

A bírálóbizottság értékelése

A bírálók közül 2 mindegyik tézispontot elfogadja új tudományos eredményként, egy bíráló a 6. és 7. tézispontokat egyszerű nyelvtani korrekció, illetve mondatrész áthelyezés után elfogadja, továbbá a 10. és 14. tézisek első felét tartja csak elfogadhatónak, mivel véleménye szerint, a második részük már feltételezéseken alapul. Ezzel szemben a 8. tézispont, amely egy hipotetikus modellt foglal magába, még megerősítésre vár, és további, az állítást igazoló eredmények birtokában válhat majd csak tézissé, a kutatócsoport valamely tagjának disszertációjában.

A bírálók az alábbi véleményt fogalmazták meg az egyes tézispontokra vonatkozóan.

Prof. Dr. Biacs Péter, a kémiai tudomány doktora, valamennyi tézispontot, változatlan formában fogadja el.

Prof. Dr. Bíró György, az orvostudomány doktora, orvosbiológiai vonatkozásban a következőket fogadja el új tudományos eredménynek:

- a növények mitokondriális dehidroaszorbinsav felvétele, transzportja, a mitokondriális elektrontranszfer szerepe ennek redukciójában, befolyása a reaktív oxigénvegyületek keletkezésére (1, 2, 3, 7, 8 pont);
- a mikroszomális GSH, illetve redukált GSH szint változása kémiai kezelés következtében és ennek hatása a sejtek apoptózisára, nekrozisára, valamint a ferroptózis jelentősége, e jelenségek befolyásolása C-vitaminnal (11, 12, 13 pont).

Prof. Dr. Záray Gyula, a kémiai tudomány doktora, az 1., 2., 3., 4., 5., 9., 11., 12., 13., és 15. tézispontokat változtatás nélkül, míg a 6. és 7. tézispontokat egyszerű nyelvtani korrekció, illetve mondatrész áthelyezés után fogadja el. A 10. és 14. tézisek első felét tartja csak elfogadhatónak, mivel véleménye szerint, a második részük már feltételezéseken alapul. Ezzel szemben a 8. tézispont, amely egy hipotetikus modellt foglal magába, még megerősítésre vár, és további, az állítást igazoló eredmények birtokában válhat majd csak tézissé, a kutatócsoport valamely tagjának disszertációjában.

Dr Szarka András jelölt a 6. és 7. tézispontokra vonatkozó javaslatokkal egyetért, azt értelemszerűen javítja. A 8. tézispont esetében csak részben ért egyet Prof. Dr. Záray Gyula kritikájával, az alábbi érvek alapján:

- *Eredményei alapján valószínűsíti, a növényi mitokondriumban egy aszkorbát/DHA redox párból álló komplex III-at megkerülő elektrontranszfer út létezését. Állításait kísérletekkel igazolta, miszerint a mitokondriális II-es komplexnél bekövetkezik a dehidroaszorbát aszkorbáttá történő redukciója (kísérletekkel bizonyítva Szarka és mtsai 2007, Szarka 2013). Az aszkorbát kijut a mitokondriális mátrixból (Szarka és mtsai 2013), ahol a IV-es komplexnek elektronokat juttatva dehidroaszorbáttá oxidálódik (Szarka és mtsai 2007, Zsigmond és mtsai 2008, 2011).*
- *Az útvonal képes lehet stresszhelyzetekben az elektrontranszfer lánc elemeinek redukáltságát csillapítani, ami egyrészt direkt módon csökkenti a reaktív oxigénvegyületek keletkezését, másrészt az aszkorbát szint fokozásával növeli az antioxidáns védelem hatásfokát.* Ez a rész valóban feltételez, mivel közvetlen stresszhelyzetben aszkorbát adagolására nem vizsgálta az elektrontranszfer lánc komponenseinek redukáltsági fokának megváltozását. A dehidroaszorbát redukálása azonban jó eséllyel csökkenti az elektrontranszfer láncban torlódó elektronok mennyiségét (mivel onnan származnak a redukálódáshoz szükséges elektronok), (Szarka és mtsai 2007, Szarka 2013), az aszkorbát szint növekedése pedig növeli az antioxidáns védelem hatásfokát.

- *A kerülőút limitáló lépése nagy valószínűség szerint az aszorbát mátrixból történő kijutása. Ezt bizonyítja, hogy a DHA redukció eredményeként keletkező aszorbát a mátrixhoz képest jelentős késedelemmel jelenik csak meg az extramitokondriális térben (mitokondriális membránközi térben). Ahogyan arról korábban már szó esett a redukált forma az aszorbát mitokondriális membránon keresztüli transzportja meglehetősen kis aktivitással rendelkező, lassú folyamat. Ezt mérésekkel is alátámasztotta (Szarka és mtsai 2013), az aszorbát a mátrixhoz képest mintegy 30 perces késéssel jelenik csak meg a mitokondriális membránközi térben, tehát az oxidációja helyszínén. A 8. tézispontban szereplő kerülőút meglétét időközben oxigráfos mérésekkel ellenőrizte. A dehidroaszorbát adagolására csak igen kismértékű légzésgyorsulást tapasztaltunk komplex III. blokk esetében, ami a redukált forma mitokondriumából történő igen lassú kijutásával magyarázható és összevág azzal.*

A Jelölt elfogadja, hogy a 10. tézispont második fele valóban feltételezésen alapul. Az ozmoregulációs mechanizmus feltárását megkezdte, sóstressz esetében igazolta a szorbít mitokondriális képződését, de részletesebb karakterizálására valóban nem került még sor.

A Jelölt elfogadja, hogy bár a tézispont második fele jelentős részben kísérletes megfigyeléseken, megállapításokon alapul, de kis mértékben ezeket kapcsolatba hozó feltételezéseket is tartalmaz, az alábbi indoklás szerint.

- *Az ALR részt vesz a mitokondriumok biogenezisében és fenntartásában. Ez a rész több munkacsoport által megerősített eredményeken nyugszik... (Lisowsky 1992, 1994, Di Fonzo és mtsai 2009, Thirunavukkarasu és mtsai 2008, Gandhi és mtsai 2015).*
- *...ezért könnyen elképzelhető, hogy szintjének megemelkedése a p0 sejtek adaptív válaszának egy része lehet, amely segít a mtDNS-ben kódolt fehérjék kiesése ellenére a mitokondriális belső membrán integritásának és a membránpotenciál megőrzésében. A p0 sejtek esetében a mitokondriális DNS-ben kódolt fehérjék nem fejeződnek ki, mégis a mitokondriális belső membrán integritása és a mitokondriális membránpotenciál megtartott marad, illetve a mitokondriumok biogenezise is folytonos, amely megfigyeléseket szintén több független forrás bizonyított (Miranda és mtsai 1999, Holmuhamedov és mtsai 2003, Li és mtsai 1995)*
- *Így az ALR a mtDNS hiánya, a mitokondriális betegségekben és az öregedés során előforduló mtDNS mutációk esetében is hozzájárulhat a mitokondriális funkciók fenntartásához. Eredményei alapján, az ALR a gépezet egy fontos alkotója lehet, a mtDNS pedig fontos szabályozó szerepet tölthet be az ALR fehérjeszintjének szabályozásában. Az ALR szint megemelkedését a Jelölt kizárólag az mtDNS hiányában írta le. Mitokondriális betegségekben és öregedésben csak a mtDNS hiánya, sérülése került leírásra az ALR szint emelkedése nem. Az ALR szintet eredményei szerint egyértelműen megemelte a mtDNS hiánya, más független laborok pedig bizonyították az ALR szerepét a mitokondrium fenntartásában, biogenezisében. Mindezekből következtetett arra, hogy más mtDNS hiányos állapotokban is szerepet kaphat az ALR a mitokondriumok fenntartásában, biogenezisében.*

A nyilvános vitára kiküldött bizottság az alábbiakban foglalja össze a kérelmező új tudományos eredményeit.

1. tézis: Megállapította, hogy a növényi mitokondrium mind az aszkorbátot, mind a dehidroaszkorbátot (DHA) felveszi. Enzimes és nem enzimes oxidálószeres fokozzák a felvett C-vitamin mennyiségét, tehát az oxidált forma, a DHA felvétele preferált. A transzport idő- és hőmérsékletfüggő, telítési kinetikát mutat és specifikus gátlószerekkel gátolható. Mindezen sajátságok alapján kijelenti, hogy a felvétel, fehérje mediált transzport.
2. tézis: Kimutatta, hogy a növényi mitokondrium, a DHA transzport mellett, kétirányú, idő és hőmérsékletfüggő, specifikus gátlószerekkel gátolható glükóz transzportot is mutat. A GLUT gátlószer genistein, DHA és glükóz transzportra gyakorolt erős gátló hatása, illetve a glükóz, DHA transzport esetében tapasztalt, gátló hatása arra utal, hogy a két molekula ugyanazon transzporter ligandjai lehetnek. A mitokondriális DHA és glükóz transzport mitoplasztok esetében is megfigyelhető, tehát a belső membránban lokalizált transzporter mediálja, amely működése a mitokondriális membránpotenciáltól (légzéstől) független.
3. tézis: Igazolta, hogy a mitokondriális elektrontranszfer lánc részt vesz a DHA mitokondriális redukciójában. Légzési szubsztrátokkal és gátlószerekkel végzett kísérletek alapján a légzési elektrontranszfer lánc-függő DHA redukció helyszíne a mitokondriális mátrix, elektrondonora a komplex II. Komplex II szubsztráttal millimolos aszkorbát koncentráció érhető el a mitokondriális mátrixban. A mátrixban a DHA redukció során keletkezett aszkorbát kijut a mitokondriumból és a membránközi térben hozzájárul a komplex IV elektronellátásához, amelynek fontos szerepe lehet stresszhelyzetben a növények életképességének fenntartásában. Eredményei alapján kijelenthető, hogy a növényi mitokondriális légzési elektrontranszfer lánc nemcsak a C-vitamin bioszintézisében, hanem a (DHA-ból történő) reciklálásában is fontos szerepet játszik.
4. tézis: Meghatározta a komplex II és a glutation (GSH) függő folyamatok mitokondriális DHA redukcióhoz való hozzájárulásának mértékét növényi sejtekben. A mitokondriális DHA redukcióhoz a GSH függő folyamatok mintegy 20%-ban járulnak hozzá, míg a komplex II függő redukció ettől lényegesen nagyobb mértékű. Ezek alapján megállapította, hogy a mitokondriális elektrontranszfer lánc szerepét a mitokondriális aszkorbát reciklálásban eddig jelentősen alábecsülték.
5. tézis: Kimutatta, hogy a mitokondriális III-as komplex mutáns ppr-40 lúdfüben, a III-as komplexnél bekövetkező elektron áramlási blokk, csökkent mértékű légzést (elektrontranszfert) okoz, amely egy kompenzációs mechanizmust indít el. A kompenzációs mechanizmus eredményeként fokozódik a IV-es komplex (citokróm c oxidáz, CCO) és az alternatív oxidáz (AOX) aktivitása, illetve jelentős mértékben megnő a IV-es komplex alternatív elektrondonoraként viselkedő aszkorbát fogyása. Így az aszkorbát nemcsak antioxidánsként, de az alap anyagcsere részeként is hozzájárul a (komplex III) sérült növények életképességének növeléséhez.
6. tézis: Kimutatta, hogy a ppr-40 növényeket mind mitokondriális, mind sejtszinten jóval alacsonyabb és oxidáltabb C-vitamin szint jellemzi a vad típusú növényekhez viszonyítva. Az aszkorbát (DHA-ból történő) regenerációjáért felelős GSH függő folyamat, az aszkorbát-glutation ciklus minden enzimének aktivitása megemelkedik a ppr-40 mutáns növényekben és az azokból izolált mitokondriumokban. A ciklus enzimeinek emelkedett aktivitása együtt jár a redukcióhoz elektronokat szolgáltató
7. (elektrondonor) GSH mitokondriális szintjének emelkedésével a mutáns növényekben. A C-vitamin bioszintézis utolsó lépését katalizáló, mitokondriális L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenáz enzim mRNS szintje nem változik meg a ppr-40 mutáns növényekben, azonban aktivitása mintegy 25%-kal megemelkedik, feltehetően az oxidáltabb redox állapotú elektronakceptor citokróm c miatt. A ppr-40 növényekben mérhető jelentősen alacsonyabb teljes C-vitamin szint és a még

jelentősebb mértékben csökkent és oxidáltabb mitokondriális C-vitamin szint azt jelzi, hogy a megnövekedett regenerációs és szintetikus kapacitás is kevésnek bizonyult a III-as komplexnél bekövetkező elektronáramlási blokk következtében kialakuló oxidatív stressz és fokozott aszkorbát fogyasztás kompenzálására.

8. tézis: Kimutatta, hogy növényi sejtekben a plazmamembránon keresztüli C-vitamin transzport esetében lineáris összefüggés van a külső inkubációs közeg DHA tartalma és a transzportra kerülő DHA mennyisége között, amely egyértelműen bizonyítja a sejtek, a C-vitamin oxidált formája, a DHA irányába mutatott transzport preferenciáját. 100-szoros glükóz és 10-szeres DHA felesleget alkalmazva sem mutatható ki kompetíció a két anyag plazmamembránon keresztüli transzportja között. Ez, valamint az eltérő inhibíciós profil bizonyítja, hogy a növényi sejtekben két különböző típusú nagy affinitású DHA transzportrendszer létezik: a mitokondriális, amely nagy valószínűség szerint hasonló a glükóz transzporterekhez, illetve a plazmamembránban található, amely egyértelműen különbözik a glükóz transzporterektől.
9. tézis: Kísérletesen igazolta, a növényi mitokondriumban egy aszkorbát/DHA redox párból álló komplex III-at megkerülő elektrontranszfer út létezését. A kerülőút limitáló lépése nagy valószínűség szerint az aszkorbát mátrixból történő kijutása. Ezt bizonyítja, hogy a DHA redukció eredményeként keletkező aszkorbát a mátrixhoz képest jelentős késedelemmel jelenik csak meg az extramitokondriális térben (mitokondriális membránközi térben).
10. tézis: Kimutatta, hogy a növényi mitokondriumban invertáz aktivitás található. A mitokondrium szubfrakcionálását követően megállapította, hogy az invertáz aktivitás (a mátrix markerenzim fumarázzal együtt) a mitokondriális mátrixhoz volt egyértelműen köthető. Az enzimaktivitás pH optimuma, kinetikai paraméterei, valamint inhibitor profilja alapján az újonnan leírásra került enzim a neutrális invertázok családjába sorolható.
11. tézis: Igazolta, hogy a mitokondriális invertáz aktivitás kiszolgálására kétirányú, telíthető, valamint mitokondriális membránpotenciáltól független szacharóz, glükóz és fruktóz transzport található a mitokondriális belső membránban. A különböző kinetikai paraméterek, valamint a kereszt-gátlás hiánya arra utalnak, hogy a transzportfolyamatokat három egymástól független transzporter mediálja.
12. tézis: Kimutatta, hogy az emlős mikroszómális membránon keresztül kétirányú FAD transzport bonyolódik. A transzport a mitokondriális FAD transzport gátló atraktiloziddal, illetve az anion transzporter gátló 4,4'-Diizotiociano-2,2'-stilbén diszulfonsavval gátlható. A FAD felvétel atraktiloziddal történő gátlása megakadályozza a FAD kiváltotta fehérje tiol oxidációt, amely igazolja a FAD szerepét a fehérje tiolok oxidációjában emlős mikroszómális vezikulák esetében.
13. tézis: Igazolta, hogy in vivo acetaminofen (APAP) és butionin-sulfoximin (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.
14. tézis: Kimutatta, hogy a nekroptózis és az apoptózis mellett egy harmadik programozott sejthalál típus, a ferroptózis is szerepet kap az APAP kiváltotta sejthalál folyamatában primer egér májsejtekben. Eredményei 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.

15. tézis: Kimutatta, hogy a mitokondriális DNS hiányának hatására, a mitokondriális oxidatív folding apparátus fontos eleme, az ALR (Augmenter of Liver Regeneration) fehérjeszintje jelentős mértékben megnő. Az ALR mennyisége nem mutatott változást a sejtek légzési komplex gátló és szétkapcsoló szerekkel történő kezelésére, ezért az ATP, illetve ROS szintek ALR fehérjeszintet szabályozó szerepe nem valószínű.
16. tézis: A GLUT (SLC2), illetve az SVCT (SLC23) transzporter családok *in silico* lokalizációjának vizsgálatával megerősítette a GLUT1 és az SVCT2 transzporterek mitokondriális lokalizációját, ugyanakkor megkérdőjelezte a GLUT10 mitokondriális jelenlétét. Ezen túl valószínűsíti két újabb, GLUT családtag, a GLUT9 és a GLUT11 mitokondriális elhelyezkedését, illetve felveti DHA transzportban való részvételüket.