

Nagy Péter disszertációja kétarcú mű: valahol a részletes doktori értekezés és a tézisek között helyezhető el. Az átlagosnál jóval több kísérleti eredményt ismertet részletesen, ugyanakkor a módszereket nem mutatja be, lényegében terjedelmi korlátokra hivatkozva. Márpedig a módszertani repertoár igen széles: reakciókinetikai, gyorskinetikai, műszeres analitikai kémiai metodikákat éppúgy alkalmaz, mint a molekuláris biológia vagy a sejtbiológia eszköztárát: legyen az sejtenyésztés, fehérje izolálás, pontmutációs klónozás, PCR elemzés, ligand dokkolása fehérjéhez, vagy proteomikai analízis. (A felsorolás koránt sem teljes.) Ugyanakkor az adatok kiértékeléséhez és modellalkotáshoz részben saját fejlesztésű programokat használt. Az opponens természetesen nincsen otthon mindezen módszerek használatában, még kevésbé kritikai értékelésükben, ezért munkámat nagyon megnehezítette, hogy a módszerek leírását még vázlatosan sem lehetett a disszertációban megtalálni. Megkönnyebbülésemre szolgált az az információ, hogy a disszertációt Nagy Péter az MTA kémiai osztályához nyújtotta be, így a munkának a kémiai tudományok területére tartozó részét nálam lényegesen avatottabb szakértők bírálhatják el.

Az értekezés témája fontos és időszerű: biológiai rendszerekben lejátszódó redox folyamatok szubmolekuláris mechanizmusát vizsgálja, igen széles skálán, kis molekuláktól fehérje oldalláncokig, arra törekedve, hogy a lehető legteljesebben megértett reakciók biológiai jelentőségére is rávilágítson. Munkája során több korábban nem ismert, vagy az irodalomban pontatlanul leírt folyamatot sikerült felderítenie. E tekintetben különösen fontosnak tartom a H_2S -nek és a perszulfidoknak a jelátviteli folyamatokban játszott szerepének a tisztázásában elért eredményeket.

A disszertáció érdemi része (az irodalomjegyzék és a köszönetnyilvánítás nélkül) 129 oldalt tesz ki, aminek az alapját 35 eredeti közlemény és 3 összefoglaló cikk adja. Utóbbiak mindegyikében első (vagy egyetlen) szerző Nagy Péter, míg az eredeti közlemények közül kilencben levelező szerző és további tizenhárom közlemény első, vagy utolsó szerzője. Ezek a cikkek mind jelentős nemzetközi folyóiratokban jelentek meg. A beadás idejében a független hivatkozások száma 605, míg az összesített impakt faktor 176,8. Megállapítható tehát, hogy Nagy Péter tudományos munkássága kiemelkedő, amit egyébként a nagyszámú meghívott előadóként tartott előadás is alátámaszt.

A dolgozatban ismertett tudományos eredmények háttérében igen sok munka áll, amit a következő egyszerű statisztika tanúsít: a disszertáció 106, többségében összetett ábrát, 19 reakciósémát és 6 táblázatot foglal magába. Az általam legfontosabbnak tartott új tudományos eredményeket szakterületi csoportosításban sorolom fel. Ezek a következők:

A) Reakciókinetika – reakció mechanizmus

1. Peptidekben lévő tirozin oldalláncok szuperoxid anionnal gyorsan reagálnak biciklusos tirozin hidroperoxid származékok képződése közben. Ezt több modell peptiden is bemutatta. (Itt, és a továbbiakban, bár az eredményt elérő team számos tagból állt, az egyszerűség kedvéért, a munkatársak kontribúcióját nem vitatva – valójában jelentőségét nem ismerve – egyes szám harmadik személyű igealakot használok.)
2. A fehérjékben található tirozin oldalláncok is számos kémiai reakcióba vihetők oxidáló és redukáló szerek jelenlétében. Erre az ábrás cet mioglobin Y151 oldalláncát, az inzulin 4 tirozinját és a humán apolipoprotein A1 tirozinjait hozza fel példának.
3. Bebizonyította, hogy az $SCN^{\ominus}$ enzimatis reakciókban $OSCN^{\ominus}$ -ná oxidálódik és részletes reakciómechanizmus sémát dolgozott ki az $OSCN^{\ominus}$ cisztein SH-val való reakciójának az értelmezésére.
4. Tanulmányozta a cisztein H_2O_2 -dal való reakciójának mechanizmusát. Jellemezte a reakció során keletkező szulfénsav és ciszteintioszulfínát észter egyes reakcióit.
5. Kidolgozta a cisztin és az oxidált glutation HOCl-lel való reakciójának kinetikai modelljét.

6. Részletesen elemezte a H_2S HOCl-val való reakcióját és javaslatot tett annak mechanizmusára.

B) A peroxiredoxin fehérjecsalád tagjainak reakciói peroxidokkal

1. Modellt állított fel a Prx enzimes család H_2O_2 -vel való kiemelkedő reaktivitásának értelmezésére
2. Bebizonyította, hogy Prx képes aminosavak, peptidek és fehérjék peroxid származékait redukálni. Ennek a kérdéskörnek a vizsgálata során új módszert dolgoztak ki a sebességi állandók meghatározására.
3. Bebizonyította, hogy a doxorubicin kezelés hatására a vörösvértestekben képződő H_2O_2 közömbösítésében a Prx2-nek kulcsszerepe van.

C) Redoxi reakciók szabályozó szerepe

1. Azonosított egy H-híd kötés rendszert a GAPD enzim aktív centrumában, ami a H_2O_2 -vel szembeni nagy reaktivitást okozza. Bebizonyította, hogy az enzim katalitikus aktivitásáért és az enzimműködés szabályozásáért ugyanaz a C152 aminosav felelős, azonban ennek gyors oxidációját a C156-tal és a Y314-gyel való kölcsönhatás teszi lehetővé. Azt a feltételezést javasolta, hogy a GAPD emelkedett H_2O_2 szint melletti aktivitás vesztese hozzájárul az oxidatív stressz elleni védekezéshez feltehetően a pentóz-foszfát ciklus aktiválása és ezen keresztül a NADPH termelés fokozódása révén.

D) A H_2S és perszulfidok szerepe a jelátviteli folyamatokban.

1. Rávilágított arra, hogy a biológiai rendszerekben mért és különböző laborokból publikált szulfid koncentrációk értékei között feszülő ellentmondások annak a következményei, hogy ezekben a rendszerekben a szulfidok nagy része kötött formában található, amiből könnyen felszabadulhat a szabad szulfid a pH, vagy a redox potenciálok változásának következtében. A biomolekulákban kötött szulfid mennyiség ezáltal mintegy pufferként viselkedik.
2. Megmutatta, hogy a PTEN fehérje a H_2S oldatokban nyomokban jelenlévő poliszulfid szennyezés hatására reverzibilisen inaktíválódik.
3. Módszert dolgozott ki a fehérje perszulfidok koncentrációjának a detektálására és kvantitatív meghatározására, amely alkalmas izolált rendszerekben és sejten belül is a fehérje perszulfidok mérésére szabad SH csoportok, diszulfidok és oxidált kéntartalmú csoportok jelenlétében is.
4. Megmutatta, hogy a tioredoxin és a GSH enzimszisztemek meghatározó szerepet töltenek be a fehérje cisztein oldalláncok perszulfidokból történő regenerálásában.
5. Kinetikai modellt dolgozott ki a H_2S MPO-zal való reakcióinak magyarázatára.
6. Igazolta, hogy a H_2S hatékonyan redukálja a hemoglobin toxikus oxidált ferrilszármazékait szulfhemoglobin képződése közben.
7. Mechanizmus javaslatokat tett a H_2S és a NO által vezérelt jelátviteli folyamatok kölcsönös kapcsolatára.

Kritikai megjegyzéseim elsősorban a dolgozat felépítésére és szerkesztésére vonatkoznak:

A módszerek ismertetésének teljes hiánya, amint azt már a bevezetőben is említettem, a dolgozat értékelését jelentősen nehezíti, különös tekintettel arra, hogy az eredeti közleményeket nem kell benyújtani a disszertáció mellé, tehát adott esetben azokat külön kellett megszerezniem.

Ezt a hibát különösen súlyosnak kell értékelnem a fent említett perszulfid meghatározási módszer esetében, amit Nagy Péter és munkatársai dolgoztak ki és állítása szerint validáltak. A módszer fontosságára való tekintettel a validálás részleteit hozzáférhetővé kellett volna tenni a bírálók számára. Az irodalomjegyzék szerint a dolgozat beadásakor a vonatkozó közlemény még meg sem jelent.

Szerkesztési probléma továbbá a következő: az ábrák aláírásait folytatólagosan és a törzsszöveggel azonos méretben és stílusban gépelte a szerző, azok sok esetben két oldalon helyezkednek el és a törzsszöveggel összeolvadva jelennek meg. Ez rendkívül zavaró. Mindkét fenti hiányosság valószínűleg abból fakad, hogy a szerző lényegében minden eredményét be kívánta mutatni, azonban nem léphette túl a megszokott terjedelmi korlátokat.

Megítélésem szerint szerencsésebb lett volna válogatni az eredmények között és csak a legfontosabbnak ítélteteket bemutatni, elkerülve a fenti buktatókat.

Kérdéseim:

1. A dolgozat 4.2.2 és 4.2.3 fejezete részletesen foglalkozik a hipohalogénessavak képződésével és reakcióival, ezek között külön részletesen a HOSCN-nel is. Ennek képződése rodanid ionok jelenlétét feltételezi. Van-e a hipotiocianát reakcióinak tényleges biológiai jelentőségük? Milyen körülmények között jelennek meg, vagy képződnek rodanid ionok a neutrofil fagocitákban, ahol a 3. séma szerint belőlük mieloperoxidáz enzimmel, pontosabban az ún. Compound I-gyel reagálva HOSCN keletkezhet?
2. Több helyen utal arra, hogy a szulfidok jelátvitelben játszott szerepe révén túltermelésük, vagy hiányuk is szerepet játszhat igen különböző betegségek patomechanizmusában. Következésképpen szulfidok bevitele, vagy fordított esetben szintézisük gátlása új megközelítést jelenthet a terápiában. Szabó Csaba már 2007-es közleményében 4 preklinikai, illetve klinikai fázis I.-ben lévő gyógyszerjelöltre utal. Nagy Péter dolgozatának záró fejezetében a CBS/CSE enzimeket mint a rákkutatás potenciális gyógyszercélpontjait említi. Ismeretes-e olyan, a szulfid szint szabályozásán keresztül ható gyógyszerjelölt, ami jelenleg is fejlesztés alatt áll? Ha igen, a fejlesztés melyik fázisában van a leginkább előrehaladott molekula és mi a megcélzott indikáció?
3. A GAPD enzim működését 2 mM H_2O_2 jelenlétében 60 percen át inkubálva megállapította, hogy a NADPH/NADP⁺ arány lényegében nem csökken vad típusú GAPD-t expresszáló élesztőben, míg C156S, vagy Y314F mutáns esetében, amely mutánsok glikolitikus aktivitása érintetlenül megvan, ez az arány jelentősen lecsökken. Ebből arra a következtetésre jutott, hogy a GAPD „redoxi kapcsoló”-ként működik abban az esetben, ha az oxidatív terhelés egy bizonyos szintet meghalad. Modellje szerint ilyen körülmények között az aktív centrumban elhelyezkedő C152 oxidálódik, aminek következtében a glikolízis leáll, helyette a pentóz-foszfát útvonalon keresztül bomlik le a glükóz NADPH termelés mellett, segítve az oxidatív stressz elleni védelmet. Ezt a gondolatmenetet az élesztő növekedési görbéje is alátámasztja.
Megállapítom azonban, hogy a fenti mechanizmus merőben szokatlan, nemcsak amiatt, hogy ugyanazon cisztein oldalláncnak így kettős funkcionális szerepe van, amint arra Nagy Péter következtet, hanem sokkal inkább azért, mert a glikolízisnek és a pentóz foszfát útvonalnak is egyébként jól ismert szabályozó enzimeik vannak: a glikolízis szabályozó enzime a foszfofruktokináz, tehát **nem** a GAPD, a pentóz foszfát útvonalé pedig a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, amit a NADPH gátol, a NADP⁺ pedig aktivál. Kissé hosszasan elővezetett kérdésem most már a következő: Nem gondolja-e Nagy Péter, hogy kísérleti eredményeit inkább a kísérlet körülményei, azaz a viszonylag magas H_2O_2 koncentráció, és a választott inkubációs idő magyarázza, esetleg az az élesztő törzs, amiben a NADPH/NADP⁺ arány alapállapotban 1-hez van közel (legalábbis ez látszik a 75. D ábrán), míg például patkány májban ettől több nagyságrenddel eltér?

A metodikai részletek ismertetésének a hiánya minden olyan kérdést és kritikai észrevételt merőben fölöslegessé tesz, ami az egyes kísérletek konkrét adataira, megbízhatóságukra, a módszerek adekvát voltának elemzésére vonatkoznának. Ezért ilyesmivel nem próbálkoztam. Megnyugtatónak tartom azonban ebből a szempontból, hogy lényegében minden egyes ábránál igen színvonalas nemzetközi folyóiratban megjelent, tehát többszörösen alaposan megvizsgált közleményeire hivatkozik a szerző. Bírálatom végén egyértelműen kijelentem, hogy kifogásaim természetesen nem érintik a munka lényegi értékeit. A felsorolt tudományos eredményeket fontosaknak és valósaknak tartom, és a disszertáció nyilvános vitára bocsátását támogatom.

Budapest, 2016. szeptember 8.

Arányi Péter
a biológiai tudomány doktora