

## OPPONENSI VÉLEMÉNY

### Várnagy Katalin

*Az imidazolgyűrű szerepe a fémionmegkötésben: oldalláncban több donorcsoportot tartalmazó peptidok és származékaik átmenetifém komplexeinek egyensúlyi és redoxi sajátosságai*  
című MTA doktori értekezéséről

Várnagy Katalin munkája a világszerte elismert debreceni bio-koordinációs kémiai iskolában született, nem nélkülözve hazai és nemzetközi együttműködésben elért eredményeket sem. Az értekezés több, mint 20 év publikációinak javát képező 26 közleményen alapul, melyhez számos kapcsolódó prezentáció is társul. E közlemények a szakterület elismert nemzetközi folyóirataiban kaptak nyilvánosságot, jelentős szakmai visszhangot váltottak ki, és a szerzőt több szakmai-tudományos testületbe kvalifikálták. Ezek alapján már előljáróban leszögezhető, hogy Várnagy Katalin munkássága feltétlenül megérett az akadémiai doktori szinten való megméretésre.

Az értekezés alapvetése, a réz – cink- szuperoxid-dizmutáz (CuZnSOD), e sokoldalú, oxidatív stressz elleni enzim szerkezeti, egyensúlyi és funkcionális modellezése, a modellek jellemzése fontos interdiszciplináris kérdés, melynek megválaszolására sokoldalú közelítést használ. A debreceni bio-koordinációs kémiai iskolába alapnak tekintett, hagyományos, pH-potenciometriás egyensúlyi vizsgálatokon túl számos további technikát használt a tanulmányozott rendszerek jellemzésére. Így a témaválasztás és a kidolgozás alapossága egyaránt dicséretes.

A következőkben az értekezés felépítését követő sorrendben a tartalomra és formára vonatkozó kérdéseket, kritikai észrevételeket, hibákat foglalom össze:

1) A Bevezetés (1. oldal) elején felsorolt, fémion-kötő funkciós csoportok megnevezése úgy lenne következetes, ha valamennyi csoportnál a fémion-kötő formát használná: tehát ha pl, az aszparaginsavnál karboxilát, akkor a ciszteinnél tiolát.

2) Az értekezésben többször fordul elő olyan szövegrész, mint pl. az 1. oldalon is: „...a fő kérdés az, hogy hogyan kötődik a fémion az egyes proteinekhez, enzimekhez, és hogyan befolyásolja azok működését.” Ebben a felsorolásban együtt, mellérendelten szerepel a vegyülettípusra utaló protein és a biokémiai funkciót megjelölő enzim elnevezés, ami még azért is korrigálandó, mert az enzimek is fehérjék, ill. mert a proteinre van elfogadott, magyar kifejezés.

3) Rendszeresen duplán (angolul és magyarul is, pl. 3. oldal) használja a soft (lágy) és hard (kemény) kifejezéseket, bár ezek magyar formájukban meghonosodtak nyelvünkben.

4) Pongyola megfogalmazás azt írni (9. oldal) hogy „A keletkező komplexek kinetikailag labilisak, így a komplexképződésre a gyors egyensúly kialakulása jellemző”. Itt nyilván az egyensúly gyors kialakulásáról van szó.

5) Van-e magyarázat arra, hogy – mint a 16. oldalon írja – „A diszulfidkén-atom és réz(II)-, nikkell(II)-, cink(II)ionok között általában a tioéterkén-atomokhoz képest is kisebb mértékű kölcsönhatás alakul ki”

6) Több helyen is ír (pl. 16. oldal) cisztein csoportról, ami bizonyára a tiolát vagy tiolcsoportot jelenti, csak kevésbé szabatosan.

7) A 20. oldalon olvashatjuk, hogy „Ez a koordináció (azaz a hisztidin imidazolon és a terminális aminosoponton keresztüli koordináció) a peptidnitrogén deprotonálódását gátolja.” Kérdés, hogy mihez képest gátolja? A szabad liganduméhoz képest biztosan nem, hiszen a komplexekben a fémion-koordináció hatására az amino és imidazol csoportokon keresztül többlet-elektron-szívás jelentkezik a peptid nitrogéneken, így az ahhoz kötődő proton

könnyebben disszociál. A fenti megállapítás nyilván az imidazol (vagy egyéb harmadik funkciós csoport) nélküli esetekre, az ilyen ligandumokkal képződő komplexekre igaz.

8) A (16) – (18) egyenletekben, a PSEQUAD ill. SUPERQUAD programokra vonatkozó anyagmérleg egyenletekből hiányzik a  $C_L$ -re vonatkozó (ill. a  $C_M$ -re vonatkozó „hibridizált” formában kétszer is megvan).

9) A 101. hivatkozás (Pettit és mtsai) ott nem található.

10) Akadémiai doktori értekezésekben a kísérleti technikák (ill. azok közül egyesek) olyan részletes bemutatása, mint itt a CD spektroszkópiáé nem szükséges, különösen, ha olyan vitatható megállapítást tartalmaz, mint itt a 41. oldalon levő („*A koordináció hatására nemcsak egy donortom, hanem egy egész ligandum aszimmetrikussá válhat*”) Másrészt, az egyes kísérleti technikák bemutatásának részletessége és terjedelme igen egyenetlen.

11) Az 54. oldalon kezdődő 5.1.1. A bisz(imidazol-2-il)-csoportot tartalmazó ligandumok sav-bázis tulajdonságai című fejezet nagyobb gondosságot érdemelt volna, fogalmazás-beli és szakmai értelemben egyaránt.

A kezdő mondat (*A bisz(imidazol-2-il)-csoport aromás gyűrűinek protonálódása valamennyi ligandum esetén a savas tartományban lejátszódik (Melléklet, M1 táblázat), a két protonált nitrogén közeli helyzete ugyanis elősegíti az imidazolcsoport deprotonálódását*) első fele az imidazol csoport(ok) protonálódását, a második fele ugyanezek deprotonálódását írja le, miközben sejtjük, hogy „*a két protonált nitrogén*” megjelölés már nem két, hanem egy imidazol csoporton belül értendő. A közvetlen folytatásban azt olvassuk, hogy: *Ennek mértéke függ attól, hogy milyen távol helyezkedik el egymástól a két gyűrű.* Ez utóbbi függőség meglepő, ha a címben és az első mondatban is található bisz(imidazol-2-il)-csoport, mint a szóban forgó molekularészlet e bekezdés tárgyaként még érvényben van, hiszen ebben az imidazol csoportok távolsága (legalábbis a kovalens távolság, másról azonban nincs szó) a vizsgált ligandumok mindegyikében azonos, még ha a következő mondat más vegyületekről szól is.

Az M1 táblázat közli a vizsgált 29 bisz(imidazol-2-il) származék deprotonálódási állandóit, az 5 különböző funkciós csoporthoz rendelt formában. A táblázat felső sorának következetlensége, hogy e csoportok közül egy (a karboxil) protonvesztés előtti, az amino protonvesztés utáni állapotban van feltüntetve, az imidazol (Im) ill. hisztidin (His) jelölésről ez nem derül ki egyértelműen. Mivel deprotonálódási állandókról van szó, helyesebb lett volna valamennyi csoportot a protonált formájában feltüntetni. További elvi hibája e táblázatnak és az 5.1.1. fejezetnek, hogy a makroállandókat funkciós csoportokhoz rendeli, ami nagy gyakorlati hibát talán e vegyületek deprotonálódási major útvonalában nem okoz, viszont annál inkább sajnálatos, mert a fejezet végén írja, hogy a mikroszkópikus (tehát csoportokhoz rendelhető) állandókat is meghatározták és közölték. Meglepő, hogy a BIMA – e két imidazol és egy amino csoporttal rendelkező molekula egyik állandója eltűnt, ill. az indoklás szerint a pH-potenciometriásan nem mérhető, 1.5 alatti tartományba esik. Ez azért is furcsa, mert a bisz-imidazol első és második állandók eltérése az összes vegyületre számolt átlagban 2.25 logK egység, így a BIMA „elmaradt” állandójának értéke 1.8 logK körül várható, ami – ha nem is kényelmesen mérhető módon, de a titrálásakor jelentkezik.

E táblázatban találkozunk néhány kiugró értékkel is, melyek a valamennyi molekula részét képező bisz-imidazol első és második állandójának különbségében jelennek meg. E különbségek – mint analóg szerkezeti egységeken belül jelentkező hatások – a különböző molekulákban is nagy állandóságot mutatnak. Ez az itt tárgyalt molekulacsaládon belül is igazolódik, mert az M1 melléklet 29 vegyületéből 28-ra számolható  $pK_2(\text{Im}) - pK_1(\text{Im})$  különbség átlaga 2.25, mindössze 0.22 százalékos szórással, amely képbe a BIP-IleHisGly-OEt, az  $\alpha$ -Glu-BIMA, valamint kisebb mértékben a His-BIMA, az AlaProBIMA és a GlyIleGly-BIMA kevéssé illik bele. Az ez utóbbiaktól megtisztított, 22 vegyületre vonatkozó átlag 2.3, mindössze 0.13 százalékos pK egység szórással, ami mutatja egyrészt e különbségnek a

molekulák egyéb részeitől való függetlenségét, az adatok nagy többségének jóságát, de azért a jelentősebben eltérő BIP-IleHisGly-OEt és  $\alpha$ -Glu-BIMA adatok vélhető pontatlanságát is.

12) A 3. táblázat adatai milyen fémion esetére vonatkoznak?

13) Mi a magyarázata annak, hogy a 3. táblázatban lévő 27 ligandumra vonatkozó  $\log K'_2$  adatok közül a legnagyobb, a  $\log K'_1$  adatok közül pedig a második legnagyobb a funkció csoportokban legszegényebb vegyülethez, a BIM-hez tartozik?

14) A 3. táblázatban lévő  $\log(K'_1/K'_2)$  adatokról említi, hogy ezek 2 log egység körüli értékek, az eltérések a koordinálódó ligandumokban a koordinálódó csoportokra jellemző protonálódási állandókból adódnak. Ezen adatok kiemelkedően legnagyobbika a GlyGlyHisBIMA-ra vonatkozó érték (5.35), az egyik legkisebbike a PheHis-BIMA-ra vonatkozó (1.46), ugyanakkor e ligandumok protonálódó csoportjai azonos típusúak és a protonálódási állandóik eltérése is mérsékeltnek tekinthető. Mivel magyarázza ezt a jelenséget?

15) A (37) – (38) egyenletekben ill. a 6. táblázatban különböző BIMA és hisztidin-származékok rézkomplexeinek deprotonálódási egyenleteit ill. állandóit látjuk. Ezek lépcsőzetes deprotonálódási makroállandók. Nem kellene-e az  $\alpha$ -Glu-BIMA és az  $\alpha$ -Asp-BIMA  $pK_1$  és  $pK_2$  értékei között is meglennie a szükséges minimális (más esetekre az 5.5.1. fejezetben említett) „statisztikus esetként” is számon tartott 0.6 pK egység különbségnek?

16) Mint írja (71. oldal), a Ni(II)-dipeptid-BIMA rendszerekben képződnek .... egymagvú  $NiH_2L_2$ , illetve kétmagvú  $NiH_3L$ ,  $NiH_4L$  összetételű komplexek. Az utóbbinál vagy a „kétmagvú” megjelölés, vagy a képlet téves.

17) A 71. oldal utolsó bekezdésében írja, hogy cink(II) komplexek esetén a Gly-BIMA kivételével az amidnitrogén deprotonálódását sem tudták kimutatni. Vizsgálták-e e sorban a Phe-BIMA ligandumot, melyben az aromás gyűrű elektron-szívó effektusa következtében az elektronsűrűség bizonyosan kisebb, így a deprotonálódás is kedvezményezettebb.

18) A bisz(imidazol-2-il) és bisz(piridin-2-il) származékok (77. oldal), mint Lewis bázisok fémkomplex-képző és protonálódási tulajdonságai között – mint írja – számos analógia figyelhető meg. De természetesen, eltérések is mutatkoznak. Mi az oka annak, hogy az analóg BIMA és BPMA amino csoportjához rendelt protonálódási állandók között mintegy 0.8 logK különbség adódik a BPMA javára, ugyanakkor a másodjára protonálódó csoport (BIMA esetén az egyik imidazol, BPMA esetén az egyik piridin) bázicitás-csökkenése (a BIM-hez ill. BPM-hez képest) - az azonos kovalens távolság ellenére - piridin-származékban jóval nagyobb.

19) A többlet lúgfogyással járó, a sztöchiometriai összetételben  $H_x$  jelölést eredményező komplexképzési folyamatok örökzöld kérdése, hogy a többlet lúg a kötött víz protonjára fogy (azaz hidroxó-vegyes komplex keletkezik, ami a fémion – ligandum kölcsönhatást nem erősíti) vagy a ligandum valamely – pl. amid nitrogénjén lévő – protonját semlegesíti, ami viszont a fémion-ligandum kölcsönhatás erősödésével jár. A vizsgált rendszerekben milyen jelek ill. módszerek voltak e kérdés eldöntésére?

20) Az analóg piridin-származékok fémkomplexeinek stabilitása alatta marad az imidazol származékokéinak. Ez különösen jelentkezik a vanadil komplexeknél, melyek inkább oxigén, mint nitrogén donoratomú komplexeiről ismertek. Ennek fényében, és az imidazol, mint a piridinhez képest kétszer annyi nitrogénnel rendelkező donorcsoport ismeretében mi lehet a magyarázata a jelentősebb különbségnek?

21) A 80. oldalon olvasható megállapítás (mely szerint a koordinációs szférából kiszoruló piridin gyűrű – ellentétben az imidazol gyűrűvel – nem képes hidat képezve kötődni egy másik fémionhoz) meglehetősen triviális, hiszen a piridinben egy nitrogén donoratom van, ellentétben az imidazoláto-híd képzésében részt vevő imidazollal.

22) Több helyen (pl. 83. oldal) használja a „fiziológias pH” kifejezést, bizonyára a vér 7.4-es pH-jára gondolva. Nem szabad azonban elfelejteni, hogy pl. éhgyomorban a fiziológias pH 2, egyes bélszakaszokban 9.

23) Az oligopeptidek Cu(II) komplexeiről azt olvashatjuk (88. oldal), hogy „*a stabilizáló hatás a makrokelát méretének növekedésével egyre kisebb, így pl. a CuL komplexek stabilitása Gly<sub>3</sub>His > Gly<sub>4</sub>His > Gly<sub>5</sub>His sorrendben csökken*”. Ehhez képest a 12. táblázat adatai szerint – a várakozással ellentétben – a peptidnitrogének deprotonálódását jellemző pK értékek (legalábbis a pK<sub>1</sub>, a többinek a változása kevésbé karakteres) a fenti sorban csökkennek. Mivel magyarázható ez?

24) Az 5.5.1. fejezetben az M16. táblázatra hivatkozva azt írja, hogy „*az Ac-HHVGD-NH<sub>2</sub> peptidet leszámítva a pK értékek az imidazolcsoporthoz rendelhetők*”, valamint, hogy az „*Ac-HHVGD-NH<sub>2</sub> ligandum esetén a legkisebb deprotonálódási állandó az oldalláncbeli karboxilátcsoporthoz rendelhető*”. Az M16-os táblázatban azonban látjuk, hogy két további vegyületnél, az Ac-HGH-OH-nál és az Ac-HHGH-OH-nál is vannak karboxilcsoporthoz rendelhető állandók (amelyek egyébként kisebbek, mint az Ac-HHVGD-NH<sub>2</sub> karboxiljához tartozó) és deprotonálódási állandója tipikusan (így itt is) nem karboxilát, hanem karboxil csoportnak van.

25) Az 5.5.1. fejezetben a kettő, három vagy négy hisztidint tartalmazó peptidek kapcsán szó esik az imidazol csoportok hasonló és egymáshoz közeli értékéről, melyek különbsége „*a statisztikai értéknek megfelelő 0.6 log egység körül van*”. Megjegyzendő, hogy ez a 0.6-es pK különbség kétcsoportos molekulánál az első és második makroállandó között szükséges minimális érték, három- és négycsoportos esetre nem érvényes. Háromcsoportos molekulában az első és harmadik lépcsőzetes állandó között statisztikus esetben 0.96, míg négycsoportos molekulában az első és negyedik lépcsőzetes állandó között legalább 1.2 log egységnek kell lenni. A táblázat adataiból egyébként látható, hogy a különbségek ezen statisztikus eseti különbségeket meghaladják, ami arra utal, hogy az egyes imidazol egységek egyedi bázicitása – amint az várható – eltérő, illetve, hogy az egyik imidazol protonálódása csökkenti a másik/többi imidazol bázicitását, vagy – ami legvalószínűbb – hogy mindkét jelenség igaz.

26) A 101. oldalon azt olvashatjuk, hogy „*az oldalláncban jelenlevő valamennyi hisztidin imidazol-N kötődik a fémionhoz ...*”. Ugyanez található a 103. oldalon is. Ez a 47.(a) ábrán igaz, a 47. (b) és (c) ábrán nem, valamint a 48. ábrán is csak részben.

A fenti, konkrét kritikai észrevételek nem változtatnak azon, hogy Várnagy Katalin értekezése igen nagy munkán alapul, lényeges kérdéseket vizsgál, vizsgálataiban számos kísérleti technikát (pH-potenciometriát, UV és látható, cirkuláris dikroizmus, NMR, tömeg-, ESR spektroszkópiát, ciklikus voltammetriát, szuperoxid-dizmutáz aktivitás vizsgálatot és szintetikus módszereket) alkalmaz, igen nehezen közelíthető biológiai rendszert modellez, eredményei rangos nemzetközi folyóiratokban jelentek meg.

Az értekezésben foglaltak a pályázó előző fokozat-szerzése után születtek, a munka jelentős új eredményekkel gyarapította a tudományszakot, az eredmények eredetiségéhez és hitelességéhez nem fér kétség.

Mindezen tények és az értekezés fent felsorolt érényei alapján az értekezés nyilvános vitára tűzését és a mű elfogadását javaslom.

Budapest, 2014. április 25.

Noszál Béla