EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOKÉMIAI TANSZÉK

Bírálói vélemény

Ambrus Attila
"A lipoamid-dehidrogenáz és az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz komplex molekuláris patológiája"
című MTA doktori értekezéséről

A humán (dihidro)lipoamid-dehidrogenáz (hLADH) számos létfontosságú dehidrogenáz komplex közös alegysége (E3), amelynek mutációs eredetű funkcióváltozásai általában súlyos lefolyású kórképekhez vezetnek. A betegségek hátterében álló aminosavszekvencia-változások többféle molekuláris mechanizmus révén is befolyásolhatják a hLADH élettani működését: a LADH aktivitás változása mellett a reaktív oxigénszármazék (ROS)-képző aktivitás növekedése, valamint a dimerizációt illetve magasabb szintű komplexképzést meghatározó fehérje-fehérje kölcsönhatásokban illetve a FAD prosztetikus csoport kötésében bekövetkező változások is hozzájárulhatnak a sejtes működészavarokhoz. A molekulaszerkezeti ismeretek hiánya azonban nagyban hátráltatja e molekuláris patomechanizmusok felderítését. Ambrus Attila és kollégái jól tervezett munkájukkal, kitartó erőfeszítéseikkel e területhez tettek jelentős hozzájárulásokat.

A doktori műnek a jelölt által új eredményként ismertetett tézispontjait elfogadom; ezek az olvasatomban a következők:

1. Kimutatták, hogy a liponsav savas körülmények között gátolja az α-ketoglutarát-dehidrogenáz komplex (KGDHk) által katalizált ROS-képzést (Ambrus *et al.* (2009) *J. Neurochem.* 109:222). E felfedezés hozzájárulhat jövőbeli ROS-képzés gátlószerek fejlesztéséhez.

2. Ismert betegségokozó hLADH variánsok rekombináns formában történt előállítása, és a tisztított fehérjék vizsgálata révén kimutatták, hogy egyes hLADH variánsok megemelkedett ROS-képző aktivitást mutatnak, ami a patomechanizmus fontos eleme lehet (Ambrus *et al.* (2011) *Hum. Mol. Genet.* 20:2984).

3. Kimutatták, hogy a hLADH (E3) aktivitás mellett – csökkent komplexképző képességű E3 variánsok esetében – a KGDHk E1-E2 alkomplexének ún. *forward* irányú ROS-képzése is hozzájárulhat a patomechanizmushoz (Ambrus *et al.* (2015) *Free Radic. Biol. Med.* 89:642).

4. Röntgenkrisztallográfia segítségével meghatározták számos betegségokozó hLADH variáns nagy felbontású szerkezetét (Szabó *et al.* (2018) *Free Radic. Biol. Med.* 124:214 (a jelölt utolsó szerző); Szabó *et al.* (2019) *Hum. Mol. Genet.* 28:3339 (a jelölt utolsó szerző)), és az aminosavszekvencia-változások által kiváltott szerkezeti-dinamikai változásokról hidrogén-deutérium kicserélődés-

Címünk: 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/c
Telefon: (1) 372-2500/8401
Telefax: (1) 381-2172
Email: kovacsm@elte.hu

tömegspektrometriás (HDX-MS) technikával is szereztek információt (Ambrus *et al.* (2016) *Biochem. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* 1862:2098).

5. A hKGDHk DHLA szukcinil transzferáz (E2) komponensének szerkezetvizsgálatában is áttörést értek el krio-elektronmikroszkópia, keresztkötéses tömegspektrometria illetve molekuladinamikai szimulációk integrált alkalmazásával (Nagy *et al.* (2021) *Biochem. Biophys. Acta – Gen. Subj.* 1865:129889 (a jelölt utolsó szerző)).

A doktori mű rövid értekezés formájában, elbírálásra alkalmas állapotban került benyújtásra. A fent felsorolt tézisek hét publikációban közölt munkán alapszanak. A cikkek közül a jelölt négyben első, háromban pedig utolsó szerző.

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.
(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”.
(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).

Másrészről viszont dicséretesnek tartom, hogy a szerző az egyes fejezetek végén precízen ismerteti saját és kollégái hozzájárulását az egyes munkákhoz.

Kérem, hogy a jelölt válaszoljon a dolgozattal kapcsolatban felmerült alábbi kérdésekre:

(1) A 4. ábrán bemutatott NADH-fogyási, szuperoxid-képzési illetve H_2O_2-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.
(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?
(3) A 20. oldalon bemutatott kísérletekben a KGDHk *forward* irányú ROS-képzését liponsav-koncentráció függvényében vizsgálták. Hogyan függ ez az aktivitás a szubsztrátok (O_2, DHLA) koncentrációjától?
(4) (34. o.) „[…] a szabadgyök/ROS-képzésnek szerepet tulajdonítottak mér – 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?

A doktori mű hiteles adatokat tartalmaz. A művet nyilvános vitára alkalmasnak találom. A doktori munka eredményeit elegendőnek tartom az MTA Doktora cím megszerzéséhez, és a nyilvános védés kitűzését javaslom.

Budapest, 2022.02.09.

Kovács Mihály
az MTA doktora

Címünk: 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/c
Telefon: (1) 372-2500/8401
Telefax: (1) 381-2172
Email: kovacsm@elte.hu