

Balogh Tibor¹, Lőrincz Tamás¹, Mandl József², Szarka András¹

¹Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék, Biokémiai és molekuláris Biológiai Laboratórium

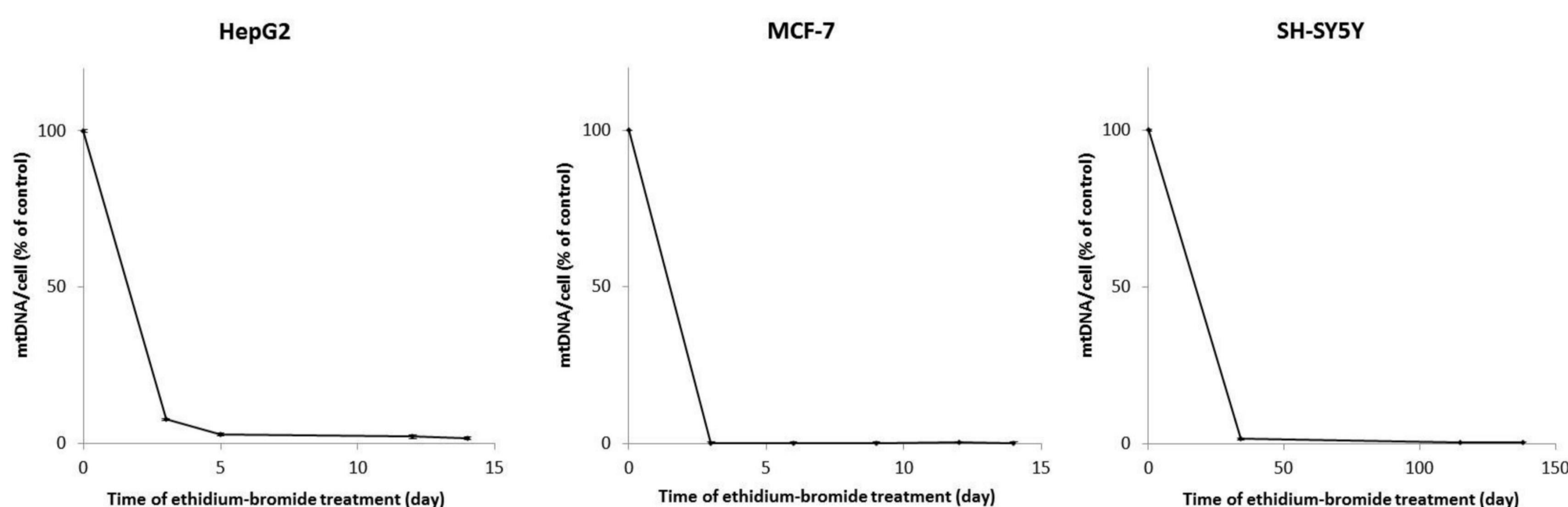
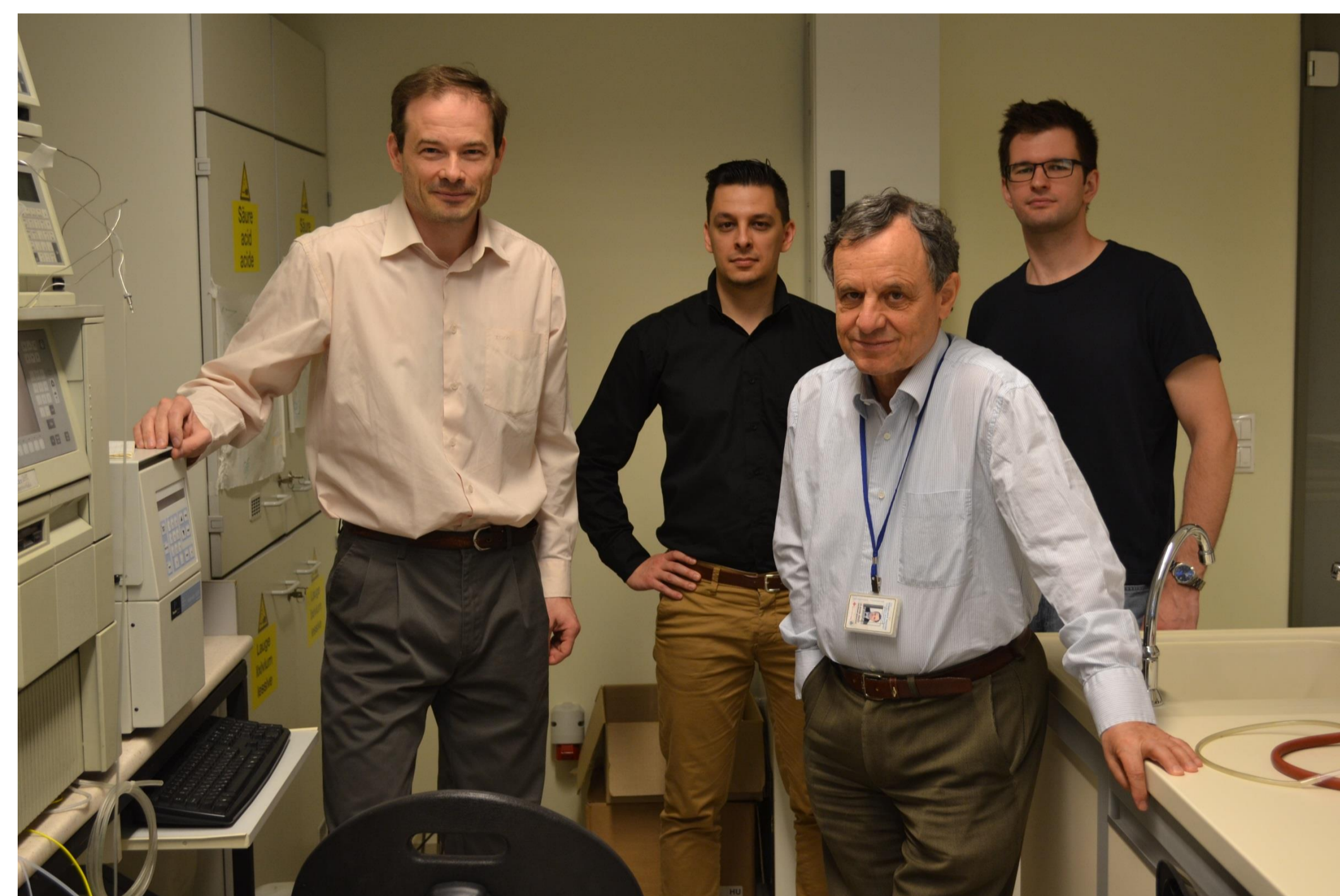
²Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Budapest

Az ALR (augmenter of liver regeneration) fehérje fontos szerepet tölt be a mitokondriális biogenezis, fenntartás folyamatában, illetve a mitokondrium fiziológias működésében. Ezen túl a mitokondriális oxidatív fehérjefolding apparátus fontos tagja. Az ALR fehérje közvetítésével csatornázódnak be a redukált fehérjéről érkező elektronok a mitokondriális elektrontranszfer láncba. Az ALR depléciója széles körben tanulmányozott, nem véletlen, hisz igen súlyos mitokondriális funkcióromlással jár együtt. Az ellentétes irányú folyamat, a mitokondriális elektrontranszfer lánc és a mitokondriális DNS (mtDNS) depléciójának hatása az ALR-re azonban mind a mai napig ismeretlen. A mitokondriális elektrontranszfer lánc és a mtDNS ALR szint szabályozásában betöltött szerepének felderítése végett mtDNS depletált sejt vonalakat hoztunk létre (1. ábra). A mtDNS depléciója nem okozott lényeges különbséget az ALR mRNS szintjében (2. ábra), azonban a fehérje szintje jelentős mértékben megemelkedett (3. ábra). Az ATP és a reaktív oxigénvegyületek szerepét az ALR fehérje szintjének szabályozásában kizártuk, mivel az eredeti anyasejt vonalakat különböző respirációs gátlószerekkel és szétkapcsoló szerrel kezelve nem változott meg az ALR fehérje kifejeződésének mértéke (4. ábra). A mtDNS depléció ALR fehérjeszintre gyakorolt hatása bizonyítottan nem máj specifikus, mivel a jelenséget két nem máj eredetű sejt vonalon is meg tudtuk figyelni (3. ábra).

Mindezek alapján úgy tűnik, hogy az mtDNS és/vagy egy(es) terméke(i) részt vesz(nek) az ALR fehérje kifejeződésének szabályozásában. Az ALR fehérje felszabályozása egy adaptív válaszreakció része lehet hiányos, vagy sérült mtDNS-sel, elektrontranszfer láncsal rendelkező sejtekben, amely segít megőrizni a mitokondrium szerkezeti integritását és fenntartani a membránpotenciált.

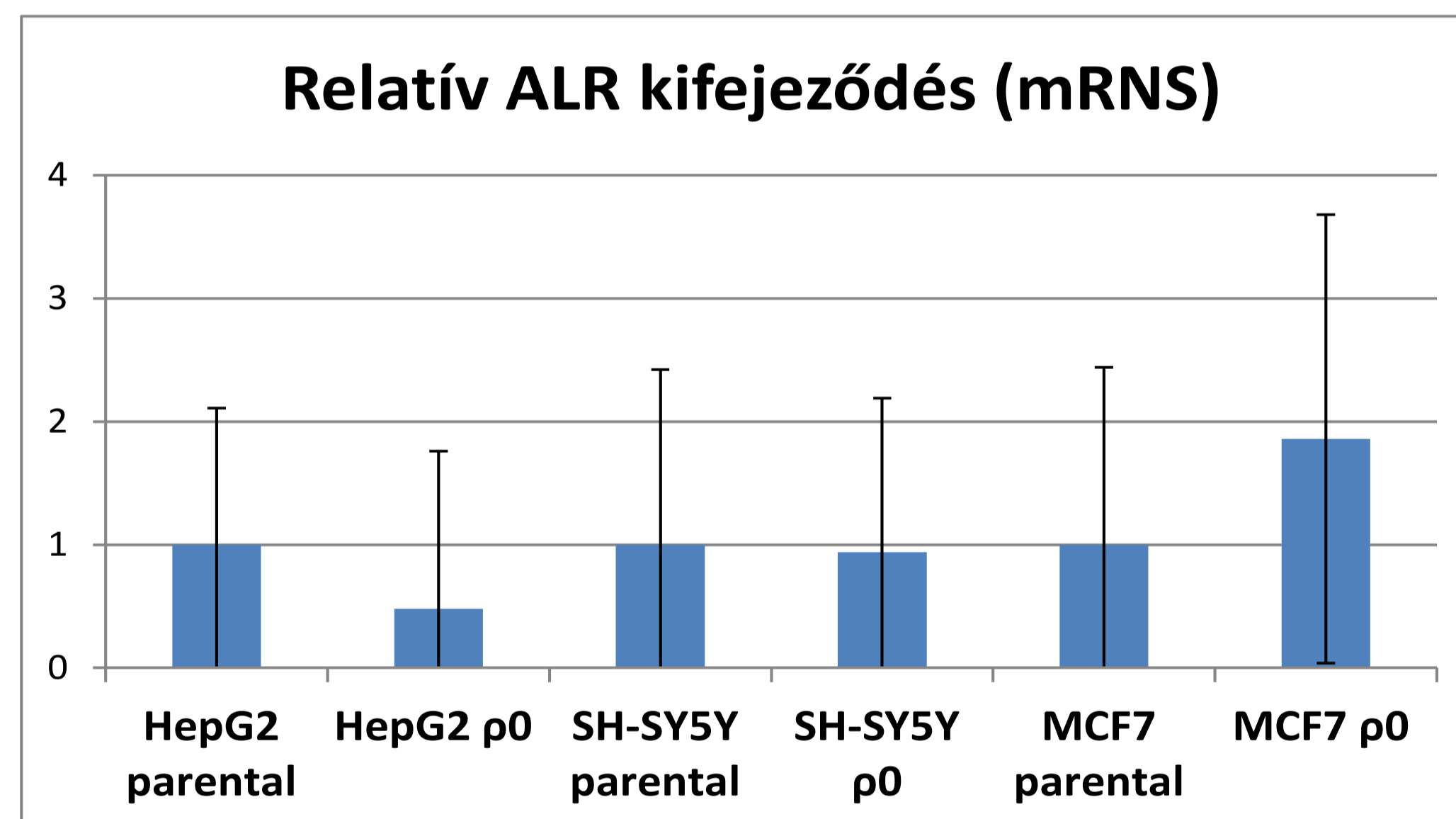
MEDINPROT fehérjetudományi együttműködés:

Szarka András, Lőrincz Tamás, Mandl József, Balogh Tibor



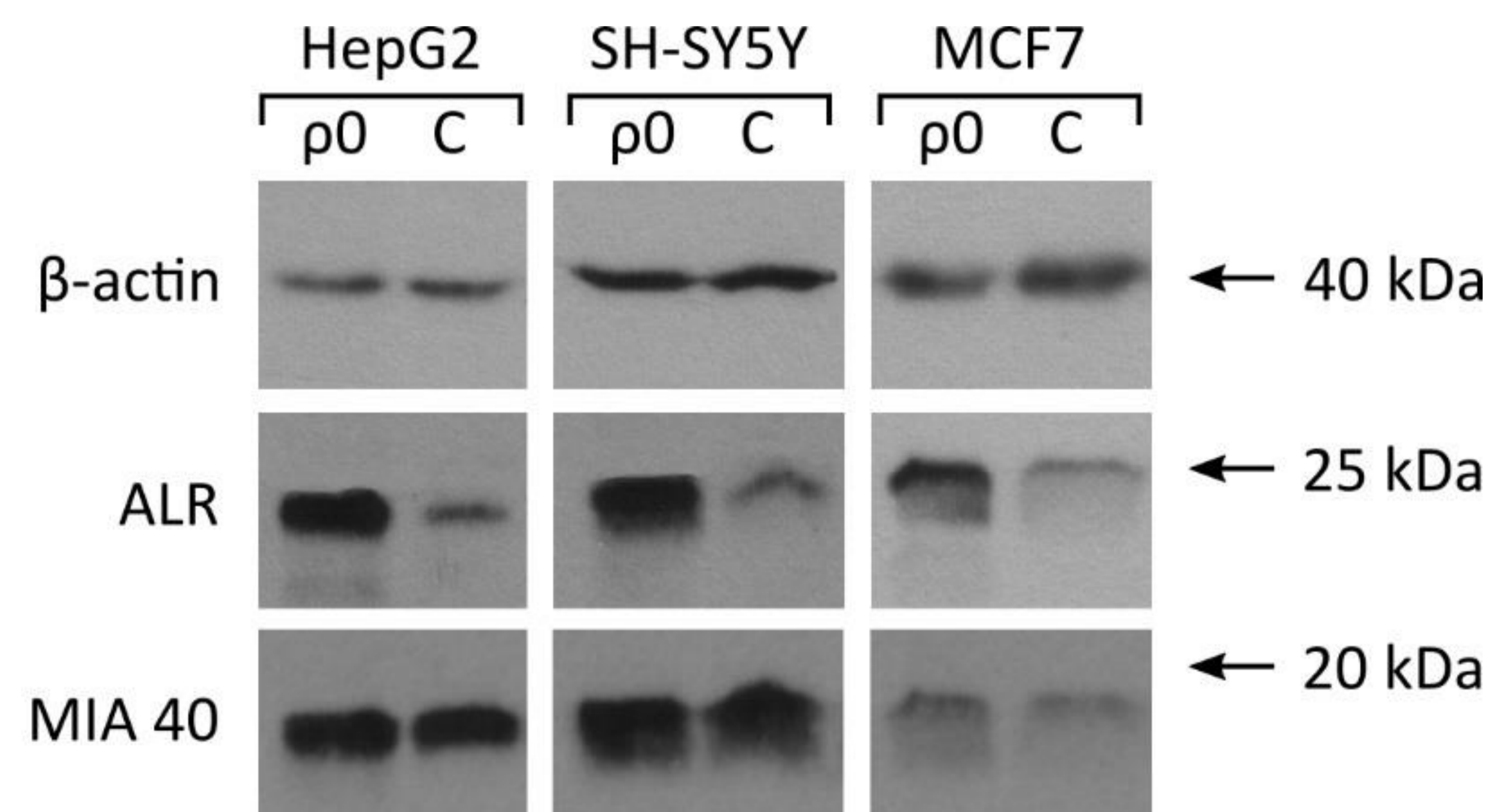
1. ábra A mtDNS tartalom változása HepG2, MCF-7 és SH-SY5Y sejt vonalokban hosszú távú etidium-bromid kezelés hatására

Az etidium-bromid kezelést a párhuzamos sejt vonalak esetében azonos időben kezdtük. A sejtől a kezelés különböző időpontjaiban mintát vettünk, majd teljes sejt DNS-t izoláltunk belőlük. Az mtDNS tartalmukat real-time PCR segítségével határoztuk meg.



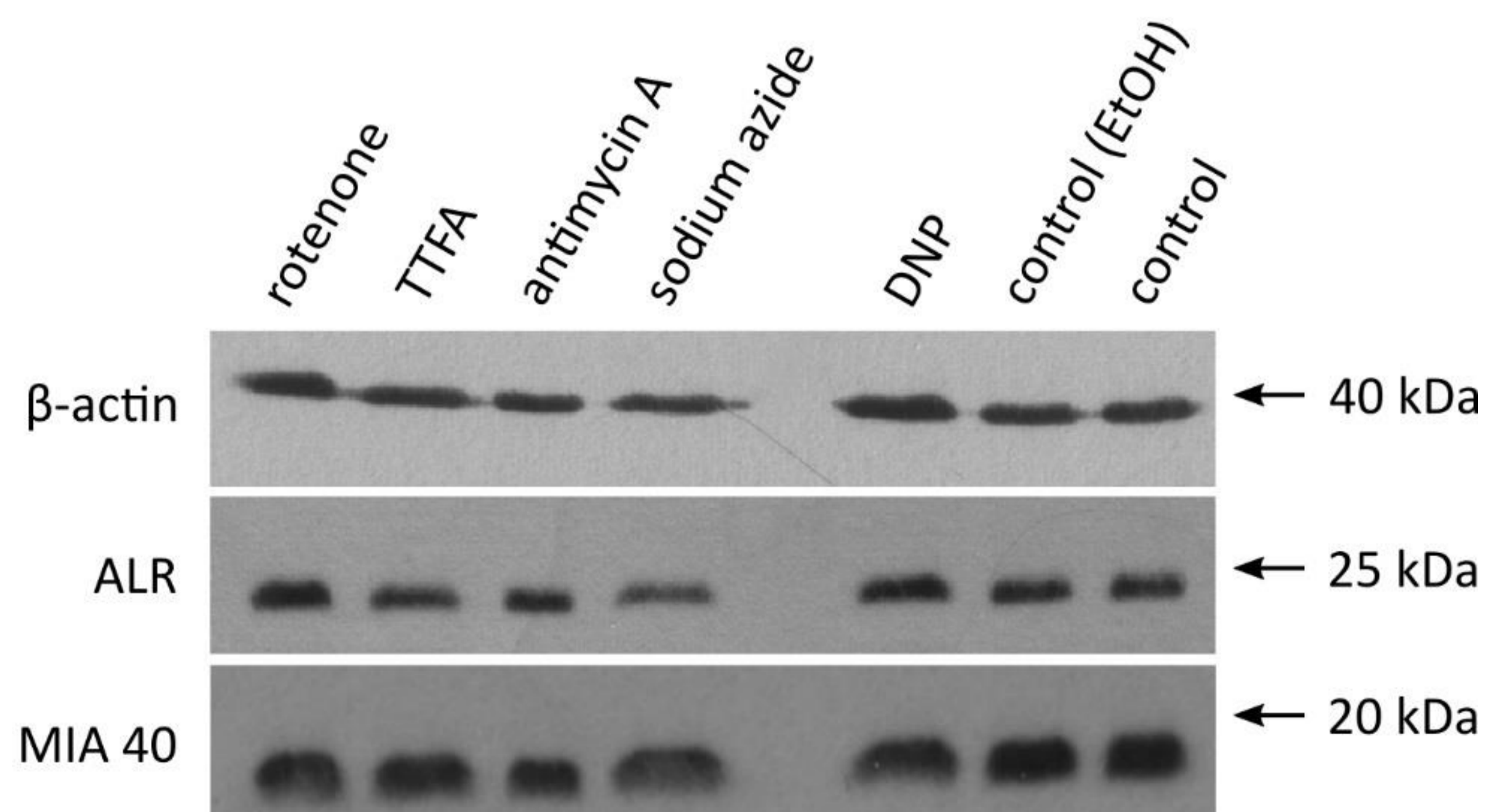
2. ábra Az mtDNS depléció hatása az ALR kifejeződésére (mRNS).

A sejtől a kezelés különböző időpontjaiban mintát vettünk, majd RNS-t izoláltunk belőlük, amit ezt követően cDNS-re írtunk vissza. Az ALR gén kifejeződését real-time PCR segítségével határoztuk meg.



3. ábra Az mtDNS depléció hatása az ALR és a MIA40 kifejeződésére.

Az ALR és a MIA40 fehérjék szintjét összevetettük mtDNS depletált (ρ0), illetve kontroll (C) sejtek esetében. A hosszú távú etidium-bromid kezelt illetve kontroll sejtekből fehérjét izoláltunk, majd redukáló SDS-PAGE segítségével elválasztottuk őket. Blottolást követően a membránokat anti-ALR illetve anti-MIA40 poliklonális antitesttel jelöltük. Belső kontrollnak β-actin-t használtunk.



4. ábra Különböző légzési gátlószerek hatása az ALR, illetve a MIA40 fehérjék kifejeződésére

HepG2 sejteket kezeltünk a komplex I gátlószer rotenone-nal, a komplex II gátlószer TTFA-val, a komplex III gátlószer antimycin A-val és a komplex IV gátlószer nátrium-aziddal. A 2,4-dinitrofenolt, mint szétkapcsolószert alkalmaztuk. 24 órával a kezelés megkezdését követően fehérjét izoláltunk a sejtekből, majd redukáló SDS-PAGE segítségével elválasztottuk őket. Blottolást követően a membránokat anti-ALR illetve anti-MIA40 poliklonális antitesttel jelöltük. Belső kontrollnak β-actin-t használtunk.