

**Bokor Mónika Zsuzsanna,**

„Széles jelű NMR-spektroszkópia alkalmazása egyes rendezetlen fehérjék hidratációjának vizsgálatára” c.

MTA doktori értekezésének bírálata

írta: **Batta Gyula**, az MTA doktora, Prof. emeritus,

Debreceni Egyetem, Kémiai Intézet, Szerves Kémiai Tanszék

A Jelölt témaválasztása rendkívül időszerű, mivel az ezredfordulótól kezdve vált világossá, hogy a globuláris fehérjék mellett a rendezetlen szerkezetű fehérjék (IDPk) nagy számban léteznek a természetben és fontos biológiai szerepet játszanak. A dolgozat mottója lehetett volna akár Petőfi verséből is: „Habár fölül a gálya, s alul a víznek árja, azért a víz az úr.”, hiszen a fehérje oldatok vizes fázisát vizsgálták. A vizsgált IDPk fontos szerepet játszhatnak a fehérje aggregációs betegségekben, így az időskori demencia kialakulásában. A téma kutatásában fontos szerepet játszottak a magyar kutatók, többek között Tompa Péter is. Szerencsés körülmény, hogy az IDP vizsgálatokhoz jelentősen hozzájárulnak az NMR spektroszkópiás módszerek, amelynek egyik hazai doyenje Tompa Kálmán. Duplán szerencsés lehetősége adódott a Jelöltnek, hogy kutatásai során mindkettőjükkel együtt dolgozhatott. Az általa alkalmazott alacsony terű, szélessávú  $^1\text{H}$ -NMR vizsgálatot alkalmazó spektrométerek alkalmasnak bizonyultak a fehérje hidratáció vizsgálatára, amit a Jelölt számos közleményében demonstrált. A Jelölt tudományos teljesítményét fémjelzi, hogy az MTMT2 adattár szerint 73 tudományos közleményére összesen 949 hivatkozás történt, amiből 669 független és a Hirsch indexe 15. Az utóbbi 10 évben megjelent 15 közleménye túlnyomórészt magas impakt faktorú lapokban jelent meg (Q1,D1 kategória, pl. ACS Omega).

A Jelölt által benyújtott dolgozat több mint 100 oldalon taglalja az elvégzett kutatásokat és elért eredményeit, továbbá mintegy 160-180 irodalmi hivatkozást is tartalmaz munkája. (Szerencsésebb lett volna a hivatkozásokat sorszámozni.) Az értekezés tézis pontjai lényegileg egyeznek az összefoglaló téziseivel, azonban több tézis esetén nem szó szerint. Előnye viszont az összefoglalónak, hogy ebben röviden (3 oldal) és érthetően elmagyarázza munkájának irodalmi hátterét és az általa alkalmazott kísérleti módszereket.

*A konkrét megjegyzéseim dőlt betűkkel szerepelnek.*

## **I. Bevezetés (3 oldal)**

## **II. Tudományos előzmények (24 oldal)**

### **A. Fehérjék – általános leírás, kémiai kötések és kölcsönhatások, típusok**

Vázszerkezet és dinamika a fehérjék körül

Fehérje-fehérje kölcsönhatások

A fehérjeoldatok általános tulajdonságai

Rendezetlen fehérjék

### **B. Vizsgált fehérjék szerkezeti és biológiai háttere**

I.  $\alpha$ -szinukleinek

II.  $\beta$ -4 timozin, stabilin-2 CPD

### **C. Széles jelű $^1\text{H}$ -NMR mérés és értelmezése**

#### **III. Célkitűzések**

*A 24 oldalas bevezetés a fehérjék (négy szerkezeti szerveződési szint, stb.) és a víz jól ismert tulajdonságait ismerteti. Ez a fejezet sajnos több helyen redundáns és a megfogalmazások nem mindig a szokásosak, nyelvtanilag kicsit dőcögősek („relaxációs ráta”), és elírások is akadnak, pl. 39. old „tömegét lett megmérve”, és az egybeírás-különírás kérdése sok helyen felmerülhet. Kétségtelen, hogy a témával ismerkedőknek mégis hasznára lehet ez az áttekintés. A dolgozat megértését lényegesen segíti a hivatkozott saját közlemények tanulmányozása annál is inkább, mert azokban pl. jobb az ábrák minősége.*

#### **A. Fehérjék – általános leírás, kémiai kötések és kölcsönhatások, típusok (12.-16. oldal)**

I. Vízszerkezet és -dinamika a fehérjék körül (16-17. oldal)

II. Fehérje-fehérje kölcsönhatások (17.-18. oldal)

III. A fehérjeoldatok általános tulajdonságai (19.-20. oldal)

IV. Rendezetlen fehérjék (20-23. oldal)

#### **B. Vizsgált fehérjék szerkezeti és biológiai háttere**

I.  $\alpha$ -szinukleinek

1. Szerep a Parkinson-kórban (24.-27. oldal)

2. Szerkezeti tulajdonságok (27.-29. oldal)

II.  $\beta$ 4-timozin, stabilin-2 citoplazmadomén és komplexük

1.  $\beta$ 4-timozin (30-31. oldal)

2. Stabilin-2 citoplazmadomén (31-32. oldal)

3.  $\beta$ 4-timozin–stabilin-2 citoplazmadomén komplex (32. oldal)

#### **C. Széles jelű $^1\text{H}$ NMR mérés és értelmezése (33-35. oldal)**

#### **III. Célkitűzések (36-37. oldal)**

#### **IV. Anyagok és módszerek**

A. Fehérjék előállítása (39-41. oldal)

B. Széles jelű  $^1\text{H}$  NMR mérések fagyott fehérjeoldatokon (41-43. oldal)

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

#### **III. Mérési eredmények és értelmezésük (44-45. oldal)**

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

*A potenciálgát fogalmára hivatkozik, bár nem volt előzetesen bevezetve.*

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

*„echósorozat” egybeírás-különírás*

### **II. $^1\text{H}$ 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 Fourier elméletből ismert, hogy a FID első pontja meghatározza a spektrum teljes integrálját. Igazolható volt-e ez a kísérleteik során? A spektrométer technikai holtideje mennyi volt (10  $\mu\text{s}$ )? Hogyan viszonyul ez a jég  $T_2$  relaxációs idejéhez?*

### **III. Olvadási diagram kiértékelésének elmélete (51-52. oldal)**

### **IV. Értelmezés részletei (53-59. oldal)**

### **B. Vad típusú és mutáns $\alpha$ -szinukleinek (59-60. oldal)**

#### **I. $\alpha$ -szinuklein monomerek (61-69. oldal)**

*1. táblázat, aláírásban (67. old) „n(i) értékek” nincsenek a táblázatban,*

*„potenciálgátrés” külön írandó*

#### **II. $\alpha$ -szinuklein oligomerek (70-72. oldal)**

#### **III. $\alpha$ -szinuklein amiloidok (72-76. oldal)**

#### **IV. Eltérő „polimerizációfokból” következő különbségek (76-80. oldal)**

*(talán helyesen polimerizációs fok?)*

#### **V. Dinamikai paraméterek (81-84. oldal)**

### **C. $\beta$ 4-timozin, stabilin-2 citoplazmadomén és 1:1 komplexük (84-98. oldal)**

#### **IV. Összefoglalás, tézisek és tervek (99-104. oldal)**

B. Tézisek (104-107. oldal)

C. Eredmények hasznosításának lehetőségei (107-109. oldal)

### **V. Irodalomjegyzék (111-123. oldal)**

*(Mintegy 160-180 hivatkozást tartalmazhat.)*

## **$^1\text{H}$ 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 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 FID fogalma nincs definiálva a rövidítéseknél (nagybetűkkel írandó !)*

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

*a szöveg a szerkesztés és a nyelvi problémák miatt általában nehezen követhető, nehezen érthető a dolgozat, különösen az eredményeket értelmező fejezetekben*

### **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 °C feletti hőmérsékleteken ?*

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

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

4. 29. old. *Az irodalmi bevezetésben utal saját eredményekre: „Eredményeink arra utalnak, hogy „*

5. 30. old. *A Sung & Eliezer 2018) referencia nem a β4-timozin-ra vonatkozik, hanem a micellához kötött α-szinukleinra. Érdekes, hogy a <sup>15</sup>N relaxációs mérések (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H} NOE) interpretálásából származó NH S<sup>2</sup> rend paraméterek a 16–85 helyek közt 0.8 átlagot mutatnak, ami inkább merevséget sejtet. Érdekes lenne a folyadékfázisban mérhető S<sup>2</sup> rend paraméterek összehasonlítása a dolgozatban szereplő rend paraméterekkel.*

6. 32. old. *β4-timozin–stabilin-2 citoplazmadomén komplex aminosavsorrendje az egymás után írt két szekvenciát mutatja, ami nem írható szerintem ilyen formába, mert nincs peptid kötés a két szekvencia között.*

7. 33. old. *„Az anyag tulajdonságai viszont sokkal egyszerűbben kinyerhetők az időtartománybeli adatokból, mint a nagy mágneses térrel mért, nagy felbontású spektrális adatokból”. Nem értünk egyet. Az atomi részletességű adatokhoz nagy felbontású NMR szükséges. Más módszerek, más információk.*

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

9. 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 ?

10. 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.

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

12. 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<sup>-1</sup>.

13. A tiszta vízben és a fiziológias oldatban mért eredmények voltak-e összehasonlítva ?

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

15. **4. tézis pont:** „hidratációsvíz” külön írandó

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

Kritikai megjegyzéseim elsősorban az értekezés formai, szerkesztésbeli és nyelvi hiányosságaira mutatnak rá, amelyek megnehezítették a bíráló munkáját.

Az ismertetett tizenegy tézispontot elismerem a Jelölt eredményeinek. A dolgozatban ismertette a lefagyasztott fehérje oldatok olvadási diagramjainak újszerű értékelését. Megállapította a mozgékony víz mennyiségét a hőmérséklet illetve az ekvivalens potenciálgát függvényében. Azonosította a fehérjék és a víz közt kialakuló kötéstípusokat. A fehérjékben másodlagos szerkezeti jellemzőket is felderített, sőt a helyüket is megjósolta. A módszerével különbséget tudott tenni a globuláris és a rendezetlen fehérjék között. Az utóbbi (IDP) tulajdonságok vizsgálata különösen fontossá vált az utóbbi időkben. Saját eredményei közt részletesen tárgyalta a vad és a mutáns (A30P, E46K, A53T)  $\alpha$ -szinukleinek tulajdonságait az oligomerizációs állapotuk függvényében. Ugyancsak a saját módszerükkel elemezte a  $\beta$ 4-timozin, stabilin-2 citoplazmadomén illetve 1:1 komplexük viselkedését az olvadási folyamatokban. Egy bizonyos potenciálgát tartományban nyitott, teljesen hidratált szerkezetet valószínűsített. Mivel ez a biológiailag fontos fehérje is rendezetlen, ezért szerkezeti tulajdonságainak és a komplex képzésének megértése fontos lehet a szerkezet-hatás összefüggések felderítéséhez.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények tudományos értéke vitathatatlan, így sikeres védelem esetén javaslom a Jelölt számára az MTA doktora cím odaítélését.

Debrecen, 2026. január 18.

Batta Gyula