Bírálói vélemény

Ambrus Attila: „A lipoamid-dehidrogenáz és az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz komplex molekuláris patológiája”

című MTA doktori értekezéséről

Ambrus Attila MTA doktori értekezésében a humán (dihidro)lipoamid/lipipoil-dehidrogenáz enzimmel (LADH), és az ezt az enzimet tartalmazó enzimkomplexekkel, elsősorban az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz komplex-szel (KGDHk) foglakozik. Az LADH illetve az LADH tartalmú enzimkomplexek kulcsszerepet töltenek be a metabolizmusban, ezért az LADH elégtelensége/deficienciája egy ritka de súlyos autoszómális recesszív öröklődésű genetikai kórkép. Az LADH-t tartalmazó piruvát dehidrogenáz komplex szolgáltatja az acetil-KoA-t a citrát ciklus számára, ezért alulműködése a piruvát felhalmozódásához, laktát képződéshez, acidózishoz vezet. A KGDHk a citrát ciklus egy sebességmeghatározó lépésében játszik meghatározó szerepet, ezért funkcióvesztése általános energiadeficit kialakulásához, komplex anyagcserezavarok megjelenéséhez vezet. Ezeknek a betegségeknek a kezelése ma még távoltól sem megoldott, ezért a jelölt által választott téma az alapvető biokémiai jelentőségén és érdekességén kívül, gyógyászati szempontból is rendkívül fontos. Ahhoz, hogy gyógyszereket tudjunk fejleszteni, ismernünk kell a vad típusú enzimek, enzimkomplexek szerkezetét és működését, valamint azt, hogy az eddig leírt mutációk milyen zavarokat okoznak a fehérjék és a fehérjekomplexek szerkezetében és a multienzim komplexek működési mechanizmusában. Ambrus Attila dolgozatában erre tesz kísérletet: rekombináns formában előállította az enzimkomplex izolált alegységeit, rekonstituálta a KGDH komplexet, előállította a hLADH mind a 14 patogén variánsát, és ezeket részletes biokémiai, és fehérjeszerkezeti jellemzésnek vetett alá a ma rendelkezésre álló legmodernebb technikákat alkalmazva. Különös hangsúlyt fordított az enzimek és enzim komplexek ROS-képző aktivitásának tanulmányozására, mivel a ROS-képzés alapvetően hozzájárulhat a molekuláris patomechanizmusokhoz. Véleményem szerint Ambrus Attila munkája értékes felfedezésekkel járult hozzá az LADH és a KGDHk szerkezetének és működésének jobb megismeréséhez, valamint az orvosi szempontból fontos molekuláris patomechanizmusok feltáráshoz.

Jelölt eredményeit „rövid értekezés” formájában ismerteti. A 68 oldal terjedelmű értekezés egy irodalmi bevezetésből (5.-13. oldal), 5 pontban megjelölt célkitűzésekből (14. oldal), néhány alkalmazott módszer rövid ismertetéséből (15.-16. oldal), és a dolgozat alapjául szolgáló 7 publikációban szereplő eredmények tárgyalásából áll (17.-55. oldal). Az új tudományos eredményeket 7 pontban foglalja össze az értekezés végén. A dolgozatot egy 193 referenciát felvonultató irodalomjegyzék zárja.

A dolgozatban csak nagyon tömören ismerteti jelölt a kutatási eredményei lényegét, a részletesebb leírásokért a publikációkhoz kell fordulni. Jelölt a dolgozatban tárgyalt mind a hét publikáció létrehozásában meghatározó szerepet játszott, részt vett a kutatási koncepció

kialakításában, a munka irányításában, a cikkek megírásában, és sokszor a laboratóriumi munkában is. A munka egy része nemzetközi kollaborációban, külföldi helyszíneken készült. Jelölt tudományos felkészültségét és jó szervezőképességét bizonyítja, hogy eredményesen irányította és hangolta össze az egyszerre több helyszínen folyó tevékenységet. A dolgozatban ismertetett eredményekből jelölt témavezetésével két PhD dolgozat is született. A dolgozatot alaposan áttanulmányozva nem maradt kétségem afelől, hogy jelölt a tudományterület nemzetközileg elismert szakértője, aki önálló munkája révén jelentősen hozzájárult ismereteink gyarapításához. A dolgozat ezenkívül több érdekes, további kutatásra érdemes kérdést is felevet.

A jelölt által a dolgozat végén összefoglalt hét tudományos eredményt új tudományos eredménynek fogadom el. Ezek röviden a következők:

1.) Az exogén liponsav acidózisban gátolja a KGDHk és az LADH reverz katalitikus irányú ROS képzését.

2.) Előállították mind a 14 ismert betegség-hordozó hLADH variánst rekombináns módon nagytisztaságú formában. Jellemezték a variánsok enzimaktivitását és ROS-képző kapacitását. Kimutatták, hogy a hLADH négy betegséget okozó mutációja fokozza a reverz katalitikus irányú ROS-képzést és annak pH-érzékenységét.

3.) A forward katalitikus irányú ROS-termelő képesség tekintetében a hKGDHk E1 komponense, illetve E1-E2 alkomplexe összemérhető a teljes hKGDHk-vel. A csökkent kötődési képességű patogén hLADH mutánsok esetében a hKGDHk-E1-E2 alkomplex általi forward katalitikus irányú ROS-képzés jelentősen hozzájárulhat a patomechanizmusokhoz és a klinikai tünetek kialakulásához.

4.) Krio-EM, CL-MS és molekulamodellezés technikák együttes alkalmazásával meghatározták a hKGDHk E2 komponensének szerkezetét.

5.) Meghatározták a hKGDHk alegység-sztöchiometriáját, amely 24:24:12-nek adódott. Javaslatot tettek a teljes multienzim komplex szerkezeti topológiájára.

6.) Tíz betegséget okozó hLADH variánsra vonatkozóan meghatározták a peptid szintű molekulaszerkezeti/dinamikai változásokat oldatban, 25 °C-on, hidrogén/deutérium-csere tömegspektrometriával és javaslatot tettek a vonatkozó molekuláris patomechanizmusokra.

7.) Hét betegséget okozó hLADH variánsnak és a vad típusú hLADH-nak meghatározták a nagyfelbontású kristályszerkezetét, illetve a hidrogén/deutérium kicserélődési adatokat is figyelembe véve, a vonatkozó molekuláris patomechanizmusokra is javaslatot tettek.

Az értekezéssel kapcsolatos megjegyzéseim illetve kérdéseim a következők:

1.) Az „Alkalmazott módszerek” fejezetben meglehetősen szerencsétlen megfogalmazásnak tartom a következő mondatot: „A periplazmatikus rendszer elméletileg funkcionálisan jobb minőségű fehérjét szolgáltat, míg a citoszólikus rendszer lényegesen nagyobb mennyiségben termeli a fehérjéket, amely pedig szerkezetvizsgálati céljaink miatt vált mindenképpen szükségessé (NMR, kristályosítási próbák)”. A szerkezetvizsgálat során nyilván nem lehet a nagyobb mennyiség miatt funkcionálisan rosszabb minőségű fehérjével dolgozni. A szerkezetvizsgálathoz nagy mennyiségű, funkcionálisan teljesen aktív fehérjére van szükség. Összehasonlították-e a periplazmatikus rendszerből nyert rekombináns enzimpreparátumok specifikus aktivitását a citoszólikus rendszerből nyert preparátumok specifikus aktivitásával? Jelölt azt is megemlíti, hogy még egy refolding eljárást is kidolgoztak az inklúziós testekbe jutott rekombináns fehérjék renaturálására. Ez a módszer milyen minőségű fehérjepreparátumot szolgáltatott, és használták-e valamelyik fehérje szerkezetvizsgálata során?

2.) A dolgozatban olvashatjuk, hogy a különböző patogén mutánsok esetében a hLADH enzimaktivitás csökkenésének mértékéből nem jelezhető jól előre a betegség lefolyásának súlyossága. Nyilvánvaló, hogy egyéb tényezőket is figyelembe kell venni. Ilyen tényező lehet, hogy a mutáns hLADH csökkent affinitással kötődik a komplexekhez. Elképzelhető-e olyan eset, hogy a mutáns nagy affinitással kötődik a komplexhez, viszont improduktív módon (pl. nem megfelelő térbeli orientációban), vagy pedig sérül a komplex sztöchiometriája?

3.) Jelölt azt is kimutatta, hogy az izolált LADH képes ROS-t termelni a komplexektől függetlenül is, és felveti, hogy ennek a ROS képzésnek a gátlása terápiás szempontból hasznos lehet. Van-e arra valami adat vagy becslés, hogy patológiás állapotokban milyen mennyiségben van jelen szabad LADH és ez az összes ROS képződés mekkora hányadáért felelős?

4.) A G194C hLADH mutánssal kapcsolatban azt olvashatjuk a dolgozatban (26. oldal), hogy részleges (kb. 30%) FAD vesztés mellett fokozott ROS képzés jellemzi. Ez némileg ellentmondás, mivel az LADH ROS képzése közvetlenül a FAD-on keresztül valósul meg. Jelölt szerint elképzelhető, hogy a mutáció a FAD reakcióképességének növelése által akár túl is kompenzálhatja a FAD veszteség mennyiségi hatását. Ehhez képest meglepő, hogy az irodalom leír egy G194C homozigóta beteget, aki a terápiás célú FAD pótlásra jól reagált. Hogyan oldhatók fel ezek az ellentmondások?

5.) Jelölt CD spektroszkópiával is vizsgálta a hLADH és patogén mutánsainak szerkezetét. A távoli UV fényben felvett CD spektrum a fehérje másodlagos szerkezeti elemeiről (pl. α-hélix, β-lemez), ezek arányairól szolgáltat információt. A CD spektrumok felvétele semleges pH-n (pH=7,3) történt. Érdekes lett volna megnézni a CD spektrumok pH függését, különös tekintettel arra, hogy patológiás szituációkban a pH savas irányba tolódik el.

6.) A dolgozat egyik fontos eredménye, hogy sikerült az LADH tartalmú enzim komplexeket rekombináns alegységekből összeépíteni. Mivel rendelkezésre állnak a mutáns hLADH fehérjék is tisztított formában, nem lehetne valamilyen módszerrel legalább közelítő pontossággal megmérni a különböző hLADH mutánsok kötődésének erősségét a komplexekhez?

7.) A hidrogén/deutérium kicserélődési kísérletek kiértékelésével kapcsolatban a dolgozatban azt olvashatjuk, hogy a deutérium beépülés tekintetében egyik mutáns esetében sem volt markáns változás a dimerizációs doménben a vad típushoz képest. A 9. ábrán viszont az látható, hogy az E340K, I445M, R447G és a P453L mutánsok esetében a dimerizációs domén C-terminálisában, míg a D444V és I358T mutánsok esetében a domén egész hosszában detektálhatók változások. Ezek a változások nem befolyásolják az LADH dimerizációját?

8.) A célkitűzések között szerepel (5. pont), hogy a jelölt gyógyszermolekulákat fog tervezni, a hLADH elégtelenség, illetve a hKGDHk/hLADH ROS képzésével kapcsolatos betegségek kezelésére. Az eredmények ezt egyáltalán nem tárgyalják, mindössze arra történik utalás a dolgozatban, hogy a liponsav jó kiindulási molekula lehet ilyen fejlesztéseknél. Kérem a jelöltet, hogy fejtse ki bővebben a gyógyszerfejlesztési koncepcióját, és azt, hogy eddig milyen eredményeket értek el.

A fenti észrevételek a dolgozat lényegi részét nem érintik.

Összefoglalva, Ambrus Attila doktori dolgozatában bemutatott munka jelentős mértékben járult hozzá a tudományterület fejlődéséhez. Jelölt tudományos teljesítménye megfelel az MTA doktori fokozathoz elvárt követelményeknek, ezért **javaslom a nyilvános vita kitűzését és az MTA doktori cím odaítélését.**

2022. január 20.

Gál Péter
tudományos tanácsadó
az MTA doktora