

Bokor Mónika Zsuzsanna

**„Széles jelű NMR-spektroszkópia alkalmazása
egyres rendezetlen fehérjék hidratációjának vizsgálatára”**

című MTA doktori értekezésének bírálata

Bokor Mónika Zsuzsanna MTA doktori értekezése kutatói munkásságának 2010-2024 között született eredményeire összpontosít. Érdeklődésének középpontjában rendezetlen fehérjék széles jelű NMR spektroszkópiai módszerekkel történő vizsgálata áll. A rendezetlen fehérjék – a globuláris fehérjéktől eltérően – nem rendelkeznek másodlagos, harmadlagos szerkezettel, hanem konformációs sokaságként írhatók le. Kutatások igazolták, hogy számos biológiai folyamat kulcsszereplői; hibás feltekeredésük és aggregációjuk pedig neurodegeneratív kórképekkel, rákos megbetegedésekkel hozható kapcsolatba. Ezen biomolekulák jellemzése, önmagukban és partner fehérjékkel való kölcsönhatásban fontos kutatási terület, hiszen az elért eredmények közelebb visznek a biológiai működésük megismeréséhez. Jelölt kutatásaiban a rendezetlen fehérjék hidratációjának vizsgálatára fókuszál, és kérdéseinek megválaszolására korábban kidolgozott széles jelű NMR spektroszkópiai módszereket alkalmaz. Az α -szinuklein és Parkinson kórban előforduló mutánsainak monomer, oligomer és amiloid formáit; továbbá a β_4 -timozin és stabilin-2 citoplazmadomén fehérjét, illetve a kölcsönhatásuk során képződött komplexet vizsgálja. Mindezek tükrében a Jelölt kutatásaiban fontos és aktuális kérdésekre keres válaszokat.

A dolgozat 10 közleményen alapul, ezek közül kettő könyvfejezet, és 5 esetben a Jelölt első/levelező szerző.

A mű szerkezete. A 123 oldal terjedelmű értekezés felépítése többnyire logikus és több, mint 300 hivatkozást tartalmaz. Sajnos számos elírás, elnagyolt megfogalmazás fordul elő, túlzott általánosításokkal találkozunk és gyakoriak a zavaró ismétlések, a stílus nem gördülékeny. Az ábrák jó része rossz felbontású, szerencsés lett volna a fekete-fehér ábrázolás helyett színek alkalmazni, átláthatóbb volna és nagymértékben könnyítené a megértést. Próbára teszi az Olvasót azzal is, hogy egy hivatkozott ábra vagy táblázat több oldallal később/korábban található. A nyomtatott példányban a lényeges adatokat tartalmazó 1. táblázat középső oszlopai alig olvashatóak. A fontos egyenletek egy része a szöveggel egy sorban található, ezeket érdemes lett volna kiemelni és számozni, így visszahivatkozni rájuk.

A megfogalmazásokkal kapcsolatos néhány észrevétel/javaslat:

- folyékony – folyadék, vagy oldatfázisú NMR.
- „lett követve”, „lett számolva”, „lett mérve”, stb. helyett szerencsésebb a követtük, számoltuk, mértük.

- „pelletet csináltak”; „A vízmolekulák viselkedése felől nézve”; „A leginkább hidrofób részek mind a három tanulmányozott fehérjében olyan kölcsönhatási energiával vannak hidratálva” zavaró megfogalmazások.
- a hőmérsékletet emelve – a hőmérséklet növelésével.
- szabad precessziós jel (fid) – szabad indukciós lecsengés, FID.
- 25. ábra naa – hibás lehet, hiszen az egy pozitív szám.

Elég általánosított és pontatlan megfogalmazások olvashatóak például a 21. és a 47. oldalon: „az NMR spektroszkópia, mely hatékony módszer a fehérjedinamika – és flexibilitás tanulmányozására (HQSC, relaxációs, valamint széles jelű mérések;...”; „Bár a fehérjekutatásban széleskörűen és sikeresen alkalmaznak nagy felbontású NMR technikákat (például homo- és heteronukleáris Overhauser módszerek), azonban a hagyományosabb széles jelű NMR spektrummérések nagyon hasznosnak bizonyulnak a globuláris és az IDP-kutatásának alapkérdéseit illetően.”

Helyesen a 2D korrelációs mérés HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation). Rapszodikus a nagyterű NMR technikák ilyenszerű ismertetése.

Megjegyzendő, hogy a nagyfelbontású NMR technikák sorában a relaxációs mérések értékelésénél, a gerincdinamika leírásánál széleskörben alkalmaznak egy rendparamétert (S^2). Értelemszerűen a jelen dolgozatban a rendparaméter (HeR) másra vonatkozik – ugyan mindkét esetben a rendezetlenségre/mozgékonyyságra tud rávilágítani, más-más szempontból.

Önmagában az, hogy egy biomolekula globuláris, vagy rendezetlen, már egy 1D ^1H spektrum jeldisziperziójából kiderül. Árulkodó egy könnyen meghatározható transzlációs diffúziós együttható értéke, vagy, ^{15}N jelölt fehérjéknél a HSQC spektrum. Azt érdemes hangsúlyozni, hogy a széles jelű NMR mérések a hidratációs tulajdonságokra világítanak rá.

Új eredmények. Új eredménynek ismerem el az alábbiakat:

Fagyott fehérjeoldatok széles jelű ^1H NMR spektroszkópiái jellemzésére új megoldásokat vezetett be, melyeket sikerrel alkalmazott rendezetlen fehérjéken.

Így olvadási diagramok részletes és sokrétű értelmezésével jellemezte a vad típusú α -szinuklein, és az A30P, E46K, A53T mutánsainak hidratációját monomer, oligomer és amiloid rendszereken; továbbá a β_4 -timozin és stabilin-2 citoplazmadomén fehérjéket, és ezek 1:1 arányú komplexét.

Megállapította, hogy az oligomerek, amiloidok és az 1:1 komplex olvadási görbéi nem egyenlők az alkotó fehérjék egyedi olvadási diagramjainak összegével.

Azonosította a másodlagos kötéstípusokat, megállapította, hogy az α -szinuklein oligomer jelenétéhez köthető a homogén energiaeioszlású fehérje-víz kötésekkel jellemzett potenciálgát-tartomány, az oligomerek felszíne általában méretüktől függetlenül alapvetően egységes, és az amiloidok jelentős része rendezetlen.

Kiszámította, hogy a β_4 -timozin és stabilin-2 citoplazmadomén fehérje komplexet alkotó fehérjék szabad állapotukban több mozgékony hidratációs vizet kötnek, mint a komplex.

Kérdések. A dolgozat olvasása során felmerült kérdéseim/megjegyzéseim:

1. Az elvégzett NMR mérések paraméterei kapcsán igen rövid az ismertetés. Milyen impulzusszekvenciát használt, milyen paraméterezéssel, a hőmérséklet függvényében milyen paramétereket változtatott, hogy vette figyelembe a relaxációs idő értékek változását? Ugyan a dolgozatban erre nem fókuszál, de hogy változnak a relaxációs idők értékei a tanulmányozott hőmérséklettartományban? A kiértékelés során az extrapoláció miért Gauss függvények összegével történik, és hogyan?
2. A dolgozatban nem részletezi, de a méréseket egy alkalommal végezte el? A reprodukálhatóság tekintetében, a mérések ismétlésekor minden lehűtés során ugyanazok lesznek fagyott mintában a konformer állapotok? Mekkora lehet az így meghatározott *naa* értékek szórása?
3. A liofilizált fehérje is tartalmaz vizet, változó mennyiségben. Hogyan vette ezt figyelembe, történt-e más módszerrel koncentráció meghatározás, esetleg több, különböző expresszió során készült minta mérésével is ellenőrizte ezt? Az α -szinuklein monomer minták készítésekor azt írja, hogy „a folyamat során képződött oligomerek(et) eltávolították.” Ilyen koncentráció viszonyok mellett nem lehetséges egy időben kialakuló monomer – oligomer egyensúly, ami az oligomerek újraképződését teszi lehetővé? Hogyan lehetne erről megbizonyosodni?
4. Az α -szinuklein szerkezeti hajlamait számos technikával vizsgálták. Natív, monomer állapotban ez egy rendezetlen fehérje – szerencsésebb lett volna egy irodalomból elérhető ilyen szerkezeti sokaságot bemutatni a 9. ábrán. Micella jelenlétében beszélhetünk hélix kialakulásról, ugyan bizonyos kutatások ezt vitatják. A vizsgált mutációk tekintetében az A30P csere során, a prolin *cisz-transz* izomer formáinak lehetséges kialakulása miatt egy nagyobb szerkezeti sokasággal lehet számolni; az E46K glutaminsav-lizin csere pedig már lokálisan is megzavarja/hatja az elektrosztatikus kölcsönhatásokat, amennyiben a szomszédos aminosavakat is figyelembe vesszük ez KEG helyett KKG lesz; ugyanígy az A53T esetében az alanin-treonin csere a hidroxil csoportok növekedésével újabb H-híd kölcsönhatások kialakítását okozhatja, és a környezet is VAT helyett VTT-re alakul. Ezek tükrében hogyan magyarázhatók a monomer formákra kapott eredmények? Ilyen, vagy hasonló érvelés mennyire állja meg a helyét?
5. Az oligomerek és amiloidok belsejében levő víz jellemzése milyen módszerrel lehetséges? Jelen eredményeiből hogyan következik a megállapítás, mi szerint: „oligomerek és amiloidok képződésekor a hidrofil aminosavak jelentős része β -redőket alkot”?

6. Az α -szinuklein témakörben a szerkezeti sokaságokat jellemző eredményei hogyan egészítik ki az NMR, CD, SAXS, stb módszerek által nyújtott ismereteinket?
7. Milyen előzetes ismeretek vannak az 1:1 β_4 -timozin és stabilin-2 citoplazmadomén komplex kialakulásáról? Mekkora a K_d értéke? Az olvadási diagramok (26. ábra) nem különböznek jelentősen. Mennyire „zavarja” egyik fehérje jelenléte a másikat? Egy koncentráció függés, különböző 1:1 közeli arányoknál segítene az eredmények alátámasztásában?
8. A kidolgozott technika segítségével számolható a vízmolekulák aminosavankénti száma (naa) és a hidratáció (h). Hogy korrelál, vagy korreláltatható-e a kapott érték a fehérjéknél bevált, aminosav szekvencia alapján számított SASA (Solvent Accessible Surface Area) értékkel, ami az oldószernek kitett felületet jellemzi.
9. Eredményei és tapasztalata alapján egy adott fehérje (globuláris, vagy IDP; monomer, vagy oligomer) aminosavszekvenciájának ismeretében jósolható-e, hogy a mozgékony víz aránya a fundamentális hőmérséklet függvényében fog-e lineáris, négyzetes, vagy köbös változást mutatni?

Összefoglalva elmondható, hogy a számos felmerült kérdéssel, megjegyzéssel együtt a felsorolt tézispontokat új tudományos eredményeknek fogadom el, és a doktori művet nyilvános vitára alkalmasnak tartom. Sikeres védés esetén javaslom az „MTA doktora” cím odaítélését a Jelöltnek.



Budapest, 2026.02.11.

Bodor Andrea, DSc.
egyetemi tanár