

B Í R Á L A T

Nagy Péter: Oxidatív stressz és redoxijelátvitel című akadémiai doktori értekezéséről

Az oxidatív stressz egyike azon jelenségeknek, melyeknek súlyos egészségkárosító következményei vannak, és megelőzéséhez, az okozott betegségek megszüntetéséhez mélyreható molekuláris, sőt, szubmolekuláris ismeretekre van szükség, amelyekkel azonban az emberiség egyelőre sajnálatosan szerény mértékben rendelkezik. Ezért – már az értekezés részletes értékelése előtt – leszögezhető, hogy Nagy Péter értekezésének témája messzemenően időszerű, az a tény pedig, hogy döntően alapkutatás-jellegű munkáját az Országos Onkológiai Intézetben – azaz egy alapvetően betegellátásra, gyakorlati gyógyításra szakosodott intézményben – végzi, mutatja a témakör mások által is elismert hasznosítási potenciálját, és mint ilyen, rendkívül dicséretes.

Az értekezés három jelentős biológiai redoxi rendszer (a tirozin és a kapcsolódó szabadgyökök, a cisztein-típusú tiolok és oxidált származékaik, valamint a szulfidion és származékai) tanulmányozásában elért, 35 eredeti közleményben és 3 könyvfejezetben közzé tett eredményeket foglal össze..

Az értekezéssel kapcsolatban felmerülő konkrét kérdések, észrevételek a következők:

- 1) A Bevezetésben a ROS-ok elsődleges biológiai célpontjaiként a kéntartalmú aminosavakat (a ciszteint és a metionint) említi, részletesebben a ciszteinről ír. A metionin reakcióképességét valóban nagyban csökkenti, hogy kénatomja tioéter kötésben van, de – egyrészt – így is vannak fontos biológiai funkciói, másrészt – igaz, nem a 20 klasszikus α aminosav körében – léteznek egyéb fontos kéntartalmú aminosavak (pl. homocisztein, penicillamin) és további tiolok (pl. ciszteamin, koenzim A, stb.) melyek szintén jelentősek a szervezet redoxi átalakulásaiban.
- 2) Az 5. oldal 4.1 fejezet elején található az a kifejezés, hogy "szuperoxid »szivárog« a mitokondriális térbe". Mit lehet tudni a különböző, nagy reakcióképességű oxigén származékok membrán permeabilitásáról? Ismert-e membrántranszportere ezeknek a részecskéknek?
- 3) Érdeklődő kérdés az 5. oldalon olvasható irodalmi adattal kapcsolatban: hogyan képződik szuperoxid a glutation autooxidációjában?
- 4) Az (1). reakcióban (6. oldal) feltüntetett ditirozin képződésben a) miért R csoportot tüntet fel a karboxil hidroxilja helyett (hiszen a ditirozint néven is nevezi), és b) ismert-e a reakció mechanizmusa, tekintettel arra, hogy a reaktánsban a reakcióképességet okozó párosítatlan elektron a fenoxil szabadgyök oxigénjéhez tartozik, a termékben azonban két szénatom közt alakult ki az új kötés?
- 5) A tirozin-hidroperoxid származékok képződésével és bomlásával foglalkozó, az N-terminális és nem N-terminális tirozint tartalmazó peptidek reaktivitás-különbségét értelmező fejezetben (11. oldal) szó esik – többek közt – egyrészt az aminocsoport fenolgyűrűhöz történő konjugált addíciójáról, másrészt az N-terminális tirozinok protonált aminocsoportjának H-hidakon keresztül történő szuperoxid-elektrofilítást befolyásoló (intermolekuláris) hatásáról. Itt több kérdés is felvetődik:

- a) A reakció mechanizmus eldöntésében az aminocsoport konjugált addíciójában keletkező, új kovalens kötésekkel rendelkező, a 3. ábrán is látható biciklusos termékek koncentrációja igen informatív lehet. Mit mutatnak ezek az értékek?
- b) Nem gondoltak-e arra, hogy a bomlási sebesség-különbségek oka – legalább részben – az, hogy az amino csoport (mely csak az N-terminális tirozinú származékok esetén lehet protonált) ezen protonáltság következtében fokozott elektron-szívó hatást gyakorol a molekula összes többi részére, mely így – intramolekuláris mechanizmussal – növeli az összes kötés bomlékonyságát.
- 6) A „hipohalogéneket termelő” megfogalmazás (19. oldal) helyesen vagy hipohalogénesavakat vagy hipohalogeniteket termelő.
- 7) A 23. oldalon olvasható „(redukált metionint tartalmazó Met-Enk hiányában)” helyesen úgy szól, hogy „természetes állapotú” vagy „oxidálatlan Met-Enk hiányában”.
- 8) A 25. oldalon említi, hogy az ábrás cet mioglobinjának ditirozin-típusú dimerizációja végbemehet két Tyr 151 vagy egy Tyr 151 és egy Tyr 103 között. Két Tyr 103 között valóban nem mehet-e végbe, és ha így van, tudjuk-e az okát, hogy ezen a módon miért nem dimerizálódhat?
- 9) A cisztein típusú biológiai tiolok kén atomjának oxidációs állapotait bemutató 37. ábra igen hasznos áttekintést ad, a tioszulfát észter, különösen a táblázatban feltüntetett szimmetrikus molekula részeként benne lévő kén atomokat eltérő, +3 ill. -1 oxidációs számmal feltüntetve rámutat az egyébként sok szempontból nagyon hasznos oxidációs szám használatának formalizmusára. Itt két teljesen azonos környezetben lévő kénatom eltérő oxidációs számmal szerepel. Nem lenne-e helyesebb itt rezonancia-szerkezeteket feltüntetni?
- 10) A 46. oldalon azt olvashatjuk: „... azt, hogy valójában melyik redox reakció fog lejátszódni – az irodalomban sokáig uralkodó dogma ellenére ^{70,71} – nem a redoxipotenciálok viszonya szabja meg, hanem az egyes reakciók egymáshoz viszonyított sebessége.” Ehhez a megállapításhoz feltétlenül hozzá kell fűzni, hogy a reakció végbemenetelének elengedhetetlen feltétele, hogy a reakcióhoz tartozó Gibbs-féle szabadentalpia (ΔG , angol irodalomban Gibbs free energy) értéke negatív legyen, ami a redoxi potenciálok függvénye. Amennyiben ez több, hasonló reakcióra is fennáll, és egyik lehetséges reakciónak sincs kinetikai vagy molekulaszervezeti gátja, továbbá, ha a reaktánsok egyike (pl. az oxidálószer) mennyisége limitált (= limitáló reaktáns) akkor lép elő kontrolláló tényezőként a reakciósebesség. Ha azonban a lassúbb reakció termékeinek keletkezése termodinamikailag előnyösebb állapotot jelent – és a gyorsabb reakció termékei valamely egyéb, gyors reakcióban időközben nem fogytak el – akkor idővel túlsúlyba kerülnek a lassúbb reakció termodinamikailag stabilabb termékei.
- 11) A 6. séma a „Redukált glutation makroszkópikus (A) és mikroszkópikus (B) részecskeeloszlása” címet viseli. Ez azonban nem részecskeeloszlási, hanem deprotonálódási séma.
- 12) A cisztein tiolok reaktivitásának és pKa értéküknek az összefüggéséről azt írja, hogy „... ez alatt, pH=7-en a pKa csökkenése nem jár a reaktívabb tiolát forma koncentrációjának növekedésével”, ezért a pKa csökkenése pH 7 alatt már nem növeli a reaktivitást. Mivel $K_a = \frac{[RS^-][H^+]}{[RSH]}$, amiből $[RS^-][RSH]^{-1} = K_a [H^+]^{-1}$, az $[RS^-]/[RSH]$ koncentráció-

arány láthatóan annál nagyobb, minél magasabb a pH, anélkül, hogy a pH=7 semlegességi állapotnak bármilyen kitüntetett szerepe lenne. (Más közegben, ahol a semlegességet nem pH=7 jelenti, szintén nincs ilyen kitüntetett érték). Az gyakori, de nem törvényszerű eset, hogy tiolok nagy része semleges pH-n valóban nagy hányadban tiol (tehát nem tiolát) állapotban van. Fontos megjegyzendő, hogy ez a megállapítás éppen a tioredoxinra és más diszulfid-redukáló enzimekre (amellett a több nagy elektronegativitású atommal körülvett kismolekulás tiolokra, pl. az ovotiolra) nem igaz.

A reaktivitás azonban a tiolok pKa értékével valóban összefügg, egy közvetlen és egy közvetett kapcsolatban, az alábbi, kettős módon: A viszonylag alacsony pKa azt jelenti, hogy a tiol csoport viszonylag széles pH tartományában van tiolát állapotban, ami a tiolénál nagyobb nukleofilitású tiolát nagyobb hozzáférhetőségét, ezzel nagyobb reaktivitását jelenti e viszonylag széles pH tartományban. Ez a közvetlen összefüggés. A közvetett – a fentivel ellentétes irányú – hatás oka, hogy a pKa érték csökkenése egyben a kénatom elektronsűrűségének, ezzel nukleofilitásának a csökkenését is jelenti, így – bár az alacsonyabb pKa értékű tiol viszonylag széles pH-tartományban csupasz (= protonátlan) – inherens redukálási hajlama (= reaktivitása) kisebb, mint magasabb pKa értékű társáé. Megjegyezzük, hogy a fenti összefüggés ezidáig nem volt publikus, így a jelöltnek nem róható fel az erre vonatkozó ismeret hiánya. Járulékos kérdés: a (24) egyenletben a logK kitevőjében(?) lévő 17(?) mit jelent?

- 13) A cisztin monoszulfoxid (CyS(=O)SCy) köztitermék disszociáció állandójának meghatározása több megjegyzést is érdemel. A szövegben több állandóról is olvashatunk („... disszociációs állandóit UV-látható...”), a 44. ábrán és aláírásában egy állandóval és egyes számmal találkozunk („... állandójának meghatározása...”). Tekintve, hogy ebben a vegyületben – a perprotonált részecske disszociációjának irányából tekintve – 2 karboxil és 2 ammónium csoport is van, összesen 4 disszociációs állandóval (makroállandóval) lehet jellemezni a vegyület aciditását. Ha elfogadjuk, hogy a semleges-lúgos pH tartományban a karboxil csoportok protonjai már túlnyomórészt disszociáltak és csak a semleges-lúgos tartományban lejátszódó protonvesztés állandóira szorítkozunk, akkor is szükséges 2 állandó a folyamatok jellemzéséhez. A 44. ábrán látható UV-pH és NMR-pH profilok nem mutatnak ugyan 2 lépcsőt, de ennek az az oka, hogy a két folyamat (6 fölötti pH tartományban az első, és második protonvesztés az egyik, majd másik – a monoszulfoxid állapot következtében nem ekvivalens – ammónium csoportokról) erősen átfed, ezért a görbeillesztés egyetlen állandóval is megoldható volt, ami azonban nem változtat azon, hogy a jellemzéshez – makroszkopikus szinten és pH 6 fölött is – két állandó szükséges.

Ezek után meglepetéssel tapasztalható, hogy két lappal később, a 46. ábrán és aláírásában már két, a lúgos tartományban lejátszódó disszociációkra vonatkozó állandót ($pK_{a1} = 7.32$ és $pK_{a2} = 7.92$) is található, melyek minden bizonnyal a $\log 2 = 0.3$ értéknek a $pK_a = 7.62$ állandóból való levonással, ill. hozzáadással keletkeztek, ami az ún. „statisztikus eset” (az egyik csoport deprotonálódása nem befolyásolja a másik csoport aciditását) fennállása esetén érvényes. Az alacsonyabb pH-khoz tartozó lépcsők a 44. ábra UV-pH görbén azért nem látszanak, mert ezen a karboxil-karboxilát átalakulás az adott hullámhosszakon csekély abszorbancia-változást okoz, az NMR-pH görbén pedig azért, mert a pH= 5.5 alatti tartomány nem található a görbén.

- 14) A 45/B ábra mikrospeciációs sémájának az adott részecskéhez tartozó protonok száma és helye, valamint a töltések között nehéz összhangot találni, továbbá a protonáltsági izomereket is célszerű lenne megkülönböztetni a kötött proton helyének a megjelölésével.
- 15) A cisztin-N,N'-diklóramin szerkezetét és kémiai tulajdonságait ^1H NMR és UV-látható spektroszkópiai módszerekkel vizsgálták. Mivel a molekula szerkezete közel áll a ciszteinéhez – a szénkötésű protonok várható ^1H NMR tulajdonságai tekintetében különösen – és a molekulában nincs jelentős UV-VIS kromofór, különösen érdekes kérdés, hogy milyen ^1H NMR ill. UV-VIS különbségek voltak tapasztalhatók a cisztinhez képest?
- 16) A cisztin 55. ábrán bemutatott képződésében a cisztein-szulfénsav – cisztein reakció látszólagos másodrendű sebességi állandója Luo és Smith szerint $720 \pm 70 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, míg a szerző szerint ez az állandó $>10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, vagyis legalább 2 nagyságrenddel nagyobb. Mi lehet az oka az eltérésnek?
- 17) A 72. oldalon az olvasható, hogy „... a reakciósebesség növelésének (azaz az aktiválási energia csökkentésének) ...”, ez a fogalmazás azt a látszatot kelti mintha a fenti két fogalom (a reakciósebesség növelése és az aktiválási energia csökkentése) szinonim lenne, de tudjuk hogy nem azok – csak összefüggenek. Ezért – legalább – az „azaz” szót e szövegrészből törölni kellene.
- 18) A peroxiredoxinok pontmutációs dezaktiválása az egyik vagy mindkét arginin glicinre vagy lizinre való lecserélésével történt, melyek több nagyságrend reakciósebesség-csökkenést eredményeztek (74. oldal). Mivel a vad típusú enzimek aktív centrumában lévő argininekhez dokkoló hidrogén-peroxid elektrofilítása nyilvánvalóan az argininek permanens pozitív töltést viselő guanidinium csoportjához való elektrosztatikus / hidrogénhidás kötés kialakulásával nő, amit a pontmutáns glicin bizonyosan nem, de a lizin szintén kationos e-ammónium csoportja képes lehet részben elérni, ezért érdekes lehet a glicines és lizines pontmutáns hatások összehasonlítása, amit a 60. ábra potenciálisan tartalmaz is, de abból ez nem kvantifikálható. Ezek az adatok vannak a 4. táblázatban (ahol úgy tűnik, más adatok is vannak)? További érdekes kérdés, hogy az arginin(ek)e)t nem helyettesítették-e citrullinnal. Ez utóbbi ugyanis guanidinium helyett karbamido csoportot tartalmaz, ami a guanidinium protonátlan változatával, a guanidino csoporttal izoelektronos és izosztérikus, így a vad, a glicinnel és a citrullinnal pontmutált változatok összehasonlításával az arginin guanidinium hatást kulombikus és sztérikus komponensekre is lehetne bontani, ami a mechanizmus még mélyrehatóbb megértésének és kihasználásának az esélyét magában hordozza.
- 19) A 77. oldalon a peroxiredoxin fehérjék kinetikai viselkedésére vonatkozó számításokról és ezek alapján levont következtetésekről olvashatunk, a hidrogén-peroxiddal szembeni viselkedésük alapján, más peroxid-érzékeny vegyületekkel való összehasonlításban. Ezeknek az összehasonlításoknak a jelentősége nagyban függ attól, hogy milyen pH-jú közegre vonatkoznak, amire itt nem sikerült utalást találni. További fontos adat lenne, hogy milyen pKa érték adható meg (ha van ilyen) a peroxiredoxinban található cisztein – és a többi vegyület – szulfhidril csoportjára, mely a peroxid-emésztést nagymértékben és pH-függően befolyásolja.
- 20) A 101 – 102. oldalon a Cys-diszulfidok kénhidrogénnel lejátszódó reakcióinak kinetikájáról olvashatunk, melyben az 5,5'-ditiobisz-(2-nitro.benzoésav)-diszulfid kénhidrogénnel végbemenő kétlépéses reakciójának látszólagos sebességi állandói is

láthatók. Milyen pH-n érvényesek ezek az állandók, és mi lehet az oka annak, hogy a második lépésre vonatkozó állandó (melynek értéke – ellentétben az első lépésre vonatkozóval – tág tartományra van megadva) egy-két nagyságrenddel nagyobb érték, mint az elsőre vonatkozó? E kérdés fölmerül, különös tekintettel arra, hogy – mint olvashatjuk – cisztin és oxidált glutation esetén a reakciók sebességei lényegesen alacsonyabbak, és a DTNB RSSH-ban a kénatomokon az elektronsűrűség valószínűleg jobban hasonlós a cisztin és GSSG kénatomok elektronsűrűségéhez, mint a DTNB RSSR-ben. Van-e adat a DTNB redukált, szulfhidril állapotú formájában lévő –SH csoport savasságára?

21) Néhány formai észrevétel:

A rövidítésjegyzékben előfordulnak hiányosságok, pl. nem található benne az Y-nal kezdődő enkefalin peptidok, amik pl. a 9. ábra vegyületei, hiányzik továbbá a Prx és a TRP rövidítés.

Több helyen olvasható az endoplazmikus retikulum (pl. 45. oldal, rövidítésjegyzék), mely helyesen endoplazmatikus.

Több helyen szerepel a „kvantitálás” kifejezés (pl. 99. oldal), ami nyilván az angol „quantitate” szóból származik, de magyartalansága mellett megjegyzendő, hogy még az angol változatban sem ez, hanem a „quantify” ige a nyelvtanilag elfogadott.

A fenti kérdések, kifogások, észrevételek, megjegyzések nem csökkentik Nagy Péter munkáinak értékeit. Az értekezés elméleti és gyakorlati szempontból egyaránt fontos kérdésekkel, igényesen foglalkozik, tekintélyes folyóiratokban elfogadott közleményeken alapul, komoly megállapításokat tartalmazó eredményeket tartalmaz. Az abban foglalt téziseket elfogadom, az eredményeket az MTA doktora cím elnyeréséhez elegendőnek tartom, a nyilvános védésre bocsátást határozottan javaslom.

Budapest, 2016. november


Noszál Béla