

Válasz Dr. Bodor Andreának

Tisztelt Dr. Bodor Andrea!

Köszönöm alapos és részletes bírálatát. Szakmai észrevételei és a megfogalmazásokra vonatkozó javaslatai egyaránt rendkívül hasznosak voltak számomra. A bírálat számos pontján rákérdez az alkalmazott módszertan és a mérési eredmények mögötti fizikai összefüggésekre, amelyeket az alábbiakban igyekszem pontosan és részletesen megválaszolni.

A megfogalmazásbeli észrevételeket köszönettel fogadom, és az egyes pontokban jelzett helyesírási, terminológiai kérdésekre is kitérek válaszaiban. Remélem, hogy az alábbi magyarázatok meggyőzően alátámasztják az értekezésben bemutatott eredmények érvényességét és az alkalmazott módszertan megalapozottságát.

A megfogalmazásokkal kapcsolatos észrevételek/javaslatok.

A megfogalmazásokkal kapcsolatos észrevételek többségével egyetértek; az alábbi pontban azonban pontosítást teszek: „25. ábra naa – hibás lehet, hiszen az egy pozitív szám.” – Az naa paraméter – mint mozgékony vízmolekulák száma aminosavegységenként – pozitív mennyiség, az adott ábrán azonban két naa -érték különbségét adtam meg (ld. ábraszöveg). A különbség negatív értéket is felvehet.

Válasz a kérdésekre:

1. *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?*

A mérések során egyszerű FID-jelek kerültek rögzítésre, ezért az alkalmazott „impulzusszekvencia” egyetlen $\pi/2$ -es impulzusból állt. A dolgozat (42. oldal) rögzíti a jellemző időskálákat: 2 μ s-os pulzushossz, 10 μ s-os spektrométer-holtidő, a mozgékony hidratációs víznek megfelelő FID hossza néhány 100–1000 μ s, a tömbvízé ~20 ms. A mágnesezettséget a 90°-os pulzus hosszára és a nukleáris szuszceptibilitás hőmérsékletfüggésére normalizáltam. A mérések ismétlésének sűrűségét változtattam, hogy mindig legalább $5 \times T_1$ legyen a két éppen mért jel között eltelt idő.

A Gauss-függvények összegével való $t = 0$ -ra történő extrapoláció fizikai indoka a következő: a fagyott mintában a jégben és a fehérjében lévő ^1H -magok rendkívül rövid T_2 idejű, gyorsan lecsengő FID-komponenst adnak, ezek intenzitása nem képezte az elemzés tárgyát. A mozgékony hidratációs víz komponense lassabban cseng le (Lorentz-alak).

A jég + fehérje és a mozgékony víz komponens a T_2 értékük több nagyságrendnyi különbsége miatt jól elkülönül (14. ábra, 50. oldal), és az extrapoláció a lassan lecsengő, mozgékony vízkomponens $t = 0$ értékét adja, ami arányos a mozgékony vízmolekulák számával. E jelkomponens extrapolációját csak a rövidebb időkhöz tartozó részének Gauss-göbök (maximum három) összegének illesztésével végeztem, mivel ez az eljárás megfelelő illeszkedést biztosított a mért jelalakhoz.

A relaxációs időket illetően: a dolgozat nyíltan közli (48. oldal), hogy „Ez a dolgozat nem tartalmaz relaxációs idő méréseket.” A dolgozat módszere a FID amplitúdójának közvetlen mérésén alapul. A korábbi, csoportból származó mérések (Tompka K. et al. 2010, Bokor et al. 2005) ugyanakkor megmutatták, hogy rendezetlen fehérjék esetén a legerősebben kötött hidratációs víz aktiválási energiája 50%-kal nagyobb, mint globuláris fehérjékénél, és a korrelációs idők nagyságrendekkel eltérnek.

2. *A dolgozatban nem részletezi, de a méréseket egy alkalommal végezte el? A reprodukálhatóság tekintetében, a mérések ismétlésekor minden lehűtés során ugyanazok lesznek a fagyott mintában a konformer állapotok? Mekkora lehet az így meghatározott naa értékek szórása?*

Az NMR méréseket desztillált vízben oldott fehérjékkel, más oldott anyagtól mentes oldatban, három azonos, egymástól függetlenül készített mintán végeztük el. Miután a megismételt, különböző időpontokban preparált mintákon végzett mérések azonos eredményt hoztak, ezek alapján megállapítható, hogy minden lehűtés során a fagyott mintában azonos konformer állapotok reprodukálhatók. Az így meghatározott naa értékek szórása a β_4 -timozin, stabilin-2 CTD, és komplexük hőmérsékletfüggetlen naa -tartományán:

fehérje	teljes N	átlag	szórás
β_4 -timozin	7	0,67	0,05
stabilin-2 CTD	5	0,49	0,02
komplex	5	0,74	0,08

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 újra képződését teszi lehetővé? Hogyan lehetne erről megbizonyosodni?*

Az NMR és DSC mérésekhez a minták elkészítése során a liofilizált vad típusú, valamint az A30P, E46K, A53T α -szinuklein variánsok tömegét további tisztítás nélkül meghatároztuk.

Több, különböző expresszió során készül minta széles jelű NMR mérésével ellenőriztük a liofilizált minták víztartalmának esetleges változását.

Az oligomer képződés viszonylag lassú, vagyis a jó pár óráig eltartó tisztítási folyamat alatt képződnek oligomerek. Ezután a mintát rögtön lefagyaszttjuk és aztán liofilizálásra kerül, tehát itt már nincs komoly oligomer képződés. Ezt alátámasztja, hogy az olvadási diagram mérése $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ között, melegítés közben történt, és a szobahőmérsékletre visszamelegített minta FID-jele minden esetben a kiindulásihoz képest változatlan maradt. Ha közben számottevő oligomer képződött volna, ez várhatóan detektálható változást eredményezett volna az olvadási diagram alakjában, különösen a globuláris jellegű oligomerekre jellemző széles hőmérsékletfüggetlen szakasz megjelenéseként. Ennek hiánya arra utal, hogy a monomer preparátumban az oligomer újraképződés mértéke elhanyagolható volt.

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?*

A bíráló által felvetett szerkezeti érvek (A30P cisz–transz izomerizáció, E46K KEG→KKG, A53T VAT→VTT) lényeges lokális szerkezeti következményekre mutatnak rá. A dolgozat maga is tárgyalja ezeket az összefüggéseket (100–101. oldal), és az eredmények konzisztensek a felvetett érvekkel:

Az E46K mutáns olvadási diagramja egyedi, két állandó szakaszt mutató lefutást mutat, ami két diszkrét potenciálgáttal jellemzett víztípusra utal. A KEG→KKG változással járó két egymás melletti pozitív töltés (KKG) lokálisan megmerevedett, elektrosztatikusan feszült struktúrát eredményez, ami a hidratációs víz kétféle kötési módjában tükröződik. A dolgozatban is megállapítom, hogy „az E46K mutáció általában a vad típushoz képest megnövekedett merevséggel társul. Kisebb rugalmassághoz vagy nyitottsághoz vezet, mert hajlamos stabilizálni speciális konformációkat.” (100. oldal). A stabilizált speciális konformáció a KKG szekvencia következménye.

Az A30P esetén a prolin cisz–transz izomerizációja valóban nagyobb konformációs sokaságot jelent. Az, hogy eredményeim szerint az A30P kevesebb vizet köt, mint a vad típus,

a prolin csökkent H-kötés donor tulajdonságával és a konformáció megváltozott hidratációs geometriájával magyarázható.

Az A53T mutáns a mérések szerint a legnyitottabb és legjobban hidratált változat, összhangban azzal, hogy a mutációval bevitt treonin új hidroxil csoportja új H-kötési lehetőségeket teremt, a fehérje nyitottabb konformációt vesz fel, ami fokozott aggregációs hajlamával is összefügg (101. oldal). A bíráló érvelése tehát összhangban van a kapott eredményekkel; az E46K < A30P < vad típus < A53T nyitottsági és hidratációs sorrend a dolgozatban is megjelenik.

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”?*

Az oligomerek és az amiloidok belsejében lévő víz vizsgálatára több kísérleti és elméleti módszer áll rendelkezésre; a legfontosabbak röviden:

a) Szilárd fázisú NMR – ^1H – ^1H NOE és ROE mérések: A fehérjén belüli vízmolekulák azonosíthatók intermolekuláris NOE keresztcsúcsok alapján: A fehérje protonok és a belső víz protonjai között fellépő dipólus–dipólus kölcsönhatás keresztcsúcsot ad a 2D NOESY spektrumban; negatív NOE keresztcsúcs (nagy fehérjékre jellemző): a víz kötött, mozgása lassú, pozitív NOE: gyorsan cserélődő, felszíni víz; ^1H T_1 és $T_{1\rho}$ relaxáció szilárd NMR-ben: a belső víz a fehérje–mátrixtól eltérő $T_{1\rho}$ értékeket ad ($T_{1\rho}^{\text{belső víz}} \ll T_{1\rho}^{\text{felszíni víz}}$), valamint a relaxációs idők hőmérsékletfüggéséből az aktiválási energia meghatározható, ami a kötési energiára utal; ^2H szilárd állapotú NMR (nehéz víz): D_2O -val cserélt mintában a ^2H vonalalak közvetlenül érzékeny a vízmozgásra, a kötött (immobil) víz széles Pake–dubletet ad, a mozgékony víz pedig keskeny csúcsot.

b) QENS – az elasztikus inkoherens struktúra faktor (EISF) az immobilis víz arányát adja, a kvázi–elasztikus kiszélesedés pedig a mozgás sebességére utal. Érzékeny a fehérjék belső vízmennyiségének dinamikájára. Segítségével meghatározható a víz diffúziós sebessége és korrelációs idő. Nem csak a víz mennyiségét, hanem annak mozgását is képes jellemezni.

c) Röntgendiffrakció – Nagy felbontású kristályszerkezeteknél (~ 1.5 – 2.0 Å) a belső vízmolekulák pozíciói láthatók az elektronsűrűség–térképen: A belső víz Debye–Waller faktora alacsony, mert merev és kötött. Neutrodiffrakció – A hidrogénatomok (és a D_2O -val cserélt pozíciók) közvetlenül láthatók, vagyis a belső víz H-kötési hálózata feltérképezhető.

d) *Molekuladinamikai szimuláció (MD)* – Az amiloid fibrillumok MD szimulációi megmutatják, hogy a β -redő rétegek közé ~ 1 – 3 vízmolekula réteg zárható; a belső víz cseréjének kinetikája (belépési/kilépési sebesség) szimulálható; a Házy et al. (2011) cikkben lévő MD szimuláció megmutatta, hogy a széles jelű NMR eredmények az első hidratációs héjnak felelnek meg.

e) *HDX-MS (hidrogén-deutérium kicserélődési spektroszkópia – tömegspektrometria)* - A lassan cserélődő NH-csoportok a fehérje belsejében vannak és a belső víz hozzáférhetőségét indirekt módon jelzik.

f) *DSC (differential scanning calorimetry)* - A belső víz olvadáspontja alacsonyabb $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -nál. A kalorimetriás görbe kiterjedtebb olvadási csúcsa jelzi a kötött (belső) víz jelenlétét.

6. *Az α -szinuklein témakörben a szerkezeti sokaságokat jellemző eredményei hogyan egészítik ki az NMR, CD, SAXS, stb módszerek által nyújtott ismereteinket?*

Az alkalmazott széles jelű NMR módszer közvetlenül méri a fehérje-víz határfelület mozgékony vizének a mennyiségét és az ennek mozgását akadályozó potenciálgátak energiaeloszlását. A felsorolt módszerek egyike sem méri a hidratációs réteg energetikáját és a mozgékony hidratációs vízmolekulák számát. A módszer érvényességét alátámasztja, hogy a vad típusú α -szinuklein monomer körüli mozgékony vízmolekulák száma az $E_{a,0} \leq E_a \leq E_{a,1}$ potenciálgát-tartományban egyezik a molekuladinamikai szimulációk alapján a vad típusú és az A53T α -szinuklein monomerek első hidratációs rétegével (Házy et al. 2011), igazolva, hogy az elsőként mozgékonyvá váló hidratációs víz mennyiségileg elég ahhoz, hogy minden lehetséges hidrogénkötést megvalósítson a fehérjével.

Az oligomerképző fehérjéknél a „hidratációs ujjlenyomat” alapján azonosítható, hogy a monomer \rightarrow oligomer \rightarrow amiloid polimerizáció során hogyan változik az oldószernek hozzáférhető felszín, ez a szerkezetképzés termodinamikájáról ad közvetlen, kvantitatív adatot.

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.*

A dolgozat „C. β_4 -timozin, stabilin-2 citoplazmadomén és 1:1 komplexük” fejezetében az első mondatban írom, hogy „nincs jól-dokumentált, közvetlen kölcsönhatás a β_4 -timozin és stabilin-2 citoplazmadomén között” (84. old.). Azóta sem jelent meg erről új információ. A kinetikai paramétereket bioréteg interferometria (BLI) mérésekkel (Tantos et al. 2013) határoztuk meg, $K_D = 2,8\text{ mM}$ – a kötés rendkívül gyenge.

„Mennyire „zavarja” egyik fehérje jelenléte a másikat?”

A komplex képződése a stabilin CTD oldószernek hozzáférhető felszínének számottevő elvesztését eredményezi, és fuzzy kölcsönhatásra utal. Az egyedi fehérjék olvadási diagramjainak súlyozott összege erősen különbözik a mért komplexétől (30. és 31. ábra, 92–93. oldal). Az $5,40\text{--}5,70\text{ kJ mol}^{-1}$ potenciálgát-tartományban az összeg nagyobb a komplexen mértnél, és a különbség értéke $naa = 0,20(1)$, azaz 19(1) vízmolekula/komplex szabadul fel az összekapcsolódáskor.

Egy koncentráció függés, különböző 1:1 közeli arányoknál segítene az eredmények alátámasztásában?

A koncentrációfüggő mérések (különböző arányoknál) további megerősítést nyújthatnának.

8. *A kidolgozott technika segítségével számolható a vízmolekulák aminosavankénti száma (naa) és a hidratáció (h). Hogy korrelál, vagy korreláltatható-e a kapott érték a fehérjék-nél bevált, aminosav szekvencia alapján számított SASA (Solvent Accessible Surface Area) értékkel, ami az oldószernek kitett felületet jellemzi.*

A 62. oldalon az α -szinukleinekre, illetve a 97. oldalon β_4 -timozinra, stabilin-2 citoplazmadoménre és az 1:1 komplexükre mutattam meg, hogy az aminosav-szekvencia alapján számított és a mért hidratációs értékek hibán belül egyeznek. Ez arra utal, hogy korrelál/korreláltatható a vízmolekulák aminosavankénti száma és az aminosav-szekvencia alapján számított SASA.

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?*

Amennyiben egy adott fehérje aminosav-szekvenciájának ismeretében tudtató, hogy globuláris, vagy rendezetlen fehérjéről van szó, akkor kvalitatív módon előre jelezhető, hogy a mozgékony víz aránya a hőmérséklet függvényében milyen változást fog mutatni, vagyis milyen lesz az olvadási diagramjának a lefutása. Erre ugyan nem dolgoztam ki előrejelző/predikciós módszert, de az összegyűlt tapasztalatok alapján ez becslés szintjén megtehető.

2026. április 7.


Bokor Mónica