

Válaszok Dr. Ambrus Attila bírálataira

Nagyon szépen köszönöm Dr. Ambrus Attilának az MTA doktori dolgozatom pozitív és támogató bírálatát, s a bírálatra fordított energiát.

Kérdéseire adott válaszaim:

- 1. Nem teljesen egyértelmű a disszertációból – de sokszor a cikkekből sem –, hogy hogyan kezelte a Jelölt az MD szimulációk során a nem szerkezeti (bulk) vizet. Implicit/explicit verziót/modellt alkalmazott, milyen vastag vízköpeny volt általában jelen, egy vagy kétrétegű volt-e a köpeny és ez utóbbival összhangban hogyan oldotta meg a hőpufferelést általában? Alkalmazott-e valamilyen beépített potenciálfelszínt a vízmolekulák szökésének megakadályozására?*
- 2. Amikor alkalmazott vízköpenyt, volt-e referencia futtatás víz nélkül is? Mi volt az alapvető különbség az eredményekben és változtatta-e bármikor is a levonható konklúziókat az, hogy vízzel vagy anélkül hajtotta végre a szimulációkat?*

A dolgozat rövid formája miatt nem volt lehetőségem a módszereket nagyon részletesen leírni, továbbá a cikkeinkben is előfordul, hogy tömören kellett leírni a módszert korábbi publikációkra történő utalással, amelyekben a részletes módszertan megtalálható. Hagyományos MD szimulációinkban mindig explicit módon modellezzük a vizet. Azaz a vízmolekulák ténylegesen jelen vannak a számolások során és nem is pusztán pár rétegben a fehérje felszínén. Szimulációinkban olyan „dobozt” használunk, amit a vízmolekulák (és ionok, általában 150 mM KCl) teljesen feltöltenek a fehérje körül. Továbbá, a doboz minden oldalán periodicitást alkalmazunk, azaz a dobozt minden oldalára „tükrözzük”. Ez azt jelenti a valóságban, hogy ha egy atom kilép a doboz egyik oldalán, akkor a másik oldalon lép be. Ez kiküszöböli azt a problémát, amit a dobozon kívüli vákuum okozna. Ahogy a Bíráló helyesen rávilágít, vízköpenyes szimuláció során szükség lenne extra potenciál alkalmazására, ami megakadályozza a vízmolekulák kilépését a vákuumba. A periodicitással viszont együtt jár, hogy a fehérje egyik fele kölcsönhatna a másik felével. Ezt úgy tudjuk megakadályozni, hogy a fehérje és a doboz fala között kb. 20 Å távolságot biztosítunk, ami hosszabb a kölcsönhatások (pl. van der Waals) távolságánál (beállítástól függően 10-14 Å). Egy ilyen rendszerben a hőpufferelés is sokkal egyszerűbb, legtöbbit a Berendsen és Nose-Hoover termosztátot alkalmazzuk. Egyik legutóbbi munkánk során az NBD1 letekerését vizsgáltuk

atomerőmikroszkóppal és húzásos molekuladinamikai szimulációkkal. Ezen számítások során nagyon nagy szimulációs dobozt kellett alkalmaznunk nagyon sok vízmolekulával, ezért felmerült bennünk a vízköpenyes szimuláció lehetősége is. Ezt végül azért nem alkalmaztuk, mert a fehérje lekeredése során annak felszíne nő és egyre több vízmolekulára lett volna szükség a beborításához. Továbbá az újabb molekuladinamikai szoftverekben (főleg GROMACS) ilyen futtatásokra nem találtam lehetőséget.

3. *Az in silico CFTR vizsgálatok esetében próbálták-e esetleg változtatni a klorid-koncentrációt és ha igen az milyen hatást eredményezett? Változtatták-e esetleg az ellenion minőségét? Hogyan hat a klorid-koncentráció változása a főbb patogén csatorna-variánsokra? Lehet ennek az információnak terápiás relevanciája esetleg?*

Nem, nem próbáltuk megváltoztatni a klorid-koncentrációt. Szimulációinkban ennek valószínűleg nem lett volna hatása és nem segített volna hozzá a kloridion átjutásához, ugyanis a fentebb említett periodikus határfeltétel miatt a membrán két oldalán megegyezett az ionok koncentrációja. Létezik egy GROMACS plugin, ami ezt a problémát úgy oldja meg, hogy két membrán kettősréteget helyez a szimulációs dobozba, így a két membrán között más lehet az ionok koncentrációja. Egy ilyen rendszernek a beállítása nagyon nehéz és amikor ezeket a szimulációkat végeztük, még nem állt rendelkezésünkre olyan hardver, amivel racionális lett volna ilyen nagy rendszerrel számolni. Egy 2023-as MD szimulációs tanulmányban (Zeng *et al.* 2023 CMLS, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36694009/>) magas membránpotenciál (500mV) alkalmazása mellett megfigyeltek spontán kloridion átjutást.

Az ellenion minőségét nem változtattuk, s nem gondolom, hogy ez hatással lenne a kloridion átjutására. Tudomásom szerint a kloridion koncentrációja nincs hatással a főbb patogén variánsokra. A kloridútvonal mentén elhelyezkedő pozitív töltésű aminosavak mutációi várhatóan változtatnak a kloridcsatorna érzékenységén is. Érdekes lenne azt is megvizsgálni, hogy vajon a klorid ionok „ligand”-ként funkcionálnak-e abban az értelemben, hogy meghatározott helyre kötődve stabilizálják a csatornát. Ilyet megfigyeltek már kálium csatornák esetén. Egyébként a szimuláció során használt klorid koncentráció (150mM) közel szaturálja a konduktanciát. szimulalat Cl concentracio kozel szaturalja a konduktanciat.

4. *Mi az az egyensúlyi szimuláció és a metadinamika? Utóbbi röviden említi a 14.o.-on, de nem teljesen egyértelmű, hogy mit ért ezek alatt és milyen információkat szolgáltatnak ezek a technikák.*

Az egyensúlyi molekuladinamikai szimuláció egy olyan számítási technika, amellyel egyes atomok vagy molekulák mozgását a klasszikus mechanika segítségével számoljuk. A szimuláció általában hosszú ideig fut, hogy a rendszer elérje az egyensúlyi állapotot, amikor makroszkópikus tulajdonságai (a hőmérséklet, a nyomás és a sűrűség) már nem változnak. Így statisztikai átlagok számolhatók különféle termodinamikai tulajdonságok meghatározásához, mint amilyen például a hőkapacitás, a diffúziós együtthatók és a radiális eloszlási függvények.

Nagy rendszerek, fehérjék esetén a konformációs tér feltérképezése nagy kihívás molekula dinamikai szimulációk során. Egyensúlyi szimulációban nagyon kicsi az esélye, hogy egy mély energiavölgyből a rendszer átkerüljön egy másik völgybe, konformációba, azaz egy (konformáció)változás megfigyeléséhez rendkívül sokáig kellene a szimulációt futtatni. A metadinamika módszer egy kiválasztott reakciókoordináta mentén elhelyezkedő magas potenciál gát leküzdését célozza. Ilyen szimuláció során adott időközönként az algoritmus ellenőrzi, hogy a rendszer elmozdult-e a reakciókoordináta mentén. Ha nem, akkor elfajult (eltérített, biased) potenciált ad a rendszerhez a reakciókoordináta adott pontjában. Így az energia ebben a pontban folyamatosan növekszik, feltölti a völgyet, azaz a rendszer áthalad a potenciálgáton (lecsúszik a másik oldalán). Például ha a reakciókoordináta a fehérje tömegközéppontja és a klorid ion közötti távolság egy membránra merőleges vektor irányában, akkor a kloridion mozdulatlansága esetén a potenciál növelése abban a pontban, ahol az ion tartózkodik, az ion kifelé vagy befelé mozdulását eredményezi. Ez a módszer nem csak arra alkalmas, hogy a rendszer (konformációs) állapotait feltérképezzük, hanem az energiagátak magasságának a jellemzésére is, ugyanis ismerjük az általunk hozzáadott energiamennyiségek nagyságát (képletesen: hány vödör homokot öntöttünk a gödörbe ahhoz, hogy a belesett szamarunk ki tudjon sétálni belőle). Dr. Kovács Mihály is feltette ezt a kérdést, ezért ez a bekezdés megegyezik a neki írt válaszzal.

5. *Egy érdeklődő technikai kérdés: A bírálónak limitált tapasztalata van az MD szimulációk terén és megtörtént vele, hogy a szimulációk során meglehetősen „szétrázódott” a szerkezete. Mitől jöhetett ez létre, mire kell vigyázni, hogy ez ne*

történjen meg egy szimuláció során? Ilyen nem fordult elő a disszertációban vizsgált rendszereken?

Egy szerkezet többféle okból is széteshet egy szimuláció során. Elsődlegesen nagyon fontos a kiindulási szerkezet jósága – például rosszul meghatározott, a Science folyóiratból visszavont publikáció ABC fehérje szerkezete gyorsan szétesett MD szimulációkban (Ivetac and Sansom 2008 European Biophysics Journal, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17960373/>). Előfordulhat, hogy valamilyen technikai hibát vétünk a rendszer felépítése során. Ennek valószínűségét nagyban csökkentheti, ha a rendszer generálása a CHARMM-GUI (<https://www.charmm-gui.org/>) webes felületen történik. Azonban nagyon ritkán így is előfordulhat, hogy a rácspontokra helyezett molekulák fizikailag nem reális konformációba kerülnek (pl. egy lipid fark áthalad egy Phe oldalláncon). Ilyenkor újra kell generálni a rendszert. Ha az energiaminimalizálás nem eredményes, akkor azt még érdemes megismételni egy-két alkalommal a módszerben jelenlevő random események miatt. Ha nem sikerül, akkor a rendszert újragenerálva már jó eséllyel túljutunk ezen a lépcsőn. A következő, többlépéses egyensúlyba-hozásos szimulációk szétesése esetén az integrálás lépésközét érdemes felére csökkenteni (a szokásos 2 fs helyett 1 fs), hogy a rendszer energiája sűrűbben frissüljön és így a lokális nagy hőfelszabadulásokat a termosztát kezelni tudja. Tapasztalataink szerint a duplapontosságú számítás, amit még javasolni szoktak ilyen esetben, nem segít. Továbbá ezekben az egyensúlyba-hozási lépésekben Berendsen termosztátot érdemes használni, mert gyorsabban reagál a változásokra (a végső *production* szimulációban viszont nem ajánlott a használata, mert a generált trajektória nem lesz kanonikus sokaság).

Végezetül ismét köszönöm dolgozatom bírálatát, s egyben kérem válaszaim szíves elfogadását és az MTA doktora cím odaítélésének támogatását.

Budapest, 2023. május 9.


Hegedűs Tamás