

Válasz Dr. Batta Gyulának

Tisztelt Dr. Batta Gyula!

Köszönöm gondosan elkészített bírálatát. A bírálat részletes figyelmet szentel az alkalmazott NMR-módszertani kérdéseknek, a spektroszkópiai alapelveknek, valamint az értekezés szerkezeti és helyesírási következetességének.

Az alábbiakban az egyes felvetésekre a dolgozat felépítését követő sorrendben kívánok válaszolni. Ahol a bíráló által jelzett hiányosság vagy pontatlanság fennáll, azt elismerem, és ahol szükséges, részletesebb magyarázattal egészítem ki az értekezésben foglaltakat. Bízom abban, hogy válaszaim megnyugtatóan tisztázzák a felmerült kérdéseket.

C. Széles jelű ^1H -NMR mérés és értelmezése

III. Célkitűzések

... az egybeírás-különírás kérdése sok helyen felmerülhet.

Az egybeírás-különírás tekintetében a helyesírás.mta.hu Helyesírási portált használtam. Tehát az MTA ajánlásait követtem.

A többi felvetéssel a redundanciáról és megfogalmazásokról egyetérték.

IV. Anyagok és módszerek

B. Széles jelű ^1H NMR mérések fagyott fehérjeoldatokon (41-43. oldal)

a 42. oldalon nincs olvadási diagram, pedig többször is van rá hivatkozás

A 42. oldalon az olvadási diagram meghatározása szerepel, konkrét példát vagy sematikus ábrát valóban nem tartalmaz; ennek beillesztése indokolt lehetett volna.

III. Mérési eredmények és értelmezésük

A. A fagyott fehérjeoldatok általános tulajdonságai (45-46. oldal)

A potenciálgát fogalmára hivatkozik, bár nem volt előzetesen bevezetve.

A potenciálgát fogalmát közismertnek tekintettem, ugyanakkor a bíráló észrevétele alapján indokolt lett volna annak rövid bevezetése.

I. Széles jelű NMR-spektroszkópia elve és részletei (47-49. oldal)

„echósorozat” egybeírás-különírás

A helyesírás.mta.hu Helyesírási tanácsadó portál Külön vagy egybe? lapja szerint az echósorozat kifejezés egybeírandó.

II. ^1H NMR fid-jel és spektrum (50-51. oldal)

A megadott fehérje koncentrációkból nyilvánvaló, hogy a víz proton koncentrációja akár 4-5 nagyságrenddel meghaladhatja az oldott anyagokét, amelyek így nem detektálhatók. Vajon a fehérjék belsejébe kerülő „szerkezeti víz” észlelhető?

A sztenderd viszonyítási koncentrációként használt 50 mg fehérje/1 ml víznél az oldószer víz protonjainak száma kb. 35-szöröse a fehérje protonjainak számának. A számarányok alapján

nem várható el a „szerkezeti víz” észlelése. A „szerkezeti víz” protonjainak FID-je a jégéhez hasonló, vagyis gyorsan lecseng és mint ilyet nem detektáljuk külön, illetve az kvázi merev protonok jelét nem vesszük figyelembe. Ezek a „szerkezeti” vízmolekulák merevnek tekinthetők, miniket viszont csak a mozgékony hidratációs víz érdekel.

A Fourier elméletből ismert, hogy a FID első pontja meghatározza a spektrum teljes integrálját. Igazolható volt e ez a kísérleteik során?

A mérési elv ezen az összefüggésen alapul, amelyet korábbi kísérleteinkkel is ellenőriztünk, és megfelelő pontosságúnak találtunk.

A spektrométer technikai holtideje mennyi volt (10 μ s)? Hogyan viszonyul ez a jég T_2 relaxációs idejéhez?

A technikai holtidő 10 μ s volt. A jég T_2 relaxációs ideje:

Hőmérséklet	T_2 (közelítő érték)
0 °C (olvadáspont közelében)	~1–10 ms
-10 °C	~100–300 μ s
-20 °C	~30–100 μ s
-40 °C	~10–30 μ s
-70 °C	~5–15 μ s

Ahogy hűl a jég, a mozgás (alagutazás, kvázi-folyékony réteg, hibák a rácsban) befagy, ezért T_2 eléri a merev rács határát (~-40 °C alatt már alig változik tovább).

I. α -szinuklein monomerek 61-69. oldal

1. táblázat, aláírásban (67. oldal) „n(i) értékek” nincsenek a táblázatban, „potenciálgátrés” külön írandó

A táblázat aláírásában az $n(i)$ megjelölésben az „i” változót jelent. Ez a változó adott esetben a hőmérséklet, így T_{fn2} -vel, T_{fn3} -mal, és $T_{fn} = 1$ -gyel helyettesítendő.

A helyesírás.mta.hu (Helyesírási tanácsadó portál) – Nyelvtudományi Kutatóközpont ajánlása szerint:

A „potenciálgát” főnevet és a „rés” főnevet egybeírjuk az alábbi szabály alapján:

A két főnévből álló – jelöletlen birtokos jelzői vagy jelentéssűrítő – alárendelő összetételeket egybeírjuk.

IV. Eltérő polimerizációfokból következő különbségek (76-80. oldal)

talán helyesen polimerizációs fok?

A polimerizációs fok lett volna a helyes kifejezés.

V. Irodalomjegyzék (111-123. oldal)
(Mintegy 160-180 hivatkozást tartalmazhat.)

185 hivatkozást tartalmaz.

¹H Széles jelű NMR mérés

*„széles jelű NMR-spektroszkópia a kémiai és biokémiai analízis fontos módszere”
nem elterjedt terminológia „spin-rács és spin-spin relaxációs ráta” helyett sebesség jobb lenne*

A sebesség szó használata helyesebb lett volna, a ráta helytelen anglicizmus.

*a 36. oldalon zárul a bevezetés, utána jönnek a célkitűzések
„pulzus spektrométer” helyesebben impulzus Fourier spektrométeren
pulzus helyett impulzust kellene írni, mivel a pulzus fogalmát az orvosok már definiálták*

A szakirodalomban mind a „pulzus”, mind az „impulzus” kifejezés használatos az angol *pulse* megfelelőjeként.

Az NMR-ben ez egy rövid, nagyintenzitású rádiófrekvenciás gerjesztési jelet jelent, amelynek időtartama tipikusan μ s-os nagyságrendű.

- „pulzus” – a hétköznapi és laboratóriumi szóhasználatban elterjedtebb, közvetlen átvétel az angolból
 - „Impulzus” – inkább a fizikai/elméleti irodalomban jelenik meg, magyarosabb hangzású
- Mindkét alak helyes és elfogadott, a magyar NMR-szakirodalomban felváltva szerepelnek.

a FID fogalma nincs definiálva a rövidítéseknél (nagybetűkkel írandó!)

A 42. oldalon „mért szabad precessziós jelek (free induction decay, fid)” meghatározás szerepel. Igen, helyesebb lett volna nagybetűket használni.

az ábrákra, táblázatokra való hivatkozás a szövegben gyakran hiányzik vagy távoli oldalakon található a hivatkozott információk, ábrák

Az ábrák és táblázatok elhelyezése a tartalmi hangsúlyok szerint történt; ugyanakkor a bíráló észrevétele alapján egyes hivatkozások közelebb is elhelyezhetők lettek volna.

További kérdések és megjegyzések:

1. *Hogyan viszonyulnak egymáshoz a szélessávú és a nagyfelbontású NMR által szolgáltatott IDP szerkezetek illetve segíthetik-e ezt az AlphaFold (AI) in-silico számítások? A fehérjék kémiai eltolódás értékeiből számítható aminosavanként az „ASA”, az asszociált felület, ami az oldószerrel érintkezik (Wishart, J Biomol NMR (2015) 62:387–401.). Mivel ezek az adatok ismertek lehetnek*

a vizsgált fehérjékre, talán korrelálhatók lehetnének a hidratációs víz mennyiségével, legalábbis 0 °C feletti hőmérsékleteken?

A szélessávú és nagyfelbontású NMR egymást kiegészíti – az egyik a szerkezetet, illetve a sokaságot, a másik a dinamikát adja. Az AlphaFold IDP-knél korlátozott, de hasznos előszűrő és molekula dinamikai kiindulópont. Az AlphaFold leginkább a szerkezet hiányára ad indikációt, bár történetek próbálkozások a szerkezeti sokaságok kiszámolására (predikciójára) is, de ezek jobbra értelmezhetetlenek. Az AlphaFold viszont nem ad információt a dinamikára. Az ASA–hidratáció korreláció elvileg megalapozott és kísérletileg tesztelhető, különösen 0 °C közelében, ahol a víz dinamikája lelassul és a korreláció várhatóan erősebb.

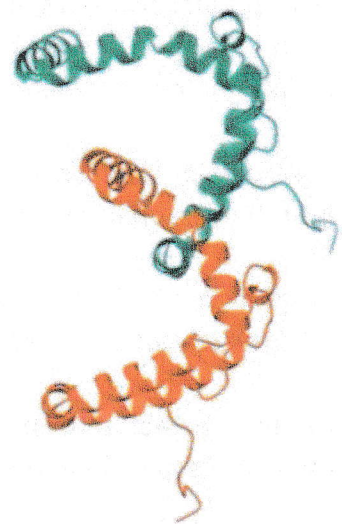
2. Mit jelent a szakirodalomban nem igazán használt „meanderkonformáció”?

Az 5. oldalon, a „Jelölések, rövidítések és idegen kifejezések jegyzéke” c. fejezetben megadtam a meanderkonformáció definícióját mint hurkokkal összekötött β -redők mintázatát. Az „A. Fehérjék – általános leírás, kémiai kötések és kölcsönhatások, típusok” c. fejezetben, a 13-14. oldalon ennek bővebb tárgyalása is megtalálható.

3. 28. old. „az α -szinuklein helikális oligomer(ek) egyensúlyi keverékeként léteznek” Lehetne ezt igazolni nagyfelbontású vagy szilárd fázisú NMR-el?

A helikális oligomer jelenléte oldatban NMR-rel nem cáfolt, de nem is közvetlen bizonyított – a meglévő NMR adatok (Fauvet et al. 2012) a sokaságátlagot tükrözik, és a kis populációjú, dinamikus oligomer kimutatásához speciális kísérletekre (relaxáció-diszperzió, CPMG, $T_{1\rho}$, esetleg szilárd fázisú NMR) lenne szükség. A jelenlegi ismereteim szerint mindaddig korlátozott számú (konkrétan egy darab) olyan vizsgálat áll rendelkezésre, melyben oldat NMR-rel és kémiai keresztkötésű tömegspektrometriával az oligomer α -szinuklein membránhoz kötött nagy felbontású szerkezeti modelljét adták meg. →

T. Schwarz, A. Beier, K. Ledolter, T. Gossenreiter, T. Höfurtherner, M. Hartl, T. Baker, R. Taylor, R. Konrat. High-resolution structural information of membrane-bound α -synuclein provides insight into the MoA of the anti-Parkinson drug UCB0599, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **120**, e2201910120, DOI: 10.1073/pnas.2201910120 (2023).



Sajnálatos módon nem minden irodalmi hivatkozás érhető el a bírálónak (szemlencséről, Tompa K. et al. 2010, a vagy b variáns?).

Tompa K. et al. 2010 hivatkozásként a és b bejegyzés is van a dolgozatban: Tompa K, Bánki P, Bokor M, Kamasa P, Rácz P, Tompa P. (2010a). Hydration water/interfacial water in crystalline lens. *Exp. Eye Res.*, **91**, 76-84. DOI: 10.106/j.exer.2010.04.005

Tompa K, Bokor M, Tompa P. (2010b). Chapter 12. Hydration of intrinsically disordered proteins from wide-line NMR. Könyvben: Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins: Assessing Structure and Conformation. Wiley Series in Protein and Peptide Science (Szerk.: Uversky VN, Longhi S.) John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 345-368. oldal. DOI: 10.1002/9780470602614.ch12

41. old. *A mérések feltehetően nem „AVANCE III NMR-pulzus spektrométeren”, hanem BRUKER SXP 4-100 spektrométeren történtek az irodalmi hivatkozás alapján (Ez a tézisekben is fel lehetett cserélve? tézis 3. oldal). A készülék mágneses terének inhomogenitása 2 ppm-nek volt megadva, ami durván 200 Hz vonalszélesedést okozhat. Figyelembe vették-e ezt?*

A mérések során ugyanazt a rendszert használtuk, a mágnes és a stabilizátor mindvégig ugyanaz maradt, egy idő után a BRUKER SXP 4-100as spektrométert lecseréltük az AVANCE III-készülékre, de a készülék mágneses terének inhomogenitása és a tér stabilitása nem változott. A mérések-nél a 2 ppm-es inhomogenitás nem volt számottevő. mert a mért vonalak ennél lényegesen szélesebbek voltak.

47. old. *„mozgékonyságának különbözőségén alapul. A mozgás itt translációs diffúziót vagy rotációt jelent.” A relaxáció (a FID lebomlása) forrása a rotációs diffúzió. A translációs diffúzió ehhez nem járul hozzá. Ez utóbbi a különböző fázisok keveredését okozza.*

A translációs diffúzió önmagában nem okoz relaxációt homogén mágneses térben. Azonban ha a tér inhomogén (ami a valóságban mindig fennáll valamilyen mértékben), akkor a diffundáló spinek különböző térerősségű helyekre kerülnek, és ezáltal különböző Larmor-frekvenciákon precesszálnak. Ez fázisdekoherenciát okoz, ami felgyorsítja a FID lecsengését.

53. old. *Hogyan definiálja a FID félértékszélességét?*

A FID félértékszélességéhez a $t = 0$ időpontra extrapolált FID-amplitúdót használtam, és az ennek felét elérő amplitúdóérték $t = 0$ -tól vett távolságát vettem félértékszélességnek.

Hibák vannak megadva a paramétereknél, de a hibaszámítás részletei nem ismertek. Néha ezreléknyi hibák szerepelnek, pl. 88. old. potenciálgát energia: 5,031(2) kJ mol⁻¹.

Ezt az értéket az olvadási diagram illesztéséből kaptam. A paraméterhibák az illesztésből adódtak.

A tiszta vízben és a fiziológiás oldatban mért eredmények voltak-e összehasonlítva?

A következő cikkeinken voltak ilyen összehasonlítások:

- Tompa K. et al. 2009 (DSC és NMR mérések; oldószer: H₂O, Tris-puffer)

- Kamasa et al. 2007 (DSC és NMR mérések; oldószer: H₂O, NaCl-oldat, Tris-puffer)
- Tompa P. et al. 2006 (DSC és NMR mérések; oldószer: H₂O, NaCl-oldat, Tris-puffer)

70. old. „vad változat körül lényegesen több mozgékony hidratációs vizet mérünk” számszerűen 0.35 > 0.31: ez tényleg nagy különbség?

A megadott hibahatárok figyelembevételével a különbség statisztikailag is értelmezhetőnek tekinthető. $h(E_{a,0})^{\text{vad}} = 0,35(1)$, $h(E_{a,0})^{\text{A53T}} = 0,306(8)$

4. tézis pont: „hidratációs víz” külön írandó

Igen, külön kellett volna írni.

A Jelölt eredményei mennyire korrelálnak az irodalomban található nagyfelbontású NMR mérésekből származó szerkezeti megállapításokkal -rendezett/rendezetlen- struktúrák?

A létező irodalmi nagyfelbontású NMR-es eredmények összhangban vannak a saját eredményekkel.

NMR-es irodalom, mely szerint az α -szinuklein oldatban rendezetlen:

1. Kim DH et al. (2020) Salient features of monomeric alpha-synuclein revealed by NMR spectroscopy. *Biomolecules*, **10**, 428.
2. Schwalbe, M. et al. (2014). Predictive atomic resolution descriptions of intrinsically disordered hTau40 and α -synuclein in solution from NMR and small angle scattering. *Structure*, **22**, 238-249.
3. Waudby CA et al. (2013) In-cell NMR characterization of the secondary structure populations of a disordered conformation of α -synuclein within *E. coli* cells. *PLoS ONE*, **8**, e72286.
4. Bertocini CW et al. (2005) Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured α -synuclein. *P Natl Acad Sci-Biol*, **102**, 1420-1435.
5. Chandra S et al. (2003) A broken α -helix in folded α -synuclein. *J Biol Chem*, **278**, 15313-15318.

β_4 -timozin rendezetlenségéről nagyfelbontású NMR:

1. Lachowicz, J. I. et al. (2026). Zinc coordination by thymosin β_4 : Structural determinants and functional implications. *Int J Mol Scie*, **27**, 1740.
2. Xue, B., & Robinson, R. C. (2016). Actin-induced structure in the beta-thymosin family of intrinsically disordered proteins. *Vitamins and Hormones*, **102**, 55-71.
3. Crockford, D. et al. (2010). Thymosin β_4 : structure, function, and biological properties supporting current and future clinical applications. *Ann NY Acad Sci*, **1194**, 179-189.
4. Domanski, M. et al. (2004). Coupling of folding and binding of thymosin β_4 upon interaction with monomeric actin monitored by nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem*, **279**, 23637-23645.
5. Zarbock, J. et al. (1990). Solution conformation of thymosin. beta. 4: a nuclear magnetic resonance and simulated annealing study. *Biochemistry*, **29**, 7814-7821.

A stabilin-2 citoplazmadoménról és a β_4 -timozinnal alkotott komplexének rendezetlenségéről nem található nagyfelbontású NMR: csak a saját kis felbontású NMR-es cikkeinket találtam.

2026. április 7.


Bokor Mónika