



Bírálati vélemény

Gáspári Zoltán

„Fibrilláris és globuláris fehérjeszerkezeti elemek belső dinamikájának vizsgálata integrált szerkezeti bioinformatikai módszerekkel”
című MTA doktori értekezéséről

Gáspári Zoltán értekezése a jelölt közel 20 éves kutatómunkáját foglalja össze a fehérjeszerkezetek témakörére vonatkozóan. Azt, hogy mennyire időszerű és aktuális területről van szó, igen látványosan mutatja a 2024-es fizikai és kémiai Nobel-díj, hiszen mindkettő szorosan kapcsolódik a szerkezeti biológiai ismeretek robbanásszerű fejlődéséhez. Ezen a területen ért el kiemelkedő eredményt a jelölt, melyet a dolgozat alapjául szolgáló összesen 20 magaspresztízsű lapban megjelent közlemény, a témakörben született 5 PhD disszertáció továbbá számos TDK, Bsc és Msc dolgozat elkészülte is jelez. Mindezek figyelembevételével bátran kijelenthető, hogy egy már eddig is sikeres kutatói pálya és egy iskolateremtő munkásság eredményeit tekinti át a dolgozat.

A dolgozat alapján megfogalmazott tézisek 3 fő témakört ölelnek fel. Az első témakörben a jelölt magányos α -hélix motívumok (a továbbiakban az angol elnevezés alapján: SAH) szerkezeti sajátosságaira vonatkozó szimulációs vizsgálatok eredményit gyűjtötte egybe. A második témakör a jelölt, *de novo* típusú fehérjekomplettel kapcsolatos elméleti vizsgálatának eredményeit foglalja össze. Végül a harmadik témakör fókuszában a fehérjék dinamikai karakterével kapcsolatos módszerfejlesztés áll. Ennek során olyan számítógépes konformációs sokaságot sikerült előállítani kutatócsoportjával a jelöltnek, mely sokaság segítségével számolt értékek közelebb voltak a kísérletekből származó eredményekhez, mintha azokat pusztán egy konformáció alkalmazásával határozta volna meg.

Fontosnak gondolom megjegyezni, hogy az említett 20 publikáció esetében a jelölt 18 esetben meghatározó szerző, így nem lehet kétséges, hogy ezen eredmények megszületéséhez alapvető mértékben járult hozzá Gáspári Zoltán.

Az értekezés új tudományos eredményeit az alábbiakban foglalom össze.

1. A jelölt kidolgozta a fehérjék SAH szakaszainak detektálására alkalmas FT_Charge eljárást, mely az általa definiált töltéskorrelációs függvény Fourier transzformációjának főkomponens analízisének alapul. A hamisan pozitív SAH régióknak talált szakaszok kiszűrésére sikeresen kombinálta saját módszerét a SCAN4CSAH módszerrel, és alakított ki végül egy konszenzusos modellt.
2. Az előző pontban kifejlesztett módszer segítségével megmutatta, hogy az emberi proteomban a SAH régiók különösen gyakran fordulnak elő RNS kötő funkcióval bíró fehérjékben. Ezen elméleti eredményből kiindulva megépítette a PSPC1/NONO fehérje komplex modelljét és vizsgálta szerkezeti tulajdonságait a modell alapján.
3. Megmutatta, hogy a fehérje-fázisszeparáció esetén, az utóbbi időben kimutatott gyakori fehérje:RNS komplexben a SAH régiókra is jellemző nagy töltéssűrűségű szakaszok és a fázisszeparáció kapcsolata leginkább úgy jellemezhető, hogy nagy töltéssűrűségű szakaszok hiányában ritkábban mutatható ki fehérje-fázisszeparáció.
4. Kimutatta a saját eljárás alapján SAH régióknak jelzett szakaszok, illetve más programok által coiled-coil vagy funkcionálisan rendezetlen szerkezetűnek prediktált szakaszok gyakori átfedését. Megmutatta, hogy az egyaránt coiled-coil szerkezetűnek és funkcionálisan rendezetlen szakasznak felismert régiók nem alkalmasak SAH régió előrejelzésére, ahhoz mindenképp szükség van valamilyen speciális, például a jelölt által kidolgozott eljárásra. További kereszt-specifikációs vizsgálatok során azt találta, hogy a szerkezeti kereszt-specifikáció nagyban függött a vizsgált proteomtól.



5. *De novo* fehérjekomplexek képzésén megállapította, hogy az új fehérje aggregációs hajlama erősen függ az őt kódoló DNS-szakasz GC tartalmától. Kimutatta, hogy a szokásos GC tartalom mellett (40%-60%) a rendezetlenség a domináns karakter. Evolúciós szemszögből vizsgálva azt találta, hogy a korai kódok egyike sem képes a mai 20 aminosavas rendszer által szolgáltatott szerkezeti változatosságra.
6. Eljárást dolgozott ki funkcionálisan rendezetlen fehérjék és szakaszok esetében a kísérleti eredményeknek minél jobban megfelelő konformációs sokaság generálására. Ehhez a legvalószínűbb gerinckonformációkat mintavételezte a szomszédságfüggő Ramachandran-eloszlások felhasználásával, illetve a felhasználó által megadott kényszerek figyelembevételével.
7. Sikeresen alkalmazta az előzőekben említett sokaság generáló eljárást több fehérje esetében, Ennek keretében:
 - megmutatta, hogy a klasszikus kulcs-zár működés ellenére a szerinproteáz inhibitorok egyáltalán nem merev ligandumok, azonban az oldatban bejárt konformációs térben megtalálható a komplexben felvett geometria. Mivel az inhibitor belső mozgása gyorsabb időskálájú, mint az asszociációs folyamat, ezáltal a ligandum konformációs átmenete nem lehet a sebességmeghatározó lépés.
 - parvulin típusú peptidil-prolil izomeráz enzimek esetében a nyitott/zárt átmenetre vonatkozóan javasolt egy általános mechanizmust, amit két faktor befolyásolhat: bizonyos WW domén megléte/nem-léte és/vagy két konzervált hisztidin protonáltsága.
 - az emberi epesavkötő fehérje apo és holo formája közti átmenetet vizsgálta, és rámutatott az epesav bekötődése szempontjából alapvető fontosságú két fehérje-target mozgásformára.
 - a PSD-95 fehérje PDZ doménjeinek sokasági dinamikai vizsgálatával megmutatta, miként változnak a felszíni loop-régiók a ligandum kötődésének hatására, ami végül a domének közötti mozgások és kapcsolatok értelmezése szempontjából fontos információ.
 - a miozin VI SAH régiójára a kémiai eltolódás, skaláris- és maradvány dipóláris csatolási kísérleti adatok felhasználásával generált konformációs sokaságot. Megmutatta, hogy a teljes régió helicitása nem teljesen egyenletes, számos megtörés található benne. A fel nem használt kísérleti S^2 értékeket visszaszámolta a sokasági modellből, és jó korrelációt kapott a számolt és mért értékek között, illetve magyarázatot adott a számolt S^2 paraméterek szisztematikus alul becslésére.

Külön fontosnak tartom megjegyezni, hogy a tézispontoknak az eljárások implementációjára vonatkozó állításait is elfogadom új eredménynek, hiszen aki foglalkozott ilyen jellegű fejlesztéssel, az pontosan tudja a súlyát annak, hogy milyen teljesítmény van egy működő implementáció elkészítésében vagy egy széles körben elérhető webservert elindításában. Különösen igaz ez, amikor egy már létező nagyobb programcsomag részeként teszi ezt meg valaki, ahol nem elég pusztán a tudományos problémát átlátni, hanem el kell mélyedni az adott programcsomag sokszor több évtizedes fejlesztése mögött álló filozófiában is. A jelölt dolgozatából pontosan kitűnik, hogy munkássága ebből a szempontból is figyelemre méltó.

Mindezen tények mellett a disszertáció olvasása során több kérdés és megjegyzés is felmerült a bírálóban, amit a következő pontokban foglalnék össze:

1. Az irodalmi áttekintés részben megemlíti, hogy a PDB adatbázisban csak néhány atomi szintű SAH szerkezet érhető el. A krio technika megjelenése segíthet-e a kísérleti kimutatásban? Várható-e nagyobb mennyiségű kísérleti adat megjelenése ennek az új technikának köszönhetően?



2. A SAH szerkezet vizsgálatára vonatkozó eredmények között említi, hogy az Asp és Glu aminosavak esetén (tehát a negatív töltésű esetekben) ismert egyfajta preferencia a Glu javára. A pozitív töltésű aminosavak esetében (Arg, Lys) ismer-e ehhez hasonló preferenciát? Ezt azért is kérdezem, mert mintha a 4.1-es ábra és 4.2-es táblázat alapján az Arg gyakrabban fordulna elő a SAH régiókban.
3. A PSPC1/NONO komplex vizsgálata során biztosan, de igazából azt megelőzően is említette a SAH szakaszok kötegeképződési tulajdonságát. Ezt fel lehet fogni egy távolság tartó, pozicionáló szerepkörnek, de akár szerkezetmervítési feladatnak is. Az előbbi feladatot tekintve, lehet-e a + és – töltésű szakaszokra úgy tekinteni, hogy az egymás melletti kötegekben, mint valamiféle egymással komplementerben álló „fogasléc” fogai funkcionálnak ezek a töltött szakaszok? A második szerepkör kapcsán pedig az lenne a kérdésem, hogy egy SAH régió önmagában mennyire merev szerkezet? Vagy a 4.2-es ábra alapján inkább a kötegeképződés segíti az ábrán látható nyújtott konformáció stabilitásának fenntartását?
4. A dolgozat végén, a diszkusziónál elemzi a SAH szerkezet rugalmas/merev voltát, ott is említi egy erőkar jellegű szerepet vele kapcsolatban. Többek között ezt a szerepet is befolyásolja a SAH hélix mérete, aminek nyilván van egy optimális hossza. Milyen elméleti megfontolásokat ismer a hélix szerkezet optimális hosszára vonatkozóan?
5. A *de novo* vizsgálatokra vonatkozó eredmények egy részét a 4.6-os ábra foglalja össze. A bal oldali oszlopot tekintve, logikusnak tűnik a legfelső ábrán látható sorrend ($Z < K < L$) megfordulása az alsó két ábrán, hiszen minél nagyobb a rendezetlen aminosav aránya egy szakaszon, annál kisebb lehet azon a szakaszon egy rendezettebb transzmembrán vagy aggregálódó aminosav aránya. A kérdés itt a humán proteom fehérjéire vonatkozó görbe értelmezése: Miként lehet, hogy noha a felső ábrán az ismert 40%-60%-os GC aránynak megfelelő humán görbe a lila és zöld görbe között helyezkedik el, addig a középső grafikonon az elején messze felette van a többi görbének? Azaz ott nem a 40%-60%-os esetnek felel meg a viselkedése. Lehet-e ez pusztán az alkalmazott normálás következménye?
6. A sokasági szerkezetet előállító részre vonatkozóan, amikor módosítják a sokaságot alkotó egyes konformerek súlyfaktorát pl. a BME eljárással, vizsgálták-e, hogy az miként befolyásolta az energetikai viszonyokat? Azaz, mennyire szőtt bele például a Boltzmann eloszlásba? Ezt azért is gondolom fontos kérdésnek, mert a kísérleti paramétereknek való jobb megfelelés kényszere azt feltételezné, hogy az energetikai viszonyoknak nem volna szabad romlaniuk, azaz a mélyebb energiás konformerek súlya a Boltzmann eloszlásnak megfelelően kellene, hogy alakuljon a sokaságban.
7. A szerinproteáz-inhibitorok vizsgálata igen érdekes kérdést vet fel az olvasóban. A 4.10-es ábra mintha azt sugallaná, hogy a ligandum kötődése nem egy dinamikus folyamat, melyben a target és az inhibitor fokozatosan, egymást módosítva hozzák létre a kötési geometriát, hanem az oldatban szabadon mozgó ligandum önmaga felveszi időnként a kötési geometriát, és ezt mintegy „kiválasztja” a target fehérje. Értelmezhető-e így a kötési folyamat az eredmények alapján?
8. A 4.12-es ábra felső sorában szereplő ábrán a 2MM3 kóddal azonosított pontok erősen elkülönülnek a többi szerkezettől. Van-e valami magyarázata ennek a speciális elhelyezkedésnek. Lehetséges-e, hogy ez pont egy példa arra, hogy bizonyos kísérleti értékek olyan esetekhez tartoznak, ami a valóságban nem nagyon fordul elő, inkább valamiféle átlagszerkezettel lehet azonosítani?
9. Az epesav kötése kapcsán megjegyzi, hogy a kétféle epesav a számítások szerint elég egyértelmű sorrendben kötődhet a fehérjébe. Történtek-e kísérleti igazolások ennek ellenőrzésére?



Figyelembe véve mindazon eredményeket, amit a jelölt a PhD fokozat megszerzése óta elért és az értekezés alapjául szolgáló cikkekben közölt, elmondható, hogy a dolgozat egy tudományosan több szempontból is gazdag, folyamatos, kitartó kutatómunka eredményeit foglalja össze.

Pécs, 2025-01-11

.....
Dr. Paragi Gábor
..... egyetemi docens