

Bírálat

Bodor Andrea „Az NMR spektroszkópia sokszínűsége fehérjék és kismolekulák világában” című MTA Doktori értekezéséről

Bodor Andrea MTA doktori értekezésében az NMR spektroszkópia szerteágazó területein végzett, különböző metodikai eljárások magasszintű alkalmazását igénylő imponáló kutatómunka eredményeit foglalja össze. Az NMR spektroszkópia az anyag- és molekulaszervezet atomi szintű kutatásának egyik leghatékonyabb eszköztárát foglalja magában. Ez különösen igaz az oldatfázisú vizsgálatokra, melyek a Jelölt tudományos kutatásainak az alapját képezik. A téma jelentősége megkérdőjelezhetetlen, az NMR spektroszkópia nélkülözhetetlen többek között a fizikai-, szerves-, szerves- és fémorganikus kémiai alap kutatásokban, az anyagtudományban, a szerkezeti biológiában, a gyógyszeriparban, környezetkémiaiában, az élelmiszeripart érintő minőség-ellenőrzésben. Fontos tényező, hogy a méret szerint széles tartományt felölelő molekuláris rendszerek szerkezeti és dinamikai sajátosságainak a vizsgálata az NMR spektroszkópia alapelvei szerint mérés technikailag is alapvetően különböző módszerek alkalmazását, adott esetben fejlesztését igényli. Az egyes problémákra keresett megoldások sikere nagymértékben a mérési módszerek, pulzusszekvenciák megválasztásán, esetleges módosításán, valamint a paraméterek beállításán múlik. Már itt ki kell hangsúlyozni, hogy mindezekben Bodor Andrea nagy szakértelemről ad tanúbizonyságot, egyértelműen birtokában van a szükséges fizikai és kémiai tudásanyagoknak.

Kutatásának célkitűzéseit 11 pontban fogalmazta meg. Az első 8 pont a fehérjék szerkezeti és hidrodinamikai tulajdonságainak a vizsgálatával kapcsolatos, mely kiemelt fontosságú a célzott terápiás hatóanyagok és módszerek fejlesztéséhez szükséges fehérje-kismolekula, fehérje-fehérje, és fehérje-membrán kölcsönhatások minél pontosabb megértéséhez. A 9-11 pontok a fenntarthatóság szempontjából fontos biomasza átalakításokban szerepet játszó szerves kismolekulák, a szacharóz, levulinsav, γ -valerolakton (GVL), 1,4-butándiol, 2-metil-tetrahidrofurán (2-metil-THF) kémiáját, valamint imidazólium-alapú ionos folyadékok oldószerként való alkalmazását érintik. A célkitűzések már önmagukban előrevetítik a disszertációban bemutatott kutatások és módszerek sokszínűségét, de a dolgozat áttanulmányozása után egyértelműen kijelenthető, hogy a Jelölt a sikeres megvalósításukhoz szükséges változatos kompetenciák birtokában van, imponáló, ötletesen és magabiztosan alkalmazott ismeretanyaggal rendelkezik az NMR spektroszkópia változatos alkalmazási és fejlesztési területein. Hozzá kell tenni, hogy a dolgozat alapját képező 18 színvonalas publikációban közölt eredményekből azokat tárgyalja, melyek a saját munkájából származnak, amire korrekt módon utalást is tesz. Az eredmények színvonalát és jelentőségét érzékelteti, hogy rangos nemzetközi folyóiratokban kerültek közlésre. Kiemelendő, hogy 2 publikáció az Angewandte Chemie-ben jelent meg. Ezek közül a 2022-ben megjelent cikk létrejöttéhez Bodor Andrea levelező szerzőként járult hozzá.

A több helyen színes ábrákkal illusztrált, kis betűmérettel írt dolgozat az elején római számokkal szereplő dícséretes Rövidítésjegyzéket és Tartalomjegyzéket leszámítva a Köszönetnyilvánítással együtt 129 oldal terjedelmű. Logikusan szerkesztett, igen nagy odafigyelést igénylő, szakmai igényességgel tömör formában megírt olvasmány. Az 1 oldalas bevezetést a 20 oldalt felölelő szakirodalmi áttekintés követi, melyben a Szerző áttekintést ad a munkája során felmerült szerkezeti és dinamikai problémák megoldásához szükséges NMR metodikákról, azok kiválasztásának szempontjairól, a kutatásainak fő fókuszában levő fehérjékről, peptidekről, speciális funkcionalitással bíró aminosav-szekvenciával jellemezhető szakaszokról, membránmimetikumokról, ezek különböző biológiai folyamatokban fontos szerepet játszó kölcsönhatásairól, valamint az NMR spektroszkópiának egy olyan felhasználási lehetőségéről, mely a fenntarthatóság szempontjából fontos biomasza átalakítás molekuláris szintű nyomonkövetésében alkalmazható ki. A 3 oldalas Célkitűzés után a vizsgált fehérjék expressziójáról és egyéb forrásokból történő beszerzéséről, valamint az NMR készülékekről, mérésekről és kiértékelésekről, az ahhoz szükséges fizikai kémiai összefüggésekről igényesen számot adó 10 oldalas Kísérleti rész következik. Egy, a dolgozat gerincét képező, 66 oldalt kitevő fejezetben logikus rendszerezéssel kutatási témák szerint 6 alfejezetre és több alpontra bontva kerül sor az elért eredmények bemutatására és értékelésére. Ezt követi a 8 oldalas „Összefoglalás és kitekintés” című fejezet, majd a 16 oldalas, az értekezés alapjául szolgáló, a kapcsolódó és egyéb

közleményeket felsoroló „Irodalomjegyzék”. Itt kell, megemlítenem, hogy a nagyszámú, és többnyire az utóbbi években megjelent cikk vonatkozó tartalmára utaló, a megfelelő szövegkörnyezetekben elhelyezett hivatkozások egyértelműen jelzik Bodor Andrea széleskörű tájékozottságát a saját kutatásait közvetlenül vagy közvetve érintő területeken. A dolgozatot a Köszönetnyilvánítás zárja.

A rangos nemzetközi folyóiratoknál szigorú bírálati eljárások során megmérettetett, szerteágazó témákból született eredmények színvonala és újdonságtartalma és a publikációkra kapott idézetek által is kimutatható jelentősége megkérdőjelezhetetlen. Ezeket lehetőleg tömör formában a következőkben igyekszem összefoglalni:

Dokumentáltan globuláris és rendezetlen szerkezetekkel jellemezhető fehérjéken végzett transzlációs diffúziós mérések segítségével megállapította, hogy a globuláris fehérjék viselkedése a gömbszimmetrikus molekulákéhoz, a rendezetlen fehérjéké pedig a szintetikus polimerekéhez mutat hasonlóságot.

Transzlációs diffúziós együtthatókat határozott meg, ezekből következtetéseket vont le fehérjék, ill. ezeken belül egyes régiók, kompaktságával, biológiai szempontból fontos kölcsönhatásokkal, többek között Ca^{2+} ionok által indukált alakváltozásokkal, valamint foszforiláció és aggregációs folyamatokkal kapcsolatban.

A mérések érzékenységét növelő, szelektív Ha-Ca korrelációkon és Ha -detektáláson alapuló, hatékony lecsatolást biztosító, 3D mérésekbe integrálható új pulzusszekvenciát dolgozott ki, és sikerrel tesztelt prolinban gazdag és ismétlődő szekvenciárszleteket tartalmazó rendezetlen fehérjéken.

Fehérjevázon belüli *cisz* és *transz* prolin izomerek azonosítására prolin-szelektív $\text{Ha} - (\text{Ca}, \text{C}\beta)$ és $\text{H}\delta - (\text{C}\delta, \text{C}\gamma)$ korrelációkat feltáró, proton-detektált 3D méréseket vezetett be és sikerrel alkalmazott prolin *cisz-transz* egyensúlyok tanulmányozásában. Megállapította, hogy ezt az egyensúlyt a szekvenciában közeli Arg, Lys, valamint aromás oldalláncot tartalmazó aminosavak jelentős mértékben befolyásolják.

Szerkezeti és molekuladinamikai vizsgálatok alapján következtetéseket vont le a p53TAD¹⁻⁶⁰ domén TAD1 és TAD2 régióin belül egyes szakaszok helicitására vonatkozóan. Ennek a doménnek az S100A4 fehérjével alkotott komplexén belül azonosította a kölcsönhatásban résztvevő és abból kimaradó szakaszokat. Megállapította, hogy a P53 fehérje TAD1 és TAD2 régiókat követő része mobilis, rendezetlen szerkezetű.

Igazolta, hogy a homodimer S100A4 Ca^{2+} -kötő fehérje és az MPT miozin IIA fragmens kölcsönhatása során a 45 aminosav hosszú MPT szakaszon belül szobahőmérsékleten nem alakul ki a coiled-coil szerkezet, valamint azt, hogy a fehérje homodimer jellege, vagyis az A és B monomer láncok ekvivalenciája a kölcsönhatás révén megszűnik.

Megállapította, hogy a filamentumok rendeződését a nem-izom miozin NMIIA esetében elsősorban az S100A4 fehérjével való kölcsönhatással míg az NMIIIB izoformánál a foszforilációval hozható összefüggésbe, igazolva azt a feltételezést, miszerint a filamentum összerendeződése és széttesése izoforma specifikus szabályozás alatt végbemenő folyamatok.

Igazolta, hogy a homodimer dinein könnyű lánc (DLC) és a miozin Va szakaszának kölcsönhatása következtében a nem kötött állapotában rendezetlen miozin peptid kötődéskor rendezett β -redő szerkezetet vesz fel. $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC és $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -CT-HSQC detektált telítésátviteli mérések segítségével kimutatta, hogy a DLC kötőárkain túlnyúló szakaszok az ún. molekuláris „ragasztó” elmélettel összhangban hidrofób kölcsönhatásokban vesznek részt.

Bizonyította, hogy az agy-specifikus tubulin polimerizációt segítő TPPP/p25 fehérje hosszú rendezetlen terminális szakaszokkal rendelkezik. Funkcionális vizsgálatok során proton-lecsatolt ^{31}P -NMR kinetikai mérésekkel kimutatta, hogy Mg^{2+} ionok jelenlétében a fehérje GTPáz aktivitást mutat, mely Zn^{2+} ionokkal csökkenthető.

Mechanizmus-vizsgálat céljából proton-lecsatolt ^{31}P -NMR mérésekkel követte a dUTP hidrolízisének időbeli lejátszódását majom retrovírus (MPMV) dUTPáz és Mg^{2+} ionok jelenlétében. Megállapította, hogy víz nukleofil támadása az aktiváló Mg^{2+} iont kelát gyűrűben tartalmazó egységen belül az α foszforatomon történik, valamint azt, hogy a folyamat kinetikáját leíró pseudo-elsőrendű állandó összevethető egyéb, dUTPáz által katalizált folyamatokra meghatározott értékekkel.

Felderítette, hogy Mg^{2+} ionok hiányában a hidrolízis lassabban játszódik le, és a víz nukleofil támadása a β foszforatomot érinti.

Több térerőn végzett ^{13}C relaxációs mérésekkel megbízhatóan jellemezte membránmimetikumok és peptid bicella rendszereken belül az egyes régiók flexibilitását a láncban belül elfoglalt pozícióik szerint.

Izotróp közeg feltételezése mellett végzett ^{31}P NMR relaxációs mérések segítségével eredményeket ért el peptidok felületaktív vagy transzmembrán jellegének kvalitatív meghatározásában. Megállapította, hogy transzmembrán peptid hatására a DHPC és DMPC foszfolinok reorientációs aktiválási energiája kismértékben csökken, amellyel, hogy az előbbi, 1,2-dihexanoil modellre nagyobb értékek adódtak.

NMR és kisszögű röntgenszórás metodikák komplementer alkalmazásával megállapította, hogy transzmembrán peptiddel való kölcsönhatások megnövelik a PC és a PC/PG bicellák méretét, míg felületaktív molekulák a méretekben nem okoznak szignifikáns növekedést.

A kismolekulás vizsgálatok terén jól bevált klasszikus NMR technikák alkalmazásával nagynyomású mérési körülmények között a biomasza átalakítás egy modelljeként követte a szacharóz energetikai és vegyipari szempontból fontos platform molekulákká, levulinsavvá, γ -valerolaktonná (GVL), 1,4-butándiollá, 2-metiltetrahidrofuránná és alkén szénhidrogénekké történő átalakítását, igazolta az összetett reakcióelegy komponenseinek a szerkezetét.

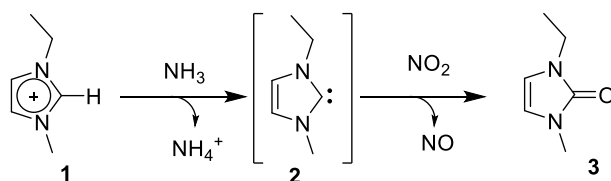
Szintén klasszikus NMR módszerek segítségével sikerrel követte nyomon a metilénsoporton ^{13}C -jelzett benzilalkohol oxidációját benzaldehiddé, mely reakciót CAN reagenssel a zöldkémiai elvárásoknak hagyományos szerves oldószerekkel jobban megfelelő imidazólium triflát alapú ionos folyadékban hajtottak végre. Kimutatta, hogy a reakció minimális mennyiségű melléktermékek képződése mellett jó konverzióval lejátsszódik, valamint az ionos folyadék/CAN arány növelésével a nitrogéndioxid képződése még magasabb hőmérsékleten is háttérbe szorítható.

Különböző hőmérsékleteken végrehajtott, jól megtervezett ^{13}C - és ^{31}P -NMR mérésekből kapott eredmények alapján racionális javaslatot tett két alkil-izocianát ciklooligomerizációs reakcióinak a mechanizmusára, igazolta egy átmeneti termékként képződő négytagú gyűrűs dimer és ^{13}C izotóp-jelzett izocianát modellel végzett ^{13}C - ^{31}P és ^{13}C - ^{13}C csatolást detektáló ötletes kísérlettel az egyik lehetséges nyíltláncú ikerionos intermedier szerkezetét.

A bírálóban a kivételesen tartalmas és színvonalas dolgozat olvasása közben a következő megjegyzések és kérdések fogalmazódtak meg.

- 1.) 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 biomasza összetételére vonatkozó szövegkörnyezetből a 20. oldalon, ahol „szénhidrogének” helyett „szénhidrátok” lenne a helyes meghatározás a hexozókra és pentozókra. (Tekintettel a dolgozat igen magas általános színvonalára ez az elírás bosszantónak is mondható.)
- 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.
- 3.) A szép színes ábrák meglehetősen gazdagok információban, de legtöbbször kis méretük miatt nagyon nehezen átláthatók, a rövidítésekkel alaposan megtűzdelt apróbetűs feliratok nem, vagy alig olvashatók. A 101. oldalon a benzilalkohol, benzaldehyd, benzilnitrát és benzoészav szerkezetén rossz helyen, a benzol gyűrű *ipso* szénatomján szerepel a ^{13}C izotópjelölés.

- 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 eltolódástartományai (200-300 ppm) jól elkülönül a fehérje láncban lévő rutinszerűen mért amid nitrogénekétől.
- 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 kínálkozhat-e elvi lehetőség arra, hogy ezt a folyamatot egyéb detekciós módszerrel időben nyomon kövesse?
- 6.) Annak tükrében hogy a CAN már 100-110 °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, *Thermochemica 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 imidazólium 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?



Összefoglalva, elmondható, hogy jól megszerkesztett, igényes kivitelezésű értekezésében a Jelölt egy rendkívül értékes, nemzetközi szinten mérve is kimagasló színvonalú, az NMR spektroszkópia változatos területeinek széles körét felölelő kutatómunkájáról, és annak eredményeiről számol be. Mivel kérdéseim elsősorban tájékozódó jellegűek, és a néhány kritikai megjegyzés messze nem kérdőjelezi meg a munka tartalmát, a tudományos eredmények újdonságát, színvonalát és jelentőségét, az értekezésben foglaltakat nyilvános vitára javaslom, és sikeres védelem esetén Bodor Andrea számára melegen támogatom az „MTA doktora” cím odaítélését.

Budapest, 2023. február 20.

Dr. Csámpai Antal
az MTA doktora