



## ORSZÁGOS ONKOLÓGIAI INTÉZET

National Institute of Oncology

Főigazgató Főorvos: *prof. dr. Kásler Miklós Ph.D., DSc., dr.h.c., FRCS*  
☒ 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9. ☎: (+36 1) 224 8600, Fax.1 224-8620 Web:www.oncol.hu

### *Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály*

Osztályvezető: *Dr. Nagy Péter*

☎: (+36 1) 224-8787

EN ISO 9001:2008

## OXIDATÍV STRESSZ és REDOXIJELÁTVITEL

Betekintés a redoxibiológia molekuláris világába

Dr. Nagy Péter MTA Doktori értekezés

### Válasz Mócsai Attila Professor Úr bírálatára

Nagyon köszönöm Mócsai Attila Professor Úrnak a téma és tudományos eredményeim jelentőségének a hangsúlyozását, a pozitív és érdeklődő bírálatát, illetve a kritikai észrevételeit, amelyekre az alábbiakban pontokba szedve válaszolok:

#### 1) Kritikai észrevétel:

"Bár a dolgozat formája összességében elfogadható, a formai megoldásokat és arányokat számos ponton nem tartom teljesen szerencsésnek. A 147 oldalból a Bevezetés egy, a Célkitűzések szintén egy, a vizsgálati módszerek két oldal, melyeket bő 120 oldalon követ a saját eredmények bemutatása és megbeszélése. Bár egyrészt helyesnek érzem, hogy a munka gerincét a saját kísérletek bemutatása adja, kifejezetten hiányoltam egy, a téma irodalmi háttérét megvilágító részletesebb bevezetést és irodalmi áttekintést. A téma határterületi jellege miatt ez feltételezhetően mind az orvos/biológus, mind a kémikus végzettségűeknek nagy segítséget nyújtott volna. Az irodalmi áttekintés hiánya különösen szembeötlő annak a tükrében, hogy egy nehezen vizsgálható, részleteiben sokszor vitatott, molekuláris szinten mindmáig nem tisztázott, egyes esetekben akár megkérdőjelezhető eredményekre épülő szakterületről van szó. Hasonló hiányérzetem van a dolgozat végén, ahol hiányzik a munka összefoglalása, benne a legfontosabb eredmények felsorolása és kritikus elemzése, ismét különös tekintettel a téma ambivalens jellegére. Ehelyett a szerző két oldalon röviden tárgyalja az eredmények „kitekintését” és hasznosulásának a lehetőségeit. Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy az eredmények tárgyalásakor a szerző általában röviden megvilágítja az egyes kísérletek háttérét és levonja azok következtetéseit."

#### Válasz:

Köszönöm a dolgozat felépítésére vonatkozó kritikai észrevételeket! A 3 tárgyalt tématerület "1) a tirozin-oldallancok redox módosulásai és ennek a szabályozása, 2) a cisztein aminosavak tiol-csoportjainak redoxszabályozása és 3) a hidrogén-szulfid, mint jelátvivő molekula" irodalma rendkívül szerteágazó. Továbbá, ahogy azt a bíráló is említi, mind a három területen komoly ellentmondások sokasága és számos tisztázatlan kérdés nehezíti az érdeklődő olvasó helyzetét, különös tekintettel a molekuláris mechanizmusok szintjén. Mindezek fényében a 3, egymástól ugyan nem független, de jól elkülönülő tématerület bevezetésénél próbáltam egy rövid, lényegre törő irodalmi áttekintést adni. Szintén a fenti okok miatt az eredmények kritikus elemzését az egyes részekenél a kísérletes munkák bemutatásával együtt vagy rögtön utánuk próbáltam lényegre törően, tömören elvégezni. A legfontosabb eredmények összefoglalását a téziszfüzet tartalmazza. Mindezekről függetlenül messzemenően egyetérték a bíráló észrevételével, miszerint egy átfogó irodalmi áttekintést tartalmazó hosszabb bevezető rész és egy kritikus elemzést tartalmazó összefoglalás nagyon sokat javíthatott volna a dolgozaton.



## ORSZÁGOS ONKOLÓGIAI INTÉZET

National Institute of Oncology

Főigazgató Főorvos: *prof. dr. Kásler Miklós Ph.D., DSc., dr.h.c., FRCS*  
☒ 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9. ☎: (+36 1) 224 8600, Fax: 1 224-8620 Web: www.oncol.hu

### Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály

Osztályvezető: *Dr. Nagy Péter*

☎: (+36 1) 224-8787

EN ISO 9001:2008

#### 2) Kritikai észrevétel:

"Bár a szerző kísérleteit egyértelműen a különböző betegségek (daganatok, gyulladás, cukorbetegség) szemszögéből vezeti be, a kísérletekből feltűnően hiányoznak az össz-szervezeti (*in vivo*) vagy részletes sejtes (*in vitro*) vizsgálatok. Emiatt, és az eredmények részletes tárgyalásának az elmaradása miatt az olvasóban keletkezik egyfajta hiányérzet az eredmények orvosi és biológiai jelentőségének a megértésével kapcsolatban."

#### Válasz:

Köszönöm a bírálónak a megjegyzését, amellyel maradéktalanul egyetértek és én is ezt a szemléletet képviselem. Kémikusként végeztem, ezért a kísérletes munkáim zöme, főleg a pályafutásom kezdeti szakaszában, leginkább kémiai megközelítésből tárgyalják az adott problémákat. Hamar felismertem azonban azt a tényt, hogy ahhoz, hogy valóban komoly eredményeket érjünk el ezen a tématerületen, elengedhetetlenül szükséges a sejtekkel történő és *in vivo* vizsgálatok magas szintű végzése is, és a kémiai kísérleteket leginkább a biológiai rendszerekhez kell igazítani. Ez azonban nem megy egyik napról a másikra, főleg, ha az ember törekszik a minőségi, valóban jelentőséggel bíró biokémiai-biológiai kutatásokra. Ez a felismerés vezetett ahhoz a döntésemhez, hogy a posztdoktori képzésem után Professzor Christine Winterbourn laboratóriumába látogatva mélyebb betekintést/képzést kapjak az általam kutatott rendszerek biológiájába is. Mai kísérleteink már szerteágazó sejten belüli jelátviteli folyamatok tanulmányozására és az észlelések *in vivo* validálására összpontosítanak, szigorú mechanisztikus, kémiai szinten való megértést megcélözva. A dolgozatban a sejtekkel történő és *in vivo* kísérletek bemutatása valóban nem számottevő (sőt csak kisebb részét teszik ki az eredményeknek) a kémiai vizsgálatok túlsúlya mellett. Ennek fő oka az, hogy a bemutatott eredményeink a fent említett tudományos fejlődést/utat ölelik fel.

#### 1) Kérdés:

"Mennyire felelnek meg az alkalmazott *in vitro*, legtöbbször sejtmentes kísérleti rendszerek a vizsgált folyamatok *in vivo* lefolyásának egy emlős szervezetben? Hogy viszonyulnak az alkalmazott reagens- és termék koncentrációk az *in vivo* körülmények között megfigyeltekhez? Létrejönnek-e a szerző által említett kémiai módosítások (enkefalin-dimerek és módosulások, inzulin-dimerizáció, stb.) élő emlős szervezetekben? Hogy lehet ezeket a folyamatokat *in vivo* vizsgálni?"

#### Válasz:

Köszönöm a bírálónak ezt a fontos kérdését. A tirozin szabadgyökök általam tanulmányozott reakcióinak a biológiai jelentősége valóban nem volt még sejtes és *in vivo* rendszerekben részletesen tanulmányozva. A biológiai rendszerekben a szuperoxid termelődése (pl. NADPH oxidázok vagy a mitokondriális elektrontranszport lánc) és a tirozin gyökök képződése (pl. enzim reakciók) viszont széles körben tanulmányozott és igazolt (értekezés 4. oldal). Az oxidatív stressz helyzetben fokozott mértékben képződő tirozin-tirozin kötések képződését viszont biológiai rendszerekben is vizsgálták és az oxidatív stressz egy biomarkerének tekintik. Többek között emlős szövet és vizelet mintákban vizsgálták a tirozin-tirozin kötések



## ORSZÁGOS ONKOLÓGIAI INTÉZET

National Institute of Oncology

Főigazgató Főorvos: *prof. dr. Kásler Miklós Ph.D., DSc., dr.h.c., FRCS*  
☒ 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9. ☎: (+36 1) 224 8600, Fax: 1 224-8620 Web: www.oncol.hu

### Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály

Osztályvezető: *Dr. Nagy Péter*

☎: (+36 1) 224-8787

EN ISO 9001:2008

képződését HPLC-vel kapcsolt tömegspektrometriás analízis segítségével. A megnövekedett ditirozin koncentrációk különböző patológiai folyamatokkal voltak összefüggésbe hozhatók, mint például szürke hályog, ateroszklerózis, akut gyulladós folyamatok vagy Alzheimer kór (1). Továbbá a szuperoxid toxicitásának vizsgálata oldaláról megközelítve érdemes kiemelni, hogy a xantin oxidáz enzim szuperoxid termelő képességének felismerése rövidesen maga után vonta a szuperoxid diszmutáz (SOD) enzimek felfedezését, ezáltal azt a következtetést, hogy a sejtek a szuperoxid közömbösítésére is be vannak rendezkedve (2-5). Az is elfogadott tény, hogy a SOD-ok elengedhetetlenül szükségesek a szuperoxid elleni *in vivo* védelemben (6, 7). A szuperoxid NO-val és vas-kén klaszterekkel való reakcióinak *in vivo* relevanciája a szuperoxid toxicitásának a vonatkozásában jól körüljárt és széles körben tanulmányozott. Ennek ellenére az is elfogadott tény, hogy ezek a modellek nem elegendők a toxicitás molekuláris mechanizmusainak értelmezésére. A tirozin szabadgyökök szuperoxiddal való reakciója termodinamikailag és kinetikailag is nagyon kedvező, ezért határoztuk el, hogy a reakciók kémiájának részletesebb tanulmányozásával mélyebb betekintést nyerjünk azok biológiai rendszerekben való lejátszódásának relevanciájára vonatkozóan, mintegy előkészítve a biológiai vizsgálatokat. A kémiai vizsgálataink jól körüljárt modell rendszereket használtak (mint például az inzulin-impulzus radiolízis vagy az ábrás cet mioglobin rendszerek), amik segítségével azt terveztük megmutatni, hogy *in vivo* körülmények között ezek a reakciók potenciálisan végbemehetnek-e az általunk karakterizált termékek képződése mellett, a javasolt reakció-utakon. Ezeknek a reakció-utaknak a vizsgálata még az alkalmazott izolált modell rendszerekben is komoly kihívást jelent (ami a szabadgyökök reakcióinak a vizsgálatára általában jellemző) ezért az *in vivo* kutatásokat nagyon jól elő kell készíteni. Talán ehhez jelenthetik az első segítő lépést a mi tanulmányaink. Meg kell jegyeznem ugyanakkor, hogy a módszerek érzékenysége és a reakciók tanulmányozásának egyéb kísérletes buktatói miatt gyakran az *in vivo* körülmények között mért koncentrációknál lényegesen nagyobb koncentrációkat kellett alkalmaznunk a kémia mélyebb megértésének érdekében. Legfontosabb eredményeink potenciális *in vivo* jelentősége meglátásom szerint a következő: Igazoltuk, hogy a neutrofil fagociták vagy egyes peroxidáz enzimek a hidrogén-peroxid mellett képesek tirozint és tirozin tartalmú peptideket is oxidálni tirozin szabadgyökök képződése mellett. Ezek a kis molekulású szabadgyökök képesek nagyobb fehérjék tirozin komponensein fenoxil szabadgyök-képződést indukálni. Fehérje tirozin szabadgyökök képződhetnek hem csoport által katalizált intramolekuláris elektrontranszfer útján is (8), és mindkét esetben a képződött tirozin szabadgyökök kedvezően reagálnak szuperoxiddal addíció és elektrontranszfer reakciókon keresztül. Az elektrontranszfer mintegy megvédi a fehérjét a további poszttranszlációs tirozin oxidációs folyamatoktól, az addíció pedig potenciálisan toxikus hidroperoxid származékok képződését eredményezi. A tirozin peroxid származékok képesek cisztein aminosav komponenseket oxidálni és az ezekben a reakciókban képződő tirozin monoxid származékon keresztül Tyr-Cys keresztkötések alakulhatnak ki. Érdekességképp megemlítem, hogy még 1992-ben Nath és munkatársai azt találták, hogy aktivált neutrofilok képesek voltak radioaktív tirozint hozzákapcsolni a membrán fehérjékhez (9). Mindezt olyan mechanizmus(ok)on keresztül végezték, amelyhez szükség volt peroxidáz aktivitásra, tirozinra és stimulációra. krónikus granulomatózisban szenvedő betegek neutrofiljai nem voltak képesek tirozin megkötésére és a



## ORSZÁGOS ONKOLÓGIAI INTÉZET

National Institute of Oncology

Főigazgató Főorvos: *prof. dr. Kásler Miklós Ph.D., DSc., dr.h.c., FRCS*  
☒ 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9. ☎: (+36 1) 224 8600, Fax: 1 224-8620 Web: www.oncol.hu

### Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály

Osztályvezető: *Dr. Nagy Péter*  
☎: (+36 1) 224-8787

EN ISO 9001:2008

tirozín megkötése nem ditirozín képződése révén valósult meg. Véleményünk szerint ezen eredmények mechanisztikus értelmezésére magyarázatul szolgálhat az általunk leírt Tyr-OH képződésen keresztül megvalósuló Tyr-Cys keresztkötések létrejötte. Mindezeknek a folyamatoknak a mélyebb biológiai jelentősége még nem tisztázott és egyetértek a bírálómmal, hogy ehhez sejtes és *in vivo* kísérletek sokasága szükséges.

A kénhidrogén reakcióinak biológiai vonatkozásait már részletesebben tanulmányoztuk. A biológiai rendszerekben mért koncentrációkról egy összefoglaló közleményt írtunk (10) és a további *in vitro* kísérleteinket ennek alapján próbáltuk tervezni. A perszulfidok biológiai kémiájának a tanulmányozására például olyan módszert dolgoztunk ki és használunk, amely nemcsak sejtes rendszerekben, de szövetekben is képes a perszulfidok tanulmányozására (11). Jelenleg több állatkísérlet is folyamatban van a kénhidrogén és perszulfidok jelátviteli folyamatokban játszott szerepeinek a tisztázására elsősorban daganatos megbetegedések vonatkozásában.

#### 2) Kérdés:

"Mennyire befolyásolja az *in vivo* környezet a tárgyalt folyamatokat? Saját kísérleteinkben szérumban jelenlétében nem tudunk kimutatni érdemi szabadgyök-termelést neutrofil granulocitákban, miközben a sejtaktiválódás egyéb jelei kialakultak. Feltételezésünk szerint ezért a szérumban jelentős antioxidáns (redox-puffer) hatása a felelős. Hogy befolyásolná mindez a szerző által vizsgált folyamatokat?"

#### Válasz:

Ahogy arra az előző kérdésre adott válaszómban is kitértem, a szabadgyökök reakcióinak vizsgálata komoly technikai kihívást jelent még izolált rendszerekben is. Ennek az egyik oka az, hogy a gyökös reakcióknak az aktiválási energiagátja gyakran nagyon alacsony, ezért a reakciók sebességei gyakran annyira gyorsak, hogy megközelítik a diffúzió által kontrollált folyamatok sebességét. Ez szelektivitásukat is nagymértékben csökkenti, főleg többkomponensű, bonyolult biológiai rendszerek esetén. Természetesen ez nem csak azt jelenti, hogy biológiai rendszerekben ezek detektálása nagyon nehéz és sok esetben új módszerek kidolgozása szükséges (mint például a bíráló által említett neutrofilok szabadgyök termelő képességének vizsgálata szérumban jelenlétében, amire a laboratóriumomban a közelmúltban egy lehetséges módszert sikerült kidolgoznunk), hanem azt is elővetíti, hogy ezek a folyamatok az izolált rendszerekben felállított modelleknél lényegesen bonyolultabb mechanizmusokkal fognak végbemenni. Természetesen ezek miatt nem állítjuk és nem is állíthatjuk, hogy a leírt reakcióutak *in vivo* mindenképp és minden körülmény mellett lefognak játszódni, de talán az általunk leírt, egyes reakciók lejátszódására jellemzően utaló termékek potenciálisan biomarkerként szolgálhatnak az *in vivo* kísérletekben (csakúgy mint az (1)-es kérdésre adott válaszómban említett ditirozín).

#### 3) Kérdés:

"Mennyire tekinthető relevánsnak az *in vitro* alkalmazott sugárdózis? Saját kísérleteinkben 10-12 Gy dózis már kisállatok letalitását eredményezi. Ehhez képest az 500 Gy soknak tűnik, még akkor is, ha a daganatterápia során nyilván magasabb sugárdózis szükséges."



## ORSZÁGOS ONKOLÓGIAI INTÉZET

National Institute of Oncology

Főigazgató Főorvos: *prof. dr. Kásler Miklós Ph.D., DSc., dr.h.c., FRCS*  
☒ 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9. ☎: (+36 1) 224 8600, Fax.1 224-8620 Web:www.oncol.hu

### *Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály*

Osztályvezető: *Dr. Nagy Péter*  
☎: (+36 1) 224-8787

EN ISO 9001:2008

Válasz:

Itt szeretnék visszautalni az (1) és (2) kérdésre adott válaszaimra. Valóban a több kísérletben is alkalmazott 200 Gy dózis lényegesen nagyobb, mint az általános sugárterápiás kezelés alatt alkalmazott dózis. Erre a fehérjéken keletkező poszttranszlációs módosulatok vizsgálatára rendelkezésünkre álló tömegspektrometriai módszer érzékenysége miatt és a kémiai részletek mélyebb megértése végett volt szükség. Szeretném megjegyezni ugyanakkor, hogy tüdődaganatok extrém hipofrakcionálás sztereotaxiás ablatív test radioterápiája esetén, amely módszer ma már rutinszerűen alkalmazott Intézetünkben, a betegeknek adott dózis mértéke  $3 \times 20$  Gy.

4) Kérdés:

"Mennyire egyértelmű a szerzőéhez hasonló kísérletek interpretációja a szakirodalomban. Még az olyan egyértelmű helyzetekben, mint a krónikus granulomatózis betegség, is felmerül, hogy alapvetően félreértjük a betegség mechanizmusát, és a kórfolyamatok egy részéért nem redox-folyamatok, hanem ionális változások lehetnek felelősek (ld. Reeves et al., Nature 2002). Mennyire lehetünk akkor biztosak ennél sokkal finomabb eltérések szerepében/mechanizmusában?"

Válasz:

A bíráló által említett közlemény valóban nagy port kavart a neutrofilok baktériumölő képességét tanulmányozó tudományos társaságban. Az Anthony Segal munkacsoportjából közölt tanulmány ugyanis megkérdőjelezte a mieloperoxidáz enzim és az oxidatív mechanizmusok antibakteriális jelentőségét, amelyet (addig is és azóta is) számos rangos folyóiratban alátámasztottak (12, 13). Szeretném itt megjegyezni, hogy volt szerencsém részt venni a téma egy meghatározó nemzetközi konferenciáján, (Akaroa, New Zealand, The 5th International Meeting on Human Peroxidases), ahol Anthony Segal előadta ezt a munkájukat. A konferencia résztvevői hosszasan elemezték az eredményeket és a konklúziókat, és a kialakult vita serkentette az oxidatív modellt megerősítő közlemények számának ugrásszerű megnövekedését. Annak ellenére, hogy mára széles körben elfogadottnak tartják az oxidatív modellt (nem kizárva ezzel Anthony Segal modelljének a relevanciáját) többen úgy vélik, hogy ez nagyon jól tett a területnek és klasszikus példaként szolgál, hogy a biológiai folyamatok mennyire sokrétűek. Mindezek fényében úgy vélem, hogy a biológiai folyamatok háttérben meghúzódó kémiai reakciók mélyebb tanulmányozása fontos és szükséges ahhoz, hogy közelebb kerüljünk a biológiai folyamatok vezérlésének megértéséhez és esetleges terápiás célú kiaknázásához

5) Kérdés:

"Milyen olyan egyértelmű genetikai eltérések (pl. öröklött humán betegségek, knockout egerek) vannak, amelyek alátámasztják a szerző által felvetett mechanizmusok jelentőségét. Itt nem elsősorban a CGD-re, hanem kevésbé ismert betegségekre, vagy pl. peroxiredoxin vagy tioredoxin mutációkra gondolok."



## ORSZÁGOS ONKOLÓGIAI INTÉZET

National Institute of Oncology

Főigazgató Főorvos: *prof. dr. Kásler Miklós Ph.D., DSc., dr.h.c., FRCS*  
☒ 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9. ☎: (+36 1) 224 8600, Fax.1 224-8620 Web:www.oncol.hu

### Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály

Osztályvezető: *Dr. Nagy Péter*

☎: (+36 1) 224-8787

EN ISO 9001:2008

Válasz:

Példának okáért említeném, hogy többek között Christine Winterbourn laboratóriumában is több biokémiai modell alátámasztására használnak mieloperoxidáz hiányos páciensek véréből izolált neutrofil granulocitákat. Bár ennek a kondíciónak a fiziológiai jelentősége még korántsem teljesen tisztázott, több rendszerben is sikerrel alkalmazzák ezt a módszert a vizsgált reakciókban a mieloperoxidáz szerepének a tisztázására. Továbbá a peroxiredoxinok, tioredoxinok fiziológiás szerepe kapcsán érdemes megemlíteni, hogy az egyik leggyakoribb humán enzimhiányos betegség a glükóz-6-foszfát deficiencia. A maláj lakosság közel fele például ebben szenved. Ez az enzim egy kulcsszereplő a redox módosulatok redukálásának az elektron szükségletét fedező NADPH előállításában a pentóz-foszfát útvonalon. Ezeknél a betegeknél például oxidatív stresszt indukáló gyógyszerek alkalmazása (pl a primaquine malária gyógyszer (14) vagy a mi tanulmányunk alapján potenciálisan a doxorubicin; értekezés 81-87 oldal) oxidatív stressz-indukált hemolitikus anémiát okoz. A kénhidrogén biológiai szerepeit több enzim hiány/mutáció esetén is vizsgálják (például a CBS hiány, amelyik komoly kötőszövet károsodások kialakulásához és neurodegenerációhoz vezet (15)).

Továbbá egyre több egérmódel jelenik meg a szakirodalomban a redoxrendszerek tanulmányozására. Példaként említem Sue Goo Rhee peroxiredoxin-1 hiányos egérmódeljét, melynek segítségével egy új redoxvezérelt mechanizmus javaslatot sikerült felállítania (16) vagy a Rui Wang által készített cisztationin  $\gamma$ -liáz hiányos egérmódellet, aminek segítségével a kénhidrogén érrendszerben betöltött fiziológiás jelentőségét igazolták (17). Itt szeretném kiemelni továbbá a kollaborátorunk, professzor Edward Schmidt, által közelmúltban előállított egér modell rendszereket, amelyek páratlan lehetőségeket kínálnak a tioredoxin és glutation redukáló rendszerek oxidatív stresszben és redoxjelátvitelben betöltött szerepeinek a vizsgálataihoz. Lévén, hogy ezek a rendszerek felelősek a peroxiredoxinok és egyéb fehérje diszulfid hidak (18, 19), a hidrogén-szulfid által generált cisztein perszulfidok (11) és a nitrozotiolok (20) redukálásáért is, ezeknek az egereknek a jelentőségét kimagaslónak ítélem. Az egyik legérdekesebb felfedezés és eredmény ezen a területen a közelmúltban megítélésem szerint az volt, hogy azok az egerek, amelyeknek a hepatocitáiban kondicionálisan kiűtötték a teljes NADPH vezérelte redukáló rendszert (TR/GR-null egerek), metionin diétán életképesek voltak, ami arra utal, hogy egyéb, NADPH független redukáló mechanizmusok is léteznek élő szervezetekben (21). Professzor Ed Schmidt-tel való aktív szakmai együttműködésünk eredményeképp a laboratóriumunkban jelenleg is aktívan dolgozunk TrxR-, TRP14-, GR-, Trx-hiányos és ezek széles körű kombinációját hordozó illetve mutáns fehérjéket expresszáló egér szövetekkel.

6) Kérdés:

"Mit gondol a szerző a szervezeten belüli esetleges redox-szenzorok létezéséről és mibenlétéről? Néhány évvel ezelőtt felmerült, hogy egyes tirozin-kinázok maguk is redoxszerzorként működhetnek (ld. pl. Yoo et al., Nature 2011). Mi a szerző véleménye erről a kérdéskörrel?"



## ORSZÁGOS ONKOLÓGIAI INTÉZET

National Institute of Oncology

Főigazgató Főorvos: *prof. dr. Kásler Miklós Ph.D., DSc., dr.h.c., FRCS*

☒ 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9. ☎: (+36 1) 224 8600, Fax: 1 224-8620 Web: www.oncol.hu

### *Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály*

Osztályvezető: *Dr. Nagy Péter*

☎: (+36 1) 224-8787

EN ISO 9001:2008

Válasz:

A redox-szenzorok létezését ma már több megalapozott közlemény is alátámasztja. A legelfogadottabb redox-szenzor megítélésem szerint a peroxiredoxin (Prx) fehérjecsalád. Ezek a fehérjék (ahogy azt az értekezésben is kifejtettem) nagy koncentrációjuk és a hidrogén-peroxiddal (ami a redox jelként leginkább számon tartott ROS (22, 23)) szemben mutatott kimagasló reaktivitásuk (24) révén viselkedhetnek szenzorként (25, 26). A szakterületen jelenleg az a legnagyobb kérdés, hogy egyes kinázok, amelyek lényegesen lassabban reagálnak peroxiddal, több rendszerben is kísérletesen igazolt redoxivezéslése milyen mechanizmusok segítségével valósul meg. Ennek magyarázatára a következőkben néhány irodalomban javasolt modellt említenék:

- 1) Az első felállított modell (az úgynevezett "floodgate" modell) szerint a Prx-ek normál körülmények között blokkolják a jelátvitel redoxivezérlését a peroxid hatékony közömbösítése révén. Nagyobb koncentrációjú ROS termelés esetén viszont, a Prx-ek szulfinsav származékok képződése következtében inaktiválódnak teret adva így a lassabban reagáló kinázoknak a peroxiddal való reakciójához (egyes sejten belüli jól elhatárolt részeken) (27).
- 2) Egy az aktivitást jelentősen befolyásoló Tyr aminosav komponens foszforilációja révén a Prx1 peroxid bontó funkciója átmenetileg kikapcsolható. Ez reverzibilis folyamat amely jól körülhatárolt sejten belüli térben (a citoplazma membránhoz közeli részénél) kinázok redoxi vezérlésének adhat utat. (16)
- 3) A Prx-ek redukcióját végző Trx oxidációja is lehet a jel átadásának az egyik köztiterméke, hiszen a Trx nagyon sok fehérje diszulfid híd redukciójáért felelős. Az elmélet szerint a Trx nemcsak redukálja a diszulfid hidakat, de oxidált formája oxidálhat is fehérje Cys komponenseket. (28)
- 4) A Prx-ek maguk is közvetíthetik a redox "jelet" más fehérjékkal való vegyes diszulfidok képzésén keresztül (29, 30).

Mindezek mellett a bíráló által említett közleményben (31) a peroxid mint a neutrofilok nyílt seb vagy tumor felismerését szolgáló kemotaxisát vezérlő kismolekula szerepel. Ebben a rendszerben a Lyn SRC kináz tölti be a redox-szenzor szerepét, amely az oxidációt követően foszforilációs kaszkádok vezérlésében vesz részt. Ez is egy nagyon érdekes és fontos példája lehet redox-szenzorok által vezérelt biológiai folyamatoknak.

Végül szeretném megjegyezni, hogy meggyőződésünk szerint ezeknek a redox-szenzoroknak kimagasló fiziológiai szerepe van, ezért intenzíven dolgozunk új tömegspektrometrián alapuló redoxiproteomikai módszerek fejlesztésén a daganatos betegségek terápiáinak vonatkozásában. Emellett egy nemzetközi együttműködés keretében, a tématerületen dolgozó több meghatározó kutató részvételével egy olyan közlemény összeállításán dolgozunk, ami ezen folyamatok fiziológiás és terápiás jelentőségeit hivatott bemutatni.



**ORSZÁGOS ONKOLÓGIAI INTÉZET**

**National Institute of Oncology**

Főigazgató Főorvos: *prof. dr. Kásler Miklós Ph.D., DSc., dr.h.c.,FRCS*  
☒1122 Budapest, Ráth György u. 7-9. ☎: (+36 1) 224 8600, Fax.1 224-8620 Web:www.oncol.hu

***Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály***

Osztályvezető: *Dr. Nagy Péter*

☎: (+36 1) 224-8787

EN ISO 9001:2008

Végezetül szeretném megköszönni Mócsai Attila Professzor Úr kedvező bírálatát, valamint konstruktív és elgondolkodtató kérdéseit, amelyek segítik a szerzőt a jövőbeni kutatási feladatok fókuszálásában.

Budapest, 2016. november 18.

Tisztelettel:

Dr. Nagy Péter  
tudományos osztályvezető





## ORSZÁGOS ONKOLÓGIAI INTÉZET

National Institute of Oncology

Főigazgató Főorvos: *prof. dr. Kásler Miklós Ph.D., DSc., dr.h.c.,FRCS*  
☒1122 Budapest, Ráth György u. 7-9. ☎: (+36 1) 224 8600, Fax.1 224-8620 Web:www.oncol.hu

### *Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály*

Osztályvezető: *Dr. Nagy Péter*

☎: (+36 1) 224-8787

EN ISO 9001:2008

#### A válaszokban felhasznált irodalom

1. T. DiMarco, C. Giulivi, Current analytical methods for the detection of dityrosine, a biomarker of oxidative stress, in biological samples. *Mass Spectrom. Rev.* **26**, 108-120 (2007).
2. I. Fridovich, Competitive inhibition by myoglobin of the reduction of cytochrome c by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **237**, 584-586 (1962).
3. J. M. McCord, I. Fridovich, The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **243**, 5753-5760 (1968).
4. P. F. Knowles, J. F. Gibson, F. M. Pick, R. C. Bray, Electron-spin-resonance evidence for enzymic reduction of oxygen to a free radical, the superoxide ion. *Biochem. J.* **111**, 53-58 (1969).
5. J. M. McCord, I. Fridovich, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055 (1969).
6. I. Fridovich, Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 97-112 (1995).
7. J. G. Morris, Fifth Stenhouse-Williams memorial lecture. Oxygen and the obligate anaerobe. *J. Appl. Bacteriol.* **40**, 229-244 (1976).
8. A. Wilks, P. R. Ortiz de Montellano, Intramolecular translocation of the protein radical formed in the reaction of recombinant sperm whale myoglobin with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* **267**, 8827-8833 (1992).
9. J. Nath, Y. Ohno, J. I. Gallin, D. G. Wright, A novel post-translational incorporation of tyrosine into multiple proteins in activated human neutrophils. Correlation with phagocytosis and activation of the NADPH oxidase-mediated respiratory burst. *J. Immunol.* **149**, 3360-3371 (1992).
10. P. Nagy, Z. Palinkas, A. Nagy, B. Budai, I. Toth, A. Vasas, Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 876-891 (2014).
11. E. Doka, I. Pader, A. Biro, K. Johansson, Q. Cheng, K. Ballago, J. R. Prigge, D. Pastor-Flores, T. P. Dick, E. E. Schmidt, E. S. Arner, P. Nagy, A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems. *Sci. Adv.* **2**, e1500968 (2016).
12. C. C. Winterbourn, A. J. Kettle, M. B. Hampton, Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 765-792 (2016).
13. C. C. Winterbourn, A. J. Kettle, Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid. Redox Signaling* **18**, 642-660 (2013).
14. A. S. Alving, P. E. Carson, C. L. Flanagan, C. E. Ickes, Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* **124**, 484-485 (1956).
15. V. Kožich, W. D. Kruger, J. P. Kraus, in *Cystathionine β-synthase (CBS) Deficiency: Genetics, eLS*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2001).
16. H. A. Woo, S. H. Yim, D. H. Shin, D. Kang, D.-Y. Yu, S. G. Rhee, Inactivation of Peroxiredoxin I by Phosphorylation Allows Localized H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Accumulation for Cell Signaling. *Cell* **140**, 517-528 (2010).



## ORSZÁGOS ONKOLÓGIAI INTÉZET

National Institute of Oncology

Főigazgató Főorvos: *prof. dr. Kásler Miklós Ph.D., DSc., dr.h.c., FRCS*

☒1122 Budapest, Ráth György u. 7-9. ☎: (+36 1) 224 8600, Fax: 1 224-8620 Web: www.oncol.hu

### *Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály*

Osztályvezető: *Dr. Nagy Péter*

☎: (+36 1) 224-8787

EN ISO 9001:2008

17. G. Yang, L. Wu, B. Jiang, W. Yang, J. Qi, K. Cao, Q. Meng, A. K. Mustafa, W. Mu, S. Zhang, S. H. Snyder, R. Wang, H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* **322**, 587-590 (2008).
18. J. Lu, A. Holmgren, The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med.* **66**, 75-87 (2014).
19. C. H. Lillig, C. Berndt, A. Holmgren, Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 1304-1317 (2008).
20. I. Pader, R. Sengupta, M. Cebula, J. Xu, J. O. Lundberg, A. Holmgren, K. Johansson, E. S. Arner, Thioredoxin-related protein of 14 kDa is an efficient L-cystine reductase and S-denitrosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 6964-6969 (2014).
21. S. Eriksson, J. R. Prigge, E. A. Talago, E. S. Arner, E. E. Schmidt, Dietary methionine can sustain cytosolic redox homeostasis in the mouse liver. *Nat. Commun.* **6**, 6479 (2015).
22. C. C. Winterbourn, M. B. Hampton, Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 549-561 (2008).
23. S. G. Rhee, Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science* **312**, 1882-1883 (2006).
24. P. Nagy, A. Karton, A. Betz, A. V. Peskin, P. Pace, R. J. O'Reilly, M. B. Hampton, L. Radom, C. C. Winterbourn, Model for the exceptional reactivity of peroxiredoxins 2 and 3 with hydrogen peroxide: a kinetic and computational study. *J. Biol. Chem.* **286**, 18048-18055 (2011).
25. P. Nagy, C. C. Winterbourn, in *Advances in Molecular Toxicology*, C. F. James, Ed. (Elsevier, 2010), vol. Volume 4, pp. 183-222.
26. C. C. Winterbourn, Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 278-286 (2008).
27. Z. A. Wood, L. B. Poole, P. A. Karplus, Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **300**, 650-653 (2003).
28. J. D. Brown, A. M. Day, S. R. Taylor, L. E. Tomalin, B. A. Morgan, E. A. Veal, A peroxiredoxin promotes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling and oxidative stress resistance by oxidizing a thioredoxin family protein. *Cell Rep.* **5**, 1425-1435 (2013).
29. A. Delaunay, D. Pflieger, M. B. Barrault, J. Vinh, M. B. Toledano, A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111**, 471-481 (2002).
30. M. C. Sobotta, W. Liou, S. Stocker, D. Talwar, M. Oehler, T. Ruppert, A. N. Scharf, T. P. Dick, Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 64-70 (2015).
31. S. K. Yoo, T. W. Starnes, Q. Deng, A. Huttenlocher, Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature* **480**, 109-112 (2011).