

Válasz Dr. Bányai Istvánnak

Tisztelt Dr. Bányai István!

Köszönöm részletes és elmélyült bírálatát, így az értekezés fizikai és kémiai háttérét érintő kérdéseit, valamint a terminológiai és szerkezeti megjegyzéseit.

A bírálat több ponton érint olyan alapvető fizikai kérdéseket – mint a relaxációs mechanizmusok, a FID-jel illesztésének elméleti megalapozása, vagy a mágneseztér-inhomogenitás szerepe –, amelyek megérdemelt figyelmet kapnak az alábbiakban. Válaszaiban igyekszem az egyes felvetéseket következetes rendben tárgyalni, és ahol az értekezés megfogalmazása pontosításra szorul, azt egyértelműen jelzem.

*A megírt értekezés két III. pontot is tartamaz.*

Ez elírás a tartalomjegyzékben és a szövegben is. A fejezetek sorrendje jó, csak a számozás rossz.

*9.o. egy vízmolekula sokszoros kapcsolata helyett a sokféle helyesebb lenne*

A leginkább „sok, különféle kapcsolata” lett volna a helyes megfogalmazás.

16.o. 4. ábra a „koaleszkálás” helyett az összeolvadást, de az asszociálódást is választanám.

Az 5. oldalon a „Jelölések, rövidítések és idegen kifejezések jegyzéke” c. fejezetben megadtam a szó jelentését, mint aggregál, összeáll.

16. o. „tömbvízfázis”-sal való kölcsönhatás nem igazán magyaros, a „tömbfázisban lévő vízzel” helyettesíteném.

Az eredeti megfogalmazást a pontosság érdekében tartottam meg, ugyanakkor a bíráló által javasolt forma nyelvileg valóban gördülékenyebb.

19. oldal: eddig jórészt a felszín szót használta a fehérje tömbfázissal érintkező részére, de itt megjelenik a felület szó. Ez fizikai-kémiai értelemben helytelen.

Ennél a definíciónál ez a helyes kifejezés, mivel a definícióban egymással érintkező makroszkopikus fázisok felszínéről van szó. Mikroszkopikus esetben – ha molekulákról van szó - sokkal inkább felületről beszélhetünk.

21.o. A 4. sor alulról az életem leghosszabb mondata, amit valaha olvastam.

A mondat valóban túl hosszú, és célszerű lett volna több részre bontani. Mentségemre szóljon, hogy a), b), c), d), e), f) részekre van tagolva.

33.o. 8. sor Nagyon nehézkes mondat. A mágnesek nem eredményeznek frekvenciákat.

A mágneses tér nagyságából következik a rezonanciafrekvencia nagysága. Az „eredményez” nem szerencsés szóhasználat. Inkább azt kellett volna írni, hogy ekkora proton frekvenciával járnak.

A kis mágneses terű és a széles jelű NMR szinonima? Miért?

A "kis tér = széles jel" összefüggés elsősorban a felbontásra vonatkozik (ppm-skálán), nem feltétlenül a fizikai  $T_2$ -re. Kivétel a CSA-dominált relaxáció, ahol nagy mágneses térben a jelek Hz-ben is szélesebbek lehetnek:  $1/T_2(\text{CSA}) \propto B_0^2$ . A két kifejezés nem tekinthető szinonimának; a dolgozatban azonban helyenként közelítő értelemben szerepelnek. Az egy másik kérdés, ahogy a dolgozatban leginkább „nem nagyfelbontású NMR” jelentésként ugyanolyan értelemben használtam.

34. oldal 2. bekezdés **A relaxációs ráta a  $T_1/T_2$  arányt jelenti?** (Ugyanitt aktivációs energia helyett aktiválásienergia írandó.) **Hogyan kapcsolódik ehhez az arányhoz az aktiválási energia? Milyen következtetést lehet levonni az arányból?**

A relaxációs ráta kifejezés alatt az  $1/T_1$  és  $1/T_2$  mennyiségeket értettem. Tehát nincs szó a  $T_1/T_2$  arányról.

Az „aktiválási energia” és „aktivációs energia” kifejezések a szakirodalomban szinonimaként használatosak.

A 34. oldal utolsó mondata fizikai jelentésére és magyarázatára vagyok kíváncsi. **Hogyan ad a relaxációs komponens aktiválási energiát, és hogy jön ehhez a translációs diffúzió?**

A részletes levezetést az idézett irodalom tartalmazza; röviden összefoglalva\*:

A longitudinális és a transzverzális relaxációs sebesség ( $R_1$  és  $R_2$ ) így írható fel homogén mintára:

$R_1 = \gamma_1^2 \sigma_1^2 \tau_1 / (1 + \omega_0^2 \tau_0^2)$ , illetve  $R_2 = \gamma_1^2 (\sigma_0^2 \tau_0 + \sigma_1^2 \tau_1 / 2(1 + \omega_0^2 \tau_1^2))$ , ahol  $\gamma_1$  a hidrogén giromágneses hányadosa. A  $\tau_q$  átlagos ugrási idő az Arrhenius összefüggést követi:  $\tau_q =$

$\tau_{q0} \exp(E/RT)$ , ahol az  $E$  a molekuláris mozgás aktivációs energiája,  $R$  pedig a moláris gázállandó. Felidézendő a transzverzális relaxációs függvény érvényes változata inhomogén mágneses terekben és olyan mintákra, melyekben a rezonáns magok translációs diffúziója nem elhanyagolható. Egytengelyű mágnesesindukció-gradiens ( $\partial B/\partial z$ ) esetén  $M_2(n2\tau) =$

$M_0 \exp[-F((\partial B/\partial z), D, \tau^3)] \exp[-\{n2\tau\}R_2]$ , ahol  $t = n2\tau$  a CPMG-sorozat gerjesztő pulzusai között mért idő  $2\tau$  egységekben és az első exponens a térgradiens, valamint a  $D$  diffúziós állandó  $F$  függvénye. A  $D$  diffúziós állandó a translációs diffúzióra jellemző.

\* Tompa K. et al. (2010). Hydration water/interfacial water in crystalline lens. *Exp Eye Res*, **91**, 74-84.

A 35. oldalon említi a tiszta jó minőségű víz alkalmazását. Ez fontos, de mennyire vihető át így a gyakorlatba a kapott eredmény, hiszen a fehérjék biológiai folyadékokban vannak. **Igényel-e ez az átvitel további megfontolásokat, kísérleteket?**

Kísérleti tapasztalataink alapján az eredmények jól átvihetők (ld. itt megadott irodalom). A sima vizes oldathoz képest lényegi különbség csak nagyon sok különböző oldott anyagot tartalmazó, „crowded” oldat esetén várható. Több kísérletet is végeztünk fiziológiás koncentrációjú (150 mM) NaCl-, illetve pufferelt ilyen oldaton és ezek feloldott fehérjét is tartalmazó változatain. A fehérjéket hidratáló víz ugyanolyan viselkedést mutatott mint a desztillált vizes oldatban, de ekkor nem kellett a fehérjén a kívüli többi oldott anyag hatásával számolni. A legtöbb biológiailag releváns mérés a pufferelt (pH 7.4) fiziológiás (150 mM) NaCl-oldatban történt.

- P. Tompa et al. 2016 (DSC és NMR mérések; oldószer: H<sub>2</sub>O, Tris-puffer)
- Balázs et al. 2009 (NMR mérések; oldószer: Tris-puffer)
- Tompa K. et al. 2009 (DSC és NMR mérések; oldószer: H<sub>2</sub>O, Tris-puffer)
- Kamasa et al. 2007 (DSC és NMR mérések; oldószer: H<sub>2</sub>O, NaCl-oldat, Tris-puffer)
- Tompa P. et al. 2006 (DSC és NMR mérések; oldószer: H<sub>2</sub>O, NaCl-oldat, Tris-puffer)

Tris-puffer = 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH = 7,0

#### 41. o. **Mit jelen a 10<sup>-6</sup> rész a stabilitásban, illetve a 2 ppm a tér az inhomogenitásában?**

A 10<sup>-6</sup> rész a stabilitásban azt jelenti, hogy a mágneses tér frekvenciájának hibája maximum ennyi lehet. Ha az NMR tér inhomogenitása 2 ppm, akkor a minta térfogatán belül a mágneses tér erőssége relatíve 2·10<sup>-6</sup>-od résszel térhet el a névleges értéktől.

**Mi okozza a 20 ms-os fid hosszat a tömbfázisú víz esetén?** Másodperces nagyságrendűnek mérjük mi 20 MHz-en a desztillált víz relaxációs időállandóját.

0 °C alatti fehérjeoldatban a 20 ms-os FID-hossz tömbfázisú víz esetén azt jelzi, hogy a tömbfázisú víz valójában fagyott, de kis méretű jégkristályokat tartalmaz, amelyek relaxációs tulajdonságai a tiszta folyékony víz (1-3 s) és a nagy jégkristályok (10-100 μs) között helyezkednek el. A fehérjék jelenléte megakadályozhatja a nagy kristályok kialakulását, így kis, mobilis határfelületekkel rendelkező jégtartományok képződnek.

**Mi az elméleti alapja a fid Gauss függvények összegével való illesztésnek a nulla időre való extrapoláció esetén? Vagy az semmiképpen nem alternatíva?**

Általában Gauss-görbe alakú vonalak találhatók szilárd anyagokban. Lorentz-görbe alakú vonal figyelhető meg, ha figyelemre méltó mozgási keskenyedés van, pl. folyadékokban (Fukushima 1981).

A FID akár nyújtott exponenciális vagy kellően mozgékony esetben Lorentz-görbével is extrapolálható lenne és ez elméletileg jól megalapozott az irodalomban, de a Gauss-görbék összegével történő illesztés kellően rugalmas és matematikailag jól visszaadja a mért görbe alakját, egyszerűbb, praktikusabb, jól használható, főleg rövidebb, de jég és fehérje FID-jének lefutásánál hosszabb időtartományban: 100-150 μs < t < 1 ms).

## Mi az előnye a fid jelek észlelésének a CPMG módszerrel mért ekhó intenzitások megfigyelése helyett?

A FID-jel használatával a számos inherens hibaforrással terhelt spektrumintegrálás elkerülhető. A FID-jel és a CPMG-echó sorozat válaszfüggvények alapvetően különbözőek (Slichter 1990). „Mozgási átlagolás” (mozgás: translációs diffúzió vagy rotáció) vagy másként fogalmazva, inhomogén lokális tér szükséges a CPMG-echó létrehozásához, míg a FID-jel a minta minden  $^1\text{H}$  magjáról tartalmaz információt, függetlenül mozgási állapotuktól. Egy nem mozgékony (merev) protonrendszer, melyre a dipólus-dipólus kölcsönhatás nem nulla, nem ad CPMG-echókat (Slichter 1990). Ezek a jelenségek nyújtják az elméleti hátterét a mozgékony és nem mozgékony hidrogénatomok szétválasztásának. Mindkét módszert használják a mozgékony hidrogénkomponensek meghatározásában.

- Fukushima, E. 1981. Experimental Pulse NMR - A Nuts and Bolts Approach. írta Eiichi Fukushima, első kiadás. CRC Press, Boca Raton
- Slichter, C. P. 1990. Principles of magnetic resonance, 3-ik bővített és frissített kiadás, 1. kötet. Springer Verlag, Berlin.

A 47. oldalon azt állítja, hogy a mozgékony vízfракciók megkülönböztetése „...*a bennük foglalt hidrogén atommagok mozgékonyságának különbözőségén alapul.*” Ez a megállapítás nem helyes, mert a relaxáció a vízmolekula rotációs korrelációs idejével kapcsolatos, ahogyan azt a következő mondatban helyesen megállapítja.

A „mozgékonyság” kifejezést összefoglaló értelemben használtam, amely magában foglalja a rotációs és – közvetett hatásokon keresztül – a translációs mozgást is. Az NMR relaxáció valóban elsősorban a rotációs korrelációs időhöz ( $\tau_c$ ) kötődik a dipólus-dipólus mechanizmuson keresztül, ahogy azt a szövegben kifejtettem. A translációs diffúzió közvetetten, az átlagos molekulaközi távolságok és a dinamikus környezet változásán keresztül hat. A két mozgástípus említése nem ellentmondás, hanem a teljes kép bemutatása.

## Mit ért magspinpolarizáció bomlásán? (47. o. utolsó bek.).

A magspinpolarizáció bomlása (nuclear spin polarization decay) azt a folyamatot jelenti, amikor a mágneses térben létrehozott nem-egyensúlyi spinállapoteloszlás visszatér a termikus egyensúlyba. A fagyott fehérjeoldatban mozgékony hidratációs víz polarizációjának bomlása  $T_1$  és  $T_2$  (illetve  $T_2^*$ ) relaxáción keresztül történik. A spin-spin relaxációnál a rövidebb relaxációs idő (gyorsabb bomlás) a fehérjéhez való erősebb kötöttséget jelez. Ezenkívül a spin-spin relaxációs idő különbségei alapján különböztethető meg a jég, a fehérje, és a mozgékony víz FID-komponense.

A 48. oldalon írja, hogy a fáziskoherencia elvesztése „energiaátadással” jár. **Kérem, ismertesse ennek részletes magyarázatát!**

A transzverzális relaxációhoz kapcsolt energiaátadás a kölcsönható magspinek közötti folyamat - ez Slichter terminológiáját követi (Slichter 1990). Ez nem a rácsba történő energiadisszipáció (az a  $T_1$  folyamat), hanem a dipolárisan vagy J-csatolással kölcsönható spinpárok közötti kölcsönös flip-flop, amely megőrzi a Zeeman-energiát, de véletlenszerűvé teszi fázisokat. A makroszkopikus fáziskoherencia elveszik, miközben a spinrendszer belső energiája átrendeződik.

Az 52. oldalon hivatkozza a 42. oldalon (nem) található olvadási diagramot.

A 42. oldalon az „olvadási diagram” fogalmának meghatározása található. Erre történt az utalás, nem pedig az egyik ábrára.

Az 53. oldalon bevezeti a vízmolekulák *naa aminosavankénti számát* a következő képlettel:

$$naa = (m_{\text{víz}} \cdot M_r^{\text{fehérje}}) / (m_{\text{fehérje}} \cdot M_r^{\text{víz}})$$

**Kérem, mutassa be a képlet levezetését, ugyanis azt gondolom, hogy valahol szerepelnie kell a fehérjét alkotó aminosavak számának is.**

A képlet a dolgozatban a következő formában szerepel:

$$naa = n \cdot (m_{\text{víz}} \cdot M_r^{\text{fehérje}}) / (m_{\text{fehérje}} \cdot M_r^{\text{víz}})$$

A képletben a tört előtt szereplő  $n$  jelöli az egy fehérjemolekulát alkotó aminosavak számának reciprokát. Ez a képletből a bírálatban lemaradt, de a dolgozatban szerepel. A dolgozatban explicit meg kellett volna adni  $n$  jelentését, ez sajnos elmaradt. Az  $n$  paraméter ilyen jelentése mellett tényleg a vízmolekulák aminosavankénti számát adja meg az  $naa$  paraméter.

A 60. oldalon szereplő megállapítás magyarázatát kérem, **azaz milyen termodinamikai szempontból különböznek az egyes  $\alpha$ -szinuklein pontmutációk?**

„Kutatásunk az adott hőmérsékleti energianál eltérő polimerizációjú, illetve eltérő mutációjú változatok körüli hidratációs víz mozgására vonatkozó potenciálgát-eloszlás vizsgálatára irányult (Bokor et al. 2022, Tompa K. et al. 2015, 2013, 2012, 2010a).” Vagyis az eltérő  $\alpha$ -szinuklein pontmutációk a hidrátvíz mozgását meghatározó potenciálgát-eloszlás tekintetében, azaz ebből a termodinamikai szempontból különböznek. A különbségeket részletesen ki lehetett volna fejteni a dolgozatban is.

### **Itt kérdezem meg, hogy a vad típusú fehérje azonos a természetes vagy natív fehérjével?**

A „vad típusú” (wild type) a nem mutált szekvenciát jelöli, míg a „natív” a fehérje sejtben domináns, funkcionális szerkezeti állapotára utal; a két fogalom nem minden esetben azonos. Ezek a kifejezések jelen esetben szinonimáknak számítanak.

A 78. oldalon írja, hogy „Továbbá, hogy a vad típusnak és az A53T mutánsnak az oligomer–monomer, illetve amiloid–monomer olvadási diagram-különbségei szembetűnően konzekvens viszonyt tükröznek (24. **ábrac**, d. ábra) (sicc).

Helyesen (24c. és d. ábra).

### **mit jelent a ”konzekvens viszony” két diagram között?**

A megfogalmazás pontosítása indokolt; itt arra akartam utalni, hogy a két diagram lefutása hasonló trendet mutat.

A jelölt nagyon ügyel az idegen szavak elkerülésére a magyar nyelvű értekezésben, de a 84. oldalon szereplő „moonlighting” fehérje még biológus kollégáimnak is fejtörést okozott. Ez a többfunkciós fehérje lehet, azaz olyan, amelyik többféle szerepet tölt be az biológiai rendszerekben.

A 30. oldalon megadtam a moonlighting fehérjék definícióját, mint olyan „fehérjék, melyekben egy polipeptidlánc egynél több fiziológiailag lényeges biokémiai vagy biofizikai funkciót lát el (Jeffery 2018, 2003, 1999)”. A „Jelölések, rövidítések és idegen kifejezések jegyzéke” c. fejezetbe sajnos nem illesztettem be ezt a meghatározást. Magyarul leginkább többfunkciós fehérjének lehet fordítani.

### **Foglalja össze néhány mondatban, mik azok az eredmények, amiket más módszerrel nem lehetett elérni?**

Új megoldásokat vezettem be fagyott fehérjeoldatok széles jelű  $^1\text{H}$  NMR spektroszkópiai jellemzésére és ezeket rendezetlen fehérjéken sikerrel alkalmaztam. A két vizsgált fehérjecsoportot olvadási diagramok részletes és sokrétű értelmezésével jellemeztem. Az oligomerek, amiloidok és a  $\beta_4$ -timozin–stabilin-2 citoplazmadomén komplex átrendeződnek amikor létrejönnek alkotóikból. Ezt azzal bizonyítottam, hogy az olvadási görbék nem egyenlők az alkotó fehérjék egyedi olvadási diagramjainak összegével. Azonosítottam a másodlagos kötéstípusokat. Kiszámítottam, hogy a  $\beta_4$ -timozin és stabilin-2 citoplazmadomén fehérje komplexet alkotó fehérjék szabad állapotukban több mozgékony hidratációs vizet kötnek, mint a komplex.

2026. április 7.

  
Bokor Mónika