

## Válaszok Dr. Kovács Mihály bírálataira

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

Kérdéseire adott válaszaim:

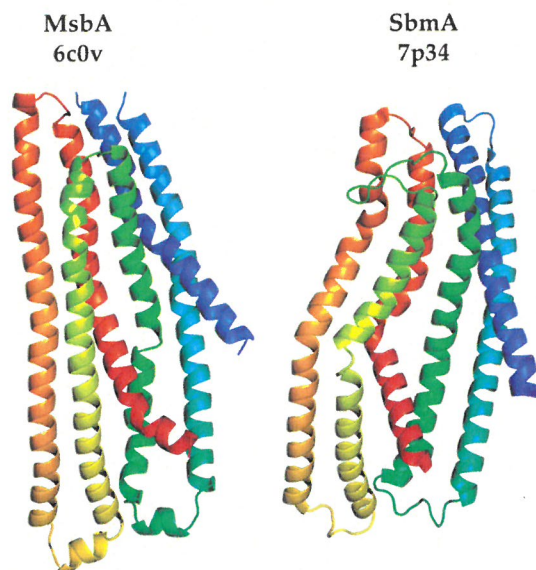
*1. Az 1. ábrán a jelöletlen barna szimbólumok feltehetően a között nukleotidot jelzik. Az ABC fehérjékben a transzportszubsztrát kötése illetve a nukleotidkötő doménekhez (NBD) kötött nukleotid állapota (nukleotidmentes, pre- illetve poszthidrolitikus stb.) közötti kapcsoltság milyen mértékben variál az ABC-fehérjék között, illetve milyen mértékben járul hozzá a transzportszubsztrát-specifitáshoz? Ismert olyan szubsztrát, amely köt ugyan a transzporterhez, de nem indukálja az NBD-k kölcsönhatását?*

A barna szimbólumok tényleg az ATP molekulákat jelölik. Sajnálom, hogy a nukleotidra és a szubsztrátra vonatkozó színmagyarázat kimaradt az ábraleírásból.

Az, hogy a szubsztrátkötés és az NBD-k állapota között mekkora a kapcsoltság, évtizedek óta lázban tartja a területet, s még mindig nagyon nehéz a témában határozott választ adni. Sokáig az volt az általános nézet, hogy beköt a szubsztrát, majd beköt az ATP, s a kötési energia hajtja a transzportot, végül a hasítás állítja vissza a kiindulási állapotot. Véleményem szerint az ATP sejten belüli koncentrációja (3-5 mM) és az NBD-k  $K_{M,ATP}$  (200-400  $\mu$ M) értéke miatt nagyon rövid időt tölt a fehérje ATP nélküli állapotban. Minden valószínűség szerint a TMD-be bekötött szubsztrát alloszterikus módon jelzi a már ATP-kötött NBD-knek, hogy itt az idő zárt konformációt felvenni és ATP-t hasítani. Annak ellenére, hogy évtizedek óta ismert az ABC transzporterek szubsztrát-stimulált ATPáz aktivitása, molekuláris részleteiben csak az elmúlt években kezdték vizsgálni, kevés eredménnyel (Clouser and Atkins Biochemistry 2022, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35384651>). Elvileg a krio-EM szerkezetek adhatnának erről határozott és egyértelmű információt. A gyakorlatot nehezíti, hogy a szerkezetmeghatározás során általában antitesteket (ami a rendelkezésre álló adatok alapján stabilizálja az NBD-szeparálódást) és NBD-mutánsokat (az ATP-áz aktivitás csökkentésére) használnak a konformációk stabilizálására.

Alapvetően azt gondolom, hogy egy átlagos ABC transzporter esetén a szubsztrát felismerés a transzmembrán doménekben (TMD) történik, ami jelez az NBD-knek, hogy asszociálódjanak szorosan. Ennek hatására megváltozik a TMD-k konformációja, s

bekövetkezik a transzport. Azonban vannak extrém esetek. Az első példát a CFTR esetén mutatom be, ami bár nem aktív transzporter, de az ATP kötés és hasítás változtatja a TMD-k konformációját, ami a csatorna nyitáshoz/záráshoz vezet. Az egyik leggyakoribb CF mutáció (G551D) az NBD1-ben található. A fehérje szerkezetét nem rontja el, az a vad típushoz hasonlóan ott van a sejtek membránjában, csak nem működik. Azt lehetne gondolni, hogy elromlott az egyik ATP kötőhely, azonban a kezelésre alkalmazott gyógyszer nagyon távoli TM régióba köt, azaz valószínűleg a mutáció „csak” az alloszterikus kommunikációt tette tönkre. Még kirívóbb példa az, hogy míg a csatorna működéséhez, a TMD-k konformációjának megfelelő változásához elvileg szükség van a mindkét NBD-t igénylő ATP kötésre/hasításra, az NBD2 nélküli CFTR fehérje is működőképes. A legkülönösebb példát, ami szinte már filozófiai problémákat is felvet, egy olyan fehérje adja (SbmA, Ghilarov et al. Sci Adv 2021 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34516884/>), amelynek a TMD-je pont olyan mint az MDR1/Pgp transzporteré (lsd. ábra). Viszont nincs NBD-je - nem külön láncon kódolódik az NBD, hanem NBD nélkül transzportál. Mivel az ABC fehérjéket a TMD szerkezet alapján osztályozzuk, ezért ezt a fehérjét ABC fehérjének kellene neveznünk, de mégsem hívhatjuk ABC fehérjének, mert nem rendelkezik a rájuk jellemző ATP-kötő kazettával/doménnel.



2. Az 1-2. tézisek alapjául szolgáló közlemények a legidézettebbek a disszertáció alapjául szolgáló cikkek közül. Ezekben a jelölt társszerzőként szerepel. Kérem ismertesse a munkákhoz való hozzájárulását.

Lukács Gergely barátommal már több mint 10 éve szorosabban együttműködünk. Ezen cikkek idején a feladatok megosztása alapvetően az volt, hogy munkatársaimmal *in silico* módszerekkel járultunk hozzá a kísérletek atomi szintű értelmezéséhez. Például abban, hogy hova kötődhetnek a gyógyszermolekulák, mutációk hogyan változtathatják meg a fehérje dinamikáját. A kérdés talán azért merült fel a Bírálóban, mert az egyik közös cikkünk úgy végződött, hogy minden *in silico* rész a kiegészítő anyagba került bírálói kérésre és terjedelmi korlátok miatt. Gergővel kapcsolatunk mára odáig fejlődött, hogy heti szinten igyekszünk beszélgetni, ötleteket adni egymás kísérleteihez (az utóbbi években mi is újból elkezdtünk kísérletezni - lsd. CFTR R domén szabályozásának tanulmányozása, CFTR NBD1 fel/letekeredés vizsgálata: Padányi et al. 2022 Computational and Structural Biotechnology Journal, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35685375>; SERCA/E-fehérje kapcsolata).

3. Kérem röviden ismertesse a DOPE pontszám (7. o.) illetve a pLDDT pontszám (26. o.) mibenlétét, jelentőségét.

A DOPE (Discrete Optimized Protein Energy; én ütöttem el a dolgozatban az utolsó karaktert) egy statisztikus potenciál, amit homológia modellezés során használunk arra, hogy a Modeller szoftver által generált nagyszámú szerkezeti modelltől kiválasszuk a lehető legjobbat. Ennek ellenére előfordulhat például, hogy nem a legjobb DOPE pontszámmal rendelkező, azaz nem a legalacsonyabb energiájú modellt fogjuk kiválasztani, mert az tartalmaz egy olyan szerkezeti részt, amiről biológiai tudásunk alapján tudjuk, hogy nem helyes.

Az IDDT (Local Distance Difference Test) egy olyan metrika, amivel két szerkezetet lehet összehasonlítani úgy, hogy nem kell a két szerkezetet illesztenünk (Mariani *et al.* Bioinformatics 2013, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23986568>). Ennek olyan esetben van jelentősége, amikor pl. egy fehérje két olyan konformációját szeretnénk összehasonlítani, amelyek eltérnek egymástól az eltérő funkcionális állapot miatt. Leegyszerűsítve, ez a pontozás azt mondja meg, hogy mennyire hasonlít egy  $C\alpha$  atom és a hozzá közeli  $C\alpha$  atomok távolsága egy másik szerkezetben található távolságokhoz. Szerkezetjósítás tesztelése esetén a kísérletesen meghatározott szerkezethez hasonlítunk. AlphaFold szerkezetjósítás esetén nem ismert a kísérletes szerkezet, nincs mihez hasonlítani, ezért ilyenkor a jósolt (predicted) pLDDT

pontszámot alkalmazzuk. Hogyan lehet jósolni ilyen esetben? Olyan fehérjék szerkezeteivel, amelyeknek jósolt szerkezete mellett ismert a kísérletes szerkezete is, betanítottak egy neurális hálót pLDDT számolására. A pontszám jelentősége abban van, hogy megbízható információt ad arról, hogy a jósolt szerkezet mennyire hihető el (vagy mennyire rendezetlen).

4. (9-10. o.) „[...] a CFTR fehérje feltekeredését segítő legígéretesebb korrektor vegyület, a VX-809 a  $\Delta F508$ -CFTR sejtfelszíni mennyiségét a vad típus szintjének kevesebb, mint 15%-ára növeli.” Kezelés nélkül a betegekben milyen sejtfelszíni mennyiségben van jelen a  $\Delta F508$ -CFTR fehérje?

Betegekben in situ igen nehéz megmérni immuncitokémiával a sejtfelszíni fehérjemennyiséget. Primer légúti és bélhámsejtek organid kultúrájával végzett funkcionális mérések alapján széles határok között mozoghat a szintje, ami kb. 2-6% a vad típusú CFTR fehérje szintjéhez képest. Figyelembe véve a mutáns funkcionális defektusait is, ez megfelelhet 4-12%-os WT denzitásnak. Valószínűsíthető, hogy 25% működőképes fehérjeszint elérése elegendő a betegség gyógyításához. Ezt a szintet a VX-809 korrektor gyógyszermolekula önmagában nem változtatta meg, hatástalan volt. A VX-661+VX-445+VX-770 (tikafta) kombináció 65-70%-ra javítja  $\Delta F508$  betegek tüdőfunkcióját.

5. (12. o.) A 4.1.3. fejezetben a jelölt említi, hogy a releváns, kísérletesen meghatározott CFTR szerkezet nem mutat a kloridion vezetésére alkalmas útvonalat. Mennyiben realiztikus illetve elvárható az, hogy az ionvezetés útvonala teljes hosszában láthatóan nyitott legyen bármely egyedi konformációban?

6. (15. o.) „[...] atomi szinten azonosítottuk és jellemeztük a kloridionok legvalószínűbb átjutási útvonalát.” A jelölt által azonosított útvonalra született később kísérletes validáció?

Egyedi-molekula *patch clamp* kísérletek alapján a képzeletben egy csatornafehérje olyan, hogy nyitás esetén a nyíláson át tudnak ömleni ionok. A Bíráló felvetése teljesen jogos, különösen egy olyan flexibilis fehérje esetén, mint amilyen a CFTR, s előfordulhat, hogy egyedi konformációkban nem figyelhető meg teljes hosszában nyitott csatorna. Ugyanakkor számomra zavaró, hogy csak egy pontban látható zárás, s sem MD szimulációk, sem krio-EM-ből származó adatok nem mutatnak olyan konformációt, amelyik máshol zárt illetve nyitott.



Nem, nem született kísérletes validáció szimulációinkban leírt klorid útvonalra. Egy másik csoport (Zeng *et al.* CMLS 2023, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36694009/>) molekula dinamika szimulációkkal írt le hasonló átjutást a CFTR fehérjén, ők hozzánk képest részletesebben jellemezték a folyamatot. Magasabb nyitási valószínűséget láttak és ezzel egy időben spontán kloridion átjutást. Fontos, hogy ezt olyan membránpotenciál alkalmazása mellett érték el (500mV), ami jelentősen magasabb a fiziológiai körülmények között megfigyelhető feszültségkülönbségnél (30-90mV).

Ehhez és a Bíráló ABCG2 fehérjével kapcsolatos kérdéséhez még annyi megjegyzést fűzök, hogy bár számos krio-EM szerkezet jelent meg az utóbbi hat évben, véleményem szerint most kezd annyira rutinná válni e nagy ABC fehérjék szerkezet-meghatározása, hogy várhatóan rövid időn (2-3 éven) belül elegendő adat fog rendelkezésre állni ahhoz, hogy a feltett kérdésekre határozottabb és pontos választ lehessen adni.

*7. (20. o.) Kérem a jelölt röviden ismertesse a metadinamikai MD szimulációk lényegét.*

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).

8. (31. o.) *A jelölt a mélytanulós eszközökről megjegyzi, hogy „ezen algoritmusok egyike sem képes a dinamikát és a konformációs sokaságot jellemezni.” Elképzelhetőnek tartja, hogy mesterséges intelligencia segítségével, a rendelkezésre álló kísérletes molekuladinamikai adatokból kiindulva, a fehérjeműködés dinamikus aspektusai is hamarosan használható megbízhatósággal előre jelezhetőek lesznek?*

Minden bizonnyal hamarosan az AlphaFold-hoz hasonló predikciós erejű neurális háló is meg fog jelenni fehérjék dinamikájának jóslására. Próbálkozások már történtek. Az egyik megközelítés egy relatíve egyszerű *autoencoder*-en alapuló módszer, ami a fehérje lehetséges konformációit tanulja meg rövid dinamikai szimulációkból (Degiacomi 2019 Structure <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31031199/>). Ennek egyik problémája, hogy a látens térből csak az ismert konformációk közeléből mintavételezhetünk, akkor kapunk megbízható szerkezeteket. Viszont ezek nem térnek el jelentősen a betanított szerkezetek konformációjától, azaz elvesz a lényeg, a jelentősen új konformációk megismerése. Továbbá ez azt is jelenti, hogy nem kanonikus sokaságból történik a mintavételezés. Annak pár éve már, hogy Boltzman generátorok alkalmazását vizsgálják egyensúlyi állapotok vizsgálatára, azonban ezek csak nagyon kis rendszerekre alkalmazhatók (Noé et al. Science 2019, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31488660/>). Ezzel kapcsolatos komolyabb áttörést korábbi együttműködő partnerem, Nikolay Dokholyan csoportja érte el (<https://arxiv.org/abs/2302.11430>), algoritmusuk nagyobb rendszerekre is alkalmazható, de pontosságával még komoly problémák vannak.

9. *A jelölt témában közölt publikációinak megjelenése óta milyen haladás történt a cisztásfibrozis CFTR korrektorokkal illetve potenciátorokkal történő gyógyításában?*

A fentebb említett G551D funkcionális mutánsra az Ivacaftor gyógyszert már több mint 10 éve alkalmazzák. Mellékhatásai miatt azonban próbálkoznak újabb generációs potenciátorral kiváltani, mint amilyen a GLPG1837 (Davies et al. J Cyst Fibr 2019 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31147302/>). A leggyakoribb  $\Delta F508$  mutációra is már évek óta elérhető egy hármas kombinációjú gyógyszer, ami normálizálja a betegek állapotát. Tudomásom szerint a legnagyobb amerikai CF központban (Chapel Hill, UNC, NC) a korábbi 40-50 súlyos beteg/év és 10-15 tüdőtranszplantáció/év helyett az elmúlt évben kevesebb, mint 10 súlyos beteg volt kórházban és csak 2-3 tüdőtranszplantációra volt szükség. Bár ezek az adatok sokatmondók, igazán hosszú távú hatása ezeknek a gyógyszereknek még nem ismert,

mert olyan betegek kezdtek el szedni, akiknek a tüdőszövege már jelentősen károsodott és bizonytalan mértékű mellékhatások is megfigyelhetők (pl. pszichológiai).

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

Budapest, 2023. május 9.

  
Hegedűs Tamás