

Bodor Andrea

“Az NMR spektroszkópia sokszínűsége fehérjék és kismolekulák világában”

című MTA doktori értekezésének bírálata

A doktori értekezés középpontjában az NMR spektroszkópia áll, amelynek érdekes és hasznos alkalmazásait mutatja meg. Ez kiterjed a régóta ismert módszerek új megközelítésű kiaknázására és új mérés technikák fejlesztésére. A vizsgált rendszerek között fontos szerepet töltenek be a funkcionálisan rendezetlen fehérjék és a membrán-aktív peptidek, de górcső alá került bizonyos szerves kémiai reakciók mechanizmusa is.

Az értekezéshez közvetlenül 18 közlemény kapcsolódik, ebből 3 első- és 5 utolsó szerzős. A közlemények a 2006-2022-ig terjedő periódust ölelik fel. Öt cikk az elmúlt öt évben született jelezve a folyamatosan aktív kutatásokat.

A dolgozat 111 oldal terjedelmű, a megértést segítő ábrákkal és táblázatokkal gazdagon illusztrálva. A szakirodalmi áttekintés nehéz feladatot vállal fel. A bőven több mint 200 hivatkozást dolgoz fel nagyon tömören (20 oldalon), és igyekszik az összes témát érinteni (mérés technikák, IDPk, fehérje célpontok, membránok, szerves kémia, stb), ami az eredmények háttérében van. Az így kialakuló mozaikos jelleg miatt az olvasó nehezen kap rá a gondolatmenetre ebben a fejezetben. A kísérleti rész 10 oldalon kellő részletességgel mutatja be a legfontosabb körülményeket és számítási módszereket. Így az értekezés a terjedelmi felosztását tekintve arányos, a zömét az új eredmények teszik ki, amit legtöbbször olvasmányos, de időnként az élősóra jellemző terjedelmesebb stílusban prezentál. Gépelési hibát maximum elvétve találhatunk. Néhány esetben az angol szakkifejezés magyarítása szokatlan, a javasolt változtatások listájában megemlítem ezeket. A dolgozat formailag megfelel az MTA doktori értekezésekkel szemben támasztott követelményeknek.

A mű, igazodva az alkalmazott analitikai megközelítéshez és a számos különféle modellhez, többé-kevésbé szeparált fejezetekre tagolódik. Iparkodik felölelni öt nagyobb területet, amelyből hármat összeköt az IDP kérdéskör. Kapcsolódik ehhez még a membránok dinamikai jellemzése a kölcsönható peptidek/fehérjékkel összefüggésben, de a szerves kémiai mechanizmusok elemzése már egy elűtő terület. A célkitűzéseket így szegmentáltan, kísérleti technikánként vagy vizsgált modellenként fogalmazza meg 11 pontban. A célok így korlátozottan épülnek egymásra, de megfogalmazásuk világos. Az IDPk esetén az NMR spektroszkópiának egyedi szerepe van, mással közel fiziológiás körülmények között nagyfelbontású szerkezeti/dinamikai adatot ezekről a fehérjékről nem lehet nyerni. A szerves kémiai átalakulások követésénél pedig ez a technika adja a legrészletesebb *in situ* nyerhető információt. Ezért a kitűzött célok nyilvánvalóan igazoltak. Maguk a vizsgált fehérjék mindegyike rendkívül érdekes funkcióval rendelkezik, ami szintén alátámasztja a célok indokoltságát. Habár a membrán-aktív peptidek membránon belüli pozicionálása más kísérleti módszerekkel is vizsgálható, mindenképpen értékes, ha erre több független módszer is rendelkezésre áll.

Az alábbiakban foglalom össze nagyon tömören a dolgozat tézispontjait, amelyeket a jelölt jól tervezett kísérletekkel és számításokkal alaposan alátámasztott, meggyőzően bemutatott és megfelelő újdonságtartalommal bíralt közleményekben publikált.

1. PFGSE technika alkalmazásával szisztematikus diffúziós állandó méréseket végzett számos IDP és feltekeredett fehérjén. Megállapította, hogy a móltömeg és lánchossz függvényében a diffúziós állandóra és a sugárra különböző empirikus összefüggéseket kapunk a fehérjék IDP jellegétől függően.
2. A diffúziós állandóra kapott összefüggéseket alkalmazta hőmérséklet-, közeg-, fémion koncentráció- és foszforiláció-függő szerkezetváltozásokra.
3. Kifejlesztette a SHACA-HSQC NMR pulzusszekvenciát, ami $H\alpha$ -detektált módszer és tiszta kémiai eltolódási spektrumokat ad minden dimenzióban. Ez jelentős előrelépést ad felbontásban és érzékenységekben a technika jelenlegi állásához képest, és olyan szerkezeti információk kinyerését teszi lehetővé IDP-k esetén, ami korábban nem volt lehetséges. Bemutatta a szekvencia 3D kiterjesztését. Alkalmazásokat mutatott be a foszforiláció hatásának bemutatására és részletes elemzést tudott adni a Pro-k *cisz-transz* konformációs állapotára és azok szekvencia-függésére.
4. Több független módszerrel elvégezte a p53TAD1-60 szekvencia szerkezeti és dinamikai jellemzését és megállapította a szerkezeti hajlammal rendelkező szegmenseket. Továbbá, a fehérje S100A4-gyel felvett szerkezetét is meghatározta az NMR adatokon alapuló molekula dinamikai modellezéssel.
5. Alapos vizsgálatnak vetette alá a metasztázis marker Ca^{2+} -kötő homodimer S100A4 fehérje és az MPT miozin IIA fragmens kölcsönhatását mindkét kötőpartner oldaláról. A komplex legnagyobb valószínűséggel a target kötő és funkcionális feltekeredés modell szerint alakul ki, ami egy konformációs szelekció típusú mechanizmus.
6. Megállapította, hogy az NMII filamentumok szétesésének és összeállításának szabályozása az NMIIA esetében az S100 fehérjékkel történő kölcsönhatás, míg az NMIIIB izoformánál a foszforiláció következtében történik meg.
7. Kimutatta, hogy a homodimer dinein könnyű lánc és a miozin Va szakasz kölcsönhatásában a szabadon rendezetlen miozin peptid β -redő szerkezetet vesz fel. Speciális STD mérésekkel detektálta, hogy a kötőárkon túlnyúló szakaszok hidrofób kölcsönhatásokban vesznek részt.
8. Elsőként igazolta, hogy az agy-specifikus tubulin polimerizációt segítő TPPP/p25 fehérje hosszú rendezetlen terminális szakaszokkal rendelkezik. Továbbá megállapította, hogy a TPPP/p25 GTPáz aktivitást mutat, amit a Zn^{2+} enyhén gátol.
9. A MPMV dUTPáz jelenlétében történő dUTP hidrolízis mechanizmusát határozta meg. Igazolta, hogy Mg^{2+} jelenlétében a nukleofil támadás az α -foszfor atomon történik. Fémion hiányában a hidrolízis lassabb és a nukleofil támadás a β -foszfor atomon megy végbe.

10. ^{13}C relaxációs mérésekkel micella és bicella rendszerekben kimutatta, hogy a transzmembrán peptidek kismértékben növelik a lipidek acil láncának korrelációs idejét és a rendparamétert. A csökkent mobilitás függ a pozíciótól.
11. ^{31}P T1 relaxációs mérésekkel megállapította, hogy a felületaktív peptid nagyobb hatással van a lipid dinamikájára, mint a transzmembrán peptid. A T2 mérések esetén viszont a transzmembrán peptid sokkal nagyobb az effektust vált ki, ami a lipid részecskék morfológiai változása miatt van a SAXS mérések szerint.
12. Számos zöld-kémiai reakció mechanizmusának felderítéséhez járult hozzá meghatározó módon speciális *in situ* NMR mérések segítségével: növelt nyomás, izotóp jelzett reagens, alacsony hőmérséklet.

Kérdéseimet, megjegyzéseimet és javaslataimat az oldalszám megjelölésével adom meg (pN).

1. pVI: A non-uniform sampling fordítását nem-lineáris mintavételezésnek adja meg. Ez eltér az eredeti szakkifejezés eléggé világos jelentéstartalmától. Az eltérést mi indokolja, vagy teszi lehetővé?
2. p5: A 2D CON mérésnél hogyan lehetséges intermolekuláris korrelációt kimutatni? Hidrogén-kötésen keresztül lenne akkora csatolás? Vagy itt valójában aminosav-maradékok közötti korrelációról van szó?
3. p6: A "vízjel" kifejezés egybeírva véleményem szerint egy általánosan használt, ide nem kapcsolódó szakkifejezésre utal. Javaslom a különírást.
4. p6: A harmadik bekezdés nehezen olvasható. Javaslom az átfogalmazását.
5. p7: A "szerkezeti sokaságok halmaza" kifejezés számomra redundás jelentést hordoz. Véleményem szerint elegendő lenne a "szerkezeti sokaság".
6. p36: Megállapítja, hogy 20 kDa móltömegnél meredeken elhajlik a D-M összefüggés. Ezt "gyenge kooperatív molekuláris kölcsönhatások meglétével" magyarázza. Mit ért ez alatt? A jelölt által is felírt 5.1 Stokes-Einstein kifejezés a D és M között eleve hiperbolikus összefüggést ad meg, ami szükségszerűen ilyen típusú görbét kell adjon egyéb kölcsönhatás jelenléte nélkül is. Hogyan befolyásolná a görbét a fent említett kölcsönhatás?
7. p36: A 5.1c ábra mutatja, hogy a karbamidos közeg nem alakít minden vizsgált fehérjét rendezetlenné a diffúziós állandó szerint. Mi ennek a magyarázata?
8. p39: Az 5.2 táblázatban kísérleti és elméleti sugarakat és azok arányait hasonlítja össze. Az összevetéshez szerencsés lenne a kísérleti adatok szórását is figyelembe venni. A táblázat címében nincs megadva a fejléc mennyiségeinek magyarázata. Segítené az olvasót, ha nem a szövegben kellene ezeket megtalálni. Milyen adatot ad meg az utolsó oszlop?
9. p39: 5.2 táblázatban a számolt és kísérletes hidrodinamikai sugár értékek között nagyságrendnyi eltérés van. Mivel a diffúziós állandók viszont összevethetők, gyanús, hogy számolási hiba történt.


10. p47, 5.2.1-3 fejezetek: Több *cisz*-konformációhoz tartozó csúcs is megfigyelhető egyazon Pro esetében. Milyen szerkezeti hatások vezethetnek ehhez a jelenséghez? Hosszútávú kölcsönhatások a láncon belül? Mégsem teljesen rendezetlen a fehérje?
11. p53, 1. bek.: Érvel, hogy a *cisz*-konformáció kialakulása energetikailag és sztérikusan kedvezőtlen. Az energiaszintet befolyásoló tényezők lehetnek sztérikusak, elektrosztatikusak, stb.. A sztérikusan kedvezőtlen állapotok azért nem valósulnak meg, mert magas energiaszinthez vezetnek. Javasolom a megfogalmazás pontosítását.
12. p54, 1. bek.: Itt találkozunk vele először, de a dolgozatban többször előfordul a "terminális vég" kifejezés. Itt redundanciát látok, mivel a "terminális" kifejezés eleve olyan szegmenst vagy aminosav maradékot jelöl, ami a lánc végén van. Javasolom a terminális és a vég szinonimaként történő használatát.
13. p60, 5.3.2 ábra: Az ábra annotációja és aláírása hiányos, a mérete pedig túl kicsi.
14. p61, 5.3.3 ábra aláírás: modellei → modelljei
15. p67: A gerinc entrópiaváltozásának becslése a rendparaméterből számos termodinamikai adathoz vezet, ugyanakkor lényegi következtetéshez nem jutunk általuk. Nem is könnyű ez, mivel bármilyen jóslás vagy értelmezés akkor lehetséges, ha az állapotfüggvényeket teljeskörűen tudjuk becsülni. Mi volt a célja a parciális entrópia becslésének? Az 5.3.8 ábrát is javasolom nagyítani.
16. p68,69: Spekulatívnak tartom a Ca^{2+} affinitás növekedésének diszkusszióját. ITC, modellezés vagy más adat nélkül nem látom az alátámasztást.
17. p71, 3. bek.: "monitorziált" Helyette és minden előfordulásnál a szövegben monitorozott vagy nyomkövetett kifejezéseket használnám.
18. p71, 5.3.10 ábra: Az ábra olvashatatlanul kicsi/rossz felbontású.
19. p73, 2. bek.: Aszimmetrikus kötődésnél milyen szekvencia lenne, ami a másik árkot elfoglalja? Hogyan lehet következtetni ilyen jelenségre, ha csak egyféle ligandumot titrálunk? Kooperatív kötésre utaló jelenséget talált-e?
20. p74, 3. bek.: ML-DLC lassú kicserélődést mutatott HSQCban. STD viszont gyors/közepes cseresebességnél működik jól. Hogyan magyarázza a sikeres STDt? Végzett-e kontroll méréseket a ligandummal a célfehérje nélkül?
21. p76, 3. bek.: Nehéz a diszkussziót megérteni szerkezeti ábra nélkül. Hivatkozik az 5.3.12 ábrára, de ott NMR adatot találunk.
22. p77, 1. bek.: A miozin Va motorfehérje működését érintő diszkusszió a szövegnek ebben a formájában spekulatívnak tűnik. Nehéz az írottakból kikövetkeztetni, hogy a túlnyúló kölcsönhatások hogyan támasztják alá a "molekuláris ragasztó" elméletet.
23. p81, 2. bek.: Nem figyelt meg dUTP hidrolízist az első 6 órában. Vmilyen indukciós folyamat miatt lehet ez? Vagy csak a kimutatási határ alatt van addig a dUTP koncentrációja?
24. p85, 5.5.1 táblázat: A szórások alapján a 3-as pozícióban látni szignifikáns változást, ha összevetjük a peptid nélkül és a különböző peptidekkel készített mintákat. Ugyanakkor a szórásokat figyelembe véve a 12 és 13 pozíciók esetén a különbségek nem tűnnek

szignifikánsnak. Milyen adatok/számítás alapján állítja, hogy a láncvégi pozíciók esetén különbség van a minták között?

25. Egyéb formai megjegyzések a teljes műre vonatkozóan. Az értekezés nem következetes a mértékegységek formázásában. Javaslom a megszokott formátum alkalmazását: a mértékegységek és a számérték között legyen szóköz. Az ábrák mérete nagyon sok esetben kicsi, ami a részletgazdag és több paneles ábrázolásoknál nagyon megnehezíti az értelmezést. Az elektronikus verzióban ugyan lehetséges a nagyítás, de több esetben ilyenkor maga a digitális felbontás nem volt elegendő és homályos képet kapunk. Javaslom az ábrák méretének és felbontásának a revízióját a teljes műre.

Összefoglalva, a számos felmerült kérdéssel és megjegyzéssel együtt tartom az értekezést nagyon értékesnek és elgondolkodtatónak. A felsorolt tézispontokat új tudományos eredményeknek fogadom el. Egyértelmű, hogy számos ponton ért el a jelölt olyan eredményeket, amelyek előrevitték/előreviszik a vonatkozó tudományterületeket. Az új NMR technikák nagyon jól alkalmazható és robusztus eszközöket adnak a kutatók kezébe. Az eredmények sokasága és minősége lehetővé tette, hogy a követelményeknek messzemenően megfelelő doktori értekezés szülessen. Mindennek alapján a doktori művet nyilvános vitára alkalmasnak tartom, és sikeres védés esetén javaslom a doktori cím odaítélését.

Szeged, 2023. január 20.



Dr. Martinek Tamás
egyetemi tanár, az MTA doktora