SEMMELWEIS EGYETEM
Általános Orvostudományi Kar
Biokémiai Tanszék

Tanszékvezető
Dr. Csanády László egyetemi tanár

**Dr. Kovács Mihály**
*egyetemi tanár*
Biokémiai Tanszék
Eötvös Lóránd Tudományegyetem

Tárgy: Válaszok MTA doktori értekezés bírálatára

Tisztelt Professzor Úr!

Hálás vagyok, hogy elfogadta doktori munkám bírálatát. Köszönöm szépen, hogy támogató javaslattal élt a nyilvános vitára bocsájtás tekintetében. Az alábbiakban engedje meg, hogy válaszoljak a megjegyzéseire és kérdéseire.

*Kritikai észrevételek:*
(1) A tézisfüzet szövegével ellentétben a doktori mű egésze nem olvasmányos, a nagy mennyiségű adat közlése a legtöbb helyütt meglehetősen leíró jellegű, kevés értés-segítő értelmezést tartalmaz.

*Válasz:* A jelölt elfogadja a kritikát és sajnálja, hogyha ezzel megnehezítette a Bíráló munkáját. Nem volt könnyű megtartani a rövid értekezési formát és ugyanakkor leírni az egyes cikkekkel kapcsolatban minden olyan információt, amivel kerek egészként lehetett bemutatni az adott munkát. A jelölt próbálta értelmezni és betartani a Doktori Szabályzat rövid értekezésre vonatkozó irányelveit, konzultált előre többször a megfelelő illetékesekkel erről a még nem annyira általános disszertációs formáról, ill. beszerzett és átnézett jónéhány rövid formában benyújtott értekezést. A Doktori Szabályzat a következőképpen fogalmaz ez ügyben (13.o.): ”…rövid értekezés, amelyben a kérelmező tömören foglalja össze önálló, valamely jól meghatározott tudományos kérdés megoldásával foglalkozó tudományos dolgozataiban megjelent eredményeit, mellékelve magukat a dolgozatokat.” Nyilvánvaló a jelölt által megtekintett MTA-ra korábban benyújtott rövid értekezésekből is, hogy sem a pályázók, sem pedig gondolom a Bírálók számára nem könnyű még ezt a disszertációs formát megszokni, mivel egyelőre nincs még meg ennek a formának a tradíciója. A jelölt mindazonáltal ténylegesen próbált minden szempontot figyelembevéve legjobb tudása szerint eljárni a formátum betartása ügyében.

(2) Az eredmények és jelentőségük folyékony befogadását tovább nehezíti, hogy a doktori műben rendkívül sok helyen fordulnak elő a jelölt publikációinak konkrét elemeire (pl. ábráira)

történő külső hivatkozások. A doktori mű önálló feldolgozhatóságát ez a bemutatási mód erősen hátráltatja. Néhány, önkényesen kiemelt példa: (*i*) a 4. ábrán a kísérletekben effektorként alkalmazott liponsav koncentrációja csak a hivatkozott cikkből derülhet ki; (*ii*) (27. o.) „A Fig. 4 [cikkben] mutatja be azokat az eseteket […] (*sic!*); (*iii*) 8., 15. ábra szövegei: „lásd az ábraaláírást a cikkben".

*Válasz:* A jelölt hivatkozik részben a fentebb tárgyaltakra, ugyanakkor megjegyzi, hogy lehetetlen lett volna betartani a rövid disszertációs formát, ha cikkenként több mint 1-2 reprezentatív ábrát használ a disszertációban. Illetve újfent csak a Doktori Szabályzat megfelelő szekciójára hivatkozik a jelölt (13.o.): "A rövid értekezés és a mellékelt dolgozatok együtt képezik a doktori művet.". A *iii*. kritikai pont tekintetében megjegyzi a jelölt, hogy az említett „lásd az ábraaláírást a cikkben" szövegrész a 8. ábra aláírásában például akkor jelent meg amikor az már így is 10 sort képezett (nyelvi szempontból ismert, hogy a magyar szöveg sokszor hosszabb mint a megfelelő angol verzió), ill. pontosan így hangzott: "Részletes kísérleti körülményekért lásd az ábraaláírást a cikkben.". A 15. ábra aláírásában a 6. sorban íródott és pontosan a következő: "További részletekért lásd az ábraaláírást a cikkben.". Itt ha minden információt átírunk a publikációban szereplő ábraaláírásból akkor az meghaladta volna a disszertáció szövegében használt részletességet és akkor az jelentett volna értelmezési nehézséget az olvasó számára. A jelölt próbált a disszertációban szereplő ábrák aláírásában a legfontosabb információkra hagyatkozni, összhangban a disszertáció szövegének részletességével.

(3) A szerző a kísérletek körülményeit egyes helyeken egy MTA doktori mű jellegétől némileg idegen módon, aprólékos technikai részletességgel ismerteti, kevés értelmezés mellett (pl. a 44. oldalon a hLADH variánsok kristályosítási körülményeit).

*Válasz:* Mindössze a legfontosabb – általában részletes optimalizációk eredményeképpen született – technikai információkat szerette volna megjeleníteni a dolgozatban a jelölt, hogy az olvasónak legyen elképzelése arról, hogy pl. milyen kémiai környezetben sikerült sok év után kikristályosítani végül a hE3 mutánsokat. De egyetért a jelölt a Bírálóval, hogy ezt a szöveg jobb olvashatósága érdekében akár el is lehetett volna hagyni, a jelölt is határesetnek gondolta ezt a tartalmi megjelenítést.

*Kérdések:*

(1) A 4. ábrán bemutatott NADH-fogyási, szuperoxid-képzési illetve H2O2-képzési reakciósebességekből – illetve további, részletesebb kinetikai analízisből – meghatározható az E3 alegység illetve a KGDHk adott enzimreakciókra vonatkozó átviteli száma (pl. s-1 egységben)? Ezen értékek összevető analízise további értékes mechanisztikus információval szolgálhat.

*Válasz:* A 4. ábrán látható analízishez még természetes forrásból származó (sertés szív) enzimeket használtunk. Míg a LADH enzim preparátum meglehetősen tiszta volt (MS alapján), a KGDHk preparátum nagy mennyiségű BSA-t és egyéb fehérje-szennyezőket is tartalmazott (SDS-PAGE alapján). Átviteli számok számítására inkább alkalmasak azok a mérések, amelyek a 2014-es JBC, ill. a 2015-ös FRBM cikkeinkben szerepelnek.

A fiziológiás (*forward* katalitikus irányú) KGDHk reakcióban az E1 alegység által katalizált reakciólépés a sebességmeghatározó. Ez valószínüleg érvényes a *forward*-irányú ROS-képzésre is, mivel megállapítást nyert, hogy azonos körülmények között az izolált hE1k alegység és az intakt hKGDHk összemérhető ROS-képző kapacitással rendelkezik (Ambrus *et al.*, FRBM, 2015). Az izolált hE1k alegységspecifikus kinetikai analízise ($\alpha$-KG+2,6-DCPIP, 600 nm [normál aktivitás mérése külső oxidálószer jelenlétében]) összehasonlításban az *in vitro* összeépített hKGDHk megfelelő adataival (NADH-detektálás, 340 nm) azt mutatta meg, hogy $k_{cat}$=6,7 $s^{-1}$ (normál hE1k aktivitás, pH=7,5; Nemeria[#], Ambrus[#], Patel[#], *et al.*, JBC, 2014, Table 1 alapján; [#]megosztott első szerzők), ill. 0,55 $s^{-1}$ (normál hKGDHk aktivitás, de a hE1k-ra számolva, pH=6,3; Ambrus *et al.*, FRBM, 2015, Fig. S4. alapján). A két esszét nem lehet megfelelően összevetni elsősorban a vizsgált rendszerek számottevő különbsége miatt. Ha a hE1k-specifikus értékhez hasonlítottuk az izolált hE1k szuperoxid-képzését ($\alpha$-KG(+$O_2$) cyt c jelenlétében [a keletkező primer termék, a szuperoxid detektálására, 550 nm]) 0,12%-nyi ($k_{cat}$=0,0076 $s^{-1}$) katalitikus hatékonyságot kaptunk (pH=6,3; Nemeria[#], Ambrus[#], Patel[#], *et al.*, JBC, 2014, Table 1 alapján; [#]megosztott első szerzők; a $H_2O_2$ a szuperoxidból spontán diszmutációval keletkezik, nem enzimatikus folyamatban). Az intakt hKGDHk *forward*-irányú ROS-termelő reakciója esetében $k_{cat}$=0,0106 $s^{-1}$ (hE1k-ra számolva újfent, pH=6,598; Ambrus *et al.*, FRBM, 2015, Fig. 4. alapján; 28% eltérés az izolált hE1k enzimre mért értéktől), amely a normál hKGDHk aktivitáshoz hasonlítva 1,9%-nyi hatékonyság.

A *reverz* katalitikus irányú ROS-képző hKGDHk reakcióban 0,07 $s^{-1}$ az átviteli szám (az E3 alegységre számolva, pH=6,598; Ambrus *et al.*, FRBM, 2015, Fig. 4 alapján). Ezt nem tudjuk összevetni a *reverz*-irányú normál hKGDHk reakcióval, mert a normál hKGDHk reakció irreverzibilis. A megfelelő *forward*-irányú értékkel összevetve ~7-szeres faktort kapunk, amely szintén jól mutatja, hogy a *reverz* katalitikus irányú ROS-képzés sokkal hatékonyabb mint a megfelelő *forward* irányú folyamat. Az izolált hE3 esetében a *reverz*-irányú ROS-képzési reakcióban átviteli számra 0,19 $s^{-1}$ értéket kaptunk (pH=6,3; Ambrus *et al.*, HMG, 2011, Fig. 2 alapján). A megfelelő *reverz*-irányú LADH reakcióban a $k_{cat}$=279,4 $s^{-1}$ (pH=7,3; Ambrus *et al.* HMG, 2011, Fig. 1B alapján), amely azt mutatja, hogy a megfelelő ROS-képzési kapacitás ennek az aktivitásnak a 0,07%-a.

A fenti eredmények egyrészt azt mutatják, hogy az egyes alegységek más hatékonysággal működnek amikor a hKGDHk részei, másrészről pedig megállapítható, hogy a ROS-képzési potenciál a normál szubsztrátokkal végbemenő megfelelő reakciók hatékonyságánál nagyságrendekkel alacsonyabb (a többször eltérő pH értékek pedig nem okoznak nagyságrendi különbségeket). A szuperoxid-anion és a belőle későbbiekben képződő reaktív termékek (pl. $H_2O_2$, hidroxil-gyök, peroxinitrit, stb.) reaktivitását, a (kismolekulás és enzimatikus antioxidáns rendszerek által) nem teljesen ellensúlyozott ROS-termelés esetenkénti krónikus jelenlétét és a specifikus esetekben különösen számottevően megemelkedett ROS-képzési potenciált (pl. acidózis, bizonyos patogén mutánsok esetében) is figyelembe véve a hKGDHk, a hE3 és patogén mutánsaik ROS-képzése patológiás jelentőségű lehet még a kimutatott relatíve csekély katalitikus hatékonyság ellenére is.

(2) (19. o.) „[…] a hLADH ROS-képzésére pH-függő módon szelektív gátlószereket kezdünk el fejleszteni […]. Ezekkel a gyógyszerjelölt molekulákkal az LS-nél nagyobb hatékonyságot próbálunk majd elérni, bár az egyik molekuláris kiindulópont maga az LS lesz." A hivatkozott molekulák valóban elérték a „gyógyszerjelölt" státusz farmakológiai kritériumait? Milyen megfontolások alapján gondolják azt, hogy a liponsavnál nagyobb potenciájú effektor molekulák fejleszthetők?

*Válasz:* Hivatkozva majd szintén a Dr. Gál Péter Bíráló Úrnak részletesen megírt 8. válaszra (a kérdés ez volt: "Kérem a jelöltet, hogy fejtse ki bővebben a gyógyszerfejlesztési koncepcióját, és azt, hogy eddig milyen eredményeket értek el."), amelyet a védésen természetesen részletesen ismertet majd a jelölt, meg kell jegyeznie a jelöltnek, hogy az ebben a kérdésben említett munkák (a ROS-termelés elleni inhibítorok fejlesztése) még csak koncepció szintjén léteznek és megvalósításuk középtávú cél. Ez főleg azért van így, mert a gyógyszerfejlesztési projektjeinkben együttműködő partnerünk, a Cyclica, Inc. (Toronto, Kanada) nagyobb kezdeti érdeklődést tanúsított az adaptor-molekula fejlesztési ötletünk iránt (olyan molekulák fejlesztése, amelyek potenciálisan visszakapcsolhatják a disszociáló patogén hE3 mutánsokat a megfelelő komplexekre).

Amikor ez a (ROS-képzés elleni inhibitor-fejlesztési) projekt beindul – és a többi jövőbeli kismolekulás gyógyszerfejlesztési projektünkben is – természetesen nagy figyelemmel és körültekintéssel szelektáljuk majd (iteratív módon) a gyógyszerjelölt molekulákat. Ennek keretében természetesen elsőrendű szempont lesz a farmakológiai kritériumok (pl. a Lipinski-szabályok) betartása. Szerencsére a Cyclica cégnek nálunk nagyobb tapasztalata van gyógyszerfejlesztési projektekben és segítségünkre lesznek ezügyben is.

A második alkérdésre reflektálva, nem tudjuk, hogy képesek leszünk-e a liponsavnál nagyobb potenciájú effektor molekulák kifejlesztésére az E3 ROS-termelésének gátlása szempontjából. Mindazonáltal ezt mindenképpen szeretnénk megcélozni, hiszen ROS-képzés elleni inhibitor-fejlesztési motivációinkat nem szeretnénk könnyen feladni, ill. maga a liponsav csak relatíve nagy koncentrációban hatékony ilyen tekintetben (pl. a KGDHk *forward*-irányú ROS-képzését ~70%-ban csak 2 mM-os koncentrációban tudta gátolni, *in vitro*; Ambrus[#], Tretter[#], *et al.* JNC, 2009, Fig. 2F; [#]megosztott első szerzők). Mivel a liponsav valamennyire hatékony tehát ebből a szempontból, elképzelhető a jelölt szerint, hogy az irodalomban leírt számos liponsav-derivatívum közül lesz amelyik esetleg még hatékonyabb is lesz nála, ill. szerkezeti információk birtokában fejleszthető is lesz esetleg potensebb liponsav-származék vagy más alapvázú molekula.

(3) A 20. oldalon bemutatott kísérletekben a KGDHk forward irányú ROS-képzését liponsavkoncentráció függvényében vizsgálták. Hogyan függ ez az aktivitás a szubsztrátok (O2, DHLA) koncentrációjától?

*Válasz:* Ezekben a kísérletekben csak a kísérleti médiumban természetes módon oldott $O_2$ koncentrációján (~250 μM) dolgoztunk. Az elektron-donor szubsztrát az alfa-ketoglutarát volt, amely esetében telítési koncentrációt állítottunk be (1 mM) és azt sem változtattuk. Mindezeket azért tettük, mert ebben a kísérletsorozatban kifejezetten csak a pH, a liponsav és a $NAD^+$ hatásait akartuk vizsgálni. A levegővel érintkező küvettában lévő oldatok esetében egyébként

magasabb az oldott $O_2$ koncentráció (amely az esetleges folyamatos kevertetés miatt még fenntartott is általában) mint *in vivo* körülmények között (pl. a mitokondriális mátrixban). Mivel magasabb $O_2$ koncentrációnál természetesen intenzívebb a ROS-képzés is, ill. ez minden ROS-képző helyre hasonlóan hat, így szisztematikusan magasabb ROS-képzést mérünk küvettában minden ROS-képző hely tekintetében (pl. a mitokondriumban). Ez méréstechnikailag hasznos is lehet egyébként, mert érzékenyebben lehet adott esetben kimérni a ROS-képzésbeli különbségeket. A fenti kísérleteket ha oxigráfos $O_2$-fogyasztási méréssel kombináltuk volna akkor meg lehetett volna állapítani, hogy az éppen aktuális $O_2$-koncentráció mellett hogyan alakul a ROS-képzés sebessége. Ez mindenképpen érdekes jövőbeli kísérlet lesz a számunkra és ezért is köszönjük ezt az észrevételt/kérdést.

(4) (34. o.) „[…] a szabadgyök/ROS-képzésnek szerepet tulajdonítottak már – a direkt patológiás hatásain felül […] – a fenti [PDHk, KGDHk] enzimkomplexek önregulációjában […], szignál transzdukcióban […] is." – Az említettek a dehidrogenáz komplexek aktivitásának rendkívül izgalmas vonatkozásai, aminek bővebb kifejtését kérem. A jelöltnek szándékában áll jövőbeli kutatásait e témák felé irányítani?

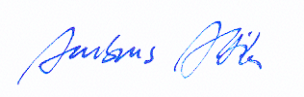
<u>*Válasz:*</u> A KGDHk(/PDHk) belső gyökös mechanizmussal történő irreverzibilis önregulációt kimutatták az E1 alegységen keresztül, amelyben a liponsav-kofaktornak van elsődleges szerepe, tiil-gyök képzésén keresztül. A mechanizmus bizonyítására szolgált, hogy a szuperoxid-diszmutáz (SOD) nem gátolta meg az enzim inaktivációját, az ismert tiil-gyök-eliminálló tioredoxin viszont sikeresen felfüggesztette azt (Bunik és Sievers, Eur. J. Biochem, 2002). A tiil-gyök azáltal indukálja a komplex(ek) gátlását, hogy az alfa-ketoglutarát(/ketosav)-dehidrogenáz (E1) reakció katalitikus köztitermékének – az alfa-ketoglutarát(/ketosav)-ThDP adduktnak – egyelektronos oxidációját képes hatékonyan előmozdítani. Ennek az oxidációnak a terméke - az alfa-ketoglutarát(/ketosav) gyökös fragmentuma - fogja az E1 alegységet közvetlenül inaktiválni azáltal, hogy egy szén-központú gyökös fragmentumot hoz létre az E1 aktív centrumában. Olyan körülmények között amikor kevesebb $NAD^+$ (mint végső elektron-akceptor) van jelen, magasabb a tiil-gyökök steady-state koncentrációja és így nagyobb mértékű a komplexek saját-gátlása is. Telítési $NAD^+$-koncentráció (ill. a tioredoxin jelenléte, lásd fent) megóvja a komplexeket a saját-gátlástól. A saját-gátlás biológiai jelentősége az lehet, hogy az alacsonyabb $NAD^+$-koncentráció mellett felerősödő ROS-képzéstől (aerob-körülmények között) óvja meg (legalább részben) a mitokondriumot/sejtet. Ez a mechanizmus így egyfajta "belülről-kódolt" indirekt prooxidáns-kontroll hatásként is felfogható; elképzelhető, hogy enélkül a mechanizmus nélkül sokkal nagyobb hatékonysággal termelne ROS-t a KGDHk/PDHk. Mivel a $NAD^+$/NADH-arány ill. abszolút koncentráció ily módon érintett, ez a mechanizmus a mitokondrium/sejt redox-státuszával is közvetlenül összefügg.

Érdekes szintén megjegyezni, hogy a liponsav-kofaktor $H_2O_2$-mediált reverzibilis glutationilációja – amely a KGDHk reverzibilis inaktivációjával jár – egy antioxidáns válasznak bizonyult, amely megvédi oxidatív stresszben a KGDHk-t az oxidatív károsodásoktól (pl. a 4-hidroxi-2-nonenáltól, amely a fő lipid-peroxidációs származék és egy nagyon reaktív molekula).

Az emelkedett ROS-szint transzkripciós, ill. poszt-transzkripciós változásokon keresztül modulálhatja a sejt szignalizációját (Gibson *et al*., BBA, 2010). Ilyen értelemben a reaktív oxigénszármazékok egyfajta szignálmolekulák is lehetnek. A $H_2O_2$-t az irodalom a fő "hírvivő" molekulák között említi. A mitokondriumot pedig egy központi ROS-visszacsatolási csomópontnak is tekintik a celluláris ROS-szignalizációs hálózatban, mivel nem csak forrása, de elnyelő helye is a ROS-oknak (a ROS-eliminálló rendszerei által). A mitokondrium "érzékeli" a sejten belüli metabolikus szükségleteket, a tápanyag-ellátottságot, a saját koncentrációját (ezekhez mérten), ill. szerkezeti és funkcionális integritását, és a külső ROS-"nyomást" (koncentrációt). Ezekkel az információkkal összhangban "küld visszafelé jelet" a sejtnek (benne a ROS/$H_2O_2$-érzékelő helyeknek) a $H_2O_2$ *steady-state* koncentrációján keresztül, amelyet a saját ROS-termelése és ROS-eliminálló képessége alapján állít be; a saját ROS-termelés mértéke nagyban összefügg az éppen aktuális metabolikus/redox státusszal (Starkov, Ann N Y Acad Sci, 2008). $H_2O_2$ által regulált transzkripciós faktorokra példa az AP-1, NRF2, CREB, HSF1, HIF-1, TP53, NF-κB, NOTCH, SP1 és SCREB-1 (Marinho *et al.*, Redox Biol., 2014). Mivel a KGDHk-t tekintik az egyik legmeghatározóbb (ha nem a legfőbb) ROS-termelő helynek a mitokondriumban (amely ráadásul érzékeny is az oxidatív/ROS-hatásokra), a KGDHk hatékony és érzékeny modulálója és mindenképpen része a fent említett folyamatoknak.

Szándékunkban áll elsősorban az önreguláció belső molekuláris mechanizmusát tovább vizsgálni a jövőben, amikor elegendő szerkezeti adat áll majd rendelkezésünkre az adott komplexekről.

Tisztelettel:



Dr. Ambrus Attila
*egyetemi docens*

Budapest, 2022. április 7.