

Bírálat Lukács Andrásnak az MTA doktora cím elnyerésére benyújtott, „Fotoaktív flavoproteinek funkcionális fehérjedinamikájának vizsgálata ultragyors spektroszkópiai módszerekkel” című disszertációjáról

Lukács András 168 oldalas, terjedelmes dolgozatban foglalta össze a PhD megszerzése óta elvégzett tudományos munkáját, pontosabban annak egy tematikailag jól körülhatárolt, összefüggő részét. A szerző az ultragyors optikai technikák fejlesztésének és biofizikai alkalmazásának egyik vezető személyisége Magyarországon. A bemutatott munka egy része Franciaországban, illetve Angliában készült, az újabb eredmények pedig már Pécsen, a szerző által felépített femtoszekundumos optikai laboratóriumban születtek. Fontos, hogy Lukács András a külföldi munkahelyein is tevékenyen részt vett a mérőrendszerek tervezésében és megépítésében, és folyamatosan fenntartja és bővíti külföldi együttműködéseit. Ennek szép példái a „Kitekintés” című fejezetben bemutatott, ill. megelőlegezett időfelbontásos röntgen-szórás és röntgenkrisztallográfias vizsgálatok.

Ahogy a dolgozat címe is mondja, a szerző különböző fotoaktív flavoproteinek fizikájával, az eltérő funkciók bemutatásával és megértésével foglalkozik. Noha a flavin adenin dinukleotid (FAD) vagy a flavin mononukleotid (FMN) aktív részei gyakorlatilag minden tárgyalt fehérjében azonosak, mégis, a fehérjekörnyezetük különbözősége változatos UV-látható-infravörös spektrális válaszokat eredményez, és az esetek többségében legalább részben magyarázatot ad a nagyon különböző biológiai funkciókra is. Ezek a főbb funkciók a DNS javítás a fotoliázok által, a cirkadián ritmus szabályozása vagy a föld mágneses terének érzékelése kriptokrómokkal, illetve transzkripciós szabályozás a fotoszintézisben vagy a fototaxis szabályozása BLUF domén fehérjékkel. A szerző a dolgozatában bemutatja a saját, nemzetközileg nagyra értékelt hozzájárulását ehhez a területhez.

A disszertáció felépítése nem követi teljesen a hagyományos szerkezetet. Ennek az az eredménye, hogy pl. ugyanazon fehérje vagy módszer bemutatásának többször fut neki a szerző. Például a fotoliázok bemutatása szerepel az 1.2 pont alatt (12. oldaltól), aztán a 34. oldalon, majd a 4. fejezetben a 48. oldaltól. Ennek eredményeként nemcsak a kapott információ ismétlődik, hanem az 1.2 ábra, ami a fotoliáz flavin körüli szerkezetét mutatja, azonos a 4.4 ábrával és a 4.5 ábrával, csak az utóbbiak feliratozva is vannak. Megjegyzem, két ábra is megkapta az 1.2 számozást... Másik példa, hogy az 1. fejezetben a szerző először a BLUF domén fehérjéket mutatja be, aztán a fotoliázokat és a kriptokróмокokat, viszont a saját eredmények részletes tárgyalásakor a sorrend fordított. Ez a nem konzekvens szerkesztés megnehezíti az olvasást és a gondolatmenet követését. Ugyancsak feleslegesen nehezíti a megértést az, hogy több jelölést alkalmaz ugyanarra a molekulára: A triptofán hol Trp, hol W, a tirozin pedig Tyr vagy Y. Mivel ezeknek az ionos és a gyökös formáit is feltünteti a szerző, mindkettő ötféle jelölésben szerepel. Ugyanakkor a $\text{TrpOH}^{\bullet+}$ jelölés hibás is, a proton nitrogénhez kapcsolódik. A rövidítések jegyzéke egyébként nem teljes.

A pályázathoz tartozik egy tézises összefoglaló is. Amennyiben a bíráló feladatai közé tartozik ennek ellenőrzése is, akkor meg kell állapítanom, hogy ez a 63 oldalas dokumentum nem egyéb, mint

a teljes pályázatból átmásolt fejezetek, szövegek, ábrák gyűjteménye. Ennek ilyen formában nem látom értelmét, viszont hiányolom a szerző által megfogalmazott, egyes szám első személyben írt tézisek, azaz saját tudományos eredmények ennél jóval rövidebb terjedelmű felsorolását. Más szóval egy rövid bevezető után a teljes terjedelmű dolgozat 149-150. oldalát kellett volna átmásolni.

A szövegszerkesztés sajnos sok hibát hagyott a dolgozatban. Szavak ismétlődnek vagy hiányoznak a mondatokból. Több esetben ez a hiány értelemzavaró is tud lenni. Több esetben baj van az ábrák számozásával, nem konzekvens az ábrák szerkesztése. Hiányos vagy hibás az ábrák aláírása. Néhány példa:

A 18. oldalon hivatkozik a szerző egy ábrára, ami a pumpa-próba rendszer elvét mutatná be, de nincs ilyen ábra. A későbbi, 2.3 ábra részben ezt mutatja, de hiányoznak róla a pumpa és a próba előállítására szolgáló blokkok.

A 20. oldalon egy (5) számú összefüggésre hivatkozik a szerző, de nincs ilyen képlet.

A 2.12 ábra bal oldali sémája nem az infravörös abszorpciót és annak változását demonstrálja, hanem a látható tartománybeli abszorpciót és a fluoreszcenciát.

A 3.5 ábra alsó két paneljéhez nincs ábraaláírás. Az N5-metil FMNH (FADH) hibás jelölés, a hidrogént helyettesíti a metil csoport. Ha jól gondolom, N5-metil FMN (FAD) lenne helyes. Jobb lett volna a 3. panelben ezt a spektrumot kézzel rajzolni, hiszen ugyanaz, mint a 2. panel kék színű spektruma.

A 4.2 ábrán a FAD kofaktor az ábraaláírással ellentétben nem piros, hanem zöld.

Az 5.6 ábra B paneljén az x tengely számozása és a beosztása nem felelnek meg egymásnak. Így nehéz leolvasni a csúcsok helyzetét.

75. oldal utolsó sor: rosszul vannak a frekvenciák azonosítva.

76. oldal, alulról 5. sor: „lecsökkentette a ... hidrogén kötéseket” helyesebben: lecsökkentette a kötések erősségét.

Az 5.7 ábra B paneljén a fordított színezés felelne meg az A panelnek. Mind a négy panelen jobb lett volna nyilakkal megjelölni a szövegben tárgyalt csúcsokat. Ugyancsak jó lett volna az 5.14 ábra két paneljén ugyanazt a színkódot használni ugyanazokra a spektrumokra.

Az 5.28 ábra B és C paneljei az ábraaláíráshoz képest fel vannak cserélve.

A 108. oldalon és az 5.31 ábrán ellentmondás van a FAD C₂=O oxigénhez kapcsolt triptofán számozásában.

Az 5.49 ábra A paneljében az x tengely feliratozása nyilván nem lehet hullámhossz.

A 135. oldal utolsó sorában „a mutáns a várakozásoknak megfelelően fotoaktív” szerintem helyesen „nem fotoaktív”.

A dolgozat olvasása közben felmerült inkább szakmai kérdéseim és megjegyzéseim az alábbiak:

A 14. oldalon olvashatjuk, hogy „fiziológias körülmények között a fotoliázban nagy valószínűséggel nem kerül sor fotoaktivációra”. Máshol viszont azt, hogy a fotoaktiváció, tehát a FADH^- kétszeresen redukált, anionos forma megléte feltétele a hibás DNS redukálásának. Ugyanakkor a 13. oldalon, alulról az 5. sorban ezzel szemben az áll, hogy a FADH^\bullet , tehát a semleges gyök a javításhoz szükséges állapot. Ezeket kérem tisztázni.

A 2.7 ábrán A FAD abszorpcióváltozását látjuk 2D idő- és spektrális felbontásban. Kérdésem, hogy a legrövidebb időtartományban 410 és 490 nm között, fokozatosan eltolódva, milyen pozitív csúcsok jelennek meg?

A 2.8 ábra a Kerr-kapuzott fluoreszcencia berendezés elvi rajzát mutatja. Egyrészt nekem úgy tűnik, hogy a leírással ellentétben nem az a helyzet, hogy „a fluoreszcencia egy része áthalad a P2-es polarizátoron, ezt a fényt gyűjtjük be az O3-as Cassegrain objektívvel”, hanem előbb van az O3-as objektív és utána a polarizátor (vagy nem jó a rajz). Kérdésem továbbá, hogy mire való a bal oldali fényút az SP2 detektorral?

Az 50. oldal bekezdésében a fotoliáz katalitikus állapotáról és az MTHF antenna és a flavin extinkciójának relatív nagyságáról van szó. Az ezt demonstráló 4.3 ábrán akkor a katalitikus, teljesen redukált flavint látjuk vagy a nem-katalitikus félig redukáltat (ahogy az ábraalírás mondja)?

Az 52. oldal második bekezdésében olvashatunk a (gerjesztett) flavin triptofán lánc általi redukciójának lépéseiről. Kérem a jelöltet, hogy pontosan mutassa be a kialakuló ionpárokat, gyököket, gyökpárokat, a W_C , azaz a 306-os triptofán protonleadásával, illetve külső redukálószerrel való kölcsönhatásával kialakuló helyzetet, azaz a FAD és a triptofán elektronállapotát, ill. protonáltsági állapotát. Tartok tőle, hogy a jelölésekbe zavaró sajtóhibák csúsztak. A „ FADH^\bullet stabilizálódik és újra elérhető a CPD-k fotojavításához” kitétel ellentmondani látszik annak, hogy a FADH^- a katalitikusan aktív forma. Ide tartozik, hogy az 53. oldal alulról 5. sorában is hiányzik a FADH mellől a negatív jel.

A 4.6 ábraszámozás kétszer szerepel. Ebből a második 4.6 ábra a polarizációs mérésekből kapott anizotrópia spektrumokat mutatja, amik ismert okokból - de ezeket a szerző nem említi - nem teljesítik a magyarázatul szolgáló képlet alapján várható $-0,2 < r < 0,4$ követelményt. Jobb lett volna, ha a megfelelő, keverékre érvényes képletet adja meg a szerző, és a 86. referenciára hivatkozik, nem pedig a 83.-ra, ahol nincs polarizációs mérés.

Az 5.4 ábra B paneljén a FAD kofaktorra jellemző infravörös spektrumokat ábrázolta a szerző, az AppA fehérjén mérve. Egyrészt az 1650 cm^{-1} -es csúcsot a szöveggel ellentétben a $\text{C}_4=\text{O}$ rezgéshez rendeli. Másrészt én ennek az eltolódását jóval kisebbnek látom, mint ami az ábrán be van jelölve, és

egyben jóval kisebbnek, mint a hasonló eltolódást riboflavinban, a C₄ szén izotópos helyettesítésekor. És akkor ez az eltolódás nem nagyobb, mint az 1700 cm⁻¹ -es csúcs eltolódása, amit viszont a C₄=O rezgésnek tulajdonított.

A 87. oldal alján a szerző azt írja, hogy feltételezésük szerint az összes vizsgált BLUF domén fehérjében megvalósul az elektrontranszfer, csak kinetikai okokból nem mindig mérhető. Tekintve, hogy a vad típusú fehérjékben a kritikus pozícióban tirozin van, nem inkább proton kapcsolt elektrontranszferre gondolt? Elképzelhető-e, hogy a Trp104-ről valósul meg elektrontranszfer, de szintén kinetikai okokból nem mérhető?

Az 5.20 ábrán az AppA-BLUF domén aktív centrumának szerkezete látható vad típusú és C20S mutánsban. Mi a mutáció jelentősége, tekintettel arra, hogy pont ez az aminosav nincs ábrázolva a szerkezetben?

Az 5.1.4 fejezetben a szerző a W104 triptofán pozícióját határozza meg a flavinhoz képest az AppA fehérjében, FRET mérések segítségével. Nem világos, hogy a 92. oldalon szereplő képlet alapján, csak a FRET határfok ismeretében hogyan kapható meg a két kromofór R távolsága, ha nem tudjuk az R₀ távolságot, ahol a FRET határfoka 50 % lenne.

A DNS-hez kötött fotoliáz szerkezete és a flavin és környezetének viselkedése különbözik-e attól, amit tisztított fehérjében lehet tapasztalni? Van-e valami különbség a fotoaktivációban DNS jelenlétében?

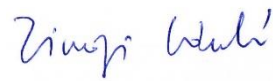
A 4.7 ábrán az elektrontranszfer lánc elemei között van-e fehérjemátrix? Ha igen, kiszámolták-e a legvalószínűbb elektrontranszfer útvonalat, illetve a mátrix sűrűségét, az ún. packing density-t? Van-e valahol esetleg vízmolekula ebben a láncban? A mért elektrontranszfer sebességek hogyan viszonyulnak az elméletileg várható (azaz kiszámolt) maximális sebességekhez aktivációmentes esetben?

Mi a hajtóerő (driving force) a három triptofánon és a flavinon végigfutó elektrontranszfer esetében? Tudjuk, hogy a triptofánoknak és a flavinnak mekkora a középponti redoxpotenciálja? Ha a végső protonleadás lenne a hajtóerő a 306-os triptofánról, akkor amíg ez a lassú folyamat be nem következik, mi stabilizálja a töltésszétválasztást?

Az 5.1, 5.5, 5.32 és 5.50 ábrán ugyanazt a jelenséget látjuk: BLUF domén fehérjékben világos állapotban a flavin 450 nm-es csúcsa pár nm-es vöröseltolódást mutat. A szerző ezt a flavint körülvevő hidrogénkötések átrendeződésével magyarázza. Azt javaslom, hogy ugyanezeket a spektrumokat ábrázolja hullámszám vagy energia függvényében. Lehet, hogy így nemcsak az S₀->S₁, de az S₀->S₂ átmenet, azaz a 360 nm körüli csúcs is ugyanakkora eltolódást mutatna. Ebben az esetben talán tovább lehetne menni, és elgondolkodni azon, hogy a hidrogénkötések átrendeződése az alapállapot energiáját növeli meg, de a gerjesztett állapotokét nem. Hátha ebből kiderül valami a flavin elektronállapotairól. Ugyanakkor az 5.52 ábrán a Q48E mutáció mintha tényleg csak az S₀->S₁ átmenet energiáját tolt volna el.

Összefoglalásként kijelentem, hogy Lukács András alkotó tevékenységét önállóan és magas szintűnek ismerem el, amivel hozzájárult egy jelentős fehérjecsald több tagja működésének jobb megértéséhez, és iskolateremtő technikai fejlesztést valósított meg az ultragyors biofizikai spektroszkópia területén Pécsen. A doktori mű hiteles adatokat tartalmaz, amiket Lukács András rangos folyóiratokban publikált. A mű összes tézisét elfogadom új tudományos eredményként, és elegendőnek tartom az MTA doktora cím megszerzéséhez. Ennek megfelelően a doktori művet alkalmasnak tartom nyilvános vitára és javaslom a vita kitűzését.

Szeged, 2024. július 22.



Zimányi László
az MTA doktora, tud. tanácsadó
HUN-REN SZBK Biofizikai Intézet