



Válasz Prof. Dr. Maróti Péter bírálatára

Először is nagyon hálás vagyok Maróti Péter professzornak, hogy vállalta a doktori disszertációm bírálatát, a disszertáció alapos átolvasását. Hálás vagyok a kritikai észrevételekért, amelyekben természetesen igaza van. Hálás vagyok, hogy olyan kérdéseket tett fel, amelyek arra kényszerítettek, hogy leássak a dolgok mélyére és amelyek által úgy érzem sikerült több megválaszolatlan kérdés megoldásához közelebb kerülnöm.

Pécs, 2024. 12. 12.

Lukács András





Address: Korányi fasor 9. Szeged, Hungary H-6720
Tel/fax: +36-62-545-077
e-mail: pmaroti@sol.cc.u-szeged.hu

OPPONENSI VÉLEMÉNY

dr. Lukács András

Fotoaktív flavoproteinek funkcionális fehérjedinamikájának vizsgálata ultragyors spektroszkópai módszerekkel

c. doktori disszertációról.

A biológiai rendszerek által elnyelt fény vagy szabadenergia formájában energetikai folyamatokat indít be, és tart fenn (pl. fotoszintézis) vagy a külvilág érzékelését, a sejtek viselkedését, és egyéb fontos életfolyamatait irányítja (pl. látás, cirkadián ritmus, fototaxis stb.). Ezek a hatások pigmentek vagy fényérzékeny fehérjék (pl. flavoproteinek) közvetítésével valósulnak. A flavinok és flavoproteinek tanulmányozása hosszú múltra, egészen 1933-ig nyúlik vissza, amikor Warburg és Christian felfedezte az Old Yellow enzimet, és a kofaktorát 1935-ben Theorell flavin mononukleotide gyanánt (FMN-ként) azonosította. A flavinfüggő fotoreceptorok 1993-as felfedezése újra felkeltette az érdeklődést a flavinok fotofizikája és fotokémiája iránt. A flavinfüggő fényérzékeny fehérjék és enzimek nagyon sokfélék lehetnek: DNS-fotoliázok, a kriptokrómok, a fény-oxigén-feszültség (LOV) fehérjék vagy kékfény-érzékelő FAD (BLUF) domén fehérjék. Széles területen fordulnak elő, és számos kritikus biológiai folyamatban vesznek részt, beleértve a DNS-javítást, a cirkadián ritmusok fotoszabályozását és a génexpressziót is.

A jelölt kutatásai (elsősorban ultragyors spektroszkópia alkalmazásával) ezekre a fotoreceptorokra összpontosítanak, amelyek kritikusak az optogenetikai alkalmazások megértésében is. Ezek a vizsgálatok olyan perspektívával kecsegtetnek, amelyek lehetővé teszik a sejtek viselkedésének fény általi szabályozását. Az elért eredmények mélyebb betekintést nyújtanak abba, hogy a fény molekuláris szinten hogyan befolyásolja a biológiai rendszereket, amely ismeretek hasznosak lehetnek az orvosi és biotechnológiai alkalmazásokra is. Vitán felül áll, hogy a jelölt modern, a tudomány frontvonalába tartozó témát választott.

Európa elismert laboratóriumaiban (Ecole Polytechnique Laboratoire d'Optique et Biosciences, University of East Anglia) kiváló szakemberek mellett dolgozott hosszabb ideig, és nagyon dicséretes, hogy hazajövele után az ott szerzett tapasztalatait itthon is hasznosította. Ez nem csupán a szakmai kapcsolatokra, hanem a mérőberendezések építésére és a fiatal kutatók képzésére is kiterjedt.

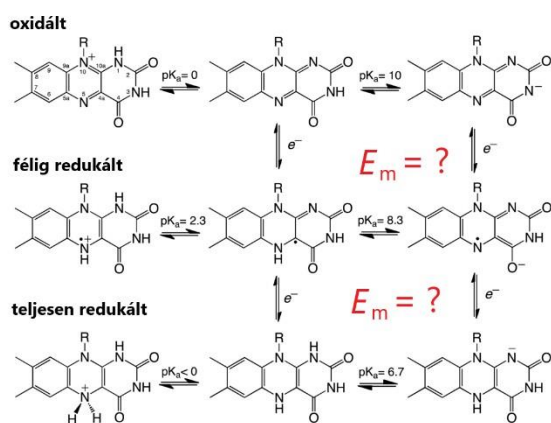
A jelölt eredményei kiváló kísérletes munkát tükröznek, amelyek igen tiszteletre méltóak, hiszen sokrétű, alapos, kitartó és inspiratív munkát igényeltek. Kissé szomorúan kellett megállapítanom azonban, hogy a jelöltnek nem sikerült a kísérleti (elsősorban az elektron- és protontranszferre, valamint azok csatolására vonatkozó) eredmények elméleti (termodinamikai) értelmezésével ehhez megközelítő magasságokba emelkednie. Természetesen lehet, hogy ez csak az én túlzott elvárásom volt a disszertáció kézbe vétele (helyesebben a pdf file feltöltése) előtt.

A jelölt tudományos és oktatói munkásságáról az MTA VIII. Biológiai Tudományok Osztálya 2023. szeptember 5-én kiadott összefoglalása szerint az összesen 56 tudományos és oktatási közleményére (ebből 44 folyóiratcikk, 10 konferenciaközlemény és 1-1 magyar ill. angol nyelvű könyvfejezet) 622 független hivatkozás történt, és a jelölt Hirsch indexe 19 volt. Az eltelt 1 év alatt ezek a tudományometriai jellemzők bizonyára emelkedtek. Mivel a habitus-vizsgálat ezeket az adatokat már elfogadta, így nekem ezen a területen nincs teendőm.

A disszertációban tett megállapítások többsége már megjelent előkelően rangsorolt nemzetközi kiadványokban, de alternatívák, más értelmezések, esetleg felületességek és egyéb észrevételek tapintatos kérdések formájában megjegyzés tárgyát képezhetik. Ezeket jól elkülönítetten lényegi és nem lényegi kategóriákba sorolom. A lényegi kérdések feltételénél igyekeztem a vonatkozó tézispontokra koncentrálni.

Lényegi kérdések

1) A flavinok redox állapotai



A flavinok képesek többszörös redox és protonációs egyensúlyi állapotban létezni. Ellentétben a szintén két elektronnal és két protonnal teljesen redukálható kinonokkal, a FAD vízdékony, ezért a köztes redox állapotait viszonylag könnyű előállítani. Fiziológiai körülmények között általában (így az értekezésben is) 5 redox forma szerepel: oxidált kinon, semleges szemikinon, anionos szemikinon, semleges hidrokinon és anionos hidrokinon.

- Hogyan képes a fehérje termodinamikai szempontból stabilizálni mind a semleges, mind az anionikus formákat?

A semleges és az anionos gyök stabilizálódása nagyon ritkán valósul meg a fehérjékben, ennek elérése érdekében glükóz oxidázban, vagy D-amino oxidázban nátrium hidroszulfát redukálószer hozzáadásával lehet akár a semleges, akár az anionos gyök állapotot stabilizálni.

Az egyetlen általam ismert eset, amikor a semleges gyök a natív fehérjében stabilizálódik, a fotoliáz (akár *A. nidulans*, vagy *E. coli*). Ebben az esetben a flavin N5 atomjához közeli aszparagin (N378) jelenléte stabilizálja a semleges gyök állapotot (Wijaya et al., *JACS*, 2016, 138). Ennek köszönhető az, hogy amikor ezt az aszparagint egy aszpartátra cseréltük, a FAD oxidált állapotba került (Müller, Brettel, Grama, Nyitrai, Lukacs, *ChemPhysChem*, 2016, 17).

- Az alapvető protonációs folyamatokhoz tartozó pKa értékeket a disszertáció tartalmazza (lásd pl. az 1.2 ábrát), de az elektrontranszfer energetikája szempontjából lényeges redox középponti potenciálokról (Em) nem tesz említést (vagy legalábbis nincs feltűnő helyen). Ezen mennyiségek ismerete is szükséges ahhoz, hogy az egyes redox-állapotok egyensúlyi koncentrációit meghatározhassuk. Sok esetben fontos lehet például a szemikinon és a hidrokinon formák egymás közti egyensúlyi eloszlásának meghatározása, de ide tartozik az oxidált és teljesen redukált formák közötti („kétlépcsős” vagy látszólagos) középponti potenciál ismerete is, amely a 2 elektronnal és 2 protonnal való teljes redukálás (vagyis a teljes biokémiai folyamat) szempontjából lehet irányadó.

E_m (FAD/FADH*) = -238 mV (Ishikita, J. Biol.Chem, 2007)

E_m (FAD/FAD*⁻) = -333 mV (Ishikita, J. Biol.Chem, 2007)

E_m (FADH*⁻/FADH⁻) = -333 mV (Ishikita, J. Biol.Chem, 2007)

- A teljes séma elméletileg sokkal bonyolultabb lehet, hiszen, ha csak az 1,3 és 5 helyeken szereplő 3 nitrogén protonálhatóságát nézzük, akkor ezekhez összesen 8 állapot tartozhat (1, ha mind protonált, 3, ha közülük 1 protonált, 3, ha közülük 2 protonált és 1, ha mindhárom protonált), azaz a fenti sémában minden sor nem 3 hanem 8 tagból áll. Milyen (véltetően a fiziológias viszonyoktól eltérő) E_m és pK_a értékek választásával lehet az ábrán szereplő fő átmeneteket biztosítani? Vannak-e olyan speciális környezeti hatások (oldószer polaritása, fehérjében való eltemettség/kitettség stb.), amelyek mégis kiemelnek egyes, a fenti sémában nem szereplő redox állapotokat?

2) Kísérleti elrendezés

- Hogyan győződött meg kísérletesen arról, hogy a gerjesztő flash valóban telítési, de mégsem túltelítési?

A nyaláb előtt elhelyezett ND filterrel állítottam a nyaláb intenzitását egészen addig, míg el nem értem a telítési intenzitást.

A fehér fényű mérő-flash nagy előnye, hogy vele azonnal spektrumot lehet felvenni, de esetleges hátránya lehet a minta részleges gerjesztése. Hogyan győződött meg arról, hogy ilyen veszély nem áll fenn?

A mérések során a korábbi és a jelenlegi rendszerben is két adatfile készül, az egyik, ami már a számolt abszorpció változás mátrixot tartalmazza. A másik file viszont az összes felvett spektrumot pumpa nélkül és pumpálással. Ebben ellenőrizni szoktuk a mért spektrum alakját, hogy fellép-e gerjesztés, mekkora a fluktuáció, beszűződik-e bármilyen más fény stb.

- Ha jól értettem a leírást, akkor a fehér mérőfény szélesebb területet világított meg a mintából, mint a gerjesztett terület. Hogyan lehet ilyen körülmények között a tényleges abszorpció-változást meghatározni?

A mérések elkezdése előtt érdemes optimalizálni a nyalábok méretét és azok átfedését, ezt egy speciális kamera segítségével tettük meg, amelyik ki is írja az átmérő nagyságát. Természetesen az a cél, hogy a nyalábok, amennyire lehetséges, átfedjenek; ez a valóságban nem így van, a sok optikán való áthaladást követően a gerjesztő nyaláb nem tökéletesen kör alakú. Ezért van az, hogy a próbanyaláb valamelyest nagyobb, mint a gerjesztő nyaláb átmérője. A kamerán való ellenőrzést követően egy a minta előtti mikrométer csavarral állítottam a gerjesztő nyaláb fókuszát mindaddig, amíg maximális abszorpcióváltozást kaptam.

Mellesleg az abszorpcióváltozás akkor is detektálható, ha a gerjesztő nyaláb átmérője jóval kisebb, mint a próbanyaláb átmérője, az abszorpció változás ugyanis a következő képlet alapján számolható:

$$\Delta A(\lambda) = -\log(I(\lambda)_{\text{van pumpa}} / I(\lambda)_{\text{nincs pumpa}}) \quad (\text{Berera, Grondelle, Kennis, } \textit{Photosynth Res} \text{ (2009) } 101:105-118)$$

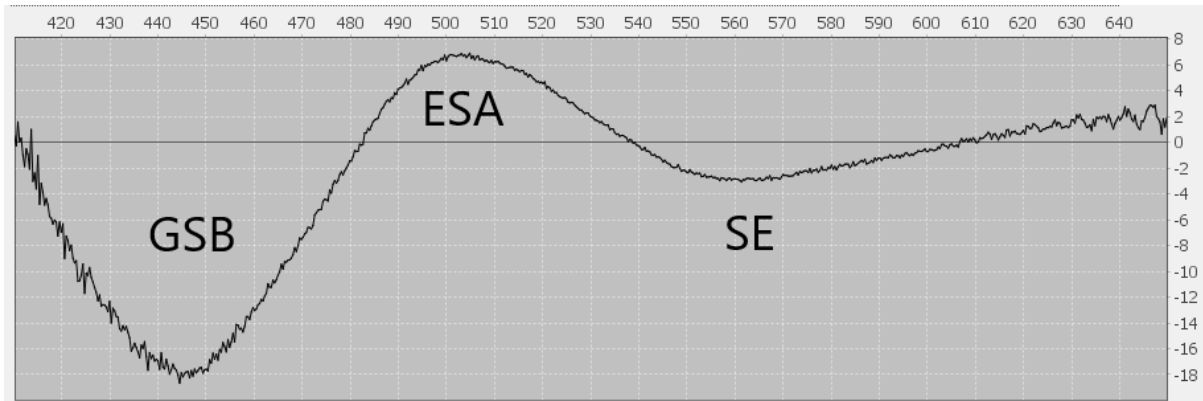
Ha a gerjesztő nyaláb túl kicsi (a próbanyalábhöz képest), akkor a pumpa okozta intenzitásváltozás is kicsi lesz, ennek megfelelően a számolt abszorpcióváltozás is. Ezzel a problémával nagyon korán szembesültem, amikor egy nagyon értékes mintát sikerült elveszteni annak következtében, hogy kicsi volt a gerjesztő nyaláb átmérője. Ezt követően a mérések előtt először ellenőriztem a nyalábprofil.

3) A FAD abszorpció-változás spektruma

- Milyen egységben mérték az abszorpcióváltozást? Feltételezhetően mOD-ben? Hogyan győződtek meg arról, hogy telítési volt az aktinikus flash?

Az abszorpcióváltozás valóban mOD-ban van megadva. A mérések előtt a teljesítményt és a kapott jelet ellenőrizni szoktuk, és egy a pumpa nyaláb előtt elhelyezett ND filterrel állítjuk be.

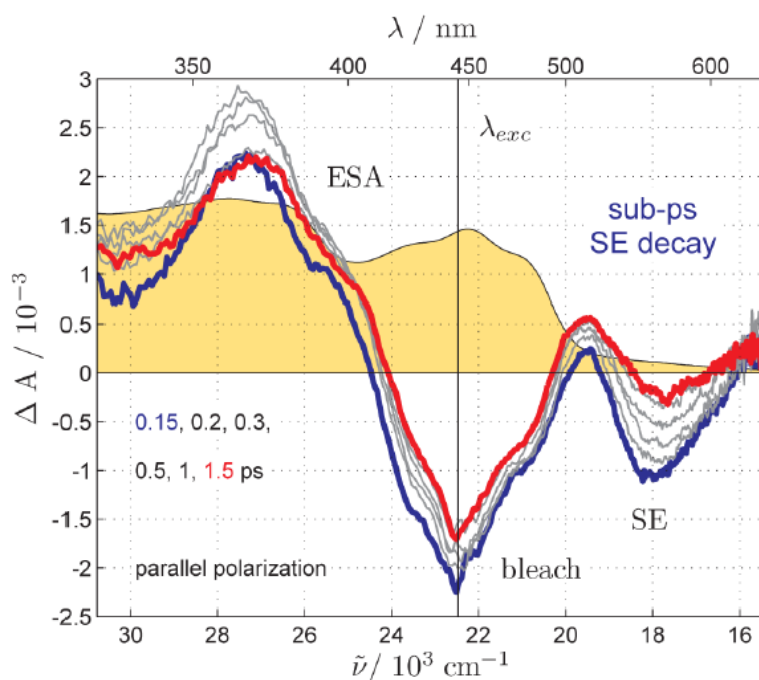
- A 2.7. ábra a FAD tranziens abszorpció-változás spektrumát mutatja. Nagyon jó jel-zaj viszonyal mért, viszonylag strukturálatlan spektrumot látunk. Ennek kialakításáért a jelölt 3 komponenst (GSB -



ground state bleaching, ESA – excited state absorption és SE – stimulated emission) tesz felelőssé, de az ezekre való felbontás a spektrum (többnyire aszimmetrikus) alakja, a komponensek maximum-helyei és a kísérleti körülményekről származó információ szükségessége miatt bennem néhány, a tisztább látás célját szolgáló kérdést vet fel:

- GSB: a FAD két közeli abszorpciós sávja közül az ábra a 450 nm körüli sáv kifakulását mutatja. Lehet-e hasonló kifakulást észlelni a 370 nm-nél található másik abszorpciós sávnál is?

Az én műszereim esetében ez sem elméletileg, sem gyakorlatilag nem volt látható, mert a fehér fény kontinuumnak (azzal a módszerrel, ahogyan én hoztam létre) gyakorlatilag már nem volt értékelhető intenzitása 400 nm alatt. 1200 nm körüli gerjesztéssel szélesebb fehér fény kontinuumot lehet létrehozni, és ezzel már az említett tartomány is vizsgálható. Az alábbi ábrán azonban látható, hogy ebben a tartományban viszont (a várakozásokkal ellentétben) nem kiféhéredés, hanem jelentős ESA figyelhető meg. Az itt bemutatott ábrát tartalmazó cikkben (Immeln, Weigel, Kottke, Pérez Lustres Primary Events in the Blue Light Sensor Plant Cryptochrome: Intraprotein Electron and Proton Transfer Revealed by Femtosecond Spectroscopy, J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12536–12546) a *Chlamydomonas reinhardtii*-ből származó kriptokrómra végeztek méréseket. A FAD ebben az esetben eredetileg oxidált állapotban van jelen.



- ESA: általában 500–600 nm között jelenik meg, de kiterjedhet akár a távolabbi vörös régióba is a gerjesztett (szingulett vagy tripllett) állapottól függően. Adott esetben kevésbé megalapozottnak érzem ennek az effektusnak az 500 nm körüli tartományra való lokalizálását.

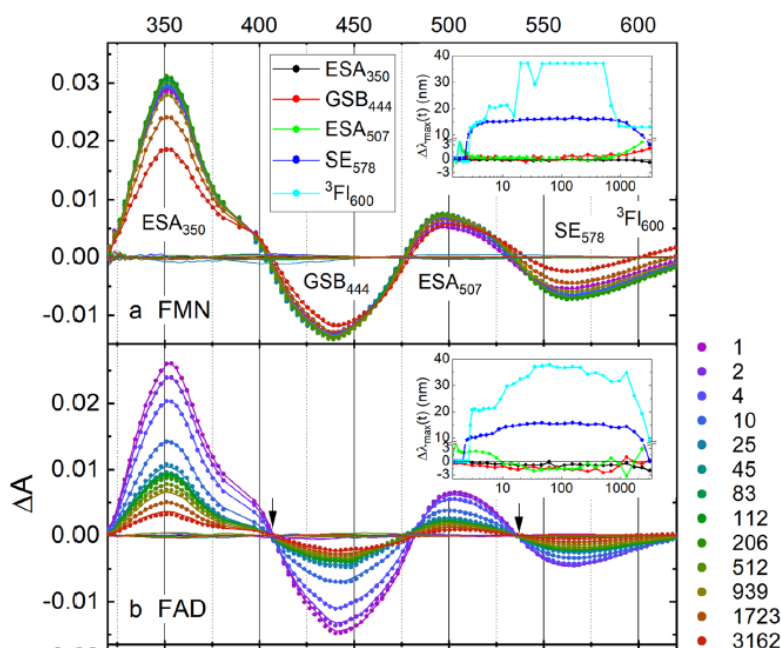
- SE: A FAD emissziója 500-600 nm között széles sávon következik be 525 nm maximummal. A kényszerített emisszióknak is hasonló spektrális tulajdonságai lehetnek. A megfigyelt abszorpció-változás alapján a stimulált emisszió maximumát (525 nm helyett) a jelölt 560 nm-nél feltételezi, míg az 500 nm körüli abszorpció sávot a gerjesztett állapot abszorpciójának tulajdonítja, holott a kényszerített emisszió már itt is részeseledést mutathat. Az átlapoló hatások miatt a kvalitatív megállapítások helyett a kvantitatív kiértékelés (komponensekre bontás) meggyőzőbb lenne.

– A viszonylag egyszerű összképet árnyalhatja azonban, hogy a körülményektől függően további komponensek is felléphetnek:

- a rendszerek közötti átmenettel formálódó *triplett állapot*, amely széles (500-700 nm) spektrumtartományt ölel fel,
- közbülső *foto-termékek*, amelyeket a fényindukált elektron transzfer vált ki,
- *töltés-transzfer (CT) komplex* állapotok a FAD és a környezete (a fehérje szomszédos aminosavai) között és
- a fény által létrehozott flavin (anion vagy kation) *gyökök*.

- Levonható-e minimálisan az a következtetés, hogy a GSB, ESA és SE effektusokon kívül más (fentebb felsorolt) hatás az adott spektrál- és időtartományban és kísérleti körülmények között nem lép fel?

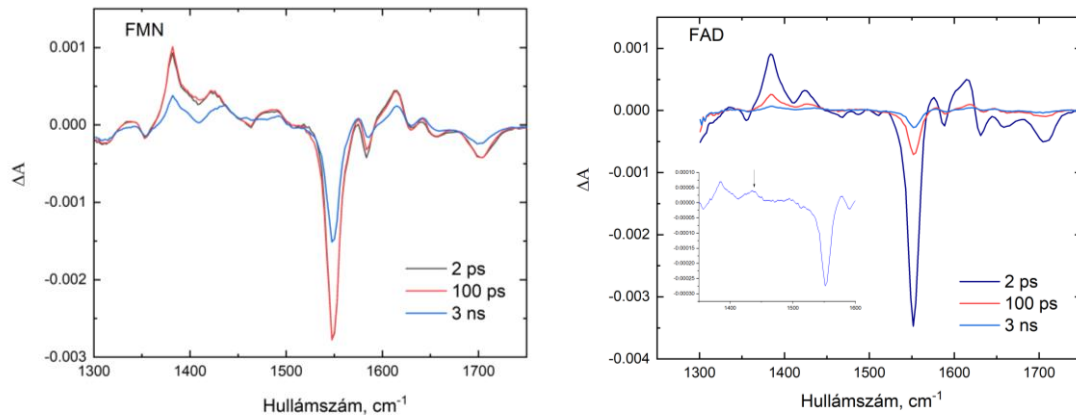
A bíráló megjegyzése jogos, valószínűleg az ESA spektrum sokkal szélesebb, és emiatt az SE spektrum nem tükörszimmetrikusan jelenik meg az emissziós spektrumhoz viszonyítva, egyben ez okozza a spektrum eltolódását az 570 nm felé. Annyi megjegyzésem lenne, hogy a flavinnal kapcsolatos irodalomban (lehet, hogy helytelenül) az 570 nm körüli tartományt konzekvensen SE tartománynak hívják, az ESA maximumát pedig 507 nm-nél rögzítik. Az alábbi ábrán sima FMN és FAD tranziens abszorpció spektrumai láthatóak az 1ps – 3 ns tartományban.



FMN (A) és FAD (B) tranziens abszorpció spektrumai (forrás: Morris et al., Photochemical & Photobiological Sciences (2022) :959–982)

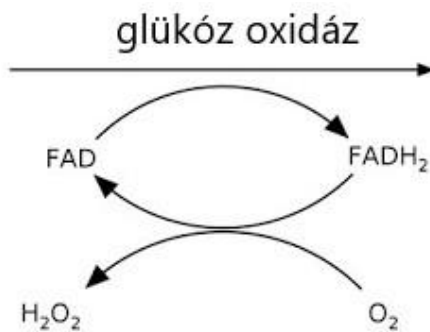
A kérdésekre válaszolva, a kiegészítő tranziens infravörös abszorpció méréseim alapján azt tudom mondani, hogy a FAD esetében csak ez a három folyamat (ESA, GSB, SE) figyelhető meg, nincs közbülső foto-termék, ezt támasztja alá a cikk, amelyikből a fenti ábra származik. A triplett állapot létrejöttében megoszlanak a vélemények: Morris és munkatársai szerint nem jön létre triplett állapot, saját méréseim alapján viszont azt mondanám, hogy az FMN-hez képest nagyon kis mértékben, de létrejön a triplett állapot. A triplett állapotnak a vibrációs markere az $\sim 1440 \text{ cm}^{-1}$ módus megjelenése. A bal oldalsó ábrán látszik, hogy ez 3 ns körül jelenik meg az FMN esetében. A

jobb oldalsó ábrán ez a csúcs nem látható, felnagyítva viszont látszik, hogy mégis csak jelen van, tehát kis mértékben, de itt is megjelenik.



4) Fényindukált csatolt elektron- és protontranszfer glükóz-oxidázban

A jelölt meghatározta a FAD vibrációs tulajdonságait a flavin 5 redox állapotában, valamint a tirozin (és a triptofán) gyököket markerként azonosította a kationikus és semleges állapotaiban. Kimutatta, hogy a glükóz oxidázban a tirozinnál a gerjesztéssel egyidejűleg előbb elektron kerül a flavinra ($FAD^{\bullet-}$), majd (kis késéssel) a proton is megérkezik semleges gyök állapotot ($FADH^{\bullet}$) létrehozva.

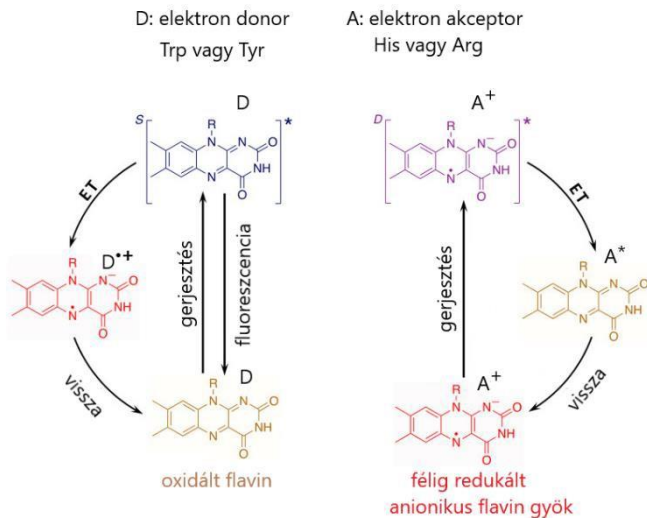


- A FAD a glükóz-oxidázban hatékony, de viszonylag lassú elektronátvitelt biztosít a szubsztrát (glükóz) és az oxigénmolekula között. Az esetünkben még a visszreakció is nagyon gyors, a ns időtartományba esik. Ennek ismeretében naiv kérdésként merül fel, hogy a megfigyelt ultragyors és fényindukált elektron- és protontranszfernek van-e bármiféle fiziológiai jelentősége ill. van-e egyáltalán kezdőlépésként kapcsolata a tényleges biokémiai folyamatokkal? *Ad absurdum*, a megfigyelt ultragyors folyamatok csak a struktúrából speciális kísérleti körülmények mellett kikényszerített, de az enzim valós

funkciójában soha meg nem valósuló lépések? A 3.1 fejezet minden más fehérjéről értekezik, de a glükóz-oxidázt egyetlen zárójeles mondattal elintézi.

A glükóz oxidáz – a flavodoxinhoz hasonlóan – számunkra csak egy modell rendszer volt, ami alkalmas volt arra, hogy a fotoindukált elektron transzfer jelenségét vizsgáljuk rajta. Amikor én elkezdtem vizsgálni, addigra már nagyon izgalmas ultragyors spektroszkópai kísérleteket végeztek mindkét fehérjén; elsőként a Mataga csoport (Mataga et al., *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104 (45), 10667-10677), majd később Zhong és mentora, Ahmed Zewail (Zhong és Zewail, *PNAS*, 2001, 11867–11872). A glükóz oxidáz vizsgálatának másik oka az volt, hogy Vincent Massey még a hatvanas években részletesen leírta, hogyan lehet redukálni a glükóz oxidázt és anionos, valamint semleges gyök állapotban stabilizálni. A korai ultragyors spektroszkópai kísérleteket követően továbbra is nyitott kérdés maradt, hogy melyik aminosav az elsődleges elektron donor.

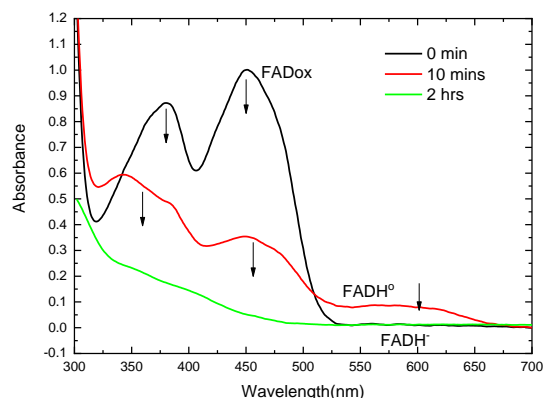
- A FAD elektrokémiai sokfélesége („Janus arca”) számomra igen elgondolkodtató (3.1 ábra): elektron donorként és akceptorként is működhet attól függően, hogy melyik redox állapotban éri a fénygerjesztés (Zhuang és mks. PNAS 2022). Ha oxidált állapotban volt, akkor redukálódik (ezzel a jelenséggel foglalkozik a jelölt), ha azonban részben (félig) redukált volt a gerjesztés pillanatában, akkor viszont oxidálódik. Ez két teljesen ellentétes folyamat, amelyekben teljesen más aminosavak (a flavin gyűrűkhöz képest) teljesen más elhelyezkedéssel vesznek részt (esetleg a fehérje konformációja is különböző), mégis a fotoredukció ill. a fotooxidáció hasonló



gyorsasággal (<100 fs alatt) megy végbe. Miért ennyire végletesen érzékeny a rendszer? Van ennek esetlegesen fiziológiai magyarázata? Hálás lennék, ha a jelölt a folyamatok energetikai (és esetleg fehérje-konformációs) hátterét meg tudná világítani. Mennyiben lehet a kiinduló (sötét) állapot kritikus elektrokémiai viszonyait egy vékony küvtáblában (esetleg többszörös megvilágítás alatt) megbízhatóan beállítani?

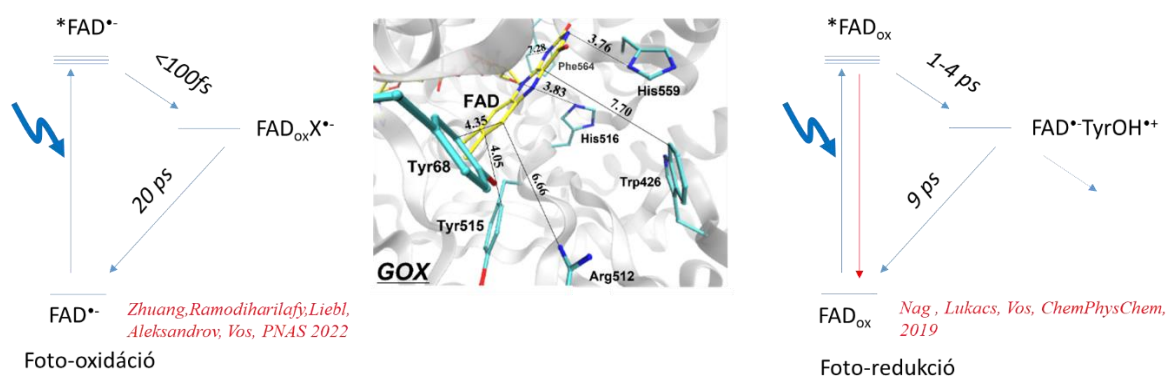
A flavoenzimek számos redoxreakciót katalizálnak a biológiában, melyek a flavin kofaktor megfelelő orientációját és elektrokémiai hangolását igénylik. A funkció szempontjából a flavin redoxpotenciálja kulcsszerepet játszik. A szabad flavin redoxpotenciálja 0,219 V pH 7,0-nál (Clark, 1960; Clark & Lowe, 1956). Ha a redox potenciálja nem változna az enzimhez való kötődéskor, nem lenne szükség a flavin elektrokémiájára. Az enzimek aktív helyei általában +100mV és -400mV között, egy 500mV-os tartományt átfogva, képesek modulálni a flavin redox-potenciált, amely lehetővé teszi, hogy a flavoenzimek különböző redoxreakciókat katalizáljanak. A fehérje funkcióját végeredményben a flavin redoxpotenciálja fogja meghatározni, mert ebből következik az, hogy milyen jellegű lesz a lejátszódó fotokémia.

Az a megállapítás, hogy „ha a flavin redukált volt a gerjesztés pillanatában, akkor viszont oxidálódik”, általában nem igaz. A fotolízis esetében például a FAD alapesetben (ha nem teszünk vele semmit az expressziót követően) félig redukált állapotban van, a flash-t követően pedig tovább redukálódik (FADH⁻). Ez a jelenség jól megfigyelhető például a tranziens infravörös abszorpciós mérések során. A glükóz oxidáz (GOX) esetében is, ha a fehérjében Massey módszerét követve (Massey, V.; Stankovich, M.; Hemmerich, P. *Biochemistry* **1978**, **17**), anaerob körülmények között, EDTA jelenlétében 10 perc megvilágítást követően létrejött a semleges gyök (FADH[•]) állapot, akkor a további megvilágítás tovább redukálta a FAD-ot és a FADH⁻ állapot jelenik meg.



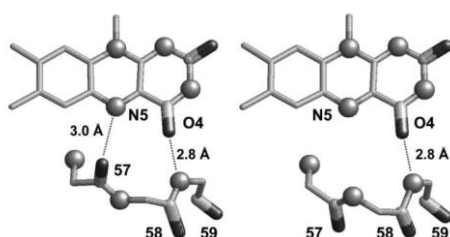
- A FAD két-elektron kémiaiát „csinál”, azaz két elektronnal és két protonnal tud teljesen redukálódni. Ezek a reakciók egymásra épülnek. Oxidált flavinból kiindulva az első flash után félig redukált anionikus flavin gyök keletkezik, amely (a visszreakció bekövetkezéséig) várja a második flash-t. A fenti séma alapján azonban a második flash hatására visszakerül az oxidált állapotába, ahelyett, hogy teljesen redukálódott volna. Ez annak a direkt következménye, hogy a flavin az első flashnél elektron akceptorként, a másodiknál pedig elektron donorként funkcionál. Így a két fotoreakció (tandembe kapcsolva) nemhogy egymásra épül, hanem egymást egyenesen kioltja. Hogyan tudná a jelölt ezt az ellentmondást feloldani?

A fenti példa egy nagyon ritka jelenséget mutat be; Bo Zhuang ebben a cikkben gyakorlatilag az összes olyan esetet feldolgozta, amikor az anionos gyököt sikerült a fehérjében stabilizálni, glükóz oxidázban, monomer szarkozin oxidázban (MOX), kolin oxidázban (COX) és D-amino oxidázban. A bemutatott összes esetben az anionos flavin gyök nem a gerjesztés hatására jött létre, hanem kémiai módszerrel (nátrium hidroszulfát segítségével) stabilizálták a fehérjében. Mindezekben a példákban az aktív régióban olyan pozitív töltésű aminosavak vannak, amelyek a szuperoxid gyök ($O_2^{\bullet-}$) stabilizálásában vesznek részt, valószínűleg ennek köszönhető, hogy a flavin anionos gyök is stabilizálható. A beérkező kék foton következtében pedig az anionos gyök valóban oxidálódik, de ennek is speciális oka van, és ebben játszik szerepet a szerkezet. Itt válaszolnék az előző kérdésre. A bemutatott fehérjék esetében a flavinhoz közel jelen van egy vagy több hisztidin, amelyek elektron akceptorként viselkednek, ez okozza az anionos gyök oxidációját.



Az általam bemutatott esetben a glükóz oxidázban a FAD oxidált állapotban volt, és a gerjesztést követően, a Tyr68-ról kapott egy elektront; így alakult ki az anionos gyök állapot (jobb oldali ábra). A Bo által vizsgált esetben (baloldali ábra) eleve anionos gyök állapotban volt, a gerjesztést követően adott egy elektront egy közeli hisztidinnak. A két esetben sem a flavin redoxállapota sem a redox potenciálja nem azonos.

A bírálónak igaza van, amikor a szerkezet szerepéről kérdez: gyakorlatilag a szerkezet végzi el azt a finomhangolást, aminek következtében a flavin redox potenciálja és ezáltal az egész fotokémia megváltozik. Az alábbi ábrán a *Clostridium beijerinckii*-ből származó flavodoxin mutáns (G57T) látható, amelyben a treoninnak két konformere van.



Attól függően, hogy a CO csoport közeli vagy disztális állapotban van, az FMN $Em(FMNH^+/FMNH^-)$

redoxpotenciálja -378 mV vagy -339 mV. Az 59-es pozícióban levő glutamát glutaminra való cseréje ugyanezt a redox potenciált 86 mV -tal növeli. (Ishikita, Influence of the Protein Environment on the Redox Potentials of Flavodoxins from *Clostridium beijerinckii*, *J. Biol. Chem.* **282**, 2007)

IR ujjlenyomat: a FAD anionos gyökét (FAD⁻) glükóz oxidázban nátrium szulfáttal való titrálás segítségével hozták létre, és vibrációs markerként 1517 cm⁻¹ hullámszámmal azonosították. Milyen vibrációs módusnak feleltethető meg? Kapcsolódik-e ehhez a rezgéshez polarizációban vagy szimmetriában bekövetkező változás, azaz hasonló ujjlenyomat jelenik-e meg a Raman spektrumban? Nem zavaró-e a markerként való azonosításban az, hogy a környezet dinamikájában különbség áll elő, hiszen a FAD⁻ állapotot ezekben a kísérletekben lassú kémiai egyensúly kialakításával állították elő, míg fotoreakcióval ultragyorsan keletkezik? Szükségét érzi-e, hogy ezeknek az IR sávoknak (vonalaknak) markerként való megjelöléséhez a rezgési módusban résztvevő kritikus (nem csak H-) atomoknak izotóppal való helyettesítését végezzék el?

Az említett 1517 cm⁻¹ vibrációs módust (fehérje-függő módon ez lehet 1518 cm⁻¹ vagy akár 1520 cm⁻¹) DFT számolásokkal a flavin gyűrű módusával azonosították. A számolások alapján azt feltételezték, hogy az intenzív 1548 cm⁻¹ módus (C10_aN1 nyújtó módusa) két, kevésbé intenzív csúcsra (1519 cm⁻¹ és 1484 cm⁻¹) hasad az anionos gyök esetén. A Raman spektroszkópiai kísérletek során ez a csúcs nemigen látszik; a legelső kísérlet során, ahol oldatban tudták mérni az anionos gyököt, egy 1498 cm⁻¹ csúcs jelenik meg (Su és Tripathi, *JACS*, **116**, 1994). Mizutani pikoszekundumos időfelbontású tranziens Raman-spektroszkópiai méréseiben (Fujiwara és Mizutani, *J. Raman. Spectrosc.* **39**, 2008) véleményem szerint látszik ez a csúcs, de ők ezt nem azonosították.

A glükóz oxidáz izotóp jelölése elég nehézkes lenne: először el kellene készíteni az izotópjelölt flavin származékot, ami önmagában nem könnyű. Ezeket számunkra Adalbert Bacher (Technische Universität München) és csoportja készítette el, így a flavin rezgési módusainak meghatározásakor [2-¹³C1]-FAD, [4,10_a-¹³C2]riboflavin, [U-¹³C₁₇]riboflavin, [U-¹⁵N₄]-FAD, [4-¹⁸O₁]-FAD flavin származékokat „illesztettünk” be az AppA nevű fehérjébe (Haigney, Lukacs et al., *Biochemistry* **50**, 2011; Haigney, Lukacs et al., *J. Phys. Chem. B.* **112**, 2012). A következő nagyon komoly probléma az lenne, hogy expresszálnunk kellene a glükóz oxidázt, hogy belerakhassuk az izotópjelölt flavint, de ez sokszori próbálkozásunk ellenére nem sikerült maradéktalanul. Annak ellenére, hogy ezt a módust valóban lassú kémiai egyensúly kialakítását követően figyeltük meg, több fehérjében is azonosítottuk ultragyors spektroszkópiai mérések során (Gil et al, *JACS*, 2017; Collado et al., *ACS Chem Bio*, 2022). Tillman Kottke és munkatársai step-scan FT-IR mérésekkel azonosították egyértelműen ezt a csúcst 1518 cm⁻¹-nél (Thöing, Oldemeyer, Kotteke, *JACS*, **137**, 2015).

- Játsszik-e szerepet, és ha igen, akkor milyen esetleges következményei vannak a fotoindukált elektron transzfer folyamatában az elektron- és a magmozgások között megnyilvánuló nem-adiabatikus csatolásnak? Modellezte-e esetleg ezt a kölcsönhatást?

Szerepet játszhat, mivel a rezgési relaxáció az elektron transzferrel (ET) azonos időskálán zajlik; ezért a mag átrendeződése nem követi szorosan az ET-t. A teljes elméleti leíráshoz teljes kvantumleírásra lenne szükség, és a Marcus-elmélet és azok utódjai (Moser-Dutton-vonalzó) a priori nem alkalmazhatóak. Én nem modelleztem ezt a kölcsönhatást.

- Mivel a vibrációs markerek szerint a tirozin mellett a triptofánok is részt vehetnek a FAD felé irányuló ultragyors elektrontranszferben, kérdésként merül fel a közöttük fennálló csatolás természete. Vannak-e superkicserélődésre (superexchange-re) utaló jelek?

A rövid válasz, hogy nincs erre utaló jel, legalábbis mi nem tapasztaltuk. Ennek oka, hogy a triptofánok a FAD-tól távolabb helyezkednek el, mint a tirozinok, és feltehetően csak a gerjesztett flavinok egy részében vesznek részt elektrondonorként. A lánc tehát FAD* → FAD*-TyrOH⁺ → FAD^o-TrpH⁺. Mivel a FAD*-TyrOH⁺ feltehetően energetikailag a FAD*-TrpH⁺ felett helyezkedik el, ez kétlépéses ugrási mechanizmusként írható le, és nem kell supercseré (ahol két ET-partner között egy magasabban

fekvő híd található). Következésképpen először a TyrOH⁺ figyelhető meg, és csak később a TrpH⁺. (Nag, Lukacs, Vos, *ChemPhysChem* 2019).

- A primer fotoreakció során a gerjesztett állapotú flavinból az anionos FAD és tirozin kation gyök pár jön létre: $FAD^* \leftrightarrow FAD^{\cdot-} + TyrOH^{\cdot+}$. Hálás lennék, ha ennek az alapreakciónak a legfontosabb termodinamikai jellemzőit meg tudná adni: mennyi (és milyen előjelű) a (Gibbs-féle) szabadenergia-változás (ΔG°), a reakció mennyiben entalpiikus jellegű (ΔH°), és ehhez hogyan viszonyul az entrópia növekedés ($T \cdot \Delta S^\circ$)?

A szabadenergia-változás a redox potenciálokból egyszerűen számítható:

$$\Delta G^\circ = e(E(TyrOH^{\cdot+}/Tyr) - E(FAD^{\cdot-}/FAD)) - \Delta E_{gerj} = 1.34 - (-0.33) - 2.5 = 0.83 \text{ eV}$$

Az entrópia kiszámolásával kapcsolatban bizonytalan vagyok, hogy hogyan kellene ebben az esetben értelmezni azt. A fotoliáz esetében a protonfelvétel entrópiáját alkalmazták (Zieba et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133) a számolás során, de az elsődleges lépésnél ez nulla lenne. Ha a bíráló erre gondolt, akkor az elsődleges elektron transzfer lépés jelentősen entalpiikus.

- A megfigyelt nagy ($>10^{13} \text{ s}^{-1}$) sebességű elektron transzfer csak nagyon közeli partnerek között alakulhat ki. Ha a Dutton-szabályt alkalmazzuk, akkor még aktiváció-mentesnek tételezett folyamat esetén is 3,3 Å távolság számítható, amely tovább csökken, ha ezzel a feltételezéssel nem élhetünk. Ha a fehérje szerkezetére tekintünk (3.2 ábra), akkor ilyen kis távolságban sem triptofánok (lásd Zewail munkáit), sem tirozinok (lásd a disszertációt) nem találhatóak. A jelölt által donorként feltételezett Y68 4,3 Å távolságban található. Mennyiben hozható összhangba a kísérlet, a szerkezet és az elektron transzfer (valamelyik) elmélete?

A 10^{13} s^{-1} sebességi állandó már a Dutton-Moser szabály felső határa; én a méréseim során ilyen sebességi állandót csak a flavodoxin esetében mértem. A glükóz oxidáz esetében három időállandót határoztunk meg (1 ps, 4 ps, 37 ps), ezek közül az 1 ps-os lépésben a populáció 70%-a relaxálódik. A Dutton-szabályt alkalmazva a képlet a következőképpen alakul: $\log(10^{-12}) = 15 - 0.6R$. Így a távolságra 5 Å jön ki, ami tulajdonképpen tökéletes megfelelés az Y68 FAD-tól való elhelyezkedésére nézve. A tirozin és a FAD közötti legkisebb távolság 4.3 Å, de ha a gyűrűk közötti távolságot nézzük, akkor 5 Å körül van, úgyhogy ez a megfelelés nagyon jónak tekinthető. Ha ennél kevésbé kedvező körülményeket képzelünk el, akkor donorként szóba jöhet még a W426 is, ahogyan ez a tranziens infravörös abszorpció méréseiből látszott is.

- Hasonló (vagy még fokozott) fenntartásaim vannak az ultragyors proton transzferre. Ennek szigorú energetikai és strukturális feltételei vannak. A protonmozgató erő a FAD^{•-} és a Tyr68 kation gyök (TyrOH^{•+}) pK_a értékeinek különbségével arányos. Az előbbi értékre nincs adat a disszertációban, az utóbbi értékre (hivatkozás nélkül) adott becslés -2. Mekkora lehet a protonmotoros erő?

A szerkezet alapján (3.10 ábra) nem nyilvánvaló a proton mozgás útvonala sem, hiszen a távolság nagyon nagy (5,5 Å), de sem szerkezeti víz, sem H-kötés-hálózat nem segíti a proton transzferet. Milyen módja lehet mégis az ultragyors protonátadásnak?

A megjegyzés teljesen jogos, szemmel láthatóan a proton transzferet nem segíti sem víz, sem hidrogénkötés. Ez volt a helyzet azonban a szintén vizsgált Trmfo esetében is, ahol ugyancsak megfigyeltük a FAD^{•-} protonálódását. A proton transzfer a glükóz oxidáz esetében is lehetségesnek tűnik a pK_a értékek alapján: a FAD^{•-} pK_a értéke 8.2 (Massey, V.; Palmer, G., *Biochemistry* 1966; Miura, *Chem Rec*, 1, 2001) a TyrOH^{•+} pK_a értéke pedig a már említett -2 (Dixon, W. T.; Murphy, D, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* 1976, 72, 1221-1230)

- A szekvenciális elektron- és protontranszfer mellett/helyett felmerülhet-e egyéb kombináció, mint együttes transzfer vagy megfordított szekvenciális sorrend, azaz a proton transzfer megelőzi az elektron transzferet?

Elméleti szempontból elképzelhető a gyors proton/lassú elektron transzfer is, de a fehérjék esetében általában mégsem ez valósul meg, ráadásul ezt a kísérleti adataink sem támasztják alá.

- Mekkora a flash-indukált elektron transzfer határfoka a vizsgált flavoproteinekben? Vételezem, hogy a jelölt méréseiből erre következtetni lehet, sőt, annak számos környezeti tényezőtől (aktuális redox-potenciáltól (az oxigéntartalomtól), pH-tól, hőmérséklettől stb.) való függését is meg lehet állapítani. A kérdésre adandó választ azért is tartom lényegesnek, mert a hatékonyságban (és sebességben) megfigyelhető változékonyság általában megnehezíti az elektron transzfer tulajdonságainak előrejelzését a biológiai rendszerekben.

Az fotoindukált transzfer határfoka többnyire nagyon alacsony volt: PixD esetében mintegy 6%-ot mértünk, OaPAC esetében 10 %-ot mértem, az AppA esetében az irodalom 24 %-ot adott meg (Gauden et al., *Biochemistry*, **44,2005**), a fotoliáz esetében is 20 % körül volt a határfok értéke (Byrdin, Lukacs et al, *J. Phys. Chem A*, **2010**).

5) Fotoaktiváció az *E. coli* fotoliázban

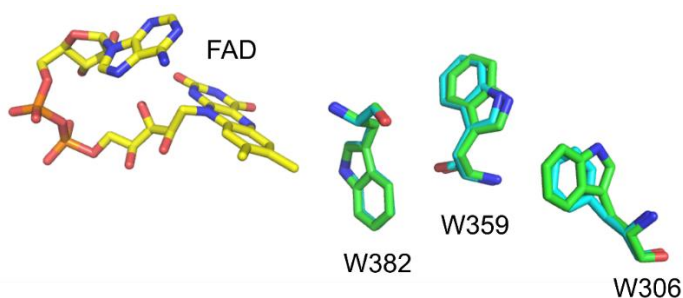
Az idetartozó tézispont: „**Polarizációs** tranziens abszorpciós kísérletek segítségével megállapítottam, hogy vad típusú fotoliázban a ~30 ps-os fázis után a pozitív töltés a W306-os triptofánon helyezkedik el. Így a FADH– W●+ töltéspár **stabilizálódása** a W306-ról a W359-en keresztül a W382-re történő elektron transzfer révén kevesebb mint 30 ps alatt történik.”

- Az *E. coli* fotoliáz fehérje szerkezetében mintegy 471 aminosav található, amelyek közül 7 triptofán. Ezek mindegyike hozzájárul a mért abszorpciós spektrumhoz, nem csupán az a „drótot” alkotó 3 triptofán, amelyeknek egymáshoz viszonyított helyzetét vizsgálják a polarizációs kísérletekben. Hogyan befolyásolják a kísérletek eredményeinek kiértékelését a fehérjéhez rögzített, így a fotoszelekcióban résztvevő egyéb aminosavak?

Az elektron transzfer láncban részt nem vevő triptofánok nem „látszanak” az abszorpciós spektrumban. A semleges triptofán gyök, valamint a triptofán kation gyök 520 nm illetve 580 nm körüli abszorpciós csúccsal rendelkezik. Azokban a triptofánokban, amelyek nem tagjai a „nanodrótnak”, nem jön létre a gyök állapot, vagyis ők nem nyelnek el a vizsgált tartományban.

- Az elvégzett polarizációs fotoszelekciós kísérletek alapja az volt, hogy a W306-os triptofán dipólusa nagyobb szöget zár be a FAD elektromos dipólusával, mint a W382 vagy a W359-es triptofán. A jelölt ezeket a szögeket W306 mutáns felhasználásával meg is határozta azzal a (ki nem mondott) feltételezéssel, hogy a mutánsban is a vad típusúval teljesen megegyező a molekulaszervezet. Rendelkezésre állt-e a mutáns kristályszerkezete ennek a feltételezésnek az alátámasztására?

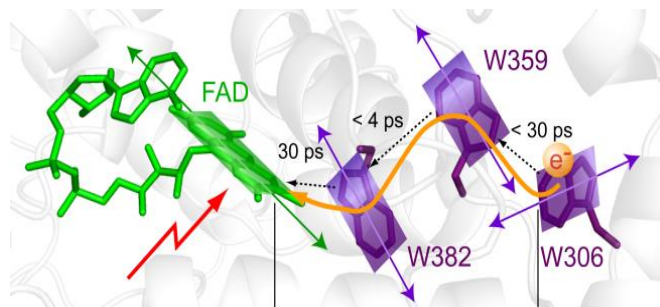
A kísérletek elvégzésekor végeztünk homológia modellezést az akkor elérhető szoftverekkel (Modeller, Andrej Sali lab). A válasz írásakor (lásd alábbi ábra) elvégeztem újra a W306F mutáns szerkezetének modellezését az Alphafold 3-mal, és az egyezés nagyon jó lett: a 382-es pozícióban lévő triptofánok tökéletesen, a 359-es pozícióban levő triptofánok pedig nagy mértékben átfednek. Valódi kristallográfiás méréseket sem mi, sem mások nem végeztünk egyik *E. coli* fotoliáz mutánsban sem.



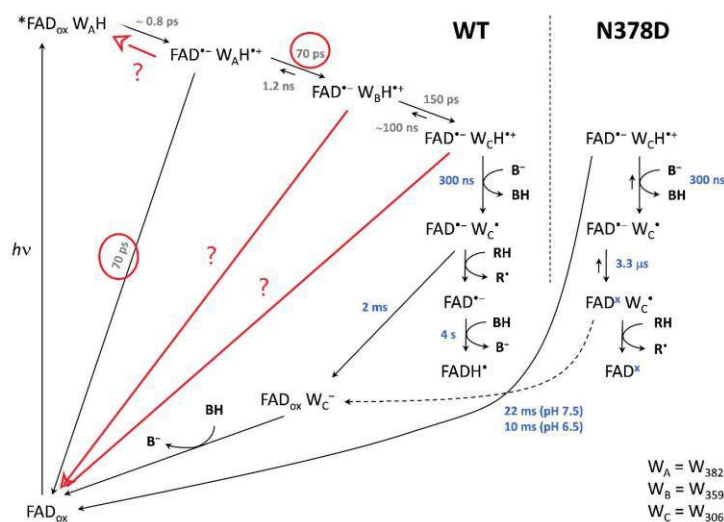
- Nem látom át teljesen világosan a mért anizotrópia (r) és az átmeneti dipólusok iránya között felhasznált összefüggést (55. old.). A jelölt a dipólusok irányát egyetlen paraméterrel (β) jellemzi, holott az abszorpcióban legalább két (mutáns) ill. három (vad típus) triptofán vesz részt.

Az anizotrópia és az átmeneti dipólusok által bezárt szög közti egyszerű összefüggés felhasználását tovább árnyalhatja az a lehetőség, hogy a dipólusok térben nem rögzítettek, hanem a fehérjeszerkezet által meghatározott (kötött, pl. megadott nyílásszögben egy kúppalást mentén) mozgást végezhetnek. Ennek mértékére a szerkezet és a dinamika együttes ismerete adhat választ. Mennyiben módosíthatja ennek a szabadsági foknak a bevezetése a kísérleti eredmények kiértékelését?

Az összefüggés mögötti elmélet Alfons Kowski cikkében van leírva részletesen (Kowski, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 23:6, 459-529). A mi esetünkben „csak” azt kellett megállapítanunk, hogy a gyök állapot a W359 vagy a W306 triptofánon stabilizálódik, a W382 triptofán ugyanis $< 4\text{ps}$ alatt redukálódik a W359 által (Lukacs et al., *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110). Természetesen ez egy dinamikus rendszer, de szerencsére ennek a két triptofánnak az esetében a dipólusok iránya annyira eltérő, hogy könnyű volt őket megkülönböztetni.



A 4.14. ábrára vonatkozó megjegyzéseim:



jönnek létre. Talán más biológiai rendszerről van szó?

1) Mennyiben jelent (gondolom energetikai) stabilizálást az elektronnak a „triptofán dróton” való végig futása, azaz az elektron hiányának (a pozitív töltésnek) W382- ről W359-en keresztül W306-ra történő eltolódása? Ennek mértékére a 4.14 ábra utalhat, de itt sincs a szabadenergia-változás feltüntetve.

A dróton való végigfutás 0.75 eV szabadenergia változással jár, a részletes adatokat a 3. pont alatt mutatom be.

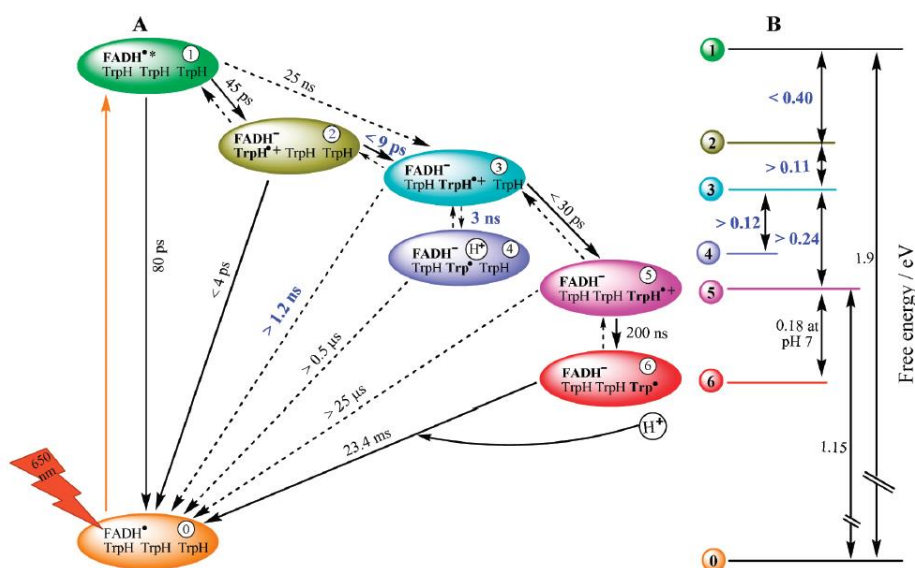
2) A fent idézett tézispontban az átfutás idejére $< 30\text{ps}$ szerepel, ám ezt a 4.14 ábrában megjelölt értékek nem támasztják alá, mert ott az első töltéspár sokkal gyorsabban, a többiek pedig

sokkal lassabban.

A megjegyzés jogos, az eltérés oka, hogy a tézispontban és a kutatásaim jelentős részében a vad típusú fotoliázban a FAD félig semleges gyök állapotban van, ahogyan tisztítás után az oszlopról „lejön”. A szóban forgó ábra speciális eset, ebben az esetben ugyanis egy imidazolos inkubációval lehetett elérni, hogy a FAD oxidált állapotban legyen. Ez esetben a mért állandók természetesen mások voltak. Az „igazi” vad típusú fotoliáz esetében az átfutás valóban közel 30 ps alatt valósul meg (Aubert et al., *Nature* 2000; Lukacs et al., *J. Phys.Chem.*, 2006; Lukacs et al., *JACS*, 2008).

3) A véleményem szerint, az „igazi” stabilizálódást (a szabadenergiában gyakorlatilag irreverzibilis változást) a kapcsolt protonációs folyamatok, elsősorban W306-nak az oldatba való protonleadása jelenthetik. A triptofánok ultragyors szekvenciális redox-változásai csak csekély, reverzibilisnek tekinthető szabadenergia-változást okoznak.

Méréseink szerint maga a deprotonáció csekélyebb szabadenergia változással jár, mint a triptofánokon való „ugrálás”, mindössze 0.18 eV, a nagy szabadenergiaváltozás a töltés rekombináció során következik be, ennek a folyamatnak az időállandója 23.4 ms. A pontos értékeket az alábbi ábra foglalja össze röviden. Az ábrát a Byrdin, Lukacs et al., Quantum Yield Measurements of Short-Lived Photoactivation Intermediates in DNA Photolyase: Toward a Detailed Understanding of the Triple Tryptophan Electron Transfer Chain, *J. Phys. Chem. A*, 2010 cikkünk részletezi. A kérdések alapján belátom, hogy a cikkben közölt adatok segítettek volna az ismertetett eredmények megértését. A disszertációban azonban csak azokat a cikkeimet ismertettem, amelyekben első vagy utolsó szerző voltam, ezért ez a fontos cikk kimaradt. A 3212. oldalon szerepelnek a folyamat összes lépésére vonatkozó időállandó, sebesség és ΔG adatok.



4) Mind a vad típusban, mind az N378D mutánsban ugyanakkorának tűnik a terminális FAD^{•-} W_CH^{•+} gyökpár képződésének kvantumhatásfoka, holott a jelölt ezeket 65% ill. 50% értéknek feleltette meg. A két minta kinetikai sémájában a különbség (elágazás) csak egy kései fázisban, a terminális triptofán deprotonációját követő eseményekben van.

A megjegyzés jogos, erre az eredeti cikkben kitértünk (Müller, Brettel, Grama, Nyitrai, Lukacs, *ChemPhysChem* 2016,17): a különbség annak köszönhető, hogy a vad típusú fehérjén végzett mérés lépései egy ultragyors rendszerrel végzett kísérletből lettek kiszámítva, a mi (flash-fotolízis) kísérleti elrendezésünkkel ezeket a lépéseket nem lehet felbontani.

5) Szerintem a megadott kvantumhatásfok értéke még ennél is kisebb lehet, mert már az első gyökpár esetén a vissz- és előrehaladó sebességek megegyeznek $(70 \text{ ps})^{-1}$, ami eleve 50%-ban limitálja a hatásfokot, és még az ezt követő lépésekről, valamint a primer pár rekombinációjáról (nincs feltüntetve) nem is beszéltünk.

Ez elképzelhető, de itt „hozott” anyagból dolgoztunk; a vad típusra vonatkozó mérések tekintetében Liu és munkatársainak a mérésére kellett támaszkodnunk (Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2013**, **110**). Az tény, hogy a normál vad típusú fotoliáz esetében, ahol kiinduláskor a FAD semleges gyök állapotban van, a kvantum hatásfok 20% körüli (Byrdin, Lukacs et al., *J. Phys. Chem. A*, **2010**, **114**).

6) Próbáljuk meg a terminális triptofán gyök ($W_C H^{\bullet+}$) deprotonálódásához tartozó disszociációs állandót a mérési adatokból kiszámítani! A mért disszociációs sebességállandó $k_{off} = (300 \text{ ns})^{-1} \approx 3 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$. A bekötési sebességállandót a diffúzió határolt bimolekuláris ütközés alakítja ki: $k_{on} = k_{diff} [H]$, ahol $k_{diff} \approx 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ és $[H]$ a bulk fázis H^+ -ion koncentrációja. Ha $\text{pH} = 7$ reális értéket veszünk, akkor $k_{on} \approx 10^3 \text{ s}^{-1}$ érték adódik. Ezekből a disszociációs egyensúlyi állandó $K = k_{off}/k_{on} \approx 3 \cdot 10^3$, ennek negatív logaritmus a $\text{pK} \approx -3,5$. Ezzel szemben a $\text{TrpH}^{\bullet+}$ pK_a értékére $\sim +4$ becslés szerepel az irodalomban (Posener, M. L., Adams, G. E., Wardman, P. & Cundall, R. B. Mechanism of tryptophan oxidation by some inorganic radical anions: A pulse radiolysis study. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1.* **72**, 2231–2239 (1976)). Hogyan lehet ezt az ellenmondást feloldani?

Az ellentmondás feloldása az, hogy a proton akceptor nem a H^+ , hanem a H_2O , így valóban kijön a megfigyelt és validnak tekinthető pK érték (~ 4) a $\text{TrpH}^{\bullet+}$ esetén. Ezt az eredeti Nature cikk – amelyben a Brettel–Vos mechanizmust ismertették – részletesen tárgyalta az 588. oldalon. Ennek megfelelően az eredeti feltételezés az volt, hogy két proton akceptor lehetséges: az egyik a Tris puffer, a másik pedig a H_2O . A Tris növekvő koncentrációja gyorsítja a $\text{TrpH}^{\bullet+}$ deprotonálódását, és ez a felgyorsulás sokkal kifejezettebb $\text{pH} 8,4$ -nél, mint $\text{pH} 7,4$ -nél (3d. ábra), ami azt mutatja, hogy a nem protonált Tris a domináns proton akceptor a Tris magas koncentrációjánál. A nulla Tris koncentrációra történő extrapolációból a deprotonálódási sebességi állandó (k_d) kb. $5,3 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$, amelyet a $\text{TrpH}^{\bullet+} H_2O$ felé való deprotonálódásnak tulajdonítottak. Feltételezve, hogy a deprotonálódó $\text{TrpH}^{\bullet+}$ pK értéke ~ 4 a fotoliázban, ez a sebességi állandó összhangban van a $k_d = k_r 10^{-\text{pK}} \text{ s}^{-1}$ összefüggéssel. 20 mM-os Tris koncentráció esetében (amit a kísérletek során használtak), a H_2O -nak még mindig a domináns protonakceptornak kell lennie (lásd a 3d. ábrát). A pH -értéket 5,4 és 8,5 között változtatva 20 mM puffer mellett a deprotonálódás kinetikája (3e. ábra) és amplitúdója lényegében állandó volt, ahogy a H_2O ($\text{pK} = -1,7$) mint protonakceptor esetében ez várható volt. A bíráló által elvégzett számolást a víz koncentrációjával megismételve a $\text{TrpH}^{\bullet+}$ pK_a értéke $+ 3,2$, ami már közel van az irodalmi értékhez.

Releváns tézispont: „*Tranziens abszorpciós mérésekkel sikerült feltárni, hogy a flavin N5 atomjához közeli aszparagin aminosav aszpartátra való cseréje nem elegendő ahhoz, hogy a fotoliáz növényi kriptokrómként viselkedjen.*”

- A negatív megállapítás a tézispont erősségét csökkenti. Arra mindenesetre alkalmas, hogy az olvasó tovább vigye a gondolatot: ha a N378D mutáció hatástalan, akkor valójában mi szükséges ahhoz, hogy a fotoliáz növényi kriptokrómként viselkedjen?

A kiinduló kérdésem az volt ebben az esetben, hogy a nagy homológia miatt miért más a funkciója a kriptokrómoknak és a fotoliázoknak. Az összes kísérlet abba az irányba mutatott, hogy a kulcsszereplő növényi kriptokrómok esetében egy aszparaginsav, rovar kriptokrómok esetében pedig egy cisztein. Elsődleges váromlásom az volt, hogy az aszparagin/aszpartát csere kriptokrómmá konvertálja a fotoliázt, legalábbis a fotokémiát tekintve. Ez nem történt meg. A dolgozatban – mivel ezek még publikálatlan adatok – nem számoltam be arról, hogy viszont a N378C mutáció következtében a

fotoliáz fotokémiai szempontból rovar kriptokrómként viselkedik. Természetesen ez a hasonlóság csak a fotokémiára vonatkozik, mivel a fotoliáz nem tartalmazza a CTT (C-termina tail) régiót, amely a kriptokróm funkciójához szükséges.

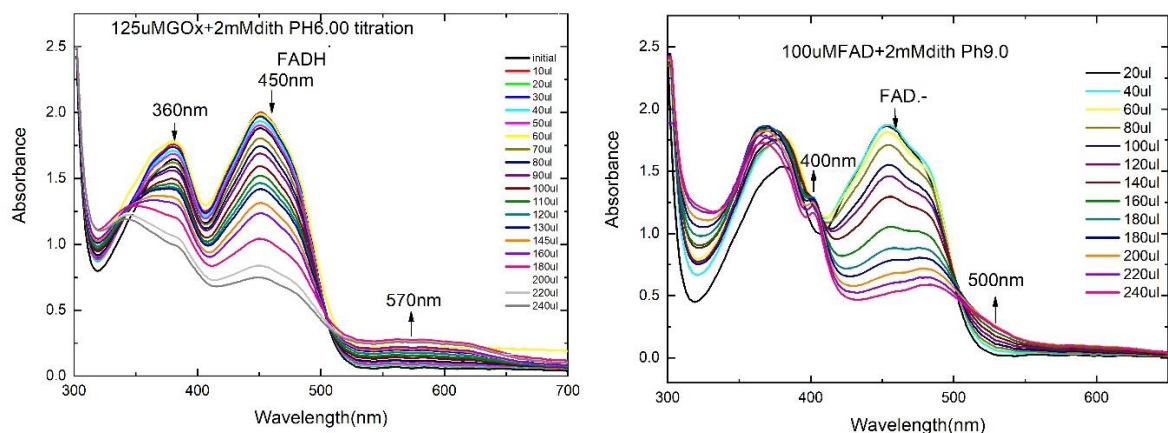
2024 júliusában tranziens infravörös abszorpciós méréseket végeztünk vad típus *Drosophila* kriptokrómon, illetve egy olyan mutáns, ahol az N5 atomhoz közeli ciszteint aszparaginra cseréltük (dCry C416N). Ezzel a mutációval fotokémiai szempontból fotoliázzá konvertáltuk a kriptokrómot, aminek az az izgalmas következménye lett – az előzetes eredményeink alapján –, hogy nem következik be a CTT-nél megfigyelt strukturális változás.

- A hatékony fotoaktivációt szolgálja az elektron transzport lánc megnyújtása, a fény indukálta gyökök stabilizálása, beleértve a $FAD^{\bullet-}$ gyors ($\sim \mu s$) protonfelvételét (különlegesen gyors a növényi kriptokrómok esetében), vagy az ET-lánc utolsó tagjának gyors (sub-ns, ns) deprotonációját. Ez utóbbi lehetőség proton akceptorok jelenlétével érhető el. Megfigyelhető-e az ET lánc terminális tagja mellett deprotonált aminosav (pl. deprotonált aszparaginsav vagy glutaminsav) vagy egy, a környező pufferrel kommunikáló strukturált vízmolekulák klasztere?

A W306 triptofán közelében található egy víz molekula, nyilván ennek köszönhető a hatékony deprotonáció.

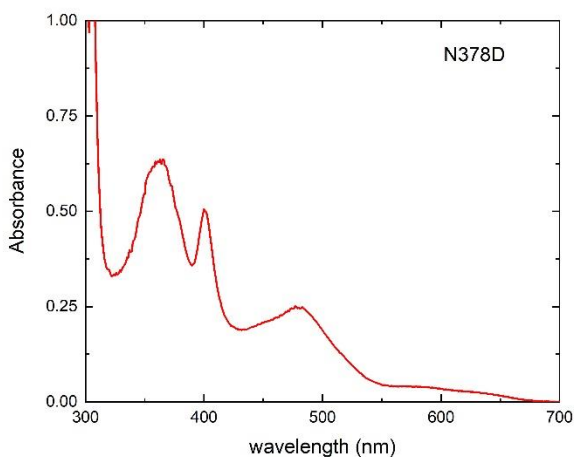
- Általános kérdésként merül fel bennem, hogy a szerteágazó protonációs folyamatok sztöchiometriai vagy kinetikai vizsgálatára miért nem alkalmazott sehol sem rutin fiziko-kémiai módszereket, mint pl. pH-titrálást (egy helyen azonban láttam: 5.22 B ábra) vagy (abszorbeáló esetleg fluoreszkáló) pH-indikátorokat. IR indikátorokkal (markerekkel) lépten-nyomon, pH-indikátorokkal sehol sem találkoztam a disszertációban.

A bíráló teljesen jogos. Annyit jegyeznek meg, hogy a terjedelem csökkentése érdekében igyekeztem a (számomra) kevésbé fontos dolgokat kihagyni, és elsősorban arra tettem a hangsúlyt, ahol úgy éreztem, hogy nagyobb volt a hozzáadott érték. Elfogult módon tehát a lézeres/szoftveres fejlesztésekre, műszerekre jóval nagyobb hangsúly jutott. Beillesztenék azonban két titrálást, ahol végül sikert értünk el a félig redukált állapot, valamint az anionos gyök állapot stabilizálásában glükóz oxidáz esetében. Ez kezdetben nem volt könnyű, mivel nem állt rendelkezésünkre az anaerob kísérletekhez szükséges fülke, argon palack stb. Végül egy glove-bagben sikerült mindezt megoldanunk. Mivel a titrálást oxigénmentes környezetben kellett végrehajtani, hosszú ideig próbálkoztunk, míg rájöttünk, hogy ehhez az összes oldatot és a fehérjét, sőt sokszor magát a fotométert is a glove-bagben kell tartanunk folyamatos nitrogén áramoltatás mellett. A glükóz oxidáz oxigénmentesítéséhez nem volt elegendő a nitrogénes buborékoltatás a glove-bagben, hanem előtte szonikátorral rázattuk fél órán keresztül, aminek következtében a csapdázott buborékok jelentős részétől megszabadultunk. Ennek eredménye a következő két mérés.



A baloldali ábra esetében 2mM nátriumhidroszulfát oldattal titráltuk a foszfát pufferben (pH 6.0) oldott glükóz oxidázt. Az 520-620 nm közötti tartományban megjelenő széles plató jelzi a FAD félig

redukált állapotának kialakulását. A jobb oldali ábra esetében szintén foszfát pufferben (pH 9.0) végeztük a titrálást. A 400 nm-nél megjelenő éles csúcs az anionos állapot létrejöttét jelzi. Ennek megfelelően jól látszik (lásd az alábbi ábrán), hogy folyamatos megvilágítás mellett az N378D fotoliáz mutánsban az anionos gyökhöz nagyon hasonló állapot jön létre.

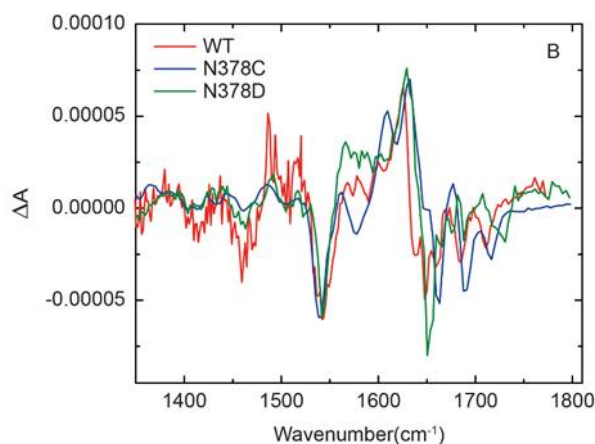


- Milyen munkahipotézis alapján volt várható, hogy a flavin N5 atomjához közeli aszparagin (N, nem protonálható) aminosavnak aszpartát (D, protonálható) aminosavra való cseréje (N378D) felgyorsítja a $\text{FAD}^{\bullet-}$ protonfelvételét? Vélelmezhetően, D (oldatbeli pK_a -val számolva) semleges pH-n már eleve deprotonált, és a távolság (3,3 Å), valamint az útvonal sem ideális a gyors D \rightarrow FAD protontranszferre. Továbbá, 1) a saját mérésük szerint a $\text{W}_c\text{H}^{\bullet+}$ deprotonálódásának kinetikáját sem befolyásolta az N378D mutáció, 2) készült-e szerkezeti kép az N378D mutánsról, amely D-nek a FAD-hoz való elhelyezkedését mutatná?

A mutáció olyan kevésbé átlátható beavatkozást jelentett, amelyek értelmezésére adott modell (élén a misztikus FAD^x redox állapot bevezetésével) számomra túlzottan bonyolultnak tűnik.

A FAD^x állapot bevezetésével kapcsolatban nem volt teljes a harmónia közöttünk. Pavel Müller korábban már használta ezt a megnevezést, és itt is ezt tartotta jó megoldásnak. A dolog tisztázása érdekében végeztünk pár előkísérletet EPR-rel, aminek alapján, és az előző kérdéshez beillesztett ábra alapján nekem úgy tűnik, hogy ez egy $\text{FAD}^{\bullet-}$ állapot, de ez a kérdés még nincs lezárva.

A munkahipotézis Tillman Kottke cikkei alapján (Anika Hense, Elena Herman, Sabine Oldemeyer, and Tilman Kottke: Proton Transfer to Flavin Stabilizes the Signaling State of the Blue Light Receptor Plant Cryptochrome, *JBC*, 290, 1743–1751, 2015; Dominik Immeln, Alexander Weigel, Tilman Kottke, and J. Luis Pérez Lustres, Primary Events in the Blue Light Sensor Plant Cryptochrome: Intraprotein Electron and Proton Transfer Revealed by Femtosecond Spectroscopy, *JACS*, 134, 12536–12546, 2012) az volt, hogy az aszpartát protonálja az anionos FAD gyököt. A disszertációban ezt nem ismertettem, mivel publikálatlan eredményekről van szó, de itt közreadnám a lényeges megfigyeléseket, amelyeket tranziens infravörös mérésekkel tettünk. A méréseimből nekem úgy tűnik, hogy az aszpartát pK_a értéke a fehérjében sokkal magasabb, mint oldatban. A TRIR spektrumokból arra következtettem, hogy a gerjesztéssel egyidőben (vagy azt megelőzően) hidrogénkötés jön létre az aszpartát és a FAD között, ezért jelenik meg a vad típusnál és az N378C mutánsnál nem megfigyelhető 1730 cm^{-1} -es vibrációs módus.



6) BLUF domén fehérjék

- A BLUF domének az egyik leggyorsabb fényvezérelt kapcsolók a természetben, és a stimuláció után másodpercekig vagy akár percekig is aktívak maradnak. Tengernyi részletet sikerült már felderíteni (ehhez a jelölt munkássága is jelentékenyen hozzájárult), de átfogó és koherens képpel (a nem hozzáértők számára is feldolgozható formában) még nem találkoztam. Számomra (alap)kérdésként merül fel, hogy a metastabil imidinsav-tautomer specifikus hidrogénkötéseivel hogyan váltja ki a konformációs kapcsolót, és hogyan stabilizálódik megfelelően ahhoz, hogy fenntartsa a hosszú élettartamú jelátviteli állapotot, amely képes különféle fiziológiai válaszok elindítására.

A BLUF domén fehérjéken végzett megfigyeléseim alapján azt gondolom, hogy a tautomerizáció „csak” egy kezdeti perturbáció, ami a C-terminálisnál olyan konformációt hoz létre, amely alkalmas a fehérje funkciójának megvalósulására.

- Tekinthető-e a BLUF fotoaktivációjánál az abszorpciós spektrumban megfigyelhető vörös-eltolódás úgy, mint a foton energiájának részleges átalakulása a flavinkötő zsebben kialakuló hidrogénkötések számának növekedésére? Ha igen, végzett-e kvantitatív vizsgálatokat az energetikai részletek felderítésére?

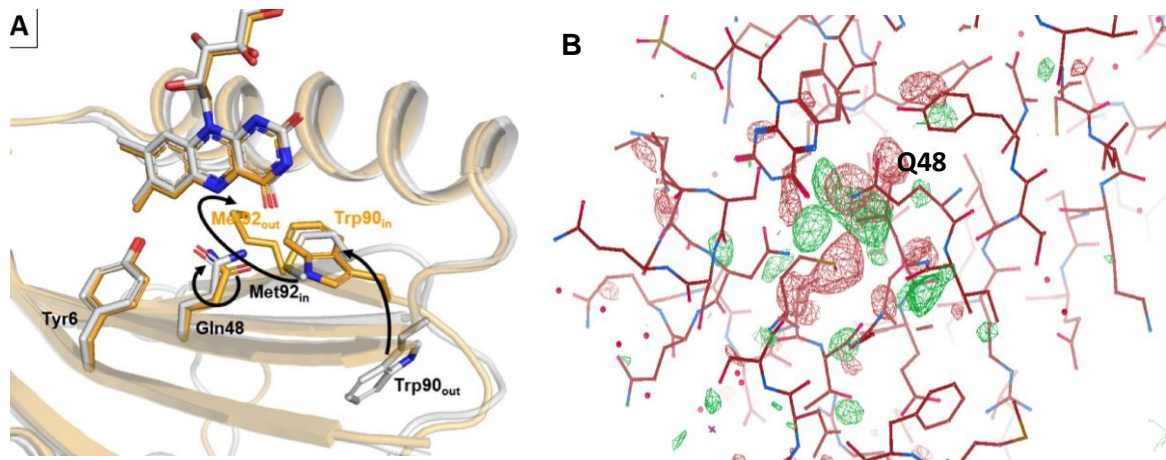
Véleményem szerint a vörös eltolódás valóban a hidrogénkötések létrejötté miatt figyelhető meg, de én magam nem számoltam ki az energetikai változásokat.

Tézispont: „Az AppA fotoaktivációja a flavin N5 atomjához közeli glutamin (Q63) tautomerizációjával valósul meg”.

- A glutamin tautomerizáció energiagátja szignifikánsan kisebb a BLUF fehérjében, mint az izolált glutaminban, mivel a BLUF tautomerizációját az elektrontranszfer és a radikális rekombináció segíti (Nemukhin 2013). Ez esetben pedig a tautomerizáció nem önállóan, nem az elektron transzfertől függetlenül, hanem azzal szorosan összekapcsolva következik be.

Mára szerintem senki nem állítja, hogy a tautomerizáció elektron transzfer nélkül valósul meg, mi sem. Annak ellenére, hogy ultragyors spektroszkópiával nem látjuk a gyökök kialakulását, saját friss kísérleteink is arra utalnak, hogy az elektron transzferre szükség van a tautomerizációhoz és a fehérje funkciójához is. Saját – még nem publikált – méréseink során a FAD-ot roseoflavinra cseréltük, amely nem alkalmas elektron transzferben való részvételre. A roseoflavint tartalmazó AppA (és OaPAC) nem volt fotoaktív, tehát az elektron transzferre szükség van a fehérje funkciójához.

- Van-e arra esély, hogy nagyfelbontású röntgen kristallográfia láthatóvá tudja tenni a konformációs heterogenitást, különbséget tudjon tenni a Q63-as glutamin keto és enol állapotai között, annak ellenére, hogy a Gln O ϵ 1 and N ϵ 2 atomok hasonló elektron-sűrűséget mutatnak?

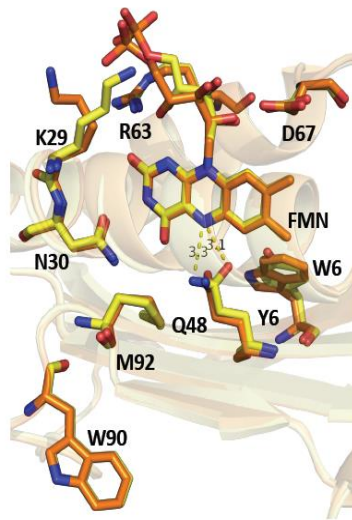


A) Sötét (szürke) és világos (narancs) állapot egymásra helyezve Chretien et al., J. Mol. Biol., 2024
 B) A hamburgi Desy-ben végzett mérésünk 300 ms-nál

Én látok rá esélyt, hogy ezt a kérdést időfelbontásos röntgenkristallográfiával megválaszoljuk a jövőben. A disszertáció benyújtása óta több röntgenkristallográfiás szerkezet készült. Chretien és munkatársai azon a véleményen vannak, hogy a szóban forgó glutamin 180 fokot elfordul, ez látszik az A) szerkezeti ábrán. Mi is több röntgenkristallográfiát végeztünk, ezek egy részét a közelmúltban publikáltuk már (Kapetanaki et al., Crystal structure of a bacterial photoactivated adenylate cyclase determined by serial femtosecond and serial synchrotron crystallography *IUCRJ* 11, 2024. A B) ábrán egy nem publikált és (egyben nem befejezett) szerkezet látható, amely a hamburgi DESY T-REXX (Time Resolved X-ray crystallography) rendszerén készült 300 ms esetében. A Q48 elmozdulása itt is látszik, de a végső szerkezet még nem készült el, így nem világos, hogy tényleg csak elfordulásról van-e szó.

- A jelölt őszintén és tiszteletreméltóan bevallja, hogy a tudomány jelen állása szerint ellentmondásos a fotoaktiváció primer mechanizmusáról alkotott képünk. Ezt felfogom, de megérteni nehezen tudom. Hogyan lehet egyrésztől tautomerizációról (jelen disszertáció), másrésztől összehangolt proton és elektron transferről (Zhou és mksai Nature Communications 2024) szinte kizárólagos jelleggel beszélni, miközben a csoportok a saját módszereikben (vakon) bíznak, és a kísérleti adatok a külső szemlélő számára megdönthetetlennek tűnnek?

A saját eredményeink és Donping Zhong eredményei között nincs ellentmondás. Zhong és csoportja összes OaPAC-kal kapcsolatos cikkében elsősorban a proton-kapcsolt elektron transzfer természetét és jelentőségét vizsgálta. Az én és a mi eredményeink annyiban mondanak mást, hogy azt állítjuk, hogy az OaPAC funkciójában egyaránt szerepet játszik a proton-kapcsolt elektron transzfer és a tautomerizáció is. Ha elég lenne az előbbi, akkor nem érthető, hogy az Y6W mutáns, amelyben Zhong és csoportja kimutatta a proton-kapcsolt elektron transzfer lépés meglétét, miért inaktív. Ezt meg is kérdeztem tőle írásban az Elementary Reactions in the Functional Triads of the Blue-Light Photoreceptor BLUF Domain (The Journal of Physical Chemistry, Vol. 128, 2024) cikkük bírálata során, de nem adtak rá közvetlen választ, mert nem is nagyon lehetett. Később derült ki ugyanis, amikor elkészítettük az Y6W szerkezetét, hogy a glutamin (Q48) mintegy 90 fokkal el van fordulva a vad típushoz képest, ezért nem valósul meg a tautomerizáció, és nem következik be az ATP- cAMP konverzióhoz szükséges konformációs változás.

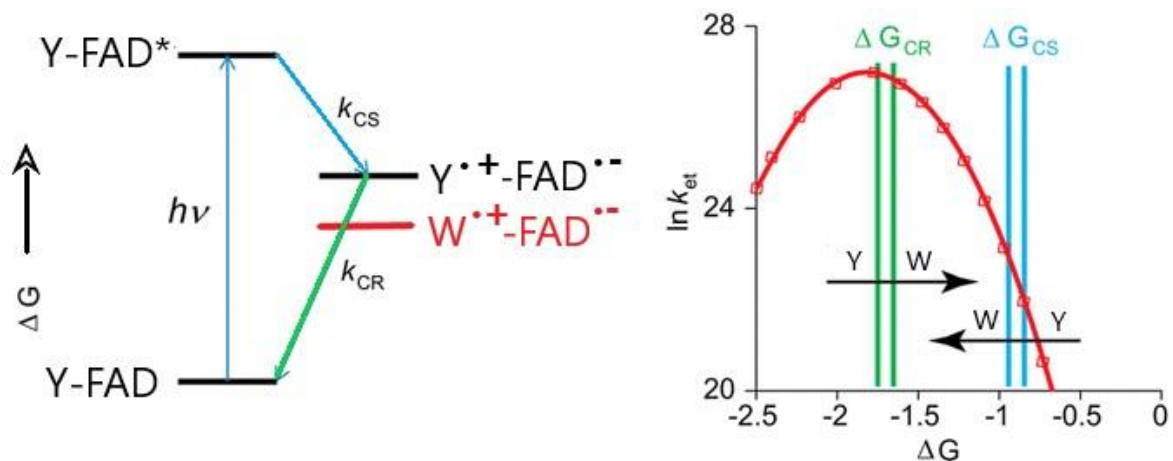


Az ábrán (Kapetanaki et al., *IUCRJ*, 2024) narancs színnel jelöltük a mutáns szerkezetét, és sárgával a vad típus szerkezetét.

Tézispont: „az AppA fotoaktivációja során nem jelennek meg flavin gyökök”

- Az egyik lehetséges magyarázat a flavin gyökök hiányára, hogy a töltésszétválasztás (CS) sebessége kicsi, a töltés-rekombinációé (CR) pedig nagy, így nem épülhetnek fel gyökök számottevő mennyiségben. A jelölt a kérdés megválaszolására az Y21W AppA mutánst választotta azzal az elvárással, hogy az elektron transzfer folyamat hatékonysága felerősödik a FAD-hoz közeli tirozinnak (Y21) triptofánra való cseréjével. A triptofán esetében ugyanis a töltésszétválasztás folyamatának szabad entalpia változása kisebb (negatívabb), mint a tirozin esetében. Ha a Marcus parabola nem invertált tartományában vagyunk, akkor a töltésszétválasztás sebessége növekszik, a rekombinációé pedig csökken. Ha azonban a rekombináció az invertált tartományba esik, akkor ez már nem lesz igaz, mert a rekombináció sebessége is növekedni fog a mutációval. A probléma tisztázására a reorganizációs energia ismeretére lenne szükségünk. Van-e erre vonatkozóan akár kísérleti, akár elméleti adat?

Kísérleti adatunk nincs, mi itt az állapotot modelleztük, hogy hogyan változik a folyamat, ha a reorganizációs energia kisebb vagy nagyobb, mint 0.9 eV.

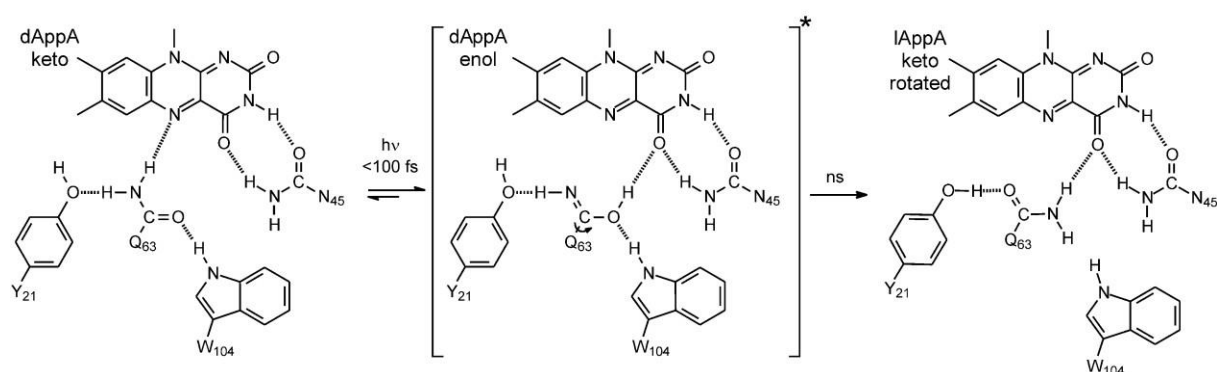


- Kevésbé értem a tézispontban foglalt megállapítást, mert a fenti ábra alapján a fotoaktiváció töltésszétválasztással, és így flavin gyök keletkezésével jár. Feltételezem, hogy valamit félreértettem.

A kritika jogos. Itt azt akartam megfogalmazni, hogy mi a mi módszereinkkel nem tudtuk megfigyelni a flavin és az aminosav gyökök megjelenését. Indirekt módszerekkel azóta már egyre világosabban látszik, hogy az elektron transzfer megvalósul. Az tűnik valószínűnek, hogy az invertált Marcus régióban vagyunk, és a töltés rekombináció nagyon gyors, $k_{CR} \gg k_{CS}$.

Tézispont: „az AppA fotoaktivációja során a W104 triptofán a flavinhoz közeli pozícióba mozdul és hidrogén kötést alkot a FAD-dal.”

- Az AppA-ban a fotoaktiváció korábban leírt modellje szerint (5.10 ábra) a 104-es triptofán nincs közvetlen H-kötésben a FAD-dal sem a sötét, sem a világos állapotokban. A sötét állapotban, és közvetlenül a gerjesztés után Q63-mal van H-kötésben, amely meg is szűnik a tautomerizáció után.



- Az ábra alapján a W104 elhelyezkedésére vonatkozó kijelentések megalapozottságát sem látom világosan. A jelölt szerint „sötét állapotban a triptofán a FAD-tól távoli pozícióban van, ahol szabadon mozog, világos állapotban pedig a flavinhoz közelebb helyezkedik el és valószínűleg hidrogén kötésben van a flavinnal.” Ha csak a H-kötéseket nézzük, akkor éppen fordított megállapításra lehet jutni: sötétben a H-kötés miatt inkább kötött a mozgása, mint világosban, ahol ez a H-kötés felszakadt.

A kezdeti kristallográfiai adatokból elfogadtuk azt a feltételezést, hogy a 104-es pozícióban lévő triptofán a világos állapotba való átmenet során elfordul. Erről hosszas vita volt 10-15 évvel ezelőtt, mert Masuda csoportja ezt megfigyelte, Ilme Schlichingék viszont nem. A mi TRIR és FRET adataink alapján azt találtuk, hogy világos állapotban van H-kötés a FAD és a W104 között. Ennek megfelelően a fenti ábrát fordítva kell elképzelni.

- Ha a két (sötét és világos) állapotban a triptofán elhelyezkedése, és a szabad mozgásában (forgásában) való korlátozottság is ennyire különbözőnek bizonyult (ill. ilyen következtetésre jutott a jelölt), akkor az átmeneti dipólusok irányultságát ill. azok eloszlását mindenképpen figyelembe kellett volna venni a FRET ill. az anizotrópia kiszámítására felhasznált összefüggésekben.

Ezt figyelembe is vettük, a FRET-tel kapcsolatos kérdésnél ismertetem.

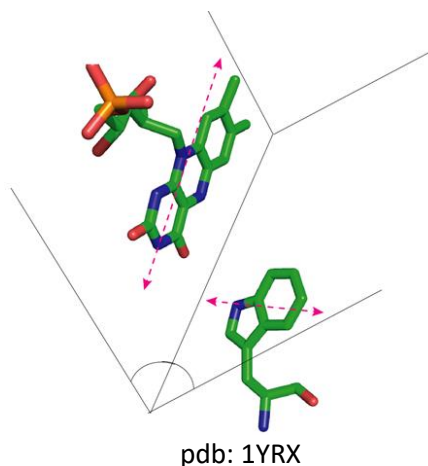
- A tirozinoknak és a triptofánoknak fenilalaninnal való többszörös helyettesítése (Y21F/Y56F/W64F/W104F) felveti a szerkezeti kép erőteljes megváltozásának lehetőségét, amelyet a mutánsokról felvett röntgenkristallográfiai képekkel kellene kizárni.

A bírálónak igaza van, ennyi mutáció esetén nagyon valószínű a szerkezet megváltozása.

Mekkorának vette a Förster-rádiust (R_0), amellyel a FRET hatékonyságából a tényleges távolságot kiszámolta? Ha a 95. oldalon megadott értékekkel visszafelé számolunk, akkor a sötét állapotban ez az

érték $R_0 = 16,7 \text{ \AA}$, míg világos állapotban csak $R_0 = 8.83 \text{ \AA}$. A két érték nem lehet különböző, hiszen ez a donor-akceptor párt jellemző mennyiség (az a karakterisztikus távolság, amely mellett a donor gerjesztési energiájának fele az akceptorra irányuló elektron gerjesztési energia-átadás).

Az R_0 értéke azért különbözik a két esetben, mert abból indultunk ki, hogy a flavintól távolabbi helyzetben a triptofán szabadon mozog, tehát az $R_0 = 9.78 \cdot 10^3 [J(\lambda)\kappa^2 n^{-4} \phi_D]^{1/6} \text{ \AA}$ képletben a κ^2 értéke az ilyenkor alkalmazott $2/3$. Feltételezve, hogy világos esetben a W104 közel van a FAD-hoz, akkor a κ^2 már nem $2/3$.



A szerkezet alapján a két dipólus majdnem derékszöget zár be, így $\kappa^2 = 0.02$. Ebben az esetben R_0 értéke 8.9 \AA -re módosul, miközben a világos állapot esetén a triptofán és a flavin távolsága 9.5 \AA -nek adódik.

- A világos állapotban a donor és akceptor partnerek között mért $6,7 \text{ \AA}$ távolság annyira csekély, hogy a dipólus-dipólus kölcsönhatásnak még a feltételezése, és így a FRET-re alkalmazott alapösszefüggés alkalmazhatósága is megkérdőjelezhető.

Ez igaz, de a $6,7 \text{ \AA}$ a lehető legkedvezőbb helyzet lenne, ami a Dutton-szabályból következett azt feltételezve, hogy az elektron transzfer akadálymentesen valósul meg. A FRET számolásokkal gyakorlatilag az elméleti határon mozogtunk.

- A Dutton-szabály alkalmazásakor mivel tudja indokolni, hogy az elektron transzfert meghajtó szabadenergia-változás ($-\Delta G^\circ$) éppen a reorganizációs energiával (λ) egyezik meg?

Ebben az esetben arra voltunk kíváncsiak, hogy mennyi a távolság akkor, ha a legkedvezőbb az elektron transzfer folyamat.

- Az 5.22b ábra a W64F/W104A AppABLUF mutáns tirozinát valamint az oldatban levő L-tirozin 295 nm-en mért abszorpciójának pH-függését mutatja. Megállapítja, hogy „a szigmoid görbét Boltzman egyenlettel illesztve $pK = 8.0$ -t kapunk az AppABLUF-ban jelen levő tirozinra, valamint $pK = 10.5$ -t az oldatban levő L-tirozinra”.

Megjegyzéseim: 1) A görbét nem a Boltzmann-egyenlettel, hanem a Henderson-Hasselbalch egyenlettel kellene illeszteni.

A kritika jogos.

2) A pH titrálás vagy túl meredek (AppA), vagy túl elnyújtott (tirozin oldatban), mert egyetlen protonálható csoport esetén a $pH = pK \pm 1$ értékeknél 10% ill. 90% értékeket kellene mérni. Az ettől való eltérést indokolni kellene. 3) Melyik tirozinról van szó az AppA fehérjében, és mivel (milyen

kölcsönhatással) magyarázható a pK értékének az oldatbeli értéktől való jelentős és szokatlan irányú ($-2,5$ pH egység) eltolódása?

A kritika jogos. Itt megtévesztett az, hogy az illesztés visszaadta az elméleti értéket, és nem gondolkodtunk el a görbe alakján.

Az ábrán az Y21 tirozincról van szó. Bár meglepő, hogy egy tirozin pK_a értéke ilyen mértékben eltérjen az elméleti értéktől, mégsem ritka. Arthur G. Szabo még a hetvenes években számolt be olyan fehérjékről, amelyek nem tartalmaznak triptofánt de mégis a triptofánéhoz hasonló fluoreszcencia emissziót figyelt meg (Szabo, A. G., Tyrosinate fluorescence maxima at 345 nm in proteins lacking tryptophan at pH 7. *FEBS Lett.* **94**, 249–52, 1978). A megoldás az volt, hogy ezekben az esetekben a tirozin tirozinát állapotban van, ennek a fluoreszcencia spektruma átfed a triptofánéval. Az AppA esetében ennek biztosan hatása van az elektron transzfer folyamatra, és valószínűleg szerepet játszik abban, hogy az AppA jóval lassabban tér vissza a sötét állapotba, mint például a PixD vagy az OaPAC, ahol nem jön létre a tirozinát.

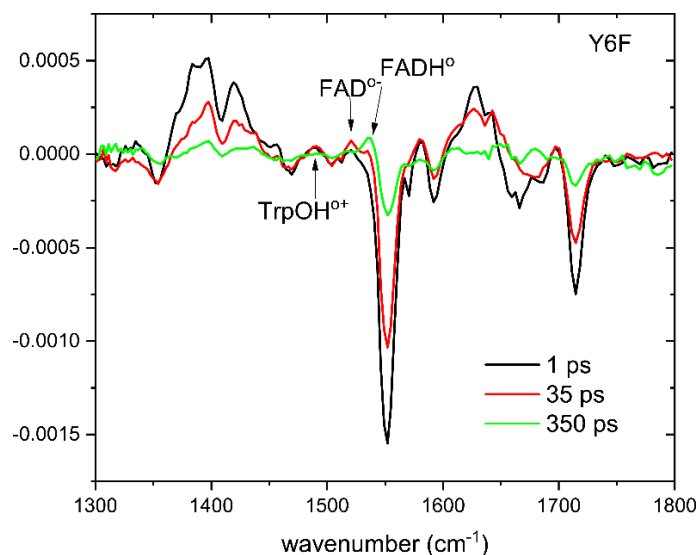
Tirozinát jelenlétét (vagyis alacsonyabb pK_a) értéket megfigyeltünk más – nem fotoaktív fehérjékben is – mint például a bakteriális citoskeletális fehérje, az MreB vagy a toxofilin esetében. Az nem világos, hogy ennek van-e fiziológias következménye.

7) OaPAC

Tézispont: „Az OaPAC fotoaktivációja proton kapcsolt elektron transzfer segítségével valósul meg, és a proton transzfer kiiktatása az enzim funkcióvesztéséhez vezet.”

- A jelölt mérései azt bizonyítják, hogy az Y6 tirozin nemcsak elektron, hanem a proton donor is. Milyen szintű és főképp milyen mechanizmus szerinti az elektron- és protontranszfer kapcsolódása? Szekvenciális vagy együttes (parallel)? Az elektrontranszfer segíti a protontranszfert vagy fordítva? Ezen kérdések megválaszolására a fluorotirozin analógok bevezetése a helyes irányba mutató lépés volt, de a két transzfer hajtóerői (az E_m és a pK értékekben megmutatkozó különbségek) ebben a rendszerben együttesen lépnek fel, ami a kiértékelést megnehezíti. Célszerű lett volna szétválasztani ezeket, és a hatásukat külön-külön nézni. Ekkor ugyanis a megfelelő elektron- és protontranszfer elméleteket közvetlenül alkalmazni lehetett volna.

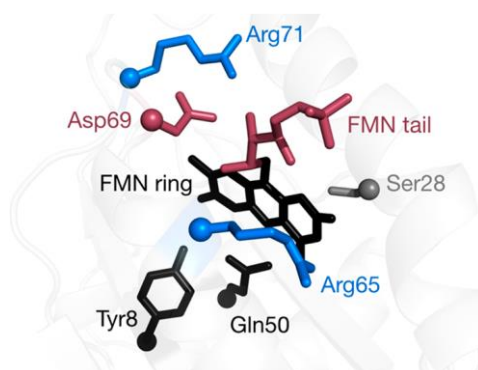
A mi méréseink, de egyben Zhong mérései is azt mutatják, hogy itt egy együttes elektron és proton transzferről van szó. A disszertációban nem hangsúlyozom, de nem csak a fluorotirozin analógokkal, hanem néhány mutáns segítségével vizsgáltuk az elektron és proton transzfer lépéseket. A legfontosabb mutáns az Y6F, amelyet elsősorban abból a szempontból mutattam be, hogy ebben az esetben a tirozin nem ad elektront a FAD-nak, és valószínűleg protont sem, ennek következtében enzimatikusan nem aktív. Az 5.37-es ábrán bemutatott infravörös mérések során, illetve az alábbi ábrán is az látszik, hogy a mutáció ellenére mind elektron, mind proton transzferre sor kerül, még hozzá szekvenciális módon. Az Y6F mutáns esetében az elektron donor egyértelműen a 90-es pozícióban található triptofán, amely egyben valószínűleg a proton donor is. Ebben az esetben is, bár bekövetkezik a proton kapcsolt elektron transzfer, a proton útvonala nem érinti a 48-as pozícióban található glutamint; ennek köszönhető, hogy nem valósul meg az a szerkezeti változás a glutamin körül, ami a cAMP konverziót lehetővé teszi.



- Feltérképezhető-e az oldatból az Y6 felé mutató proton-útvonal a belső (Y6-tól a FAD-ra irányuló) proton-mozgás kiegészítésére vagy esetleg ez „integrált” módon (nem egy jól meghatározott útvonalon) következik be? Vannak-e „proton-kapuk” a fehérjében?

Azt gondolom, hogy az elsődleges proton kapu a Q48. Ha ez nincs jelen, nem következik be a proton transzfer.

- Ha ennyire kihegyezett az elektron- és protontranszfer az Y6 tirozinra, akkor hogyan értelmezhető a flavin körüli aminosavak szerepe, hiszen ismert (és ki is mutatta), hogy az elektron transzfer folyamat hatékonyságában a D67 és R63 aminosavak is jelentős szerepet játszanak? Hogyan valósul meg ennek figyelembevételével az összekapcsolt(nak gondolt) elektron- és protontranszfer?



Forrás: Goings, Hammes-Schiffer, JACS, 141, 2019

A D67N mutánson végzett kísérlet ötlete Joshua Goings és Sharon Hammes-Schiffer cikkének (Goings and Hammes-Schiffer, *J. Am. Chem. Soc.* 2019, 141) egy megjegyzéséből jött. Ők az Slr1694 BLUF (vagy más néven PixD) BLUF domén fehérje fotociklusát vizsgálták QM/MM módszerekkel. Cikkükben megjegyezték, hogy az Asp69 és az Arg71 hidrogénkötést létesít egymással (lásd a fenti ábrán), és gyakran ellentétes hatást gyakorolnak (azaz amikor a pár közelebb kerül a flavin gyűrűhöz, a negatív töltésű Asp69 destabilizálja a töltésátvitelt, míg a pozitív töltésű Arg71 stabilizálja a töltésátvitelt, és fordítva). „Ha az Asp69-et semleges vagy akár pozitív töltésű maradványra mutálnánk, az Slr1694 teljesen más fotociklust mutatna”. Ebben az esetben, amellett, hogy érdekelt, hogy ez valóban így van-e, azt kívántam vizsgálni, hogy az elektron transzfer megváltozása milyen hatással bír a fehérje funkciójára. A PixD esetében ugyanis ezt lehetetlen mérni, a PixD a PixE fehérjével alkot bonyolult komplexet. Az OaPAC esetében azonban közvetlen módon lehet ezt a hatást megfigyelni. Ahogyan a disszertációmban leírtam, az elektron transzfer valóban gyorsabb. A proton transzfer természetét nem

sikerült egyértelműen megállapítani, a cikk írásakor ugyanis nem volt gépidőnk az infravörös tranziens abszorpciós rendszeren (ULTRA, CLF, Rutherford Appleton), de szándékunkban áll ezeknek a méréseknek az elvégzése 2025-ben, mivel újra kaptunk gépidőt.

Tézispont: „Az elektron transzfer felgyorsítása OaPAC-ben az enzimatis aktivitás növekedéséhez vezet.”

- Noha a D67N mutáns felgyorsítja a fotoindukált elektron transzfert folyamatot (beleértve a flavin oxidációját is), a cAMP konverzió növekedését mégsem ennek, hanem a mutáns szerkezetének megváltozására vezeti vissza. A tézispontban mégsem ezt, hanem az elektron transzfer szerepét emelte ki. Mi volt ennek az indoka?

Ennek elsősorban az az oka, hogy az eddigi mérésekkel nem sikerült rájönni arra, melyik hatás a fontosabb. A D67N és a W90F mutánsok esetében is a hatékony elektron transzfer mellett nagyobb enzimatis aktivitást mértünk. Mindaddig, amíg meg nem láttam a DSC adatokat, azt hittem, hogy ez elsősorban az elektrontranszfernek tulajdonítható. A szerkezeti változást figyelembe véve viszont ez egyáltalán nem biztos.

- Kalorimetrikus vizsgálatokkal is igazolta, hogy a D67N mutánsban az OaPAC megnövekedett aktivitását a rugalmasabb szerkezet okozza. Ha ez így van, akkor a vad típustól számottevően eltérő entrópia-változással kell számolnunk. Alá tudja ezt támasztani a mérési adatokkal?

WT entrópia: 1.14 KJ mol⁻¹ K⁻¹

D67N entrópia: 1.29 KJ mol⁻¹ K⁻¹

- Egy kis értelmezésre szorul az 5.3 táblázatban megadott adatok értelmezése: „a konverzió maximális sebessége ~ 1,5-szer nagyobb volt a mutánsban... de ami még fontosabb, a katalitikus állandó (k_{cat}) ~ 1,5-szer magasabb a D67N-ben, mint a WT OaPAC-ban.” Mivel a jelölt az adatokat a klasszikus Michaelis-Menten egyenlet szerint értékelte ki, azért egyáltalán nem meglepő, hogy ha a maximális sebességre 1,5-ször nagyobb értéket kapott a mutánsban, akkor a katalitikus sebesség növekedésére is ugyanezt fogja kapni, hiszen $v_{max} = k_{cat} \cdot [E_0]$.

A megjegyzés jogos. A „de ami még fontosabb” helyett azt kellett volna írnom, hogy „ennek megfelelően”.

- Mivel alapos indokok merültek fel, hogy a mutáns szerkezetében lényeges változások lépnek fel a vad típuséhoz képest, ezért a katalitikus sebesség megfigyelt növekedése részben (vagy egészben) a kötőhelyek számának növekedésével is magyarázható lenne. Ekkor természetesen a klasszikus Michaelis-Menten leírás kinetikai egyenleteit módosítani kellene.

Jelen pillanatban stopped-flow méréseket végzünk annak megállapítására, hogy valóban változott-e a kötőhelyek száma.

Tézispont: „OaPAC-ben a flavin N5 atomjához közeli glutamin glutamátra való cseréje az enzimet folyamatosan bekapcsolt állapotban tartja.”

- Megértési problémáim vannak az 5.52 ábrával kapcsolatban, ahol jól látható (és be is jelölt) a vöröseltolódás a Q48E mutáns esetén. Mégis a szövegben ezt olvasom: „A Q63E AppABLUF-hoz hasonlóan a Q48E OaPAC mutáns sem mutat vörös eltolódást (5.52 ábra) kék fény besugárzásakor, ami arra utal, hogy a mutáns a várakozásoknak megfelelően fotoaktív.” Valami lényeges dolgot figyelmen kívül hagytam?

A megjegyzés jogos: azt szerettem volna írni, hogy a Q48E mutánsban nem látható a vad típusnál

megfigyelt, a kék fény hatására bekövetkező vörös eltolódás, vagyis a mutáns nem fotoaktív. Az 5.52 ábra a sötét állapotú abszorpciót hasonlítja össze a Q48E mutáns abszorpciójával. Az itt megjelölt vörös eltolódás a vad típus és a Q48E mutáns szerkezete közötti különbségnek köszönhető, és ez is arra utal, hogy az aszpartát hidrogénkötést alkot a FAD-dal.

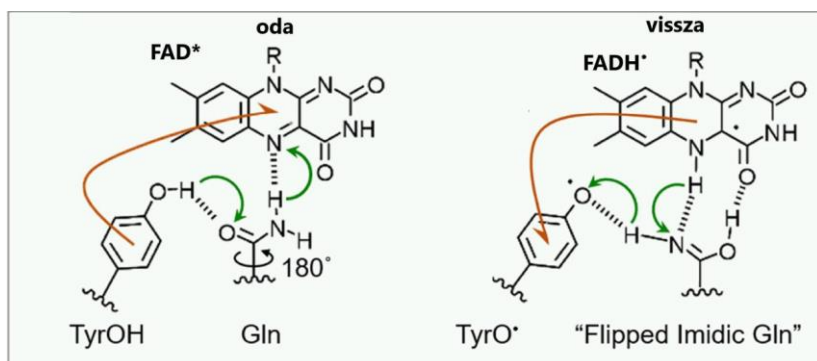
- A jelölt szerint a Q48E OaPAC mutánsban a gerjesztést követően a tirozin egy elektront ad a FAD-nak, illetve egy protont a glutaminsavnak, amely ezzel egy időben egy protont ad a FAD-nak, és a protontranszfer Groththus-mechanizmus szerint történik.

Megjegyzéseim: 1) A több, mint 200 éves Groththus-mechanizmusra általában hosszabb H-kötés láncon való protontranszfer formális leírása kapcsán hivatkoznak. Itt nem egy nagy távolságú protontranszferről, hanem egy jól definiált protondonor-akceptor párról van szó.

Elfogadom a kritikát, a Groththus mechanizmus említését Zhong vezette be az OaPAC kapcsán (Chen et al., *JACS* 2022; Kang et al., *Angew. Chem. Int.*, 61, 2002), ezt emeltem be a szövegbe.

2) Feltételezem, hogy ha a kísérleteket H₂O-ban és D₂O-ban is elvégzik, akkor jelentékeny kinetikai izotóp effektust kapnak. Ha vannak ilyen mérései, akkor ezeket, ha nincsenek, akkor a becsült értéket fogadnám köszönettel.

A kinetikai izotóp effektust mindegyik BLUF fehérjében vizsgáltuk, és minden esetben 4 körüli értéket kaptunk. Egészen pontosan a PixD és az OaPAC esetében ez 4 volt, az AppA esetében 4.7. Az OaPAC esetében ezt Zhong csoportja is vizsgálta, és szintén 4-et kaptak (Zhou, et al., *PNAS*, 2022)



3) Hogyan érintheti a Q48E (és hasonló) mutáció a vad típus fotociklusát, amely finom oldalláncmozgásokat és/vagy a Q48 180° forgását foglalja magában? Ennek elemzésére a disszertáció nem tért ki, pedig ezek a mozgások a visszreakció sebességére, a proton-csatolt elektron transzfer (soros vagy párhuzamos) mechanizmusára, így a fotociklusra is jelentékeny hatást fejthetnek ki (Zhou és mksai PNAS 2022).

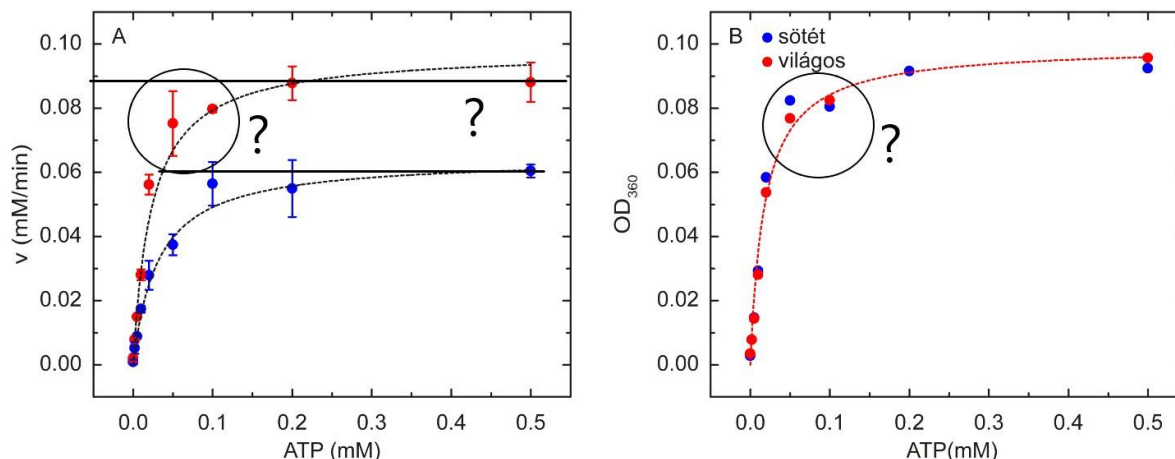
A Q48E mutánsnak nincs fotociklusa, a mutáció következtében ugyanis fotoinaktívvá vált, enzimátikus szempontból pedig olyan, mintha folyamatosan bekapcsolt állapotban lenne.

4) A kísérleti adatok értelmezésére rendre az izoalloxazin körüli H-híd hálózat megváltozásának módjai kerülnek előtérbe. Noha a FAD-H híd-Tyr rendszerben (az N5 atom 5 Å távolságában) nincs szerkezeti vízmolekula, ellenben az izoalloxazin gyűrű 10 Å távolságában kb. 60 vízmolekula található a gyűrű és az α hélixek közé ágyazódva. Ez arra utal, hogy a H-híd hálózat dinamikai heterogeneitása mellett a hidratáció közeli helyei is szerephez juthatnak (pl. polarizációs effektusok révén). Mi a véleménye erről, és milyen jelentőséget tulajdonít ennek (ha egyáltalán említésre méltónak találja)?

A vízmolekuláknak sok esetben nagyon fontos szerepe van a proton transzferben, de még nem jutottunk el oda, hogy ezt is modellezzük.

5)

- Elnézve az 5.56 ábrát, a mérési hibákkal és az illesztéssel szemben vannak fenntartásaim (hasonló problémát fogalmazhattam volna meg a korábbi adatoknak a Michaelis-Menten egyenlet alapján történő illesztésével kapcsolatban is).

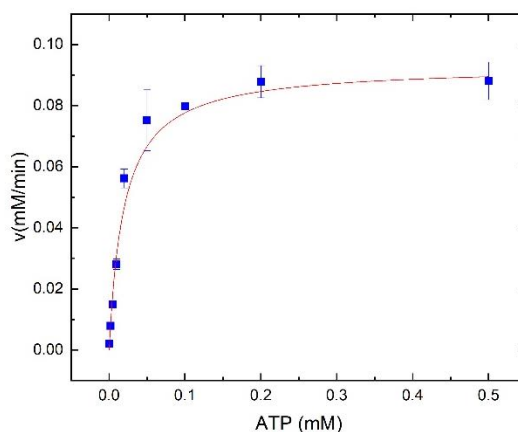


Mi lehet annak az oka, hogy a közeli mérési adatoknak ennyire különböző a hibája? (Feltételezhetően a középérték közepes hibájáról beszélünk.) A baloldali ábrán a bekarikázott két mérési adat közül az egyiknek igen nagy, a másiknak gyakorlatilag nincs hibája. Hogyan keletkezhetett ez a hiba, ha az eredeti mérési pontoknak (lásd a jobb oldali ábrát) gyakorlatilag nem is volt hibájuk? Olyan érzésem támad (de ezt megpróbálom elhessegetni), hogy a mérési hiba-nagyságok éppen úgy alakultak, hogy azok még az illesztési görbére kerüljenek.

Az illesztés jóságáról mond indirekt kritikát az a megfigyelés, hogy a mérési pontok már réges-régen azonos szintre kerültek (azaz telítődtek), amikor az illesztett görbe még vígan emelkedik. Lásd például a bal oldali ábra kék pontjait. Elegánsabban kellett volna ezt a kiértékelést elvégezni.

Itt mindegyik mérési pont egy teljesen külön kísérlet, amelyhez új mintát kell összerakni, a megvilágító lézert újra be kell pozícionálni (ez volt a legérzékenyebb rész); innen fakad a viszonylag nagy hiba ott, ahol az enzim már tényleg elkezd „dolgozni”. Újra megnéztem az eredeti méréseket, de valóban ezeket az értékeket mértük, az adatokat nem kozmetikáztuk. Nem is lett volna értelme ilyen kicsi hibát kitalálni, amikor előtte és utána elég nagy volt a mérés hibája.

Az illesztés jóságát illető kritika teljesen jogos: az adatokat Origin 2022-ben illesztettem, és a paramétereket engedtem, hogy szabadon fussanak. Ha a v_{max} értékét 0.094-re rögzítem, akkor valóban jobb lett volna az illesztés.



Kevéssé lényeges meglátások

- Hasznos lett volna az alkalmazott és felhasznált kémiai és biológiai anyagokról, pH- és redox pufferekről, fizikai-kémiai módszerekről (nem csak a fizikai/optikai berendezésekről) külön fejezetben ismertetést adni. Az olvasó számára fekete lyuknak számítanak a nagy számban használt mutánsok is, amelyek előállításáról, krisztallográfiai szerkezetükről, génszekvencián alapuló ellenőrzésükről, tulajdonságaikról, másodlagos szerkezeti és funkcionális hatásukról sem tudunk meg sokat a disszertációból.

A bírálónak tökéletesen igaza van.

- 31. old. „A fotoindukált elektron transzfer jól ismert folyamat a fotokémiában, amelynek során, ha egy molekulát fénnel gerjesztünk, az **a környezetéből** egy elektront von el.” Ez nincs így szükségszerűen, mert pl. a fotoszintézis primer fotoreakciója során a gerjesztett (B)Chl dimér önmagától, és nem a környezetétől von el elektront.

A megjegyzés jogos. Elfogult módon csak a flavinban megvalósuló fotoindukált elektron transzferre gondoltam.

- A jó gazda gondossága megkívánta volna az elírások, félreütések számának lényeges csökkentését. Noha ezek óhatatlanul mindig előfordulnak, ezek jó részét akár egyszeri figyelmes átolvasással (vagy akár szemrevételezéssel – orvosi szóhasználatnál „obszervációval”) el lehetett volna kerülni. Ezek felsorolásától eltekintek, mert felesleges, hiszen a mű ilyen formában marad fenn, javított kiadás nem lesz.

A bírálónak igaza van, ez védhetetlen.

- A jelölt nyilvánvalóan a bőség zavarával küzdött a disszertáció összeállításánál. A témákat az időrendbe állított cikkei köré csoportosította. Habár láthatóan igyekezett, de nem tudta ezeket egységes egészbe olvasztani, ill. kellően magasról áttekintve koherens képpé formálni. Ennek bizonyítéka a disszertáció sajátos szerkezete, amennyiben az igen testes, 168 oldal terjedelmű íráshoz viszonylag rövid (gyakorlatilag 1 oldalba sűrített) összefoglalás társul. Ezt tekintem tézisyűjteménynek. Az olvasó reménységére azonban ott van az összefogottabbnak gondolt „tézisek” nevet viselő összeállítás, de ilyen formájában vajmi kevés (többlet) segítséget adhat neki a könnyebb tájékozódásban: ez a rész is szükségtelenül hosszúvá nyúlt (habkönnyű 63 oldal), és tartalmában inkább a disszertációra emlékeztet (annak egyes részeit ismétli meg), mintsem az összefoglalásban szereplő tézispontokra és azok (esetlegesen más oldalú) megismertetésére fókuszálna. Az „*aki mindent hangsúlyoz, az semmit sem emel ki*” esetével állunk szemben. Felmerül bennem a kérdés, hogy ilyen formában szükség volt-e az ilyen nevet viselő tézisek gyűjteményére.

A bírálónak természetesen igaza van, a téziszűzet valóban nem lett lényegretörő. Ezen a ponton sokat vívódtam, milyen megoldás lenne jó. Nem segített az sem, hogy nem volt semmilyen előírás arra, milyen hosszú lehet.

- A DFT mindenütt rövidítésként szerepel, sehol sincs megnevezve (még az erre a célra létrehozott rövidítések jegyzékében sem), hogy mit jelent.

A bírálónak igaza van.

- 17. old. A dr. Gerard Mourouról szóló bekezdés a disszertáció tárgyilagos stílusától nagyon eltérő módon, igen sajátos stílusban fogalmazódott meg. A feltétlen áhítat kisugárzását szeretném egy kissé (le)árnyékolni az alábbi 3 megjegyzés megtételével. 1) Nem tudom eldönteni, hogy ez egy memoir (visszaemlékezés, élménybeszámoló) vagy egy szigorú szakmai leírás, hiszen az elemek keverednek. 2) Gerard Mourou-val Szegeden is lehet találkozni, hiszen az egyetem tanára (részben miatta is lehet az SZTE-t (nem kis fellengzőséggel) a "Nobel díjasok egyetemének" nevezni). 3) Az alábbi idézet

szerény reakciót vált ki bennem: „*Mourounak melleleg különleges érzéke van a marketinghez.*” Lehet, hogy így van, ezt nem tudom eldönteni, de szabadjon itt egy másik (áldásos vagy átkos, döntse el mindenki a maga szemszögéből) lobbitevékenységéről is említést tenni: ő beszélte rá a szegedieket a lézer-alapú neutronforrások kutatására, ami ugyan perspektivikus eszköz/eljárás lehet a radioaktív hulladékoknak transzmutációs eljárásokkal való semlegesítéséhez, de már most látszik, hogy a lézerfény keltette nagy fluxusú neutronforrás megvalósításához vezető út nagyon göröngyösnek ígérkezik mind a szakma, mind a társadalmi szempontú megtérülés (gazdaságosság) szempontjaiból.

Ebben a szakaszban arra próbáltam utalni, hogy a 2000-es évek elején szerencsés folyamatok mentek végbe a szakmában: a laboroknak több pénzük volt helyben fejlesztéseket végezniük, szinte mindenki újabb és újabb ultragyors spektroszkópiai műszert épített. Ez mára jelentősen eltolódott. Én úgy érzem, a finanszírozás abba az irányba tol minket, hogy a műszerfejlesztést bizzuk a nagy centrumokra, de hát így a Krausz-féle siker sem jött volna létre, hiszen az is egy egyetemen valósult meg, a tükkészítés pedig a KFKI kis laborjában.

Az áhitat nem annyira Mourounak szólt, hanem a helyzetnek, hogy ebben az izgalmas időszakban olyan helyen lehetett az ember, ahol éppen az izgalmas felfedezések történtek. Mint ahogyan az is izgalmas volt, hogy egy sima pénteki szemináriumon jelen volt két későbbi Nobel-díjas (Mourou és Alain Aspect).

- 19. old. „*Donna Strickland – Mourou posztdokja volt és osztozott a Nobel-díjban – érdemeit kiemeli, hogy míg jelenleg az impulzusok megnyújtása és összenyomása egy optikai rács segítségével történik (lásd 2.2 ábra), a nyolcvanas évek elején Donna Strickland ehhez egy km hosszúságú optikai kábelt használt.*” Mennyire emeli ki ez az érdemeit, hiszen optikai ráccsal csak könnyebb és elegánsabb lett volna az impulzusokat megnyújtani, majd összenyomni?

Ezzel a mondattal Donna Strickland érdemeit akartam aláhúzni, amelyeket a legelső sajtótájékoztatón Gerard Mourou igyekezett csökkenteni.

Strickland nem femtoszekundumos impulzusokkal dolgozott, ezért kellett optikai szálakat alkalmaznia. A nyolcvanas évek gyenge minőségű (nem módustartó) optikai szálaival ez nagy teljesítmény volt.

- 20. old. „*... az (5) összefüggés által leírt fázisnak lesz egy nemlineáris tagja is.*” Ez a rész kakukktojás, valahonnan értelmetlenül lett bemásolva, mert (5) összefüggés a közelben sincs. Egyébként sajnálatos módon a disszertációban előforduló egyenletek nincsenek számozva.

A megjegyzés jogos.

- 71. old. Megjegyzés nélkül: „*A nehezebb szénatom ilyen módon lassabb vibrációs frekvenciát eredményezett*”

A megjegyzés jogos.

- 72. old. Megjegyzés nélkül: „*...a gerjesztést követő bekövetkezett változásról*”.

A megjegyzés jogos.

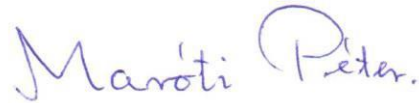
A fent leírt megjegyzések és kérdések nem kérdőjelezik meg a dolgozatban összefoglalt eredmények kiemelkedő tudományos értékét. A disszertáció rendkívüli anyag-erősségű, amelyre a jelölt méltán lehet büszke.

A jelölt tudományos tevékenysége, eredményei és a flavinok kutatásához való hozzájárulása nemzetközi szinten is kiemelkedő. Ezen a területen kiváló kutatás-vezetőkkel dolgozott együtt, modern, jól felszerelt laboratóriumokban dolgozott, és az így szerzett gazdag tapasztalatait hazahozta, és itthon is értékesítette, és teszi manapság is. A publikációs színvonalas folyóiratokban jelentek meg. A cikkekben és így a dolgozatban is bemutatott eredmények magas színvonalúak, eredetinek és valódinak tekintem. A jelen értékelés nagy részben arról szól, hogy a (rejtett) tézispontokban

megfogalmazott állítások diszkusszió tárgyát képezik, és nagy érdeklődéssel várom a feltett kérdésekre a jelölt megtisztelő válaszait.

Meggyőződésem, hogy dr. Lukács András tudományos munkássága megfelel a Magyar Tudományos Akadémia doktori címe követelményeinek. A disszertációban bemutatott eredményeket nyílt vitára alkalmasnak tartom, és ha sikeres a védés, akkor (*per definitionem*) javaslom, hogy a Bizottság ítélje oda az Akadémia doktora fokozatot.

Szeged, 2024. október 8.



Maróti Péter
kiérdemesült egyetemi tanár