

VÁLASZOK DR. CSÁMPAI ANTAL BÍRÁLATÁRA

Tisztelt Bíráló!

Köszönöm, hogy elvállalta MTA doktori értekezésem bírálatát, és az abban megfogalmazott támogató véleményt. Köszönöm, hogy időt szánt az alapos átnézésre, a gondolatébresztő és hasznos észrevételeket. Kritikai megjegyzéseit elfogadom.

A feltett kérdésekre pontokban válaszolok:

I.) A gondosan megírt szövegben elírásokat alig találtam, ugyanakkor néhol furcsának tűnő szóhasználattal lehet találkozni. Ilyen pl. a „mindegyik” helyett „mindenik”, ami hiba helyett inkább egy erdélyi szóhasználatnak tekinthető. A szakmai nyelvezet többnyire helytálló, de matematikailag a Dirac deltával leírható, elvileg végtelen szélességű frekvencia tartományt gerjeszteni képes „impulzus” helyett jobb lett volna a gerjesztő energiacsomag fizikai valóságára helyesen utaló, a dolgozatban szintén előforduló „pulzus” következetes használata. Az apróbb elírások felsorolásától eltekintek, ezek közül csupán egy jelentősebbnek tekinthető emelek ki, a biomassza összetételére vonatkozó szöveggörnyezetből a 20. oldalon, ahol „szénhidrogének” helyett „szénhidrátok” lenne a helyes meghatározás a hexozókra és pentózokra. (Tekintettel a dolgozat igen magas általános színvonalára ez az elírás bosszantónak is mondható.)

Köszönöm, hogy felhívta a figyelmet a „mindenik” szó használatára, ez részemről nem tudatos választás. Viszont felkeltette az érdeklődésem és utánanéztem a magyar értelmező szótárban. Az alábbiak olvashatók:

mindegyik: névmás általános

I. (melléknévi) <Az ismert, szóban forgó tárgynak összetartozó személyekből v. tárgyakkból, dolgokból álló összességnek részéről, ill. tagjairól szólva> minden egyes.

A növény **mindegyik** levele formás.

II. (főnévi) Minden egyes személy, dolog, akire utaltak, v. akit említettek, ill. akit a személyrag megjelöl.

Problémánk sokféle volt, de **mindegyiket** sikerült megoldani.

Rájöttem, hogy **mindegyikünk** lelke ki van már kezdve. (Kuncz Aladár)

Mindketten szomorúak voltak... **Mindegyik** azt hitte a másikról, hogy boldog.
(Kosztolányi Dezső)

mindenik: névmás általános

I. (melléknévi) (népies, régies)

Mindenik kimondatott szó hazud

(Katona József)

A nagy erő **mindenik** fiúban megnyilatkozott (Móricz Zsigmond)
 Szomorú egy látvány! ime ott terülnek. Mögöttem s előttem, **mindenik** kopáron
 (Arany János)
 összecseengnek egy csomóban de elválasztva **mindenik** más zárba tartozik
 (Mikszáth Kálmán)

Az értelmezés és a példák alapján azt mondhatjuk, hogy az általam használt „mindenik” kifejezés inkább régies, de nem erdélyi szóhasználat. Muszáj megjegyezni azt is, hogy a felsorolt költők, írók közül Kuncz Aladár az, aki gyermekkorát Kolozsváron töltötte, mi több ugyanabban az iskolában (ma Báthory István Elméleti Líceum, korábban piarista gimnázium) sajátítottuk el az alapokat, és tettük le az érettségi vizsgákat. Kuncz Aladár viszont a „mindegyik” kifejezést használja.

A szakmai szóhasználatot illetően az NMR munkabizottságban rendszeresen felmerül a „Pulzus vagy impulzus?” kérdés. Egyelőre egyértelmű, mindenkit megnyugtató választ erre nem sikerült adni.

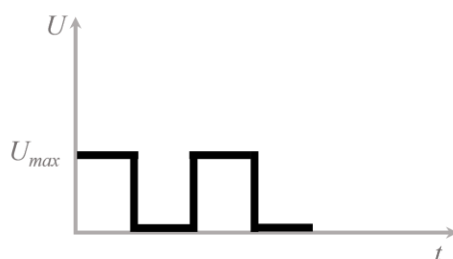
Utánanéztem, és a magyar értelmező szótár szerint:

pulzus: főnév *-t, -ok, -a*
 (orvostudomány) Érverés.
 Egyenletes, erős, nyugodt **pulzus**.
 Gyorsul, kihagy, szabálytalan a **pulzusa**.

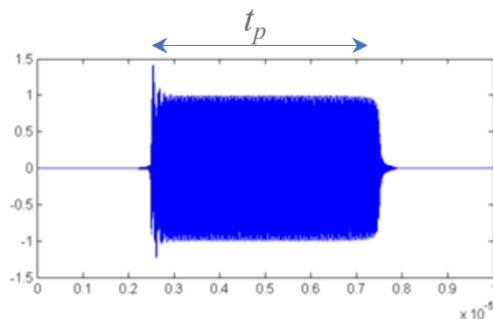
impulzus: főnév *-t, -ok, -a*

- 1.* (választékos) Ösztönzés, indítás. **Impulzust** merít, nyer vmiből. Az adta neki az első **impulzust**, hogy ...
2. (fizika) Az a fizikai mennyiség, amelyet úgy kapunk meg, hogy az erőt megszorozzuk az erő hatásának időtartamával.
3. (műszaki nyelv, villamosság) Vmely energiának rövid ideig tartó, lökészerű, rendsz. ismétlődő jelentkezése, amely vmely berendezésben működtet vmit, ill. jelzést ad.

Ezek alapján a *pulzus* (a vízjel kifejezéshez hasonlóan) már egy jól meghatározott szakkifejezést takar, aminek nincs kapcsolata az NMR spektroszkópiával. Az *impulzus* a műszaki meghatározás szerint inkább utal az NMR spektroszkópiában előforduló jelenségre. Az elektronikában használatos megfogalmazás szerint az impulzus olyan áram, vagy feszültség melynek értéke két nyugalmi állapot között ugrásszerűen változik. Szabályos impulzusalakok közé tartozik a négyszög impulzus, a trapéz alakú impulzus. Ennek ábrázolása:



Az NMR spektroszkópiában a kemény 90°-os impulzus egy négyszög impulzus. Amit ábrázolunk, az valójában egy burkológörbe, mivel a t_p időtartam alatt széles frekvenciatartományban oszcilláló rádiófrekvenciás hullámokat adunk ki (700 MHz-en $1/700\,000\,000 = 1,4 \cdot 10^{-9}$ s/360° modulációval):



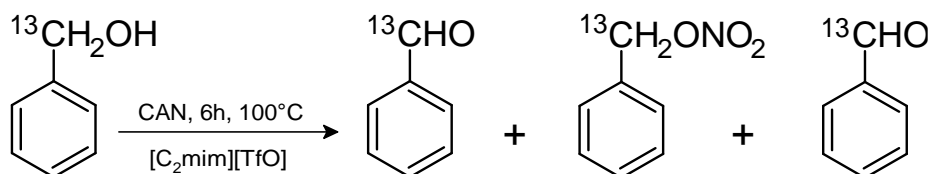
Bíráló megjegyzését a „szénhidrátok” kifejezés használatára elfogadom.

2.) Az irodalomjegyzékbe foglalt közlemények az első szerző neve alapján alfabetikus sorrendben lettek feltüntetve, nem kaptak sorszámot, így a dolgozatban a Szerző által alkalmazott hivatkozási mód alapján kissé körülményesen azonosíthatók. Bár ezzel a formával nem túl gyakran, de találkozhatunk a nemzetközi irodalomban is, szerencsésebbnek tartottam volna a sorszámok használatát.

Az irodalomjegyzéket tekintve nem volt formai megkötés. Az általam alkalmazott első szerző neve szerinti alfabetikus sorrend inkább összefoglalók, könyvek irodalomjegyzékében használatos, ezért esett erre a választásom.

3.) A szép színes ábrák meglehetősen gazdagok információban, de legtöbbször kis méretük miatt nagyon nehezen átláthatók, a rövidítésekkel alaposan megtűzdelte apróbetűs feliratok nem, vagy alig olvashatóak. A 101. oldalon a benzilalkohol, benzaldehyd, benzilnitrát és benzoésav szerkezetén rossz helyen, a benzol gyűrű ipso szénatomján szerepel a ^{13}C izotópjelölés.

Köszönöm az észrevételt, az elírást javítottam:



4.) Áll-e rendelkezésre (akár röntgendiffrakciós mérésekből származó) atomi szintű információ az S100A4 fehérje vagy egyéb intra- és extracelluláris Ca^{2+} kötő fehérjék, illetve a TPPP25 és egyéb Zn^{2+} kötő fehérjék fémkötő helyeiről, a koordinációs számról és geometriáról? Ismeretes-e erre nézve valamilyen általánosítható, pl. egyes szekvenciák jelenlétével kapcsolatba hozható törvényszerűség? Véleménye szerint a dokumentált módon nagy valószínűséggel érintett aminosavak, pl. hisztidin oldallánc imidazol nitrogénjének koordinációja reális eséllyel nyomon követhető-e a fémion-koordinációra igen érzékeny ^{15}N -NMR eltolódás változáson keresztül? Lát-e erre lehetőséget akár ^1H - ^{15}N HMBC vagy egyéb pulzusszekvenciák

alkalmazása mellett? A szelektív mérést és a jelhozzárendelést esetleg megkönnyítené az a körülmény, hogy az imidazol gyűrűben levő nitrogének eltolódástartománya (200-300 ppm) jól elkülönül a fehérje láncban lévő rutinszerűen mért amid nitrogénekétől.

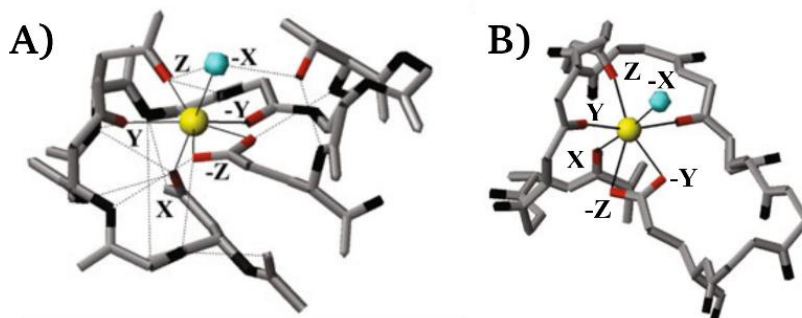
Igen, az S100A fehérje család számos tagjáról rendelkezésre áll atomi szintű információ. A TPPP25 esetében az AlphaFold által predikált szerkezet létezik, de cink-kötő motívumokról más fehérjékre bőven található adatot.

Az S100 fehérje családban egy jellegzetes Ca^{2+} -kötő hélix-hurok-hélix motívum található, az EF-kéz. A motívumot a parvalbumin fehérjében írták le először, melynek kristályszerkezetében az E és F α -hélixek, illetve az ezeket összekötő szakasz alkotja ezt a szerkezeti egységet – innen ered a megnevezés is. A Ca^{2+} kationhoz „hard” oxigén ligandumok koordinálódnak, leginkább az Asp és Glu karboxilát csoportjai, és a polipeptid lánc karboniljai, a Ca^{2+} koordinációs száma 6-8 között változhat. A kialakuló geometria enyhén torzult pentagonális bipiramis. A koordinálódó aminosavakat vagy a motívumban elfoglalt helyük (1, 3,...), vagy a koordinációs geometriai helyzetük (x,y,...) alapján jelöljük (lásd lenti táblázat és 1, 2 ábrák). Megkülönböztetünk kanonikus és nem-kanonikus EF-kéz motívumot. A kanonikus motívum jellegzetesen 12, míg a nem-kanonikus 14 aminosavat tartalmaz. A nem-kanonikus motívumban a peptidgerinc karbonil oxigénjei inkább részt vesznek a koordinációban.

Táblázat. EF-kéz motívumok néhány ismert fehérje esetében.

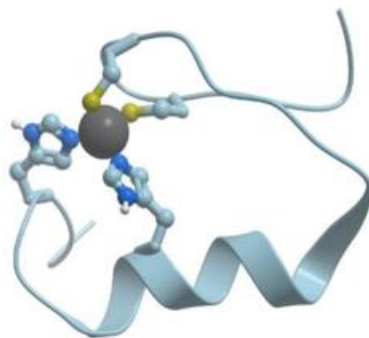
	1	3	5	7	9	12
	x	y	z	-y	-x	-z
Kanonikus EF-kéz						
Kalmodulin (EF1)	D	-	KDGD	-	GTITTKE	
S100B (EF2)	D	-	NDGD	-	GECDFQE	
S100A4 (EF2)	D	-	SNRD	-	NEVDFQE	
Nem-kanonikus EF-kéz						
Kalbindin D9k (EF1)	A	A	KEGD	PN	QLSKEE	
S100B (EF1)	S	G	REGD	KH	KLKKSE	
S100A4 (EF1)	S	G	KEGD	KF	KLNKSE	

Ábra 1. A) Kanonikus, és B) nem-kanonikus EF-kéz geometria:



A fehérjékben a gyakori Zn^{2+} - kötő motívum a cink-ujj (zinc finger ZF). Ez egy 30 aminosavból álló β - β - α szerkezeti motívum. A Zn^{2+} a S, N ligandumokat részesíti elsősorban előnyben. Ide tartozik a Cys kén atomja, vagy a His imidazol gyűrűben található nitrogén atomok, viszont az Asp és Glu oxigénjei is koordinálódhatnak. A Zn^{2+} koordinációs száma tipikusan 4. A ZF esetében 4 Cys, vagy 2 Cys és 2 His aminosav-oldallánc koordinálódik a központi Zn^{2+} fémionhoz.

A Zn-ujjak, és a cink-tartalmú enzimek esetében tetraédes koordinációval találkozunk (lásd 3. ábra), de 5-, vagy 6-koordinációs geometria is lehetséges.



3. Ábra. A Zn^{2+} koordinációs geometriája, egy cink-ujj szerkezetben (3cnf.pdb). Szürkével jelölve a fémion, kézzel a N-atomok, sárgával a S-atomok.

A TPPP25 esetében egy tipikus Zn^{2+} kötő motívum a $His^{61}(Xaa)_{10}His^{72}(Xaa)_7Cys^{80}(Xaa)_2Cys^{83}$ szakasz, ám ez a régió NMR spektroszkópiai úton láthatatlan maradt, így részletes jellemzését nem lehetett elvégezni.

A bíráló által felvetett $^1H, ^{15}N$ HMBC mérés valóban sikerrel alkalmazható fémion koordináció, vagy protonálódás vizsgálatok, hiszen elsősorban az oldallánc környezeti fogják ezt a változást érzékelni. Irodalmi példák is mutatják, hogy érdemes az oldallánc N környezeteinek peptidgerinc környezetektől jól elkülönülő kémiai eltolódásaiban bekövetkező változásokat követni (Drohat et al. *Biochemistry*, **1999**, 38, 11876 – 11886.)

Ugyanakkor kimutatható, hogy egy protonálódás/koordináció a peptidgerinc atomjainak környezetét is befolyásolja – sokkal kisebb mértékben, de detektálható különbség.

Esetünkben a korábban említett okok miatt ilyen mérésekre nem került sor.

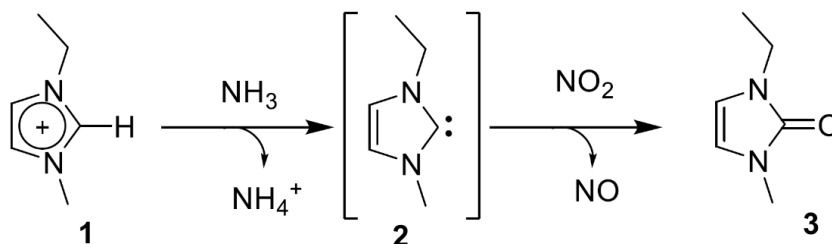
5.) *Hogyan értelmezhető, hogy a dUPNPP hidrolízise dUTPáz és Mg^{2+} ionok jelenlétében is csak 6 óra után indul el? Ha esetleg ebben az aktivációs időszakban alakul ki egy kelátgyűrűben koordinált fémiont tartalmazó szubsztrát és az enzim komplexe, véleménye szerint kínálkozik-e elvi lehetőség arra, hogy ezt a folyamatot egyéb detekciós módszerrel időben nyomon kövesse?*

Egy másik Bírálóban is hasonló kérdés merült fel. A dUPNPP hidrolízise lassú reakció, ugyanakkor kis mennyiségekkel dolgozunk. A képződött dUMP és (N)PP_i jeleinek integrál értékei kezdetben kicsik, így a kvantitatív kiértékeléséhez, a megfelelő jel/zaj arány biztosításához egy mérés időtartama hosszú (5 óra körüli).

A lassú reakció kinetikus krisztallográfiai felvételek elkészítésére is lehetőséget adott. Különböző inkubációs időpillanatokból származó szerkezeti információk az αP atomon történő nukleofil támadást igazolták és a mechanizmus útvonala is követhetővé vált.

Egy másik lehetőség a ^{18}O jelölt víz alkalmazása és a hidrolízis során képződött dUMP tömegspektrometriás analízise. Az eredmények azt mutatták, hogy a ^{18}O jelölést tartalmazó vízmolekula a dUMP-hez kötött. Így egy másik úton is kimutatható volt az αP atomon történő nukleofil támadás.

6.) Annak tükrében, hogy a CAN már $100\text{-}110^\circ\text{C}$ körül CeO_2 , NH_3 , H_2O , NO és NO_2 képződése mellett bomlást szenved (N. Audebrand, N. Guillou, J.P. Auffrédic, D. Louer, *Thermochimica Acta*, **1996**, 286, 83-87.), igen érdekes tapasztalat, miszerint a benzilalkohol ezzel a reagenssel magas hőmérsékleten végzett oxidációja során megnövelt ionos folyadék/CAN arány mellett nem képződött nitrogéndioxid gáz, viszont az ionos folyadék relatív mennyiségének csökkentésekor észlelhető a barna gáz fejlődése. Véleménye szerint elképzelhető-e az az alább felvázolt folyamat, melyben a CAN termikus bomlása során képződő ammónia a feleslegben levő imidazolium kationból (1) a C2-atomot érintő deprotonálással karbént (2) generál, ami a szintelen nitrogénmonoxid képződése mellett nitrogéndioxiddal reagálva NMR módszerekkel könnyen azonosítható 2-imidazolonná (3) alakul, vagy ennek a kísérleti tapasztalatnak egy alternatív értelmezését inkább lehetségesnek tartja?



A kísérletek során barna gáz képződött minden esetben, amikor az ionos folyadék nitrát aniont tartalmazott. Ugyancsak detektálható volt, ha CAN só és triflát aniont tartalmazó ionos folyadék közegben dolgoztunk. Viszont benzil alkohol hiányában a gázképződés nem volt megfigyelhető. Értelmezésünk szerint a közeg víztartalma felelős a jelenség kialakulásáért. Amennyiben vizes közegben dolgozunk a lejátszódó redoxireakció során salétromsav képződik és a savasság nő. Ha száraz ionos folyadék a közeg, akkor a vízmentes salétromsav bomlása következtében szabadul fel a barna NO_2 gáz.

A gázképződés mélyebb vizsgálatát célzó kísérletek nem történtek. A Bíráló által javasolt folyamatot elképzelhetőnek tartom, viszont akkor a képződő 2-imidazolont az NMR spektrumban látni kellene. Ugyan mi szelektív ^{13}C jelölést alkalmaztunk, de a nagy mennyiségben jelen levő ionos folyadék jelei egyértelműen detektálhatóak. Ezek mellett a felírt folyamat során képződő 2-imidazolon jelei nem láthatók. Egyértelműbb volna, ha nem alkalmaznánk izotópjelölést, hiszen akkor a $\text{C}=\text{O}$, és a nagy valószínűséggel kicsit más eltolódású metil és etilcsoportok ^{13}C jelei is láthatóvá válnának – amennyiben ez a folyamat lejátszódik.

Budapest, 2023.03.12.

Bodor Andrea, PhD.Habil.
egyetemi docens