
A cisztein oldalláncok tiol csoportjai között létrejövő kovalens kötés (diszulfid híd) a legerősebb kapcsolat, amely a fehérjék harmadlagos szerkezetét stabilizálja. Diszulfid hidak stabilizálják a szekréciós fehérjék szerkezetét, meghatározzák a búza glutén fehérjék szerkezetét és funkcionális tulajdonságaikat (Lásztity és Abonyi 2009). A ribonukleáz reverzibilis denaturálását követő újbóli foldingja során kiderült, hogy a patkány máj és a galamb hasnyálmirigy homogenátumok egy hőre érzékeny, labilis nagy molekulatömegű fehérje faktort és egy hőstabil nem fehérje faktort tartalmaznak, amelyek együtt jelentős mértékben meggyorsítják a redukált ribonukleáz újraaktiválását, azonban külön-külön semmire sem képesek (Goldberger és mtsai 1963, Venetainer és Straub 1963). A máj mikroszóma ribonukleáz refolding, újraaktiváló rendszerének fehérje részét a következő évben (részlegesen) tisztították (Goldberger és mtsai 1964) és 1975-től hivatalosan protein diszulfid izomeráznak (PDI) nevezték (Hawkins és Freedman 1975). A hőstabil oldható faktor *in vitro* refolding kísérletekben DHA-tal helyettesíthetőnek bizonyult (Venetainer és Straub 1964). A patkány PDI szekvenciáját meghatározták és kiderült, hogy két, a tioredoxinnal nagyfokú homológiát mutató régió is található benne (Edman és mtsai 1985). A PDI aktív centruma CXXC tioredoxin-szerű részletet tartalmaz, amely a ditiol és diszulfid állapotok között ingázik az enzim katalitikus ciklusa során. Tekintve, hogy a PDI a legkülönbébb ER-ben található szubsztrát fehérjéket oxidál tiol-diszulfid kicserélődés révén, a PDI CXXC részletét minden egyes katalitikus ciklus előtt vissza kell oxidálni.

1.3.5.1. A DHA, mint lehetséges elektron akceptor

A PDI, DHA reduktáz aktivitása révén képes közvetlenül reagálni a DHA-tal és a GSH-val, miközben a DHA aszkorbáttá redukálódását katalizálja 1 mM-os látszólagos K_m és 8 nmol min⁻¹-es V_{max} értékkel (Wells és mtsai 1990). Az aszkorbát, patkány, tengerimalac és humán mikroszómális vezikulákhoz történő adagolása kiváltotta a fehérjék tiol koncentrációjának csökkenését, amely minden bizonnyal oxidációjukból származott, mivel merkaptóetanollal redukálhatóak voltak (Csala és mtsai 1999). Mind az aszkorbát, mind a DHA ER membránon keresztüli transzportját leírták (Bánhegyi és mtsai 1998), igaz az előbbié szinte elhanyagolhatóan tűnik és oxidációja DHA-tá a felvétel előkövetelményének bizonyult (Csala és mtsai 2000). Ez a megfigyelés arra utal, hogy az aszkorbát oxidált formájában éri el az ER lumenét. Így a PDI képes a DHA-ot redukálni (Wells és mtsai 1990), miközben az aktív centrumában található CXXC részlet (vissza)oxidálódik (7. ábra). Mindezen megfigyelések egy ER-hoz köthető aszkorbát oxidáz létezését valószínűsítették. Ezt a nézetet támogatta az a megfigyelés is, amely szerint patkány mikroszómális vezikulákat citoszol-szerű aszkorbát koncentrációval együtt inkubálva megtartott MDHA és DHA szint érhető el (Szarka és mtsai 2002). Minden olyan anyag, amely gátolta az aszkorbát oxidációt (MDHA, DHA keletkezést)

gátolta a fehérje tiolok oxidációját is, egyértelműen demonstrálva az aszkorbát oxidáció és a diszulfidképződés közötti kapcsolatot (Szarka és mtsai 2002). A réz specifikus kelátor, a neokuproin (amely viszonylag specifikusan gátolta az enzim aszkorbát oxidációt) szinte teljes mértékben gátolta az aszkorbát-függő fehérje tiol oxidációt, még igen alacsony ($1\mu\text{M}$) koncentrációban is. A viszonylag rézspecifikus neokuproin (Al-Sa'doni és mtsai 1997) hatása azt is sugallja, hogy a folyamatért egy réztartalmú oxidáz lehet felelős, de természetesen egyértelműen más fémtartalmú enzimeket sem zárhatunk ki. Ezen ponton érdemes megemlíteni, hogy a növényekben található aszkorbát oxidázok szintén réztartalmú enzimek.

Mindezek alapján a következő modellt lehetett felállítani: Az aszkorbinsav egy mikroszómális metalloenzim mediálta oxidáció során – aszkorbil gyök intermediéren keresztül – dehidroaszkorbáttá oxidálódik a membrán külső (citoszol felé néző) felszínén. A dehidroaszkorbát transzporterének segítségével az endoplazmás retikulum lumenébe jut. A lumenben a dehidroaszkorbát oxidálja a célfehérjék tioljait a protein diszulfid izomeráz (illetve más tiol-diszulfid kicserélődésre alkalmas fehérjék) által katalizált reakcióban (7. ábra).



7. ábra A C-vitamin szerepe a diszulfid kötések kialakulásában

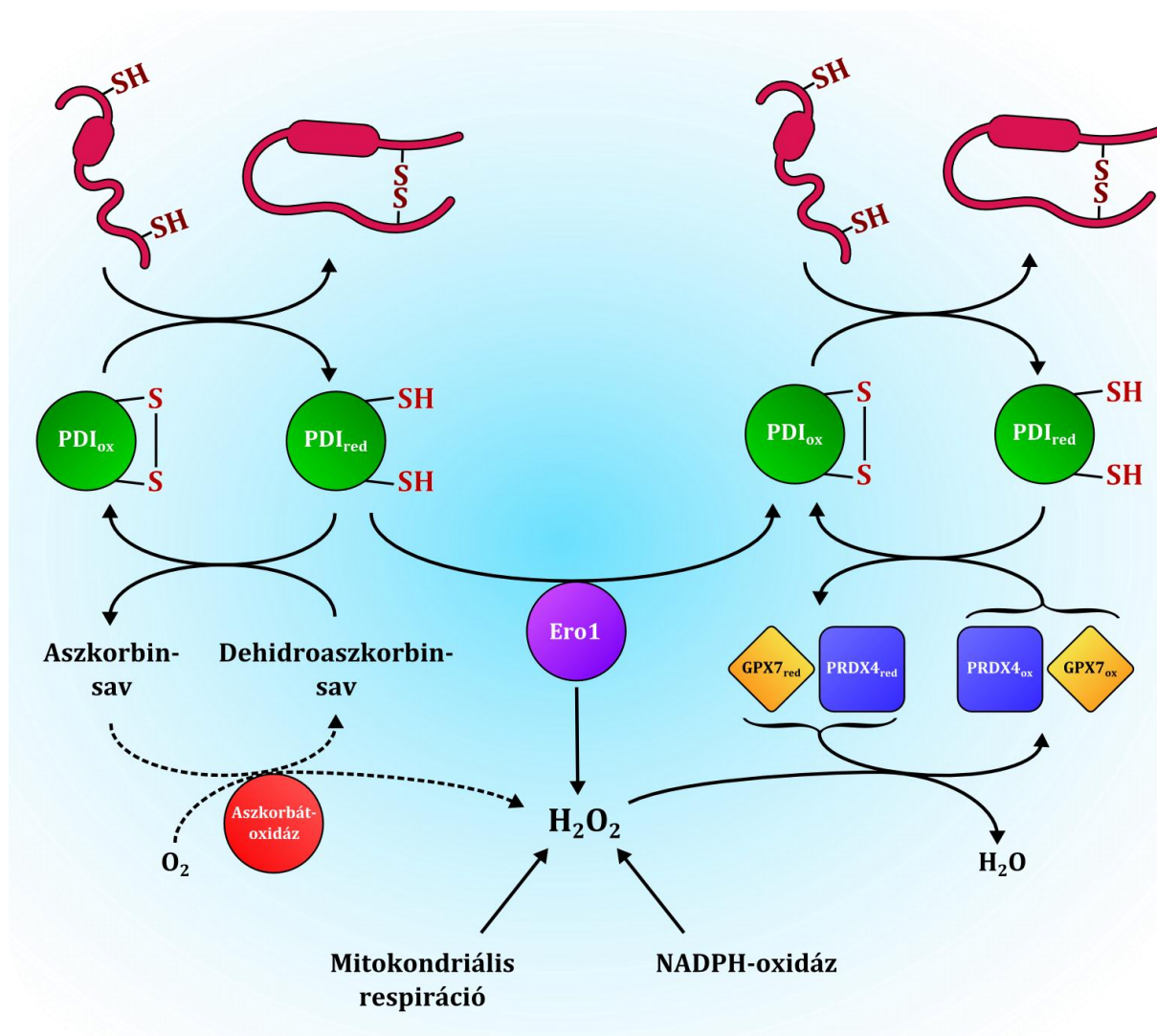
1.3.5.2. Kérdések, kétségek az aszkorbát oxidatív foldingban betöltött szerepével kapcsolatban

A fenti modell meglehetősen biztosnak, szilárdnak tűnt egészen 2010-ig. Akkor Saaranen és munkatársai (2010) felvetették, hogy a redukált PDI és DHA között lejátszódó reakció túl lassú lehet ahhoz, hogy a fő DHA redukciós útvonal legyen az ER-ben. Természetesen rendkívül nehéz bármiféle jóslást tenni *in vivo* folyamatokra *in vitro* nyert adatokból. Azt is fontos megjegyeznünk, hogy a DHA ER lumenbeli koncentrációja (a többi más vegyületéhez hasonlatosan) ismeretlen. Ez a megfigyelés semmiképpen sem azt jelenti, hogy a DHA és annak redukciója független az ER-ben zajló diszulfidképződéstől, de mindenesetre érdemes fenntartásokkal kezelni a fenti modellt.

1.3.5.3. Átfedések a PDI visszaoxidálásában

Ahogy azt korábban említettük a PDI a legkülönbözőbb fehérjék (tiol csoportjainak) oxidációját katalizálja, miközben CXXC részlete redukálódik. Ennek újbóli oxidációja elengedhetetlen a következő katalitikus ciklus lejátszódásához. Az első ízben élesztőben leírt ERO1 fehérje (Frand és Kaiser 1998; Pollard és mtsai 1998) képesnek bizonyult a PDI re-aktivációjára (vagyis a CXXC részlet oxidációjára). Legalább egy ERO1 családtag minden egyes eukarióta sejtben megtalálható. Amíg az élesztőben egyetlen gén található, addig humán sejtekben két ortológot (ERO1 α és ERO1 β) fedeztek fel eltérő szöveti eloszlással és transzkripciók kontrollal (Cabibbo és mtsai 2000; Pagani és mtsai 2000). Az ERO1 flavin adenin dinukleotid (FAD) kofaktora segítségével elektronokat juttat a molekuláris oxigénre, amely folyamat H₂O₂ képződését eredményezi (Tu és Weissman 2002). A H₂O₂ hatékony eltávolításáról ER peroxidázok gondoskodnak (Zito 2013). Három peroxidázt írtak le az emlős ER-ban: a PRDX4-et és két GSH peroxidázt a GPX7-et és a GPX8-at (Tavender és mtsai 2008; Nguyen és mtsai 2011). Mind a GPX7, mind a GPX8 *in vivo* kapcsolatát leírták az ERO1 α -val. A GPX7 jelentős mértékben fokozta az ERO1 α oxigénfogyasztását *in vitro* (Nguyen és mtsai 2011). Ezen túl a közelmúltban kimutatták, hogy a GPX7 képes az ERO1 α által termelt H₂O₂-t mind *in vivo*, mind *in vitro* felhasználni a szubsztrátfehérjék oxidatív foldingjának meggyorsításához (Wang és mtsai 2014). A PRDX4 messze a legjobban karakterizált ER peroxidáz. A többi ER peroxidázhoz képest kimagasló a H₂O₂-vel való reaktivitása ($k_2=2.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Wang és mtsai 2012). Ez a tulajdonsága kiválóan alkalmassá teszi az alacsony koncentrációjú H₂O₂ eltávolítására. A PRDX4 peroxidáz aktivitása során peroxiredoxin dimer keletkezik. Az oxidált PRDX4-et a (redukált) PDI re-aktiválja, ami újabb kliens fehérjékben található diszulfid kötések kialakulásához vezet (8. ábra). Az ERO1 és a PRDX4 közötti együttműködés egyrészt növeli az oxidatív fehérje folding hatásfokát, hiszen két diszulfidkötés jön létre, egy oxigénmolekula terhére, másrészt megoldja a hidrogén-peroxid toxicitás problémáját is. Mind az ERO1 α , mind az ERO1 β egerekben nélkülözhetőnek tűnik (Zito és mtsai 2010). Habár az ERO1 β -hiányos állatok az inzulin termelés és szekréció defektusa miatt cukorbetegségeket, az

ERO1 α hiányos egerek pedig adrenerg stimulációra abnormalis kardiális választ adnak (Chin és mtsai 2011, Zito és mtsai 2010), azonban a többi diszulfidkötést igénylő létfontosságú funkciójuk változatlan marad. Ezen kívül a PRDX4 hiányos egérnek kisebb rendellenessége akad a spermatogenezissel, de semmiféle ER fehérje metabolikus rendellenességről nem számoltak be esetükben (Iuchi és mtsai 2009). Ezek a viszonylagosan enyhe eltérést mutató fenotípusok, arra utalnak, hogy más alternatív utak is léteznek a fehérje tiolok oxidációjára (8. ábra).

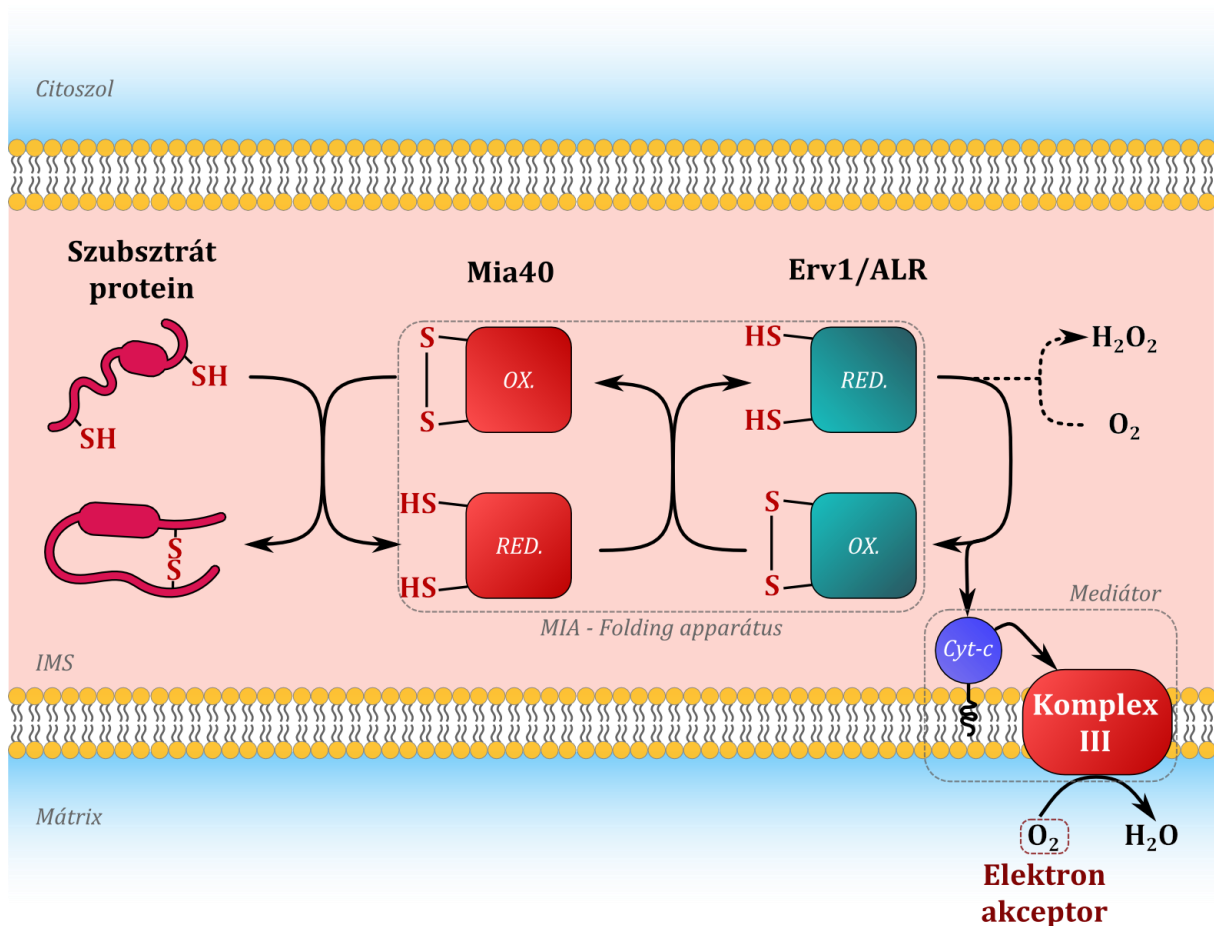


8. ábra Az ER oxidatív folding gépezete

1.3.5.4. Diszulfid kötések kialakulása a mitokondriumban

A diszulfidkötések, közelmúltban felfedezett mitokondriális membránközi térben való előfordulása meglehetősen váratlan esemény volt. Váratlan volt a membránközi tér redukáló citoszollal meglévő kapcsolata miatt, amely az oxidáló milióval rendelkező ER-ről nem mondható el. Az mindenképpen említésre érdemes, hogy számos membránközi térben található, vagy arrafelé néző fehérje rendelkezik diszulfidkötéssel (Deponte és mtsai 2009). A redox mérések szerint a membránközi tér redox állapota jóval oxidálóbb (-255 mV), mint a citoszol (-286 mV), vagy a mitokondriális mátrixé (-296 mV) (Hu és mtsai 2008). Ezen kívül a mitokondriális membránközi térben endogén glutation reduktáz aktivitással sem kell számolni. Ez a redox környezet támogatólag hathat a membránközi térbe importált fehérjék oxidatív foldingjára.

A mitokondriális diszulfidgeneráló gépezet egyik kulcs eleme a MIA40 (mitochondrial import and assembly) oxidoreduktáz (Chacinska és mtsai 2004). A fehérje előalakja 44, az érett formája 40 kDa-os molekulatömeggel jellemezhető. A korábban említett ER-ben található apparátushoz hasonlatosan a szubsztrátfehérjétől (pont, mint a PDI) a MIA40 veszi át az elektronokat, majd a MIA40-től az ERV1 (funkcionálisan az ERO1-hez hasonló), majd végül oxidoredukciók sorozatán keresztül citokróm c-re, vagy oxigénre kerül (9. ábra) (Allen és mtsai 2005, Dabir és mtsai 2007, Bihlmaier és mtsai 2007). A MIA40 szerkezete egyedinek számít a sejt ismert oxidoreduktázainak klubjában. Nem rendelkezik a többi oxidoreduktázra (mint például a PDI) jellemző tioredoxin-szerű doménnel. Ezzel szemben hat konzervált ciszteint tartalmaz a következő elrendeződésben: -CPC-CX9C-CX9C-. A MIA40 is redukálttá válik miközben a szubsztrátfehérjében segíti kialakulni a diszulfidkötéseket. A PDI-hez hasonlatosan, neki is oxidálódnia kell a következő katalitikus ciklus előtt. A MIA40 (vissza)oxidálását egy oldható homodimer flavoprotein az ERV1 (essential for respiration and vegetative growth) végzi (Bien és mtsai 2010, Lee és mtsai 2000, Lisowsky 1992, Mesecke és mtsai 2005). Az ERV1, vagy annak humán analógja az ALR (augmenter of liver regeneration) a mitokondriális membránközi térben helyezkedik el és a flavoproteinek Erv1/QSOX (quiescin sulfhydryl oxidase) családjába tartozik (Coppock és Thorpe 2006, Fass 2008). Az ERV1 mindegyik alegysége két doménből áll (N és FAD domén) mindegyikben megtalálható a konzervált CXXC részlet (Szarka és Bánhegyi 2011). Az ERV1 az elektronokat a citokróm c-n, majd a citokróm c oxidázon keresztül molekuláris oxigénre juttatja. A légzési elektrontranszfer láncsal ily módon meglévő kapcsolat fokozza az oxidatív folding apparátus oxidációjának hatásfokát, valamint segít elkerülni a H₂O₂ képződését (9. ábra) (Dabir és mtsai 2007, Bihlmaier és mtsai 2007).



9. ábra. A mitokondriális fehérje folding gépezet

Végezetül fontos megemlítenünk, hogy az ALR fehérje nem szimplán a mitokondriális oxidatív folding gépezet egyik tagja, rész vesz a máj regenerációjában, szükséges a megfelelő mitokondriális biogenezishez és a mitokondriumok fenntartásához is (Balogh és Szarka 2015).

2. Kísérleti módszerek

2.1. Növények termesztése

Mind a ppr-40 mutáns *Arabidopsis thaliana*, mind a kontroll *A. thaliana* (Columbia ökotípus) növények magvait felhasználásig sötétben, 4°C-on tároltuk. COMPO SANA típusú virágföldet alkalmaztunk, a magokat vízzel jól felitatott föld felszínére vetettük. Fitotronban, 12 óra fény – 12 óra sötét fotoperiódusban, 80% relatív páratartalom mellett, 22±2°C-os hőmérsékleten neveltük a növényeket. A vizsgálatokhoz 6-8 hetes korukban, jóval a virágzás megindulása előtt használtuk fel a növényeket. Ültetéseket átlagosan kéthetente végeztünk, a nevelés folyamatosan zajlott.

2.2. *Nicotiana tabacum* sejtkultúra *in vitro* fenntartása

Nicotiana tabacum L. cv. Bright Yellow-2 szuszpenziós sejtkultúrát Murashige és Skoog tápoldatban tartottuk fenn, amelyet literenként a következő anyagokkal egészítettünk ki: 0.2 g KH₂PO₄, 30g szacharóz, 0.2 mg 2,4-diklorofenoxiecetsav, 0.01 g tiamin-HCl, és 0.1 g myoinositol (pH=5.8). A sejteket 22°C-os inkubátorban, 120 rpm-es rázatás mellett, sötétben növesztettük. A sejteket 7 naponta oltottuk át, húszszoros hígítással.

2.3. *Arabidopsis thaliana* sejtkultúra *in vitro* fenntartása

Arabidopsis thaliana ppr-40 mutáns, valamint Columbia ökotípusból tartottunk fel szuszpenziós sejtkultúrákat. A sejteket 22°C-os inkubátorban, 120 rpm-es rázatás mellett, sötétben növesztettük. A sejteket 7 naponta oltottuk át, tízszeres hígítással. A tápfolyadék összetétele a következő volt: 0.44% Murashige és Skoog sókeverék Gamborg vitaminkészítménnyel kiegészítve, 3% szacharóz, 0.24 mg/l 2,4-diklorofenoxiecetsav, 0.014 mg/l kinetin, 40 ml/l 0.1M PBS; pH=5.8.

2.4. Állatkísérletek

In vivo kísérleteinkhez egereket választottunk, mivel az acetaminofen-toxicitás irodalma jelentős részben egérkísérleteken alapul. A CD-1 hím állatokat a Charles River Magyarországtól vásároltuk (Gödöllő). Az egerek állatházi tartása és a kísérletek a Semmelweis Egyetem által lefektetett szabályok betartásával történtek. Az állatok az állatházi tartás során szabadon jutottak táplálékhoz és vízhez. Az állatok kezelése akkor történt, amikor testsúlyuk a 25-30 grammos tartományba került. A kezelést 24 órás éheztetés előzte meg; az állatok ivóvíz-hozzáférése ez idő alatt is megmaradt. Kísérleteink során az egereket APAP-nel (450 mg/kg), BGP-15-tel (100 mg/kg) illetve butioninszulfloximinnel (BSO; 7,2 mmol/kg) kezeltük. Mindkét szert fiziológiás pH-jú steril PBS pufferben oldottuk fel, majd a testhőmérsékleten tartott oldatok 0.5 ml-es térfogatát intraperitoneálisan adtuk be. A kontroll állatok azonos térfogatú steril PBS-t kaptak.

2.5. Emlős 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% CO₂-t tartalmazó atmoszférában szaporítottuk őket. A HepG2 sejteket EMEM tápközegben tartottuk fenn, amit 10% FBS-sel, 2 mM glutaminnal, 1 % NEAA-val és A/A oldattal egészítettünk ki. Az MCF7 sejtvonalat 10 % FBS-sel, 2 mM glutaminnal és A/A oldattal kiegészített DMEM oldatban neveltük. Az SH-SY5Y sejteket pedig Ham's F12 és EMEM tápoldat 1:1 arányú elegyében tartottuk fenn, amit 15% FBS-sel, 2 mM glutaminnal, 1% NEAA-val és A/A oldattal egészítettünk ki. A fent leírt összetételű tápközeg keverékek a továbbiakban „komplett médium” néven szerepelnek.

2.6. ρ^0 -sejtvonalak létrehozása és fenntartása

A mtDNS sejtekből történő eliminációjához a kiválasztott sejtvonalakat (HepG2, MCF7, SH-SY5Y) hosszú távú etídiom-bromidos kezelésnek vetettük alá, miközben a komplett médiumokat piruváttal és uridinnel is kiegészítettük. A HepG2 és MCF7 sejteket 50 ng/ml etídiom-bromiddal, 100 μ g/ml piruváttal és 50 μ g/ml uridinnel kiegészített komplett médiumban tartottuk legalább két hétig. Az SH-SY5Y sejteket pedig Trimmer és munkatársai leírása (2004) alapján 5 μ g/ml etídiom-bromiddal kezeltük átlagosan 16 héten keresztül, és a médiumot ebben az esetben is 100 μ g/ml piruváttal és 50 μ g/ml uridinnel egészítettük ki.

A mtDNS elminiációját real-time PCR technikával igazoltuk. A mitokondriális és sejtmagi DNS mennyiség arányának alakulását PikoReal (Thermo Scientific) real-time PCR készülékkel követtük az etídium-bromidos kezelés során. mtDNS által kódolt szekvenciaként a COX II gén egy specifikus szakaszát vizsgáltuk; amplifikációjához a következő primer párt használtuk: FW 5'-CATCCTAGTCCTCATCGCCCTCC-3' és REV 5'-GGGCATGAAACTGTGGTTTGC TCC-3'. Nukleáris DNS által kódolt referencia szekvenciaként pedig a β -globin gén egy szakaszát használtuk, a következő primer párral: FW 5'-TTTCCCACCCTTAGGCTGCTG-3' és REV 5'-GGGAAAGAAAACATCAAGCGTCCCA-3'.

A PCR reakcióhoz szükséges DNS-t Wizard SV (Promega) DNS tisztító kit segítségével izoláltuk mind az eredeti vad, mind a ρ^0 -sejtekből. Minden mintával három párhuzamos mérést végeztünk. A PCR reakció a következő protokoll szerint történt: kezdő denaturáló lépés 95°C-on 3 percig, majd denaturáció 95°C-on 10 másodpercig, majd kombinált betapadási és lánchosszabbítási lépés következik 60°C-on 30 másodpercig; a ciklus 40-szer ismétlődik.

2.7. Primer egér májsejtek izolálása és fenntartása

Az izolálást hím NMRI egerekből (23–25 g) CharlesRiver (Gödöllő, Magyarország) származó májból végeztük. A májsejteket háromlépéses átáramoltatásos technikával izoláltuk. A májat első lépésben Ca^{2+} mentes EGTA tartalmú Earle kiegyenlítő oldattal (EBSS) mostuk át, második lépésben ugyanezzel az oldattal, csak kelátor nélkül, végül Ca^{2+} és IV-es típusú kollagenáz tartalmú EBSS-sel. A perfúziót 37°C-on, pH=7.4 végeztük. A májsejteket ezt követően patkány farok I-es típusú kollagénnel bevont 96 lyukú lemezre (Becton, Dickinson and Company) ültettük 3×10^4 sejt/lyuk sűrűségben. A sejteket 5 % borjú szérum, 100 nM inzulin, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B, 0.1 mg/ml gentamicin, 30 nM Na_2SeO_3 , és 0.1 μM dexamethasone tartalmú Williams tápoldatban tartottuk fenn. A borjú szérum és az amphotericin B csak az első 24 h-ban volt jelen, ezt követően mellőztük a tápoldatból. A sejteket 37°C-on 95 % levegő +5 % CO_2 tartalmú atmoszférában tartottuk. A sejteket 24 órával a kiültetést követően a kísérleteknél jelzett módon kezeltük.

2.8. Mitokondrium izolálása szuszpenziós sejt kultúrákból

A mitokondriumokat egy hetes BY2, ppr-40 mutáns, vagy Columbia ökotípusú szuszpenziós sejt kultúrából izoláltuk. A felhasználandó sejteket Büchner-tölcséren szűrtük, a tömegüket lemértük (min. 250 - 300g sejtrel dolgoztunk), majd kétszeres mennyiségű feltáró puffert (450 mM szacharóz, 0.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.2% BSA, 0.6% PVP40, 15 mM MOPS, 2 mM cisztein; pH=7.4) adtunk hozzá. A sejtek feltárását laboratóriumi turmixgéppel (Waring Blender) végeztük ötször húsz másodpercig. A homogenátumot vásznon átszűrtük, a szűrletet

centrifugacsövekbe töltöttük. A sejtörmelék és a sejtmag eltávolítása céljából a szűrletet lecentrifugáltuk (3000 g, 15 perc, 4°C) majd a felülúszót újból centrifugáltuk (17 000 g, 15 perc, 4°C). Ekkor a pelletben találhatóak a mitokondriumok. 1 ml mosópufferben (300 mM szacharóz, 0.5 mM EGTA, 5 mM MOPS; pH=7,2) felszuszpendáltuk a mintákat, majd egyesítettük őket. A maradék szennyezők eltávolítása céljából újból lecentrifugáltuk (3000 g, 5 perc, 4°C) a szuszpenziót. A felülúszót egy másik centrifugacsőbe szívtuk, majd centrifugáltuk (17 000 g, 15 perc, 4°C), ekkor a mitokondrium ismét a pelletbe került. A pelletet 1-2 ml mosópufferben szuszpendáltuk fel, majd a végső tisztítás céljából háromrétegű Percoll-gradiens tetejére rétegeztük. A gradiens 4 ml 40v/v% -os, 8 ml 23v/v%-os és 8 ml 18v/v%-os Percoll oldatból állt. Az egyes oldatokat tömény Percoll oldat és pufferoldat (300 mM szacharóz, 1 mM EGTA, 10 mM MOPS; pH=7.2) megfelelő arányú keverésével állítottuk össze. A gradiens centrifugálást kilendülő fejes rotorral, 70 000 g-n, 4°C-on, 45 percig végeztük. A mitokondriális frakció a gradiens 23%-os és 18%-os rétegének határán helyezkedett el, ahonnan pipettával óvatosan leszívtuk. A Percollt a mitokondriális frakcióból háromszori MOPS-mannitol pufferes mosással és centrifugálással (40 000 g, 10 perc, 4°C) távolítottuk el. Az utolsó centrifugálás után a pelletet MOPS-mannitol pufferben szuszpendáltuk fel (gradiens tisztított mitokondrium), majd a mérések során ezzel a mitokondrium szuszpenzióval dolgoztunk. Az egész izolálás alatt a mintáinkat és a felhasznált oldatokat végig jégen tartottuk. A mintavételek során aszkorbát, glutation méréshez 150-300 µl mintát vettünk, ehhez egyező térfogatú 8%-os metafoszforsavat, 10%-os szulfoszalicilsavat adtunk, a fehérje méréséhez 50 µl mintát vettünk. A továbbiakban a mintákat -80°C-on tároltunk.

2.9. Mitokondrium izolálása zöld növényből

Az izolálásokat 6 hetes ppr-40 mutáns, valamint Columbia ökotípusú zöld növényekből végeztük. Minimum 100 g zöld szövetből kiindulva (levél és szár), kétszeres térfogatú feltáró pufferben (450 mM szacharóz, 0.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 10 mM DTT, 0.2 w/v% BSA, 0.6 w/v% PVP 40, 15 mM MOPS, pH=7.4) homogenizáltuk a növényi szövetet. A homogenizálás 10x5 másodpercig történt, késes turmixban (Waring Blender). A homogenátumot vásznon átszűrtük, a felülúszót centrifugáltuk: 10 percig 3500g-n, majd 5 percig 6000g-n, a végén 10 percig 17000g-n centrifugáljuk. A pelletet amely tartalmazza a mitokondriumokat mosópufferben (300 mM szacharóz, 1 mM EGTA, 10 mM MOPS, pH=7.2) felszuszpendáltuk. Az így kapott mitokondrium szuszpenziót 3 lépéses Percoll gradiensre rétegeztük: 18%, 29%, 45% Percoll 300 mM szacharóz, 10 mM MOPS, pH=7.2 pufferben. A centrifugálást 45 percig, 70 000 g végeztük kilendülőfejes rotor segítségével. A mitokondriumok a 29%, 45% határrétegnél találhatók a centrifugálást követően. A határrétegről leszívtuk a mitokondriumot, majd a Percollt három egymást követő mosással, mosópufferben (0.4 M mannitol, 1 mM EGTA, 10 mM MOPS, pH=7.2) eltávolítottuk. A centrifugálást 10 percig, 12 000 g-n végeztük. A sejtorganellumot MOPS-mannitol mosópufferben szuszpendáltuk fel.

2.10. Mitokondrium izolálása csicsókából

Az izolálásokat a saját kertemben található „kísérleti” csicsókaültetvényből származó csicsókából végeztük.

Minimum 300g csicsókát bő vízben megmostunk, majd meghámoztunk és lereszeltünk. Kétszeres térfogatú feltárási pufferben (0.4 M szacharóz, 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1% BSA, 0.05% cisztein, pH 8.2) homogenizáltuk a növényi szövetet. A homogenizálás 10x5 sec történik kések turmixban. A felülúszót 5 percig 1000 g-n, majd 15 percig 17 000 g-n centrifugáljuk. A pelletet mosópufferben (300 mM szacharóz, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH=7.4) szuszpendáltuk fel. Az így kapott mitokondrium szuszpenziót önbeálló Percoll gradiensre rétegeztük (300 mM szacharóz, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.1% BSA, 23% Percoll, pH=7.4). A centrifugálás 30 percig, 40 000 g-n történt. A mitokondriális frakció a kialakult gradiens alsó egyharmadában megjelenő sávban volt megtalálható a centrifugálást követően. A mitokondriális frakciót tartalmazó sávot leszívtuk, majd a Percollt három egymást követő mosással, mosópufferben (0.3 M mannit, 1 mM, 10 mM MOPS, pH=7.2) eltávolítottuk. A centrifugálást 5 percig, 42000 g-n végeztük. A sejtorganelumot MOPS-mannitol mosópufferben szuszpendáltuk fel.

2.11. Mikroszóma és mitokondrium izolálás májszövetből

A máj mikroszómákat hím Wistar (180-230 g), patkányokból, vagy CD1-es egerekből preparáltuk. Az állatokból frissen kivett májat apró darabokra vágva 0.3 M szacharózt, 20 mM HEPES-t (pH = 7.0) tartalmazó pufferbe tettük, majd Potter-Elvehjem homogenizátorral egyenletes szuszpenziót készítettünk. A szuszpenzió koncentrációját 20%-ra állítottuk szacharóz-HEPES pufferrel. Ezt követően centrifugacsövekbe töltöttük és lecentrifugáltuk (1000 g, 10 perc, 4 °C). A sejtörmeléket tartalmazó csapadékot eldobtuk. A felülúszót ultracentrifugával tovább centrifugáltuk (11 000 g, 20 perc, 4 °C). A csapadék a mitokondriális frakció. A citoszól és mikroszómát tartalmazó felülúszót újra lecentrifugáltuk (100 000 g, 60 perc, 4 °C). A felülúszó tartalmazza a sejt citoplazmáját. A mikroszómafrakciót tartalmazó csapadékot újrászuszpendáltuk 100 mM KCl-ot, 20 mM NaCl-ot, 1 mM MgCl₂-ot és 20 mM MOPS-ot tartalmazó, pH 7.2-es pufferben (a továbbiakban MOPS puffer) és újfent lecentrifugáltuk. (100 000 g, 60 perc, 4 °C). A mikroszómákat MOPS pufferben reszuszendáltuk (≈60 mg fehérje/ml). A szuszpenziót gyorsan lefagyasztottuk és felhasználásig folyékony nitrogénben tartottuk. A mikroszómális vezikulumok épségét, a szacharóz adására bekövetkező ozmotikus változások alapján fényszórás méréssel ellenőriztük. Vizsgálatainkban csak szacharóz adására fenntartott zsugorodású mikroszómákat használtunk. A mikroszómális fehérje koncentrációt, standardként marha szérum albumint használva, Bio-Rad kit segítségével határoztuk meg.

2.12. Szubmitokondriális partikulák preparálása

A mitoplasztokat Sweetlove és mtsai (2001) kissé módosított módszere szerint nyertük. Röviden, a mitokondriumot a Percoll gradiens centrifugálást követően 10 mg/ml-es koncentrációban 70 mM mannitolt, 10 mM MOPS puffert (pH 7.4) tartalmazó oldatban szuszpendáltuk fel és 15 percig inkubáltuk időnként óvatosan megkeverve jégen. Ezt követően az ozmotikus viszonyokat 0.3 M mannitolra állítottuk és további 15 percig jégen inkubáltuk, a szuszpenziót 10 percig centrifugáltuk 18 000 g-n, 4°C-on. Az így nyert felülúszó tartalmazta a membránközi teret és a külső membránt, a mitoplasztot pedig a pellet. A membránközi teret és a külső membránt tartalmazó felülúszót tovább centrifugáltuk 200 000 g-n 10 percig 4°C-on. A centrifugálást követően a szolubilis membránközi tér a felülúszóban, a külső membrán pedig a pelletben található. A külső membrán frakciót kétszer mostuk 10 mM MOPS pufferrel (pH = 7.4). A mitoplasztot tartalmazó pelletet 10 mM-os MOPS (pH = 7.4) pufferben szuszpendáltuk fel, a membránt ismételt olvasztás-fagyasztással törtük fel, majd 18 000 g-n 15 percig centrifugáljuk 4°C-on, a felülúszóban található a mátrix, a pelletben a belső membrán frakció. A belső membrán frakciót kétszer mostuk 10 mM MOPS pufferrel (pH = 7.4). Végezetül a pelleteket óvatosan 10 mM MOPS pufferben szuszpendáltuk fel.

A mitoplasztok intaktságát két citrát-ciklus enzim latenciájával mutattuk ki: az izocitrát-dehidrogenázéval (Osmani és Scrutton 1983) és az α -ketoglutarát dehidrogenázéval. Az izocitrát-dehidrogenáz 92%-os, az α -ketoglutarát dehidrogenáz pedig 98%-os latenciát mutatott, ami egyértelműen mutatja a mitoplasztok magas fokú épségét. Az enzimaktivitások meghatározásához a mitoplaszt frakciót (0.08 mg fehérje/ml) MOPS-mannitol pufferben 37°C-on 1 mM NAD^+ jelenlétében inkubáltuk. A szubsztrát adagolását követően (izocitrát/ α -ketoglutarát; 1/1 mM) a redukált piridin nukleotidot (NADH) detektáltuk a rá jellemző fluoreszcens spektruma alapján. A fluoreszcenciát 350 nm-es excitációs és 460 nm-es emissziós hullámhosszaknál követtük nyomon Cary Eclipse fluoreszcens spektrofotométerrel (Varian, Vic., Australia). A mátrix enzimek kofaktorhoz való szabad hozzáférése végett a mitoplasztokat a pórusformáló alameticinnel (0.1 mg/mg fehérje) permeabilizáltuk.

2.13. Kis molsúlyú anyagok transzportjának meghatározása mitokondrium és mikroszóma eredetű vezikulákon gyorsszűrési módszerrel

A sejteket, mitokondriumokat, illetve mikroszómális vezikulákat (0.5–1 mg fehérje/ml) szobahőmérsékleten (22°C) inkubáltuk az adott kísérletben jelzett koncentrációjú hideg aszkorbátot, glükózt, fruktózt, szacharózt, GSH-t, FAD-ot és a megfelelő radioaktívan jelölt analóg vegyületet tartalmazó pufferben. Különböző időpontokban eltávolított alikvotokat (0.1 ml) nitrocellulóz membránon (pórusméret: 0.22 μm mikroszóma, 0.45 μm mitokondrium esetében) szűrtünk és mostunk azonos összetételű jéghideg pufferrel. A membránon

visszamaradt radioaktivitást szcintillációs számlálóval (FAD esetében fluoriméterrel) mértük. Az intravezikuláris és membránkötött radioaktivitás elkülönítésére párhuzamos méréseket is végeztünk alameticin tartalmú (50 µg/mg fehérje) mintákból. Az alameticin egy pórusképző antibiotikum, a vezikulákat permeabilissá teszi számos hidrofíl molekulára, így az általunk vizsgáltakra is. Az alameticinnel permeabilizált vezikulákat is az előbb leírt módon szűrtük, majd mostuk. A mikroszómális/mitokondriális fehérjék több mint 95%-a visszamaradt a membránon, ami mutatja, hogy az alameticin-kezelés nem változtatja meg a vezikuláris szerkezetet. Az alameticinnel kiengedhető, tehát intravezikuláris radioaktivitást a membránkötött radioaktivitás teljes radioaktivitásból való kivonásával nyertük.

2.14. Mikroszómális glutation meghatározás

A nitrogénből felvett mikroszóma mintákból körülbelül 300 µg fehérjének megfelelő mennyiséget TRIZMA pufferben (pH = 8.0) feloldottunk. Összglutation-mennyiség meghatározásakor 0.1 mM ditiotreitollal (DTT, 1 mM) kezeltük a mintákat (inkubáció 25°C-on, 1 óráig), redukált glutation (GSH) meghatározásához a DTT-vel végzett redukció elmaradt. Ezt követően 1 mM monoklorobimánnal derivatizáltuk a mintákat (inkubáció sötétben, 25°C-on, 10 percig). A monoklorobimán tiol-specifikus reagens, a reakcióban erősen fluoreszcens tioéter keletkezik. A mintákat ezután egytized térfogatnyi 100%-os TCA-val kezeltük és a leváló csapadékot 5 perces 20 000 g-s centrifugálással választottuk le. A derivatizált glutation mérése a felülúszókból vett mintákból, HPLC módszerrel történt. Elválasztásra Teknokroma Nucleosil 100 C-18 oszlopot használtunk (4,6 x 250 mm, 5 µm szemcseméret). A derivatizált glutation mennyiségét fluoreszcens detektorral (Waters 2475 Multi λ Fluorescence Detector) mértük.

2.15. Sejtes glutation tartalom meghatározás

Petri csészéken közel konfluenssé növesztettük a sejteket (HepG2, primer egér hepatocita). Médiumcserét követően 24 órával APAP-nel, illetve az eredmények fejezetben jelzett különböző reagensekkel kezeltük a sejteket. Kezelés után a sejteket jéghideg PBS-sel mostuk, jégen lizáltuk, majd centrifugáltuk (10 perc, 10 000g). A 10x-esre hígított felülúszó 10 µl-ét használtuk redukált glutation és teljes glutation meghatározására, az előző pontban leírtaknak megfelelően.

2.16. Aszkorbát koncentráció meghatározása HPLC-vel

Folyékony nitrogénben a növényi szövetet eldörzsöltük, a finom port nitrogénben hűtött Eppendorf csövekbe helyeztük. 50-100 mg folyékony nitrogénben feltárt zöld növényi szövethez, vagy sejtszuszpenzióhoz 1 ml 8%-os metafoszforsavat (Asc méréséhez), illetve 8%-os metafoszforsavat + 5 mM DTT-t (DHA méréséhez) adtunk, majd homogenizáltuk a mintákat. Az így előkészített mintákat lecentrifugáltuk (11 000 g, 10 perc, 4°C), majd a felülúszóból 100 µl-t a mintatartókba mértünk. Az elválasztást Waters 2690 folyadékkromatográfiás készüléken, Teknokroma fordított fázisú, C18-as töltetű kolonnán (4.6 x 250mm, 5 µm szemcseméret) végeztük. Az izokratikus mozgófázis összetétele 0.1 M NaH₂PO₄, 0.2 mM EDTA, pH=3.1 (ortofoszforsavval beállítva) volt, az áramlási sebesség 1 ml/perc volt. Az aszkorbátot Waters 2487 dual lambda UV-VIS detektor alkalmazásával 254 nm-en detektáltuk. A mérések előtt a kromatográfiás oszlopot 30 percig vízzel, majd 30 percig eluenssel mostuk. Az eluenst felhasználás előtt mindig gondosan kilevegőztettük. A kalibrációhoz 1 - 100 µM koncentrációjú aszkorbát standard oldatokat alkalmaztunk, oldószerként MOPS-mannitol puffer és 25%-os metafoszforsav 3:1 arányú elegyét használtuk. A retenciós idő esetleges csúszásának és az aszkorbát bomlásának nyomon követésére a mintasorozat elé, mögé, valamint közé is helyeztünk standard oldatokat.

2.17. Redukált glutation/teljes glutation koncentráció mérése HPLC-vel

A folyadékkromatográfiás méréseket Nagy és munkatársai (2007) alapján végeztük el. Folyékony nitrogénben a növényi szövetet eldörzsöltük, a finom port nitrogénben hűtött Eppendorf csövekbe helyeztük. 50-100 mg folyékony nitrogénben feltárt zöld növényi szövethez 1 ml 5%-os szulfoszalicilsav oldatot adtunk, majd homogenizáltuk. (Az így előkészített, konzervált minták -80°C-on tárolhatók). A folyadékkromatográfiás mérésekhez a lefagyasztott oldatokat kiolvadás után lecentrifugáltuk (11 000 g, 5 perc, 4°C), 200 µl felülúszót lepipettáztunk, majd a felülúszóhoz egytized térfogatnyi trietanol-amint adtunk (pH semlegesítése). Ezt két azonos térfogatú részre osztottuk. Az egyik felét GSH meghatározásra használtuk, amelynek során a semlegesített felülúszóhoz 1 térfogatszázaléknyi, 100 mM-os monoklórbimánt adtunk, majd jól összekevertük és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A monoklórbimán tiol-specifikus reagens, a reakcióban erősen fluoreszcens tioéter keletkezett. A reakciót 10 térfogatszázaléknyi 100%-os triklórecetsav adagolásával állítottuk le. A másik adag semlegesített felülúszóhoz 10 térfogatszázaléknyi, 10 mM-os DTT-vel redukáltuk (így a totál GSH tartalom mérhető), majd 1 h-ig szobahőmérsékleten sötétben inkubáltuk. Ezután a mintákhoz 1 térfogatszázaléknyi 100 mM-os monoklórbimánt adtunk, majd jól összekevertük és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A reakciót 10 térfogatszázaléknyi 100%-os triklórecetsav adagolásával állítottuk le. A mérésekhez a kalibrációs standard oldatokat (5 - 500 µM), valamint a vak mintákat is hasonló módon készítettük elő.

Az elválasztást Waters 2690 folyadékkromatográfiás készüléken, Teknokroma fordított fázisú, C18-as töltetű kolonnán (4,6 x 250mm, átlagos szemcseméret: 5µm) gradiens elúcióval (áramlási sebesség 1 ml/perc) végeztük. A használt eluensek összetétele: 0,25% ecetsav, pH=3,5 (NaOH-dal állítva) (A oldat), analitikai tisztaságú metanol (B oldat). A 40 perces elválasztás során az oldat összetétel a következőképpen alakult: 0 perc: 15 v/v% B oldat; 5 perc: 15 v/v% B oldat; 15 perc: 23 v/v% B oldat; 20 perc: 23 v/v% B oldat; 25 perc: 100 v/v% B oldat; 30 perc: 15 v/v% B oldat; 40 perc: 15 v/v% B oldat. A glutation detektálását (Waters 2475 fluoreszcens detektor) 394 nm gerjesztési- és 477 nm emissziós hullámhosszon végeztük. A mérések előtt az oszlopot 30 percig eluenssel (A:B=85:15 oldat) mostuk. Az eluenst felhasználás előtt gondosan kilevegőztettük.

2.18. Invertáz aktivitás vizsgálata

100 – 250 µl frissen izolált, MOPS-mannitol (300 mM mannitol, 10 mM MOPS, pH 7.4) pufferben szuszpendált mitokondrium vagy mitokondriális mátrix frakciót (kb. 1 mg/ml) használtunk fel a kísérletekhez. Az inkubálást szobahőmérsékleten végeztük és 100 mM szacharóz hozzáadásával indítottuk. 2 óra inkubálási idő eltelte után a reakciót 0,05 térfogat Carrez I. reagens (30%-os (w/v) cink-acetát) hozzáadásával állítottuk le. A felesleges reagenst a Carrez I oldat mennyiségével azonos térfogatú Carrez II reagens (15% (w/v)-ferrocianid) hozzáadásával távolítottuk el. A mintákat 10 percig 18 000 g-n, 4°C-on centrifugáltuk.

A mitokondrium frakciót (~ 1 mg/ml) 100 mM szacharóz jelenlétében szobahőmérsékleten inkubáltuk annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a glükóz és fruktóz a mitokondriumon belül, vagy kívül képződik. 250 µl mitokondrium szuszpenziót vettünk ki 2 h inkubálást követően és 2 percig centrifugáltuk 38 000 g-n, 4°C-on. A felülúszó és a pellet térfogatát a centrifugálást követően azonnal mikropipettával megállapítottuk, majd a reakciót 0.05 térfogat Carrez I. reagens (30%-os (w/v) cink-acetát) hozzáadásával állítottuk le. A felesleges reagenst a Carrez I oldat mennyiségével azonos térfogatú Carrez II reagens (15% (w/v)-ferrocianid) hozzáadásával távolítottuk el. A mintákat 10 percig 18 000 g-n, 4°C-on centrifugáltuk.

2.19. Fumaráz aktivitás meghatározása

A fumaráz (EC 4.2.1.2) aktivitását, mint tipikus mitokondriális mátrix markerenzimét azért határoztuk meg a mitokondriális belső és külső membrán frakciókból, hogy megállapítsuk esetleges mátrix frakcióval történt keresztszennyeződésük mértékét. A fumaráz aktivitását spektrofotometriásan 240 nm-nél mértük, ahogyan azt Bergmeyer és mtsai (1974) leírták. Az abszorbancia 240 nm-nél bekövetkező növekedését követtük, amelyet az L-malát (50 mM) adott szubmitokondriális frakcióhoz történő hozzáadását követő fumarát termelődés váltott ki.

2.20. Fehérje tiolok mérése

A fehérje tiolok oxidációjának vizsgálata során intakt mikroszómális vezikulákat (1 ml, 1 mg/ml fehérje) inkubáltunk szabad FAD jelenlétében, illetve távollétében MOPS pufferben. Az inkubációt 50 μ l 100%-os triklórecetsav hozzáadásával fejeztük be. A kicsapódott fehérjéket centrifugálással eltávolítottuk (20 000 g, 5 perc). A felülúszót vízsugárszivattyúval eltávolítottuk, a kicsapódott fehérjéket 1 ml foszfát pufferben (pH = 7.2) ultrahangos sejtfeltárával újraszuszpendáltattuk. Ezt követően 20 μ l 37.8 mM-os ditio-nitro-benzoátot (DTNB) adtunk a szuszpenzióhoz és 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk (20 000 g, 5 perc). A felülúszó abszorbanciáját 412 nm-en mérve, az extinkciós koefficiens ($\epsilon = 13\,600\text{ cm}^2\cdot\text{M}^{-1}$) ismeretében számítottuk ki a tiolkoncentrációt.

2.21. A tiol-diszulfid redox állapot meghatározása fehérjékben AMS jelöléssel

40 μ g fehérjét tartalmazó mikroszóma frakciót 0.1 M Tris-pufferrel (pH 7.2) 40 μ l-es térfogatra hígítottunk, majd a mintákat 5%-os végső koncentrációjú TCA oldattal kicsaptuk és 10 000g-n 5 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A pelletet kétszer 70% acetonnal mostuk, majd kétszer 0.1 M Tris-sel átöblítettük. A pelletet 40 μ l pufferben (0.1 M Tris, 70 mM SDS, 6 M urea, pH 6.8) újra feloldottuk. Az így kapott oldat 18 μ l-éhez 2 μ l AMS (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulphonic acid; DMSO-ban feloldva) törzsoldatot adtunk, a végső AMS koncentráció 20 mM volt. A mintákat 15 percig jégen inkubáltuk, majd újabb 15 percig 37 °C-on. A redukált és az oxidált kontroll mintákhoz 40 μ g fehérjét tartalmazó mikroszóma frakciót 37 °C-on együtt inkubáltunk 50 mM ditiotreitolal, vagy 25 mM diamiddel, majd TCA-val kicsaptuk. Mind a redukált, mind az oxidált kontrollt a továbbiakban a többi mintához hasonlóan kezeltük. A mintákkal megegyező térfogatú mintapuffert adtunk a mintákhoz, majd 5 percig forraltuk őket. Végül 13%-os nem redukáló SDS-PAGE gélbe töltöttük őket. A fehérjéket 4 °C-on nitrocellulóz membránra blotoltuk. A továbbiakban a western blotoknál ismertett protokoll szerint a kísérletnek megfelelő antitestekkel kezeltük.

2.22. Mitokondriális légzési vizsgálatok

A mitokondriális légzésvizsgálatokat Ho és mtsai (2007) alapján, kisebb módosításokkal végeztük. A légzés meghatározásához 250 μ g mitokondriális fehérjét adtunk 1 ml reakcióközeghez (0.3 M mannitol, 10 mM MOPS, 5 mM KH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 2 mM MgSO_4 , 1% marha szérum albumin, pH 7.5). Az oxigénfogyasztást szobahőmérsékleten Clarke-típusú oxigén elektróddal (Hansatech Oxythech) mértük. A reagenseket, inhibitorokat a következő

végső koncentrációkban alkalmaztuk: NADH (1.5 mM), szukcinát (5 mM), piruvát (5 mM), ADP (0.3 mM), ATP (0.3 mM), rotenone (10 mM), antimycin A (10 mM), KCN (1 mM), szalicilhidroxamin sav (2 mM), aszkorbát (1 mM), and dithiothreitol (2 mM). A szukcinát, illetve NADH-függő légzést mind ADP jelenlétében, mind távollétében meghatároztuk. Az alternatív oxidáz (AOX) aktivitást szukcinát NADH, ATP, ADP, piruvát, és ditiotritol jelenlétében mértük, hogy maximalizáljuk az elektronáramot, illetve KCN-t adagoltunk, hogy gátoljuk a citokróm c útvonalat. Szalicilhidroxamin savat adagoltunk, hogy biztosak legyünk abban, hogy az oxigénfogyás valóban az AOX aktivitásából ered. Az aszkorbát-függő légzést antimycin A adagolását követően mértük, hogy blokkoljuk a komplex III-on keresztüli elektronáramot.

2.23. Aszkorbil gyök meghatározása, elektron spin rezonancia mérések

Az elektron spin rezonancia (ESR) spektrumokat X-band számítógépvezérelt EMX6 Bruker spektrométer segítségével határoztuk meg. A mintaspektrumokat kvarc flat cell-ben szobahőmérsékleten vettük fel a következő műszerbeállítások mellett:

Modulációs frekvencia: 100 kHz

Modulációs amplitudó: 0,8 mT

Mikrohullámú erősítés: 15 mW

Felvételi idő: 84 sec

Időkonstans: 1,02 s

Field sweep: 2 mT

A spektrumok kiértékelését kettős integrálással végeztük.

2.24. HepG2 és primer májsejtek kezelése

A sejteket 6, vagy 96 lyukú lemezekben egyenletesen elosztatva tartottuk fenn. 96 lyukú lemezeket használtunk a hatásos gyógyszer koncentrációk meghatározásához, ekkor 8000 sejt/lyuk sejtszámot alkalmaztunk. A sejteket komplett sejtenyésző közegbe vettük fel és 24 órán keresztül inkubáltuk, majd a közeget lecseréltük olyan komplet sejtenyésző közegre, amelyet különböző reagensekkel egészítettünk ki a kezelésekhez, kísérletekhez. A sejtenyésző közeget a következő anyagokkal egészítettük ki: acetaminofen (APAP), ferostatin-1 (Fer-1),

α -tokoferol (α -TOC), dehidroaszorbát (DHA). DHA-t Washko és mtsai (1993) alapján aszkorbinsav oldat brómos oxidációjával készítettük.

2.25. Sejt életképesség vizsgálatok

A sejt életképesség vizsgálatokhoz 96 lyukú lemezeket használtunk. A sejttenyésztő közeget leszívtuk, majd olyan sejttenyésztő közegre cseréltük le, amely komplett sejttenyésztő közegben oldott 1/10 térfogat 5 mg/ml MTT-t (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid) tartalmazott. A lemezt a sejtekkel és az MTT oldattal 4 órán keresztül sejttenyésztő inkubátorban tartottuk, majd a közeget DMSO-ra cseréltük és 10 percig 37 °C-on inkubáltuk, hogy a formazán kristályokat feloldja. Az abszorbanciát mikrolemez spektrofotométer olvasóval (Thermo Scientific Multiskan™GO) 570 nm-en megmértük.

2.26. Apoptózis és nekrosis detektálása

A hisztológia számára formalin fixált paraffinba ágyazott máj mintákat készítettünk hematoxilin és eozin festéssel (HE). Az apoptózis detektálása TUNEL reakcióval történt az ApopTag Peroxidase Kit (Chemicon, Temecula, CA, USA) használatával. Az apoptotikus sejtek arányának megállapításához minden esetben 1000 sejtet számoltunk meg nagy (600×-os) nagyítás mellett. A nekrosis mértékét hematoxilin-eozin festett májszeletekből határozta meg két patológus egymástól függetlenül. A következő pontozási rendszert használták: 0: nincs nekrosis, 1: a nekrosis zonális és a zóna III maximum 20%-ára terjed ki, 2: a nekrosis zonális és a zóna III maximum 50%-ára terjed ki, 3: konfluens nekrosis. A nekrosis kiterjedtségének megállapításához 10 látóteret vizsgáltak vakon alacsony nagyításnál (10×-es objektív). Az eredményeket átlag $\pm$ S.D. formátumban adtuk meg. Minden eredmény statisztikai analízise Student t-próbával zajlott, szignifikáns eltérés P kisebb, mint 0.05 esetén.

2.27. Galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz expresszió vizsgálata

A vizsgálatokhoz teljes RNS-t izoláltunk növényekből Zimmerli és mtsai (2000) módszere alapján. Folyékony nitrogénben a növényi szövetet eldörzsöltük, a finom port nitrogénben hűtött Eppendorf csövekbe tettük (max. 500 μ l). Az RNS-t a mintákból TES puffer (1:2:1 arányú 2 M Tris-HCl, pH = 8.0 : 0.5 M EDTA, pH = 8.0 : 20% SDS) és azonos térfogatú fenol/kloroform/izoamil-alkohol oldat segítségével extraháltuk ki. Centrifugálás követően a fázisok szétvááltak, az RNS-t a vizes fázisból a vizes fázis térfogatával megegyező térfogatú,

8M-os litium-klorid oldattal csaptuk ki (egy éjszakán át). A keletkezett csapadékot feloldottuk RN-áz mentes vízben, majd az RNS-t ismét kicsaptuk a vizes fázis térfogatához képest egytized térfogatú, 3 M-os nátrium-acetát (pH = 4,8), valamint háromszoros térfogatú, 96 %-os etanol segítségével, egy éjszakán át -20°C-on. A csapadékot ezután 70 %-os etanollal mostuk, majd újra feloldottuk RN-áz mentes vízben. A továbbiakban Czechowski és mtsai (2005) módszere alapján haladtunk. Egyszálú cDNS-t szintetizáltattunk RevertAid reverz transzkriptáz enzimmel, oligo-dT primerek alkalmazásával (Fermentas). Real-time PCR reakciókat futtattunk Fast-Plus EvaGreen, qPCR Master Mix (Biotium) alkalmazásával, Bio-Rad iCycler Real-Time PCR készüléken. A hőmérséklet program a következő volt: 95°C-on 10 perc tartás, majd 45 ciklus esetében 95°C 15 s-ig, valamint 60°C 60s-ig. A következő primereket használtuk az Arabidopsisban megtalálható GLDH enzim (AB042279) vizsgálatához: FW 5' – CCCAGTGGATGCATACAACAA - 3', illetve RW 5' –GTGGTGGAGACTGGGAAGAG - 3'. Az állandóan expresszáldó, housekeeping gén vizsgálatához az YLS8, mitózis fehérje génjére (AT5G08290) tervezett FW 5'- TTACTGTTTCGGTTGTTCTCCATTT– 3', illetve RW 5'–CACTGAATCATGTTCGAAGCAAGT – 3' primereket használtuk.

2.28. A mitokondriumok intaktságának ellenőrzése (citokróm c oxidáz aktivitásának mérése)

A vizsgálatot egy membránközi tér felé néző, mitokondriális markerenzim, a citokróm c oxidáz latenciája alapján végeztük el. A vizsgálatokhoz a citokróm c-t MOPS-mannitol pufferben oldottuk fel (0.0053g/10 ml). Ezután 0.1 M-os nátrium-ditionit oldat óvatos adagolásával (kb. 40-70 µl), az abszorbancia ($\lambda=550$ nm) folyamatos figyelése mellett teljes mértékben redukáltuk. A mérés kinetikus, az abszorbancia változásából tudtuk az enzim aktivitását kiszámolni. Fél percen keresztül felvettük a redukált citokróm c oldat abszorbanciáját, majd mitokondriális preparátumot adunk hozzá (~10µl) és további 1-2 percig figyeltük az abszorbancia változását. Intakt mitokondrium esetében nem, vagy csak enyhe abszorbancia csökkenést tapasztaltunk. A mitokondrium intaktságát az enzim latenciájával jellemezhetjük, ezért a mérést elvégeztük Triton X-100-zal (detergens) kezelt mitokondriumok esetében is. A mérés során 1 ml citokróm c oldathoz 25 µl 1 %-os Triton X-100-at adagoltunk mérés előtt. Az enzimaktivitást a kezdeti abszorbancia csökkenésből a Lambert-Beer törvény segítségével számítottuk ki ($\varepsilon=20 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.29. Galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz aktivitás mérése

A mérés a citokróm c galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz által katalizált redukciójának nyomon követésével, spektrofotometriásan történt. 1 ml MOPS-mannitol pufferben feloldott citokróm

C oldathoz (1.5 mg/ml) 25 μ l 1%-os Triton X-100 oldatot adtunk, majd ehhez az izolált mitokondriumot (~ 5 μ l). Ezt követően felvettük az alapvonalat 550 nm-en, majd 25 μ l 0.5 M-os galaktono-1,4-lakton hozzáadásával indítottuk a reakciót. 1 perc elteltével 10 μ l 100 mM-os nátrium-azid oldatot adagoltunk. Az enzim fajlagos aktivitása, az egységnyi fehérjére jutó időegység alatt redukált citokróom C, számolható a citokróom C ϵ -jából ($\epsilon=20 \text{ mM}^{-1}$), illetve a mitokondriális frakció fehérjetartalmából.

2.30. A Foyer-Halliwell-Asada ciklus enzimeinek aktivitásvizsgálata

Az enzimek vizsgálata során a mitokondriális szuszpenziókat 2- és 5-szörös hígításban alkalmaztuk, 50 mM kálium-foszfát puffer (pH=7.8), és 0.1 V/V% Triton X-100 jelenlétében.

2.30.1. Dehidroaszorbát reduktáz aktivitásának vizsgálata

A dehidroaszorbát reduktáz (DHAR) enzim aktivitását a 265 nm-n mért abszorbancia növekedéséből határoztuk meg, amely a DHA redukálása során keletkezett, ASC termelődésének mértékét adja meg (Stahl és mtsai 1983). Az enzimaktivitást a következőképpen számítottuk: $\Delta A_{265}/\text{perc}/\text{mg}$ fehérje ($\epsilon=14,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Az 1 ml térfogatú reakcióelegy (pH=7.8) 50 mM foszfát-puffert, 0.27 mM EDTA-t, 2 mM GSH-t, valamint 100 μ l növényi extraktumot tartalmazott. A reakciót 1 mM DHA hozzáadásával indítottuk el. Az abszorbancia változását az első 90 másodperces időszak alapján számoltuk ki.

2.30.2. Monodehidroaszorbát reduktáz aktivitásának vizsgálata

A monodehidroaszorbát reduktáz (MDHAR) enzim aktivitását a 340 nm-en mért abszorbancia csökkenéséből számítottuk ki, amely a NADH oxidációjának volt köszönhető (Nakano és mtsai 1981). Az 1 ml térfogatú reakcióelegy (pH=7.8) 50 mM foszfát-puffert, 0.2 mM EDTA-t, 1 mM NADH-t, 0.25 egység aszkorbát oxidázt, valamint 100 μ l növényi extraktumot tartalmazott. A reakciót 1 mM Asc hozzáadásával indítottuk el. Az abszorbancia változását az első 90 másodperces időszak alapján számoltuk ki ($\epsilon=6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.30.3. Aszkorbát-peroxidáz aktivitásának vizsgálata

Az aszkorbát-peroxidáz (APX) enzim aktivitását a 290 nm-n mért abszorbancia csökkenéséből számítottuk, amely a hidrogén-peroxid adagolása után bekövetkező aszkorbát fogyásnak köszönhető (Nakano és mtsai 1981). Az 1 ml térfogatú reakcióelegy (pH=7.8) 50 mM foszfát-puffert, 0.2 mM EDTA-t, valamint 100 µl növényi extraktumot tartalmazott. A reakciót 1 mM aszkorbát jelenlétében 0.1 mM H₂O₂ hozzáadásával indítottuk el. Az abszorbancia változását az első 90 másodperces időszak alapján számoltuk ki ($\epsilon=2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.30.4. Glutation-reduktáz aktivitásának vizsgálata

A glutation-reduktáz (GR) enzim aktivitását a 412 nm-n mért abszorbancia növekedéséből határoztuk meg (Smith és mtsai 1988). A reakciók során a glutation reduktáz (GR) NADPH terhére az oxidált glutationt (GSSG) glutationná (GSH) redukálja. A keletkezett glutation és az 5,5'-ditio-bisz-2-nitro-benzoésav (DTNB) reakciójában ezután 2-nitro-5-tiobenzoésav (TNB) keletkezik, amelynek abszorbanciája 412 nm-en mérhető ($\epsilon=13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A mintákból 50 µl-t kimértünk, és 100 µl reagens mix-szel reagáltattuk. A reagens mix pH=7.5-es foszfát pufferből (100 mM, 950 µl), DTNB-ből (22,5 mM, 10 µl), NADPH-ből (1 mM, 30 µl) állt. A reakció 10 µl, 20 mM GSSG hozzáadásával indult. Az abszorbancia változását az első 90 másodperces időszak alapján számoltuk ki.

2.31. Fehérjekoncentráció meghatározása

A minták fehérjetartalmának mérését Comassie Protein Assay kittel, a gyártó utasításai alapján végeztük. A kalibrációs egyenes felvételéhez szarvasmarha szérum albumin fehérje különböző koncentrációjú (0.025- 2 mg/ml) oldatait használtuk. A minták 5 µl-éhez 250 µl Comassie reagenst adtunk, majd 10 perc inkubálás után, fotométerrel 595 nm-en mértük az abszorbanciájukat. A kalibrációs pontokra illesztett egyenes egyenletének felhasználásával a minták fehérjetartalma kiszámítható volt.

2.32. A mitokondriális légzési komplexek gátlása

A különböző mitokondriális légzési komplexek blokkolása céljából a HepG2 sejteket 24 óráig inkubáltuk komplett tápközegben, amit 100 µg/ml nátrium-piruváttal, 50 µg/ml uridinnal és az adott légzési komplex megfelelő gátlószerével egészítettünk ki. A következő gátlószereket és koncentrációkat alkalmaztuk: 0.025 µM rotenont a KOMPLEX I, 200 µM teonil-trifluoroacetont (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 kezelt sejtek életképességét tripánkék festéssel ellenőriztük; a kezelések során az elpusztult sejtek aránya minden esetben 5 % alatt maradt. Az inhibitor-kezelések eredményességét a sejtek légzési oxigén felvételének Clark-típusú elektróddal (Hansatech Instruments) történő mérése alapján igazoltuk.

2.33. A mitokondriális oxidatív folding enzimek expressziójának meghatározása Western blot technikával

A sejteket a lemezekekről felszuszpendáltuk, ülepítettük, majd lízis puffer (150 mM NaCl; 1 % NP40; 0.1 % SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 8) segítségével feltártuk. A homogenizált mintákat előbb 30 percig 4 °C-on inkubáltuk, majd 14 000 g-n centrifugáltuk 15 percig 4 °C-on, hogy a sejtörmeléket (pellet) elválasszuk a fehérje frakciótól (felülúszó). A fehérje koncentrációkat Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg a gyártói protokollnak megfelelően.

A fehérje mintákból 50 µg-os mennyiségeket vittünk fel 15 %-os poliakrilamid gélre, redukáló körülményeket alkalmazva. A méret szerint elválasztott fehérjéket ezután a gélről 0.45 µm pórusátmérőjű nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A műveletekhez Cleaver típusú elektroforézis és Western blot készüléket használtunk (Cleaver Scientific). Miután Ponceau-festéssel ellenőriztük a fehérjeminták mennyiségi egyenlőségét, a membrán szabadon maradt kötőhelyeit 2 órán keresztül folyamatos himbáztatva blokkoltuk telítő oldat (5 % zsírszegény tejpor TBS-Tween-ben (0.05 M Tris; 0.15 M NaCl; 0.05 % Tween-20) feloldva) segítségével. A blokkolás után a membránokat 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk a megfelelő elsődleges antitesttel, melyet telítő oldatban vettünk fel. Ezután a membránokat 1 órán át HRP-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ECL reagensbe áztattuk őket, hogy fényérzékeny filmen (AGFA Healthcare) detektálható jelet kapjunk.

2.34. Az ALR és a CYP2E1 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, a CYP2E1 és a háztartási génként alkalmazott 18S rRNS, illetve GAPDH RNS transzkriptumainak mennyiségi elemzését PikoReal (Thermo Scientific) real-time PCR készülék és Sensifast SYBR No-ROX Kit (Bioline London) felhasználásával végeztük. Az ALR cDNS meghatározásához a FW 5'-CACAATGAAGTGAACCGCAAG-3' és REV 5'-CACCCAACCTGAGACACAACAG-3' primer párt, a 18S rRNS-ről átírt cDNS-hez pedig a FW 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3' és REV 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' primer párt használtuk.

A CYP2E1 cDNS meghatározásához a FW 5'-GTTGCCTTGCTTGTCTGGATCG-3' és REV 5'-CTTGTGGTTCAGTAGCACCTCC-3' primer párt, a GAPDH-ról átírt cDNS-hez pedig a FW 5'-TCCACTCACGGCAAATTCAACG-3' és REV 5'-TAGACTCCACGACATACTCAGC-3' primer párt használtuk.

2.35. C-vitamin transzporterek mitokondriális lokalizációjának *in silico* vizsgálata

A GLUT és SVCT transzport fehérje családok, valamint négy különböző, egyértelműen mitokondriálisan lokalizálódó transzport 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>).

Az ismert mitokondriális célszekvenciák általában 6-60 aminosav hosszúságú N-terminálisan elhelyezkedő fehérjerészletek, továbbá a GLUT1-5 és 7 transzportereket érintő korábbi egyetlen *in silico* tanulmány 60 aminosav hosszúságú részletet vizsgált (KC 2005 és mtsai), a transzporterek elhelyezkedésének analizéséhez, ezért mi is a fehérjék első 60 aminosavas részletét használtuk elemzéseinkhez.

A fehérjék (GLUT1-14; SVCT1,2) szubcelluláris lokalizációját összesen nyolc különböző predikciós eszközzel elemeztük:

Target P: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> (Emanuelsson és mtsai 2000)

Mitoprot II: <http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html> (Claros és mtsai 1996)

Predotar: <https://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html> (Small és mtsai 2004)

Psort II: <http://psort.hgc.jp/form2.html> (Nakai és mtsai 1999)

MultiLoc/TargetLoc: <http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/> (Hoglund és mtsai 2006)

ngLOC: <http://genome.unmc.edu/ngLOC/index.html> (King és mtsai 2012)

YLoc: <http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi> (Briesemeister és mtsai 2010)

CELLO v2.5: <http://cello.life.nctu.edu.tw/> (Yu és mtsai 2006)

Az elemzéseket 2014 áprilisában és augusztusában végeztük, 2014 augusztusában az összes eredményt újra ellenőriztük és megerősítettük.

2.36. Élelmiszer minták preparálása C-vitamin meghatározási módszerek teszteléséhez

Összesen négyféle, táplálkozásban fontos szerepet játszó zöldség és gyümölcs C-vitamintartalmát elemeztük, hogy a különböző aszkorbinsav 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. A felülúszókat ezt követően kis részletekben felhasználásukig - 80 °C-on tároltuk.

2.37. C-vitamin meghatározása α,α' -dipiridiles módszerrel

75 μ l 85 %-os ortofoszforsavat, 750 μ l 1 %-os α,α' -dipiridilt és 300 μ l 1 %-os FeCl_3 oldatot adtunk 300 μ l aszkorbinsavat tartalmazó mintához mikrocentrifuga-csőben. Az így elkészített mintákat 60 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 5 percig 16 500 g-n centrifugáltuk. Ezt követően a felülúszókból 350 μ l-es mennyiségeket mikrotiter lemezbe pipettáztunk. Minden mintából 3-3 párhuzamos bemérést végeztünk. A minták abszorbanciáját 525 nm hullámhosszúságon Thermo Multiskan Go spektrofotometriás lemezolvasóval határoztuk meg.

A mért vak oldatok az aszkorbinsav tartalmú minta helyett ugyanolyan térfogatú 5 %-os ecetsavat tartalmaztak. Minden minta mellé kontrollt is készítettünk, hogy a mért értékeket korrigálhassuk a mintához tartozó háttér értékével. A kontroll oldatok készítésénél az α,α' -dipiridil helyett csak az oldószereként használt abszolút etanolt adtuk a mintákhoz.

2.38. C-vitamin meghatározása aszkorbát oxidáz enzim módszerrel

300 µl 4,6 mM OPDA oldatot és 15 µl 10 U/ml aszkorbinsav oxidáz enzimet 0.1 M foszfát pufferben feloldva 37.5 µl C-vitamin tartalmú mintához adtunk mikrotiter lemezen. Félperces rázás, és 10 perc szobahőmérsékleten történő inkubációt követően 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.

A vak oldatok elkészítésénél a C-vitamin tartalmú mintát 5 %-os ecetsavra cseréltük. A mintákkal párhuzamosan kontrollokat is mértünk, amelyekhez az aszkorbinsav-oxidáz enzim oldat helyett foszfát puffert adagoltunk.

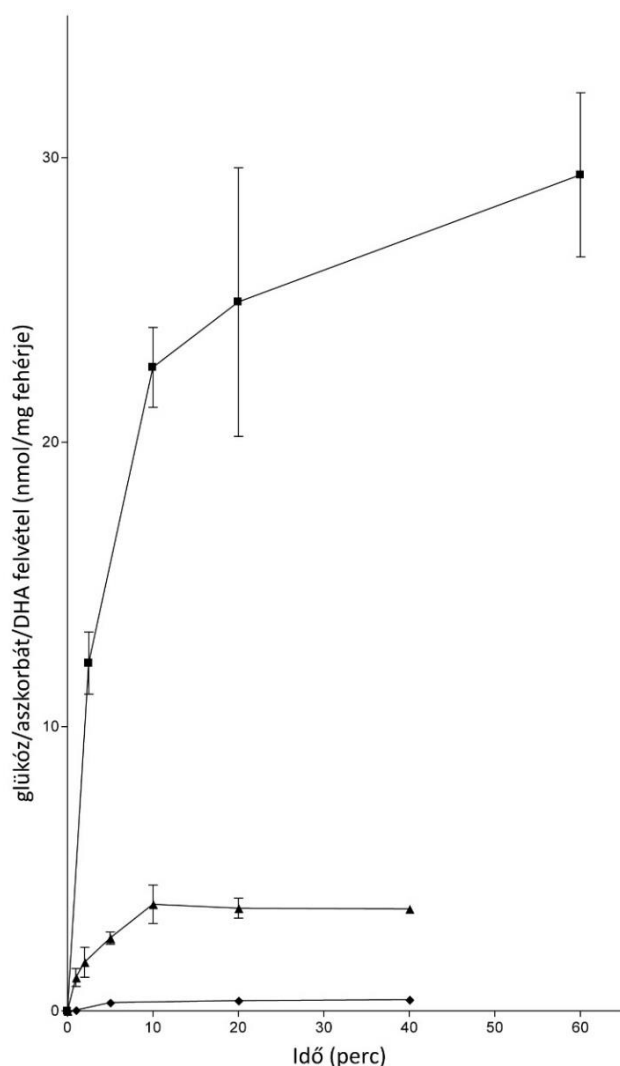
Minden standardból, mintából és kontrollból három párhuzamos mérést végeztünk mindkét detektálási módszerrel kivitelezve.

Az összecs C-vitmin mérési módszert összevetve megállapítottuk, hogy a viszonylag kis mintaszám miatt számunkra a HPLC-vel történő C-vitamin meghatározás (2.16. fejezet) a legmegfelelőbb és a továbbiakban ezt használtuk a minták C-vitamin tartalmának meghatározására.

3. Eredmények és értékelésük

3.1. Facilitált glükóz és dehidroaskorbát transzport a növényi mitokondriumban

A C-vitamin bioszintézis, utolsó, mitokondriumhoz kötött lépését katalizáló GLDH enzim topológiája ismeretlen volt kísérleteink kezdetekor. A két orientációs lehetőség, két különböző transzportrendszer meglétét jelentette, amennyiben aktív helye a mitokondriális mátrix felé néz az egyrészt egy L-galaktono-1,4-lakton, másrészt egy askorbát transzporter létezését veti fel a mitokondrium belső membránjában, hiszen az enzim szubsztrátjának a mátrixba kell jutnia, termékének pedig ki kell onnan kerülnie. Specifikus askorbát transzporterre akkor is szükség van, ha az aktív hely a két membrán közti tér felé néz, hiszen az askorbinsav jelenlétét több más sejtservecskével egyetemben a mitokondriumban is leírták (Jimenez és mtsai 1998, Smirnov 2000b).



A mitokondriális askorbát regenerációs gépezet működéséhez is elengedhetetlen egy mitokondriális belső membránban található DHA/askorbát transzporter, hiszen az oxidált formának (DHA) a redukció helyszínére a mitokondriális mátrixba kell jutnia.

A fenti háttérismereteket követően kezdtük el a feltételezett mitokondriális askorbát/DHA transzporter felderítését, karakterizálását.

A kísérletek első körében BY2 dohány sejtekből frissen izolált mitokondriumokat inkubáltunk radioaktívan (^{14}C) jelölt askorbáttal, illetve DHA-tal, majd megvizsgáltuk, a jelölt anyaggal a sejtservecskékbe jutott radioaktivitás mértékét. A mitokondrium mind a két anyagot felvette és 5-10 perc alatt beállt a felvétel állandósult állapota (10. ábra).

10. ábra Askorbát (◆), dehidroaskorbát (▲) és glükóz (■) felvétel a növényi mitokondriumban

A redukált és az oxidált forma felvételét összehasonlítva megállapíthattuk, hogy a DHA felvétele preferált. Mitokondriális koncentrációja, a felvétel állandósult állapotában, messze meghaladja az extramitokondriális koncentrációt (1 ml/mg fehérje mitokondriális térfogattal számolva (Li és mtsai 2001)). Ezzel szemben, aszkorbát adagolását követően a mitokondriális koncentráció nem éri el az extramitokondriális szintet (10. ábra). Az aszkorbát felvétel oxidálószerekkel, mint például kálium-ferricianiddal (10 mM), vagy aszkorbát oxidázzal (250 U/ml) stimulálható volt. Mind az aszkorbát, mind a DHA felvétel hőmérsékletfüggést mutatott. A kísérleteket 4°C-on elvégezve a felvétel nagyjából 50%-kal lecsökkent.

A transzport(er) kinetikai paramétereinek megállapítása céljából 0.1-40 mM-os extramitokondriális aszkorbát koncentrációtartományban vizsgáltuk meg a felvétel mértékét. DHA esetében csak jóval szűkebb koncentrációtartományban tudtuk a méréseket elvégezni, mivel a DHA fiziológiás pH értéken igen gyorsan elbomlik, a fiziológiásnál jóval savasabb pH értéket pedig a mitokondriális frakció nem tolerálja. A két eltérő redox forma, eltérő kinetikai karakterisztikát mutatott. A kinetikai paraméterek Lineweaver–Burk kalkulációja szerint a DHA felvétel nagyobb affinitású és kapacitású, mint az aszkorbáté (1. táblázat).

1. táblázat A mitokondriális aszkorbát, dehidroaszkorbát glukóz felvétel kinetikai paramétere

Ligand	K_M (mM)	V_{max} (nmol/min/mg protein)
Aszkorbát	36.1	2.3
Dehidroaszkorbát	6.3	3.3
Glükóz	9.2	28.1

Az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy növényi mitokondriumok esetében az oxidált forma, a DHA transzportja preferált. Itt érdemes megjegyeznünk, hogy a növényi sejtek citoplazmájában az aszkorbát elérheti a 20 mM-os értéket, illetve a kloroplaszt aszkorbát transzporterének K_m értéke is a 18-40 mM-os nagyságrendbe esik (Foyer és Lelandais 1996, Szarka és mtsai 2013b). Ugyanakkor azt sem zárhatjuk ki, hogy kizárólag az oxidált forma transzportálódik és a redukált forma esetében tapasztalható intramitokondriális radioaktivitás növekedés az aszkorbát oxidálódásával képződött DHA felvétel következménye. Ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelésünk, amely szerint az oxidálószerek (ferricianid, aszkorbát oxidáz) növelték az aszkorbát felvételét. Hasonló eredményekről számoltak be máj mitokondrium (Ingebretsen és mtsai 1982) és mikroszóma (Csala és mtsai 2000), valamint bab plazmamembrán vezikulumok (Horemans és mtsai 1997), illetve BY2 protoplaszt (Horemans és mtsai 1998) esetében. Éppen ezért a redukált formára, az aszkorbátra specifikus mitokondriális transzporter létezése megkérdőjelezhető.

3.1.1. A mitokondriális aszkorbát/DHA transzport inhibitor profilja

Tekintve, hogy a 4,4'-Diizotiociano-2,2'-stilbén diszulfonsav (DIDS) és az N-etilmaleinimid (NEM) gátolja az emlős endoplazmás retikulum membránon keresztüli aszkorbát transzportot (Bánhegyi és mtsai 1998) megvizsgáltuk ezen anyagok hatását a mitokondriális aszkorbát/DHA transzportra. Ezeken az anyagokon kívül szintén vizsgálat tárgyává tettük a DHA-ot az emlős plazma (Vera és mtsai 1993, Rumsey és mtsai 1997, 2000, Lee és mtsai 2010, Corpe és mtsai 2013, Mardones és mtsai 2011), illetve endoplazmás retikulum membránon keresztül szállító GLUT transzporterek elsődleges ligandjának, a glükóznak, illetve gátlószerüknek, a genisteinnek hatását (Vera és mtsai 1996). Így számos olyan anyag hatását megvizsgáltuk, amelyekről leírták, hogy növényi, illetve állati sejtekben gátolják az aszkorbát és/vagy DHA transzportját (2. táblázat).

2. táblázat Különböző anyagok hatása a mitokondriális glükóz és DHA felvételre

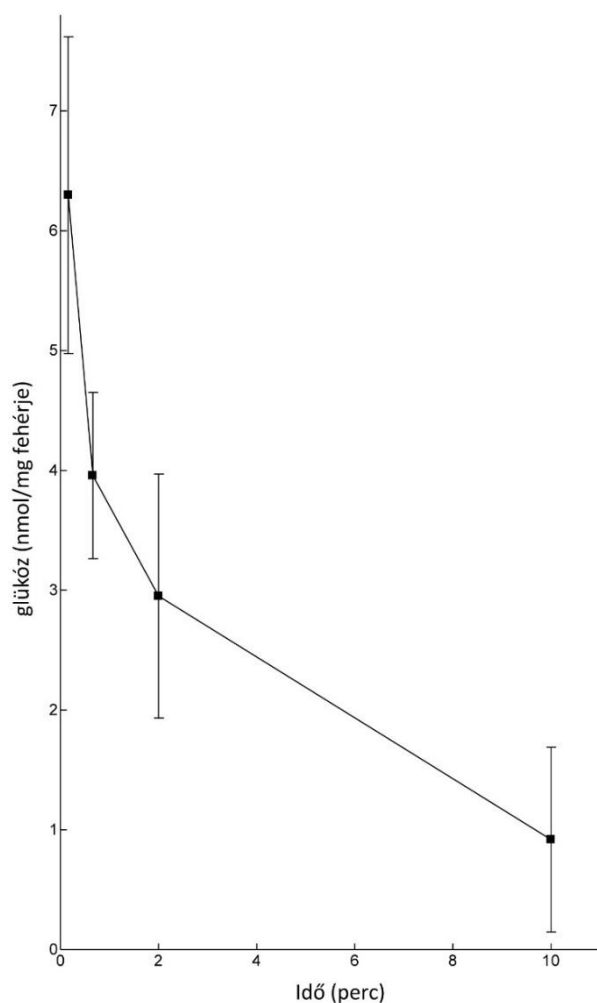
Hozzáadott anyag	DHA	Glükóz
	felvétel (nmol/min/mg protein)	
Kontroll	0.44 ± 0.11 (9)	1.94 ± 0.32 (12)
N-etilmaleimid (5 mM)	0.41 ± 0.15 (4)	1.81 ± 0.35 (3)
DIDS (0.5 mM)	0.41 ± 0.03 (3)	NM
D-glükóz (25 mM)	0.17 ± 0.05 (5)*	NM
aszkorbát (30 mM)	NM	1.11 ± 0.22 (3)*
genistein (0.25mM)	0.21 ± 0.01 (5)*	0.87 ± 0.05 (6)*
3-O-metil-glükóz (40 mM)	NM	1.39 ± 0.21 (3)*
D-mannóz (40 mM)	NM	1.28 ± 0.14 (3)*
L-glükóz (40 mM)	NM	2.03 ± 0.37 (3)
Etilidén-glükóz (40 mM)	NM	1.73 ± 0.26 (3)
2-deoxiglükóz (40 mM)	NM	1.68 ± 0.04 (3)
D-galaktóz (40 mM)	NM	1.91 ± 0.35 (3)
phloretin (0.25 mM)	NM	1.83 ± 0.21 (5)
phlorizin (0.25 mM)	NM	2.16 ± 0.64 (5)
Cytochalasin B (0.25 mM)	NM	1.17 ± 0.17 (5)*

NM: nem meghatározott, * szignifikáns a kontrollhoz képest, $p < 0.05$

A nem specifikus anion transzport inhibitor, DIDS és NEM, nem gyakorolt hatást a DHA mitokondriális felvételére (2. táblázat). Ugyanakkor a glükóz és a genistein hatásos gátlószereknek bizonyult (2. táblázat). A genistein az aszkorbát transzport esetében is hatásos gátlószerként viselkedett, azonban a DIDS és a NEM ez esetben sem mutatott gátlást.

3.1.2. Mitokondriális glükóz transzport

A DHA transzportra gyakorolt gátló hatása miatt megvizsgáltuk a glükóz mitokondriális belső membránon keresztüli transzportját. A radioaktívan jelölt glükóz (2 mM) felvétele hozzávetőleg 25 perc alatt elérte maximumát (10. ábra). A glükóz transzport kétirányúnak bizonyult. A mitokondriumokat 90 perces ^{14}C jelölt glükózzal történt feltöltésüket követően glükóz mentes pufferrel 50-szeresére hígítva a jelölt (glükóz) molekulák gyors kiáramlását figyelhettük meg (11. ábra).



11. ábra A glükóz efflux transzportja, előzetesen ^{14}C -glükózzal feltöltött mitokondriumokból

A glükóz felvétel telíthető Michaelis–Menten kinetikát mutatott az 1-es táblázatban látható kinetikai paraméterekkel. Az aszkorbát és DHA transzport-folyamatokhoz hasonlóan a glükóz transzport is hőmérséklet-függőnek bizonyult (1.94 nmol/min/mg protein szobahőmérsékleten vs. 1.07 nmol/min/mg fehérje 4°C-on, 2.2mM glükóz koncentrációnál 2.5 percet követően). Ez esetben is megvizsgáltuk, hogy különböző glükóz analóg és ismert glükóz transzport gátló molekulák, hogyan befolyásolják a mitokondriális glükóz transzportot. Kísérleteink során a kompetáló cukormolekulák húszszoros feleslege mellett határoztuk meg a glükóz kezdeti felvételi sebességét. A D-

mannóz és a 3-O-metil-glükóz gyenge, de statisztikailag szignifikáns gátlást mutatott, míg a többi vizsgált glükóz analóg semmilyen hatást sem gyakorolt a mitokondriális glükóz

transzportra (2. táblázat). Ismert, hogy a phloretin és a phlorizin szorosan kötik és gátolják a vörösvértest membrán glükóz transzporterét (Betz és mtsai 1975), azonban esetünkben egyik sem mutatott semmiféle hatást (2. táblázat). A glükóz transzport inhibitor cytochalasin B a mitokondriális glükóz transzport részleges, hozzávetőlegesen 30%-os gátlását okozta (2. táblázat). A mitokondriális aszkorbát/DHA transzporthoz hasonlóan a genistein a glükóz transzportjára is markáns gátló hatást gyakorolt (2. táblázat).

Mind a DHA, mind a glükóz transzportja hőmérséklet és időfüggést mutatott, kinetikai vizsgálatuk során telíthetőnek bizonyult, specifikus gátlószerekkel gátolható. Mindezen megfigyelések egyértelműen arra utalnak, hogy a transzportfolyamatok fehérje mediáltak.

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 megfigyelt transzportfolyamatok molekuláris háttere nem ismert. Könnyen elképzelhető, hogy a szóban forgó transzporter a kloroplaszt glükóz transzlokátor (Weber és mtsai 2000), esetleg az emlős glükóz, DHA transzportban résztvevő, GLUT család (Vera és mtsai 1993) rokona. Az igazsághoz azonban hozzátartozik, hogy esetünkben a konvencionális glükóz transzport gátló phloretin és phlorizin, illetve a glükóz analógok jelentős része semmiféle hatást sem mutatott, míg a cytochalasin B, a 3-O-metil glükóz és a mannóz valamelyest gátolta a glükóz transzportot.

3.1.3. A mitokondriális légzés hatása a DHA és glükóz transzportra

A mitokondriális transzportfolyamatok számos esetben befolyásolhatók a mitokondriális membránpotenciál megváltoztatásával. Ennek vizsgálata érdekében a mitokondriális DHA és glükóz transzportot nyomon követtük légzési szubsztrát (szukcinát), gátlószer (KCN) és szétkapcsolószer (2,4-dinitrofenol) jelenlétében.

A KCN és a 2,4-dinitrofenol nem befolyásolta sem a glükóz, sem a DHA mitokondriális felvételét, a szukcinát az alkalmazott koncentrációban mérsékelten gátolta mindkét anyag transzportját (3. táblázat). Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a vizsgált transzportfolyamatok függetlenek a mitokondriális légzéstől és membránpotenciáltól.

3. táblázat Légzési szubsztrát, gátlószer és szétkapcsolószer hatása a mitokondriális glükóz és DHA transzportra

Hozzáadott anyag	DHA	Glükóz
	Felvétel (nmol/min/mg protein)	
Kontroll	0.41 ± 0.11 (3)	1.46 ± 0.20 (3)
Szukcinát 5 mM)	0.29 ± 0.16 (3)*	0.83 ± 0.10 (3)*
KCN (0.2 mM)	0.49 ± 0.12 (3)	1.66 ± 0.29 (3)
2,4-dinitrofenol (0.1 mM)	0.34 ± 0.11 (3)	1.77 ± 0.27 (3)

* szignifikáns a kontrollhoz képest, $p < 0.05$

3.1.4. Az aszkorbát, DHA és glükóz felvétele mitoplasztok esetében

A transzportméréseket elvégeztük BY2 dohány mitokondriumokból készült mitoplasztok esetében is. Az így mért transzport aktivitások mind aszkorbát, mind DHA esetében a mitokondriális transzport aktivitásokhoz hasonlóak voltak, míg glükóz esetében enyhe csökkenést tapasztaltunk (4. táblázat). A tény, amely szerint a transzportfolyamatok mitoplasztok esetében ugyanúgy fennállnak, mint mitokondriumok esetében, egyértelműen arra utalnak, hogy a transzporter(ek) a mitokondriális belső membránban foglalnak helyet.

4. táblázat Aszkorbát, DHA és glükóz felvétele BY2 dohány mitoplasztokba

Ligand	Felvétel (nmol/min/mg protein)
Aszkorbát	0.13 ± 0.02 (3)
DHA	0.34 ± 0.07 (3)
Glükóz	1.02 ± 0.16 (3)

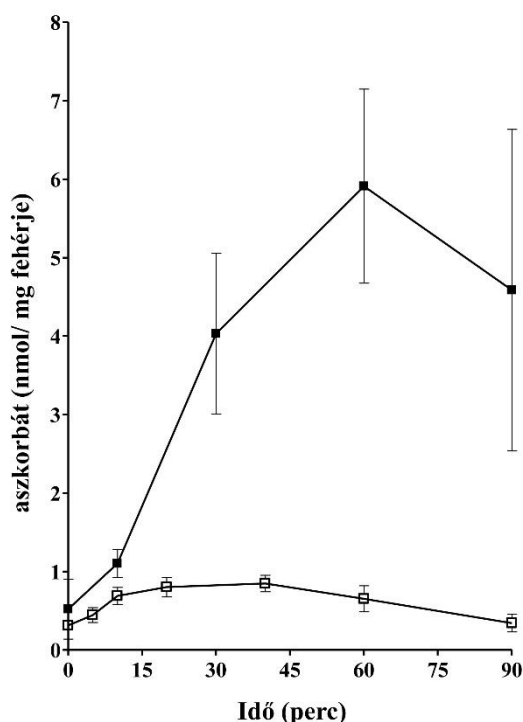
Tekintve, hogy az APX aktivitás következtében a C-vitamin oxidált formája a DHA a két membrán közötti térben keletkezik (Chew és mtsai 2003) (1.1.4. fejezet), az általunk leírt DHA transzporterrel keresztül bejuthat redukciójának helyszínére a mitokondriális mátrixba (Chew és mtsai 2003, Jimenez és mtsai 1997, 1998). Így a transzportált DHA hozzájárulhat a növényi mitokondrium antioxidáns védelméhez (Szarka és mtsai 2012). A DHA transzport tehát nélkülözhetetlennek tűnő, kiemelkedő fontossággal bíró folyamat. A mitokondriális glükóz

transzport szerepe már jóval kevésbé egyértelmű. A transzporter leírásának időpontjában sem glükóz termelő, sem glükózt igénylő, fogyasztó folyamatot nem ismertünk a növényi mitokondriumban. A folyamat hátterére azonban 4 évvel később szintén kutatócsoportunk jött rá, amelyet egy későbbi fejezetben ismertetünk.

3.2. A mitokondriális elektrontranszferhez kapcsolt DHA redukció növényi sejtekben

A fent ismertetett DHA transzporter tehát a mitokondriális mátrixba szállíthatja a döntően, a korábban ismertetett APX aktivitás révén a membránközi térben keletkező DHA-ot. A mátrixban működő aszkorbát-glutation ciklus a redukált glutation terhére végzi a DHA aszkorbáttá történő redukcióját (Foyer és Halliwell 1976, Jimenez és mtsai 1997, Szarka és mtsai 2012). Az ezredfordulót követően állati sejtekből származó mitokondriumok esetében felmerült, hogy a mitokondriális elektrontranszfer láncról származó elektronok is részt vehetnek a mitokondriális DHA redukcióban (Li és mtsai 2001, 2002). A növényi mitokondriális aszkorbát anyagcseréről alkotott képünk teljessé tétele végett mitokondriális elektrontranszfer lánc szubsztrátok és inhibitorok segítségével kerestük a választ arra a kérdésre, hogy hasonló jelenség megfigyelhető-e növényi mitokondriumok esetében is?

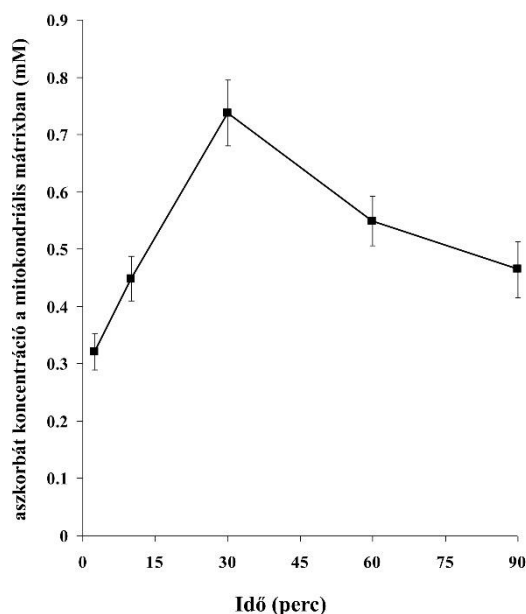
Kísérleteink elején egyértelmű választ szerettünk volna kapni a kérdésre, ezért BY2 dohány sejtekből izolált mitokondriumokat DHA-tal együtt inkubáltunk szukcinát, mint légzési szubsztrát jelenlétében, illetve távollétében miközben folyamatosan figyeltük a redukált forma, az aszkorbát szintjét, képződését. A BY2 mitokondriumok egyértelműen képesek voltak, DHA adagolását követően, szignifikáns redukált aszkorbát szint fenntartására (12. ábra). Az aszkorbát koncentrációja 20-30 perc alatt érte el maximumát. Szukcinát jelenlétében (5 mM) az aszkorbinsav megjelenésének mértéke drasztikus mértékben fokozódott (12. ábra). Az aszkorbát képződés első emelkedő szakasza pedig megnyúlt, ebben az esetben az aszkorbát szint 1 óra elteltével érte el maximális értékét (12. ábra). Ez a maximális érték pedig 7-szeresére emelkedett a szukcinát távollétében mérthez képest. Ezek az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a respirációs elektrontranszfer lánc részt vesz a DHA redukálásában.



12. ábra DHA adagolás kiváltotta aszkorbát produkció növényi mitokondriumban szukcinát, mint légzési szubsztrát távollétében (□), illetve jelenlétében (■)

A kísérletek következő fázisában külön-külön határoztuk meg a mátrix és a membrán közötti tér aszkorbát koncentrációját. A mátrixban mérhető aszkorbát koncentráció a patkány vázizomsejtekből származó mitokondriumokhoz (Li és mtsai 2001) hasonlóan elérte a millimolos koncentrációtartományt (13. ábra) és hasonló időbeli lefutást mutatott, mint teljes mitokondrium esetén (12. ábra).

Az extramitokondriális (membránközi tér) aszkorbát koncentráció ettől jóval alacsonyabbnak bizonyult és 30 perc elteltével folyamatosan csökkent. Az 1 mM-os DHA koncentráció (amellyel a méréseket végeztük) minden bizonnyal a DHA redukciós enzim(ek) K_m értéke felett volt, mivel a DHA koncentrációt 2 mM-ra emelve csak igen csekély hatást tudtunk elérni (0.45 ± 0.04 mM vs. 0.55 ± 0.01 mM, 10 perc inkubációt követően).



13. ábra DHA adagolás kiváltotta aszkorbát produkció növényi mitokondriális mátrixban

Annak érdekében, hogy fényt derítsünk a mitokondriális elektron transzfer lánc szerepére a DHA redukcióban, különböző légzési lánc szubsztrátok és gátlók hatását vizsgáltuk meg (5. táblázat). A komplex I szubsztrát malát, valamint a komplex I gátló rotenon nem befolyásolta a dehidroaszkorbátból történő aszkorbát képződést. Az előző esethez hasonlóan a komplex III inhibitor antimycin A, az alternatív oxidáz inhibitor szalicilhidroxamin sav (SHAM) és a szétkapcsolószer 2,4-dinitrofenol sem gyakorolt hatást a

mitokondriális aszkorbát keletkezésére. Mindezek alapján a komplex I és III szerepe nem valószínű a redukciós folyamatban, ahogyan az alternatív oxidáz is kizárható a jelöltek sorából.

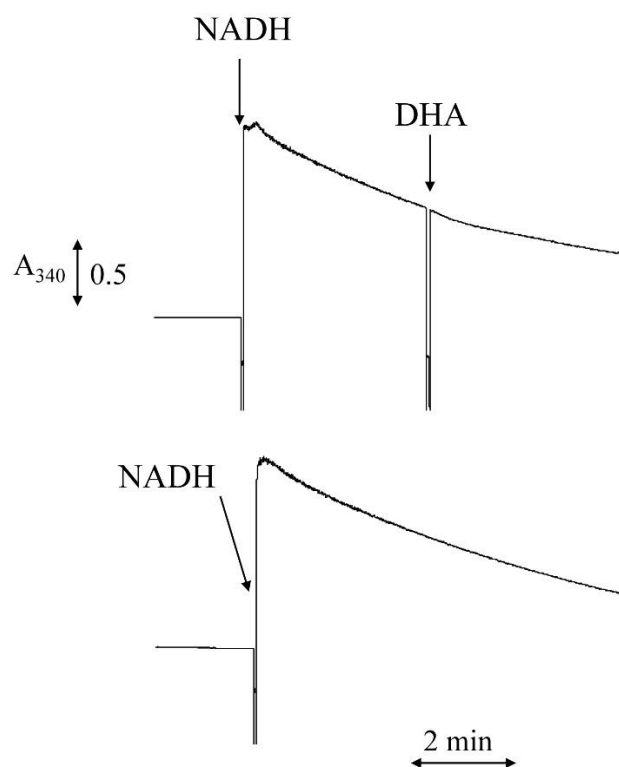
5. táblázat Különböző anyagok hatása a DHA redukcióra kontroll és szukcinát táplált mitokondrium esetében

Hozzáadott anyag	DHA (1 mM) hozzáadásával		DHA hozzáadása nélkül	
	szukcinát nélkül	5 mM szukcináttal	szukcinát nélkül	5 mM szukcináttal
Kontroll	0.653 ± 0.042 (12)	1.044 ± 0.076 (12)#	0.213 ± 0.043 (3)	0.227 ± 0.021 (3)
Antimycin A (10 µM)	0.712 ± 0.026 (6)	1.011 ± 0.164 (3)#	N.D.	N.D.
Rotenone (10 µM)	0.705 ± 0.011 (6)	0.953 ± 0.047 (3)#	N.D.	N.D.
KCN (1 mM)	1.937 ± 0.054 (6)*	2.332 ± 0.022 (3)*#	0.247 ± 0.083 (3)	0.244 ± 0.042 (3)
Glükóz (100 mM)	0.555 ± 0.011 (6)*	0.750 ± 0.139 (3)*	N.D.	N.D.
2,4-Dinitrofenol (0.1 mM)	0.684 ± 0.067(3)	0.850 ± 0.049 (3)	N.D.	N.D.
Malát (10 mM)	0.723 ± 0.078 (3)	N.D.	N.D.	N.D.
Malonát (5 mM)	0.577 ± 0.066 (3)	0.798 ± 0.106 (9)*#	0.208 ± 0.026 (3)	0.195 ± 0.036 (3)
SHAM (2 mM)	0.705 ± 0.120 (3)	1.173 ± 0.044 (3)#	N.D.	N.D.
SHAM (2 mM) + KCN (1 mM)	2.018 ± 0.122 (3)*	1.887 ± 0.220 (3)*	N.D.	N.D.

szignifikáns a *kontrollhoz, #szukcinát mentes mintákhoz képest, $p < 0.05$

A gátlószerek hatását a légzési szubsztát szukcinát nem befolyásolta. Az előző gátlószerekkel ellentétben a szukcinát dehidrogenáz kompetitív gátlószere a malonát gyakorlatilag teljesen felfüggesztette a szukcinát függő aszkorbinsav keletkezést a mitokondriumban. Ez, a szukcinát, mint komplex II szubsztát egyértelmű hatásával egyetemben a DHA redukciójában a komplex II egyértelmű érintettségére utal. A komplex IV gátlószer KCN jelentős mértékben fokozta az aszkorbinsav felhalmozódását a mitokondriumban. Dehidroaszkorbát hozzáadása nélkül a különböző inhibitorok nem befolyásolták az alap mitokondriális aszkorbát szintet (5. táblázat). A glükóz, a mitokondriális DHA transzport gátlószere (lásd korábban 2. táblázat) mind szukcinát jelenlétében, mind távollétében gátolta a DHA adagolás kiváltotta aszkorbát képződést (5. táblázat).

Alameticinnel permeabilizált mitokondriumokon megvizsgáltuk a NADH hatását a DHA redukcióra. Az inkubációs közeghez NADH-t (0.2 mM) adtunk, majd szintjét 340 nm-en spektrofotometriásan nyomon követtük (14. ábra). Megállapítottuk, hogy a dehidroaszkorbát, nem befolyásolta a külsőlegesen hozzáadott NADH szintjét (14. ábra). Ez a megfigyelés további bizonyítékkal szolgált arra vonatkozóan, hogy sem a komplex I, sem a rotenon inszenzitív NADH dehidrogenázok (NDin(NADH) és az NDex(NADH)) nem vesznek részt a redukciós folyamatban.

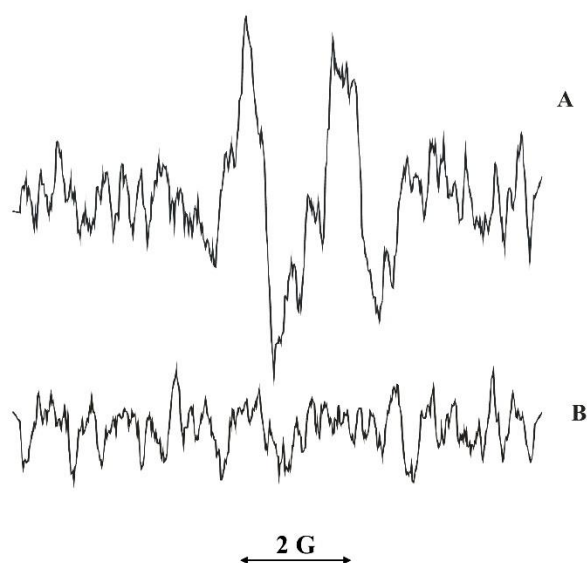


14. ábra A DHA hatása alameticinnel permeabilizált mitokondriumok NADH szintjére

A MDHA (aszkorbil gyök) megjelenését, mint a redukciós lépés lehetséges köztitermékét is meghatároztuk elektron paramágneses rezonancia (EPR) spektroszkópiával. Az 1 mM DHA-ot tartalmazó mitokondriális szuszpenzióban az aszkorbil gyök tipikus 1.8 G csatolási állandójú iker jelét tudtunk detektálni (15. ábra A panel). A MDHA jelet sem a pusztán mitokondriumot (DHA-ot nem), sem a pusztán DHA-ot

(mitokondriumot nem) tartalmazó oldatból nem tudtuk detektálni. A gyökszintet a szukcinát

nem befolyásolta, valamint 60 perces inkubációs időn keresztül végig megtartottnak bizonyult. Az aszkorbil gyök teljesen eltűnt 1 mM KCN hatására (15. ábra, B panel).



15. ábra Növényi mitokondriumok aszkorbil gyök szintje DHA jelenlétében (A), illetve DHA + KCN (mindkettő 1 mM) jelenlétében (B)

Mitokondriumokat inkubáltunk együtt aszkorbáttal (5 μ M) KCN (2 mM)

jelenlétében, illetve távollétében. Az aszkorbát oxidációját, mint az aszkorbát koncentráció csökkenését követtük nyomon. Megállapítottuk, hogy KCN távollétében a mitokondrium rendkívül gyorsan eloxidálta a hozzáadott aszkorbátot (10 perces inkubációs időt követően gyakorlatilag kimutathatatlan volt a jelenléte), ugyanakkor KCN jelenlétében az aszkorbát szint megtartottnak bizonyult (mindössze a kiindulási érték 60%-ra csökkent). Ezek a megfigyelések, illetve a DHA-tal együtt inkubált mitokondriumok esetében KCN hatására mérhető markáns aszkorbát szintnövekedés arra utalnak, hogy a DHA hozzáadását követően mérhető aszkorbil

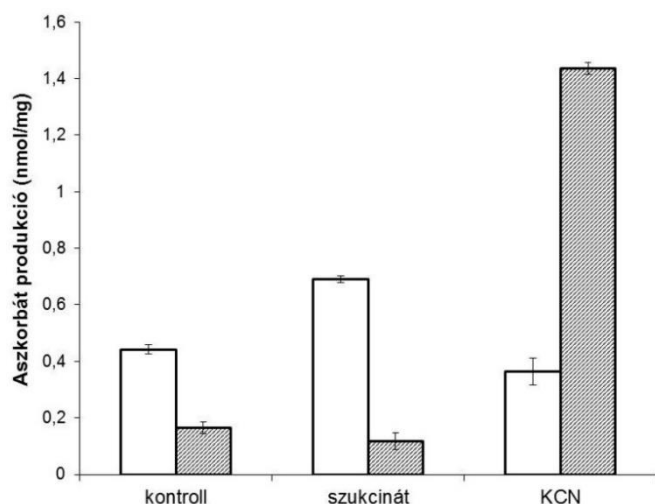
gyök nem a DHA redukciója során jön létre, hanem a redukció eredményeképp termelődött aszkorbát mitokondriális oxidációjának következménye.

Ezt követően megvizsgáltuk a szukcinát lehetséges hatását a NADH-függő MDHA reduktáz aktivitásra (MDHAR). MDHA-t generáltunk aszkorbát és aszkorbát oxidáz egyidejű NADH-val kiegészített mitokondriális szuszpenzióhoz adagolásával. A NADH-függő MDHAR aktivitását, az inkubációs közeg NADH szintjének csökkenése révén követtük nyomon mind szukcinát jelenlétében, mind távollétében. Az eredmények alapján megállapíthattuk, hogy a szukcinát nem befolyásolja a MDHAR aktivitást (6. táblázat).

6. táblázat. Szukcinát hatása a mitokondriális MDHAR aktivitására

Kezelés	Intakt ($\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ fehérje)	Permeabilizált ($\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ fehérje)	Latencia (%)
Kontroll	150 ± 4	464 ± 30	68
Szukcinát (5 mM)	146 ± 6	448 ± 27	68

Végezetül az aszkorbát mátrixban, illetve extramitokondriális térben történő megjelenését vizsgáltuk meg a legpotensebb aktivátorok (szukcinát, KCN) jelenlétében. A két anyag eltérő aszkorbát eloszlást eredményezett (16. ábra). Az aszkorbát mátrixban mérhető koncentrációját nem befolyásolta a KCN, azonban 50%-kal megemelte a szukcinát kezelés (16. ábra).



16. ábra Szukcinát és KCN hatása a mitokondriális mátrix (üres terület) és az extramitokondriális tér (sraffozott terület) DHA kiváltotta aszkorbát produkciójára (koncentrációjára).

Pontosan ellenkező eredményeket kaptunk az extramitokondriális aszkorbát szint esetében. A szukcinát

nem befolyásolta, azonban KCN kezelés hatására az aszkorbát szint közel egy nagyságrenddel megemelkedett (16. ábra). Ezek a megfigyelések megerősítették korábbi sejtésünket, hogy míg

a szukcinát a (II-es komplex függő) DHA redukciót fokozza, addig a KCN az aszkorbát (két membrán közötti térben bekövetkező) oxidációját (fogyását) gátolja.

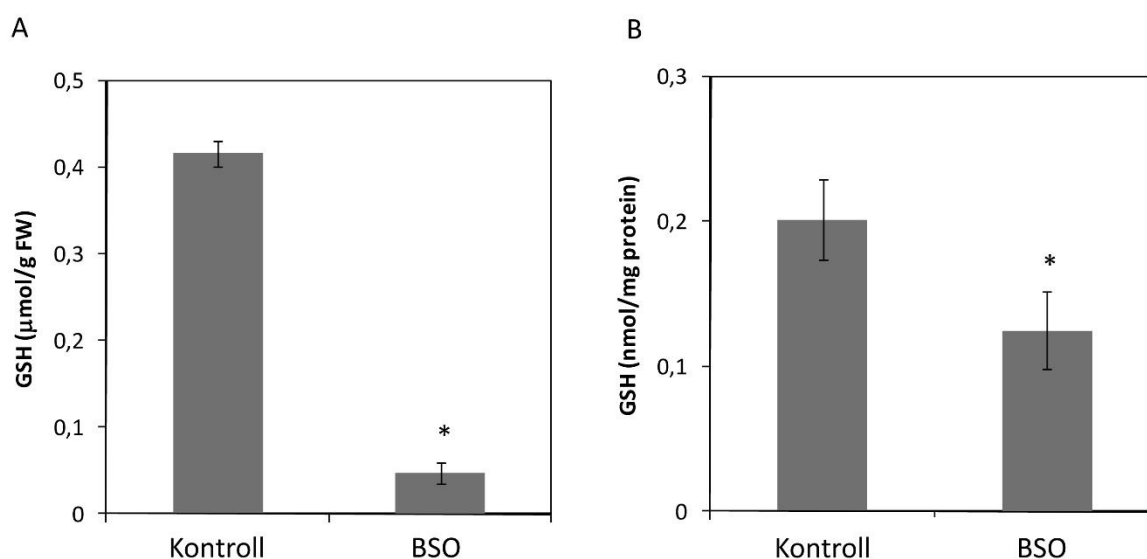
Mindezen eredményeink alapján azt valószínűsíthetjük, hogy a DHA redukciójához szükséges elektronok (részben) a szukcinátról származnak és a komplex II-n keresztül jutnak el a redukció helyszínére, amely a szukcinát dehidrogenáz és a komplex III között helyezkedik el. Korábban patkány vázizom mitokondrium esetében a DHA redukció helyszínéként a komplex III külső (membránközti tér felé néző) részét jelölték meg. Ugyanebben a tanulmányban a külsődleges NADH és malát, amelyek a komplex I számára biztosítanak elektronokat nem tudták érdemlegesen elősegíteni a DHA redukcióját, valamint mérhető aszkorbil gyök szintet eredményezni (Li és mtsai 2002). Ennek megfelelően a malát a mi vizsgálatainkban sem járult hozzá a DHA redukciójához és az aszkorbil gyök köztiterméket mi sem tudtuk detektálni. Másrészt, bár az állati eredetű mitokondriumok esetében a komplex III gátlószerek hatékonynak bizonyultak (Li és mtsai 2002), a dohány sejtéből származó mitokondriumok esetében semmiféle hatást sem gyakoroltak a DHA redukciójára. Ez a látszólagos ellentmondás egyfelől magyarázható lehet az állati és növényi eredetű mitokondriumok ismert különbözőségével. A mitokondriális komplexek különböző szuperkomplexeit alkotnak az állati és növényi mitokondriumokban (Dudkina és mtsai 2006, Schagger 2002). Ezen kívül a növényi respirációs elektrontranszfer lánc öt olyan elemet is tartalmaz, amelyek az emlős mitokondriumban nem fordulnak elő: az alternatív oxidázt és négy NAD(P)H dehidrogenázt (Møller 2001). A növényi és állati mitokondriumok eltérő szerveződése, illetve az eltérő DHA redukciós háttér viszonya jelenleg nem teljes mértékben tisztázott. A DHA redukció, növényekben tapasztalt, komplex II-höz kapcsoltága megmagyarázza a malát hatástalanságát és az átmeneti termék aszkorbil gyök hiányát. A szukcinát mellett a KCN mutatott igen erőteljes pozitív hatást a DHA kiváltotta aszkorbát akkumulációra (5. táblázat). Ez egyfelől eredhet a DHA redukció helyszínén tapasztalható megnövekedett elektron ellátásból, másfelől a csökkent aszkorbát oxidációból. Ez a második lehetőség tűnik inkább valószínűnek. Ezt a feltételezést támasztja ugyanis alá EPR spektroszkópiai mérésünk is. A komplex IV gátlószert KCN teljes mértékben gátolta az aszkorbát oxidációt (15. ábra), ami összhangban van azzal az ismert ténnyel, amely szerint az aszkorbát elektronokat juttathat a komplex IV-re (Myer és mtsai 1980). Végezetül a szukcinát kezelés hatására elsősorban az intramitokondriális aszkorbát szint nőtt meg, míg a KCN kezelés az extramitokondriális aszkorbát szintnövekedésnek kedvezett (16. ábra).

3.3. Kvantitatív adatok a glutation és a komplex II függő aszkorbát reciklálásról növényi mitokondriumban

Ahogy láttuk növényi mitokondriumok esetében eddig két DHA redukciós folyamat, az aszkorbát-glutathion ciklus, illetve az előző fejezetben ismertetett, komplex II-függő folyamat került részletesen jellemzésre (Foyer és Halliwell 1976, Szarka és mtsai 2007, 3.2. fejezet). A két folyamat DHA redukcióhoz való mennyiségi hozzájárulása azonban kísérleteink

megkezdéséig ismeretlen volt. Ezért a két útvonal szubsztrátjainak, illetve inhibitorainak alkalmazása révén mennyiségi adatokat kívántunk nyerni ezen két útvonal DHA redukcióhoz történő hozzájárulásához növényi mitokondriumokban.

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a glutation-függő DHA redukció mértékét, BY2 dohány sejteket kezeltünk a gamma-glutamilcisztein szintetáz (glutation bioszintézist) gátló butioninszulfoximinnel (BSO). A kezelés hatására a celluláris glutation szint drámai mértékben (közel 90%-kal) lecsökkent (17. ábra, a panel), azonban ez a drámai glutation szint csökkenés nem befolyásolta a sejtek életképességét, amely tripán kék kizárásos módszerrel mind a kezelt, mind a kontroll sejtek esetében meghaladta a 95%-ot.

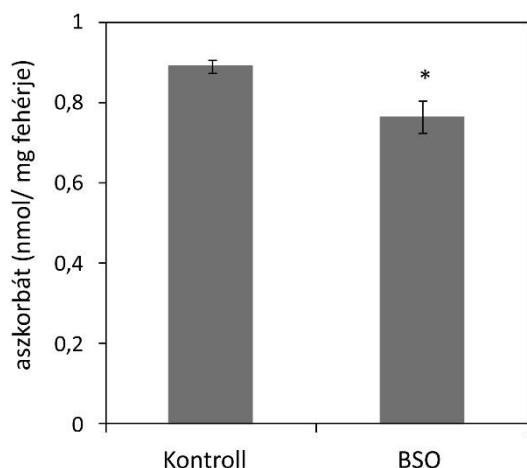


17. ábra Kontroll és BSO kezelt BY2 sejtek (A) és belőlük származó mitokondriumok (B) glutation (GSH) tartalma (* szignifikáns a kontrollhoz képest, $p < 0.05$)

A drámai, közel 90%-os celluláris glutation szint csökkenéstől jóval mérsékeltebb glutation szint csökkenést tapasztaltunk mitokondriális szinten (89% vs. 38%) (17. ábra, b panel). A kisebb mértékű mitokondriális GSH tartalom csökkenés (38%) összhangban van a korábban BSO kezelt tök (*Cucurbita pepo*) (Zechmann és mtsai 2006) és a *pad2-1* mutáns lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) (Zechmann és mtsai 2008) esetében tapasztaltakkal. Ezek a megfigyelések igen jól szabályozott mitokondriális glutation transzport meglétére utalnak, mivel a glutation bioszintézise a citoszolban és a plasztiszban folyik (1.3.1.1. fejezet). Az állandó mitokondriális GSH szint fontos lehet a mitokondriális membrán intaktitásának megőrzésében, így a mitokondriális diszfunkció kiváltotta sejthalál elkerülésében (Fernandez-Checa 2003).

Annak érdekében, hogy megállapítsuk a csökkent GSH szint mitokondriális DHA redukcióra gyakorolt hatását, frissen izolált mitokondriális szuszpenzióban a redukált forma, aszkorbát megjelenését követtük nyomon DHA (1 mM) hozzáadását követően. Egyértelműen csökkent a

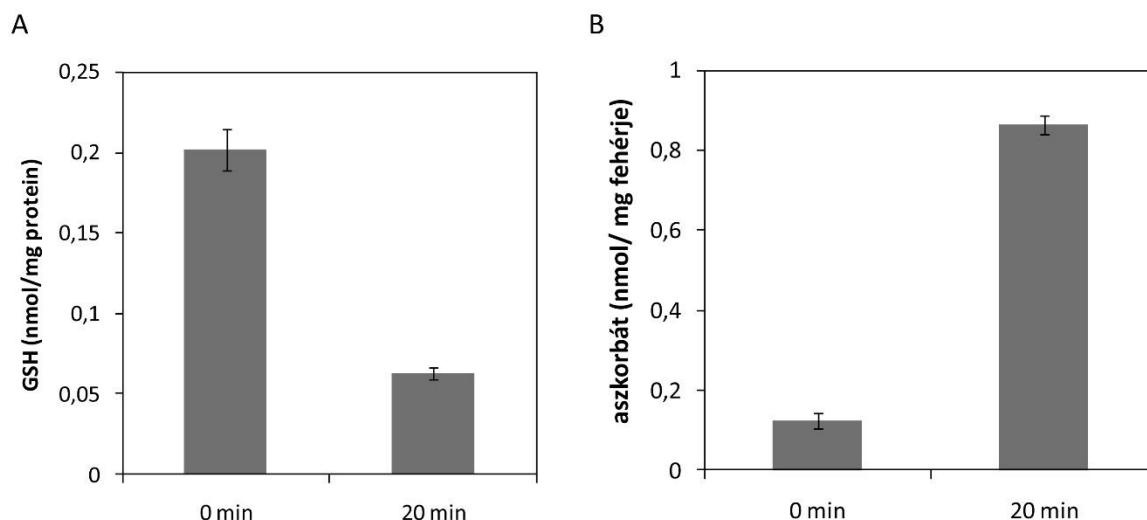
DHA redukciós kapacitás a BSO kezelt sejtekből izolált mitokondriumok esetében, a nem kezeltékből származókhöz képest (18. ábra). Habár a csökkenés egyértelműen szignifikáns volt a BSO kezelt és a kontroll sejtekből származó mitokondriumok, DHA redukciós kapacitása között, még kisebb különbséget tapasztaltunk, mint glutation szintjük között (15% vs. 38%) (17B. és 18. ábra). Ez a jelenség megerősíti az alternatív, nem glutation-függő DHA redukciós folyamatok meglétét növényi mitokondriumban.



18. ábra Kontroll és BSO kezelt sejtekből származó mitokondriumok, DHA redukciós kapacitása (* szignifikáns a kontrollhoz képest, $p < 0.05$)

A mitokondriális glutation, DHA redukcióhoz való hozzájárulását, a mitokondriális glutation szint DHA hozzáadására kiváltott változásának (csökkenésének) nyomon követésével

határoztuk meg. A glutation szintet a DHA (1 mM) hozzáadása előtt, illetve 20 perccel később mértük meg, miközben párhuzamosan mértük a DHA hozzáadására képződő aszkorbát mennyiségét is (19. ábra).

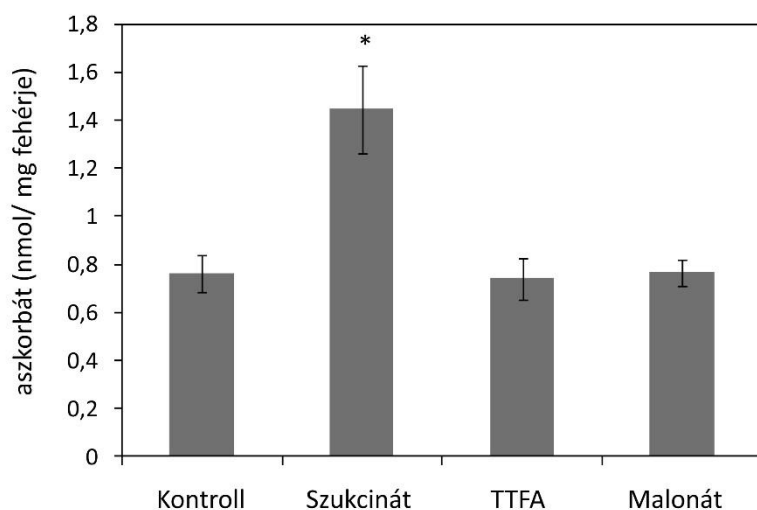


19. ábra Mitokondriális glutation (GSH) (A) és aszkorbát (B) szint DHA adagolás előtt és 20 perc inkubációs időt követően

A metabolizmus bármely szubsztrátjának hiányában ilyenkor a tisztán glutation-függő DHA redukcióról kaphatunk képet a növényi mitokondriumban. A mitokondriális glutation tartalom csökkenése hozzávetőlegesen az aszkorbát produkció egyötödét tette ki (19. ábra). A glutation (csökkenés) így durván az aszkorbát produkció 20%-áért lehet felelős. A DHA redukció fennmaradó része nem glutation-függő módon valósulhat meg. Ezek közül két folyamat

részvétele meglehetősen valószínű, azonban eddig egyiket sem vizsgálták növényi mitokondriumok esetében. Az emlős analógiát alapul véve a tioredoxin reduktáz lehet az egyik, mivel kimutatták, hogy a patkány máj tioredoxin reduktáz katalizálja a DHA NADPH-függő redukcióját (May és mtsai 1997). Szintén patkány májsejteken végzett kísérletek alapján, a másik potens jelölt az α -liponsav lehet. Az α -liponsav-függő redukciót olyan faktorok stimulálták, amelyek növelték az α -liponsav, NADH-függő dihidroliponsavvá történő redukcióját. A piruvát dehidrogenáz és az α -ketoglutarát dehidrogenáz, α -liponsav-, koenzim A- és piruvát-, vagy α -ketoglutarát-függő módon redukálta a DHA-ot aszkorbáttá (Xu és Wells 1996).

Az előző fejezetben ismertetetteknek megfelelően a mitokondriális elektrontranszfer lánc II-es komplexe is részt vesz a DHA redukcióban növényi mitokondriumokban. Így az elektron transzferlánc szerepe, kiválóan tanulmányozható az inkubációs közeghez adott II-es komplex szubsztrát, szukcinát, illetve II-es komplex inhibitor malonát és TTFA (thenoiltrifluoroaceton) hatása által. Szukcinát hozzáadására az aszkorbát produkció mintegy 90%-kal megemelkedik, amelyet szinte teljes mértékben fel lehet függeszteni TTFA, vagy malonát együttes adagolásával (20. ábra).



20. ábra Mitokondriális II-es komplex szubsztrát (szukcinát) és gátlószerek (TTFA, malonát) hatása a mitokondriális DHA redukcióra (* szignifikáns a kontrollhoz képest, $p < 0.05$)

Annak ellenére, hogy a szukcinát mérsékelt gátló hatással bír a mitokondriális DHA felvételre (Szarka és mtsai 2004), ezen komplex II szubsztrát mégis jelentős mértékű (DHA adagolást követő) aszkorbát termeléshez vezet (20. ábra). A megfigyelt szukcinát hatására bekövetkező lökészerű aszkorbát termelődés egyértelműen a megnövekedett elektronátadás eredménye, ami kompenzálni képes a mitokondriális DHA felvételre kifejtett negatív hatását.

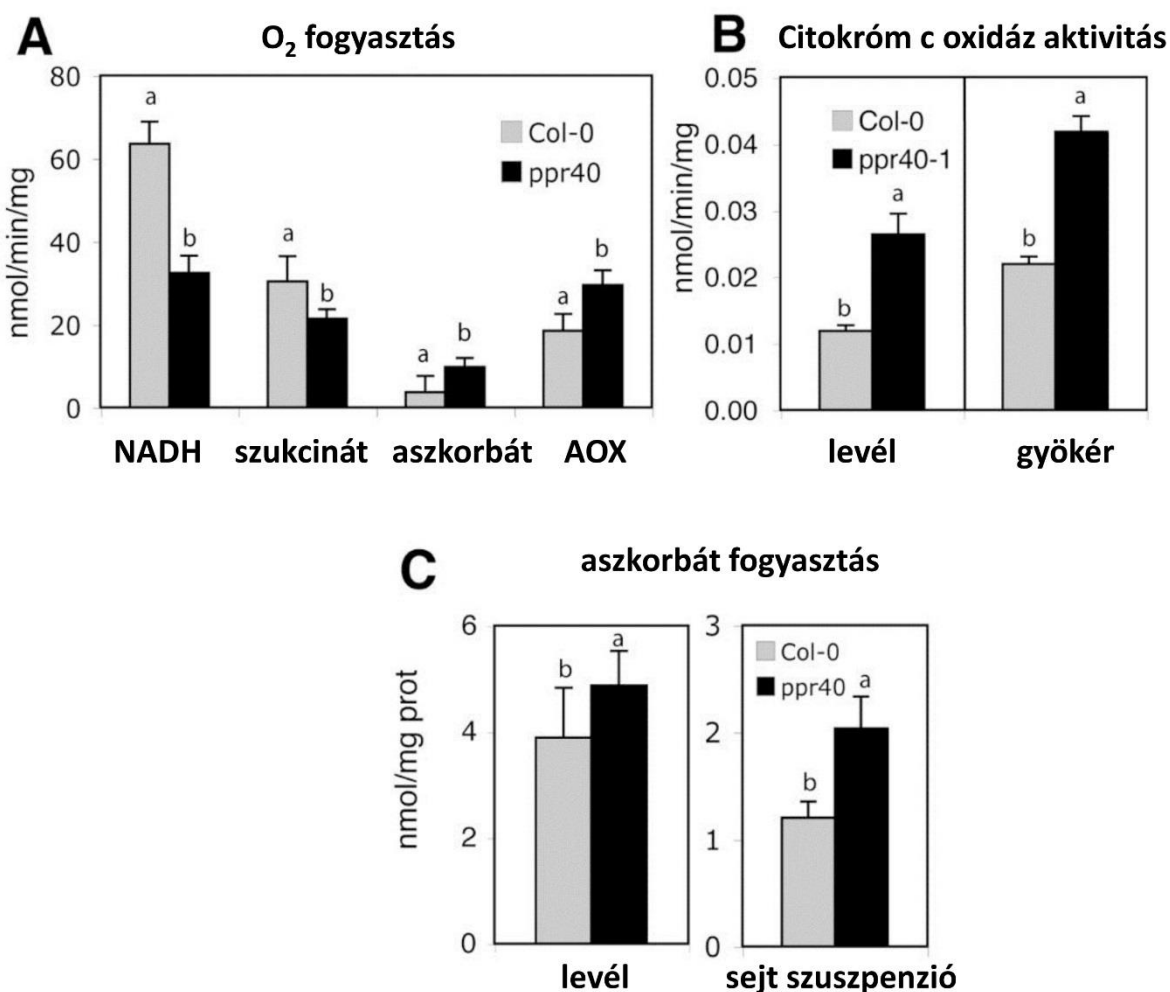
Összefoglalásképp elmondhatjuk, hogy a mitokondriális elektrontranszfer lánc szerepét a mitokondriális aszkorbát reciklálásban eddig méltatlanul alulbecsülték.

3.4. Fokozott ROS termelés és aszkorbát fogyasztás a PPR-40 *Arabidopsis*-ban

A mitokondriális elektrontranszfer láncban létrejövő bármilyen elektronáramlási nehézség, vagy blokk az elektronok torlódását, redukáltabb elektrontranszfer lánc komponenseket és ezáltal fokozott reaktív oxigénvegyület (ROS) képződést idéz elő (Szarka és mtsai 2012, 2013a, 2013b, 2014).

Az egyetlen jelenleg ismert mitokondriális III-as komplex mutánsban, a ppr-40-es *Arabidopsis*-ban, a III-as komplexnél bekövetkező elektron áramlási blokk igen jelentős mértékű reaktív oxigénvegyület (elsősorban H_2O_2) szint emelkedéssel és lipidperoxidációval jár együtt. Ezért kiváló vizsgálati objektum, a mitokondriális elektrontranszfer és a C-vitamin anyagcsere kapcsolatának részletesebb felderítésére.

Első kísérleti lépésként, az oxigénfogyasztáson keresztül meghatároztuk a légzést, mind vad típusú, mind ppr-40 mutáns sejt szuszpenzióból izolált mitokondriumok esetében. A komplex I fő elektrondonorját, NADH-t használva légzési szubsztrátként 50%-os csökkenést figyeltünk meg a ppr-40 mitokondriumok esetében a vad típushoz (Col-0) képest (21. ábra A panel). Komplex II szubsztrát szukcinátot használva, az előző esethez hasonlóan 40%-kal alacsonyabb oxigénfogyasztást tudtunk mérni (21. ábra A panel). Ezen mérési adatok alapján a komplex I-en és komplex II-ön (a III-as komplexet megelőző komplexeken) keresztüli elektronáramok lényeges mértékben csökkentek a ppr-40 mutánsban. A mitokondriális elektrontranszfer láncban a komplex III továbbítja az ubikinolról érkező elektronokat a citokróm c-re a komplex IV irányába, amely végül citokróm c oxidáz aktivitásán keresztül a molekuláris oxigénre. Aszkorbátot használva komplex IV légzési szubsztrátként (Myers és mtsai 1980, Szarka és mtsai 2007) közvetlenül meg tudtuk határozni a szubsztrátról (aszkorbát) a molekuláris oxigénre történő elektron átadás sebességét. Ebben az esetben mintegy 2.5-3-szor nagyobb oxigénfogyasztást tudtunk mérni a ppr-40 mutáns mitokondriumok esetében a vad típushoz (Col-0) képest (21. ábra A panel).



21. ábra Komplex III blokk következtében kialakult csökkent légzés, fokozott IV-es komplex (CCO), alternatív oxidáz (AOX) aktivitás és fokozott (IV-es komplexen bekövetkező) aszorbát fogyasztás ppr-40 *Arabidopsis* mitokondriumokban

A csökkent komplex I és komplex II aktivitásokkal szemben eredményeink arról tanúskodnak, hogy a komplex IV teljes mértékben működőképes és az aszorbát legalább részlegesen áthidalhatja, megkerülheti a hibás komplex III-on keresztüli elektron transzfert a ppr-40 mutáns növényekben. Ezen kívül a mutáns növényekben a vad típusúhoz képest hozzávetőlegesen kétszer akkora citokróm c oxidáz aktivitást (21. ábra B panel), a gyökerekben 30%-kal, a sejt szuszpenzióban pedig 80%-kal magasabb aszorbát fogyasztást lehetett mérni (21. ábra C panel). Ezen adatok mindegyike arra utal, hogy a ppr-40 mutánsokban a komplex IV jóval nagyobb intenzitással működött, mint a vad típusú mitokondriumokban. Így a ppr-40 mutánsban tapasztalható jelentős mértékű komplex III-on keresztüli elektron transzfer visszaesés ellenére, a komplex IV aktivitása, az aszorbáton keresztül, megtartott volt és jelentős mértékű oxigénfogyasztásra volt képes. A komplex III csökkent mértékű ubikinol citokróm c oxidoreduktáz aktivitása, elektronáramlási gátat eredményez, amely fokozott mértékű ROS termelődéshez vezet. A komplex III-on keresztüli csökkent elektronáram esetén az AOX képes az ubikinolról átvenni a feles elektronokat, miközben víz keletkezik és csökkenti

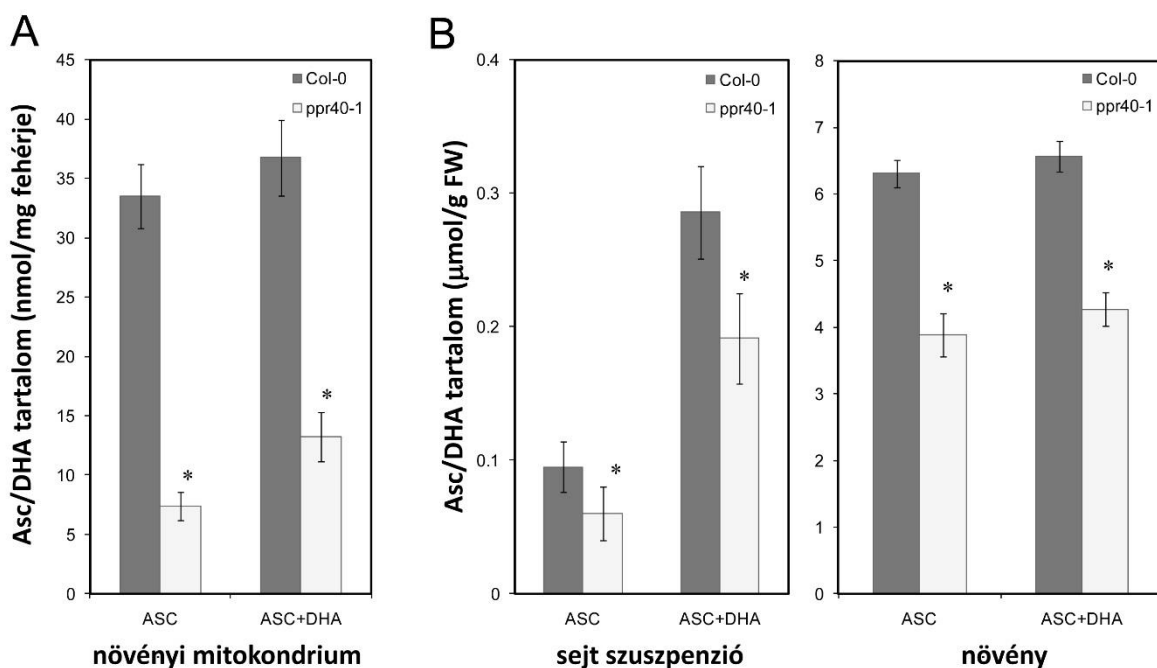
a ROS terhelést (Vanlerberghe és Ordog 2002, Millenaar és Lambers 2003, Navrot és mtsai 2007). Így nem meglepő módon 60-70%-kal emelkedett AOX aktivitást tudtunk mérni a ppr-40 mutánsokban a vad típushoz képest (21. ábra A panel).

3.5. Fokozott GLDH aktivitás és aszkorbát-glutation ciklus a ppr-40 lúdfűben

Az aszkorbát fogyás sebessége több ok miatt is megnő a ppr-40 mutáns növényekben. Egyrészt a komplex III blokk következtében kialakuló, magasabb ROS szint (3.4. fejezet) eliminálása, másrészt a megnövekedett IV-es komplex aktivitás, (mint alternatív légzési szubsztrát) (3.2. és 3.4. fejezet) fogja az aszkorbát DHA-tá (és MDHA-tá) történő oxidációját fokozni. Ennek megfelelően mind mitokondriális, mind sejtszinten jóval alacsonyabb és oxidáltabb C-vitamin szinteket tudtunk mérni a ppr-40 növények (és sejtek) esetében (22. ábra).

A ppr-40-es mitokondrium aszkorbát szintje mindössze a negyedét, az aszkorbát + DHA szintje pedig a harmadát érte el a vad típusú mitokondriuménak (22. ábra A panel). A sejt szuszpenzióból izolált mitokondriális aszkorbát szint pedig a detektálási küszöb környékén volt. Ez nem meglepő, hisz már korábban is leírták, hogy a sejt szuszpenzióban mérhető aszkorbát szint hozzávetőlegesen egy nagyságrenddel alacsonyabb, mint a zöld szöveté (Potters és mtsai 2004, Vandenhove és mtsai 2010). Hasonlóan szignifikáns, de valamivel kisebb mértékű különbséget lehetett megfigyelni a mutáns és vad típusú sejtek és zöld szövet homogenátumok aszkorbát és aszkorbát + DHA tartalmában (22. ábra B panel).

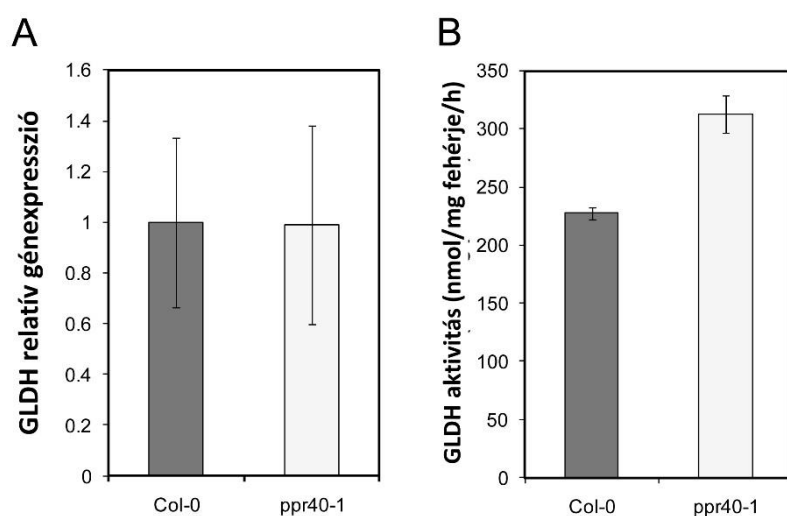
Az aszkorbát redox státuszát az aszkorbát/aszkorbát + DHA (teljes aszkorbát) arány alapján határoztuk meg. A ppr-40 mutáns és a vad típus között lényegi különbséget teljes sejt (0.31 vs 0.33) vagy szöveti (0.91 vs 0.96) szinten nem lehetett kimutatni. Ezzel szemben a zöld szövetből származó mitokondriális aszkorbát jóval oxidáltabb állapotban volt a ppr-40 mutánsok esetében, mint a vad típusban (0.56 vs 0.91). Ezek az eredmények azt valószínűsítik, hogy az aszkorbát tartalomban és redox státuszban bekövetkező változások a mitokondriumból indulnak és csak másodlagosan érintik a teljes sejtet/növényt.



22. ábra Alacsonyabb és oxidáltabb C-vitamin szintek ppr-40 sejtek, szövetek és mitokondriumok esetében (* szignifikáns a kontrollhoz képest, $p < 0.05$)

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. Az aszkorbinsav szint három folyamat eredője: szintézis, fogyasztás, regeneráció (DHA-ból történő redukció) mindhárom folyamat együttes vizsgálata vezethet eredményre. Ezért a fokozott fogyasztást 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 (23. ábra).

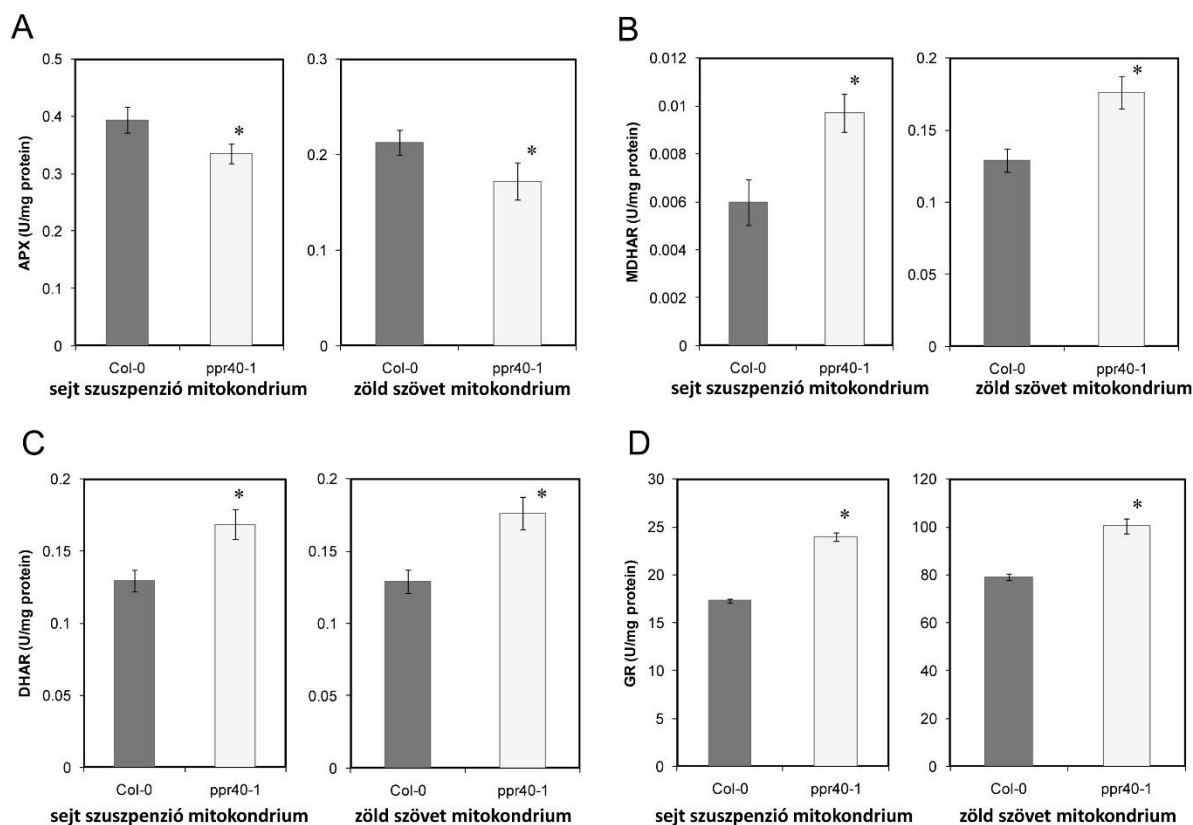


23. ábra GLDH expresszió (A) és aktivitás (B) vad típusú és ppr-40 mutáns növényekben

Ezzel szemben 25%-os enzimaktivitás fokozódást tapasztaltunk (23. ábra). 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 elektron akceptorként (Bartoli és mtsai 2000). Így nem meglepő módon minden olyan folyamat fokozza az aktivitását, amely a komplex III citokrom c redukcióját csökkenti (Bartoli és mtsai

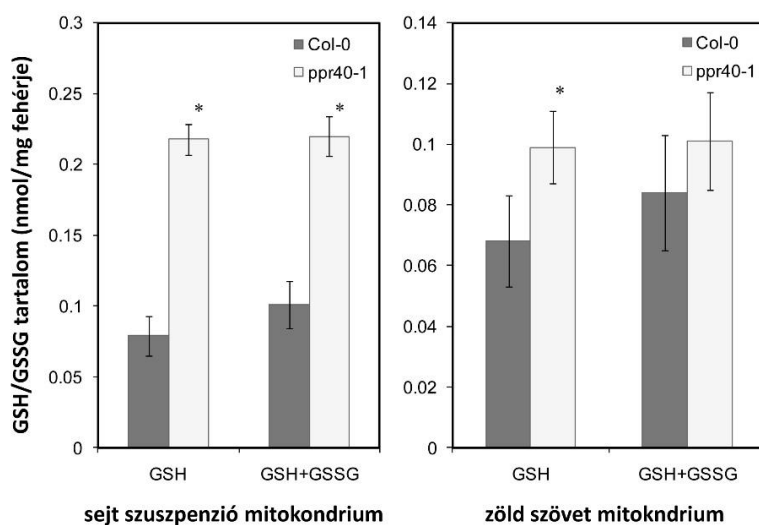
2000, Zsigmond és mtsai 2008, 3.4. fejezet). Természetesen azt sem szabad elfelejtenünk, hogy a ppr-40 mutáns legalább kétszeres citokróm c oxidáz aktivitása révén jóval oxidáltabb citokróm c állománnyal rendelkezik (Zsigmond és mtsai 2008, 3.4. fejezet). Mindezen folyamatokkal könnyedén magyarázható az emelkedett GLDH aktivitás.



24. ábra Az aszkorbát glutation ciklus enzimeinek aktivitása vad típusú és ppr-40 mutáns növényekben, sejtekben és mitokondriumokban (* szignifikáns a kontrollhoz képest, $p < 0.05$)

A fokozott aszkorbát fogyasztás és oxidáció hátterében a korábban részletezett komplex IV függő folyamat (3.2. és 3.4. fejezet) mellett a fokozott mitokondriális APX aktivitás állhat. Esetünkben ez nem igazolódott be, mivel enyhe, de szignifikáns mértékben csökkent APX aktivitást tudtunk mérni mind ppr-40-es szuszpenziós sejt kultúrából, mind zöld növényekből a vad típusúhoz képest (24. ábra, A panel). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a mutáns növények alacsonyabb aszkorbát koncentrációhoz való adaptációját meghatároztuk az aszkorbát-glutathion ciklus többi enzimének (MDHAR, DHAR, és GR) aktivitását is. Az előzmények ismeretében nem meglepő módon, a ciklus minden enzimének emelkedett aktivitását tapasztaltuk a mutáns növényekben és az azokból izolált mitokondriumokban a vad típusú növényekhez viszonyítva (24. ábra, B-D panel).

A ciklus enzimeinek emelkedett aktivitása együtt járt a redukcióhoz elektronokat szolgáltatató (elektron donor) GSH mitokondriális szintjének emelkedésével a mutáns növényekben (25. ábra).



25. ábra A glutation mitokondriális szintje vad típusú és ppr-40 mutáns növényekből származó mitokondriumokban (* szignifikáns a kontrollhoz képest, $p < 0.05$)

A növekedést mind a redukált, mind a teljes GSH szintjén tapasztalni lehetett. Az emelkedés jóval markánsabb volt a

sejtekből (2.7 és 2.1-szeres emelkedés) mint a zöld növényekből (45 és 20%-os emelkedés) származó mitokondriumok esetében (25. ábra). Ez egyúttal a redox státusz egyértelmű redukzív irányba való eltolódását is jelentette (sejtszuszenzióban 0.78-ról 0.99-re, zöld növényből 0.81-ről 0.98-ra). A DHA redukció glutation függő folyamatai, tehát egyértelműen emelkedett aktivitást mutattak a ppr-40 mutáns növények mitokondriumaiban.

Ez a fajta kompenzációs mechanizmus koránt sem ismeretlen a növényi biotechnológiában. Az aszkorbát-glutation ciklus emelkedett aktivitásáról számoltak be például durum búza Cd kiváltotta oxidatív stressz állapota esetében is (Paradiso és mtsai 2008). A fokozott aszkorbát recikláláshoz szükséges fokozott GSH ellátást a fokozott GSH bioszintézis, illetve mitokondriális import biztosíthatja.

Nem meglepő módon a GSH bioszintézis első, egyben sebesség meghatározó lépését katalizáló enzim, a γ -glutamilcisztein szintáz aktivitása ismert módon fokozódik oxidatív stressz esetén (Rausch és mtsai 2007). A glutation redox eltolódását okozhatja a blokkolt elektron transzfer lánc következtében, a mátrixban felhalmozódó redukáló ekvivalensek és a GR ppr-40-es növényekben/sejtekből leírt aktivitásemelkedése (24. ábra D panel). Hasonló GSH szintemelkedést figyeltek meg a már említett Cd kezelt durum búza, illetve a csökkent aszkorbát tartalmú, vtc1 mutáns lúdfű esetében (Paradiso és mtsai 2008, Pavet és mtsai 2005). A kompenzációs mechanizmus megfigyelhető volt az E-, C-vitamin, illetve GSH deficiens (vtc1, vtc1 és cad1) lúdfű mutánsokban is. Általánosságban véve a három antioxidáns egyikének a csökkent szintje, maga után vonta a másik kettő, kompenzációs emelkedését (Kanwischer és mtsai 2005). A kompenzációs mechanizmus minden bizonnyal szerepet kap a lipidperoxidáció elleni védelemben is. Tekintve, hogy az aszkorbát-glutation ciklus részt vesz a tokoferil gyök tokoferollá történő redukálásában (Fryer 1992), az aszkorbát-glutation ciklus emelkedett aktivitása révén nem csak a fokozott H_2O_2 képződést, hanem a jelentős mértékű lipidperoxidációt is mérsékelheti a ppr-40-es növényekben. Más mitokondriális légzési komplex mutációval rendelkező növények esetében is megfigyelhető hasonló ROS ellenes,

kompenzációs mechanizmus. Így a ppr-40-es lúdfűhöz hasonlóan a komplex I funkciójában károsodott CMSII (cytoplasmic male-sterile mutant) dohány (*Nicotiana glauca*) is emelkedett AOX és mitokondriális MnSOD kifejeződéssel jellemezhető. A CMSII esetében tapasztalható AOX és MnSOD indukció alacsonyabb H_2O_2 szinttel jár együtt, ugyanakkor sem a GSH, sem az aszkorbát tartalma lényegesen nem változik (Duttilleul és mtsai 2003b). Egy másik complex I mutáns, a Fro1 lúdfű esetében azonban intenzív NBT (nitroblue tetrazolium) és DAB (3,3'-diaminobenzidine) festődés tapasztalható, ami emelkedett szuperoxid és H_2O_2 szintet mutat és arra utal, hogy a fro1 mutáns állandó módon emelkedett ROS szinttel jellemezhető (Lee és mtsai 2002). A CMSII mutánssal kapcsolatban korábban megváltozott fotoszintetikus aktivitásról, valamint emelkedett rotenon rezisztens légzésről számoltak be (Sabar és mtsai 2000, Duttilleul és mtsai 2003b), ami egyértelműen arra utal, hogy bár a komplex I funkciója kiesett, de a légzési elektronáram alternatív utakon megtartott maradt. A CMSII nem foszforilációs légzési enzimek (a rotenon inszenzitív NAD(P)H dehidrogenázok) normális *in vivo* légzési szintet képesek fenntartani (Duttilleul és mtsai 2003). A ppr-40 azonban az emelkedett AOX aktivitás ellenére képtelen erre (3.4. fejezet, Zsigmond és mtsai 2008). A nem teljes mértékben kompenzált légzés okozhatja a ROS felhalmozódását (a CMSII mutáns teljesen kompenzált légzésével ellentétben) a ppr-40 lúdfű esetében.

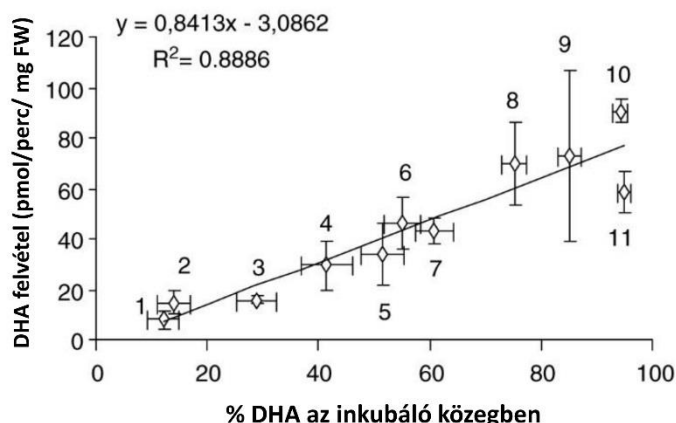
Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az általunk leírt (antioxidáns) kompenzációs mechanizmus ellenére jelentősen alacsonyabb teljes C-vitamin szint jellemezte a ppr-40 mutáns növényeket. A mutáns növényekből izolált mitokondriumokban még jelentősebb mértékben csökkent a C-vitamin szintje, illetve a mitokondriumokban, a teljes növényi szövettel ellentétben, az aszkorbát redox statusa is jelentősen eltolódott az oxidált forma DHA irányába (22. ábra) jelezve, 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.

3.6. Eltérő mechanizmusú DHA és glükóz transzport lúdfű szuszpenziós sejtkultúrában

A mitokondriális rendszerrel kapcsolatban felgyűlt tapasztalatok alapján megkíséreltük a plazmamembránon keresztül zajló C-vitamin és glükóz transzportfolyamatok részletesebb jellemzését.

Annak ellenére, hogy a plazmamembrán C-vitamin transzportrendszerei, minden eddig vizsgált növényi szövet általános sajátosságának tűnnek, a transzportált molekula redox státusza (aszkorbát vagy DHA) és a hexóz transzporterek esetleges szerepe vizsgálatunk kezdetekor teljes mértékben kétséges volt (Horemans és mtsai 2000). Az állati szövetekben, az aszkorbát nátrium-függő transzporterek (1.2.2. fejezet, Daruwala és mtsai 1999, Tsukaguchi és mtsai 1999), a DHA pedig glükóz (GLUT) transzporterek (1.2.2. fejezet, Vera és mtsai 1993, Mandl és mtsai 2009).

Különböző redox státuszú ^{14}C jelölt C-vitamint (aszorbát, DHA keveréket) állítottunk elő redukáló/oxidáló szerek segítségével. A C-vitamin redox állapota a 87.9%-ban redukálttól (50 mM DTT jelenlétében) egészen az 5.7%-ban redukáltig (20 perces aszorbát oxidázós kezelést követően) terjedt (26. ábra). Különösen kontroll körülmények között (bármiféle redox aktív anyag távollétében) a hozzáadott aszorbátot a sejtek mintegy 20 perc alatt oxidálták. Az oxidáció egyértelműen a sejtek jelenlétéhez kötődött, mivel azok távollétében még 1 óra elteltével is teljes mértékben redukált maradt. Lineáris összefüggést találtunk a külső inkubációs közeg DHA tartalma és a transzportra kerülő radioaktivitás (DHA) között (26. ábra).



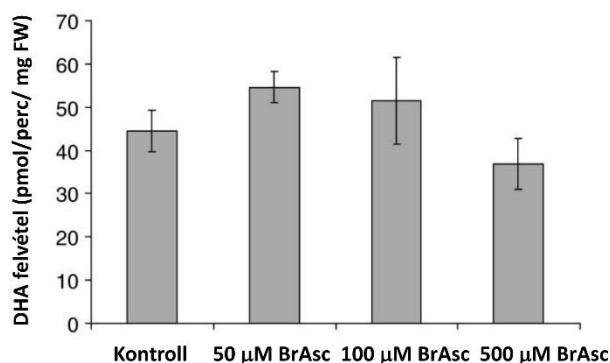
26. ábra A külső inkubációs közeg DHA tartalma (redox státusza) és a DHA felvétel kapcsolata

Felmerülhet annak a lehetősége, hogy az általunk alkalmazott redox aktív reagensek, mint például a DTT, merkaptó-etanol, vagy a GSH reagálhat a fehérjék tiol csoportjaival. Ez felveti annak a

lehetőségét, hogy ezen vegyületek oly módon gyakorolnak hatást a felvétel aktivitására, hogy a jelenlévő fehérjék tiol csoportjainak redox állapotát változtatják meg. Izolált plazmamembrán zsákocskák esetében azonban a szulfhidril reagensek (pl. p-kloromerkuribenzénszulfonsav és N-etilmaleimid) nem változtatták meg a DHA sejtekbe irányuló transzportját (Horemans és mtsai 1996). Ezen kívül oxidatív stressz esetén a DHA transzport inkább csökkent, minthogy nőtt volna, pedig ez lenne várható, amennyiben a DTT és más redukáló anyagok valamiféle általános hatást gyakorolnának a növényi sejtek redox állapotára (Horemans és mtsai 2007). Mindezek alapján több mint valószínű, hogy pusztán a DHA és nem az aszkorbinsav a C-vitamin transzportformája növényi sejt kultúrák esetén.

Itt érdemes megjegyeznünk, hogy a sejtek képesek a tápközeghez adott aszorbát gyors és teljes oxidációjára, megerősítve azokat a korábban BY2 dohány sejteken (Potters és mtsai 2000), illetve bab plazma membrán zsákocskákon (Horemans és mtsai 1997) kapott eredményeket, amelyek szerint a sejt kultúrák tápközegében lévő aszorbát redox állapota inkább az oxidált, míg az egészséges növényi szövetekben inkább a redukált felé (Horemans és mtsai 2000) van eltolva. Habár az oxidáció természetét részletekbe menően nem vizsgáltuk, annak forrása esélyesen az endogén aszorbát oxidázok. Az apoplasztban található aszorbát oxidázt aktívan szekretálják az auxin tartalmú MS tápoldatban (mint amilyenben mi is fenntartottuk a sejtek) fenntartott tök (*Cucurbita* speciesek) sejtek a sejt fenntartó médiumba (Esaka és mtsai 1992).

Ezt követően az állati sejtek esetében az aszorbát felvételt gátló 6-bromo-6-deoksi-aszorbát (BrAsc) (Corpe és mtsai 2005) hatását vizsgáltuk meg. Méréseink egyértelműen arra utaltak, hogy a növényi sejtek esetében a gátlószer hatástalan (27. ábra).

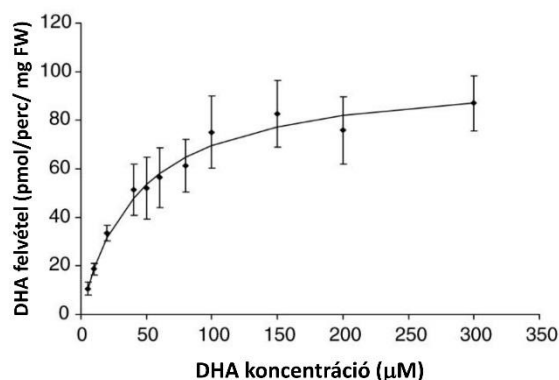


27. ábra A 6-bromo-6-deoxi-aszkorbát hatása a DHA plazmamembránon keresztüli felvételére

A BrAsc nem kompetált a DHA felvétellel növényi sejtekben (27. ábra). A BrAsc volt az első aszkorbát analóg, amelyről kiderült, hogy teljes mértékben specifikus az állati szövetek Na-függő C-vitamin transzportereire és nem szállítják a GLUT

transzporterek, mivel lehetséges BrDHA-t történő oxidációja, de nem záródik hemiketál formává, amely normális körülmények között a GLUT transzporterek transzportformája (Corpe és mtsai 2005). Éppen ezért az állati transzporter kutatásban ez egy viszonylag új eszköz az aszkorbát és DHA transzport megkülönböztetésére. A BrAsc DHA transzportra való hatástalansága biztosan nem az oxidált BrDHA instabilitásában keresendő, mivel mind a BrDHA-ot, mind a DHA-ot 100%-ban vissza tudtuk nyerni (redukálni) a 20 perces időintervallumon belül. Ez azt jelenti, hogy a DHA növényekben is a hemiketál formában kerülhet felvételre, vagy legalábbis az állati aszkorbát transzporterek nem aktívak a növényi plazmamembránban. Mindent együttvéve, mind az aszkorbát redox állapotának befolyásolása, mind a BrAsc-tal végzett kísérletek egyértelműen arra utalnak, hogy az exponenciálisan növekvő lúdfü sejtek kizárólag a DHA-ot veszik fel, az aszkorbátot pedig nem. Korábban izolált protoplasztokon és plazmamembrán zsákocskákon végzett kísérletek is azt valószínűsítették, hogy a DHA a preferált transzportforma (Foyer és Lelandais 1996, Horemans és mtsai 1997). Ugyanakkor borsó protoplasztok esetében mind a két forma (aszkorbát, DHA) transzportját leírták (Rautenkranz és mtsai 1994). Ezen kísérletek során azonban nem követték nyomon az inkubáló közegben található aszkorbát redox állapotát, éppen ezért a transzportált formáról felelősséggel nem lehet nyilatkozni.

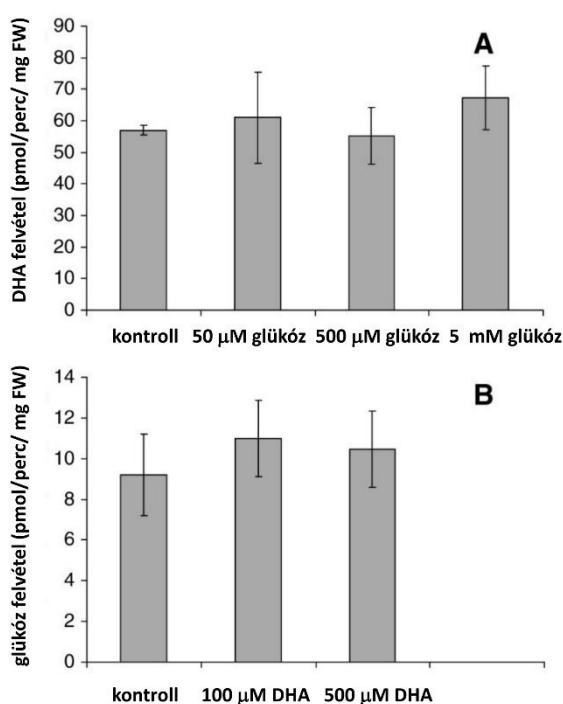
A következőkben kimutattuk, hogy a DHA transzport telítési kinetikát mutat (28. ábra), egyúttal meghatároztuk a transzport kinetikai paramétereit (K_m : 42.9 μ M, V_{max} : 99.5 μ mol/min/mg). Mind a DHA, mind a glükóz transzportja időben lineárisnak bizonyult (legalábbis 1 óra időtartamig). A mitokondriális transzporter kinetikai paramétereire képest a plazmamembrán transzporter jóval nagyobb affinitást és transzport kapacitást mutatott (lásd korábban 1. táblázat). Ezek a megfigyelések eltérő transzportrendszerekre utalnak. A további vizsgálatok során a DHA esetében 50 μ M-os a glükóz esetében 55 μ M-os koncentrációt alkalmaztunk, mivel ezek az értékek közel álltak a mért K_m értékekhez. A transzportfolyamatokat 20 percig követtük nyomon.



28. ábra A DHA transzport ligandkoncentráció függése

A növényi mitokondriális (3.1. fejezet, Szarka és mtsai 2004), illetve az állati sejtek (1.2.2. fejezet, Vera és mtsai 1993) esetében tapasztalt DHA, glükóz keresztgátlás miatt, megvizsgáltuk, hogy a két anyag transzportja verseng-e egymással. 100-szoros glükóz és 10-szeres DHA felesleget alkalmazva sem

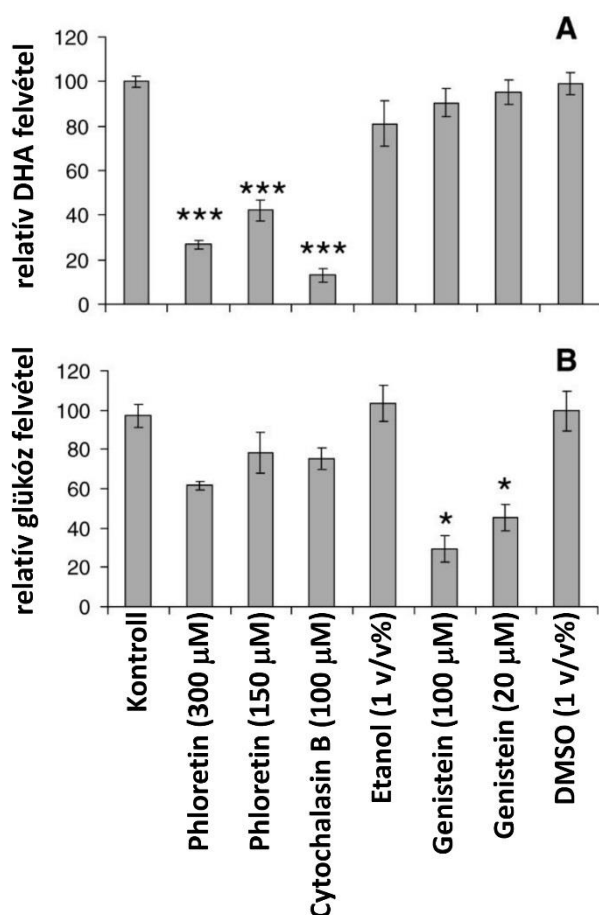
tudtunk kompetíciót kimutatni a két anyag transzportja között (29. ábra).



29. ábra. A DHA és glükóz transzportfolyamatok keresztgátlásának vizsgálata

Ezt követően három, már korábban a mitokondriális transzportméréseknél is alkalmazott potenciális transzport gátló anyag hatását vizsgáltuk meg. A genisteinét (amely egy izoflavon, ismert DHA és glükóz transzport gátló állati sejtek (Vera és mtsai 1996) és növényi mitokondriumok (Szarka és mtsai 2004) esetében), a cytochalsin B-ét (amely egy gombatoxin, ismert glükóz transzport gátló) és phloretinét (amely egy flavonoid és ismert glükóz transzport gátló, mind állati, mind növényi sejtek esetében). A phloretin és a cytochalsin B csekély nem szignifikáns, viszont a genistein

koncentrációfüggő módon szignifikáns gátlást mutatott a növényi sejtek glükóz felvétele esetében (30. ábra). A DHA transzport esetében pont ellentétes gátlási profilt figyelhattunk meg, a genistein nem, viszont a cytochalsin B (86.8%-os gátlás) és a phloretin (73.3%-os gátlás) szignifikáns mértékben gátolta a transzportot (30. ábra). Ahogy korábban láttuk a növényi mitokondriumok esetében a glükóz és a DHA felvétel egymással verseng és mindkettőt gátolja a genistein. Mindezek alapján igen valószínű, hogy ugyanaz a transzporter, vagy közeli kapcsolatban álló transzportrendszer végzik a két anyag transzportját (3.1. fejezet, Szarka és mtsai 2004). Ezzel szemben az intakt lúdfű sejtek esetében a DHA és a glükóz felvétele között semmiféle versengést sem tapasztaltunk. Ezen kívül a két transzportrendszer ellentétesen reagált az alkalmazott gátlószerekre (30. ábra).



30. ábra A DHA és glükóz transzportfolyamatok inhibíciós profilja (* szignifikáns a kontrollhoz képest, $p < 0.05$, * szignifikáns a kontrollhoz képest, $p < 0.001$)**

Ezek a kísérleti eredmények meggyőző módon mutatják, hogy a lúdfü sejtek esetében, az állati rendszerrel ellentétben (Vera és mtsai 1993, Mandl és mtsai 2009), a DHA-ot és a glükózt nem ugyanazon transzporter szállítja. A korábban borsó protoplasztok esetében leírt, DHA és glükóz transzport között meglévő szinergikus hatást (Foyer és Lelandais 1996) jelen esetben nem tapasztaltuk. Érdeemes megemlítenünk, hogy a glükóz és DHA felvételt olyan közegben mértük, amely nem tartalmazott semmiféle cukrot. A DHA felvétel átlagos mértéke lúdfü sejtek esetében azonban

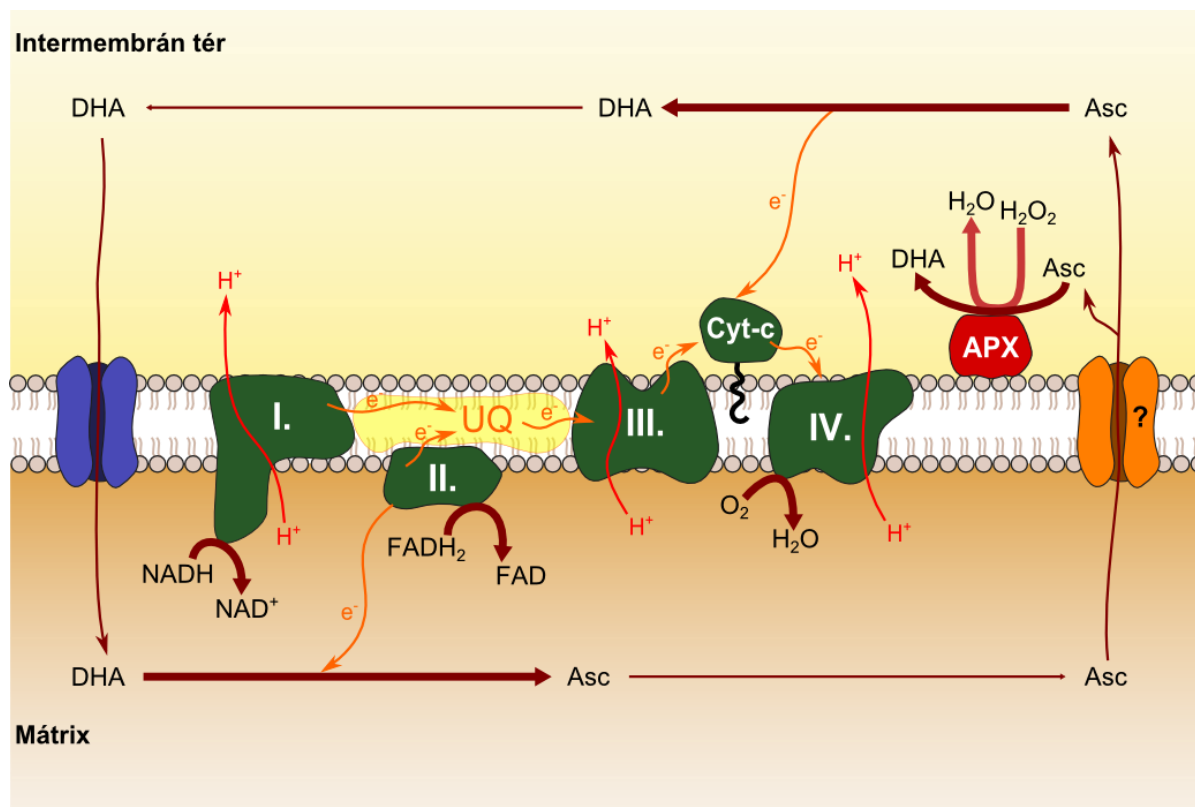
nem különbözött attól az esettől, amikor az inkubáló közeg 3 (w/v) %-nyi szacharózt tartalmazott (Horemans és mtsai 2007), amely arra utal, hogy a szacharóz érdemben nem befolyásolja a DHA felvételét.

Összefoglalva megfigyeléseink igen érdekes eredménnyel zárultak, elsőként írtuk le, hogy a növényi sejtekben két különböző típusú nagy affinitású DHA transzportrendszer létezik: a mitokondriális, amely nagy valószínűség szerint hasonló a glükóz transzporterekhez (3.1. fejezet), illetve a plazmamembránban található, amely egyértelműen különbözik a glükóz transzporterektől.

3.7. Hipotetikus modellünk: A mitokondrium, a mitokondriális elektrontranszfer szerepe a C-vitamin szintézisben, regenerációban; az aszkorbát/DHA redox páros szerepe a mitokondriális elektrontranszferben

Eddig elért eredményeink alapján a következő modell valószínűsíthető: a mitokondriális két membrán közötti térben, az APX aktivitás révén keletkező DHA, egy glükóz transzport(er) segítségével, jut át a belső membránra. A DHA, ezt követően a mitokondriális mátrixban aszkorbáttá redukálódik az aszkorbát-glutation ciklus, vagy a komplex II-ről származó elektronok révén. Az aszkorbát egy része, jelenleg nem pontosan tisztázott körülmények között

elhagyja a mitokondriális mátrixot. A két membrán közötti térbe visszajutott (vagy ott lévő) aszkorbát elektronjait a komplex IV-re juttatva oxidálódik (31. ábra).



31. ábra Az aszkorbát/DHA kör hipotetikus összefoglaló modellábrája

A hipotézis legkevésbé tisztázott eleme az aszkorbát mátrixból történő kijutása. A körfolyamat limitáló lépése minden valószínűség szerint pont ez a lépés lehet, mivel a DHA redukció eredményeként keletkező aszkorbát a mátrixhoz képest jelentős késedelemmel jelenik csak meg az extramitokondriális térben (membrán közti térben). Az aszkorbát/DHA redox páros által képviselt elektron áram, egyféle alternatív elektron áramlási útvonalat jelenthet a komplex III bármilyen sérülése, blokkja esetén, elektronokat véve fel a komplex II-nél (a DHA aszkorbáttá történő reduciójával) és elektronokat adva (ezen a kerülő úton keresztül) a komplex IV-nek (az aszkorbát DHA-tá oxidálásával). Összegezősképp elmondhatjuk, hogy a növényi mitokondriális elektron transzfer lánc nemcsak az aszkorbát bioszintézisben, hanem annak regenerációjában is fontos szerepet játszik.

3.8. A mitokondriális glukóz transzport háttere: mitokondriális invertáz aktivitás és a vele összefüggő cukortranszport folyamatok

Az 3.1. fejezetben ismertetett mitokondriális DHA/glukóz transzportfolyamat, DHA transzporttal kapcsolatos történéseit és annak tudományos következményeit, beágyazását a

fentiekben (3.2.-3.7. fejezetek) alaposan kifejtettük. A glükóz transzport megléte, annak indokoltsága és molekuláris háttere hosszú ideig rejtély volt. Az előrelépéshez egy kis kitekintésre és a tudományterületen bekövetkező előrelépésre, mondhatni némi külső segítségre volt szükségünk. Milyen folyamat igényelhet, eredményezhet glükózt a mitokondriumban? *In silico* és genetikai adatok arra utaltak, hogy az invertázok egyik alcsoportja, esetlegesen mitokondriális lokalizációval rendelkezhet (Murayama és Handa 2007). Így kísérleteink kiindulásakor feltételeztük, hogy az alkalikus/neutrális invertázok egy csoportja megtalálható a növényi sejtorganellekben.

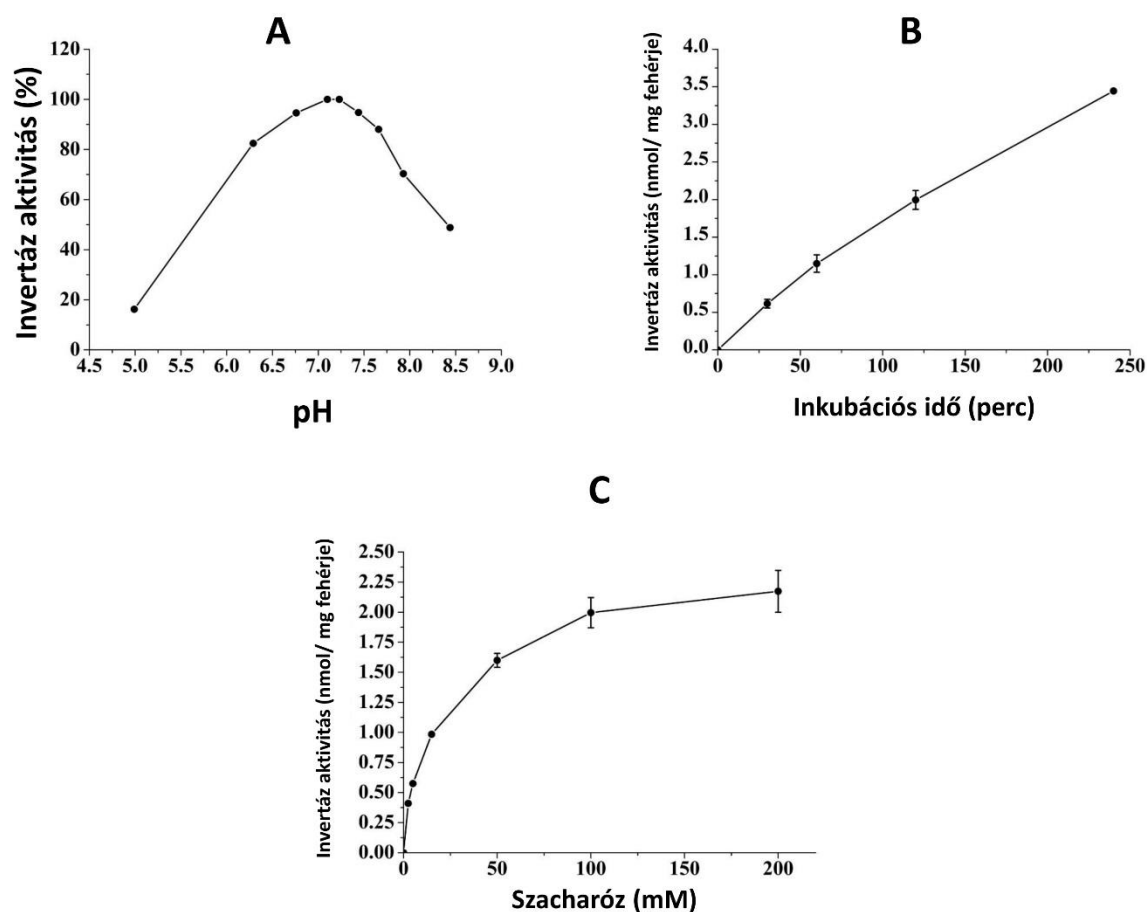
A mitokondriális invertáz aktivitás pontos elhelyezkedésének felderítése érdekében szubmitokondriális frakciókat (külső-, belső mitokondriális membrán, mátrix) preparáltunk frissen izolált csicsóka mitokondriumokból. A mitokondriális invertáz aktivitás egyértelműen a mitokondriális mátrix frakcióban volt a legnagyobb (7. táblázat). Az invertáz mitokondriális mátrixban történő elhelyezkedésének valószínűségét tovább erősítette a tipikus mátrix enzim fumaráz teljesen hasonló szubmitokondriális eloszlása (7. táblázat). A belső membrán felszakadása és a következtében, még ha igen kismértékben is kiáramló mátrix (tartalom) igen komoly keresztszennyezést okoz a meglehetősen kis térfogatú membrán közti térben (Møller és mtsai 1987). Még ennek ellenére is mindkét enzim aktivitása legalább négyszer kisebb volt (a membránközti térben), mint a mátrix frakcióban. Ezért a mátrix frakciót használtuk a mitokondriális invertáz aktivitás további jellemzésére.

7. táblázat Az invertáz és a mitokondriális markerenzim, fumaráz szubmitokondriális eloszlása csicsóka mitokondriumban

Szubmitokondriális frakció	Invertáz aktivitás (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Fumaráz aktivitás (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)
Mátrix	19.55 ± 0.22 (6)	689 ± 21 (6)
Belső membrán	0.54 ± 0.10 (6)	22 ± 12 (6)
Külső membrán	0.77 ± 0.02 (6)	26 ± 16 (6)

Tekintve, hogy az invertázokat a pH optimumuk alapján osztályozzák, mi is meghatároztuk a mitokondriális invertáz aktivitás pH függését. A mitokondriális invertáz aktivitás egy monofázisos pH profilt mutatott, amelynek 7.2-nél volt a maximuma (32. ábra A panel). A pH optimuma alapján, tehát a mitokondriális invertáz a neutrális invertázok családjába sorolhatjuk. Az enzim aktivitása gyakorlatilag állandó volt (egyenletesen emelkedett) a vizsgált időintervallumon belül (32. ábra B panel). A hosszabb inkubációs idő után tapasztalható enyhe csökkenés minden bizonnyal a termékek lehetséges gátló hatásának tudható be. A reakció, növekvő szacharóz (szubsztrát) koncentrációtól való függését a 32. ábra C panel mutatja, amely alapján megállapíthatjuk, hogy a mitokondriális invertáz tipikus telítési kinetikát mutat, 21 mM körüli K_m értékkel, amely az ismert növényi invertázok K_m érték tartományába esik (Lee és Sturm 1996, Vorster és Botha 1998, Sturm 1999, Sturm és mtsai 1999). Egy párhuzamos kísérletben sem a raffinózt, sem a maltózt (mindkettőt 100 mM-os koncentrációban alkalmazva)

nem hasította a mitokondriális mátrix frakció, amely arra utal, hogy a mitokondriális invertáz nem rendelkezik β -fruktofuranozidáz aktivitással.



32. ábra A mitokondriális invertáz aktivitás pH optimuma, kinetikai sajátosságai

Az inkubációs hőmérséklet emelése lényegesen fokozta az enzimaktivitást (8. táblázat). A tipikus alkalikus/neutrális invertáz gátló Tris szignifikánsan, koncentrációfüggő módon gátolta a mátrix invertáz enzimaktivitást (8. táblázat). Gyakorlatilag teljes mértékben gátolta az enzim aktivitását a HgCl_2 , AgNO_3 , ZnCl_2 és a CuSO_4 1 mM-os koncentrációban. A tipikus alkalikus invertáz gátlószerek, mint a MgCl_2 és a CaCl_2 (mindkettő 1 mM-os koncentrációban) azonban teljesen hatástalannak bizonyultak, megerősítve, hogy a mitokondriális invertáz a neutrális invertázok családjába tartozik. A reakció mindkét terméke, a fruktóz és a glükóz is gátolta a szacharóz hasítását (8. táblázat). A glükóz és fruktóz hozzáadására viszont nem tapasztaltunk szacharóz képződést a mátrix frakcióban.

8. táblázat Különböző anyagok hatása mitokondriális invertáz aktivitásra

Hozzáadott anyag	Invertáz aktivitás (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Gátlás (%)
kontroll (szoba hőm.)	11.64 ± 0.47 (9)	0
37 °C	26.93 ± 0.47* (3)	NA
Tris (1 mM)	3.00 ± 0.48* (3)	74
Tris (10 mM)	1.49 ± 0.24* (3)	87
ZnCl ₂ (1 mM)	0* (3)	100
CuSO ₄ (1 mM)	0* (3)	100
HgCl ₂ (1 mM)	1.33 ± 0.23* (3)	89
AgNO ₃ (1 mM)	1.35 ± 0.27* (3)	88
ZnCl ₂ (0.1 mM)	1.84 ± 0.09* (3)	84
CuSO ₄ (0.1 mM)	6.30 ± 0.08* (3)	46
HgCl ₂ (0.1 mM)	6.04 ± 0.14* (3)	48
AgNO ₃ (0.1 mM)	7.33 ± 0.10* (3)	37
MgCl ₂ (1 mM)	11.30 ± 0.52 (3)	3
CaCl ₂ (1 mM)	11.97 ± 0.41 (3)	0
Glükóz (40 mM)	0* (3)	100
Fruktóz (4 mM)	9.08 ± 0.61(3)*	22
Fruktóz (40 mM)	5.57 ± 0.13 (3)*	52

* szignifikáns a kontrollhoz képest, $p < 0.05$

Elmondhatjuk, hogy kísérleteink során funkcionálisan bizonyítani tudtuk, hogy invertáz aktivitás található a mitokondriumban, még pontosabban a mitokondriális mátrixban (7. táblázat). A vizsgált enzimet, pH optimuma alapján neutrális invertáznak sorolhatjuk be. Ezt a besorolást további megfigyelések is megerősítik: 1. az enzim K_m értéke a már ismert neutrális invertázok K_m érték tartományába esik (Lee és Sturm 1996, Gallagher és Pollock 1998, Vorster és Botha 1998, Sturm 1999); 2. az enzim aktivitása olyan tipikus neutrális invertáz inhibitorokkal gátolható, mint a Tris, a fruktóz, az AgCl₂, a HgCl₂, a CuSO₄ és a ZnCl₂ (Lee és Sturm 1996, Gallagher és Pollock 1998, Vorster és Botha 1998, Sturm 1999); 3. az enzim nem gátolható az olyan tipikus alkalikus invertáz gátlókkal, mint a MgCl₂ és a CaCl₂ (Lee és Sturm 1996, Gallagher és Pollock 1998, Vorster és Botha 1998, Sturm 1999); 4. enzimünk más neutrális invertázokhoz hasonlóan specifikus a szacharózra és nem mutat β -fruktofuranozidáz aktivitást (Gallagher és Pollock 1998, Sturm 1999).

3.8.1. A kapcsolódó cukor transzporterek jellemzése

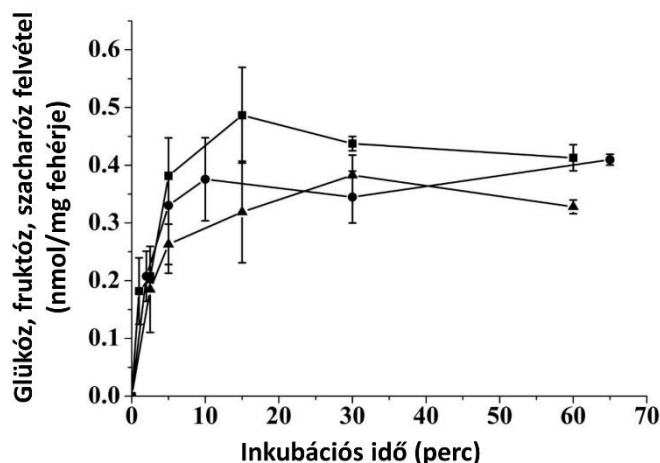
A mitokondriális mátrixban elhelyezkedő invertáz aktivitás, a mitokondriális belső membránon keresztüli szénhidrát forgalom meglétét igényli, amely során a szacharóz belép, míg az invertáz aktivitás során képződő glükóz és fruktóz elhagyja a mitokondriumot. Mindazonáltal az sem elképzelhetetlen, hogy a glükóz és fruktóz továbbalakul, vagy felhalmozódik a mitokondriumban. A folyamat részletesebb vizsgálata során a szacharóz csicsóka mitokondriumhoz adagolását követően vizsgáltuk a fruktóz és a glükóz megjelenését a mitokondriális mátrixban és az extramitokondriális közegben. A mátrixban és az inkubációs közegben igen hasonló fruktóz koncentrációkat tudtunk mérni (4.81 ± 0.46 vs. 5.13 ± 0.20 mM) 2 órás 100 mM szacharózzal történő inkubációt követően. (Szacharóz hozzáadása nélkül a fruktóz jelenléte kimutathatatlan volt.) Ez alapján arra következtethetünk, hogy a glükóz és a fruktóz mitokondriális felhalmozódása nem következik be. Ugyanakkor ez a megfigyelés fruktóz és glükóz transzporterek meglétére utalt a mitokondriális belső membránban.

A porin csatornák kiváló útvonalat biztosítanak a külső mitokondriális membránon keresztül a kis molsúlyú (kisebb, mint 5000 Da) anyagcsere köztitermékek számára (pl. ATP, ADP, szukcinát) (Colombini 1979). Nem meglepő módon a külső mitokondriális membrán nem is befolyásolta a mitokondriális glükóz transzportot dohány mitokondriumok esetében (3.1. fejezet, Szarka és mtsai 2004). Ennek megfelelően, a cukrok felvétele ez esetben is teljesen hasonlóan bizonyult mitokondriumok és mitoplasztok esetében (9. táblázat).

9. táblázat Fruktóz, szacharóz és glükóz felvétel csicsóka mitokondriumba és mitoplasztba

Ligand	Felvétel ($\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ protein)	
	mitokondrium	mitoplaszt
Fruktóz	0.36 ± 0.01 (3)	0.38 ± 0.02 (3)
Szacharóz	0.34 ± 0.06 (3)	0.36 ± 0.03 (3)
Glükóz	0.32 ± 0.01 (3)	0.33 ± 0.02 (3)

Ezért minden további transzportmérést intakt mitokondriumokon végeztünk. Tekintve, hogy a növényi sejtek mitokondriális glükóz transzporterét már a korábbiakban leírtuk (3.1. fejezet, Szarka és mtsai 2004) inkább a másik két cukor transzportjára fókuszáltunk. A frissen izolált csicsóka mitokondriumok mind a három radioaktívan jelzett cukrot (fruktóz, glükóz, szacharóz) felvették (33. ábra). Ahogy a módszerek leírásánál jeleztük a pórusképző alameticinnel együtt inkubált minták segítségével meghatároztuk a radioaktívan jelölt anyagok nem specifikus kötődését. Az alameticin jelenlétében a mitokondriumhoz kötődött radioaktivitás a megfelelő kontroll érték kevesebb, mint 20%-a volt. A glükóz, fruktóz és szacharóz felvétel 5-10 perc alatt elérte az állandósult állapotot (33. ábra).



33. ábra A mitokondriális szacharóz (▲), glükóz (■), fruktóz (●) felvétel időfüggése

Megfigyeléseinkhez hasonlóan paradicsom tonoplaszt membránok esetében is gyors és időfüggő glükóz, fruktóz és szacharóz felvételt számoltak be (Milner és mtsai 1995). A különböző cukor transzportfolyamatok kinetikai paramétereinek meghatározása

céljából különböző extramitokondriális cukorkoncentrációknál (0.25-50 mM) végeztük el a cukorfelvétel vizsgálatokat. A különböző cukrok esetében eltérő kinetikai jellegzetességeket tudtunk megfigyelni. A Lineweaver–Burk módszerrel számolva, a glükóz és fruktóz transzport nagyobb affinitással és kisebb kapacitással jellemezhető (10. táblázat). Itt érdemes megjegyeznünk, hogy az Eadie–Hofstee módszerrel számolva igen hasonló kinetikai paramétereket kaptunk.

10. táblázat A mitokondriális fruktóz, szacharóz és glükóz felvétel kinetikai paramétere

Ligand	K_m (mM)	v_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)
Fruktóz	8.4	3.65
Szacharóz	57.1	15.13
Glükóz	10.4	2.89

A mitokondriális szacharóz felvétel jóval alacsonyabb affinitást (K_m 57 mM) mutatott, mint a glükóz és a fruktóz felvétele (K_m 10.4 és 8.4 mM). A szacharóz felvétel 57 mM-os K_m értéke meglehetősen magasnak tűnik, azonban érdemes megjegyeznünk, hogy a metabolitok szubcelluláris eloszlásával kapcsolatos tanulmányok igen magas citoszolikus szacharóz koncentrációkról számoltak be. Burgonya gumók esetében 41 mM-os (Farré és mtsai 2001), cukornád szuszpenziós sejtek esetében 180 mM-os (Preisser és mtsai 1992), zeller esetében 86 mM-os és őszibarack esetében 106 mM-os (Nadwodnik és Lohaus 2008) citoszolikus szacharóz koncentrációkat mértek. Másfelől a már említett tonoplaszt tanulmány még magasabb K_m értékekről számolt be, 232 mM-ról a szacharóz, 122 mM-ról a glükóz és 120 mM-ról a fruktóz transzport esetében (Milner és mtsai 1995).

A különböző cukortranszportok lehetséges interakcióját vizsgálva a lehetséges kompetáló cukrok 30-szoros feleslegében is meghatároztuk az egyes cukrok felvételét. Mindegyik cukor gyenge, statisztikailag nem szignifikáns gátló hatást gyakorolt a másik két cukor felvételére (11. táblázat). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a három különböző cukor, három különböző transzportert használ a mitokondriális belső membránon keresztüli átjutására. Mindenesetre, ha

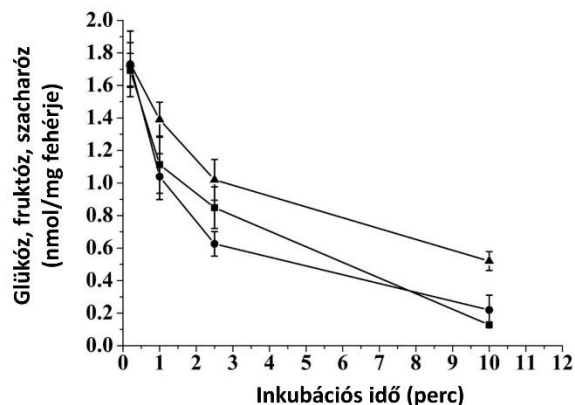
egy transzportert is használnak, akkor sem versengenek egymással a kötőhelyért. Ezt a feltételezést erősíti a genistein és az aszkorbát cukortranszport folyamatokra gyakorolt eltérő hatása is (11. táblázat). A glükóz (3.1. fejezet, Szarka és mtsai 2004) és a szacharóz (11. táblázat) transzportját szignifikáns mértékben gátolta az ismert GLUT1 gátlószer genistein (Vera és mtsai 1996), viszont a fruktóz transzportjára semmiféle hatást sem gyakorolt (11. táblázat). A glükóz transzportot szignifikánsan gátolta az aszkorbát (3.1. fejezet, Szarka és mtsai 2004), azonban a szacharóz és a fruktóz transzportjára semmiféle hatást sem gyakorolt (11. táblázat). A korábban már említett paradicsom tonoplaszt transzport esetében is három különböző transzporter jelenlétét feltételezték a hasonlóan hiányzó keresztgátlások miatt (Milner és mtsai 1995).

11. táblázat Különböző anyagok hatása a mitokondriális fruktóz, szacharóz és glükóz felvételre

Reagens	Felvétel (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)		
	fruktóz	szacharóz	glükóz
Kontroll	0.34 ± 0.11 (12)	0.33 ± 0.12 (9)	0.21 ± 0.03 (5)
Fruktóz (30 mM)	N.M.	0.28 ± 0.17 (5)	0.18 ± 0.08 (3)
Szacharóz (30 mM)	0.28 ± 0.05 (5)	N.M.	0.20 ± 0.08 (3)
Glükóz (30 mM)	0.26 ± 0.08 (5)	0.26 ± 0.14 (5)	N.M.
Szukcinát (5 mM)	0.26 ± 0.03 (6)	0.24 ± 0.05 (6)	0.20 ± 0.03 (3)
KCN (1 mM)	0.29 ± 0.02 (3)	0.28 ± 0.06 (3)	N.M.
2,4-Dinitrofenol (0.1 mM)	0.29 ± 0.11 (3)	0.28 ± 0.02 (3)	N.M.
DEPC (1.5 mM)	N.M.	0.30 ± 0.02 (3)	N.M.
Aszkorbát (30 mM)	0.30 ± 0.02 (3)	0.28 ± 0.05 (3)	N.M.
Maltóz (30 mM)	N.M.	0.32 ± 0.08 (3)	N.M.
Tris (10 mM)	N.M.	0.43 ± 0.02 (3)*	N.M.
Genistein (0.25 mM)	0.22 ± 0.07 (3)	0.16 ± 0.03 (3)*	N.M.

* szignifikáns a kontrollhoz képest, $p < 0.05$, N.M.: nem történt mérés

A mitokondriumokat 60 percig szacharózzal, fruktózzal, glükózzal feltöltve, majd cukormentes pufferrel 50-szeresére kihígítva a jelölt cukormolekulák kiáramlását (effluxát) lehetett megfigyelni (34. ábra). Ez arra utal, hogy mindegyik cukor transzportja kétirányú. A felvétel kinetikájához hasonlatosan igen gyors volt a glükóz, fruktóz és szacharóz kiáramlása is az előre feltöltött mitokondriumokból (34. ábra).



34. ábra A szacharóz (▲), fruktóz (●), glükóz (■) efflux transzportja, előre ^{14}C -cukorral feltöltött mitokondriumokból

A transz-sztimulációs kísérlettel igen ötletesen lehet azt meghatározni, hogy egy anyag felvétele, vagy kiáramlása csatorna, vagy karrier mediálta folyamat-e (Stein 1990). A membrán zsákocskákat előre nagy koncentrációjú, nem jelölt (hideg) anyaggal

töltjük fel. Amennyiben a transzportfolyamat karrier mediált, akkor a nagy koncentrációjú transz oldali (a vezikula belsejében található) ligand elősegíti a transzportot. Ezzel szemben a csatorna mediálta transzport sebessége csökken a nagy belső ligand koncentráció hatására, mivel a csatornán keresztüli transzportot mindig a kémiai potenciálkülönbség hajtja (Stein 1990). Kísérleteink során a mitokondriumok hideg cukrokkal való előzetes feltöltése mérsékelt stimulációs hatást gyakorolt a vizsgált cukor transzportokra, ami arra utal, hogy a vizsgált cukor transzportfolyamatok karrier és nem csatorna mediált folyamatok. Ahogy azt már korábban írtuk, a mitokondriális membrántranszport folyamatok igen gyakran függenek a membránpotenciáltól. Annak érdekében, hogy ezt a lehetőséget is megvizsgáljuk a cukorfelvételeket megmértük egy légzési szubsztrát, a szukcinát, egy légzési gátlószer a KCN és egy szétkapcsolószer, a 2,4-dinitrofenol jelenlétében is. Sem a KCN, sem a 2,4-dinitrofenol nem gyakorolt semmiféle hatást sem a fruktóz, vagy a szacharóz felvételére (11. táblázat). A szukcinát az alkalmazott koncentrációban nem szignifikáns mértékben gátolta az összes vizsgált anyag felvételét (11. táblázat). Habár egyetlen, a mitokondriális membrán potenciált befolyásoló anyag sem gyakorolt hatást a cukrok felvételére, megvizsgáltuk a szacharóz/ H^+ szimporter konzervált 65-ös hisztidinjéhez kapcsolódó, így azt gátló (Lu és Bush 1998, Lemoine 2000) DEPC hatását is. Ahogy azt várni lehetett, ez sem gyakorolt semmiféle hatást sem a mitokondriális szacharóz felvételre (11. táblázat). Az aszkorbát gátolta a mitokondriális glükóz felvételt (3.1. fejezet, Szarka és mtsai 2004), ezért a másik két cukor felvételét is megpróbáltuk gátolni vele, azonban ez esetben a hatás elmaradt (11. táblázat). Ahogyan a diszacharid maltóz sem gátolta a mitokondriális szacharóz felvételt (11. táblázat). A Tris viszont szignifikáns mértékben fokozta a mitokondriumok ^{14}C -jelölt szacharóz hozzáadására mérhető radioaktivitását (11. táblázat). Könnyen elképzelhető, hogy a jelenség hátterében a Tris mitokondriális invertázra gyakorolt gátló hatása lehet (8. táblázat). A gátló hatás révén ugyanis a felvett szacharóz kisebb hányada hasad glükózzra és fruktózzra és ezáltal csak kisebb mértékű radioaktivitás hagyja el a mitokondriumot glükóz, vagy fruktóz formájában.

Annak érdekében, hogy eldöntsük, hogy a transzport limitálja-e az invertáz aktivitást, alameticinnel permeabilizált és nem permeabilizált mitokondriumokat inkubáltunk együtt szacharózzal, majd meghatároztuk az invertáz aktivitást. Egyértelműen magasabb invertáz aktivitást tudtunk mérni az alameticinnel kezelt mitokondriumok esetében, mint az intaktakban ($23.11 \pm 0.46 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ vs. $13.95 \pm 1.22 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 37°C -on). Ez a megfigyelésünk

egyértelműen arra utal, hogy a folyamat sebesség meghatározó lépése nem az enzim aktivitása, hanem valamelyik transzportfolyamat, ugyanakkor egy újabb bizonyítékot szolgáltat arra is, hogy az invertáz aktivitás egyértelműen a mitokondriális mátrixban helyezkedik el.

A csicsóka mitokondrium esetében a vizsgált cukrok transzportja a légzéstől, a mitokondriális membránpotenciáltól függetlennek és kétirányúnak bizonyult. A cukrok felhalmozódását nem lehetett megfigyelni. Mindezen tulajdonságokat együttevén igen valószínű, hogy a vizsgált cukrok mitokondriális felvétele facilitált diffúzióval történik. Ezekkel az eredményekkel, megfigyelésekkel ellentétben a legtöbb eddig karakterizált növényi monoszacharid transzporter energia-függő proton gradiens kapcsolt transzporter (Büttner 2007, Büttner és Sauer 2000). Viszont vakuóla, tonoplaszt zsákok és mitokondrium esetében facilitált glükóz és fruktóz transzportról számoltak be (Daie és Wilusz 1987, Milner és mtsai 1995, Szarka és mtsai 2004, Neuhaus 2007). A növényi szacharóz transzportereket szintén proton szimportereknek tartották (Lalonde és mtsai 1999, 2004). Ez idáig mindössze szórványos adatok és megfigyelések láttak napvilágot szacharóz facilitált transzportjáról növényi sejtekben (ezen belül is elsősorban tonoplaszt membránokban (Preisser és Komor 1991, Shiratake és mtsai 1997, McRae és mtsai 2002, Milner és mtsai 1995, Neuhaus 2007). Zhou és mtsai (2007) azonban a szacharóz transzporterek egy új alcsoportját írta le borsó és bab növényekben. A mitokondriális szacharóz transzporterünkhöz hasonlóan, a Zhou és mtsai által felfedezett alcsoport tagjai is viszonylag magas K_m értékkel (8.9–99.8 mM), proton és energia független kétirányú transzportmechanizmussal jellemezhetőek. Végezetül az általunk vizsgált mitokondriális cukor transzportokhoz hasonlóan az új alcsoport tagjait sem lehetett DEPC-cel, maltózzal, a H^+ -szimporterek tipikus gátlószereivel gátolni (Zhou és mtsai 2007).

Igen valószínű, hogy a jelenleg leírásra került mitokondriális cukor transzportok és a mátrixban elhelyezkedő invertáz aktivitás között funkcionális kapcsolat van. Tekintve, hogy az enzim nem katalizálja a glükózból és fruktózból kiinduló szacharóz képződést, valamint a szacharóz hasítási termékei szinte azonnal megjelennek az inkubációs közegben, a következő modellt valószínűsíthetjük: a mitokondrium egy szacharóz transzporter segítségével felveszi a citoszolból a szacharózt. A szacharózt glükózra és fruktózzra hasítja a mátrixban található neutrális invertáz, majd a termékek visszaszállításra kerülnek a citoszolba. Az a feladvány még megfejtésre vár, hogy mi a mitokondriális invertáz rendszer funkcionális szerepe a növényekben. Egy lehetséges szerepkört vet fel a prokarióta analógia. Egy baktérium, a *Zymomonas mobilis* ugyanis rendelkezik egy, a jelenleg leírthoz hasonló szacharóz-glükóz/fruktóz útvonallal, amelynek fontos szerepe lehet az ozmoregulációban (Loos és mtsai 1994). Ozmotikus stresszhelyzetben a baktériumok szacharózt vesznek fel, azt hasítják invertáz enzimaktivitásuk révén glükózra és fruktózzra. A mitokondrium bakteriális eredete és a bakteriális analógia miatt könnyen elképzelhető, hogy a magasabb rendű növényekben (csicsóka) 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 ozmolitok, a cukoralkoholok termelésének. Termelésük által a növények könnyebben birkózhatnak meg a szárazság és a szikes talajok jelentette ozmotikus stresszel.

Ugyanakkor a mitokondriális invertáz rendszer az intermedier anyagcserében is részt vehet. Kiderült, hogy pozitív korreláció van a glikolitikus enzimek mitokondrium felszínéhez történő asszociációjának mértéke és a mitokondriális légzés között (Graham és mtsai 2007). Ez a megfigyelés egyértelműen arra utal, hogy funkcionális kapcsolat állhat fenn a mitokondriális légzés és a glikolitikus útvonal között. Az invertáz rendszer révén a mitokondrium befolyásolhatja a glikolízis tápanyagellátását és ezen keresztül a légzés piruvát ellátását. Természetesen mindkét hipotézis igazolására kísérletes bizonyítékot kell szolgáltatnunk.

3.9. *In silico* támogatott gondolatok a mitokondriális C-vitamin transzportról

2014 tavaszára a mitokondriális C-vitamin transzportról alkotott képünk meglehetősen összekuszálódott. A GLUT transzporterek kezdetben szilárdnak tűnő szerepe megkérdőjeleződött a kezdetben kizárt SCVT transzporterek szerepe pedig megerősödött a mitokondriális belső membránon keresztüli C-vitamin transzport folyamatában (Bánhegyi és mtsai 2014). Ezen a ponton kértünk segítséget néhány *in silico* lokalizációs eszköztől, hogy tisztábban lássuk az *in vitro* és *in vivo* nyert eredményeket. Mind az *in vitro*, mind az *in vivo* módszerek számos technikai korláttal rendelkeznek a fúziós, vagy címkézett fehérjék lehetséges interferenciájából, vagy a keresztszennyezésből adódóan (Emanuelsson és mtsai 2007). Ezen kívül mindkettő meglehetősen idő- és munkaigényes, valamint drága. A számítógépes megközelítés kizárólag a fehérjék szekvenciáján nyugszik, gyors és meglehetősen pontos. A kísérletes módszerek és a számítási eszközök, amelyek valószínűségi pontszámot rendelnek, egy adott fehérje bizonyos sejtalkotóban történő elhelyezkedése mellé kiválóan kiegészítik egymást. Ezeket a pontszámokat használhatjuk fel arra, hogy nagy áteresztőképességű vizsgálatokat végezzünk, javítsuk a kísérletes eredmények hatásfokát, áteresztőképességét. Természetesen tisztában vagyunk azzal, hogy egyetlen egy módszer sem rendelkezik kellő érzékenységgel, ezért 8 különböző eszközt alkalmaztunk vizsgálataink során, amelyek eltérő algoritmus alapján tették meg elhelyezkedési jóslásaikat.

A választottaink között volt: 1. a TargetP (Emanuelsson és mtsai 2000), amely neurális hálózatok kombinációját használja, hogy megadja a fehérje elhelyezkedési pontszámát és egy súlyozott mátrixot, hogy meghatározza a szignál peptid vágási helyét; 2. a Mitoprot (Claros és Vincens 1996), amely egy tulajdonság alapú módszer, amely olyan tulajdonságok lineáris kombinációját használja, mint például az aminosavak előfordulási gyakorisága, a maximális hidrofobicitás és a maximális hidrofobicitási momentum; 3. a Predotar (Small és mtsai 2004), amely egy neurális hálózat alapú megközelítés; 4. a PSORT II (Nakai és Horton 1999), amely legközelebbi szomszéd analízisen alapul; 5. a MultiLoc (Höglund és mtsai 2006) egy tartóvektor-gép (Support Vector Machine; SVM) alapú megközelítés, amely integrálja az N-terminális célszekvenciákat, az aminosav összetételt és a fehérjeszekvencia részleteket az elhelyezkedés megállapítására; 6. az ngLOC (King és mtsai 2012), amely egy n-gram alapú Bayes-osztályozó; 7. az YLoc (Briesemeister és mtsai 2010), amely egy egy interpretálható web-szerver, amely gén ontológiai (GO) sajátosságokat is használ az elhelyezkedés

megállapításához; 8. a CELLO (Yu és mtsai 2006), amely egy többosztályos SVM alapú osztályozó rendszer, ami négy különböző szekvencia kódoló sémát használ. Az eredmények ismertetése előtt még egy fontos megállapítást kell megemlítenünk, a számításos szubcelluláris elhelyezkedést becsülő módszerek különböző hatásfokkal dolgoznak (Sprenger és mtsai 2006). Szerencsére a mitokondriális elhelyezkedés becslése egyike a legprecízebbeknek (Sprenger és mtsai 2006). Négy ismert mitokondriális elhelyezkedéssel rendelkező transzportfehérjét választottunk ki mitokondriális elhelyezkedési sztenderdnek, etalonnak. Mind a négy etalonfehérje esetében, ugyanazzal a 8 elhelyezkedést becsülő eszközzel elvégeztük a mitokondriális elhelyezkedési pontszámok kiszámítását, amelyeket a későbbiekben a GLUT és az SCVT család tagjai esetében is alkalmaztunk (12. táblázat). Érdekes módon két különböző típusú variabilitást láthattunk. Egyfelől, egyértelműen látszott a különbség a becslést végző eszközök között (12. táblázat). Másfelől egyértelmű különbséget lehetett megfigyelni a különböző mitokondriális etalonfehérjék elhelyezkedési pontszámában. Az etalonfehérjéket három különböző csoportba lehetett sorolni. A 8 eszköz közül 6 kimondottan magas, 2 pedig közepes pontszámot adott a CPT2 mitokondriális elhelyezkedésére (12. táblázat). A fehérje N-terminális szignál szekvenciáját tehát nagy valószínűséggel azonosítják mitokondriális irányítószignálként. Ugyanakkor a DIC a legtöbb eszköztől (kivéve a MultiLoc/TargetLoc és az ngLOC) jóval alacsonyabb pontszámokat kapott, tehát ennek az N-terminális szignál szekvenciáját jóval kisebb valószínűséggel ismerik fel mitokondriális irányító szekvenciaként (12. táblázat). Az MPC2 és az MPCP egy átmeneti csoportot képeztek, köztes mitokondriális elhelyezkedést jósoló pontszámokkal (12. táblázat).

12. táblázat. Különböző mitokondriális transzporter fehérjék *in silico* mitokondriális elhelyezkedés-becslése

Fehérje	N-terminális szekvencia a FASTA címkével	Target P	Mitoprot	Predotar	PSORT II	MultiLoc / TargetLoc	ngLOC	yLoc	Cello
MPC2	>sp09556/MPC2_HUMAN Mitochondrial pyruvate carrier 2 OS=Homo sapiens GN=MPC2 PE=1 SV=1 MSAAGARGLRATYHRLLDKVELMLPEKL RPLYNHGAPRTVFFWAPIMKWLVCAG LADM	0.607	0.8369	0.05	30.4%	0.87	14.73	99.8% (0.82)	2.781
MPCP	>spQ00325/MPCP_HUMAN Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SLC25A3 PE=1 SV=2 MFSSVAHLARANPNTPHLQLVHDGLGDI RSSSPGPTGQPRPRNLAAAEEQYSCD YG	0.668	0.6828	0.03	30.4%	0	48.1	99.9 (0.95)	1.217
DIC	>spQ9UBX3/DIC_HUMAN Mitochondrial dicarboxylate carrier OS=Homo sapiens GN=SLC25A10 PE=1 SV=2 MAAEARVSRWYFGGLASCGAACCTHPLD LLKVHLQTOQEVKLRMTGMALRVVRTDG ILAL	0.384	0.4777	0.00	8.7%	0.87	69.59	14.8 (0.00)	1.606
CPT2	>spP23786/CPT2_HUMAN Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=CPT2 PE=1 SV=2 MVPRLRLRAWPRGPAVGAPSRPLSAGS GPGQYLQRSIVPTMHVQDSLPLPIPKLED T	0.930	0.9970	0.90	78.3%	0.15	53.03	99.96 (0.93)	1.337

MPC2: Mitokondriális piruvát carrier 2, MPCP: Mitokondriális foszfát carrier protein, DIC: Dikarboxilát carrier, CPT2: Carnitine O-palmitoiltranszferáz 2

A mitokondriális etalon fehérjékhez hasonlóan, mindegyik eszköz (kivéve az ngLOC) jó esélyt adott a GLUT1 mitokondriális elhelyezkedésének (13. táblázat). A GLUT1-5, 7 családtagokat vizsgáló egyetlen *in silico* eszközöket alkalmazó tanulmány három különböző eszközt használt (TargetP, Mitoprot, Predotar) (KC és mtsai 2005).

13. táblázat. A humán GLUT (SLC2) család *in silico* mitokondriális elhelyezkedés-bebecslése

Fehérje	N-terminális szekvencia a FASTA címkevel	Target P	Mitoprot	Predotar	PSORT II	MultiLoc / TargetLoc	ngLOC	yLoc	Cello
Glut 1 - Slc2A1	>spP11166GTR1_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 OS=Homo sapiens GN=SLC2A1 PE=1 SV=2 MEPSSKKLTGRLMLAVGGAVLGSQF GYNIGVINAPQKVIEEFYNQI WVHRY GESILPTT	0.167	0.4341	0.03	13.0 %	0.41	-	0,5% (0,65)	1.333
Glut 2 - Slc2A2	>spP1168GTR2_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2 OS=Homo sapiens GN=SLC2A2 PE=1 SV=1 MIEDKVTGLVFTVITAVLGSFQFGY DIGVINAPQQVHSHYHVLGVPLDDR KAINNVV	0.026	0.1606	0	11.1%	-	5,635	0,0% (0,96)	0.514
Glut 3 - Slc2A3	>spP1169GTR3_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3 OS=Homo sapiens GN=SLC2A3 PE=1 SV=1 MGTQKVTPLAFATVATIGSFQFGYN IGVINAPKEIKIEFINKILIDKGNAPP EVLIT	0.028	0.1775	0	11.1%	-	-	0,0% (0,97)	0.949
Glut 4 - Slc2A4	>spP14672GTR4_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4 OS=Homo sapiens GN=SLC2A4 PE=1 SV=1 MPSGFQIQSGEDGEPPQQRVTGTLVLA VISAVALGSLQFGYNGVINAPQKVIEQ SYNEIW	0.034	0.0191	0	21,7%	-	-	0,0% (0,40)	0.695
Glut 5 - Slc2A5	>spP22732GTR5_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5 OS=Homo sapiens GN=SLC2A5 PE=1 SV=1 MEQQQDSMKEGRLTLVLAATLIAAF GSSFGYGYNVAAVNSPALLMQQFYNE TYVGRIGE	0.017	0.0253	0	11.1%	-	-	0,0% (0,64)	0,486
Glut 5 - Slc2A5 isoform 2	>spP22732-2GTR5_HUMAN Isoform 2 of Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5 OS=Homo sapiens GN=SLC2A5 MFQQQDSMKEGRLTLVLAATLIAAF GSSFGYGYNVAAVNSPALLMQQFYNE TYVGRIGE	0.017	0.0253	0	11.1%	-	-	0,0% (0,64)	0,486
Glut 6 - Slc2A6	>spQ9UGQ3-2GTR6_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 6 OS=Homo sapiens GN=SLC2A6 PE=1 SV=2 MQPELLGALGPDYDITPEKPPSPGDR ARVGTQNKRVLFATFAVLGNFSFG YALVYTS	0.091	0.0284	0	8.7%	-	-	0,2% (0,14)	0,935
Glut 6 isoform2	>spQ9UGQ3-2GTR6_HUMAN Isoform 2 of Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 6 OS=Homo sapiens GN=SLC2A6 MQPELLGALGPDYDITPEKPPSPGDR ARVGTQNKRVLFATFAVLGNFSFG YALVYTS	0.091	0.0284	0	8.7%	-	-	0,2% (0,14)	0,935
Glut 7 - Slc2A7	>spQ6PXP3GTR7_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 7 OS=Homo sapiens GN=SLC2A7 PE=2 SV=2 MENKLAGTPPPPSREGRLQPTLLAATL SAAGSFAFYGYNLSVNTPHKVFES FYNETY	0.030	0.1891	0	21,7%	-	-	0,1% (0,11)	0,988
Glut 8 - Slc2A8	>spQ9NY64GTR8_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 8 OS=Homo sapiens GN=SLC2A8 PE=1 SV=3 MTPEDEPETQPLPPGGSAPRRRVF LAFAAALGPLSFGFALGYSSPAISLQ RAAPF	0.130	0.0143	0	13.0%	-	-	0,8% (0,08)	0,591
Glut 9 - Slc2A9a	>spQ9NRM0GTR9_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 9 OS=Homo sapiens GN=SLC2A9 PE=1 SV=2 MARKQNRNSKELGLVPLTDOTSHAGP PGGRALLCEDHLRSGVPGRRRKDW SCSLVAS	0.253	0.9044	0	34.8%	-	-	0,5% (0,05)	0,712
Glut 9 - Slc2A9b isoform2	>spQ9NRM0-2GTR9_HUMAN Isoform 2 of Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 9 OS=Homo sapiens GN=SLC2A9 MKLSKKDRGEDELSDSAKKLDWSCS LLVASLAGAFSSFLYGYNLSVNVNAPI PYIAEY	0.035	0.0487	0	22,2%	-	-	0,1% (0,05)	0,774
Glut 10 - Slc2A10	>spQ9S528GTR10_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 10 OS=Homo sapiens GN=SLC2A10 PE=1 SV=2 MGHSPVPLPCASVSLGGLTFGYELA VISGALLPLQLDFGLSCLQEFLVGSLL LGALL	0.020	0.0175	0	4,3%	-	-	0,0% (0,97)	0,502
Glut 11	>spQ9BYW1GTR11_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 11 OS=Homo sapiens GN=SLC2A11 PE=2 SV=1 MRALRRLLQGRILLTICAAGIGGTQF GYNLSINAPILHIQEFNETWQARTG EPLPD	0.485	0.9739	0.22	-	-	-	5,7% (0,91)	1,403
Glut 11 - Slc2A11 isoform 2	>spQ9BYW1-2GTR11_HUMAN Isoform 2 of Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 11 OS=Homo sapiens GN=SLC2A11 MLHALLRSRMQGRILLTICAAGIGG TFQGYNLSINAPILHIQEFNETWQA RTGEP	0.474	0.1447	0,58	30,4%	-	-	8,0% (0,79)	1,453
Glut 11 isoform 3	>spQ9BYW1-3GTR11_HUMAN Isoform 3 of Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 11 OS=Homo sapiens GN=SLC2A11 MLHALLRSRMQGRILLTICAAGIGG TFQGYNLSINAPILHIQEFNETWQA RTGEP	0.474	0.1447	0,58	30,4%	-	-	8,0% (0,79)	1,453
Glut 11 isoform 4	>spQ9BYW1-4GTR11_HUMAN Isoform 4 of Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 11 OS=Homo sapiens GN=SLC2A11 MEDELEPSLRPTQIQGRILLTICAAG IGGTQFGYNLSINAPILHIQEFNET WQAR	0.032	0.2340	0	17,4%	-	-	0,0% (0,52)	0,890

Fehérje	N-terminális szekvencia a FASTA címkével	Target P	Mitoprot	Predotar	PSORT II	MultiLoc / TargetLoc	ngLOC	yLoc	Cello
Glut 12 - Slc2A12	>sp Q8TD20 GTR12_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 12 OS=Homo sapiens GN=SLC2A12 PE=2 SV=1 MYPVTEGTPSLNQGTAVETEGSG SRHPWPARGCGMFTLSSVTAAYSG LVGYELGI	0.216	0.0370	0	11.1%	-	16,67	0,1% (0,30)	0,690
Glut 13 - Slc2A13	>tr Q86X07 Q86X07_HUMAN SLC2A13 protein OS=Homo sapiens GN=SLC2A13 PE=2 SV=1 MGERRRKQPEPDAASAAGECSLLAA ESSTLSQAGAGGGVGDLEAARRQ FQDDETPA	0.132	0.0516	0	30,4%/	-	-	0,0% (0,34)	0,545
Glut 13 - Slc2A13	>sp Q96DE2 MYCT_HUMAN Proton myo-inositol cotransporter OS=Homo sapiens GN=SLC2A13 PE=1 SV=3 MSRRKASFNVTYTRSLMIGERRRK QPEPDAASAAGECSLLAAESSTLSQ AGAGGGG	0.508	0.9743	0,11	43,5%	-	-	0,6% (0,04)	0,651
Glut 13 - Slc2A13	>tr E9PE47 E9PE47_HUMAN Proton myo-inositol cotransporter OS=Homo sapiens GN=SLC2A13 PE=2 SV=1 MSRRKASFNVTYTRSLMIGERRRK QPEPDAASAAGECSLLAAESSTLSQ AGAGGGG	0.508	0.9743	0,11	43,5%	-	-	0,6% (0,04)	0,651
Glut 14 - Slc2A14	>sp Q8TDB8 GTR14_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14 OS=Homo sapiens GN=SLC2A14 PE=2 SV=1 MEFHNGGHVSGIGFLVSLTSRMKPH TLAVTPALIFAITVATIGSFQGYNTGV INAPET	0.413	0.0417	0	11.1%	-	-	0,3% (0,76)	0,880
Glut 14 - Slc2A14 isoform 2	>sp Q8TDB8-2 GTR14_HUMAN Isoform 2 of Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14 OS=Homo sapiens GN=SLC2A14 MDNRQNVTPALIFAITVATIGSFQGY NTGVINAPETIKFEINKTLTDKANAPP SLVLL	0.031	0.0483	0	34,8%	-	-	0,0% (0,88)	0,820
Glut 14 - Slc2A14 isoform 3	>sp Q8TDB8-3 GTR14_HUMAN Isoform 3 of Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14 OS=Homo sapiens GN=SLC2A14 MIGLGGMAFCSLMIYVSLLLKNHYNG MSFVCIGAILVFVACFEIGPGIPWFIV AELFSQ	0,071	0,2139	0,15	22,2%	-	-	0,0% (1,00)	0,563

Teljesen hasonló mitokondriális pontszámokat kaptunk, kivéve a Predotar esetében. A GLUT1 mitokondriális elhelyezkedési pontszámunk 0.03 volt (13. táblázat), míg KC és mtsai 0.97-et kaptak. Azt gondoljuk, hogy csupán egy elírásról van szó, mivel az összes többi pontszám majdnem, vagy teljes mértékben megegyezett. A GLUT1 mitokondriális elhelyezkedésének nagy valószínűsége még szembeötlőbb, ha pontszámait összevetjük a GLUT2-től GLUT8-ig tartó GLUT tagok és a mitokondriális etalon fehérje a DIC mitokondriális elhelyezkedési valószínűségi pontszámaival (12. és 13. táblázat). Következésképp *in silico* eredményeink megerősítik a GLUT1 mitokondriális elhelyezkedését, amelyet korábban KC és mtsai GLUT1-EGFP és immunoblot megfigyelései alapoztak meg (KC és mtsai 2005). Habár a GLUT2-t, 3-at, 4-et és 8-at kiváló DHA transzportereknek tartják (Rumsey és mtsai 1997, 2000, Mardones és mtsai 2011, Corpe és mtsai 2013) mégis mitokondriális előfordulásuk nem túl valószínű. Egyfelől mindegyik transzportfehérje igen alacsony mitokondriális pontszámot kapott (13. táblázat), másfelől semmilyen kísérletes adat sem támasztja alá mitokondriális elhelyezkedésüket. A 8 eszköz közül 5 kimondottan magas mitokondriális pontszámot adott a GLUT9-nek. Tekintve, hogy a 2 különböző izoforma különbözik N-terminális (cél) szekvenciájukban, a mitokondriális elhelyezkedési pontszámuk is különböző. A pontszámok alacsonyabbak a b izoforma esetében. A GLUT9, vagy SLC2A9 ugyan a GLUT család tagja, de jelenleg elsősorban nagy kapacitású urát transzporterként ismert, amely glükózt és fruktózt képes urátra cserélni (antiporter) (Caulfield és mtsai 2008; Vitart és mtsai 2008). Az urátot feszültség-függő transzporttal szállítja a negatívól a pozitív felé mutató irányba (Anzai és mtsai 2008). Az SLC2A9 génnek 2 különböző splicing változata létezik, amelyek kizárólag az N-terminálisukban különböznek (Augustin és mtsai 2004). Mind a teljes hosszúságú SLC2A9a, mind a rövidebb SLC2A9b kifejeződik az emberi vesében (Augustin és mtsai 2004). A két splicing változat különbözőképpen fejeződik ki polarizált sejtekben: az SLC2A9b (512 aminosav) az apikális, míg az SLC2A9a (540 aminosav) a bazolaterális membránban helyezkedik el. Szintén különbség figyelhető meg az SLC2A9 izoformák között az extracelluláris glükóz érzékenységükben, az apikális SLC2A9b izoforma elvesztette az urát

effluxát hajtó glükóz transzstimulációs képességét (Witkowska és mtsai 2012). Egy közelmúltban megjelent tanulmányban beszámoltak róla, hogy az SLC2A9b egy része valamelyik intracelluláris sejtalkotóban helyezkedik el. Ugyanakkor az SLC2A9a kizárólag a bazolaterális membránban fejeződött ki (Kimura és mtsai 2014). Az SLC2A9a nagy kiterjedésű, N-terminálisát érintő mutáns változata viszont nem kizárólag az apikális és a bazolaterális membránban fordult elő, hanem szintén valamelyik intracelluláris sejtalkotóban is (Kimura és mtsai 2014). Sajnálatos módon csak az ER, a Golgi és a lizoszómális elhelyezkedést vizsgálták. Így ezen kísérletes eredmények alapján nagyon nehéz bármit is mondani a GLUT család 9-es tagjának sejten belüli elhelyezkedéséről. Azt mindenesetre tudni, hogy az utát csökkenti a mitokondriális tömeget, csökkenti az enoíl-CoA hidratáz-1 kifejeződését és az akonitáz-2 aktivitását emberi aorta endotél sejtekből izolált mitokondriumokban (Sánchez-Lozada és mtsai 2012). Így könnyen elképzelhető, hogy az SLC2A9a a mitokondriális belső membránban elhelyezkedve feszültségfüggő módon urátot szállít a mitokondriális mátrixból a citoszolba (a negatív irányból a pozitív irányba) miközben a glükóz, vagy a rokon molekula DHA felvételét végzi. Ily módon az SLC2A9a képes lehet csökkenteni a mitokondriumra nehezedő urát nyomást, továbbá mérsékelheti a következményes ROS termelődést, mitokondriális diszfunkciót és egyúttal hozzájárulhat az antioxidáns C-vitamin felvételéhez is.

A GLUT10 esetében kapott pontszámok igazi meglepetésként hatottak, mivel ezek voltak messze a legalacsonyabbak (13. táblázat). Korábban NIH3T3 egér fibroblaszt és 3T3-L1 differenciált zsírsejtekben úgy találták, hogy a GLUT10-EGFP a Golgi apparátusban helyezkedik el (Lee és mtsai 2010). A GLUT10-EGFP egy része inzulinkezelést követően azonban a 3T3-L1 zsírsejtek mitokondriumaiban helyezkedett el. A zsírsejtekhez hasonlóan a GLUT10-EGFP nagyjából fele alapesetben és inzulinkezelést követően is az A10 patkány aorta simaizom sejtek mitokondriumaiban helyezkedtek el, amit immunoblot vizsgálattal is megerősítettek (Lee és mtsai 2010). Egy, a közelmúltban megjelent tanulmány HEK-293 esetében nem tudták a GLUT10 kifejeződését kimutatni, ezért a szerzők, legalábbis ezen sejtek esetében elvetették annak a lehetőségét, hogy a GLUT10 részt vegyen a mitokondriális DHA transzportban (Muñoz-Montesino és mtsai 2014). Az általunk kapott különösen alacsony mitokondriális pontszámok (13. táblázat) szintén megkérdőjelezi a GLUT10 szerepét a mitokondriális C-vitamin transzportban.

Mindegyik elhelyezkedést becslő eszköz (kivéve a MultiLoc és az ngLoc) nagy mitokondriális valószínűségi pontszámot adott a GLUT11-nek. A GLUT11 esetében is különböző N-terminális (cél) szekvenciákkal rendelkezik az 1-es, a 2-es és a 3-as, valamint a 4-es izoforma, ezért az SLC2A11 esetében is különböző pontszámokat tudunk a mitokondriális elhelyezkedéshez rendelni. A legalacsonyabbat a 4-es izoformához (13. táblázat). A GLUT11 legközelebbi rokona a fruktóz transzporter GLUT5, amelynek aminosav összetételével 42%-os azonosságot mutat (Doege és mtsai 2001). Mindegyik izoformája mind a glükózt, mind a fruktózt szállítja, de egyik sem szállítja a galaktózt. A három vizsgált izoforma sejten belüli elhelyezkedése, lézer szkennelő mikroszkóppal vizsgálva nem különbözött egymástól. GLUT11 immunoreaktív fehérjét találtak a sejt felszínén, illetve a sejt egyik alkotójában (Scheepers és mtsai 2005). Sajnos ettől pontosabb kísérletes adat a GLUT11 sejten belüli

elhelyezkedéséről a mai napig nem látott napvilágot. Így az sem zárható ki, hogy az a bizonyos (be nem azonosított) sejtalkotó a mitokondrium volt.

A GLUT12, amelynek kismértékű glükóz transzport aktivitását mutatták ki afrikai karmos béka petesejtekben meglehetősen alacsony mitokondriális elhelyezkedés pontszámokat kapott (13. táblázat). Eredményeinkkel összhangban, úgy tűnik, hogy a Golgi apparátusban és a plazmamembránban helyezkedik el (Flessner és Moley 2009). Az inzulin emberi vázizomban képes a GLUT12 intracelluláris membránokból, plazmamembránba történő áthelyezését stimulálni (Stuart és mtsai 2009) továbbá a transzportfehérje túltermeltetése növelte a kísérleti egerek inzulinérzékenységét (Purcell és mtsai 2011). Érdekes azt is megjegyeznünk, hogy a GLUT12 képes proton csatolt szimporterként működve glükózt koncentráció gradiense ellenében szállítani (Pujol Giménez és mtsai 2013).

A GLUT13 (HMIT) minden egyes izoformájának mitokondriális elhelyezkedési pontszáma meglehetősen nagy volt (13. táblázat). A GLUT13, vagy HMIT egy H^+ /mioinozitol kotranszporter, amelyet az SLC2A13 gén kódol (Uldry és mtsai 2001). A HMIT-ről elmondható, hogy általában a sejten belül elhelyezkedő membránokban fejeződik ki (Augustin, 2010). Így például az idegsejtekben, a Golgi apparátusban (Di Daniel és mtsai 2009). Habár a mitokondrium esetében a hajtóerő (a H^+ gradiens) adott, a HMIT mitokondriális C-vitamin transzportban betöltött szerepe nem túl valószínű, mivel ezidáig semmiféle cukor transzport aktivitást sem írtak le róla (Di Daniel és mtsai 2009).

A GLUT14, a GLUT3 génduplikációs termékének tűnik (Augustin 2010). Így a GLUT3-hoz hasonlóan nem valószínű mitokondriális elhelyezkedése (13. táblázat).

Ahogy az irodalmi bevezetőben és a fejezet elején is már említettük, a közelmúltban jelent tanulmányok a nátrium-függő C-vitamin transzporter, az SVCT2 mitokondriális kifejeződéséről számoltak be, ami egyértelműen megnövelte a belső membránon keresztüli C-vitamin transzport meglétének valószínűségét (Azzolini és mtsai 2013, Guidarelli és mtsai 2014, Muñoz-Montesino és mtsai 2014). A kép teljessé tételét segítette az SVCT1 lehetséges mitokondriális elhelyezkedésének vizsgálata. Az SVCT1-gyel transzfektált HEK 293 sejtekben a transzporter azonban a plazmamembránban helyezkedett el és nem vett részt a mitokondriális aszorbát transzportban (Muñoz-Montesino és mtsai 2014). Az előző tanulmánnyal összhangban a mi eredményeink is arra utalnak, hogy az SVCT1 egyik izoformája sem mitokondriális elhelyezkedésű (14. táblázat). Az SVCT1-gyel ellentétben az SVCT2 viszont magas mitokondriális elhelyezkedési pontszámokat kapott (14. táblázat). Ez az eredmény kiválóan összecseng a korábban említett tanulmány konfokális kolokalizációs, immunoblot és SVCT2 csendesítés kísérleti eredményeivel (Muñoz-Montesino és mtsai 2014). Ezek az eredmények azonban felvetik azt a rendkívül mód indokolt kérdést, hogy mi biztosítja a mitokondriális belső membránban elhelyezkedő SVCT2 transzporter számára a hajtóerőt? Mit lehet tudni a mátrix és a citoszol Na^+ koncentrációjáról? A működő mitokondriumok esetében, amelyek protont pumpálnak ki magukból (a mátrixból), az a feltételezés él, hogy a pH gradiens hajtja a Na^+ gradienst. Az *in situ* mitokondriális pH gradiens alapján azt gondoljuk, hogy az (*in situ*) Na^+ gradiens valamivel kisebb lehet a kétszeres értéknél. A tipikus citoszolikus Na^+ koncentráció 8 mM körül a mitokondriális pedig 6 mM körül lehet (Murphy és Eisner 2009).

Ez az ionmilió lehetővé teszi, hogy az SVCT2 mint (kis affinitású) mitokondriális aszkorbát transzporter működjön.

14. táblázat. A humán SVCT (SLC23) család *in silico* mitokondriális elhelyezkedés-becslése

Fehérje	N-terminális szekvencia a FASTA címkével	Target P	Mitoprot	Predotar	PSORT II	MultiLoc / TargetLoc	ngLOC	yLoc	Cello
SVCT 1 - Slc23A1	>sp Q9UHI7 S23A1_HUMAN Solute carrier family 23 member 1 OS=Homo sapiens GN=SLC23A1 PE=1 SV=3 MRAQEDLEGRTOHETTRDPSPLPTEP KFDMLYKIEDVPPWYLCILGQHYLT CFSGIT	0,132	0,2153	0,0	13,0%	-	-	0,0% (0,25)	0,934
SVCT 1 - Slc23A1 isoform 2	>sp Q9UHI7-2 S23A1_HUMAN isoform 2 of Solute carrier family 23 member 1 OS=Homo sapiens GN=SLC23A1 MRAQEDLEGRTOHETTRDPSPLPTEP KFDMLYKIEDVPPWYLCILGQHYLT CFSGIT	0,132	0,2153	0,0	13,0%	-	-	0,0% (0,25)	0,934
SVCT 1 - Slc23A1 isoform 3	>sp Q9UHI7-3 S23A1_HUMAN isoform 3 of Solute carrier family 23 member 1 OS=Homo sapiens GN=SLC23A1 MRAQEDLEGRTOHETTRDPSPLPTEP KFDMLYKIEDVPPWYLCILGQHYLT CFSGIT	0,132	0,2153	0,0	13,0%	-	-	0,0% (0,25)	0,934
SVCT 2 - Slc23A2	>sp Q9UGH3 S23A2_HUMAN Solute carrier family 23 member 2 OS=Homo sapiens GN=SLC23A2 PE=1 SV=1 MDGKGGYTSKSNLEAGSSLEGGYEDIE AKHPAFFTLPVVINGGATSSGEQDNED TELMAIV	0,236	0,5133	0,02	26,1%	-	-	0,0% (0,04)	0,515

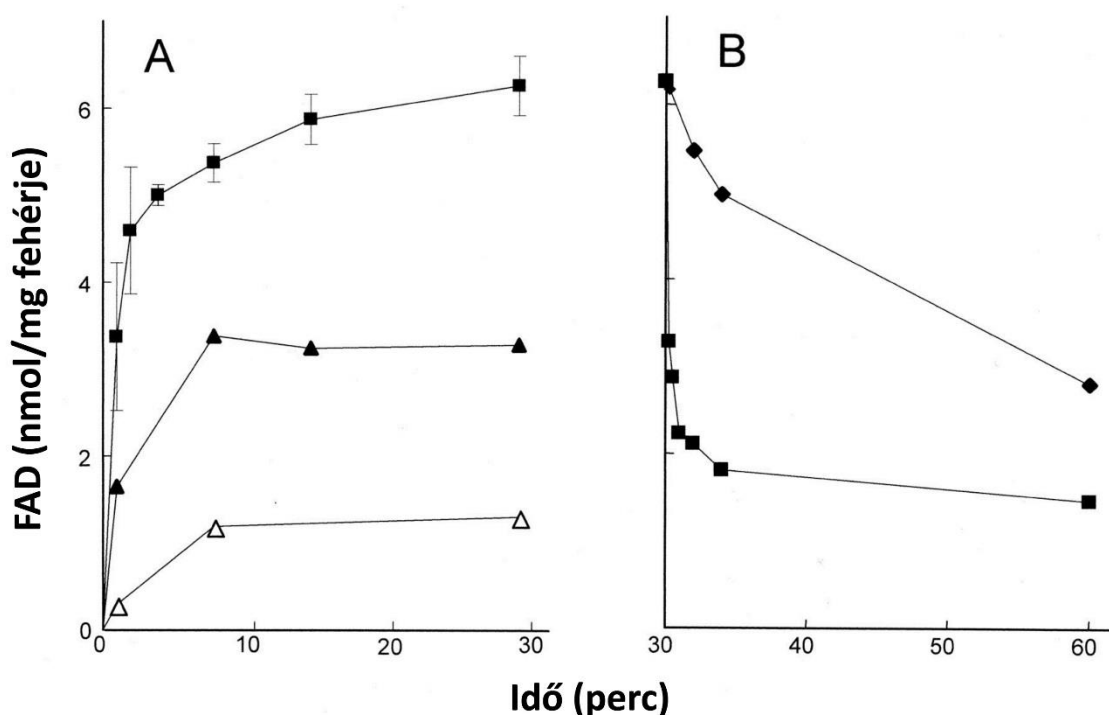
3.10. FAD transzport és a FAD szerepe a mikroszómális oxidatív folding elektrontranszfer folyamatában

A szekrécióra kerülő fehérjék tekintélyes számú diszulfidkötést tartalmaznak, amelyek szükségesek megfelelő térszerkezetükhöz, stabilitásukhoz és funkcionalitásukhoz. Ezen fehérjék diszulfid kötései elsősorban az eukarióta sejtek endoplazmás retikulumában (ER) alakulnak ki (Szarka és Bánhegyi 2011). A cisztein oldalláncok tiol csoportjainak oxidációja folyamatos, a végső elektronakceptor molekuláris oxigén 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). Jól lehet az oxidatív folding gépezet kulcs fehérje komponenseit már azonosították a kis mol súlyú molekulák kémiai természete, mint lehetséges kofaktorok jelenleg is vita tárgyai. Számos redox aktív anyagról számoltak be, mint az elektrontranszfer lánc komponenseiről, úgy mint a K-vitaminról (Wajih és mtsai 2007), E-vitaminról (Csala és mtsai 2001), glutation diszulfidról és a DHA-ról (Csala és mtsai 1999, Szarka és mtsai 2002). Élesztősejtek esetében felmerült, hogy a FAD-nak fontos szerepe lehet a folyamatban. Az ER-ben található FAD-függő oxidázok, mint az Ero1p (Pollard és mtsai 1998, Frand és Kaiser 1998), Erv2 (Gross és mtsai 2002) és az Fmo1p (Suh és mtsai 1999) az oxidatív folding gépezet tagjai lehetnek. Ezen túl kiderült, hogy az Ero1p aktivitása a szabad FAD jelenlététől függ, illetve a szabad citoszolikus FAD képes átjutni az élesztő ER membránon (Tu és Weissman 2002).

Tekintve, hogy az emlős sejtek Ero1p analógokat fejeznek ki (Cabibbo és mtsai 2000, Pagani és mtsai 2000, Benham és mtsai 2000) az ER membránon keresztüli FAD transzport kritikus lehet a fehérjék oxidatív foldingjának szempontjából. Emlős sejtek esetében azonban sem a FAD ER membránon keresztüli transzportját, sem a FAD mikroszómális fehérjékre gyakorolt

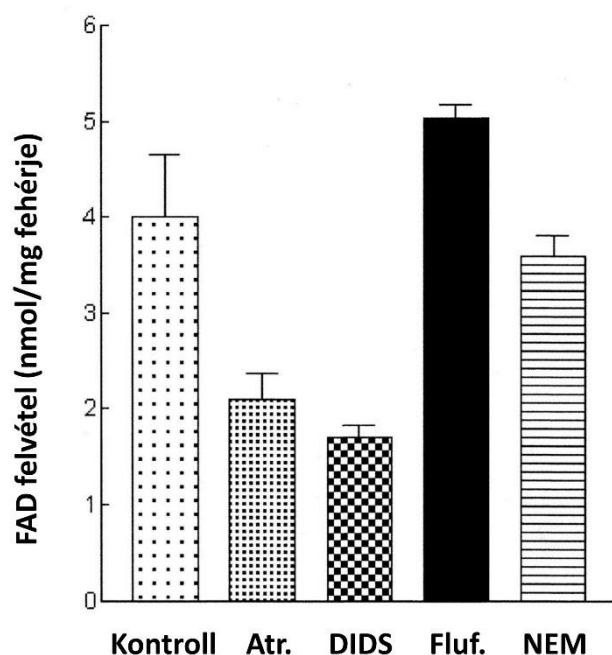
oxidatív hatását nem vizsgálták még. Ezért célul tűztük ki, hogy ezen folyamatokat patkány mikroszómális vezikulákön megvizsgáljuk.

A FAD felvételt a korábbi mitokondriális transzport vizsgálatokhoz hasonlóan végeztük el. A különbség ez esetben az volt, hogy radioaktív jelölés helyett a FAD saját fluoreszcenciáját használtuk fel a molekula detektálására. A kezdeti szakaszt követően a FAD felvétel nagyjából 10 percet követően elérte maximumát (35. ábra, A panel). A felvétel állandósult állapotában, a számított intravezikuláris FAD koncentráció meghaladja az extravezikuláris koncentrációt (35. ábra). Ezt a jelenséget magyarázhatja a FAD intravezikuláris anyagcseréje, amelyet mintáink HPLC analízise is alátámasztott.



35. ábra A mikroszómális FAD felvétel időfüggése (A) kontrol (■) DIDS mentes pufferrel mosva (▲), alameticinnel permeabilizálva (Δ) és kiáramlás időfüggése (B) DIDS tartalmú (◆) és DIDS mentes (■) pufferrel mosva.

A transzport kétirányúnak bizonyult, az előzetesen FAD-dal feltöltött vezikulák kihígítását követően gyors FAD áramlást tudtunk megfigyelni (35. ábra, B panel). Megvizsgáltuk néhány anion transzport gátló, illetve a mitokondriális FAD transzport gátló atraktolozid mikroszómális FAD transzportra gyakorolt hatását (Barile és mtsai 2000). A FAD felvételt a DIDS és az atraktolozid szignifikáns mértékben gátolta, míg a NEM és a flufenamát nem mutatott gátló hatást (35. és 36. ábra).

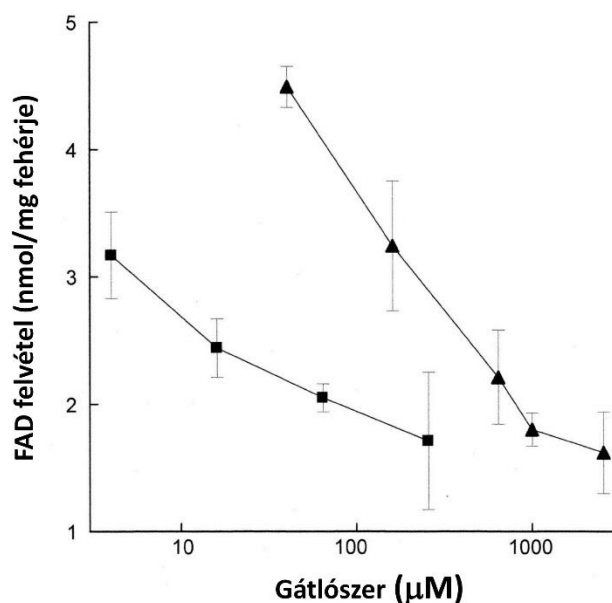


36. ábra A mikroszómális FAD felvétel inhibíciós profilja

A DIDS és az atraktulozid gátló hatása koncentrációfüggőnek bizonyult (37. ábra). A FAD kiáramlását (effluxát) szintén gátolta a DIDS (35. ábra B panel). Ezért a továbbiakban folyamatosan alkalmaztuk, hogy blokkoljuk a FAD kiáramlását a gyors szűrési technika mosási fázisában. Ahogy az a 35. ábra A paneljén is látható, a DIDS mentes mosópuffer a FAD felvétel szisztematikus alulbecslését okozza a mosás során

bekövetkező kiáramlás.

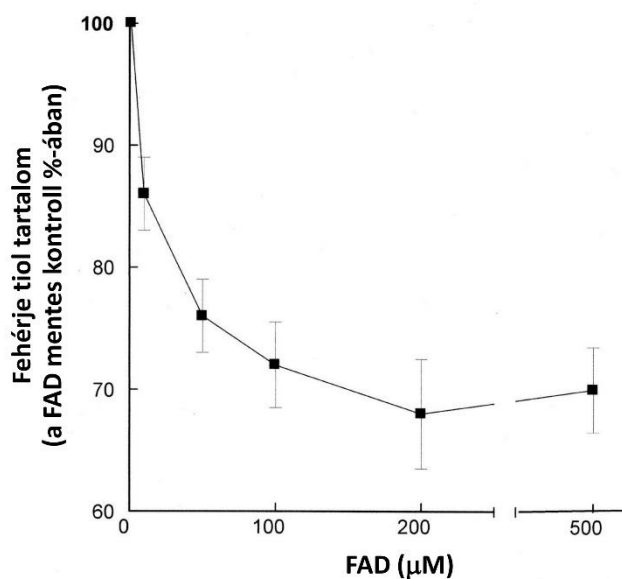
Mindent egybevetve, megfigyeléseink egy fehérje mediált FAD transzportot valószínűsítene a máj endoplazmás retikulumában. Az endomembránokon keresztül zajló FAD transzport meglehetősen kevésbé vizsgált folyamat, molekuláris szinten teljes biztonsággal még egyetlen transzportert sem sikerült leírni. FAD transzportot ez idáig mindössze a mitokondriális belső membránon keresztül sikerült leírni (Barile és mtsai 2000). A mitokondriális transzporter jó eséllyel egy antiporter, amelyet az atraktulozid már mikromolos koncentrációban képes gátolni (Barile és mtsai 2000). Az általunk leírt FAD transzport jellegzetességei (DIDS-szel történő gátlás, viszonylagos érzéketlenség az atraktulozid irányába, enyhe NEM gátlás) hasonlatosak az ER ATP/ADP antiporteréhez (Hirschberg és mtsai 1998, Clairmont és mtsai 1992). Így nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy a FAD transzport az ATP/ADP antiporternek egyik funkciója mind a mitokondriumban, mind az ER-ben.



37. ábra A mikroszómális FAD felvétel koncentrációfüggő DIDS (▲) és atraktolozid (■) gátlása

Amennyiben a FAD mikroszómális felvétele valóban bekövetkezik, annak elő kell segítenie az ER lumenében folyó oxidációs folyamatokat. Annak érdekében, hogy ezt a feltevést bizonyítsuk nyomon követtük a fehérje tiol csoportok oxidációját. A fehérje tiol

csoportok 37°C-on, atmoszférikus körülmények között időben állandónak bizonyultak. A FAD adagolás azonban igen kifejezett fehérje tiol oxidációt váltott ki. A legnagyobb mértékű oxidációt, amely a fehérje tiolok mintegy harmadát érintette, 0.2 mM-os FAD koncentráció esetén tudtuk elérni (38. ábra).



38. ábra A FAD hatása a fehérje tiolok mikroszómális oxidációjára

A FAD hatása koncentrációfüggőnek bizonyult, már 10 μM FAD hatásos volt, de 200 μM-nál magasabb FAD koncentráció, vagy 20 percnél hosszabb inkubációs idő nem járt együtt további szignifikáns tiol oxidációval. A FAD felvétel atraktoloziddal történő gátlása megakadályozta a FAD kiváltotta fehérje tiol oxidációt (15. táblázat).

Az atraktolozid, az alkalmazott koncentrációban önmagában nem befolyásolta a mikroszómális fehérje tiol csoportok redox állapotát.

Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy a citoszol szabad FAD tartalma hozzájárulhat az emlős sejtek endoplazmás retikulumában a diszulfid kötések kialakulásához. Az ER membránon keresztüli FAD transzport egy fontos kapocs lehet a diszulfid kötések kialakulása és a sejt tápláltsági, metabolikus és energetikai állapota között.

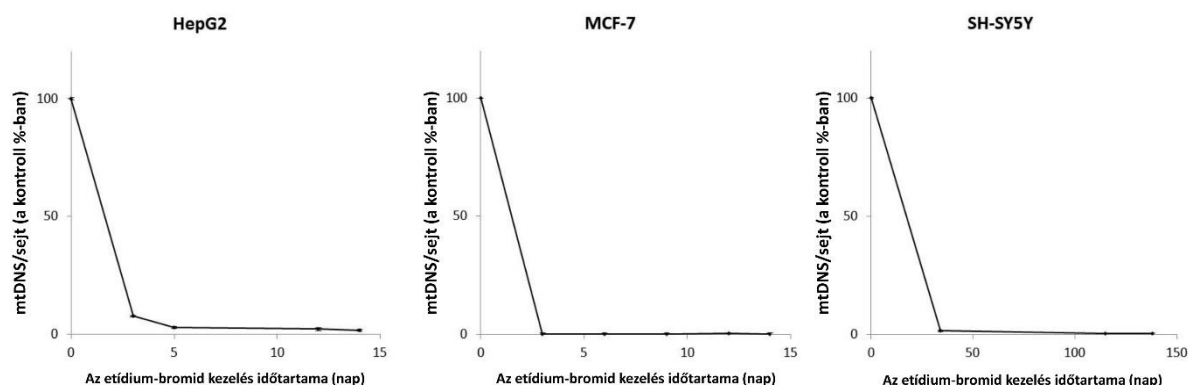
15. táblázat A FAD transzport gátlásának hatása a mikroszómális fehérje tiol oxidációra

Kezelés	Mikroszómális tiol tartalom (nmol mg ⁻¹ fehérje)
Kontroll	239 ± 12
FAD (50 µM)	211 ± 22
Atraktilozid (0.5 mM)	238 ± 27
FAD (50 µM) + Atraktilozid (0.5 mM)	230 ± 10

3.11. A mitokondriális oxidatív folding apparátus és az mtDNS kapcsolata

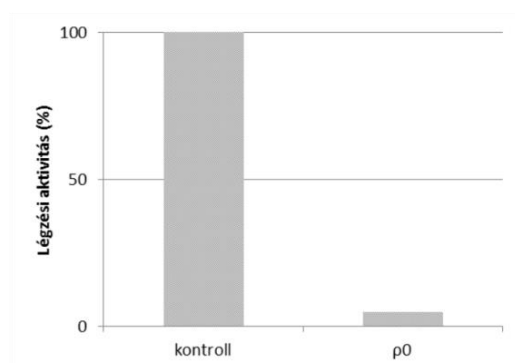
Sokáig elfogadott tény volt, hogy oxidatív folding kizárólag az oxidatív miliővel rendelkező bakteriális periplazmatikus térben és az eukarióta endoplazmás retikulumban folyik. A közelmúltban azonban számos ciszteinben (tiol csoportban) gazdag mitokondriális membránközi térben található fehérjében diszulfidkötéseket találtak és ennek folyamánként leírásra került a MIA40 és az ERV1 (ALR) fehérjékből álló membránközi térben található oxidatív folding gépezet (Chacinska és mtsai 2004, Deponte és mtsai 2009, Szarka és Bánhegyi 2011). A mitokondriális membránközi térbe érkező szubsztrát fehérjéktől a MIA40 veszi át az elektronokat. A MIA40 redukálttá válik miközben a szubsztrátfehérjék tiol csoportjait diszulfidkötésekké oxidálja, ezért oxidálódnia kell a következő katalitikus ciklus előtt. A MIA40 (vissza)oxidálását az ERV1 vagy annak humán analógja az ALR végzi (Bien és mtsai 2010, Lee és mtsai 2000, Lisowsky 1992, Mesecke és mtsai 2005). Végezetül az ERV1/ALR az elektronokat a citokróm c-n, majd a citokróm c oxidázon keresztül molekuláris oxigénre juttatja.

Annak érdekében, hogy megtudjuk, mi történik a mitokondriális diszulfidgeneráló rendszerrel működőképes légzési elektrontranszfer lánc hiányában, mtDNS fosztott sejteket készítettünk. HepG2 humán máj karcinóma, MCF7 humán mell adenokarcinóma, és SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonalak hosszú távú etídium-bromid kezelésével mtDNS hiányos, működőképes légzési láncsal nem rendelkező sejteket hoztunk létre (a mitokondriális komplex I, III, IV és V részben az mtDNS-ben kódolt). A mitokondriális és nukleáris DNS arányát, amely lényegében a mtDNS kópiák sejtenkénti száma, real-time PCR-rel követtük nyomon. Az arány mindhárom sejtvonal esetében meredeken zuhant, az utolsó mintavételi pontnál mtDNS gyakorlatilag már nem volt detektálható (39. ábra).



39. ábra. HepG2, MCF7 és SH-SY5Y sejtvonalak mtDNS kópiaszámának alakulása etidium-bromid kezelésük során.

A mtDNS fosztott ρ^0 sejtek létrehozásának sikerességét a légzési aktivitás vizsgálatával is igazoltuk. Várakozásainknak megfelelően a mtDNS mennyiség csökkenésével párhuzamosan az oxigén-fogyasztás is jelentős mértékben csökkent. Így újabb bizonyítékot szerezhettünk a működőképes légzési lánc hiányáról (40. ábra).



40. ábra. ρ^0 HepG2 sejt kultúra légzési aktivitása a kontrollhoz viszonyítva.

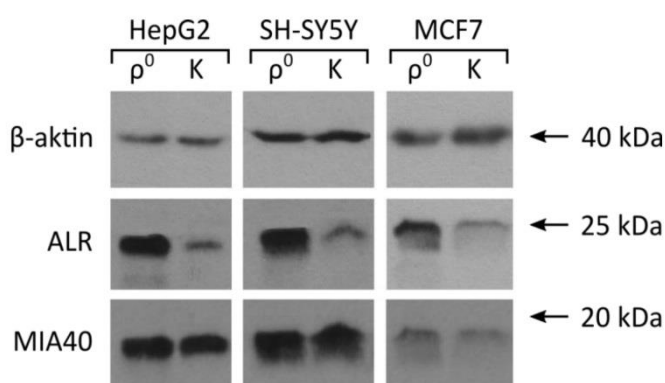
Miután három különböző sejtvonalból (HepG2, MCF7, SHSY5Y) is sikeresen hoztunk létre ρ^0 -sejteket, az ALR mRNS szintű kifejeződését real-time PCR-rel vizsgáltuk meg. A mtDNS hiánya egyik sejt típus esetén sem okozott szignifikáns mértékű eltérést az ALR mRNS szintjében (16.

táblázat).

16. táblázat A mtDNS hiány hatása az ALR mRNS szintű kifejeződésre

Sejt vonal	relatív ALR kifejeződés
HepG2 kontroll	$1,00 \pm 1,11$
HepG2 ρ^0	$0,48 \pm 1,28$
SH-SY5Y kontroll	$1,00 \pm 1,42$
SH-SY5Y ρ^0	$0,94 \pm 1,25$
MCF7 kontroll	$1,00 \pm 1,44$
MCF7 ρ^0	$1,86 \pm 1,82$

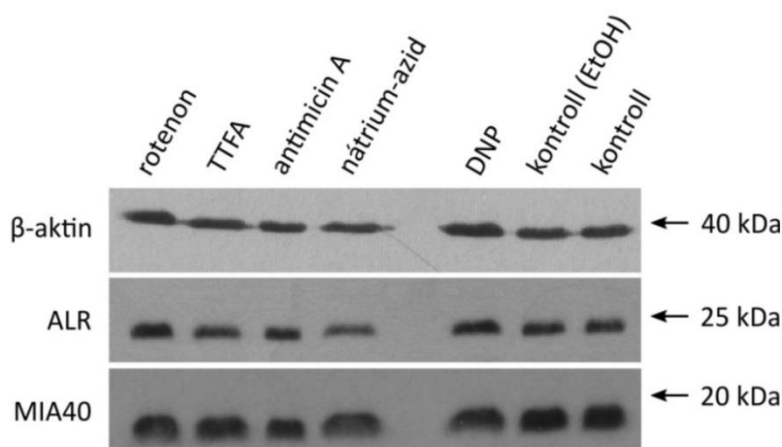
A mtDNS hiány ALR kifejeződésre gyakorolt hatását fehérje szinten is megvizsgáltuk. Az ALR fehérjeszint egyértelműen megemelkedett a kontroll sejtekéhez képest a ρ^0 sejtekben (41. ábra). A fehérje kifejeződésének növekedését, a nem máj eredetű MCF7, humán mell adenokarcinóma és az SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonalak esetében is kimutattuk (41. ábra). Ez utóbbi különös jelentőséggel bír, mivel az ALR fontos májnövekedési faktor és majd minden májsejtet ért inzultus hatására megnövekszik a szintje (Balogh és Szarka 2015). Így kizárhattuk annak a lehetőségét, hogy az ALR fehérjeszint növekedése a fehérje májsejt-specifikus védőhatásával függ össze. A mitokondriális oxidatív folding apparátus másik tagját, a MIA40 fehérjét is vizsgálat tárgyává tettük. Ez utóbbi fehérje szintje azonban nem változott a mtDNS hiány hatására (41. ábra).



41. ábra: Az mtDNS-depléció hatása az ALR és MIA40 fehérjeszintjére.

Annak érdekében, hogy további információt nyerjünk az ALR kifejeződés szabályozásáról HepG2 sejteket kezeltünk különböző mitokondriális elektrontranszfer lánc

gátlószerekkel. Ezzel a módszerrel, egyrészt a ρ^0 sejtekhez hasonlóan csökkenthető a sejtek ATP termelése, illetve befolyásolható az elektrontranszfer lánc ROS termelése is. A komplex I rotenonnal történő gátlása blokkolja az ubikinon irányába történő elektronátadást, így az ATP-szintézis mellett csökkenti a ROS képződés mértékét is. Ezzel szemben a komplex III antimicin A-val történő gátlása az ATP szint csökkentése mellett elektrontrorlódást okoz, gátolja az ubikinolról történő elektronátadást, így jelentős mértékben növeli a ROS képződést is. Így mind az ATP szint, mind a ROS szint lehetséges szabályozó hatása tanulmányozható. A teljesség kedvéért a komplex II gátlószer TTFA-val, a komplex IV gátló nátrium-aziddal, illetve



a szétkapcsoló szer 2,4-dinitrofenollal is elvégeztük a kísérleteket. Utóbbi vegyület az ATP mellett a ROS termelést is csökkenti. A különböző gátló- és szétkapcsoló szer kezeléseket sejtlégzésre kifejtett hatását a sejtek oxigén-fogyasztásának mérésével igazoltuk.

42. ábra. Különböző mitokondriális légzési lánc gátlószerek hatása az ALR és a MIA40 fehérjeszintjére.

A vegyületek légzésre kifejtett hatása a vártak megfelelő volt. Érdekes módon, az alkalmazott vegyületek egyike sem okozott a ρ^0 sejtekben megfigyelthez hasonló ALR fehérjeszint növekedést (42. ábra vs 41. ábra).

Vajon milyen titokzatos szabályozó faktor állhat az ALR fehérjeszint emelkedése mögött a ρ^0 sejtekben?

Az első lehetséges jelöltünk az ATP. Az már régóta jól ismert, hogy az ALR hiánya az ATP szint csökkenéséhez vezet (Thirunavukkarasu és mtsai 2008, Gandhi és mtsai 2015). Ebből kiindulva nem elképzelhetetlen, hogy a ρ^0 sejtekben, működőképes légzési lánc hiányában lecsökkent ATP szint az ALR fehérje szintjének emelkedését idézi elő. Ennek a feltételezésnek leellenőrzéséhez, a kontroll (anyai) sejtvonalat különböző légzési gátlószerekkel és szétkapcsoló szerrel kezeltük. Az ATP szintet (is) csökkentő kezelések hatására azonban nem tapasztaltunk semmiféle változást az ALR fehérje szintjében (42. ábra), így az ATP szint jó eséllyel nem játszik szerepet az ALR-expresszió szabályozásában.

Az ALR szintjét befolyásoló faktor szerepére, második jelöltünk a reaktív oxigénvegyületek voltak, mivel a ρ^0 sejtekben, az elektrontranszfer lánc működésképtelensége, a ROS termelés jelentős növekedését vonja maga után (Miranda és mtsai 1999). A ROS termelés növelésének egyik leghatásosabb módját, az elektrontranszfer lánc III-as komplexének antimicin A-val történő blokkolását választottuk (Boveris és mtsai 1973). Meg kellett állapítanunk, hogy a komplex III gátlásából fakadó ROS szint emelkedés sem váltotta ki az ALR fehérje szintjének emelkedését (42. ábra). A 2,4-dinitrofenol kezelés hatására kialakuló csökkent mértékű ROS szint sem gyakorolt hatást az ALR fehérje szintjére (42. ábra).

Az ALR gén csendesítésének vagy kiütésének hatására megfigyelt kaszpáz-3 aktiváció (Polimeno és mtsai 2012) egy harmadik lehetőséget vet fel, amely szerint az ALR anti-apoptotikus hatással rendelkezhet ρ^0 -sejtekben. Ezt a lehetőséget a ρ^0 -sejtek apoptózissal szemben megfigyelt rezisztenciája is alátámasztani látszik (Lee és mtsai 2004). Ennek a lehetőségnek jövőbeli vizsgálata mindenképpen indokolt és tanácsos.

A mitokondriális oxidatív folding apparátus másik tagjának, a MIA40-nek ALR-hez képest állandó fehérjeszintje (41. ábra) azt valószínűsíti, hogy az ALR szint emelkedése független lehet a mitokondriális oxidatív folding folyamatától. Természetesen az sem kizárt, hogy az ALR szintnövekedés orvosolja a problémát azzal, hogy több elektront képes átvenni a MIA40-től, így annak szintnövekedése szükségtelen.

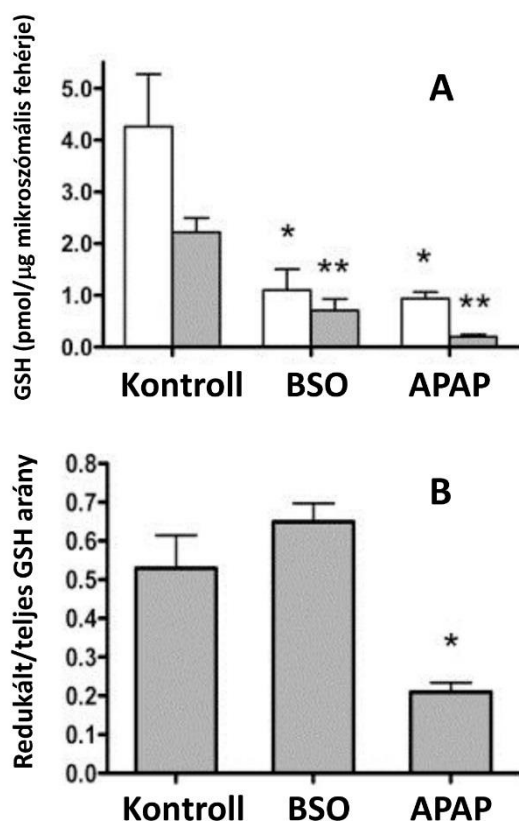
A fentiek alapján nem zárható ki, hogy a mtDNS és/vagy egyes géntermékei szerepet játszhatnak az ALR fehérje kifejeződésének szabályozásában. Korábban két nukleárisan kódolt, mitokondriális biogenezisben szerepet játszó gén az NRF-1 és a TFAM felszabályozásáról számoltak be ρ^0 sejtekben (Miranda és mtsai 1999). ρ^0 sejtekben a mtDNS elvesztése a mitokondriális szerkezet torzulásával a külső és belső membrán rendezetlenségével jár együtt, aminek következtében „szellem-szerű” mitokondriumok alakulnak ki (Holmuhamedov és mtsai 2003). A mitokondriális biogenezist (az újonnan megjelenő „szellem-szerű” mitokondriumok számát) és a membránpotenciált azonban nem befolyásolja a mtDNS elvesztése (Miranda és

mtsai 1999, Holmuamedov és mtsai 2003, Li és mtsai 1995). Ismert, hogy az ALR részt vesz a mitokondriumok biogenezisében és fenntartásában (Lisowsky 1992, 1994, Di Fonzo és mtsai 2009, Thirunavukkarasu és mtsai 2008, Gandhi és mtsai 2015), így az ALR, májtól független felszabályozása 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. A mitokondriumok keletkezése fenntartása csak részben ismertek jelenleg. Eredményeink alapján, az ALR a gépezet egy fontos alkotója lehet, a mtDNS pedig fontos szabályozó szerepet tölthet be az ALR fehérjeszintjének szabályozásában.

3.12. GSH hiány kiváltotta sejthalálformák

3.12.1. Nagy dózisu acetaminofen kezelés és a következményes extrém GSH hiány

Kísérletes munkánk első, nagyobb részt kitevő szakaszában a C-vitamint helyeztük középpontba. A második nagyobb szakasz a fehérjékben található tiol csoportokról szólt. Kísérleteink következő, harmadik szakaszában, főszereplőnek a C-vitamin mellett a legfontosabbnak tartott vízoldható antioxidánst a GSH-t választottuk. Ahogyan korábban a

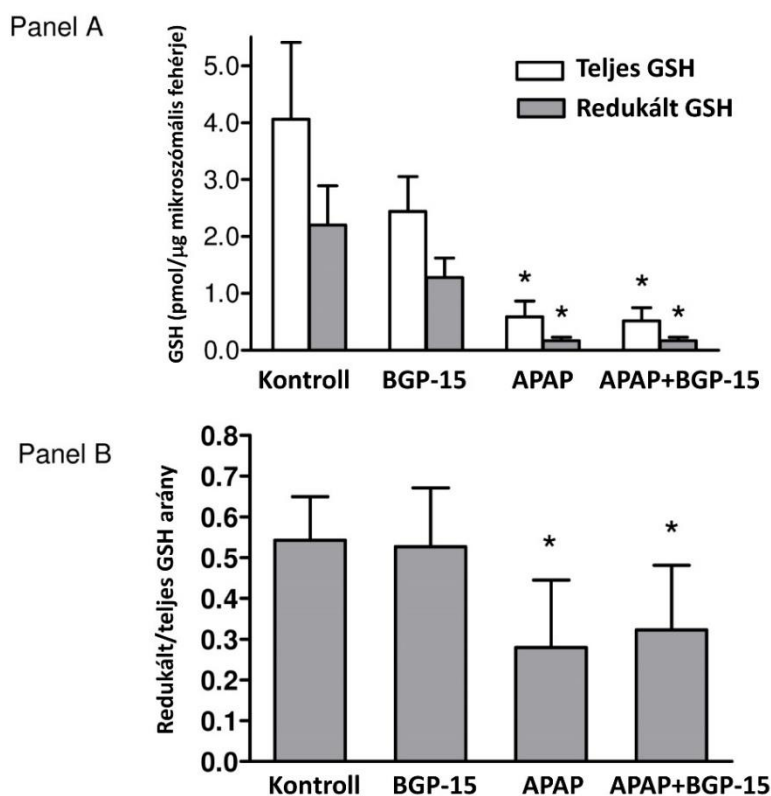


DHA redukció mennyiségi vizsgálata során, most is a GSH bioszintézis és szint befolyásolása lesz ez egyik legfontosabb eszközünk. Ezt a DHA redukciós vizsgálatoknál már alkalmazott γ -glutamilcisztein szintáz gátló BSO alkalmazásával, illetve az extrém mértékű GSH felhasználó, így extrém mértékű GSH hiányt okozó acetaminofen (APAP) kezelésekkel értük el. Tekintve, hogy az APAP, GSH hiányt okozó reaktív metabolitját, a NAPQI-t a CYP2E1 enzim állítja elő (irodalmi háttér 1.3.3.1. fejezet) vizsgálatunk tárgyának a CYP2E1 enzimben rendkívül gazdag májsejteket, ezen belül is az endoplazmás retikulumot választottuk. Első kísérletes lépésként APAP és BSO kezelt egerek májából mikroszoma frakciókat preparáltunk, majd meghatároztuk azok redukált és teljes GSH szintjét.

43. ábra APAP és BSO kezelés hatása a mikroszómális GSH szintre és redox státuszra

A teljes GSH magába foglalja a redukált, az oxidált és a GSH-fehérje kevert diszulfidokat is (Bass és mtsai 2004). A teljes mikroszómális GSH tartalom mintegy 70%-kal csökkent 3 órás APAP kezelés hatására (43. ábra A panel). A BSO kezelés is hasonlóan markáns teljes GSH csökkenéssel járt együtt (43. ábra A panel). A redukált/teljes GSH arány azonban jelentősen különbözött az APAP és a BSO kezelt csoportok esetében (43. ábra B panel). A redukált GSH részaránya APAP kezelést követően lényegesen alacsonyabbnak bizonyult. A kontroll minták esetében, a redukált GSH a teljes GSH mintegy 50%-át adta, addig az APAP kezelt minták esetében ez az arány csak 20% körül adódott (43. ábra B panel). A BSO kezelés ugyanakkor a mikroszómákban lényeges mértékben nem változtatta meg a redukált/teljes GSH arányt (43. ábra B panel).

A következő lépésben megpróbáltuk az APAP kiváltotta toxikus folyamatokat mérsékelni. Ennek érdekében az APAP kezeléssel párhuzamosan és önmagában BGP-15-öt adtunk (mindkét esetben 100 mg/ttkg) a kísérleti állatoknak. A BGP-15 O-(3-piperidino-2-hidroxi-1-propil)nikotinsavamid-oxim egy nikotin amidoximin származék, amelyet eredetileg inzulinrezisztencia ellen fejlesztettek ki. Korábban azonban a BGP-15 szerkezeti analógjait sikeresen alkalmazták az APAP kiváltotta májkárosodás kivédésére (Ray és mtsai 2001). Ahogy a korábbiakban láttuk az APAP nemcsak sejt, ER szinten is igen komoly GSH hiányt okozott, sőt a redukált/teljes GSH arány is nagymértékben csökkentette. Felmerült bennünk a annak a lehetősége, hogy a BGP-15 esetleges védő hatását az APAP kiváltotta ER redox változások mérséklése révén érheti el. A BGP-15 együttes adagolása azonban nem mérsékelte az APAP kiváltotta redox változást. A BGP-15 önmagában nem okozott szignifikáns GSH szint változást (44. ábra).



44. ábra. Az APAP és a BGP-15 kezelés hatása a mikroszómális GSH szintre és redox státuszra

Annak érdekében, hogy bővebb betekintést nyerjünk a mikroszómális tiol-diszulfid állapotokba, AMS jelölést végeztünk, amely képes a fehérje tiol csoportok redox állapotának detektálására. A CXXC motívumot tartalmazó ER dajkafehérje ERp72 AMS jelölése során kiderült, hogy 3 órás APAP kezelést követően gyakorlatilag

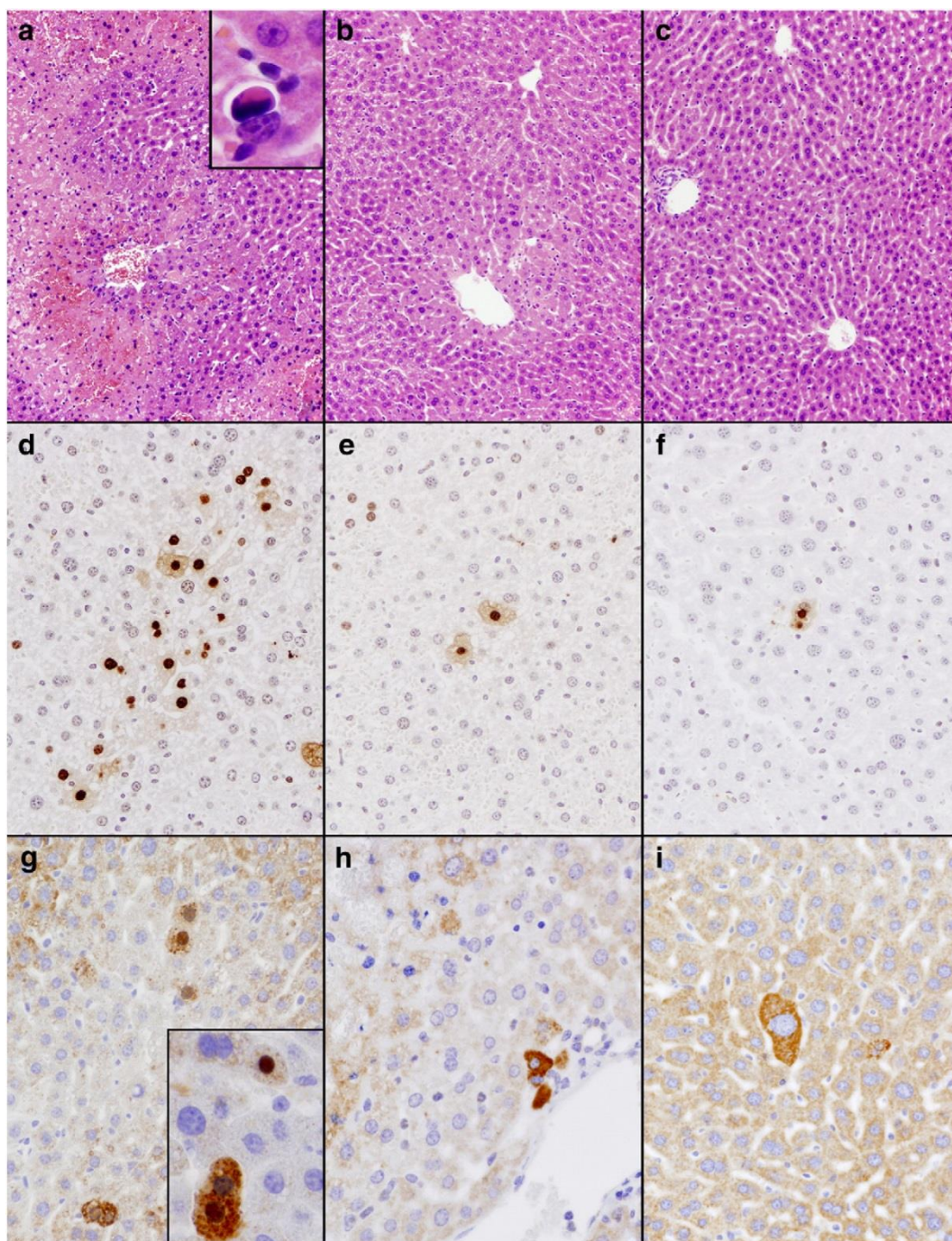
hiányzik a redukált forma és csakis kizárólag az oxidált van jelen. Ezen a BGP-15-tel történt

kezelés sem tudott érdemben változtatni, tehát a BGP-15 valóban nem képes az APAP kiváltotta ER-ben végbemenő redox változások mérséklésére (45. ábra).



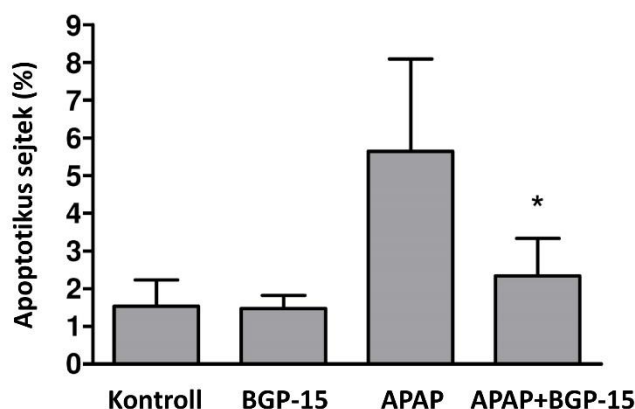
45. ábra. Az APAP és a BGP-15 kezelés hatása az ERp72 redox státuszára

A BGP-15 a kísérleti állatokra egyértelműen jótékony hatást gyakorolt, amit leginkább azon lehetett lemérni, hogy az APAP-nel párhuzamosan BGP-15-öt kapott állatok életben maradtak a közel halálos APAP dózis (450 mg/ttkg) ellenére. Ezért a BGP-15 májvédő hatásának felderítését 12 órás APAP kezelést követően elvégzett szövettani vizsgálatokkal folytattuk (46. ábra). Hematoxin-eozin festést alkalmaztunk a májkárosodások megváltozásának és mintázatának detektálására (46. ábra a-c panel). A BGP-15 önmagában semmilyen szignifikáns szövettani hatást sem mutatott (a kontrollhoz képest). Ahogyan arra előzetesen számítani lehetett az APAP kezelés közel összefüggő nekrotikus sejtelhalást okozott a centrilobuláris régióban (46. ábra a panel).



46. ábra Az APAP és a BGP-15 kezelés szövettani hatása.

Az APAP + BGP-15 párhuzamos kezelést kapott állatok hematoxin-eozin festett májszeletei mérsékelt nekrozist mutattak a centrilobuláris régióban (46. ábra b panel). ApopTag festést alkalmaztunk, hogy a pozitív sejtmagokat kimutassuk (46. ábra d-f panel) majd minden egyes kezelés esetében kiszámítottuk az apoptotikus indexet (47. ábra). A BGP-15 (100 mg/ttkg) önmagában nem befolyásolta az apoptotikus indexet. Az APAP kezelést követően, az apoptózissal érintett sejtek száma mintegy négyszeresére ugrott. Az APAP kezeléssel párhuzamosan adott BGP-15 gyakorlatilag teljesen kivédte az APAP apoptotikus sejtszámot növelő hatását (47. ábra).



47. ábra Az APAP és a BGP-15 kezelés hatása az apoptotikus indexre.

A módszerek fejezetben leírtak szerint megállapítottuk a nekrosis mértékét, kiterjedését. A kontroll és a BGP-15 kezelt csoportok átlagos nekrotikus pontszáma 0.00 volt, az APAP kezelt csoporté 2.1 ± 1.0 , az APAP + BGP-15 párhuzamos kezelést kapott csoporté pedig 2.0 ± 0.7 . A nekrotikus

pontszámok tehát az utóbbi két csoportban jelentősen magasabbak voltak, mint a kontroll és a BGP-15 kezelést kapottakban, lényegi különbséget nem tudtunk az APAP és az APAP + BGP-15 párhuzamos kezelést kapott csoportok között kimutatni, a BGP-15 nem tudta a nekrotikus sejthalált mérsékelni.

Ahogy már korábban megemlítettük (1.3.3.3. fejezet) klinikai tanulmányok szerint az APAP kiváltotta hepatotoxicitásban szenvedő betegekben a keringő hasított K18 fragmens szintje, amely egy apoptózis marker jóval alacsonyabb volt (15%), mint a teljes hosszúságú K18 (F1K18), amely pedig egy nekrosis marker (85%) (Antoine és mtsai 2012). Ez a megfigyelés alátámasztja azt a vélekedést, amely szerint a súlyos APAP hepatotoxicitás a betegekben elsősorban a máj nekrosisával jár együtt és csak kis mértékben fordul elő apoptotikus sejthalál. Fenti eredményeink szerint APAP kezelés hatására jelentős mértékben megnövekszik az apoptotikus sejtek száma, azonban a nekrosis mennyiségileg jóval jelentősebb mértékű (46. és 47. ábra). Érdekes azt is megjegyeznünk, hogy bizonyos tanulmányok szerint a programozott nekrosis során, az apoptózishoz hasonlóan TUNEL detektálható DNS törések következnek be. A sejthalál későbbi fázisában következik be a plazmamembrán integritásának elvesztése (Lorenzo and Susin, 2007).

3.12.2. A ferroptózis szerepe az APAP kiváltotta sejthalál folyamatában

A közelmúltban leírt programozott sejthalálforma, a ferroptózis olyan anyagokkal váltható ki, amelyek GSH hiányt, vagy GPX4 gátlást idéznek elő. A ferroptózis, az apoptózistól, nekrozistól és az autofágiától egyértelműen különböző morfológiai, biokémiai és genetikai sajátosságokat mutat (Dixon és mtsai 2012). Tekintve, hogy az APAP reaktív metabolitja a NAPQI pont olyan sejthalált vált ki, amely GSH hiánnyal (előző fejezet, McGill és mtsai 2013) és GPX gátlással jellemezhető (Tirmenstein és Nelson 1990), valamint kaszpáz független (előző fejezet és Nagy és mtsai 2007), megvizsgáltuk a ferroptózis lehetséges szerepét az APAP kiváltotta (máj)sejthalál folyamatában.

Első kísérleteinket, a már korábban alkalmazott HepG2 máj karcinóma sejteken végeztük. Az viszonylag jól ismert, hogy a HepG2 sejtek gyakorlatilag nem fejezik ki a fázis I enzimeket (Roe és mtsai 1993) és ezért nem termelik a reaktív köztitermék NAPQI-t sem. Ennek következtében sem GSH hiány, sem fehérje addukt kialakulásával nem kell számolni ezekben a sejtekben (McGill és mtsai 2011). Mindazonáltal az APAP és az APAP valamint a specifikus ferroptózis gátlószer, ferrostatin-1 együttes kezelés (APAP + Fer-1), HepG2 sejtek életképességére gyakorolt hatásának megfigyelése hasznos lehet a ferroptózis APAP kiváltotta sejthalálban betöltött szerepének tanulmányozásában. Ahogyan azt várni lehetett a HepG2 sejtek viszonylag rezisztensek voltak az APAP kezelésre (17. táblázat).

17. táblázat Acetaminofen és ferrostatin-1 kezelés hatása HepG2 sejtek életképességére

Fer-1 koncentráció [μM]	APAP koncentráció [mM]			
	0	5	10	25
0	100.0 ±9.6	90.6 ±11.1	84.7 ±4.7*	50.8 ±3.1*
0.1	104.7 ±14.7	106.3 ±9.8	81.2 ±8.2*	54.4 ±6.7*
0.5	101.3 ±3.5	94.5 ±16.0	81.9 ±13.3	54.2 ±5.3*
1	98.8 ±1.0	109.9 ±15.7	82.9 ±8.0*	51.9 ±3.2*
5	103.9 ±5.8	91.0 ±14.6	80.8 ±7.1*	51.5 ±5.7*
10	89.4 ±5.8	94.9 ±10.8	72.7 ±7.9*	47.6 ±1.4*

*Szigifikáns különbség az APAP kezelést nem kapott mintákhoz (APAP 0 mM) képest (P<0.05).

Jelentős mértékű életképesség csökkenést mindössze az extrém magas, 25 mM-os APAP koncentrációnál lehetett megfigyelni. A ferrostatin-1, a korábban sikeresen alkalmazott koncentrációkban (0.1 és 0.5μM) (Dixon és mtsai 2012), az APAP jelenlététől függetlenül, semmilyen hatást sem gyakorolt a HepG2 sejtek életképességére (17. táblázat). Mindezen megfigyelések alapján kizárhatjuk annak a lehetőségét, hogy HepG2 sejtek esetében a ferroptózis szerepet játszik az APAP kiváltotta sejthalál folyamatában. Ezt a kijelentésünket megerősíti az a megfigyelés, amely szerint az egyetlen, APAP túladagolás esetén a gyakorlatban alkalmazott ellenszer, az N-acetil-cisztein, amely egyébként igen hatásos állatmodellek esetében is, a HepG2 sejteket nem tudta megvédeni (Manov és mtsai 2004). Ezen a ponton fontos megjegyeznünk, hogy a ferroptotikus sejthalált szintén ki lehetett védeni a sejtenyészítő közegbe tett N-acetil-ciszteinnel, vagy GSH-val (Yang és mtsai 2014). Habár a HepG2 sejtek kevésbé érzékenyek az APAP kezelésre, azért a HepG2 sejteket is képes megölni az APAP (17. táblázat, Manov és mtsai 2004, Macanas-Pirard és mtsai 2015). A sejthalál mechanizmusa azonban egyértelműen különbözik a primer májsejtek reaktív NAPQI

generálásával együtt járó sejthalálához képest, a HepG2 esetében elsősorban az apoptózis dominál (Jaeschke és mtsai 2012).

Tekintve, hogy az APAP toxicitás mechanizmusa az emberi szervezetben és az egerekben nagyon hasonló (McGill és mtsai 2012) igen gyakran primer egér májsejteken tanulmányozzák az APAP toxicitását. Ezért primer egér májsejteken mi is megvizsgáltuk a ferrostatin-1 hatását különböző koncentrációjú APAP jelenlétében (illetve távollétében). Annak érdekében, hogy mélyebb betekintést nyerjünk az APAP kiváltotta sejthalál mechanizmusának részleteibe a potens és szelektív RIP1 kináz gátló, necrostatin-1 (Nec-1) (Degterev és mtsai 2008, Vandenabeele és mtsai 2010), a vízoldható antioxidáns C-vitamin (DHA) és a zsírolható antioxidáns α -tokoferol (α -tok) hatását is megvizsgáltuk külön-külön, majd egymás mellett is. Mindegyik vizsgált reagens képes volt az APAP kezelt primer egér májsejtek életképességének növelésére (18. táblázat).

18. táblázat Különböző ferroptózis, nekroptózis gátlószerek és antioxidánsok hatása acetaminofen kezelt primer egér májsejtek életképességére.

Kezelés	APAP koncentráció [mM]		
	0	10	20
kontroll	100.0 $\pm$ 2.8	80.4 $\pm$ 7.7*	19.9 $\pm$ 2.7*
Fer-1 (1 μ M)	96.7 $\pm$ 2.0	85.7 $\pm$ 1.9*#	40.7 $\pm$ 3.0*#
Fer-1 (0.5 μ M)	98.2 $\pm$ 2.4	89.2 $\pm$ 3.7*#	40.1 $\pm$ 8.1*#
α -tok (1 nM)	104.3 $\pm$ 0.3	86.4 $\pm$ 6.5*	33.4 $\pm$ 4.0*#
DHA (1 mM)	106.4 $\pm$ 3.1	93.2 $\pm$ 3.4*#	52.2 $\pm$ 1.6*#
α -tok (1 nM) + DHA (1 mM)	108.8 $\pm$ 2.5	88.3 $\pm$ 0.9*#	53.9 $\pm$ 3.9*#
Nec-1 (25 μ M)	96.8 $\pm$ 5.9	93.5 $\pm$ 9.3#	37.7 $\pm$ 4.6*#

* Szignifikáns különbség az APAP kezelést nem kapott mintákhoz (APAP 0 mM) képest # Szignifikáns különbség a kontrollhoz képest (P<0.05).

Mind a ferrostatin-1, mind a necrostatin-1 hatása jelentősebb volt, magasabb, 20 mM-os APAP dózis esetében (18. táblázat). Így első ízben sikerült igazolnunk, hogy az APAP túladagolás kiváltotta GSH hiány és GPX gátlás (Tirmenstein és Nelson 1990, McGill és mtsai 2013) ferroptotikus sejthalált okozhat, amely mérsékelhető a szelektív ferroptózis gátlószerek, ferrostatin-1 alkalmazásával. Eredményeink tehát egyértelműen arra utalnak, hogy a ferroptózis szerepet játszhat az APAP kiváltotta sejthalál folyamatában. Ebben tulajdonképpen semmi meglepő sincs, hiszen a ferroptózist számos különböző anyag kiváltja, ami sejt szintű GSH hiányt és/vagy a GPX4 gátlását okozza (Dixon és mtsai 2012, Yang és mtsai 2014, Friedman Angeli és mtsai 2014). A ferrostatin-1-hez hasonlóan a RIP1 kináz gátló necrostatin-1 szintén fokozni tudta az APAP kezelt primer egér májsejtek életképességét (18. táblázat). Ez a megfigyelésünk megerősíti Takemoto és mtsai (2014), illetve Zhang és mtsai (2014)

eredményeit, amely szerint a necrostatin-1 mind a primer májsejteket, mind az egereket megvédte az APAP okozta citotoxicitástól.

A C-vitamin (DHA), valamint a C- és E-vitamin védőhatása meghaladta a kizárólag önmagában adagolt E-vitaminét (18. táblázat). Az extrém magas 25 mM-os APAP koncentráció esetén, kizárólag ennek a két anyagnak, a DHA és a DHA+ α -tokoferol kombinációja tudott bármiféle védő hatást elérni.

A ferrostatin-1 hatásának hátterét szeretnénk volna alaposabban megismerni, ezért tovább folytattuk primer májsejten a kísérleteinket. Következő lépésként mRNS-t izoláltunk és meghatároztuk a CYP2E1 kifejeződését, hogy megtudjuk a ferrostatin-1 védőhatása vajon a megváltozott APAP anyagcseréből fakad-e. Ahogy arra számítani lehetett az APAP kezelés igen jelentős mértékben fokozta a CYP2E1 kifejeződését (19. táblázat). Igen, ám, de semmilyen különbséget sem tudtunk detektálni a CYP2E1 kifejeződésében a ferrostatin-1 kezelt és a kontroll minták, illetve az APAP kezelt és az APAP + ferrostatin-1 kezelt primer egér májsejt minták között (19. táblázat).

19. táblázat Acetaminofen és ferrostatin-1 kezelés hatása primer egér májsejtek CYP2E1 mRNS szintjére

Kezelés	Relatív CYP2E1 mRNS szint
kontroll	1.0 $\pm$ 1.9
APAP (20 mM)	462.2 $\pm$ 1.9*
APAP (20 mM) + Fer-1 (1 μ M)	453.0 $\pm$ 1.6*
Fer-1 (1 μ M)	1.5 $\pm$ 2.8

*Szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($P < 0.05$).

Ezt követően meghatároztuk a minták GSH tartalmát, hogy megvizsgáljuk a ferrostatin-1 primer egér májsejtek detoxifikáló státuszára gyakorolt lehetséges hatását, különös tekintettel a reaktív NAPQI, GSH-val történő konjugációjára. Ahogyan a fent ismertetett korábbi állatkísérletes eredményeinkből arra számítottunk, az APAP kezelés nagymértékben csökkentette a primer egér májsejtek GSH tartalmát (20. táblázat). Az eredmények azonban arról is árulkodtak, hogy a ferrostatin-1 kezelés semmiféle befolyást sem gyakorolt a sejtek GSH szintjére (20. táblázat). Korábban a necrostatin-1 képes volt ugyan az APAP kiváltotta ROS termelést csökkenteni, de ennek sem volt semmiféle hatása sem a CYP2E1 kifejeződésére, sem az APAP kiváltotta GSH hiányra (Takemoto és mtsai 2014). A ferrostatin-1 védőhatása, tehát nem a csökkent APAP-NAPQI metabolizmuson és nem is a megváltozott GSH-val történő NAPQI konjugáción áll. Érdekes módon Pfa1 fibroblaszt sejtek esetében a GSH szint, BSO kezeléssel történő csökkentése, vagy a sejtek erastin kezelése sikeresen váltott ki ferroptózist, amelyet mind necrostatin-1, mind ferrostatin-1 kezeléssel ki lehetett védeni (Friedmann Angeli és mtsai 2014).

20. táblázat Acetaminofen és ferrostatin-1 kezelés hatása primer egér májsejtek GSH szintjére

Kezelés	Relatív GSH level [%]
kontroll	100.0 ±4.1
APAP (20 mM)	2.6 ±1.3*
APAP (20 mM) + Fer-1 (1 µM)	1.9 ±1.5*
Fer-1 (1 µM)	75.9 ±8.5*

*Szigifikáns különbség a kontrollhoz képest (P<0.05).

Eredményeink arra utalnak, hogy a nekroptózis (Takemoto és mtsai 2014, Zhang és mtsai 2014) és az apoptózis (Manov és mtsai 2004, Macanas-Pirard és mtsai 2015) mellett egy harmadik programozott sejthalál típus a ferroptózis is szerepet kap az APAP kiváltotta sejthalál folyamatában primer egér májsejtekben. A necrostatin-1-en kívül a ferrostatin-1 is hatékony ellenszere lehet az APAP kiváltotta máj-toxicitásnak. A ferroptózis nem máj specifikus folyamat, szerepe van a tumor sejtek vasfüggő, cisztein transzportot és GSH termelést gátlószeivel kiváltott sejthalál folyamataiban, ahogyan a patkány hipokampusz agyszeletek toxikus koncentrációjú, cisztein importot gátló (Murphy és mtsai 1989) glutamát kezelésének következtében kialakuló sejthalálában is (Dixon és mtsai 2012).

A DHA + α - tokoferol koktél kiváló sejtvédő hatása miatt szerettük volna megtalálni a két komponens azon ideális összetételi arányát, amely a legnagyobb mértékű védelmet nyújtja a sejtek számára. Ennek érdekében primer egér májsejteket kezeltünk APAP-nel különböző koncentrációjú DHA és α - tokoferol jelenlétében.

21. táblázat Különböző koncentrációjú DHA és α - tokoferol hatása acetaminofen kezelt primer egér májsejtek életképességére.

DHA [µM]	koncentráció	α -TOC koncentráció [nM]			
		0	1	50	500
0		100.0 ±4.7	124.9 ±7.1*	111.8 ±4.2*	83.0 ±4.0*
10		83.3 ±5.2*	100.2 ±4.8	118.4 ±6.7*	100.5 ±7.1
50		87.1 ±4.3*	104.7 ±5.5	131.7 ±1.8*	100.0 ±6.4
100		91.6 ±3.8*	102.4 ±5.8	127.8 ±5.8*	103.7 ±6.0
500		100.1 ±5.3	130.0 ±8.6*	113.5 ±3.5*	92.3 ±5.5*
1000		124.0 ±3.5*	151.4 ±5.0*	123.2 ±7.2*	85.5 ±4.0*

* Szigifikáns különbség az APAP kezelt (APAP 10 mM), de DHA (DHA 0 µM) és α - tokoferol (α - tokoferol 0 nM) nem kezelt mintákhoz képest (P<0.05).

Érdekes módon a legnagyobb sejtvédő hatást, pont a már korábban alkalmazott DHA, α -tokoferol keverék összetétellel tudtuk elérni (21. táblázat). Az E- és a C-vitamin (valamint a GSH) szinergikus hatása logikus, hiszen a három antioxidáns reciklálásuk révén, egymással összefonódó szerepet játszik a sejt elektrontranszfer színpadán (Meister 1994, May és mtsai 1996). A szóban forgó antioxidánsok kedvező hatása ezen szinergikus hatással, illetve azok lipid és nem-lipid eredetű ROS fogó képességével is magyarázható.

Összefoglalás

A C-vitamin megszerzésére külsőleg, elsősorban növényi, forrásokra szorulunk. Érdekes módon a növényekben folyó aszkorbát bioszintézis útvonala az ezredfordulóig ismeretlen volt. Felfedezése egyértelműen új lehetőségek tárházát nyitotta meg a biotechnológiában és az élelmiszertudományban, hiszen a C-vitamin bioszintézis és reciklálás befolyásolása által lehetőségünk nyílt a C-vitamin szint befolyásolására, magasabb C-vitamin tartalmú növények létrehozására, amelyek jobban ellenállnak a környezeti stressz hatásoknak, emelt vitamintartalmuk révén jobban eltartható, megnövelt értékű élelmiszereket állíthatunk elő belőlük. A növényi C-vitamin bioszintézis, utolsó lépését katalizáló, galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz enzim a mitokondriumban helyezkedik el. Kísérleteink kezdetekor az enzim topológiája ismeretlen volt. A két orientációs lehetőség, két különböző transzportrendszer meglétét jelentette, amennyiben aktív helye a mitokondriális mátrix felé néz az egyrészt egy L-galaktono-1,4-lakton, másrészt egy aszkorbát transzporter létezését veti fel a mitokondrium belső membránjában, hiszen az enzim szubsztrátjának a mátrixba kell jutnia, termékének pedig ki kell onnan kerülnie. Specifikus aszkorbát transzporterre akkor is szükség van, ha az aktív hely a két membrán közti tér felé néz, hiszen az aszkorbinsav jelenlétét több más sejtszervecskével egyetemben a mitokondriumban is leírták.

Radioaktívan jelölt C-vitamin segítségével tisztáztuk, hogy a növényi mitokondrium mind az aszkorbátot, mind a dehidroaszkorbátot (DHA) felveszi, azonban a DHA felvétele preferált. A transzport jellemzésével egyértelművé tettük, hogy az, egy fehérje mediálta folyamat. A DHA transzport glükózzal történő gátlása révén kimutattuk, hogy a növényi mitokondrium, a DHA transzport mellett, kétirányú, idő és hőmérsékletfüggő, gátolható glükóz transzportot is mutat. A transzport inhibíciós profilja valószínűsíti, hogy a két molekula ugyanazon transzporter ligandjai. A mitokondriumba jutott DHA a mitokondriális elektrontranszfer lánc részvételével aszkorbáttá redukálódik. Megállapítottuk, hogy a légzési elektrontranszfer lánc-függő DHA redukció helyszíne a mitokondriális mátrix, elektrondonora a komplex II. A DHA redukció során keletkezett aszkorbát kijut a mitokondriumból és a membránközi térben hozzájárul a komplex IV elektronellátásához. Eredményeink szerint a mitokondriális DHA redukcióhoz a GSH függő folyamatok csupán 20%-ban járulnak hozzá, azonban az általunk újonnan leírt komplex II függő redukció ettől lényegesen nagyobb mértékű. A növényi mitokondriumban tehát egy aszkorbát/DHA redox párból álló komplex III-at megkerülő elektrontranszfer út létezhet. A kerülőút limitáló lépése nagy valószínűség szerint az aszkorbát mátrixból történő kijutása, amelyet a DHA redukció eredményeként keletkező aszkorbát extramitokondriális térben történő késedelmes megjelenése is alátámaszt. Vizsgálatainkat a komplex III mutáns ppr-40 lúdfűn folytattuk. A komplex III-nál bekövetkező elektronáramlási blokk csökkent mértékű légzést, fokozott IV-es komplex, alternatív oxidáz aktivitást és fokozott aszkorbát fogyaszt eredményezett a ppr-40 lúdfű esetében. Így nem meglepő módon mind mitokondriális, mind sejtszinten jóval alacsonyabb és oxidáltabb C-vitamin szint jellemezte a ppr-40-es növényeket. Ez kiváltotta az aszkorbát-glutation ciklus minden enzimének aktivitásfokozódását. A ciklus enzimeinek emelkedett aktivitása együtt járt a redukcióhoz

elektronokat szolgáltató GSH mitokondriális szintjének emelkedésével is. A C-vitamin bioszintézis utolsó lépését katalizáló, mitokondriális L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz enzim mRNS szintje ugyan nem változott meg a ppr-40 mutáns növényekben, azonban aktivitása mintegy 25%-kal megemelkedett, feltehetően az oxidáltabb citokróm c miatt. Így egy (nem teljes mértékben sikeres) kompenzációs mechanizmust figyelhettünk meg a mutáns növényekben. A mitokondriális és a plazmamembránban folyó C-vitamin transzportfolyamatok összehasonlítása során kimutattuk, hogy a plazmamembránon keresztüli C-vitamin transzport esetében lineáris összefüggés van a külső inkubációs közeg C-vitamin redox státusza (DHA tartalma) és a transzportra kerülő DHA mennyisége között. Ez egyértelműen bizonyítja a sejtek DHA irányába mutatott transzport preferenciáját. A két anyag plazmamembránon keresztüli transzportja között nem mutatható ki kompetíció, ami az eltérő inhibíciós profillal egyetemben arra utal, 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. A mitokondriális glükózfelvételt tovább vizsgálva invertáz aktivitást találtunk a növényi mitokondriális mátrixban. Az enzimaktivitás pH optimuma, kinetikai paraméterei, valamint inhibitor profilja alapján az újonnan leírásra került enzimet a neutrális invertázok családjába soroltuk. A mitokondriális invertáz aktivitás kiszolgálására, a korábban leírt glükóz transzport mellett kétirányú, telíthető, valamint mitokondriális membránpotenciáltól független szacharóz és fruktóz transzportot találtunk a mitokondriális belső membránban. A különböző kinetikai paraméterek, valamint a kereszt-gátlás hiánya arra utalnak, hogy a transzportfolyamatokat három egymástól független transzporter mediálja. A mitokondriális C-vitamin transzporttal kapcsolatos vizsgálatainkat kiterjesztettük a humán mitokondriumokra is. A GLUT (SLC2), illetve az SVCT (SLC23) transzporter családok *in silico* lokalizációs vizsgálatával megerősítettük a GLUT1 és az SVCT2 transzporterek mitokondriális lokalizációját, ugyanakkor megkérdőjeleztük a GLUT10 mitokondriális jelenlétét. Ezen túl valószínűsítettük két újabb, GLUT családtag, a GLUT9 és a GLUT11 mitokondriális elhelyezkedését, illetve felvetettük DHA transzportban való részvételüket.

Kísérleteink második nagyobb fejezete a fehérjeláncokban található tiol csoportok diszulfidkötéseké történő oxidációjával, az oxidatív foldinggal foglalkozik. A fehérjék diszulfid kötése elsősorban az eukarióta sejtek endoplazmás retikulumában (ER) alakulnak ki. Az ER membránon keresztüli FAD transzport kritikus lehet a fehérjék oxidatív foldingjának szempontjából. Vizsgálataink során kétirányú, gátolható FAD transzportot találtunk emlős mikroszómális membránok esetében. A FAD felvétel atraktiloziddal történő gátlása megakadályozza a FAD kiváltotta fehérje tiol oxidációt, amely révén igazolni tudtuk a FAD szerepét a fehérje tiolok oxidációjában emlős mikroszómális vezikulákban. Ezt követően az újonnan felfedezett mitokondriális oxidatív folding apparátus felé fordult érdeklődésünk. A membránközi 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. Annak érdekében, hogy megtudjuk, mi történik a mitokondriális diszulfidgeneráló rendszerrel működőképes légzési elektrontranszfer lánc hiányában, mtDNS fosztott sejteket készítettünk. A mtDNS hiányának hatására, a mitokondriális oxidatív folding apparátus fontos eleme, az ALR fehérjeszintje

jelentős mértékben megnőtt. Tekintve, hogy az ALR mennyisége nem mutat változást a sejtek légzési komplex gátló és szétkapcsoló szerekekkel történő kezelésére, az ATP, illetve ROS szintek ALR fehérjeszintet szabályozó szerepe nem tarjuk valószínűnek, azonban a mtDNS mennyisége fontos szabályozó faktornak látszik.

Kísérleteink következő, harmadik szakaszában, főszereplőnek a C-vitamin mellett a legfontosabbnak tartott vízoldható antioxidáns, a GSH-t választottuk. A DHA redukciós vizsgálatoknál már alkalmazott γ -glutamilcisztein szintáz gátló BSO alkalmazásával, illetve az extrém mértékű GSH felhasználó acetaminofen (APAP) kezelésekkel GSH hiányt értük el. Kísérleteink során igazoltuk, hogy *in vivo* APAP és 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. Ugyanakkor kimutattuk, hogy a nekroptózis és az apoptózis mellett egy harmadik programozott sejthalál típus, a ferroptózis is szerepet kap az APAP kiváltotta sejthalál folyamatában. 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.

Eredményeink jól demonstrálják a növényi mitokondrium és a C-vitamin anyagszere (szintézis, felhasználás és reciklálás) szoros kapcsolatát. A mitokondriális C-vitamin reciklálás vizsgálata során, illetve a ppr-40 mutáns lúdfűn kapott eredményeink kísérletes munkánk gyakorlati hasznosítását vetítik előre. A C-vitamin és glükóz rokon szerkezete, mitokondriális transzportjuk keresztgátlása révén feltárt mitokondriális invertáz rendszer szintén a gyakorlati hasznosítás lehetőségét rejti magában. Számos esetben példát láthattunk a C-vitamin és a GSH együttes, egymást befolyásoló, egymást segítő hatására, amely újabb bekezdésekkel bővíti a két legfontosabb vízoldható antioxidáns már így is sok közös fejezetet tartalmazó történetét.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani Salgó Andrásnak, aki 2003-ban bizalmat szavazott a frissen végzett doktoránsnak és munkatársának választott, őszintén remélem, hogy ezt, azóta sem bánta meg. Köszönöm, hogy ajtaja mindig nyitva állt előttem. Köszönöm a bizalmat Vértessy G. Beátának, aki 2015-ben helyettesének választott, hogy együtt dolgozzunk a Műegyetemen folyó biotechnológiai kutatásért, oktatásért. 2003-ban egy, a BME-n új területtel kezdtem el foglalkozni. Munkám nem lehetett volna sikeres korábbi és jelenlegi együttműködő partnereim nélkül, akik közül elsőként Bánhegyi Gábort és Mandl Józsefet kell megemlítenem, a Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani Intézetének jelenlegi és korábbi igazgatóit. Kutatói és emberi világképem alakulásához, kiteljesedéséhez nagyban hozzájárult az Antwerpeni Egyetem, Növényélettani és Növény Biotechnológiai Intézetében eltöltött idő. Az intézet munkatársai közül ki kell emelnem Nele Horemans, Han Asard, Geert Potters és Tine Raeymakers szerepét. A kutatói fejlődésemhez szintén jelentős mértékben hozzájárult a Sienai Egyetemen Angelo Benedetti laboratóriumában és a Molise Egyetemen Salvatorre Passarella laboratóriumában eltöltött idő. Hazai együttműködő partnereim közül mindenképpen ki kell emelnem Szabados Lászlót, Zsigmond Laurát és Rigó Gábort az SzBK Növénybiológiai Intézet munkatársait. Közvetlen munkatársaim közül köszönettel tartozom Wunderlich Líviusnak, Deák Veronikának és Örsi Ferencnek, akitől gyakorlatias, igazi mérnöki hozzáállást, gondolkodást tanulhattam. Köszönöm Lásztity Radomir professzor úrnak, hogy biokémia előadásai során megszerettette velem ezt a csodálatos tudományt, amely rabul ejtett és professzor úr munkatársává tett. Önzetlen segítségükért köszönettel tartozom Farkas Tamásnének, Laukó Évának, Kalausné Boruzs Beátának és Mile Valériának. Eddigi munkám során számtalan remek fiatal kollégával, tanítvánnyal volt alkalmam megismerkedni, közösen dolgozni, közülük is kiemelkedett Pézsa Nikolett, Mayer Miklós, Tarcsay Ákos. A kiváló tanítványok legjobbjai PhD hallgatóként hosszabb ideig társaimul szegődtek a kutatásban, köszönöm Tomasskovics Bálint, Balogh Tibor, Lőrincz Tamás, Czobor Ádám és Hajdinák Péter lelkes, odaadó munkáját. Köszönöm a BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék teljes kollektívájának az elmúlt 13 évben nyújtott támogatásukat.

Irodalomlista

1. Agius F, González-Lamothe R, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta V. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nat Biotechnol* 21: 177-181, 2003.
2. Alhagdow M, Mounet F, Gilbert L, Nunes-Nesi A, Garcia V, Just D, Petit J, Beauvoit B, Fernie AR, Rothan C, Baldet P. Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiol* 145: 1408-1422, 2007.
3. Allen S, Balabanidou V, Sideris DP, Lisowsky T, Tokatlidis K. Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *J Mol Biol* 353: 937-944, 2005.
4. Al-Sa'doni HH, Megson IL, Bisland S, Butler AR, Flitney FW. Neocuproine, a selective Cu(I) chelator, and the relaxation of rat vascular smooth muscle by S-nitrosothiols. *Br J Pharmacol* 121: 1047-1050, 1997.
5. Alscher RG. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plant* 77: 457-464, 1989.
6. Anderson JW, Foyer CH, Walker DA. Lightdependent reduction of dehydroascorbate and uptake of exogenous ascorbate by spinach chloroplasts. *Planta* 158: 442-450, 1983.
7. Antoine DJ, et al. Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity. *J Hepatol.* 56:1070-1079, 2012.
8. Anzai N, Ichida K, Jutabha P, Kimura T, Babu E, Jin C.J, Srivastava S, Kitamura K, Hisatome I, Endou H, Sakurai H. Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. *J. Biol. Chem.* 283: 26834-26838, 2008.
9. Aono M, Kubo A, Saji H, Tanaka K, Kondo N. Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana-tabacum* with high chloroplastic glutathione-reductase activity. *Plant Cell Physiol.* 34: 129-135, 1993.
10. Aoyama K, Watabe M, Nakaki T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J. Pharmacol. Sci.* 108: 227-238, 2008.
11. Arisi ACM, Noctor G, Foyer CH, Jouanin L. Modification of thiol contents in poplars (*Populus tremula* × *P. alba*) overexpressing enzymes involved in glutathione synthesis. *Planta* 203: 362-372, 1997.
12. Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267: 6102-6109, 2000.
13. Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 936-944, 1999.
14. Arrigoni O, De Gara L, Tommasi F, Liso R. Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiology* 99: 235-238, 1992.

15. Arrigoni O, Dipierro S, and Borraccino G. Ascorbate free radical reductase: a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Lett* 125: 242–244, 1981.
16. Arrigoni O. Ascorbate system in plant development. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26: 407–419, 1994.
17. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol. Life Sci.* 57: 1825–1835, 2000.
18. Asada K, Miyake C. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant and Cell Physiology* 33: 541–553, 1992.
19. Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601–639, 1999.
20. Augustin R. The protein family of glucose transport facilitators: it's not only about glucose after all. *IUBMB Life* 62: 315–333, 2010.
21. 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.
22. Baier M, Noctor G, Foyer CH, Dietz KJ. Antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxin in *Arabidopsis* specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism. *Plant Physiology* 124: 823–832, 2000.
23. Bajt ML, Knight TR, Farhood A, Jaeschke H. Scavenging peroxynitrite with glutathione promotes regeneration and enhances survival during acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 307:67–73, 2003.
24. Ballatori N, Krance SM, Marchan, R, Hammond CL. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol. Aspects Med.* 30: 13–28, 2009.
25. Balogh T, Szarka A Egy multifunkcionális fehérje: az ALR. *ORVOSI HETILAP* 156: 503-509, 2015.
26. Bánhegyi G, Benedetti A, Margittai E, Marcolongo P, Fulceri R, Németh CE, Szarka A. Subcellular compartmentation of ascorbate and its variation in disease states. *Biochim Biophys Acta.* 1843:1909-1916, 2014.
27. Bánhegyi G, Braun L, Csala M, Puskás F, Mandl J, Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radic. Biol. Med.* 23: 793–803, 1997.
28. Bánhegyi G, Marcolongo P, Puskás F, Fulceri R, Mandl J, Benedetti A Dehydroascorbate and ascorbate trans-port in rat liver microsomal vesicles. *J Biol Chem* 273:2758–2762, 1998.
29. Bánhegyi G, Marcolongo P, Puskás F, Fulceri R, Mandl J, Benedetti A. Dehydroascorbate and ascorbate transport in rat liver microsomal vesicles. *J. Biol. Chem.* 273: 2758–2762, 1998.
30. Bannai, S. Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261: 2256–2263, 1986.
31. Barile M, Brizio C, Valenti D, De Virgilio C, and Passarella S. The riboflavin/FAD cycle in rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 267: 4888–4900, 2000.
32. 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.

33. Bartoli CG, Yu J, Gomez F, Fernandez L, McIntosh L, Foyer CH. Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany* 57: 1621–1631, 2006.
34. Bashandy T, Guillemot J, Vernoux T, Caparros-Ruiz D, Ljung K, Meyer Y. & Reichheld JP. Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in *Arabidopsis* auxin signaling. *The Plant Cell* 22: 376–391, 2010.
35. Bass R, Ruddock LW, Klappa P, Freedman RB. A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J. Biol. Chem.* 279: 5257–5262, 2004.
36. Beck E, Burkert A, Hofmann M. Uptake of L-ascorbate by intact spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 73: 41–45, 1983.
37. Beckman JS. Peroxynitrite versus hydroxyl radical: The role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 738: 69–75, 1994.
38. Benham AM, Cabibbo A, Fassio A, Bulleid N, Sitia R, Braakman I. The CXXCXXC motif determines the folding, structure and stability of human Ero1- α . *EMBO J.* 19: 4493–4502, 2000.
39. Bergmeyer HU, Gawehn K, Grassl M. Enzymatic assay of fumarase. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol 1. Academic Press, New York, pp 543–545, 1974.
40. Berndt C, Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim. Biophys. Acta* 1783: 641–650, 2008.
41. Betz AL, Drewes LR, Gilboe DD. Inhibition of glucose transport into brain by phlorizin, phloretin and glucose analogues. *Biochim Biophys Acta.* 406: 505–515, 1975.
42. Bick JA, Aslund F, Chen Y. & Leustek T. Glutaredoxin function for the carboxyl-terminal domain of the plant-type 5'-adenylylsulfate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 8404–8409, 1998.
43. Bielski BHJ. Chemistry of ascorbic acid radicals. In: PA Seib, BM Tolbert, editors, *Ascorbic acid: chemistry, metabolism and uses*. American Chemical Society 200: 81–100, 1982.
44. Bien M, Longen S, Wagener N, Chwalla I, Herrmann JM, Riemer J. Mitochondrial disulfide bond formation is driven by intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione. *Mol Cell* 37: 516–528, 2010.
45. Bihlmaier K, Mesecke N, Terzyiska N, Bien M, Hell K, Herrmann JM. The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *J Cell Biol* 179: 389–395, 2007.
46. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707–716, 1973.
47. Briesemeister S, Rahnenfuhrer J, Kohlbacher O. YLoc--an interpretable web server for predicting subcellular localization. *Nucleic Acids Res* 38: 497–502, 2010.
48. Broadbent P, Creissen GP, Kular, B, Wellburn AR, Mullineaux PM. Oxidative stress responses in transgenic tobacco containing altered levels of glutathione-reductase activity. *J. Plant* 8: 247–255, 1995.
49. Brummell DA. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* 33: 103–119, 2006.
50. Buchner P, Stuijver CE, Westerman S, Wirtz M, Hell R, Hawkesford MJ. & De Kok LJ. Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica*

- oleraceas affected by atmospheric H₂S and pedospheric sulfate nutrition. *Plant Physiology* 136: 3396–3408, 2004.
51. Buerzle M, Suzuki Y, Ackermann D, Miyazaki H, Maeda N, Clemençon B, et al. The sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Mol. Aspects Med.* 34: 436–454, 2013.
 52. Bulley S, Wright M, Rommens C, Yan H, Rassam M, Lin-Wang K, Andre C, Brewster D, Karunairetnam S, Allan AC, Laing WA. Enhancing ascorbate in fruits and tubers through over-expression of the L-galactose pathway gene GDP-L-galactose phosphorylase. *Plant Biotechnol. J.* 10: 390–397, 2012.
 53. Büttner M The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Lett.* 581:2318-2324, 2007.
 54. Büttner M, Sauer N Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim Biophys Acta* 1465: 263-274, 2000.
 55. Cabibbo A, Pagani M, Fabbri M, Rocchi M, Farmery MR, Bulleid NJ, Sitia R. ERO1-L, a human protein that favors disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275:4827–4833, 2000.
 56. Cai X, Ye J, Hu T, Zhang Y, Ye Z. and Li H. Genome-wide classification and expression analysis of nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in tomato. *Plant Growth Regul.* 73: 19–30, 2014.
 57. Cairns NG, Pasternak M, Wachter A, Cobbett CS. & Meyer AJ. Maturation of Arabidopsis seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiology* 141: 446–455, 2006.
 58. Cascia G, Bulley SM, Punter M, Bowen J, Rassam M, Schotsmans WC, Larrigaudière C, Johnston JW. 2012. Investigation of ascorbate metabolism during inducement of storage disorders in pear. *Physiologia Plantarum* 147:121-134, 2013.
 59. Caulfield MJ, Munroe PB, O'Neill D, Witkowska K, Charchar FJ, Doblado M, Evans S, Eyheramendy S, Onipinla A, Howard P, Shaw-Hawkins S, Dobson R.J, Wallace C, Newhouse SJ, Brown M, Connell JM, Dominiczak A, Farrall M, Lathrop GM, Samani NJ, Kumari M, Marmot M, Brunner E, Chambers J, Elliott P, Kooner J, Laan M, Org E, Veldre G, Viigimaa M, Cappuccio FP, Ji C, Iacone R, Strazzullo P, Moley KH, Cheeseman C. SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans. *PLoS Med.* 5: e197, 2008.
 60. Chacinska A, Pfannschmidt S, Wiedemann N, Kozjak V, Sanjuan Szklarz LK, Schulze-Specking A, Truscott KN, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J* 23: 3735–46, 2004.
 61. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527–605, 1979.
 62. Chatterjee A: Reduced Glutathione: A Radioprotector or a Modulator of DNA-Repair Activity? *Nutrients* 5: 525-542, 2013.
 63. Chen Y, Shertzer HG, Schneider SN, Nebert DW, Dalton TP. Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *J. Biol. Chem.* 280: 33766–33774, 2005.

64. Chen Z, and Lash LH. Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285: 608–618, 1998.
65. Chen Z, Putt DA, and Lash LH. Enrichment and functional reconstitution of glutathione transport activity from rabbit kidney mitochondria: further evidence for the role of the dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers in mitochondrial glutathione transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 373: 193–202, 2000.
66. Chew O, Whelan J, and Millar AH. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J Biol Chem* 278: 46869–46877, 2003.
67. Chin KT, Kang G, Qu J, Gardner LB, Coetzee WA, Zito E, Fishman GI, Ron D The sarcoplasmic reticulum luminal thiol oxidase ERO1 regulates cardiomyocyte excitation-coupled calcium release and response to hemodynamic load. *FASEB J* 25: 2583–2591, 2011.
68. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M. and Chan FK. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1–RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137: 1112–1123, 2009.
69. Citterio S, Sgorbati G, Scippa S, Sparvoli E. Ascorbic acid effect on the onset of cell proliferation in pea root. *Physiologia Plantarum* 92: 601–607, 1994.
70. Clairmont CA, De Maio A. and Hirschberg CB. Translocation of ATP into the lumen of rough endoplasmic reticulum-derived vesicles and its binding to luminal proteins including BiP (GRP 78) and GRP 94. *J. Biol. Chem.* 267: 3983–3990, 1992.
71. Claros MG, Vincens P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241:779–786, 1996.
72. Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J.* 18: 3325–3333, 1999.
73. Clemens, S. Evolution and function of phytochelatin synthases. *J. Plant Physiol.* 163: 319–332, 2006.
74. Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 159–182, 2002.
75. Coll O, Colell A, Garcia-Ruiz C, Kaplowitz N. and Fernandez-Checa, JC. Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology* 38: 692–702, 2003.
76. Collins Y, Chouchani ET, James AM, Menger KE, Cocheme HM, Murphy MP. Mitochondrial redox signalling at a glance. *J. Cell Sci.* 125: 801–806, 2012.
77. Colombini M. A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane *Nature* 279: 643–645, 1979.
78. Conklin PL, Norris SR, Wheeler GL, Williams EH, Smirnoff N, Last RL. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4198–4203, 1999.
79. Cooper AJ, Kristal BS. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.* 378: 793–802, 1997.
80. Cooper JB, Heuser JE, Varner JE. 3,4-Dehydroproline inhibits cell wall assembly and cell division in tobacco protoplasts. *Plant Physiology* 104, 747–752, 1994.

81. Coppock DL, Thorpe C. Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. *Antioxid Redox Signal* 8: 300–311, 2006.
82. Corcoran GB, Racz WJ, Smith CV, Mitchell JR. Effects of N-acetylcysteine on acetaminophen covalent binding and hepatic necrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 232: 864–872, 1985.
83. Corpe C, Eck P, Wang J, Al-Assani H, Levine M. Intestinal dehydroascorbic acid (DHA) transport mediated by the facilitative sugar transporters, GLUT2 and GLUT8. *J Biol Chem* 288: 9092–9101, 2013.
84. Corpe C, Tu H, Wang J. et al.: SVCT1 (Slc23a1) knock out mice: Slc23a1 as the vitamin C kidney reabsorptive transporter. *FASEB J.* 21: 1b520, 2007.
85. Corpe CP, Lee J-H, Kwon O, Eck P, Narayanan J, Kirk KL. and Levine M. 6-Bromo-6-deoxy-L-ascorbic acid an ascorbate analog specific for Na⁺-dependent vitamin C transporter but not glucose transporter pathways. *J. Biol. Chem.* 280: 5211–5220, 2005.
86. Cover C, Mansouri A, Knight TR, Bajt ML, Lemasters JJ, Pessayre D. et al. Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity *J. Pharmacol. Exp. Ther* 315: 879–887, 2005.
87. Creissen G, Fermin J, Fryer M, Kular B, Leyland N, Reynolds H, Pastori, G, Wellburn F, Baker N, Wellburn A. et al. Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* 12: 301–301, 2000.
88. Crivellato E, Nico B, Ribatti D, The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle, *Anat. Rec. (Hoboken)* 291: (2008) 1587–1602, 2000.
89. Csala M, Braun L, Mile V, Kardon T, Szarka A, Kupcsulik P, Mandl J, Bánhegyi G. Ascorbate-mediated electron transfer in protein thiol oxidation in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 460:539–543, 1999.
90. Csala M, Mile V, Benedetti A, Mandl J, Bánhegyi G. Ascorbate oxidation is a prerequisite for its transport into rat liver microsomal vesicles. *Biochem J* 349:413–415, 2000.
91. Csala M., Mile V., Benedetti A., Mandl J., Bánhegyi G., Ascorbate oxidation is a prerequisite for its transport into rat liver microsomal vesicles, *Biochem. J.* 349 (Pt 2): 413–415, 2000.
92. Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. Genomewide identification and testing of superior reference genes for transcript normalisation in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 139: 5e17, 2005.
93. Dabir DV, Leverich EP, Kim SK, Tsai FD, Hirasawa M, Knaff DB, Koehler CM. A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1. *EMBO J* 26: 4801–411, 2007.
94. Daie J, Wilusz EJ. Facilitated transport of glucose in isolated phloem segments of celery. *Plant Physiol* 85: 711–715, 1987.
95. Dall'Asta V, Gazzola GC, Franchi-Gazzola R, Bussolati O, Longo N, Guidotti GG. Pathways of L-glutamic acid transport in cultured human fibroblasts. *J. Biol.Chem.* 258: 6371–6379, 1983.
96. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* 10: 389–406, 2006.

97. Dara L, Johnson H, Suda J, Win S, Gaarde W, Han D, Kaplowitz N. Receptor interacting protein kinase 1 mediates murine acetaminophen toxicity independent of the necrosome and not through necroptosis. *Hepatology* 62: 1847-1857, 2015.
98. Davey MW, Auwerkerken A, Keulemans J. Relationship of apple vitamin C and antioxidant contents to harvest date and postharvest pathogen infection. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 802–813, 2007.
99. Davey MW, Kenis K, Keulemans J. Genetic control of fruit vitamin C contents. *Plant Physiology* 142, 343–351, 2006.
100. Davey MW, Keulemans J. Determining the potential to breed for enhanced antioxidant status in *Malus*: mean inter- and intravarietal fruit vitamin C and glutathione contents at harvest and their evolution during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 8031–8038, 2004.
101. Davey MW, Van Montagu M, Inzé D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie IJJ, Strain JJ, Favell D, Fletcher J. Plant l-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 825–860, 2000.
102. De Gara L, De Pinto MC, Arrigoni O. Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum* 100: 894–900, 1997.
103. De Gara L, Paciullo C, Liso R, Stefani A, Arrigoni O. Correlation between ascorbate peroxidase activity and some anomalies of seedlings from aged caryopses of *Dasypyrum villosum* (L.) Borb. *Journal of Plant Physiology* 137: 697–700, 1991.
104. de Rey-Pailhade, J. Le philothéion, diastase d'hydrogénation. *C. R. Soc. Biol. XCIX*: 1700, 1928.
105. De Rey-Pailhade, M.J. Sur un corps d'origine organique hydrogénant le soufre à froid. *C. R. Acad. Sci.* 106: 1683–1684, 1888.
106. De Tullio MC, Paciolla C, Dalla Vecchia F, Rascio N, D'Emerico S, De Gara L, Liso R, Arrigoni O. Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta* 209: 424–434, 1999.
107. DeBolt S, Cook DR, Ford CM. l-tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103: 5608–5613, 2006.
108. DeBolt S, Melino V, Ford CM. Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants. *Annals of Botany* 99: 3–8, 2007.
109. Degterev A, Hitomi J, Gernscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A. and Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat. Chem. Biol.* 4: 313–321, 2008.
110. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA. and Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* 1: 112–119, 2005.
111. del Rio LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jimenez A, Lopez-Huertas E, Hernandez JA. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* 116: 1195–1200, 1998.
112. Demmig-Adams B, Adams WW, 3rd. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1: 21–26, 1996.

113. Deponte M, Hell K. Disulphide bond formation in the intermembrane space of mitochondria. *J Biochem* 146: 599–608, 2009.
114. Dhar-Masareño M, Cárcamo JM, Golde DW. Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C. *Free Radic Biol Med* 38: 1311-1322, 2005.
115. Di Daniel E, Mok MH, Mead E, Mutinelli C, Zambello E, Caberlotto LL, Pell TJ, Langmead CJ, Shah AJ, Duddy G, Kew JN, Maycox PR. Evaluation of expression and function of the H⁺/myo-inositol transporter HMIT. *BMC Cell Biol* 10: 54, 2009.
116. Di Fonzo A, Ronchi D, Lodi T, et al. 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, 2009.
117. Ding S, Lu Q, Zhang Y, Yang Z, Wen X, Zhang L, Lu C. Enhanced sensitivity to oxidative stress in transgenic tobacco plants with decreased glutathione reductase activity leads to a decrease in ascorbate pool and ascorbate redox state. *Plant Mol. Biol.* 69: 577–592, 2009.
118. Dixon DP, Davis BG. & Edwards R. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 277 30859–30869, 2002.
119. Dixon DP, Hawkins T, Hussey PJ. & Edwards R. Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. *Journal of Experimental Botany* 60: 1207–1218, 2009.
120. Dixon DP. & Edwards R. Glutathione S-transferases. *The Arabidopsis Book* 8, e0131. doi/full/10.1199/tab.0131, 2010.
121. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B 3rd, Stockwell BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 149: 1060-1072, 2012.
122. Doege H, Bocianski A, Scheepers A, Axer H, Eckel J, Joost HG, Schürmann A. Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem. J.* 359: 443–449, 2001.
123. Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, Smirnoff 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.
124. Dringen R, Gutterer JM. Glutathione reductase from bovine brain. *Methods Enzymol.* 348: 281–288, 2002.
125. Dringen R, Kussmaul L, Gutterer JM, Hirrlinger J, Hamprecht B. The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J. Neurochem.* 72: 2523–2530, 1999.
126. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J. Neurosci. Res.* 79: 157–165, 2005.
127. Du K, McGill MR, Xie Y, Bajt ML, Jaeschke H. Resveratrol prevents protein nitration and release of endonucleases from mitochondria during acetaminophen hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 81: 62-70, 2015.

128. Dudkina NV, Heinemeyer J, Sunderhaus S, Boekema EJ, Braun HP. Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends Plant Sci* 11: 232–240, 2006.
129. Dumas Y, Dadomo M, Lucca G, Grolier P. A review: effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 369–382, 2003.
130. Dumville JC, Fry SC. Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymic mechanism of fruit softening. *Planta* 217: 951–961, 2003.
131. Dutilleul C, Driscoll S, Cornic G, De Paepe R, Foyer CH, Noctor G. Functional mitochondrial complex I is required by tobacco leaves for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients, *Plant Physiol.* 131 264-275, 2003b
132. Dutilleul C, Garmier M, Noctor G, Mathieu C, Chétrit P, Foyer CH, dePaepe R. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signalling and diurnal regulation, *Plant Cell* 15: 1212-1226, 2003.
133. Edman JC, Ellis L, Blacher RW, Roth RA, Rutter WJ Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature* 317: 267–270, 1985.
134. Edwards EA, Rawsthorne S, and Mullineux PM. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180: 278–284, 1990.
135. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *J Mol Biol* 300: 1005–1016, 2000.
136. Erecinska M, Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 35: 245–296, 1990.
137. Esaka M, Fujisawa K, Goto M. and Kisu Y. Regulation of ascorbate oxidase expression in pumpkin by auxin and copper. *Plant Physiol.* 100: 231–237, 1992.
138. Esterbauer, E., and Grill, D. Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of *Picea abies*. *Plant Physiol.* 61: 119-121, 1978.
139. Farré EM, Tiessen A, Roessner U, Geigenberger P, Trethewey RN, Willmitzer L Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method. *Plant Physiol* 127: 685-700, 2001.
140. Fass D. The Erv family of sulfhydryl oxidases. *Biochim Biophys Acta* 1783: 557–566, 2008.
141. Faurobert M, Mihr C, Bertin N, Pawlowski T, Negroni L, Sommerer N, Causse M. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. *Plant Physiology* 143: 1327–1346, 2007.
142. Fernández-Checa JC. Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 471-479, 2003.
143. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J.* 17: 64–66, 2003.
144. Flessner LB, Moley KH. Similar [DE]XXXL[LI] motifs differentially target GLUT8 and GLUT12 in Chinese hamster ovary cells. *Traffic* 10: 324–333, 2009.

145. Foyer C, Lelandais M, Galap C, Kunert KJ. Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *J. Plant Physiol.* 97: 863–872, 1991.
146. Foyer CH and Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21–25, 1976.
147. Foyer CH, Lelandais M. A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaf mesophyll cells, *J. Plant Physiol.* 148: 391–398, 1996.
148. Foyer CH, Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* 155: 2–18, 2011.
149. Foyer CH, Shigeoka S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology* 155: 93–100, 2011.
150. Foyer CH, Souriau N, Perret S, Lelandais M, Kunert, KJ, Pruvost C, Jouanin L. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *J. Plant Physiol.* 109: 1047–1057, 1995.
151. Foyer CH. and Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21–25, 1976.
152. 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.
153. Frand AR, Kaiser CA. The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 1: 161–170, 1998.
154. Fratelli M, Goodwin LO, Orom UA, Lombardi S, Tonelli R, Mengozzi M, Ghezzi P. Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 13998–14003, 2005.
155. Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, Herbach N, Aichler M, Walch A, Eggenhofer E, Basavarajappa D, Rådmark O, Kobayashi S, Seibt T, Beck H, Neff F, Esposito I, Wanke R, Förster H, Yefremova O, Heinrichmeyer M, Bornkamm GW, Geissler EK, Thomas SB, Stockwell BR, O'Donnell VB, Kagan VE, Schick JA, Conrad M. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol.* 16: 1180–1191, 2014.
156. Frottin F, Espagne C, Traverso JA, Mauve C, Valot B, Lelarge-Trouverie C, Zivy M, Noctor G, Meinel T. & Giglione C. Cotranslational proteolysis dominates glutathione homeostasis for proper growth and development. *The Plant Cell* 21: 3296–3314, 2009
157. Fry SC. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *The Biochemical Journal* 332 : 507–515, 1998.
158. Fryer MJ. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α-tocopherol), *Plant Cell Environ.* 15: 381–392, 1992.
159. Gallagher J, Pollock C. Isolation and characterization of a cDNA clone from *Lolium temulentum* L. encoding for a sucrose hydrolytic enzyme which shows alkaline/neutral invertase activity *J Exp Bot* 49: 789–795, 1998.
160. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar, S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter

- ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G. and Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19: 107–120, 2012.
161. Gandhi CR, Chaillet JR, Nalesnik M a, et al. Liver-specific deletion of augments liver regeneration accelerates development of steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in mice. *Gastroenterology* 148: 379–391, 2015.
 162. Gao M, Monian P, Quadri N, Ramasamy R, Jiang X. Glutaminolysis and Transferrin Regulate Ferroptosis. *Mol Cell.* 59: 298–308, 2015.
 163. Gautier H, Lopez-Lauri F, Massot C, Murshed R, Marty I, Grasselly D, Keller C, Sallanon H, Genard M Impact of ripening and salinity on tomato fruit ascorbate content and enzymatic activities related to ascorbate recycling. *Functional Plant Science and Biotechnology* 4: 66–75, 2010.
 164. Gest N, Gautier H, Stevens R. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *J Exp Bot.* 64: 33–53, 2013.
 165. Gest N, Page D, Birtic S, Gouble B, Gilbert L, Garchery C, Causse M, Stevens R. Response of the fruit antioxidant system to the post-chilling period in two different tomato lines. *Functional Plant Science and Biotechnology* 4: 76–83, 2010.
 166. Ghezzi, P. Protein glutathionylation in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1830: 3165–3172, 2013.
 167. Gilbert H.F. Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods Enzymol.* 251: 8–28, 1995.
 168. Gilbert HF. Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods Enzymol.* 107: 330–351, 1984,
 169. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39: 1529–1542, 1998.
 170. Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I. S-Glutathionylation: From redox regulation of protein functions to human diseases. *J. Cell. Mol. Med.* 8: 201–212, 2004.
 171. Goldberger RF, Epstein CJ, Anfinsen CB. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J Biol Chem* 238: 628–635, 1963.
 172. Goldberger RF, Epstein CJ, Anfinsen CB. Purification and properties of a microsomal enzyme system catalyzing the reactivation of reduced ribonuclease and lysozyme. *J Biol Chem* 239: 1406–1410, 1964.
 173. Gournas C, Papageorgiou I. and Dhalluin G. The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) family: genomics, evolution, structure-function relationships and physiological role. *Mol. Biosyst.* 4: 404–416, 2008.
 174. Graham JW, Williams TC, Morgan M, Fernie AR, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *Plant Cell* 19: 3723–3738, 2007.
 175. Griffith OW, Meister A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4668–4672, 1985.

176. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 922–935, 1999.
177. Grill E, Löffler S, Winnacker EL, Zenk MH. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatase synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6838–6842, 1989.
178. Gromes R, Hothorn M, Lenherr ED, Rybin V, Scheffzek K, Rausch T. The redox switch of gamma-glutamylcysteine ligase via a reversible monomer-dimer transition is a mechanism unique to plants. *Plant J.* 54: 1063–1075, 2008.
179. Gross E, Sevier CS, Vala A, Kaiser CA, Fass D. A new FAD-binding fold and intersubunit disulfide shuttle in the thiol oxidase Erv2p. *Nature Struct Biol* 9: 61–67, 2002.
180. Groten K, Dutilleul C, van Heerden PD, Vanacker H, Bernard S, Finkemeier I, Dietz KJ, Foyer CH. Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence. *FEBS Letters* 580: 1269–1276, 2006.
181. Gruss-Fischer T, Fabian I. Protection by ascorbic acid from denaturation and release of cytochrome c, alteration of mitochondrial membrane potential and activation of multiple caspases induced by H₂O₂ in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 63:1325–1335, 2002.
182. Guidarelli A, Cerioni L, Fiorani M, Azzolini C, Cantoni O. Mitochondrial ascorbic acid is responsible for enhanced susceptibility of U937 cells to the toxic effects of peroxynitrite. *Biofactors* 40: 236–246, 2014.
183. Gullner G, Komives T, Rennenberg H. Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides. *J. Exp. Bot.* 52: 971–979, 2001.
184. H. Vandenhove, N. Vanhoudt, A. Cuypers, M. van Hees, J. Wannijn, N. Horemans, Life-cycle chronic gamma exposure of *Arabidopsis thaliana* induces growth effects but no discernable effects on oxidative stress pathways, *Plant Physiol. Biochem.* 48: 778–786, 2010.
185. Ha SB, Smith A.P, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell M.J, Goldsbrough P.B, Cobbett CS. Phytochelatase synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11: 1153–1164, 1999.
186. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1–14, 1984.
187. Han D. et al. Signal transduction pathways involved in drug-induced liver injury. *Handb Exp Pharmacol.* 267–310, 2010.
188. Hanawa N, et al. Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J Biol Chem.* 283: 13565–13577, 2008.
189. Hancock RD, Walker PG, Pont SDA, Marquis N, Vivera S, Gordon SL, Brennan RM, Viola R. l-Ascorbic acid accumulation in fruit of *Ribes nigrum* occurs by in situ biosynthesis via the l-galactose pathway. *Functional Plant Biology* 34: 1080–1091, 2007.
190. Hawkins HC, Freedman RB. Randomly reoxidised soybean trypsin inhibitor and the possibility of conformational barriers to disulphide isomerization in proteins. *FEBS Lett* 58: 7–10, 1975.

191. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 51–88, 2005.
192. Heazlewood JL, Howell KA, Millar AH. Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochim Biophys Acta* 1604: 159-169, 2003.
193. Hegedűs A, Engel R, Abrankó L, Balogh E, Blázovics A, Hermán R, Halász J, Ercisli S, Pedryc A, Stefanovits-Bányai É. Antioxidant and antiradical capacities in apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruits: variations from genotypes, years, and analytical methods. *J Food Sci.* 75: C722-730, 2010.
194. Hegedűs A, Pfeiffer P, Papp N, Abrankó L, Blázovics A, Pedryc A, Stefanovits-Bányai E. Accumulation of antioxidants in apricot fruit through ripening: characterization of a genotype with enhanced functional properties. *Biol Res.* 44: 339-344, 2011.
195. Hendry GAF. Oxygen, free radical processes and seed longevity. *Seed Science Research* 3: 141–153, 1993.
196. Herschbach C. & Rennenberg H. Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulfate and sulfate transport in tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* 45: 1069–1076, 1994.
197. Hirschberg CB, Robbins PW. and Abeijon C. Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 49–69, 1998.
198. Ho LHM, Giraud E, Lister R, Thirkettle-Watts D, Low J, Clifton R, Howell KA, Carrie C, Donald T, Whelan J. Characterization of the regulatory and expression context of an alternative oxidase gene provides insights into cyanide-insensitive respiration during growth and development. *Plant Physiol* 143: 1519–1533, 2007.
199. Hogg N, Singh RJ, Kalyanaraman B. The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Lett.* 382: 223–228, 1996.
200. Hoglund A, Donnes P, Blum T, et al. MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs and amino acid composition. *Bioinformatics* 22: 1158–1165, 2006.
201. Holmuamedov E, Jahangir A, Bienengraeber M, et al. Deletion of mtDNA disrupts mitochondrial function and structure, but not biogenesis. *Mitochondrion* 3: 13–19, 2003.
202. Hopkins FG. and Morgan EJ. Some relations between ascorbic acid and glutathione. *Biochem. J.* 30: 1446-1462, 1936.
203. Hopkins FG. On an autoxidisable constituent of the cell. *Biochem. J.* 15: 286–305, 1921.
204. Hopkins FG. On glutathione: A reinvestigation. *J. Biol. Chem.* 84: 269–320, 1929.
205. Horemans N, Asard H, Caubergs RJ. Carrier mediated uptake of dehydroascorbate into higher plant plasma membrane vesicles shows trans-stimulation, *FEBS Lett.* 421: 41–44, 1998b.
206. Horemans N, Asard H, Caubergs RJ. The ascorbate carrier of higher plant plasma membranes preferentially translocates the fully oxidized (dehydroascorbate) molecule, *Plant Physiol.* 114: 1247–1253, 1997.
207. Horemans N, Asard H, Caubergs RJ. Transport of ascorbate into plasma membrane vesicles of *Phaseolus vulgaris* L., *Protoplasma* 194: 177–185, 1996.
208. Horemans N, Foyer CH, Potters G, Asard H. Ascorbate function and associated transport systems in plants *Plant Physiol. Biochem.* 38: 531–540, 2000.

209. Horemans N, Potters G, Asard H, Caubergs RJ. Transport of ascorbate into protoplasts of *Nicotiana tabacum* Bright Yellow 2 cell line, *Protoplasma* 205: 114–121, 1998.
210. Horemans, N, Raeymaekers T, Van Beek K, Nowocin A, Broos K, Blust R, Cuypers A, Vangronsveld J. and Guisez Y. Dehydroascorbate uptake is impaired in the early response of *Arabidopsis* plant cell cultures to cadmium. *J. Exp. Bot.* 58: 4307–4317, 2007.
211. Horling F, Lamkemeyer P, Konig J, Finkemeier I, Kandlbinder A, Baier M, Dietz KJ. Divergent light-, ascorbate-, and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131: 317–325, 2003.
212. Hossain MA, Asada K. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol.* 25: 85–92, 1984.
213. Hu J, Dong L, Outten CE. The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. *J Biol Chem* 283: 29126–29134, 2008.
214. Imai T, Niwa M, Ban Y, Hirai M, Oba K, Moriguchi T. Importance of the L-galactonolactone pool for enhancing the ascorbate content revealed by L-galactonolactone dehydrogenase-overexpressing tobacco plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 96:105–112, 2009.
215. Ingebreetsen O.C., Normann P.T., *Biochim. Biophys. Acta* 684: 21–26, 1982.
216. Ioannidi E, Kalamaki MS, Engineer C, Pateraki I, Alexandrou D, Mellidou I, Giovannonni J, Kanellis AK. Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 60: 663–678, 2009.
217. Ishikawa T, Dowdle J, Smirnoff N. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiologia Plantarum* 126: 343–355, 2006a.
218. Iuchi Y, Okada F, Tsunoda S, Kibe N, Shirasawa N, Ikawa M, Okabe M, Ikeda Y, Fujii J. Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress. *Biochem J* 419: 149–158, 2009.
219. Ivanova LA, Ronzhina DA, Ivanov LA, Stroukova LV, Peuke AD, Rennenberg H. Over-expression of *gsh1* in the cytosol affects the photosynthetic apparatus and improves the performance of transgenic poplars on heavy metal-contaminated soil. *Plant Biol.* 13: 649–659, 2011.
220. Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* 44: 88–106, 2012.
221. Jaeschke H. Glutathione disulfide formation and oxidant stress during acetaminophen induced hepatotoxicity in mice in vivo: the protective effect of allopurinol. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 935–41, 1990.
222. James LP, McCullough SS, Lamps LW, Hinson JA. Effect of N-acetylcysteine on acetaminophen toxicity in mice: relationship to reactive nitrogen and cytokine formation. *Toxicol Sci* 75: 458–67, 2003b.
223. Jimenez A, Creissen G, Kular B, Firmin J, Robinson S, Verhoeyen M, Mullineaux P. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* 214: 751–758, 2002.

224. 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.
225. Jimenez A, Hernandez JA, Pastori G, del Rio LA, Sevilla F. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves *Plant Physiol*. 118:1327-1335, 1998.
226. Jollow DJ, Mitchell JR, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 187: 195–202, 1973.
227. Justi KC, Visentainer JV, Evelazio de Souza N, Matsushita M. Nutritional composition and vitamin C stability in stored camucamu (*Myrciaria dubia*) pulp. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* 50: 405–408, 2000.
228. Kanwischer M, Porfirova S, Bergmüller E, Dörmann P. Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress, *Plant Physiol*. 137: 713-723, 2005.
229. KC S, Cárcamo JM, Golde DW. Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury. *FASEB J* 19: 1657-1667, 2005.
230. Kendall, E.C.; Mason, H.L.; McKenzie, B.F. A study of glutathione. *J. Biol. Chem.* 88: 409–423, 1930.
231. Kimura T, Takahashi M, Yan K, Sakurai H. Expression of SLC2A9 isoforms in the kidney and their localization in polarized epithelial cells. *PLoS One* 9, e84996, 2014.
232. King BR, Vural S, Pandey S, et al. ngLOC: software and web server for predicting protein subcellular localization in prokaryotes and eukaryotes. *BMC Res Notes* 5:351, 2012.
233. Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem* 267: 4928–4944, 2000.
234. Klatt P, Molina EP, de Lacoba MG, Padilla CA, Martinez-Galesteo E, Barcena JA, Lamas S. Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *FASEB J.* 13: 1481–1490, 1999.
235. Klodmann J, Sunderhaus S, Nimtz M, Jänsch L, Braun HP. Internal architecture of mitochondrial complex I from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22: 797-810, 2010.
236. Knight TR, Jaeschke H. Acetaminophen-induced inhibition of Fas receptor-mediated liver cell apoptosis: mitochondrial dysfunction versus glutathione depletion. *Toxicol Appl Pharmacol* 181:133–41, 2002.
237. Knight TR, Kurtz A, Bajt ML, Hinson JA, Jaeschke H. Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity: role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicol Sci* 62: 212–20, 2001.
238. Koji Aoyama and Toshio Nakaki Impaired Glutathione Synthesis in Neurodegeneration *Int. J. Mol. Sci.* 14: 21021-21044, 2013.
239. Kon K, Kim JS, Jaeschke H, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 40: 1170–1179, 2004.
240. Kopriva S. & Rennenberg H. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis, interaction with N and C metabolism. *Journal of Experimental Botany* 55: 1831–1842, 2004.

241. Kornyejev D, Logan BA, Allen RD, Holaday AS. Field-grown cotton plants with elevated activity of chloroplastic glutathione reductase exhibit no significant alteration of diurnal or seasonal patterns of excitation energy partitioning and CO₂fixation. *Field Crops Res.* 94: 165–175, 2005.
242. Kotchoni SO, Larrimore KE, Mukherjee M, Kempinski CF, Barth C. Alterations in the endogenous ascorbic acid content affect flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149: 803–815, 2009.
243. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 47: 333-343, 2009.
244. Kubo A, Saji H, Tanaka K. and Kondo N. Expression of *Arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfurdioxide. *Plant Mol. Biol.* 29: 479-489, 1995.
245. Laing WA, Wright MA, Cooney J, Bulley SM. The missing step of the L-galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an L-galactose guanyltransferase, increases leaf ascorbate content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 9534-9539, 2007.
246. Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM. The dual function of sugar carriers. *Transport and sugar sensing Plant Cell* 11: 707-726, 1999.
247. Lalonde S, Wipf D, Frommer WB. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol* 55: 341-372, 2004.
248. Lappartient AG, Vidmar JJ, Leustek T, Glass AD. & Touraine B. Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *The Plant Journal* 18: 89–95, 1999.
249. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, et al. Acute Liver Failure Study Group. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *HEPATOLOGY* 42: 1364-1372, 2005.
250. Lásztity R, Abonyi T. Prediction of Wheat Quality - Past, Present, Future. *A Review Food Reviews International* 25: 126-141, 2009.
251. Le Martret B, Poage M, Shiel K, Nugent GD, Dix PJ. Tobacco chloroplast transformants expressing genes encoding dehydroascorbate reductase, glutathione reductase, and glutathione-S-transferase, exhibit altered anti-oxidant metabolism and improved abiotic stress tolerance. *Plant Biotech. J.* 9: 661–673, 2011.
252. Lee BH, Lee H, Xiong L, Zhu JK. A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression, *Plant Cell* 14: 1235-1251, 2002.
253. Lee HS. and Sturm A. Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. *Plant Physiol* 112: 1513-1522, 1996.
254. Lee J, Hofhaus G, Lisowsky T. Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett* 477: 62–66, 2000.
255. Lee MS, Kim JY, Park SY. Resistance of p0 cells against apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 1011: 146–153, 2004.
256. Lee YC, Huang HY, Chang CJ, Cheng CH, Chen YT. Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects cells against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome. *Hum Mol Genet* 19: 3721-3733, 2010.
257. Lee YP, Baek KH, Lee HS, Kwak SS, Bang JW, Kwon SY. Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn-superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced

- seed longevity and germination rates under stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 61: 2499–2506, 2010.
258. Leferink NG, Fraaije MW, Joosten HJ, Schaap PJ, Mattevi A, van Berkel WJ. Identification of a gatekeeper residue that prevents dehydrogenases from acting as oxidases. *J Biol Chem* 284: 4392–4397, 2009.
 259. Leferink NG, van den Berg WA, van Berkel WJ. l-Galactono-gamma-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *FEBS J* 275: 713–726, 2008.
 260. Leferink NG, van Duijn E, Barendregt A, Heck AJ, van Berkel WJ. Galactonolactone dehydrogenase requires a redox-sensitive thiol for optimal production of vitamin C. *Plant Physiol* 150: 596–605, 2009b.
 261. Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Center M, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem. J.* 314: 433–437, 1996.
 262. Lemoine R. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim Biophys Acta* 1465: 246–262, 2000.
 263. Leprince O, Hendry GAF, McKersie BD. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research* 3: 231–246, 1993.
 264. Leustek T. Sulfate metabolism. *The Arabidopsis Book* 1, e0017. doi:10.1199/tab.0017, 2002.
 265. Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583–593, 1994.
 266. Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y. et al.: Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 3704–3709, 1996.
 267. Li K, Neuffer PD, Williams RS. Nuclear responses to depletion of mitochondrial DNA in human cells. *Am J Physiol* 269: C1265–C1270, 1995.
 268. Li M, Liang D, Pu F, Ma F, Hou C, Lu T. Ascorbate levels and the activity of key enzymes in ascorbate biosynthesis and recycling in the leaves of 22 Chinese persimmon cultivars. *Scientia Horticulturae* 120: 250–256, 2009.
 269. Li M, Ma F, Liang D, Li J, Wang Y. Ascorbate biosynthesis during early fruit development is the main reason for its accumulation in kiwi. *PloS One* 5: e14281, 2010.
 270. Li X, Cobb CE, Hill KE, Burk RF, May JM. Mitochondrial uptake and recycling of ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys* 387: 143–153, 2001.
 271. Li X, Cobb CE, May JM. Mitochondrial recycling of ascorbic acid from dehydroascorbic acid: dependence on the electron transport chain. *Arch Biochem Biophys* 403: 103–110, 2002.
 272. Liedschulte V, Wachter, A, An ZG, Rausch T. Exploiting plants for glutathione (GSH) production: Uncoupling GSH synthesis from cellular controls results in unprecedented GSH accumulation. *Plant Biotech. J.* 8: 807–820, 2010.
 273. Linster CL, Clarke SG. L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. *Trends Plant Sci* 13: 567–573, 2008.
 274. Linster CL, Gomez TA, Christensen KC, Adler LN, Young BD, Brenner C, Clarke SG. *Arabidopsis* VTC2 encodes a GDP-L-galactose phosphorylase, the last unknown enzyme in

- the Smirnoff-Wheeler pathway to ascorbic acid in plants. *J Biol Chem.* 282: 18879-18885, 2007.
275. Lisowsky T. Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet* 232: 58–64, 1992.
 276. Lisowsky T. ERV1 is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 26: 15–20, 1994.
 277. Loewus FA, Kelly S, Hiatt HH. Ascorbic acid synthesis from D-glucose-2-14c In the liver of the intact rat. *J. biol. Chem.* 235: 937-93, 1960.
 278. Loewus FA, Loewus MW. Biosynthesis and metabolism of ascorbic-acid in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 5: 101–119, 1987.
 279. Loos H, Kramer R, Sahm H, Sprenger GA. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. *J Bacteriol* 176: 7688-7693, 1994.
 280. Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL. MyoInositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology* 134: 1200–1205, 2004.
 281. Lorenzo HK, Susin SA. Therapeutic potential of AIF-mediated caspaseindependent programmed cell death. *Drug Resist. Updat.* 10: 235–255, 2007.
 282. Lu JMY, Bush DR. His-65 in the proton-sucrose symporter is an essential amino acid whose modification with site-directed mutagenesis increases transport activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9025–9030, 1998.
 283. Macanas-Pirard P, Yaacob NS, Lee PC, Holder JC, Hinton RH, Kass GE. Glycogen synthase kinase-3 mediates acetaminophen-induced apoptosis in human hepatoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 780–789, 2005.
 284. MacDonald L, Thumser AE, Sharp P.: Decreased expression of the vitamin C transporter SVCT1 by ascorbic acid in a human intestinal epithelial cell line. *Br. J. Nutr.* 87: 97-100, 2002.
 285. Maiti MK, Krishnasamy S, Owen HA. & Makaroff CA. Molecular characterization of glyoxalase II from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 35: 471–481, 1997.
 286. Malacrida C, Valle E, Boggio S. Postharvest chilling induces oxidative stress response in the dwarf tomato cultivar Micro-Tom. *Physiologia Plantarum* 127: 10–18, 2006.
 287. Malo C, Wilson JX. Glucose modulates vitamin C transport in adult human small intestinal brush border membrane vesicles. *J. Nutr.* 130: 63-69, 2000.
 288. Mandl J, Szarka A, Bánhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology, *Br. J. Pharmacol.* 157: 1097–1110, 2009.
 289. Manov I, Hirsh M, Iancu TC. N-acetylcysteine does not protect HepG2 cells against acetaminophen-induced apoptosis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 94: 213–225, 2004.
 290. Mapson LW, Breslow E. Biological synthesis of ascorbic acid: L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase. *Biochem J* 68: 395-406, 1958.
 291. Marasinghe GPK, Sander IM, Bennett B, Perlyannan G, Yang KW, Makaroff CA. & Crowder MW. Structural studies on a mitochondrial glyoxalase II. *Journal of Biological Chemistry* 280: 40668–40675, 2005.
 292. Mardones L, Ormazabal V, Romo X, Jaña C, Binder P, Peña E, Vergara M, Zúñiga F. The glucose transporter-2 (GLUT2) is a low-affinity dehydroascorbic acid transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 410: 7-12, 2011.

293. Mari M, Colell A, Morales A, von Montfort C, Garcia-Ruiz C. and Fernandez Checa JC. Redox control of liver function in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 12: 1295–1331, 2010.
294. Mari M, Morales A, Colell A, Garcia-Ruiz, C. and Fernandez-Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid. Redox Signal.* 11: 2685–2700, 2009.
295. Markovic J, Borrás C, Ortega A, Sastre J, Vina J, Pallardo FV. Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 282: 20416–20424, 2009.
296. Maruta T, Ichikawa Y, Mieda T, Takeda T, Tamoi M, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S. The contribution of Arabidopsis homologs of L-gulonolactone oxidase to the biosynthesis of ascorbic acid. *Biosci Biotechnol Biochem* 74: 1494–1497, 2010.
297. Masubuchi Y, Suda C, Horie T. Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Hepatol* 42: 110–116, 2005.
298. Matamoros MA, Loscos J, Dietz KJ, Aparicio-Tejo PM, Becana M. Function of antioxidant enzymes and metabolites during maturation of pea fruits. *Journal of Experimental Botany* 61: 87–97, 2010.
299. Maughan SC, Pasternak M, Cairns N, Kiddle G, Brach T, Jarvis R, Haas F, Nieuwland J, Lim B, Muller C. et al. Plant homologs of the Plasmodium falciparum chloroquine-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 2331–2336, 2010.
300. Maurino VG, Grube E, Zielinski J, Schild A, Fischer K, Flügge UI. Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 47: 1381–1393, 2006.
301. May JM, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 272: 22607–22610, 1997.
302. May JM, Qu ZC, Morrow JD. Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol in resealed human erythrocyte ghosts. Transmembrane electron transfer and protection from lipid peroxidation. *J Biol Chem* 271: 10577–10582, 1996.
303. McGill MR, Lebofsky M, Norris HR, Slawson MH, Bajt ML, Xie Y, Williams CD, Wilkins DG, Rollins DE, Jaeschke H. Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: dose–response, mechanisms, and clinical implications. *Toxicol Appl Pharmacol* 269: 240–249, 2013.
304. McGill MR, Williams CD, Xie Y, Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 264: 387–394, 2012.
305. McGill MR, Yan HM, Ramachandran A, Murray GJ, Rollins DE, Jaeschke H. HepaRG cells: a human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 53: 974–982, 2011.
306. McRae SR, Christopher JT, Smith JAC, Holtum JAM. Sucrose transport across the vacuolar membrane of Ananas comosus. *Funct Plant Biol* 29: 717–724, 2002.
307. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 711–760, 1983.
308. Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res.* 54: 1969–1975, 1994.
309. Meister, A. On the discovery of glutathione. *Trends Biochem. Sci.* 13: 185–188, 1988.

310. Melino VJ, Soole KL, Ford CM. Ascorbate metabolism and the developmental demand for tartaric and oxalic acids in ripening grape berries. *BMC Plant Biology* 9: 145, 2009.
311. Mellado M, Contreras RA, Gonzalez A, Dennett G, Moenne A. Copper-induced synthesis of ascorbate, glutathione and phytochelatins in the marine alga *Ulva compressa* (Chlorophyta). *Plant Physiology and Biochemistry* 51: 102–108, 2012.
312. Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 121: 1059–69, 2005.
313. Mhamdi A, Hager J, Chaouch S, Queval G, Han Y, Taconnat L, Saindrenan P, Gouia H, Issakidis-Bourguet E, Renou JP. 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.
314. Millar AH, Mittova V, Kiddle G, Heazlewood JL, Bartoli CG, Theodoulou FL, Foyer CH. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol* 133: 443–447, 2003.
315. Millenaar FF, Lambers H. The alternative oxidase: in vivo regulation and function. *Plant Biol* 5: 2–15, 2003.
316. Milner ID, Ho LC, Hall JL. Properties of proton and sugar transport at the tonoplast of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *Physiol Plant* 94:399–410, 1995.
317. Miranda S, Foncea R, Guerrero J, Leighton F. Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 258: 44–49, 1999.
318. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther.* 187: 211–217, 1973b.
319. Miyaji T, Kuromori T, Takeuchi Y, Yamaji N, Yokosho K, Shimazawa A, Sugimoto E, Omote H, Ma JF, Shinozaki K. et al. AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in Arabidopsis. *Nat. Commun.* 6:5928, 2015.
320. Møller IM, Lidén AC, Ericson I, Gardeström P. Isolation of submitochondrial particles with different polarities. *Methods Enzymol* 148: 442–453, 1987.
321. Møller IM. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 561–591, 2001.
322. Monteiro G, Horta BB, Pimenta DC, Augusto O, Netto LE. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiolspecific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 104: 4886–4891, 2007.
323. Moss Ralph W. SZENT-GYÖRGYI ALBERT, Typotex Budapest, 2003
324. Mozafar A, Oertli JJ. Vitamin C, (ascorbic acid): Uptake and metabolism by soybean, J. *Plant Physiol.* 141: 316–321, 1993.
325. Müller-Moulé P, Conklin PL, and Niyogi KK. Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiol.* 128: 970–977, 2002.
326. Muñoz-Montesino C, Roa FJ, Peña E, González M, Sotomayor K, Inostroza E, A Muñoz C, González I, Maldonado M, Soliz C, Reyes AM, Vera JC, Rivas CI. Mitochondrial ascorbic

- acid transport is mediated by a low-affinity form of the sodium-coupled ascorbic acid transporter-2. *Free Radic Biol Med.* 70: 241-254, 2014.
327. Murayama S, Handa H . Genes for alkaline/neutral invertase in rice: alkaline/neutral invertases are located in plant mitochondria and also in plastids. *Planta* 225: 1193-1203, 2007.
 328. Murphy E, Eisner DA. Regulation of intracellular and mitochondrial sodium in health and disease. *Circ. Res.* 104: 292–303, 2009.
 329. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417: 1-13, 2009.
 330. Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron.* 2: 1547–1558, 1989.
 331. Myer YP, Thallam KK, Pande A. Kinetics of the reduction of horse heart ferricytochrome c. Ascorbate reduction in the presence and absence of urea. *J Biol Chem* 255: 9666–9673, 1980.
 332. Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, key enzymes in the synthesis of collagens and regulation of the response to hypoxia, and their roles as treatment targets, *Ann. Med.* 40: 402–417, 2008.
 333. Nadwodnik J, Lohaus G. Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* 227: 1079-1089, 2008.
 334. Nagy G, Kardon T, Wunderlich L, Szarka A, Kiss A, Schaff Z, Bánhegyi G, Mandl J. Acetaminophen induces ER dependent signaling in mouse liver *Arch. Biochem. Biophys.* 459: 273-279, 2007.
 335. Nakagawa H. et al. Deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates acetaminophen-induced liver injury by inhibiting c-Jun N-terminal kinase activation. *Gastroenterology.* 135: 1311–1321, 2008.
 336. Nakai K, Horton P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24: 34–36, 1999.
 337. Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880, 1981.
 338. Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plant* 129: 185–195, 2007.
 339. Nehs MA, Lin CI, Kozono DE, Whang EE, Cho NL, Zhu K, Moalem J, Moore FD. and Ruan DT. Necroptosis is a novel mechanism of radiation-induced cell death in anaplastic thyroid and adrenocortical cancers. *Surgery.* 150: 1032-1039, 2011.
 340. Neuhaus HE. Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS Lett* 581: 2223-2226, 2007.
 341. Nguyen VD, Saaranen MJ, Karala AR, Lappi AK, Wang L, Raykhel IB, Alanen HI, Salo KE, Wang CC, Ruddock LW. Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. *J Mol Biol* 406: 503–515, 2011.
 342. Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *The American Journal of Clinical Nutrition* 54: 1119S–1124S, 1991.

343. Noctor G, Strohm M, Jouanin L, Kunert KJ, Foyer CH, Rennenberg H. Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol.* 112: 1071–1078, 1996.
344. Noctor G, Foyer CH. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249–279, 1998.
345. Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* 53: 1283–1304, 2002.
346. Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer CH. Glutathione in plants: An integrated overview. *Plant Cell Environ.* 2: 454–484, 2011.
347. Noctor G. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell and Environment* 29: 409–425, 2006.
348. Noguchi K. and Yoshida K. Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. *Mitochondrion* 8: 87–99, 2008.
349. Oerlemans MI, Liu J, Arslan F, den Ouden K, van Middelaar BJ, Doevendans PA. and Sluijter JP. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia–reperfusion in vivo. *Basic Res. Cardiol.* 107: 270, 2012.
350. Orvar BL. and Ellis BE. Transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for cytosolic ascorbate peroxidase show increased susceptibility to ozone injury. *PlantJ.* 11: 1297–1305, 1997.
351. Osmani SA, Scrutton MC. The sub-cellular localisation of pyruvate carboxylase and of some other enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Eur J Biochem* 133: 551–560, 1983.
352. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev* 87: 315–424, 2007.
353. Padayatty SJ, Riordan HD, Hewitt SM. et al. Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *CMAJ* 174: 937–942, 2006.
354. Padayatty SJ, Sun H, Wang Y. et al. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann. Intern. Med.* 140: 533–537, 2004.
355. Pagani M, Fabbri M, Benedetti C, Fassio A, Pilati S, Bulleid NJ, Cabibbo A, Sitia R. Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-lbeta (ERO1-Lbeta), a human gene induced in the course of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 275: 23685–23692, 2000.
356. Page M, Sultana N, Paszkiewicz K, Florance H, Smirnoff N. The influence of ascorbate on anthocyanin accumulation during high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*: further evidence for redox control of anthocyanin synthesis. *Plant, Cell and Environment* 35: 388–404, 2012.
357. Paradiso A, Berardino R, de Pinto MC, Sanità di Toppi L, Storelli MM, Tommasi F, De Gara L. Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants, *Plant Cell Physiol.* 49: 362–374, 2008.
358. Pavet V, Olmos E, Kiddle G, Mowla S, Kumar S, Antoniow J, Alvarez ME, Foyer CH. Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 139: 1291–1303, 2005.

359. Perez-Cruz I, Carcamo JM, Golde DW. Vitamin C inhibits FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells. *Blood* 102: 336-343, 2003.
360. Pineau B, Layoune O, Danon A, De Paepe R. L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase is required for the accumulation of plant respiratory complex I. *J Biol Chem* 283: 32500-32505, 2008.
361. Pineda-Molina, E.; Klatt, P.; Vazquez, J.; Marina, A.; Garcia de Lacoba, M.; Perez-Sala, D.; Lamas, S. Glutathionylation of the p50 subunit of NF- κ B: A mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry* 40: 14134–14142, 2001.
362. Poiroux-Gonord F, Bidel LP, Fanciullino AL, Gautier H, LauriLopez F, Urban L Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 12065-12082, 2010.
363. Polimeno L, Pesetti B, De Santis F, et al. Decreased expression of the Augmenter of Liver Regeneration results in increased apoptosis and oxidative damage in human-derived glioma cells. *Cell Death Dis* 3: e289, 2012.
364. Pollard MG, Travers KJ, Weissman JS. Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 1: 171–182, 1998.
365. Poot M, Teubert H, Rabinovitch PS, Kavanagh TJ. De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *J. Cell. Physiol.* 163: 555–560, 1995.
366. Potters G, Horemans N, Bellone S, Caubergs RJ, Trost P, Guisez Y, Asard H. Dehydroascorbate influences the plant cell cycle through a glutathione-independent reduction mechanism, *Plant Physiol.* 134: 1479-1487, 2004.
367. Potters G, Horemans N, Caubergs RJ. and Asard H. Ascorbate and dehydroascorbate influence cell cycle progression in a tobacco cell suspension. *Plant Physiol.* 124: 17–20. 2000.
368. Preisser J, Komor E. Sucrose uptake into vacuoles of sugarcane suspension cells. *Planta* 186: 109-114, 1991.
369. Preisser J, Sprügel H, Komor E. Solute distribution between vacuole and cytosol of sugarcane suspension cells: Sucrose is not accumulated in the vacuole. *Planta* 186: 203-211, 1992.
370. Prescott AG. and John P. Dioxygenases: molecular structure and role in metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 245-271, 1996.
371. Pujol-Giménez J, Barrenetxe J, González-Muniesa P, Lostao MP. The facilitative glucose transporter GLUT12: what do we know and what would we like to know? *J. Physiol. Biochem.* 69: 325–333, 2013.
372. Purcell SH, Aerni-Flessner LB, Willcockson AR, Diggs-Andrews KA, Fisher SJ, Moley KH. Improved insulin sensitivity by GLUT12 overexpression in mice. *Diabetes* 60: 1478–1482, 2011.
373. Qiu Y, Benet LZ, Burlingame AL. Identification of hepatic protein targets of the reactive metabolites of the non-hepatotoxic regioisomer of acetaminophen, 3'-hydroxyacetanilide, in the mouse in vivo using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Adv Exp Med Biol* 500: 663–673, 2001.

374. Queval G, Jaillard D, Zechmann B, Noctor G. Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant Cell Environ.* 34: 21–32, 2011.
375. Queval G, Thominet D, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Gakiere B, Noctor G. H₂O₂-activated up-regulation of glutathione in *Arabidopsis* involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Mol. Plant* 2: 344–356, 2009.
376. Ramachandran A, Lebofsky M, Baines CP, Lemasters JJ, Jaeschke H. Cyclophilin D deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury. *Free Radic Res* 45: 156–164, 2011.
377. Ramachandran A, McGill MR, Xie Y, Ni HM, Ding WX, Jaeschke H. The receptor interacting protein kinase 3 is a critical early mediator of acetaminophen-induced hepatocyte necrosis in mice. *HEPATOLOGY* 58: 2099–2108, 2013.
378. Rassam M, Laing W. Variation in ascorbic acid and oxalate levels in the fruit of *Actinidia chinensis* tissues and genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2322–2326, 2005.
379. Rautenkranz AAF, Li L, Mächler F, Märtinoia E, Oertli JJ. Transport of ascorbic and dehydroascorbic acid across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel) leaves, *Plant Physiol.* 106: 187–193, 1994.
380. Ray SD, Balasubramanian G, Bagchi D, Reddy CS. Ca(2+)-calmodulin antagonist chlorpromazine and poly(ADP-ribose) polymerase modulators 4-aminobenzamide and nicotinamide influence hepatic expression of BCL-XL and P53 and protect against acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 277–291, 2001.
381. Reichheld JP, Khafif M, Riondet C, Droux M, Bonnard G. & Meyer Y. Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell* 19: 1851–1865, 2007.
382. Rennenberg, H. Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* 21: 2771–2781, 1982.
383. Reuhs BL, Glenn J, Stephens SB, Kim JS, Christie DB, Glushka JG, Zablackis E, Albersheim P, Darvill AG, O'Neill MA. L-galactose replaces L-fucose in the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II synthesized by the L-fucose-deficient *mur1* *Arabidopsis* mutant. *Planta* 219: 147–157, 2004.
384. Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol.* 1: 5:151, 2014.
385. Richman PG, Meister A. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* 250: 1422–1426, 1975.
386. Roe AL, Snawder JE, Benson RW, Roberts DW, Casciano DA. HepG2 cells: an in vitro model for P450-dependent metabolism of acetaminophen. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 15–19, 1993.
387. Rouhier N, Cerveau D, Couturier J, Reichheld JP, Rey P. Involvement of thiol-based mechanisms in plant development. *Biochim Biophys Acta.* 1850: 1479–1496, 2015.
388. Roux, M.J.; Supplisson, S. Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. *Neuron* 25: 373–383, 2000.

389. Rumsey SC, Daruwala R, Al-Hasani H. et al.: Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* oocytes and isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 275: 28246-28253, 2000.
390. Rumsey SC, Kwon O, Xu GW. et al. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.* 272: 18982-18989, 1997.
391. Saaranen MJ, Karala A-R, Lappi A-K, Ruddock LW. The role of dehydroascorbate in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal* 12: 15–25, 2010.
392. Sabar M, De Paepe R, de Kouchkovsky Y. Complex I impairment, respiratory compensations, and photosynthetic decrease in nuclear and mitochondrial male sterile mutants of *Nicotiana sylvestris*, *Plant Physiol.* 124: 1239-1250, 2000.
393. Saito C, Lemasters JJ, Jaeschke H. c-Jun N-terminal kinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 246: 8-17, 2010a.
394. Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology* 51: 246–254, 2010b.
395. Sánchez-Lozada LG, Lanaspa MA, Cristóbal-García M, García-Arroyo F, Soto V, Cruz-Robles D, Nakagawa T, Yu MA, Kang DH, Johnson RJ. Uric acid-induced endothelial dysfunction is associated with mitochondrial alterations and decreased intracellular ATP concentrations. *Nephron Exp. Nephrol* 121 : e71–e78, 2012.
396. Sappl, PG, Carroll AJ, Clifton R, Lister R, Whelan J, Harvey Millar A, Singh KB. The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *Plant J.* 58: 53–68, 2009.
397. Savini I, Catani MV, Arnone R. et al. Translational control of the ascorbic acid transporter SVCT2 in human platelets. *Free Radic. Biol. Med.* 42: 608-616, 2007a.
398. Savini I, Rossi A, Catani MV. et al.: Redox regulation of vitamin C transporter SVCT2 in C2C12 myotubes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361: 385-390, 2007b.
399. Savini I, Rossi A, Pierro C. et al.: SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids*, 34: 347-355, 2008.
400. Schägger H. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1555: 154–159, 2002.
401. Scheepers A, Schmidt S, Manolescu A, Cheeseman CI, Bell A, Zahn C, Joost HG, Schürmann A. Characterization of the human SLC2A11 (GLUT11) gene: alternative promoter usage, function, expression, and subcellular distribution of three isoforms, and lack of mouse orthologue. *Mol. Membr. Biol.* 22: 339–351, 2005.
402. Schertl P, Sunderhaus S, Klodmann J, Gergoff GE, Bartoli CG, Braun HP. L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GLDH) forms part of three subcomplexes of mitochondrial complex I in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 287:14412-14419, 2012.
403. Schopfer P, Plachy C, Frahy G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiology* 125, 1591–1602, 2001.
404. Segade F. Glucose transporter 10 and arterial tortuosity syndrome: the vitamin C connection, *FEBS Lett.* 584: 2990–2994, 2010.

405. Shaikhali J, Baier M. Ascorbate regulation of 2-Cys peroxiredoxin-A promoter activity is light-dependent. *Journal of Plant Physiology* 167: 461–467, 2010.
406. Sharma M. et al. Critical role for mixed-lineage kinase 3 in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Mol Pharmacol.* 82: 1001–1007, 2012.
407. Shiratake K, Kanayama Y, Maeshima M, Yamaki S. Changes in H(+)-pumps and a tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit. *Plant Cell Physiol* 38: 1039-1045, 1997.
408. Shiu CT, Lee TM. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate–glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata*. *Journal of Experimental Botany* 56: 2851–2865, 2005.
409. Sies, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215: 213–219, 1993.
410. Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* 4: 1581–1590, 2004.
411. Smirnoff N, Conklin PL, Loewus FA. Biosynthesis of ascorbic acids in plants: a renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 437–467, 2001.
412. Smirnoff N, Pallanca JE. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 24: 472–478, 1996.
413. Smirnoff N, Wheeler GL. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35: 291–314, 2000.
414. Smirnoff N. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 355: 1455–1464, 2000a.
415. Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 229–235, 2000b.
416. Smirnoff N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *The New Phytologist* 125: 27–58, 1993.
417. Smirnoff, N..Antioxidant systems and plant response to the environment. In: *Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation*. pp. 217-243. Smirnoff, N., Ed. Bios Scientific Publishers, Oxford, 1995.
418. Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA, Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), *Anal. Biochem.* 175: 408e413, 1988.
419. Sommer-Knudsen J, Bacic A. and Clarke AE. Hydroxyproline rich plant glycoproteins. *Phytochemistry* 47: 483-497, 1998.
420. Sotiriou S, Gispert S, Cheng J. et al.: Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nat. Med.* 8: 514-517, 2002.
421. Spickett CM, Smirnoff N. and Pitt AR. The biosynthesis of erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an antioxidant. *FreeRad. BioI. Med.* 24: 649-652, 2000.
422. Sprenger J, Fink JL, Teasdale RD. Evaluation and comparison of mammalian subcellular localization prediction methods. *BMC Bioinf.* 7 (Suppl. 5), S3, 2006.
423. Stahl RL, Liebes LF, Farber CM, Silber R. A spectrophotometric assay for dehydroascorbate reductase, *Anal. Biochem.* 131: 341e344, 1983.

424. Stahl W, van den Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, Gartner C, Haenen G, Hollman P, Holst B. et al. Bioavailability and metabolism. *Mol. Aspects Med.* 23: 39–100, 2002.
425. Staniek K, Nohl H. Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochim. Biophys. Acta* 1460: 268–275, 2000.
426. Stein WD. Channels, Carriers, and Pumps: An introduction to membrane transport. Academic Press, San Diego, 1990.
427. Stevens R, Buret M, Duffe P, Garchery C, Baldet P, Rothan C, Causse M. Candidate genes and quantitative trait loci affecting fruit ascorbic acid content in three tomato populations. *Plant Physiology* 143: 1943–1953, 2007.
428. Stevens R, Buret M, Garchery C, Carretero Y, Causse M. Technique for rapid, small-scale analysis of vitamin C levels in fruit and application to a tomato mutant collection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6159–6165, 2006.
429. Stevens R, Page D, Gouble B, Garchery C, Zamir D, Causse M. Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant, Cell and Environment* 31: 1086–1096, 2008.
430. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277: 44784–44790, 2002.
431. Streb P, Aubert S, Gout E, Bligny R. Reversibility of cold- and light-stress tolerance and accompanying changes of metabolite and antioxidant levels in the two high mountain plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*. *Journal of Experimental Botany* 54: 405–418, 2003.
432. Streb P, Feierabend J, Bligny R. Resistance of photoinhibition of photosystem II and catalase and antioxidative protection in high mountain plants. *Plant, Cell and Environment* 20: 1030–1040. 1997.
433. Strohm M, Jouanin L, Kunert KJ, Pruvost C, Polle A, Foyer CH, Rennenberg H. Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* × *Populus alba*) overexpressing glutathione synthetase. *Plant J.* 7: 141–145, 1995.
434. Stuart CA, Howell ME, Zhang Y, Yin D. Insulin-stimulated translocation of glucose transporter (GLUT) 12 parallels that of GLUT4 in normal muscle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94: 3535–3542, 2009.
435. Sturgeon BE, Sipe HJ, Jr., Barr DP, Corbett JT, Martinez JG, Mason RP. The fate of the oxidizing tyrosyl radical in the presence of glutathione and ascorbate. Implications for the radical sink hypothesis. *Journal of Biological Chemistry* 273: 30116–30121, 1998.
436. Sturm A, Hess D, Lee HS, Lienhard S. Neutral invertase is a novel type of sucrose-cleaving enzyme. *Physiol Plant* 107: 159–165, 1999.
437. Sturm A. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol* 121: 1-8, 1999.
438. Suh JK, Poulsen LL, Ziegler DM, Robertus JD. Yeast flavin-containing monooxygenase generates oxidizing equivalents that control protein folding in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 2687-2691, 1999.

439. Sun WH, Duan M, Shu DF, Yang S, Meng QW. Overexpression of StAPX in tobacco improves seed germination and increases early seedling tolerance to salinity and osmotic stresses. *Plant Cell Reports* 29: 917–926, 2010b.
440. Sweetlove LJ, Mowday B, Hebestreit HF, Leaver CJ, Millar AH. Nucleoside diphosphate kinase III is localized to the intermembrane space in plant mitochondria. *FEBS Lett* 508: 272–276, 2001.
441. Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6: 662–680, 2007.
442. Szarka A Quantitative data on the contribution of GSH and Complex II dependent ascorbate recycling in plant mitochondria *Acta Physiol Plant* 35: 3245-3250, 2013a.
443. Szarka A, Bánhegyi G, Asard H. The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration. *Antioxid Redox Signal*, 19(9):1036-44, 2013b.
444. Szarka A, Bánhegyi G. Oxidative folding: recent developments. *BioMol Concepts* 2: 379–390, 2011.
445. Szarka A, Horemans N, Bánhegyi G, Asard H. Facilitated glucose and dehydroascorbate transport in plant mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 428: 73-80, 2004.
446. Szarka A, Horemans N, Kovács Z, Gróf P, Mayer M, Bánhegyi G. Dehydroascorbate reduction in plant mitochondria is coupled to the respiratory electron transfer chain. *Physiol Plant* 129: 225-232, 2007.
447. Szarka A, Stadler K, Jenei V, Margittai É, Csala M, Jakus J, Mandl J, Bánhegyi G. Ascorbyl free radical and dehydroascorbate formation in rat liver endoplasmic reticulum. *J Bioenerg Biomembr* 34: 317–323, 2002.
448. Szarka A, Tomasskovics B, and Bánhegyi G. The ascorbateglutathione-a-tocopherol triad in abiotic stress response *Int J Mol Sci* 13: 4458–4483, 2012.
449. Szarka A, Lőrinc T, The role of ascorbate in protein folding, *Protoplasma* 251: 489–497, 2014.
450. Szent-Györgyi A. Oxidation, energy transfer, and vitamins Nobel Lecture, December 11, 1937 http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1937/szent-gyorgyi-lecture.pdf
451. Szent-Györgyi A. *The Living State and Cancer*. Marcel Dekker: New York, 1978.
452. Szent-Györgyi, A. On the function of hexuronic acid in the respiration of the cabbage leaf. *J. Biol. Chem.* 90: 385-393, 1931.
453. T. Rausch, R. Gromes, V. Liedschulte, I. Müller, J. Bogs, V. Galovic, A. Wachter, Novel insight into the regulation of GSH biosynthesis in higher plants, *Plant Biol. (Stuttg.)* 9: 565-572, 2007.
454. Takahama U. Effects of fusaric acid and indole-3-acetic acid on the levels of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in the apoplast during elongation of epicotyl segments of *Vigna angularis*, *Physiol. Plant.* 98: 731–736, 1996.
455. Takemoto K, Hatano E, Iwaisako K, Takeiri M, Noma N, Ohmae S, Toriguchi K, Tanabe K, Tanaka H, Seo S, Taura K, Machida K, Takeda N, Saji S, Uemoto S, Asagiri M. Necrostatin-1 protects against reactive oxygen species (ROS)-induced hepatotoxicity in acetaminophen-induced acute liver failure. *FEBS Open Bio* 4: 777–787, 2014.
456. Tausz M, Sircelj H. and Grill D. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *J. Exp. Bot.* 55: 1955-1962, 2004.

457. Tavender TJ, Sheppard AM, Bulleid NJ. Peroxiredoxin IV is an endoplasmic reticulum-localized enzyme forming oligomeric complexes in human cells. *Biochem J* 411: 191–199, 2008.
458. Taylor CG, Nagy LE, Bray TM. Nutritional and hormonal regulation of glutathione homeostasis. *Curr. Top. Cell. Regul.* 34: 189–208, 1996.
459. Tedone L, Hancock RD, Alberino S, Haupt S, Viola R. Long-distance transport of l-ascorbic acid in potato. *BMC Plant Biology* 4, 16, 2004.
460. Thirunavukkarasu C, Wang LF, Harvey S a K, et al. Augmenter of liver regeneration: an important intracellular survival factor for hepatocytes. *J Hepatol* 48:578–588, 2008.
461. Tirmenstein MA, Nelson SD. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols. Contribution of impaired thiolmetabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotides. *J Biol Chem* 265: 3059–3065, 1990.
462. Tirmenstein MA, Nelson SD. Subcellular binding and effects on calcium homeostasis produced by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in mouse liver. *J Biol Chem* 264: 9814–9, 1989.
463. Tommasi F, Paciolla C, Arrigoni O. The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. *Physiologia Plantarum* 105: 193–198, 1999.
464. Tommasi F, Paciolla C, de Pinto MC, De Gara L. Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in *Ginkgo biloba* L. seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 359–368, 2006.
465. Trimmer P a, Keeney PM, Borland MK, et al. Mitochondrial abnormalities in cybrid cell models of sporadic Alzheimer's disease worsen with passage in culture. *Neurobiol Dis* 15: 29–39, 2004.
466. Tsuchiya J, Yamada T, Niki E, Kamiya Y. Interaction of galvinoxyl radical with ascorbic acid, cysteine and glutathione in homogeneous solution and in aqueous dispersions. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 58: 326–330, 1985.
467. Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B. et al.: A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature (London)* 399: 70-75, 1999.
468. Tu BP, Weissman JS. The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 10: 983–994, 2002.
469. Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM, Thorens B. Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J.* 20: 4467–4477, 2001.
470. Váli L, Stefanovits-Bányai E, Szentmihályi K, Fébel H, Sárdi E, Lugasi A, Kocsis I, Blázovics A. Liver-protecting effects of table beet (*Beta vulgaris* var. *rubra*) during ischemia-reperfusion. *Nutrition* 23: 172-178, 2007.
471. Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F. and Vanden Berghe T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci. Signal.* 3, 2010.
472. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T. and Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 700–714, 2010.
473. Vanlerberghe GC, Ordog SH. Alternative oxidase: integrating carbon metabolism and electron transport in plant respiration. In GH Foyer, G Noctor, eds, *Advances in Photosynthesis and Respiration, Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated*

- Carbon and Respiratory Metabolism, Vol 12. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 173–191, 2002.
474. Vatamaniuk OK, Mari S, Lang A, Chalasani S, Demkiv LO, Rea PA. Phytochelatase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis: Stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of *Arabidopsis thaliana* PCS1-catalyzed phytochelatase synthesis. *J. Biol. Chem.* 279: 22449–22460, 2004.
 475. Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA. Atpcs1, a phytochelatase from *Arabidopsis*: Isolation and in vitro reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7110–7115, 1999.
 476. Vauclare P, Kopriva S, Fell D, Suter M, Sticher L, von Ballmoos P, Krähenbühl U, den Camp RO. & Brunold C. Flux control of sulphate assimilation in *Arabidopsis thaliana*: adenosine 5'-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols. *The Plant Journal* 31: 729–740, 2002.
 477. Veltman RH, Sanders MG, Persijn ST, Peppelenbos HW, Oosterhaven J. Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears (*Pyrus communis* L. cv. Conference). *Physiologia Plantarum* 107: 39–45, 1999.
 478. Venetainer P, Straub FB. The enzymic reactivation of reduced ribonuclease. *Biochim Biophys Acta* 67: 166–168, 1963.
 479. Venetainer P, Straub FB. The mechanism of action of the ribonuclease-reactivating enzyme. *Biochim Biophys Acta* 89: 189–190, 1964
 480. Vera JC, Reyes AM, Cárcamo JG, Velásquez FV, Rivas CI, Zhang RH, Strobel P, Iribarren R, Scher HI, Slebe JC, D.W. Golde, Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1. *J Biol Chem.* 271: 8719-8724, 1996.
 481. Vera JC, Rivas CI, Fischbarg J. et al. Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature*, 364: 79-82, 1993.
 482. Vera JC, Rivas CI, Zhang RH. et al. Human HL-60 myeloid leukemia cells transport dehydroascorbic acid via the glucose transporters and accumulate reduced ascorbic acid. *Blood* 84: 1628-1634, 1994.
 483. Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA. et al. The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *The Plant Cell* 12: 97–110, 2000.
 484. Vitart V, Rudan I, Hayward C, Gray NK, Floyd J, Palmer CN, Knott SA, Klocic I, Polasek O, Graessler J. et al. SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat. Genet.* 40: 437–442, 2008.
 485. Voehringer DW. BCL-2 and glutathione: Alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 945–950, 1999.
 486. Vorster DJ, Botha FC. Partial purification and characterisation of sugarcane neutral invertase. *Phytochemistry* 49: 651-655, 1998.
 487. Wachter A, Wolf S, Steininger H, Bogs J, Rausch T. Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: Implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant J.* 41: 15–30, 2005.

488. Wadey A L, Muyderman H, Kwek PT. and Sims N R. Mitochondrial glutathione uptake: characterization in isolated brain mitochondria and astrocytes in culture. *J. Neurochem.* 109(Suppl. 1): 101–108, 2009.
489. Wagner U, Edwards R, Dixon DP. & Mauch F. Probing the diversity of the Arabidopsisglutathione S-transferase gene family. *Plant Molecular Biology* 49: 515–532, 2002.
490. Wajih N, Hutson SM, Wallin R. Disulfide-dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmic reticulum. A protein disulfide isomeraseVKORC1 redox enzyme complex appears to be responsible for vitamin K1 2,3-epoxide reduction. *J Biol Chem* 282: 2626–2635, 2007.
491. Wang L, Zhang L, Niu Y, Sitia R, Wang CC. Glutathione peroxidase 7 utilizes hydrogen peroxide generated by Ero1 α to promote oxidative protein folding. *Antioxid Redox Signal.* 20: 545-556, 2014.
492. Wang X, Wang L, Sun F, Wang CC. Structural insights into the peroxidase activity and inactivation of human peroxiredoxin 4. *Biochem J* 441: 113–118, 2012.
493. Wang Z, Jiang H, Chen S, Du F. and Wang X. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell* 148: 228–243, 2012b.
494. Washko PW, Wang Y, Levine M. Ascorbic acid recycling in human neutrophils. *J Biol Chem* 268: 15531–15535, 1993.
495. Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Gröner F, Hebbeker U, Flügge UI. Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell.* 12: 787-802, 2000.
496. Wells WW, Xu DP, Yang Y, Rocque PA. Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J Biol Chem* 265: 15361–15364, 1990.
497. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365-369, 1998.
498. Wildi B, Lütz C. Antioxidant composition of selected high alpine plants species from different altitudes. *Plant, Cell and Environment* 19: 138–146, 1996.
499. Wilkins HM, Marquardt K, Lash LH. and Linseman DA. Bcl-2 is a novel interacting partner for the 2-oxoglutarate carrier and a key regulator of mitochondrial glutathione. *Free Radic. Biol. Med.* 52: 410–419, 2012.
500. Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, van Montagu M, Inze D, van Camp W. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J.* 16: 4806–4816, 1997.
501. Wilson J.X.: Regulation of vitamin C transport. *Annu. Rev. Nutr.* 25: 105-125, 2005.
502. Wilson JX. The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Lett.* 527: 5-9, 2002.
503. Wiltshire C. et al. A new c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein, Sab (SH3BP5), associates with mitochondria. *Biochem J.* 367: 577–585, 2002.
504. Win S. et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent acute liver injury from acetaminophen or tumor necrosis factor (TNF) requires mitochondrial Sab protein expression in mice. *J Biol Chem.* 286: 35071–35078, 2011.

505. Winterbourn CC, Metodiewa D. The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 314: 284–290, 1994.
506. Witkowska K, Smith KM, Yao SY, Ng AM, O'Neill D, Karpinski E, Young JD, Cheeseman CI. Human SLC2A9a and SLC2A9b isoforms mediate electrogenic transport of urate with different characteristics in the presence of hexoses. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* 303: F527–F539, 2012.
507. Wolosiuk RA. and Buchanan BB. Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature* 266: 565–567, 1977.
508. Wolucka BA, Van Montagu M. GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *J Biol Chem* 278: 47483–47490, 2003.
509. Xu DP, Wells WW. α -Lipoic acid dependent regeneration of ascorbic acid from dehydroascorbic acid in rat liver mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 28: 77–85, 1996.
510. Yamazaki I, Piette LH. Mechanism of free radical formation and disappearance during the ascorbic acid oxidase and peroxidase reactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 50: 62–69, 1961.
511. Yan HM, Ramachandran A, Bajt ML, Lemasters JJ, Jaeschke H. The oxygen tension modulates acetaminophen-induced mitochondrial oxidant stress and cell injury in cultured hepatocytes. *Toxicol Sci* 117: 515–23, 2010.
512. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, Cheah JH, Clemons PA, Shamji AF, Clish CB, Brown LM, Girotti AW, Cornish VW, Schreiber SL, Stockwell BR. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell.* 156: 317–331, 2014.
513. Ye N, Zhu G, Liu Y, Zhang A, Li Y, Liu R, Shi L, Jia L, Zhang J. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. *Journal of Experimental Botany* 63: 1809–1822, 2012.
514. Yu C-S, Chen Y-C, Lu C-H, Hwang J-K. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins* 64: 643–651, 2006.
515. Yuan L, Kaplowitz N Mechanisms of Drug Induced Liver Injury *Clin Liver Dis.* 17: 507–518, 2013.
516. Zechmann B, Koffler BE. & Russell SD. Glutathione synthesis is essential for pollen germination in vitro. *BMC Plant Biology* 11: 54, 2011.
517. Zechmann B, Mauch F, Sticher L, Muller M. Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *J. Exp. Bot.* 59: 4017–4027, 2008.
518. Zechmann B, Muller M, Zellnig G. Intracellular adaptations of glutathione content in *Cucurbita pepo* L. Induced by treatment with reduced glutathione and buthionine sulfoximine. *Protoplasma* 227: 197–209, 2006.
519. Zechmann B, Stumpe M, Mauch F. Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta* 233: 1–12, 2011.
520. Zechmann B, Tomasic A, Horvat L, Fulgosi H. Subcellular distribution of glutathione and cysteine in Cyanobacteria. *Protoplasma* 246: 65–72, 2010.

521. Zhang W, Lorence A, Gruszewski HA, Chevone BI, Nessler CL. AMR1, an Arabidopsis gene that coordinately and negatively regulates the mannose/l-galactose ascorbic acid biosynthetic pathway. *Plant Physiology* 150: 942–950, 2009.
522. Zhang YF, He W, Zhang C, Liu XJ, Lu Y, Wang H, Zhang ZH, Chen X, Xu DX. Role of receptor interacting protein (RIP)1 on apoptosis-inducing factor-mediated necroptosis during acetaminophen-evoked acute liver failure in mice. *Toxicol Lett* 225: 445–453, 2014.
523. Zhou Y, Qu H, Dibley KE, Offler CE, Patrick JW. A suite of sucrose transporters expressed in coats of developing legume seeds includes novel pH-independent facilitators. *Plant J* 49: 750–764, 2007.
524. Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L, Terry N. Cadmium tolerance and accumulation in indian mustard is enhanced by overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase. *J. Plant Physiol.* 121: 1169–1177, 1999.
525. Zimmerli L, Jakab G, Métraux JP, Mauch-Mani B. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by γ -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 12920–12925, 2000.
526. Zito E, Chin KT, Blais J, Harding HP, Ron D. ERO1- β , a pancreas-specific disulfide oxidase promotes insulin biogenesis and glucose homeostasis. *J Cell Biol* 188: 821–832, 2010.
527. Zito E. PRDX4, an endoplasmic reticulum-localized peroxiredoxin at the crossroads between enzymatic oxidative protein folding and nonenzymatic protein oxidation. *Antioxid Redox Signal* 18: 1666–1674, 2013.
528. Zsigmond L, Tomasskovics B, Deák V, Rigó G, Szabados L, Bánhegyi G, Szarka A. 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, 2011.
529. Zsigmond L, Rigó G, Szarka A, Székely Gy, Ötvös K, Darula Zs, Medzihradszky KF, Koncz Cs, Koncz Zs, Szabados L. The *Arabidopsis* PPR domain protein PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol.* 146:1721–1737, 2008.