

Válaszok Dr. Bogár Ferenc bírálataira

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

Kérdéseire adott válaszaim:

A CFTR ioncsatornával összefüggő eredményekhez kapcsolódó kérdések:

1. A VX809 molekula chaperon-ként viselkedve stabilizálja a CFTR szerkezetét, ami megnöveli a funkcionális fehérje mennyiségét. Ismert-e a NBD1-TMD1/2 interfészt stabilizációjának mechanizmusa, és az, hogy milyen kölcsönhatásokat alakít ki a VX809 molekula a CFTR fehérjével a stabilizáció során?

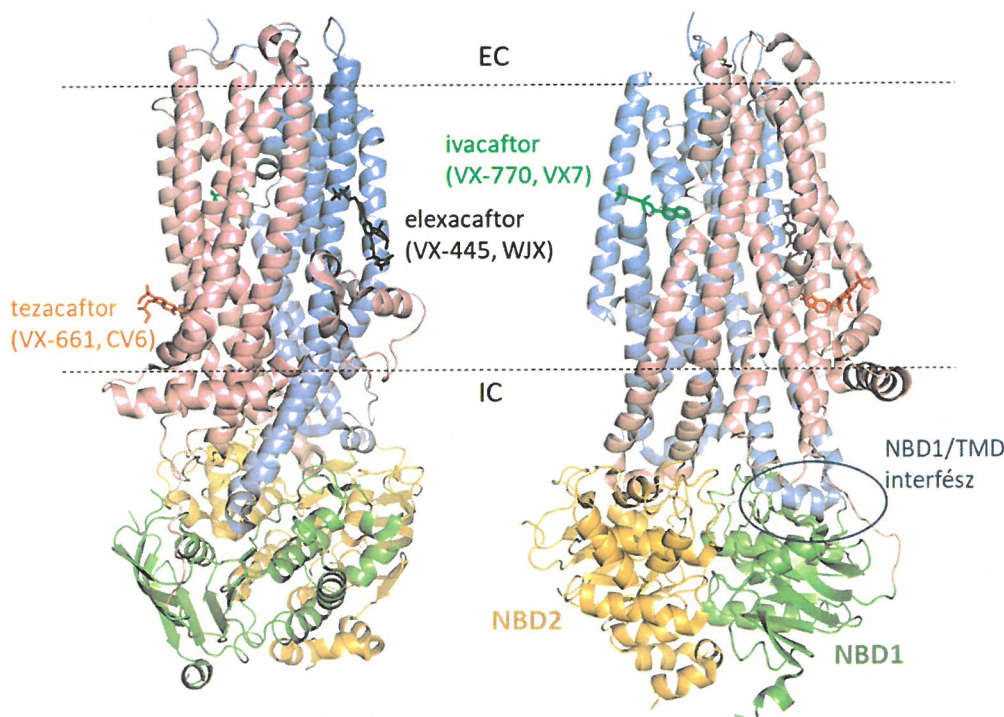
Érdekes módon ez a molekula nem közvetlenül az NBD1-TMD interfészhez kötődik, hanem a transzmembrán régióban négy darab hélix-vel alakít ki kölcsönhatást (Isd. a következő oldali ábrát) (Fiedorczuk and Chen, 2022 Cell, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34995514>). A vegyület stabilizálja ezeket a régiókat, ami alloszterikusan hat a távolabbi sérült NBD1 szerkezetre, NBD1/TMD interfészre. Lukács Gergely együttműködő partneremmel a közelmúltban mutattuk ki (kéziratunk már a bírálóknál), hogy a CFTR fehérje különböző régiói között nagyon erős az alloszterikus kapcsoltság, s egy domén (de)stabilizálása az összes többi domén (de)stabilizálását maga után vonja. Ez azért különösen fontos, mert így egy adott doménben egy adott helyre kötődő egyetlen alloszterikusan ható gyógyszer eltérő mutációval rendelkező betegek kezelésére is alkalmas lehet.

2. A 2013-ban a Nature Chemical Biology folyóiratban közölt vizsgálataik idején csak nemszpecifikus NBD1 korrektorok voltak ismertek. Milyen eredmények születtek az elmúlt 10 évben a specifikus NBD1 korrektorok kutatásának területén?

A fent említett cikk levelező szerzője, Lukács Gergely, a cikkben vázolt ötlet alapján próbált NBD1-en ható vegyületeket azonosítani együttműködve a Novartis gyógyszercéggel (Veit *et al.* 2018 Nature Medicine, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30297908>). Találtak egy ígéretes vegyületet (#4172), amely eredményeik alapján nagy valószínűséggel az NBD1-en hat. A vegyület klinikai vizsgálatára végül nem került sor, mivel a Novartis fejlesztési preferenciái időközben megváltoztak. A többi újgenerációs korrektorról vagy nem tudjuk, hogy hova köt (példa), vagy a transzmembrán doménekhez (példa), s így alloszterikusan fejtik ki hatásukat.

Fontos megemlíteni, hogy a Sionna Therapeutics azonosított egy NBD1-en ható molekulát, amelyet más gyógyszermolekulákkal adva teljes mértékben megmenthető a $\Delta F508$ CFTR (<https://bit.ly/3VPPQDA>).

A dolgozat beadásával egyidejűleg jelent meg egy tanulmányunk (Padányi *et al.* 2022 *Comp and Struct Biotechnology J*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35685375>), amelyben az meghatároztuk a kötőhelyét az akkoriban egyetlen olyan vegyületnek (5-bromindole-3-acetic acid, BIA, *in vitro* 1-10 mM koncentrációban hatásos), amelyről tudott volt, hogy az NBD1-hez köt. Eredményeink alapján nem interferál az ATP kötéssel és NBD asszociációval, ezért érdemes lehet fejleszteni és specifikusabbá tenni.



3. A 2019-ben az FDA által jóváhagyott cisztás fibrózis kezelésére szolgáló Tricافتor egyik összetevője az "új generációs" CFTR modulator az elexacaftor (VX-445). Mi a hatásmechanizmusa ennek a vegyületnek?

Ez a vegyület is a transzmembrán doménhez kötődik, illetve részben az L0/Lasso régióhoz (lsd. fenti ábra) (Fiedorczuk and Chen, 2022 *Cell*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34995514>). Azaz hatását szintén alloszterikusan fejti ki, ami számunkra nem volt meglepő annak fényében, hogy az említett, bírálat alatt levő kéziratunkban bemutatjuk, hogy az L0/Lasso régió stabilizálása alloszterikusan stabilizál távoli régiókat (pl. NBD1/TMD interfész) is.

4. A CFTR csatorna Cl^- ion transzportjának aktiválásában egyes kutatók szerint szerepet játszhat a kialakuló membrán potenciál. Lehet-e szerepe a membránpotenciál figyelembevételének az iontranszport modellezése során?

A csatorna aktiválásában a membránpotenciál nem játszik közvetlen szerepet, azonban az átáramlott kloridionok mennyiségére jelentős befolyással van, amit számos egyedi csatornás kísérlet is mutat. Ezek alapján a membránpotenciál figyelembevétele a szimuláció során biztosan segítené a klorid átjutását. Annak, hogy a szimulációkban nem látunk kloridáramot az lehet az oka, hogy a szerkezetben a TM8 megtörése akadályozza a nyitott pórus létrejöttét, az ionok átjutásának konformációs gátja van (Hegedűs *et al.* 2022 CMLS, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35034173/>). Az év elején publikáltak egy olyan MD szimulációt tartalmazó tanulmányt, ahol membránpotenciál hatására spontán jutottak át kloridionok a csatornán (Zeng *et al.* 2023 CMLS, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36694009/>), azonban ők a fiziológiásan kialakuló membránpotenciálnál jóval magasabb feszültséget alkalmaztak (500mV-ot 30-90mV helyett). Szimulációik alapján azt gondolják, hogy az átjutást a pórus közelében az elektromos mező által megnövelt hidratáció segíti.

5. Homológia modellezés és molekuladinamikai szimulációk segítségével megmutatták, hogy a CFTR csatorna falát alkotó TM8 hélix megtört szerkezete kísérleti műtermék lehet. Megerősítették-e azóta az újabb szerkezeti adatok ezt a következtetést?

Nem. Azonban egyre több kísérletes CFTR-kutató is kezdi megkérdőjelezni a törés jelenlétét és kísérletes CFTR szerkezetek figyelembevételét kizáró AlphaFold predikciók sem mutatnak törést (Hegedűs *et al.* 2022 CMLS, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35034173/>).

ABCG2 transzporterrel kapcsolatos kérdések:

6. Az ABCG2 transzporter térszerkezetének hiánya nagyban hátráltatta a működésének megértésére illetve a működés befolyásolására irányuló kutatásokat. Ezt a problémát részben megoldották az ABCG5/ABCG8 dimer szerkezeten alapuló homológia modell elkészítésével. A munka magas minőségét mutatja, hogy az 2017-ben a Nature-ben közölt krio-EM szerkezet transzmembrán doménjének és a homológia modell megfelelő tartományának RMSD-je csupán 2.2 Å-ös eltérést mutatott a szerzők szerint. Megállapították továbbá, hogy lényeges különbség két helyen mutatkozott az egyik a TM2 és TM5a hélixek egy aminosavval történő elcsúszása, a másik az EL3 hurok szerkezete. Mennyiben befolyásolhatják ezek az eltérések a homológia modellen alapuló szimulációkból levont következtetéseiket?

7. Az utóbbi időben több olyan publikáció is megjelent, ami az ABCG2 transzport folyamatának részleteit (pl. Yu és mts. Nat Com 12,4376 (2021)), illetve a szubsztrát kötés mikéntjét tárgyalja

(pl. Kowal és mts. *J Mol Biol* 433, 166980 (2021)). Hogyan viszonyulnak az Önök szimuláción alapuló következtetései ezen kísérleti vizsgálatok eredményeihez?

A TM5a (TM5 extracelláris része) allosztérikusan hatással lehet azokra a folyamatokra, amelyet jellemeztünk. Azonban a cikk írásakor végzett szimulációink rövid időskálája miatt ezeket a hatásokat elhanyagolhatónak gondolom. A TM2 eltolódás viszont érintette a központi kötőzsebet, ami okot adhatna aggodalomra. Azonban azóta M. Liao csoportja is meghatározott ABCG2 szerkezeteket (Orlando és Liao 2020 Nat Commun, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32385283>), amelyek némiképp különböznek a Locher laborban meghatározott szerkezetektől. Két fontos eltérést emelek ki: ATP nélkül is zárt volt a TM hélixek citoszólikus része, ami jelentheti azt, hogy a szubsztrátok nem csak úgy egyszerűen beúsznak egy nagy kötőzseb közepébe, hanem egy sajátos útvonalat kell bejárniuk, miközben aminosavakkal kialakítanak és elvesztenek kölcsönhatásokat. Kaspar Locher csoportja a szerkezetmeghatározás során egy extracelluláris régiót felismerő antitestet alkalmaz, ami a fehérje konformációját rögzítve segíti a krio-EM kísérleteket. Ez kritikaként is felmerült annak kapcsán, hogy vajon fiziológiásan megjelenhet-e ATP nélkül a befelé nagyon nyitott transzmembrán domén. Ezzel arra szeretnék utalni, hogy a kísérletes szerkezetek kapcsán is felmerülnek kritikus kérdések. Továbbá a belül-zárt szerkezetben a TM2 konformációja jelentősen eltér, a szubsztrátkötésben jelentős szerepet játszó Phe439 nem a szubsztrátkötő-zseb felé néz. Azaz a két szerkezetben a TM2 elcsúszott egy kicsit egymáshoz képest. Magam nem tartottam jelentősnek a homológia modellben az elcsúszást, mert a kísérletes statikus szerkezetekkel szemben mi a fehérjét mozgás közben figyeljük meg.

Yu és mások is úgy gondolják, hogy az R482 nem vesz közvetlenül részt a szubsztrátkötésben. Az ABCG2 homológia modelles publikációnkban nem zártuk ki annak a lehetőségét, hogy az R482 nem közvetlenül hat a szubsztrátkötésre, hanem indirekt módon. Bár az ebben a cikkben bemutatott *in silico* dokkolási eredmények meglepően informatívak, a dokkolás ilyen típusú alkalmazása nem megbízható. Ugyanakkor későbbi publikációnk (Nagy *et al.* 2021 CMLS) MD szimulációiban is tapasztaltuk azt, hogy egy szubsztrát (a húgysav), a centrális kötőhely elérése előtt meglátogatja az oldalsó, R482-et is tartalmazó kötőzsebet, ez többször is előfordult a szimuláció során. Ennek ellenére a biokémiai kísérletes publikációk alapján inkább az allosztérikus hatást tartom valószínűbbnek.

Adatbázisokkal kapcsolatos kérdések:

8. *ABCMdb: Disszertációjában említi, hogy a 2012-ben létrehozott, az ABC transzporterek mutációit tartalmazó ABCMdb adatbázist új funkciókkal bővítették 2017-ben. Kérem, ismertesse ezeket!*

Az adatbázis első verziójában arra fókuszáltunk, hogy *in vitro* mutagenézises kísérletek adatait gyűjtsük össze az irodalomból. A betegséget okozó mutációk adatbázisait ekkor inkább validálásra használtuk. A későbbi években, a felhasználók visszajelzése alapján sokkal nagyobb hangsúlyt fektettünk a patogén mutációkra. Ezeket elsősorban a ClinVar adatbázisból gyűjtöttük be. Azonban ez az adathalmaz számos ABC fehérjére kevés adatot tartalmazott. Ezért kétféle *in silico* módszerrel is megjósoltuk az adott mutációk hatásait, amit szintén beillesztettünk az adatbázisba. Fontos kérdés volt, hogy ne csak fehérjeszintű adatokat tartalmazzon az adatbázis, ezért nem-kódoló régiókról is illesztettünk be adatokat az adatbázis új verziójába.

9. *Conftor: A Pgp-szerű transzporter szerkezetek kísérleti szerkezeteinek kvantitatív összehasonlítása jelentős segítséget ad a növekvő számú kísérleti eredmény, elsősorban krio-EM szerkezetek közötti eligazodásban. Ez szorosan összefügg azzal a törekvéssel is, ami a működése során térszerkezeti változáson áteső fehérjék állapotainak azonosítását tűzi ki célul. Vizsgálataik során bebizonyították, hogy a bevezetett térszerkezeti leíró mennyiségek, a konftorok, jól használhatók a transzporter fehérje állapotainak elkülönítése során. Mennyire általánosítható ez a megközelítés más transzporterekre, esetleg más fehérjékre? Automatizálható-e a konftorok kiválasztása egy adott fehérjére/fehérje családra?*

Kis túlzással kijelenthetjük, hogy vektorokat minden fehérje-szerkezettel foglalkozó kutató használ (pl. Gazgalis *et al.* 2022 IJMS, 3. ábra, D panel; <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/18/10820>), a szerkezeteket és a trajektóriák konformációit szögekkel és távolságokkal jellemzik. Azonban, ha pontos szeretnék lenni, akkor ezekből pont a konftor lényege hiányzik, a standardizálás. Az esetek nagy részében minden kutató más aminosavak közötti távolságot tart fontosnak és mér meg, ezért hiába futtatnak hasonló körülmények között szimulációkat ugyanazzal a fehérjével, a szimulációk összehasonlítása nehézkes. Ha nem ugyanazzal a fehérjével, hanem egy rokon fehérjével végeznek szimulációt szekvenciaillesztés vagy még inkább szerkezetillesztés segítségével a konftorokat, aminosavakat viszonylag könnyű automatikusan átvinni egyik fehérjéről a másikra. Azonban a Bíráló kérdésére nincs optimista válaszom, véleményem szerint nagyon nehezen automatizálható az egyes konformációkra

jellemző konftorok definiálása. Esetleg nagyobb számú konformer alapján lehetne automatikus módszerekkel (Bayes-statisztika, Markov modellek, vagy szimulációból származó nagyobb számú konformáció esetén mélytanulós módszerek) fontosabb távolság, szög, és kontaktus jellemzőket azonosítani, azonban a biológiai tudást ehhez jelen pillanatban elengedhetetlennek érzem.

10. Megmutatták, hogy az AlphaFold2 eljárás membránfehérjékre is hasonló minőségű szerkezeteket állít elő, mint a szolubilis fehérjék esetében, annak ellenére, hogy a betanítás során nem használtak ilyen fehérjéket. Mi lehet az oka ennek a számomra váratlan eredménynek?

Az AlphaFold2 membránfehérje jóslásokkal kapcsolatosan az a meglepő dolog, hogy a tanulóhalmazban a TM fehérjék aránya számottevően alacsonyabb volt a szolubilis fehérjékhez képest. Az RCSB adatbázisban jelenleg 201885 fehérje szerkezete található meg, míg transzmembrán fehérje szerkezetből csak 8475 (<5%). A jóslás minősége engem is meglepett, mert a membránfehérjék nemcsak kísérletes, hanem *in silico* módszereknek is ellenállnak. Egy fizikus barátommal, Csikor Ferencsel beszélgettem erről a napokban. A konklúziója az volt, hogy még a matematikusok sem értik teljesen, hogy a megszokott méretű adatainkhoz képest mi történik viszonylagosan kis tanulóhalmaz és a nagy paraméterhalmaz esetén, mi az az új jelenség, ami elkerüli a túlillesztést, és amit az átlagos számú lineáris egyenletekhez szokott gondolkodásmódunkkal nem tudunk megmagyarázni. Azaz a mesterséges intelligencia mindenhatóságával szemben felhozni azt az érvet, hogy „csak sok lineáris egyenlet”, nem teljesen állja meg a helyét. Az igazságot valószínűleg a kettő álláspont között kell keresnünk.

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

Budapest, 2023. május 9.


Hegedűs Tamás