



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 Noszál Béla Professor Úr bírálataira

Tisztelettel köszönöm Noszál Béla Professor Úrnak a nagyon alapos, segítőkész és konstruktív bírálatát. Észrevételeire és feltett kérdéseire az alábbiakban, pontokba szedve válaszolok:

1) Megjegyzés:

"Az oxidatív stressz egyike azon jelenségeknek, melyeknek súlyos egészségkárosító következményei vannak, s 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."

Válasz:

Köszönöm Noszál Béla Professor Úr elismerő szavait. Az elismerés ebben az esetben Professor Kásler Miklós Főigazgató Urat illeti. Nagyon jelentős mértékben Neki köszönhető, hogy hosszas külföldi tartózkodásom után hazatelepedtem. Professor Úr az Országos Onkológiai Intézetben a munkacsoportom megalakításának minden feltételét biztosította és a tudományos munkámat továbbra is messzemenően támogatja.

2) Megjegyzés:

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 kéntatomja 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.

Válasz:

Egyetértek ezzel a megjegyzéssel. A bíráló által említett kéntartalmú aminosavak és tiolok nagyon jelentős biológiai szereppel bírnak és redoxireakcióiknak kémiaja/biokémiaja széles körben kutatott; komoly irodalmi háttérrel rendelkezik. A mi kutatásaink egyelőre ezekre a rendszerekre nem terjedtek ki, ezért nem tárgyaltam őket.



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) Kérdés:

Az 5. oldal 4.1. fejezet elején található az a kifejezés, hogy „szuperoxid »szivárog« a mitokondriális térbe”. Mít lehet tudni a különböző, nagy reakciósebességű oxigén származékok membrán permeabilitásáról? Ismert-e membrántranszportere ezeknek a részecskéknek?

Válasz:

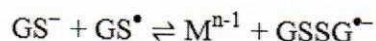
A szuperoxidnak tudomásom szerint még nem ismert membrántranszportere és az anion membrán permeabilitása is nagyon csekély (1, 2), ezért általánosan elfogadott, hogy reakciói abban a sejt kompartmentben veendők számba, ahol termelődik (3, 4). Az elektrontranszport lánc nem tökéletes működése miatt, leginkább az úgynevezett komplex I és komplex III enzimkomplexek szuperoxidot termelnek a mitokondriális térbe (5). Ezt értettem a valóban szerencsétlenül megfogalmazott „szuperoxid szivárog a mitokondriális térbe” kifejezés alatt. Tehát ebben a folyamatban a szuperoxidnak nem szükséges sejtmembránon áthaladnia. A hidrogén-peroxid membrántranszporterei az aquaporinok; ezeknek a transzport folyamatoknak kiterjedt irodalma van (6).

3) Kérdés:

Érdeklődő kérdés az 5. oldalon olvasható irodalmi adattal kapcsolatban: hogyan képződik szuperoxid a glutation autooxidációjában?

Válasz:

A következő reakciósor eredményeképpen képződhet szuperoxid a glutation autooxidációjával (7):



A glutation fémionokkal vagy szabadgyökökkel való egyelektronos oxidációs reakciójában glutation tiol szabadgyök (GS^{\bullet}) képződik. A GS^{\bullet} biológiai környezetben bizonyítottan leginkább tiolátokkal reagál diszulfid anion szabadgyök képződése közben (a fenti mechanizmus javaslatban egy másik glutation tioláttal van feltüntetve a reakció) (8). A diszulfid anion szabadgyök származékok diffúziókontrollált reakcióban reagálnak oldott oxigénnel szuperoxid képződése mellett (9, 10).

4) Kérdés:

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 reakcióképeséget okozó párosítatlan



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*

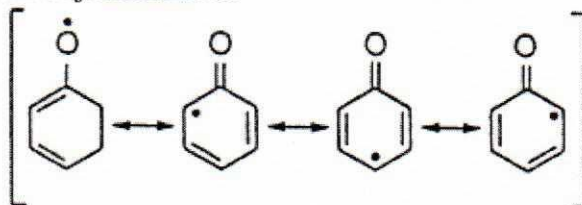
☎: (+36 1) 224-8787

EN ISO 9001:2008

elektron a fenoxil szabadgyök oxigénjéhez tartozik, a termékekben azonban két szénatom közt alakult ki az új kötés?

Válasz:

- Az R csoport használatával arra szerettem volna utalni, hogy a reakció nem csak szabad tirozin esetében, hanem peptidek és fehérjék esetében is lejátszódik, ha nincs sztérikus gátlás.
- Valóban a fenol származékok egyelektronos oxidációjában első lépésben fenoxil gyök intermedier képződik. A párosítatlan elektron ebben a molekulában azonban gyorsan delokalizálódik a fenol gyűrűn, ahol az előfordulási valószínűsége legjobban az alábbi mezomer szerkezetekkel jellemezhető:



Az energetikailag legkedvezőbb rezonancia szerkezet (75-80%) az, amikor a párosítatlan elektron orto pozícióban van (11-14). Ezért a tirozin szabadgyökök rekombinációjával az o,o-ditirozin származék képződik legnagyobb mennyiségben. Érdeemes azonban megjegyezni, hogy egyéb, sokkal kisebb mennyiségben képződő reakciótermékeket is azonosítottak, mint például az izoditirozin (15).

5) Kérdés:

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 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?
- 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.



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) Jin és von Sonntag az elektrontranszfer utat az addíciós úthoz képest elhanyagolhatónak (<10%) becsülték impulzus radiolízis technika segítségével generált tirozin szabadgyök és szuperoxid reakciójában (16). Winterbourn és munkatársai ezzel összhangban ¹⁴C izotóppal jelzett Tyr-ből kiindulva a dolgozatban is ismertetett peroxidáz/xantin oxidáz/acetaldehid/Tyr rendszerben azt találta, hogy ilyen körülmények között is az addíciós reakcióút dominál (17). Ámbrás cet myoglobin esetén viszont (fenilizotiocianáttal való derivatizációt követően a fenilizotiocianát elnyelésénél mért HPLC-Uv kromatogramok relatív csúcsintenzitásainak segítségével végzett kvantitatív becsülésünk alapján) azt találtuk, hogy az elektrontranszfer reakcióút dominált (az addíciós út hozzájárulása körülbelül ennek 10%-ára volt becsülhető) (18). Ebben az esetben viszont érdemes megjegyezni, hogy a Tyr151 (ahol a reakció végbemegy) nem N-terminális, tehát az addíciós utat segítő amino csoport hiányzik. Ezek a szemi-quantitatív mérések összhangban vannak az addíciós és elektrontranszfer utak, tömegspektrometriás mérések segítségével becsült arányaival N-terminális és nem N-terminális Tyr származékok esetén (19, 20).
- b) Erre a hatásra nem gondoltunk, köszönöm a bírálónak, hogy felhívta rá a figyelmet. Ez a jelenség valóban hozzájárulhat az N-terminális és nem N-terminális Tyr származékok esetén észlelt termékkoncentrációkban tapasztalt különbségekhez.

6) Kérdés:

A „hipohalogéneket termelő” megfogalmazás (19. oldal) helyesen vagy hipohalogén-savakat vagy hipohalogeniteket termelő.

Válasz:

A bírálónak igaza van, tisztelettel elfogadom a korrekciót.

7) Kérdés:

A 23. oldalon olvasható „(redukált metionint tartalmazó Met-Enk hiányában)” helyesen úgy szól, hogy „természetes állapotú” vagy „oxidálatlan Met-Enk hiányában”.

Válasz:

Ezt a korrekciót is köszönettel elfogadom.

8) Kérdés:

A 25. oldalon említi, hogy az ámbrás 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?



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:

Ortiz De Montelliano és munkacsoportja 1988-as cikkükben írta le az ámbrás cet mioglobinjának a dimerizációját. Kísérletesen igazolták (tömegspektrometria segítségével), hogy a dimerizáció legvalószínűbben egy Tyr 103 és egy másik mioglobin molekula Tyr 151 aminosav komponensei között jön létre (21). A magyarázata ennek az, hogy a Tyr 103 közel van a hem aktív centrumhoz, ezért ez oxidálódik először. A Tyr 151 oxidációja intramolekuláris elektrontranszfer útján valósul meg (22). Mindezek alapján azt a következtetést vonták le, hogy az ámbrás cet mioglobinnal való reakciójában képződő Tyr 103 szabadgyököt tartalmazó fehérje steady-state koncentrációja lényegesen nagyobb mint a Tyr 151-et tartalmazóé. Lévén, hogy két Tyr 103 rekombinációja sztereikusan gátolt ezért a statisztikailag legkedvezőbb eset az, amikor a ditirozin kötés egy Tyr 103 és egy Tyr 151 között valósul meg. Ezt alátámasztja, hogy Tyr pontmutáns fehérjék segítségével megmutatták, hogy a Tyr 151 jelenléte szükséges a dimerizációhoz. Érdekes megfigyelés volt, hogy a Tyr 103 jelenléte nem szükséges feltétele a dimerizációnak, amiből arra következtettek, hogy a Tyr 151-ről közvetlenül is tud elektron vándorolni a hem csoportra. Mindezek a megfigyelések összhangban vannak azzal, hogy a kutya hemoglobinja, amelyből a Tyr 151 hiányzik és a vörös kenguru hemoglobinja, melyből a Tyr 151 és a Tyr 103 is hiányzik, nem képesek dimerizálódni, annak ellenére, hogy Tyr szabadgyök képződése közben reagálnak peroxiddal. Lásd még (23).

9) Kérdés:

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?

Válasz:

A 37. ábrán feltüntetett cisztin-dioxid molekula spektroszkópiás szerkezetvizsgálata igazolta, hogy az valóban a tioszulfonát észter, nem pedig a diszulfid származék (24). A mi rendszerünkben a cisztin tioszulfonát észter diszproporciós reakciójában képződött köztiterméről igazoltuk, hogy az valóban a 37. ábrán feltüntetett tioszulfonát észter származék (függetlenül előállított tioszulfonát észtert mint belső standardet használva és oxidáló tulajdonságát vizsgálva (1 mol diszulfid származék 2 mol ciszteint oxidált 3 mol cisztin képződése mellett); ezzel összhangban ¹H NMR spektruma alapján a köztitermék nem volt szimmetrikus). Mindezek alapján a molekulában lévő két kén atomot nem tekintettem ekvivalensnek, ezért rendeltem hozzájuk különböző oxidációs számokat.

10) Kérdés:

A 46. oldalon az 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



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

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 molekuláris szerkezeti 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.

Válasz:

A bírálónak teljes mértékben igaza van. Egy (spontán) reakció végbemenetelének elengedhetetlen kritériuma minden esetben az, hogy a folyamat során a Gibbs-féle szabadentalpia változása negatív legyen, ami valóban a redoxi potenciálokból számítható. Erre a dolgozatban sajnos csak az alábbi, nem elégséges mondattal utaltam: „A termodinamikai kontroll kizárólag azt hivatott szabályozni, hogy melyek a potenciálisan végbemehető biológiai folyamatok.” A bekezdésben taglalt gondolatmenettel arra a Dean Jones által először megfogalmazott szemléletre szerettem volna utalni, hogy a sejtek nagyon dinamikus működésének következtében sok esetben nincs elegendő idő arra, hogy az enzimek katalizált reakciók sokaságához képest azok a gyakran relatíve lassú folyamatok lejátsszódjanak, amelyek a termodinamikailag legstabilabb termékek képződéséhez vezetnek. Ezt a jelenséget Jones és munkatársai a GSH/GSSG, Cys/CySSCy és Trx_{red}/Trx_{ox} redoxipárok működésének sejten belüli kinetikai elszigeteltségével szemléltették kinetikai modellezés segítségével (25, 26). Érdekes megemlíteni azt is, hogy ez a munkacsoport a fenti közleményeket megelőzően évtizedeken keresztül tanulmányozta és hangsúlyozta a sejtek redoxi potenciálok által kontrollált oxidatív folyamatait. Nagyon egyszerű megközelítésből talán azt is mondhatjuk, hogy az enzimek (amelyek nem mások, mint biológiai katalizátorok) szerteágazó funkciója önmagában is utalhat arra, hogy a kinetikai kontroll nagyon fontos a sejtes rendszerekben lejátszódó reakciók szempontjából.

11) Kérdés:

A 6. séma a „Redukált glutation makroszkópikus (A) és mikroszkópikus (B) részecskeeloszlása” címet viseli. Ez azonban nem részecskeeloszlási, hanem deprotonálódási séma.

Válasz:

A bíráló megállapítása helytálló, azt elfogadom.

12) Kérdés:

A cisztein tiolok reaktivitásának és pKa értéküknek az összefüggéséről azt írja, hogy „...ez alatt, pH=7-en pKa csökkenése nem jár a reaktívabb tiolát forma koncentrációjának növekedésével”, ezért a pKa csökkenése pH 7 alatt már nem növeli a reaktivitást. Mivel



ORSZÁGOS ONKOLÓGIAI INTÉZET

National Institute of Oncology

Főigazgató Főorvos: *prof. dr. Kásler Miklós Ph.D., D.Sc., 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

$K_a = \frac{[RS^-][H^+]}{[RSH]}$, 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 állapotának 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 a 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 értéke csökkenése egyben a kéntatom 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?

Válasz:

A bíráló okfejtésével maradéktalanul egyetértek. Valójában én is pontosan a 12. kérdésben megfogalmazott (a bíráló által közvetlen és közvetett effektusnak nevezett) kettős effektust szerettem volna szemléltetni a 38. ábrával. A pH = 7 értéket azért választottam kitüntetett értéknek, mert ez a leggyakoribb fiziológiás pH érték. Ilyen körülmények között (pH = 7-en) a 38-as ábrán látható harang alakú reaktivitási görbe jól szemlélteti, hogy $pK_a > 7$ értékkel rendelkező tiolok esetében a közvetett effektus, míg azoknál a tioloknál, amelyeknél a $pK_a < 7$ a közvetlen effektus (a dolgozatban a (24) reakcióban feltüntetett Brønsted egyenlettel szemléltetve) dominál. A tiolok nagyon eltérő pKa értékeit, azok általam kritikusan értelmezett jelentését, biológiai szerepeit és a kérdésben megfogalmazott effektusokat a (27) összefoglaló közleményemben részletesen tárgyalom, kis molekula és fehérje tiolok esetén egyaránt. A (24) egyenletben a logk kitevőjében lévő 17 sajnos a fent említett közleményből való beillesztés eredménye, ahol ez az egyenlet a 17. egyenletként szerepel.

13) Kérdés:

A cisztin monoszulfoxid (CyS(=O)SCy) köztitermék disszociáció állandójának meghatározása több megjegyzést is érdemel. A szövegben több állandóról is olvashatunk („...disszociális 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 (makróállandóval) lehet jellemezni 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

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 a második protonvesztés az egyik, majd a 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 szintet és pH 6 fölött is – két állandó szükséges.

Ezek után meglepetéssel tapasztalható, hogy két lappal később, a 46. ábrán és aláírásban már két, 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.

Válasz:

A bíráló meglátása és okfejtése teljes mértékben igaz. Mindezek megtalálhatók a (28) közleményben, de sajnos a dolgozatban elmulasztottam tárgyalásukat. Belátom, hogy a szövegben taglalt disszociációs állandók szemben a 44. ábra aláírásában található egyetlen állandó említésével zavaró és a bíráló által taglalt rész hiányában valóban nehezen értelmezhető.

14) Kérdés:

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.

Válasz:

Valóban, a protonok száma és helye nem egyértelmű a 45/B ábra alapján. Ezért egy ábramagyarázat beillesztése lett volna szükséges. A részecskék töltésével szerettem volna szemléltetni a kötött protonok számát és a CyS illetve CySH jelölés a tiol csoport protonáltsági fokára hivatott utalni, amely a kinetikai illesztés szempontjából a legfontosabb. A mikroszkopikus protonálódási állandókban (például pK_{a2s} vagy pK_{a2n}) az alsó indexben szereplő szám arra utal, hogy a teljesen protonált részecskéhez képest az adott reakcióban hányadik proton disszociációjához rendelhető az adott állandó, a szám utáni „n” vagy „s” betű pedig azt jelzi, hogy a proton a tiol (s) vagy az ammónium (n) csoportról szakad le.



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

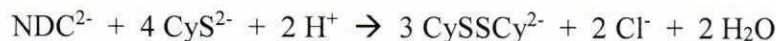
EN ISO 9001:2008

15) Kérdés:

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 kromofór különbségek voltak tapasztalhatók a ciszteinhez képest.

Válasz:

A cisztin-N,N'-diklóramin (NDC) UV-látható spektrumában, az alifás klóraminokra jellemző karakterisztikus $\lambda_{\text{max}} = 255$ nm elnyelés látható (alifás klóraminok tipikus elnyelési maximummal rendelkeznek a 245-260 nm hullámhossztartományban(29)), amely nem jelentkezik a cisztin UV-látható spektrumában. A mért moláris abszorpciós koefficiens értéke ($\epsilon^{255} = 1150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) és a cisztin, HOCl-el való UV-látható spektroszkópiás titrálása arra utalnak, hogy egy HOCl molekula egy klóramin csoport létrejöttét eredményezi, figyelembe véve az alifás klóraminokra jellemző tipikus $\epsilon^{245-260} = 300-420 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ érték tartományt. A cisztin molekula szimmetrikus szerkezete miatt az ^1H NMR spektrumában a két cisztein egységen található α és β protonok ekvivalensek. A β szénen lévő protonok egymással és az α szénen levő protonnal is csatolnak ezért pH = 7,5-ön két dupla dublettet mutatnak $\delta_{\beta 1} = 3,17$ ppm-nél és $\delta_{\beta 2} = 3,36$ ppm-nél. Az α szénen lévő proton dupla dublettjének kémiai eltolódása pedig $\delta_{\alpha} = 4,11$ ppm-nél figyelhető meg. Az NDC ^1H NMR spektrumában a ciszteinre jellemző szimmetria volt megfigyelhető (összhangban azzal, hogy a molekula mindkét amin csoportja monoklóramin formában van jelen), viszont az α és β protonok kémiai eltolódás értékei eltérnek a ciszteinétől (pH = 7,5-nél: $\delta_{\beta 1} = 3,03$ ppm, $\delta_{\beta 2} = 3,17$ ppm, $\delta_{\alpha} = 3,83$ ppm). Kvantitatív ^1H NMR spektroszkópiai mérésorozatot használva az NDC ciszteinnel való reakciójának termékeit növekvő cisztein koncentráció mellett tanulmányoztuk. Cisztein felesleg mellett az egyetlen detektálható termék a cisztin volt és a reakció, kvantitatív NMR segítségével meghatározott, sztöchiometriája összhangban volt az alábbi egyenlettel:



16) Kérdés:

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?

Válasz:

Ennek a kérdésnek a részletes taglalása két megjelent közleményben található meg (30, 31). Elkerülve a nagyon részletes válasz adását, röviden összefoglalva a válaszom a következő: Luo és Smith a cisztein szulfénsav (CyS-OH) molekula képződését a cisztein H_2O_2 -vel való oxidációjával érte el. Ez a reakció lassú, a mért másodrendű látszólagos sebességi állandója az adott pH-n $k = 15,2 \pm 0,1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Ilyen körülmények között, a Luo és Smith által javasolt 720



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

$M^{-1}s^{-1}$ -es állandót használva a CyS-OH-nak a feleslegben lévő ciszteinnel való reakciójára (amelyik nagyságrendekkel kisebb az általunk becsült értéknél), kinetikai modellezéssel bizonyítottuk, hogy a CyS-OH *steady-state* koncentrációja olyan csekély mértékű, hogy a Luo és Smith által a reakció követésére használt HPLC alapú detektálási módszer segítségével, a két állandó elkülönítése nem lehetséges (a várt különbségek a kinetikai görbék lefolyásában a mérési hibahatáron belül esnek). Továbbá a kérdéses sebességi állandót egymástól független 4 különböző rendszerben is nagyon részletesen vizsgáltuk, a CyS-OH-t sokkal gyorsabban (nem sebesség meghatározó lépésben) generálva (32, 33).

17) Megjegyzés:

A 72. oldalon olvasható, hogy „...a reakciósebesség növelésének (azaz az aktiválási energia csökkentésének)...” ez a megfogalmazás ezt a látszatot kelti, mintha a fenti két fogalom (a reakciósebesség növelése az az aktiválási energia csökkentése) szinonim lenne, de tudjuk hogy nem azok- csak összefüggenek. Ezért – legalább – az „azaz” szót e szövegrészből törölni kellene.

Válasz:

Egyetértek a bíráló megjegyzésével.

18) Kérdés:

A peroxidázok pontmutációs dezaktiválása az egyik vagy mindkét arginin glicinre vagy lizinre való lecserélésével történt, melyek több nagyságrend reakciósebesség-csökkentést 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 / hidrogénhidas 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 kvalifikálható. 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.

Válasz:

A 60. ábra reprezentatív kinetikai görbéket tartalmaz a Prx3 esetén a glicines, a Prx2 esetén pedig lizines pontmutánsok esetében. A 4. táblázat az összes mért adatból nyert látszólagos másodlagos sebességi állandók átlagát és szórását mutatja minden alkalmazott pontmutánsra (pH = 7,4-en). Amint az a táblázat adataiból látható, azt találtuk, hogy a lizin pontmutánsok esetén mért sebességi állandók nem térnek el lényegesen a glicin, alanin illetve hisztidin pontmutánsokkal mért értékektől. Ennek több oka is lehet. Például, a lizin amin csoportjának



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 pozíciója különbözhet a guanídium nitrogénjeinek sztérikus helyzetétől, vagy a két funkciós csoport különböző erősségű H-híd kötés létesítésére lehet képes peroxiddal a Prx aktív centrumában (többek között a környező funkciós csoportokkal való egyéb kölcsönhatások miatt).

Az argininek citrullinnal való helyettesítését nem vizsgáltuk, de hálás vagyok a bírálónak ezért az ötletért, mert ez valóban közelebb vihet minket a Prx katalitikus peroxidbontó hatásának a megértéséhez, lehetőség adva a guanídium hatás kulombikus és sztérikus komponenseinek szétválasztására.

19) Kérdés:

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.

Válasz:

A kinetikai modellezést pH = 7-re vonatkozó látszólagos másodrendű sebességi állandók használatával végeztük. A modellezésben feltüntetett fehérjék tiol pK_a értékei a következők:
Peroxiredoxinok: 4-6 között

PTP1B: 5,4

Cdc25b: 6,1

GAPDH: 8,2

GSH: a mikroszkópikus és makroszkópikus savi disszociációs állandók 8 és 10 között helyezkednek el (lásd a 197. oldalon lévő táblázatot az (7) könyvfejezetben)

Meg kell azonban említeni, hogy fehérjék cisztein tiol csoportjaira vonatkozó pK_a értékekkel szemben, a dolgozat 47. oldalán említett ok miatt, kicsit skeptikus vagyok. „A fehérjék tiolcsoportjainak savi disszociációs állandói nem statikus paraméterek. Mivel a fehérjék fluktuációja/működése következtében másodlagos/harmadlagos/negyedleges szerkezeteik állandóan változnak, ezért a tiol csoportjaikat körülvevő egyéb funkciós csoportok pozícióinak és hatásainak változásával a tiol pK_a-k is nagymértékben változhatnak.” Továbbá ezeket az állandókat általában pH titrálásos módszerrel határozzák meg. A pH változtatásával a fehérjék másodlagos/harmadlagos/negyedleges szerkezete, így a pK_a értéket befolyásoló funkciós csoportok pozíciója is általában változik. Ezért véleményem szerint fehérjék esetén az adott mérési módszer segítségével mért (általában spektroszkópiái) paraméterek pH függését nagyon nehéz kizárólag egyetlen funkciós csoport deprotonálódásának a hatásához rendelni. Mindezek mellett, a fenti fehérje tiolok hasonló becsült pK_a értékeivel szemben a peroxiddal tanúsított nagyon eltérő reaktivitásaik rávilágítanak, hogy a fehérje tiolok



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

peroxiddal való reakciójának sebességét a pK_a -n kívül sok egyéb paraméter is befolyásolja. Ezeket igyekeztem a (27) cikkben összefoglalni.

20) Kérdés:

A 101-102. oldalon a Cys-diszulfidok kénhidrogénnel lejátszódó reakcióinak kinetikájáról olvashatunk, melyben az 5,5'-ditiobisz-(2-nitro.benzoészav)-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 tartományban van megadva) egy-két nagyságrenddel nagyobb érték, mint az elsőre vonatkozó? E kérdés fölmerül, különös tekintettel arra, hogy – mint olvashatjuk – tisztin és oxidált glutation esetén a reakciók sebességei lényegesen alacsonyabbak, és a DTNB RSSH-ban a kénatomokon az elektronsűrűség valószínűleg jobban hasonlatos a tisztin és GSSG kénatomok elektronsűrűségéhez, mint a DTNB RSSR-ben. Van-e adat a DTNB redukált, szulfhidril állapotú formájában lévő –SH csoport savasságára?

Válasz:

A (44) és (45) egyenletekben szereplő sebességi állandók $pH = 7,4$ -re vonatkoznak. A DTNB szulfiddal való reakciójának pH függéséből a pH független másodrendű sebességi állandót is meghatároztuk: $k = 1090 \pm 12 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. A TNB-SSH szulfiddal való reakciójának sebességi állandó szélsőértékeit kinetikai szimulációk segítségével becsültük, a következő kísérletes észlelésekre támaszkodva: 1) Még DTNB felesleg mellett is, a mért kinetikai görbék, a DTNB szulfiddal való bimolekuláris reakciójának megfelelő egy exponenciális egyenlettel voltak illeszthetők. 2) Sztöchiometriai vizsgálatok igazolták, hogy 100-szoros DTNB feleslegre volt szükség ahhoz, hogy a DTNB szulfiddal való reakcióját követő TNB-SSH szulfiddal való redukciója ne játszódjon le. A tisztin és glutation esetén a lassabb reakciók adódhatnak abból, hogy a DTNB diszulfidban és TNB-SSH-ban a kén-kén kötések sokkal reaktívabbak, ami a kén atomokhoz kötődő elektron hiányos aromás gyűrű(k)nek köszönhető (A DTNB egy benzoészav származék, orto helyzetben egy erősen elektron szívó tulajdonságú nitro csoporttal). A TNB-SH pK_a -ját saját mérések alapján ellenőriztük, értéke $4,38 \pm 0,01$ -nek adódott, amit a (34) tanulmányban közöltük. Ez a viszonylag kis érték arra utal, hogy a DTNB és a TNB-SSH szulfiddal való tiol/diszulfid cserereakcióiban ($pH = 7$ -en) a távozó TNB-S⁻ csoportnak nem kell protonálódnia, ami szintén csökkentheti a reakciók aktiválási energia értékeit.

21) Kérdés:

Néhány formai észrevétel:

A rövidítésjegyzékben előfordulnak hiányosságok, pl. nem találhatóak 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 endoplazmatikus retikulum (pl. 45. oldal, rövidítésjegyzék), mely helyesen endoplazmatikus.



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

Több helyen szerepel a „kvantitálás” kifejezés (p. 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.

Válasz:

A formai észrevételeket köszönettel elfogadom.

Összegezve, még egyszer szeretném megköszönni Noszál Béla Professzor Úrnak a nagyon alapos szakértő bírálatát, amely több ponton gondolatébresztő volt és segíti a jövőbeni kutatásainkat is.

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. G. D. Mao, M. J. Poznansky, Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes. *FEBS Lett.* **305**, 233-236 (1992).
2. M. A. Takahashi, K. Asada, Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **226**, 558-566 (1983).
3. C. C. Winterbourn, in *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*. (John Wiley, New York, 2012).
4. C. C. Winterbourn, Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 278-286 (2008).
5. M. P. Murphy, How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1-13 (2009).
6. G. P. Bienert, J. K. Schjoerring, T. P. Jahn, Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 994-1003 (2006).
7. P. Nagy, C. C. Winterbourn, in *Advances in Molecular Toxicology*, C. F. James, Ed. (Elsevier, 2010), vol. Volume 4, pp. 183-222.
8. P. Wardman, Reactions of Thiyl Radicals. in: *L. Packer, E. Cadenas* (Eds.), *Biothiols in Health and Disease*, Marcel Dekker Inc., New York, , 1-20 (1995).
9. C. C. Winterbourn, Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 85-90 (1993).
10. W. H. Koppenol, A thermodynamic appraisal of the radical sink hypothesis. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 91-94 (1993).
11. T. J. Stone, W. A. Waters, *J. Chem. Soc.*, 213 (1964).
12. F. R. Hewgill, T. J. Stone, W. A. Waters, *J. Chem. Soc.*, 408 (1964).
13. W. T. Dixon, R. O. C. Norman, *J. Chem. Soc.*, 4857 (1964).
14. T. J. Stone, W. A. Waters, *Proc. Chem. Soc.*, 253 (1962).
15. J. W. Heinecke, Tyrosyl radical production by myeloperoxidase: a phagocyte pathway for lipid peroxidation and dityrosine cross-linking of proteins. *Toxicology* **177**, 11-22 (2002).
16. F. Jin, J. Leitich, C. von Sonntag, The superoxide radical reacts with tyrosine-derived phenoxyl radicals by addition rather than by electron transfer. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.*, 1583-1588 (1993).
17. C. C. Winterbourn, H. N. Parsons-Mair, S. Gebicki, J. M. Gebicki, M. J. Davies, Requirements for superoxide-dependent tyrosine hydroperoxide formation in peptides. *Biochem. J.* **381**, 241-248 (2004).
18. A. B. Das, P. Nagy, H. F. Abbott, C. C. Winterbourn, A. J. Kettle, Reactions of superoxide with the myoglobin tyrosyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 1540-1547 (2010).
19. P. Nagy, A. J. Kettle, C. C. Winterbourn, Superoxide-mediated formation of tyrosine hydroperoxides and methionine sulfoxide in peptides through radical addition and intramolecular oxygen transfer. *J. Biol. Chem.* **284**, 14723-14733 (2009).



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

20. A. B. Das, T. Nauser, W. H. Koppenol, A. J. Kettle, C. C. Winterbourn, P. Nagy, Rapid reaction of superoxide with insulin-tyrosyl radicals to generate a hydroperoxide with subsequent glutathione addition. *Free Radic. Biol. Med.* **70**, 86-95 (2014).
21. D. Tew, P. R. Ortiz de Montellano, The myoglobin protein radical. Coupling of Tyr-103 to Tyr-151 in the H₂O₂-mediated cross-linking of sperm whale myoglobin. *J. Biol. Chem.* **263**, 17880-17886 (1988).
22. A. Wilks, P. R. Ortiz de Montellano, Intramolecular translocation of the protein radical formed in the reaction of recombinant sperm whale myoglobin with H₂O₂. *J. Biol. Chem.* **267**, 8827-8833 (1992).
23. M. R. Gunther, R. A. Tschirret-Guth, H. E. Witkowska, Y. C. Fann, D. P. Barr, P. R. Ortiz De Montellano, R. P. Mason, Site-specific spin trapping of tyrosine radicals in the oxidation of metmyoglobin by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **330 (Pt 3)**, 1293-1299 (1998).
24. B. J. Sweetman, Structure of 'Cystine Disulphoxide'. *Nature* **183**, 744-745 (1959).
25. M. Kemp, Y. M. Go, D. P. Jones, Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 921-937 (2008).
26. D. P. Jones, Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, C849-868 (2008).
27. P. Nagy, Kinetics and Mechanisms of Thiol-Disulfide Exchange Covering Direct Substitution and Thiol Oxidation-Mediated Pathways. *Antioxid. Redox Signaling* **18**, 1623-1641 (2013).
28. P. Nagy, M. T. Ashby, Reactive sulfur species: kinetics and mechanism of the hydrolysis of cysteine thiosulfinate ester. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 1364-1372 (2007).
29. P. Kovacic, M. K. Lowery, K. W. Field, Chemistry of N-bromamines and N-chloramines. *Chem. Rev.* **70**, 639-665 (1970).
30. M. T. Ashby, P. Nagy, Revisiting a proposed kinetic model for the reaction of cysteine and hydrogen peroxide via cysteine sulfenic acid. *Int. J. Chem. Kinet.* **39**, 32-38 (2007).
31. M. T. Ashby, P. Nagy, On the kinetics and mechanism of the reaction of cysteine and hydrogen peroxide in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* **95**, 15-18 (2006).
32. P. Nagy, K. Lemma, M. T. Ashby, Reactive Sulfur Species: Kinetics and Mechanisms of the Reaction of Cysteine Thiosulfinate Ester with Cysteine to Give Cysteine Sulfenic Acid. *J. Org. Chem.* **72**, 8838-8846 (2007).
33. P. Nagy, M. T. Ashby, Reactive Sulfur Species: Kinetics and Mechanisms of the Oxidation of Cysteine by Hypohalous Acid to Give Cysteine Sulfenic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14082-14091 (2007).
34. P. Nagy, G. N. Jameson, C. C. Winterbourn, Kinetics and mechanisms of the reaction of hypothiocyanous acid with 5-thio-2-nitrobenzoic acid and reduced glutathione. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1833-1840 (2009).