

Kiss Tamás egyetemi tanárnak „Az Imidazolgyűrű szerepe a fémionmegkötésben: oldalláncban több donorcsoportot tartalmazó peptidek és származékaik átmenetifém komplexeinek egyensúlyi és redoxi sajátságai” című MTA doktori értekezéséről írt bírálatára

Mindenekelőtt nagyon köszönöm Bírálómnak a doktori értekezés és a tézisek alapos áttanulmányozását és köszönöm a dolgozatról és a munkámról írt elismerő szavait. Ugyancsak köszönöm, hogy felhívta a figyelmemet a dolgozatban előforduló magyartalan kifejezésekre és pontatlan megfogalmazásokra, amelyeket természetesen elfogadok.

A kérdésekre, kritikai megjegyzésekre az alábbiakban válaszolok:

Eredményeit jól felépített, arányos és annak ellenére, hogy egy nagy témakörrel foglalkozik eléggé olvasmányos értekezésbe foglalta össze. Ezt a sok magyarázó ábra segíti, de az, hogy a szerző az összefoglaló stabilitási állandó táblázatokat a dolgozat végén a mellékletben közli kifejezetten gátolják.

A dolgozat összeállítása során igyekeztem az eredményeket összefoglaló ábrák és az adatok összehasonlító elemzésével bemutatni, így a „Kísérleti eredmények és értékelésük” fejezetben általában a stabilitási állandókból származtatott adatok szerepelnek szemléltetésül, a meghatározott stabilitási állandók ezért kerültek a „Mellékletek” részbe. Elfogadom, hogy ez nehezítette a dolgozat olvasását.

Nem hiszem, hogy a PSEQUAD és a SUPERQUAD számítógépes programok egymás továbbfejlesztett változatai volnának. Mindkettő ugyanarról az alapról a SCOGS programról indult és párhuzamosan fejlődtek a 70-es években.

Köszönöm az észrevételt, és teljesen egyetértek vele. A PSEQUAD programot 1978-ban írta meg Zékány László és Nagypál István és 1983-ban fejlesztették ki az első központi számítógépre alkalmazható verzióját (L. Zékány, I. Nagypál, in Computational Methods for the Determination of Formation Constants, ed.D. Leggett, Plenum Press, New York, 1985, p. 291.). A SUPERQUAD programot 1985-ben Peter Gans, Antonio Sabatini és Alberto Vacca fejlesztette ki és hozta nyilvánosságra (P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1985, 1195.). Bár mindkét program ugyanazon alapprogramból (SCOGS) indult ki, és a stabilitási állandók meghatározásának elve is gyakorlatilag azonos, a két programot alkotóik egymástól függetlenül hozták létre.

- 1. Nem teljesen világos, hogy a Cu(II)-BPMA és Cu(II)-BIMA komplexek jelentősen eltérő $\log(K_1/K_2)$ értékeire vonatkozó értelmezés. Valószínűleg a szerző jót gondolt a ligandumok koordinációs fogszámáról, de pontatlanul fogalmazott. Elmondaná helyesen a koordinációs viszonyokat.*

Mindkét ligandumnak három koordinálódásra képes donorcsoportja van (két aromás-N és egy amino-N), így mind a BIMA, mind a BPMA háromfogú koordinációval kötheti a réz(II)iont.

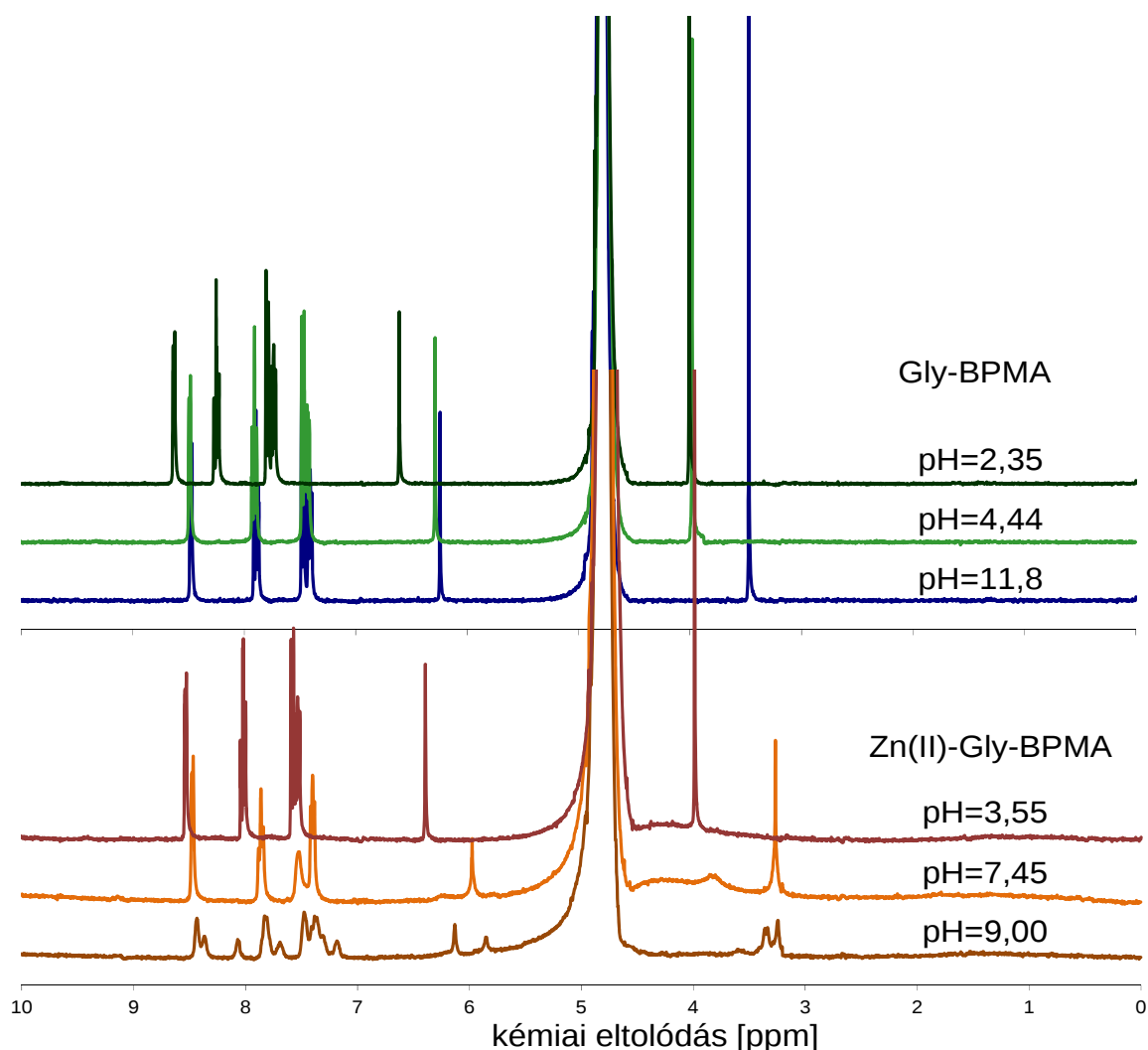
A bisz(imidazol-2-il)-metilamin (BIMA) esetén a savas tartományban képződő $[\text{CuHL}]^{3+}$, illetve $[\text{CuH}_2\text{L}_2]^{4+}$ komplexekben a fémion a két, illetve négy imidazolgyűrűn keresztül kötődik, az aminocsoport protonált, a 2, illetve 4 imidazolgyűrű a réz(II)ion körül ekvatoriálisan helyezkedik el. Az ammóniumcsoport deprotonálódásával képződő $[\text{CuL}]^{2+}$ komplexben azonban az egyik imidazolnitrogén kiszorul az ekvatoriális síkból, a fémion körül egy síkban az amino- és az egyik imidazolnitrogén található, míg a másik imidazol gyenge axiális koordinációja jön létre. A $[\text{CuL}_2]^{2+}$ komplexben szintén megváltozik a 4 ekvivalens imidazol-nitrogéneken keresztüli koordináció, a spektrális adatok alapján legalább az egyik ligandum háromfogú koordinációját feltételeztük. Így mind a $[\text{CuHL}]^{3+}$, mind a $[\text{CuH}_2\text{L}_2]^{4+}$ deprotonálódását és $[\text{CuL}]^{2+}$, illetve $[\text{CuL}_2]^{2+}$ komplex képződését a réz(II)ion körüli koordináció és a komplex-geometria jelentős mértékű változása kíséri.

A bisz(piridin-2-il)-metilamin esetén protonált komplexek képződése nem volt kimutatható, a gyengén savas tartományban képződő $[\text{CuL}]^{2+}$ és $[\text{CuL}_2]^{2+}$ komplexben az ekvatoriális síkban az amino- és piridin-N koordinációját mutattuk ki, míg a másik piridin axiális koordinációja feltételezhető egy torzult oktaéderes geometriát eredményezve. Ennek kialakulását a szilárd biskomplex röntgendiffrakciós vizsgálatai igazolták, az oldategyensúlyi vizsgálatok ugyanakkor azt tükrözik, hogy legfeljebb egy piridin axiális koordinációja valósul meg.

A $\lg(K_1/K_2)$ értékekben mutatkozó különbséghez nagymértékben az járul hozzá, hogy a BIMA $[\text{CuL}]^{2+}$ és $[\text{CuL}_2]^{2+}$ komplexeinek képződését jelentős geometriaváltás kíséri.

2. A Zn(II) komplexek NMR spektrális viselkedésénél lehetett-e a lassú csere tartományba eső folyamatokat megfigyelni, ami az NMR spektrumban egyértelműen megfigyelhető lett volna.

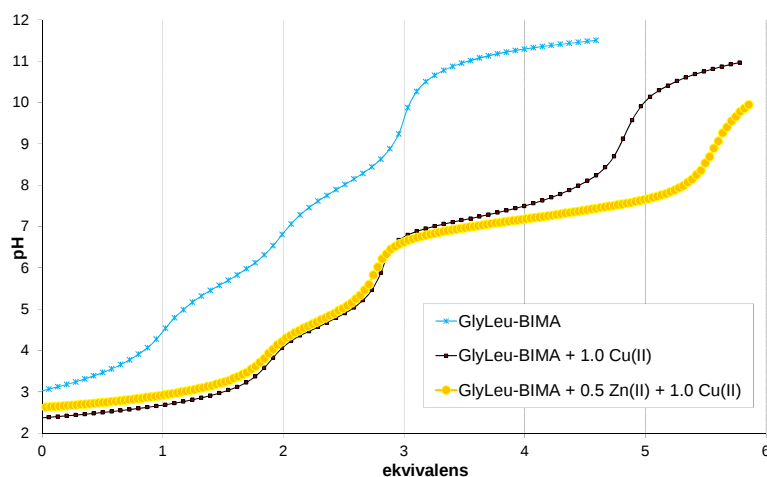
A képződő Zn(II) komplexeket ^1H -NMR spektroszkópiával a Gly-BPMA, a GlyGlyHis-BIMA, valamint a hisztidin analóg aminosavat tartalmazó di- és tripeptid-származékok esetén vizsgáltuk, valamennyi esetben annak eldöntése volt a cél, hogy a lúgos tartományban lejátszódó extra lúgfogyasztó folyamat a fémion indukálta amidnitrogén deprotonálódáshoz vagy a fémion hidrolíziséhez rendelhető-e. Az amidnitrogén deprotonálódást a fenti ligandumok közül csak a Gly-BPMA esetén igazoltuk. A cink(II)iont tartalmazó rendszerekben felvett spektrumok valamennyi esetben azt tükrözték, hogy a gyors csere tartományba eső folyamatok játszódnak le. Így a Zn(II) hozzáadására jelek kiszélesedése volt tapasztalható, ligandumfelesleg sem tapasztaltuk a jelek kettőződését, a szabad ligandum és a komplexben kötött ligandum jele nem különült el. A Zn(II)-Gly-BPMA rendszerben az amidcsoporthoz kapcsolódó CH proton (és az aromás protonok) jelének kiszélesedéséből és eltolódásából következtettünk a koordinációs módra (1. ábra).



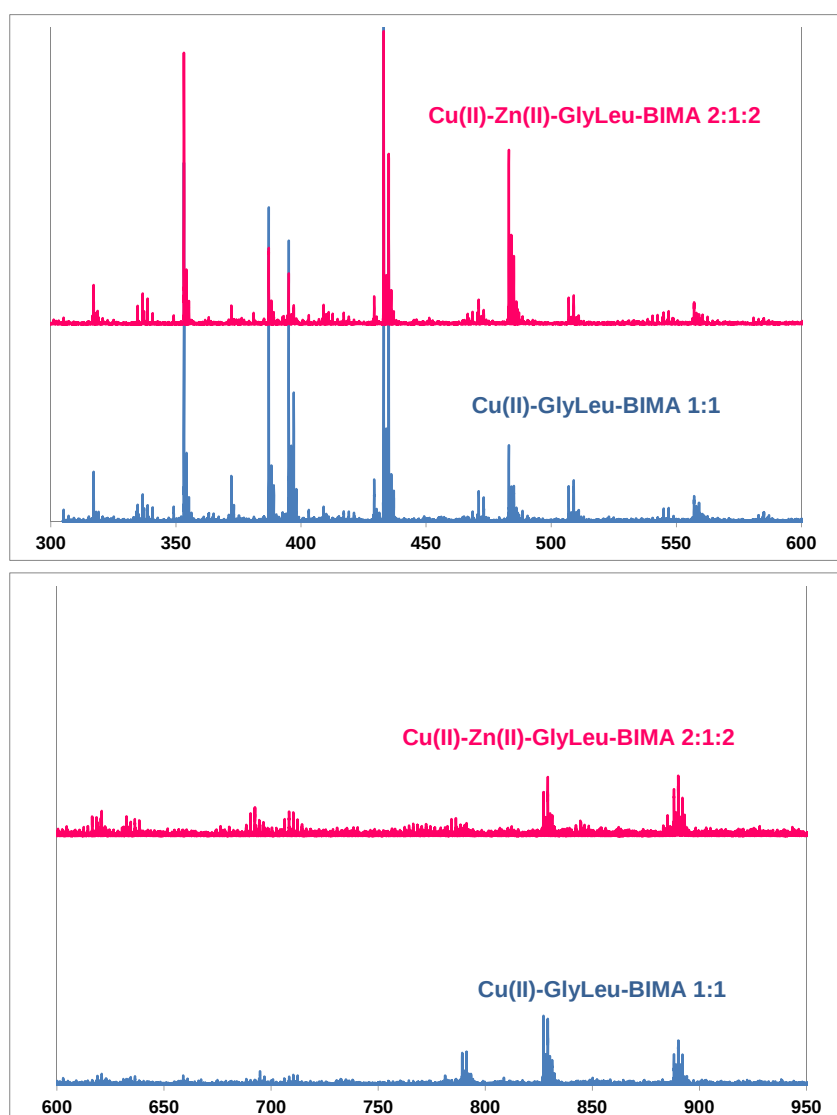
1. ábra A Gly-BIMA és a Zn-Gly-BIMA rendszerben felvett ^1H NMR spektrumok a pH függvényében

3. A szerző részletesen tanulmányozta a CuZnSOD enzim szerkezeti modelljét, szerkezet kialakulását befolyásoló alapvető tényezőket releváns fémionok komplexeinél. Meglepőnek tartom ugyanakkor, hogy még csak kísérletet sem tett – legalább is értekezésében nem említi – hogy heterodinukleáris imidazolato-hidas komplexek előállításával illetve oldatbeli vizsgálatával próbálkozott volna. Miért?

A legígéretesebb szerkezeti SOD modell a His-BIMA $[\text{Cu}_3\text{L}_2\text{H}_{-4}]^{2+}$ és a dipeptid-BIMA (GlyLeu-BIMA, LeuGly-BIMA) $[\text{Cu}_3\text{L}_2\text{H}_{-6}]$ komplexe volt. Így a GlyLeu-BIMA ligandum esetén vizsgáltuk a vegyes Cu(II)-Zn(II)-ligandum rendszert. Bár a potenciometriás titrálási görbe (3. ábra) illeszthető olyan modellel, amelyben a törzskomplexek mellett egy $[\text{Cu}_2\text{ZnL}_2\text{H}_{-6}]$ összetételű komplex is van, de ha keletkezne is, átfedésben lenne a cink(II)ion hidrolízisével. Ugyanakkor a tömegspektrometriás vizsgálatok csak a Cu(II)-GlyLeu-BIMA törzsrendszerben képződő komplexekkel azonos részecskék megjelenését igazolták (2. ábra), tehát a vegyes Cu(II),Zn(II)-komplex keletkezését nem tudtuk igazolni. Így ilyen irányban a vizsgálatainkat nem folytattuk.



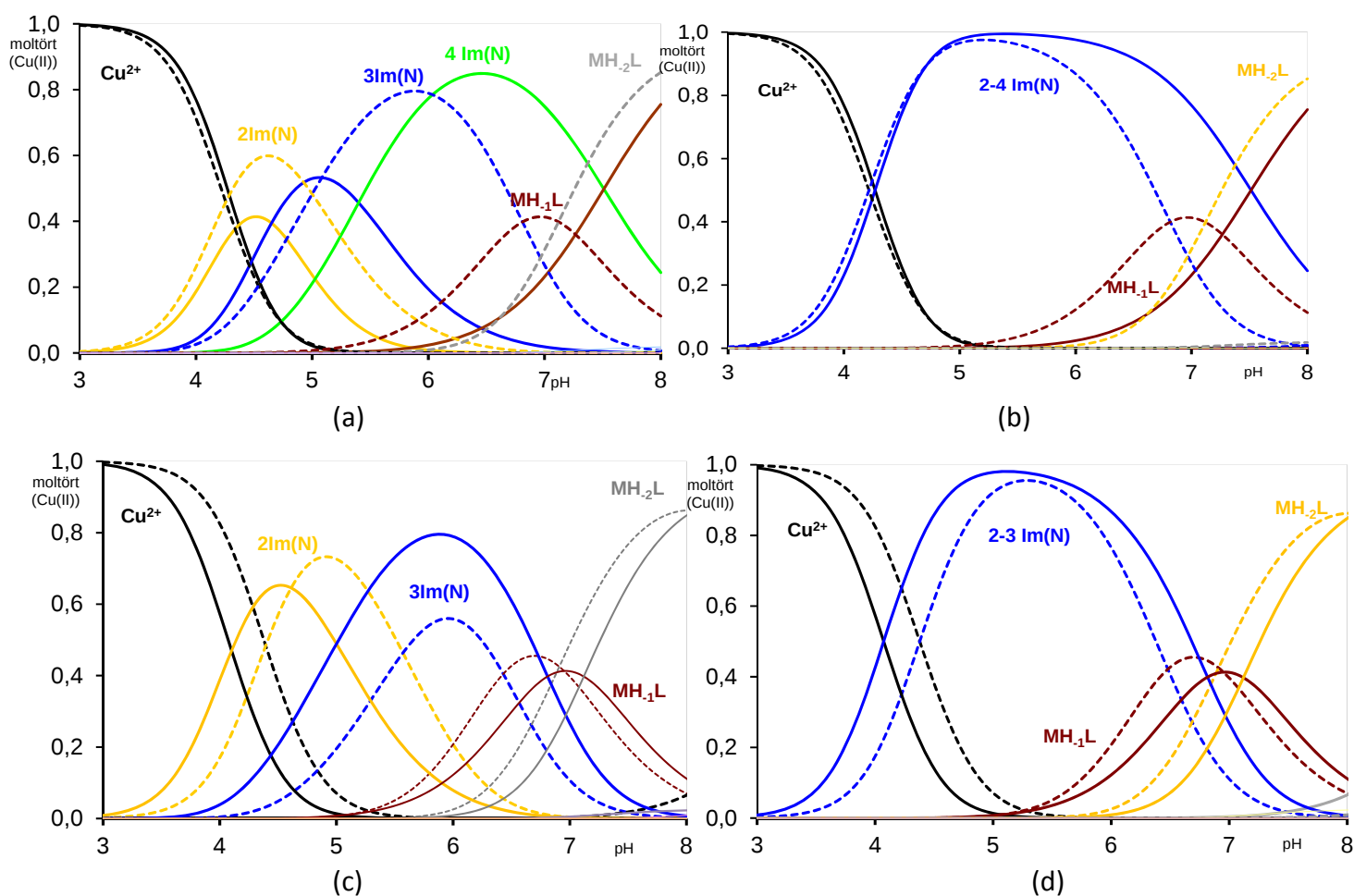
2. ábra A GlyLeu-BIMA (kék), a Cu(II)-GlyLeuBIMA 1:1 (fekete) és a Cu(II)-Zn(II)-GlyLeu-BIMA 2:1:2 (sárga) titrálási görbéi ($c_L = 0,001$ M)



3. ábra A Cu(II)-GlyLeu-BIMA 1:1 (kék) rendszerben és a Cu(II)-Zn(II)-GlyLeu-BIMA 2:1:2 (ciklámen) rendszerben rögzített tömegspektrumok ($[\text{Cu}_2\text{ZnL}_2\text{H}_{-6}]$ komplexre: $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_4\text{Zn}$: M: 853,20)

4. Azt találták, hogy a csak oldalláncon keresztüli koordináció esetén a koordinálódó imidazol-N-ek számának növekedésével nő ezen komplexek stabilitása és 4 Im-N esetén ez már a fiziológias pH-n lejátszódik. Az 53. ábra szerint a többi komplex esetén pedig már savas pH-n. Nem világos a megfogalmazás, hiszen a nagyobb stabilitás kisebb pH-n való komplexképződésnek kedvez

Egyetértek, hogy valóban pontatlan a megfogalmazás. A dolgozat 53. ábráján (4.a ábra) két peptid, az Ac-HisAlaHisValHis-NH₂ (szaggatott vonal) és az Ac-HisSarHisSarHisSarHis-NH₂ (S3H4, folytonos vonal) réz(II)ionnal alkotott komplexeinek koncentráció eloszlása látható. Az ábra azt is mutatja, hogy mindkét ligandum esetén lépcsőzetesen képződik két, illetve három imidazol-N koordinációjú komplex, amelynek a megjelenése a 4 hisztidint tartalmazó molekula esetén valamivel kisebb pH-n figyelhető meg. Az S3H4 ligandumnál e két komplexképződési folyamatot követi a 4 imidazol-N koordinációjú komplex megjelenése. A hisztidinek számának növekedésével így az a pH tartomány növekszik, ahol az imidazol-N koordinációjú komplexek vannak jelen.



4. ábra A Cu(II)-Ac-HisAlaHisValHis-NH₂ (szaggatott vonal) és a Cu(II)-Ac-HisSarHisSarHisSarHis-NH₂ (folytonos vonal) rendszerben képződő komplexek eloszlása (a), (b); valamint a Cu(II)-Ac-HisHisGlyHis-NH₂ (szaggatott vonal) és a Cu(II)-Ac-HisAlaHisValHis-NH₂ (folytonos vonal) rendszerben képződő komplexek eloszlása (c), (d);

Talán még szemléletesebben mutatja ezt a 4.b ábra, ami az eloszlásban összegezve mutatja az imidazol koordinációjú komplexeket, tükrözve, hogy a hisztidinek számának növekedésével egyre

szélesebb pH tartományban uralkodó a csak az oldalláncon keresztüli koordinációs mód, és egyre nagyobb pH felé tolódik az $[\text{CuH}_{-1}\text{L}]^+$ komplex képződése. Összehasonlításként a 4.c és 4.d ábra az eltérő helyzetben 3 hisztidint tartalmazó két peptidre, az Ac-HisHisGlyHis-NHCH₃ (szaggatott vonal) és az Ac-HisAlaHisValHis-NH₂ (folytonos vonal) mutatja be a keletkező komplexek eloszlását külön-külön, illetve összegezve az imidazol koordinációjú komplexeket. A kedvezőbb HXH szekvenciát tartalmazó peptid esetén a 2 és 3 imidazol nitrogén koordinációjú komplex képződése kisebb pH-n kezdődik és nagyobb arányban jelenik meg a komplex, mint az Ac-HisHisGlyHis-NHCH₃ peptid esetén. Így az imidazol koordinációjú komplexek az Ac-HisAlaHisValHis-NH₂ ligandumnál szélesebb pH tartományban vannak jelen, és az amidnitrogének deprotonálódása nagyobb pH-nál játszódik le.

Végezetül még egyszer köszönöm Prof. Kiss Tamásnak a dolgozatom bírálatának elkészítését és azt, hogy az értekezés nyilvános vitára való bocsátását javasolja.

Debrecen, 2014. július 23.

Dr. Várnagy Katalin