

Vélemény

Dr. Bokor Mónika Zsuzsanna:

Széles jelű NMR-spektroszkópia alkalmazása egyes rendezetlen fehérjék hidratációjának vizsgálatára

című MTA doktori értekezéséről

Dr. Bokor Mónika kislebontású relaxációs NMR technikával („wide line NMR”) rendezett és rendezetlen fehérjék vízzel való kölcsönhatásának részleteit vizsgálta abból a célból, hogy a hidratáltság mértékét és formáit meghatározza. A további cél az volt, hogy egy egyszerű technikával meg tudja különböztetni a rendezett és rendezetlen fehérjéket, illetve a vízzel való kölcsönhatás finom, elsősorban energetikai, részleteit meghatározza. A kapott eredmények elvezethetnek bizonyos betegségek molekuláris okainak megértéséhez, így a *Parkinson-kór és az Alzheimer-kór* korai felismeréséhez.

A dolgozat egyik értéke a vizsgálati módszer kidolgozása és az adatok fizikai-kémiai igényű értékelése, amelyet HUN-REN Wigner Fizikai Kutatóközpont-beli kutatócsoport fejlesztett ki, illetve tökéletesített, a jelölt közreműködésével. A kutatócsoport tevékenysége, Tompa Kálmán irányításával, a múlt században elkezdődött és a világ színvonalává vált magyarországi NMR kutatás origójának tekinthető. A leírt módszer lényege a kisterű, kislebontású mágneses rezonancia készülék kreatív alkalmazása, a vízmolekulák olvadásának érzékelésére. A jelölt ezt a módszert fehérjeoldatok elemzésére alkalmazta, követve a teljesen lefagyasztott oldat melegítése során a megolvadó, különböző állapotú kötött vízmolekulák megjelenését. Ezek fáziskénti olvadáspontja (illetve az abból származtatott aktiválási energia) attól függ, hogy milyen kölcsönhatásban vannak a fehérjékkel, ami a fehérjék a tömbfázissal érintkező részeinek kémiai szerkezetéről ad információt.

Az eredmények értékelésére bevezette a *normalizált fundamentális hőmérsékletet*, illetve azt a potenciális energiagátat, amelynél nagyobb termikus energiára van szükség ahhoz, hogy a vízmolekulák „folyadékszerű”, azaz NMR-rel detektálható állapotba kerüljenek. A kapott oladási görbét hatványsorral jellemezte, illetve alapvető fogalmakat definiált a jelenség jellemzésére, úgymint a *heterogénen kötő „határfelület” aránya*, $(HeR=(1-T_{fn1})/(1-T_{fn0}))$ Ha az első vízszintes szakasz hosszú, akkor a felület inkább homogén, *HeR* tart zérushoz. A *HeR* =1 amikor teljesen heterogén, azaz *T_{fn1}* és *T_{fn2}* egyenlő. Ez lehet szerkezeti rendezetlenség fokmérője) a *heterogén*

fehérje–víz kötések számaránya, (HeR_n a heterogén környezetben lévő vízmolekulák moláris törtje $n_{he}/n_{első\ hidráthéj}$) és a *heterogenitásmérték* (a hidratációs víz mennyiségének növekedési sebessége). Ezek segítségével értelmezte, kvantitatívan jellemezte a rendezetlen fehérjék oldószerrel érintkező részeinek arányát és a víz-fehérje kötések energiaviszonyait.

A leírt megoldásokkal a következő eredményeket érte el:

- NMR relaxometriás módszert dolgozott ki a fehérjék hidratációjának elemzésére, az olvadásgörbék értelmezésére, amelyek lehetővé tették a másodlagos és harmadlagos fehérje szerkezetek dinamikai jellemzését.
- Az α -szinuklein természetes (natív) és mutáns típusainak, valamint a β 4-timozin, a stabilin-2 citoplazmadomén és a β 4-timozin–stabilin-2 citoplazmadomén komplex olvadásgörbéi alapján a hidratációs víz kötéseinek mennyiségi és minőségi viszonyait elemezte és jellemezte.
- Kimutatta, hogy az aggregátumok és a fehérje komplexek hidratációs viszonyai nem adhatók meg a monomerek illetve a komponensek egyedi olvadási görbéinek kombinálásával.
- Különbséget tudott kimutatni a hidrogén kötések és a Van der Waals kötések között, aszerint, hogy az olvadásgörbén lépcsős vagy lineárisan emelkedő szakaszok vannak. Ezeket a jellegzetességeket minden vizsgált rendszeren ki tudta mutatni.
- A legkisebb hőmérsékleteken megjelenő, (így a legkisebb termikus energiagát átlépésekor) megmozduló vízmolekula hányad a monomerek esetében a lehetséges összes hidrogénkötést megmutatja. Az amiloidokban NMR-rejtett vízmolekulákat mutatott ki, míg az oligomerek esetében a fehérje oldalláncok dinamikájára tudott következtetni.
- Az olvadásgörbék elemzése azt mutatta, hogy az α -szinuklein oligomerek felszíne alapvetően egységes, és a rájuk jellemző olvadási szakasz nem utal különböző méretű oligomerek jelenlétére, az irodalmi vélekedésektől eltérően.
- A képződő különböző típusú aggregátumokra a β - redő jellemző, amelyek aminosavai már nem hozzáférhetők a vízmolekulák számára. Mennyiségeik a hidratáló vízmolekulák közel felének megkötéséhez szükséges kötési lehetőségeit foglalják el.
- Az α -szinuklein amiloidok esetében a rendezetlen és a rendezett részeket azonosította, mint vízzel kölcsönható, illetve β - redőket alkotó részeket.
- Bizonyította a β 4-timozin–stabilin-2 citoplazma-domén fehérjekomplex megvalósulását, a komponensekben és a komplexben lévő mozgékony hidratációs víz mennyiségének mérése alapján. Meghatározta a komplexet kialakító kötések számát. Megállapította ennek alapján, hogy a komplexben nincsenek az egyes aminosav láncoknak nem aktív hidrogénkötőhelyei.

Illetve azt is kimutatta, hogy a komplexképződés rendezetlenség növekedéssel jár, ami azt jelenti, hogy a kialakuló komplex tisztán ún. „fuzzy” (bolyhos felszínű) komplex.

- Az eredmények a molekuláris diagnosztika és terápia számára értékes adatokkal szolgálnak, a már meglévő eredmények és az ezeken alapuló további kutatások gyakorlati haszonnal kecsegtetnek.

A megírt értekezés sajátos szerkezetű. Két III. pontot is tartalmaz, ami valószínűleg elírás eredménye már a tartalomjegyzékben. A *Bevezetés* és a *Tudományos előzmények* számomra igen érdekesek voltak, lévén nagyon kevésbé vagyok járatos a fehérjék tudományában. A II. C pontban többet vártam a „wide type” NMR (számomra rokonszenvesebb NMR relaxometria) értelmezéséről. Ezt kissé később a jelölt a IV./B pontban pótolta. Nem tartom szerencsésnek ezt az elválasztást. Arról nem is beszélve, hogy erre visszatér a „másik” III. fejezet A rész I. és II. pontjában. Itt jegyzem meg, hogy római számok és betűk helyett az arab számok jobb szerkezeti áttekintést tettek volna lehetővé. Összességében megállapítom, hogy egy utolsó átnézés ezeket a nem tartalmi hiányosságokat kiderítette volna.

Az előbb említett résznél merült fel bennem, hogy a módszer kísértetiesen emlékeztet az NMR kriporozimetriára, amelyet J.H. Strange és munkatársai írtak le először ilyen néven (1993) illetve hasonló elvek alapján vizsgáldtak többben a múlt század 80-as éveiben. A módszer adaptálása kifelébontású NMR-re, kihasználva, hogy csak a vízmolekulákat detektáljuk, és a kémiai rendszer kiválasztása azonban rendkívüli kreativitás eredménye. Nagyon jónak ítélem meg a kiértékelést, illetve az olvadásgörbék energiaprofilla alakítását, ami egyedi értelmezést tett lehetővé, szemléletes dinamikus paraméterek megteremtésével.

Az NMR eredményekből adódó kémiai következtetéseket, amelyet a szerző a téziseiben foglalt össze új eredmények tartom, és a tézispontokat ilyennek elfogadom.

A dolgozat magyar nyelven íródott, esetenként túlzott törekvés volt benne az idegen szakszavak magyar fordítására. Ez néha értelmezési zavart okozott a lelkes olvasónak. Ennek egyik példája az „időtartományú” NMR (time domain NMR), ami helyett használnám a relaxometria kifejezést.

Néhány a fogalmazással kapcsolatos megjegyzés:

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

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

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

20oldal: eddig jórészt a felszín szót használta a fehérje tömbfázissal érintkező részére, de itt megjelenik a felület szó. Ez fizikai-kémiai értelemben helytelen.

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

33. o. 8. sor Nagyon nehézkes mondat. A mágnesek nem eredményeznek frekvenciákat. **A kis mágneses térű és a széles jelű NMR szinonima? Miért?**

34. 2. bek. Nem hiszem, hogy „megérdemlik” a rendezetlen fehérjék a külön kategóriát, de hogy hasznos a besorolás abban biztos vagyok.

Ugyanitt: **a relaxációs ráta a T_1/T_2 arányt jelenti?** (Ugyanitt aktivációs energia helyett aktiválási energia írandó.) **Hogyan kapcsolódik ehhez az arányhoz az aktiválási energia? Milyen következtetést lehet levonni az arányból?**

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

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?**

41. o. **Mit jelen a 10^{-6} rész a stabilitásban, illetve a 2 ppm a tér az inhomogenitásában?**

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

Mi az elméleti alapja a fid Gauss függvények összegével való illesztésnek a nulla időre való extrapoláció esetén? Mi az előnye a fid jelek észlelésének a CPMG módszerrel mért ekhó intenzitások megfigyelése helyett? Vagy az semmiképpen nem alternatíva?

A 46. oldalon „*a jégfázisban lévő hidrogénatomok keskeny időskálájú ^1H -jele (fidje) a spektrométer holtidejébe esik*” mondat töredék nagyon bonyolult megfogalmazása a gyors relaxációnak. A szabad indukciós lecsengés négy szakaszának magyarázata a 46. oldalon meglehetősen illetlenség úgy, hogy a hozzátartozó ábra valahol az 50. oldalon van. A gyors relaxáció körülírása „*Ha a mintát fagyáspont alá hűtjük, akkor növekvő mennyiségben van jelen és NMR-jele a spektrométer holtidejében elvesző gyors lecsengéssel jellemzett.*” mondattal sem lett közérthetőbb.

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

Mit ért magspinpolarizáció bomlásán? (47. o. utolsó bek.). A 48. oldalon írja, hogy a fáziskoherencia elvesztése „energiaátadással” jár. **Kérem, ismertesse ennek részletes magyarázatát!**

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

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

$$naa = \frac{m_{\text{víz}} M_{\text{r}}^{\text{fehérje}}}{m_{\text{fehérje}} M_{\text{r}}^{\text{víz}}}$$

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

A 60. oldalon szereplő megállapítás magyarázatát kérem, **azaz milyen termodinamikai szempontból különbözőek az egyes α -szinuklein pontmutációk?** Az azt követő mondatban az „adtuk meg”-nek kell szerepelni. **Itt kérdezem meg, hogy a vad típusú fehérje azonos a természetes vagy natív fehérjével?**

Az értekezés nehéz olvasmány, de tetszik a fehérjék jellemzése az olvadási diagramok alapján. Azt gondolom ennek tudományos újdonsága és eredetisége nehezen vitatható. Még ha időnként olyan mondatokba akad bele az olvasó, hogy „*Minél gyengébben hat kölcsön egy adott fehérje a vízzel, annál lazábbak a fehérje–víz kötési.*”(63. o. Ilyenkor jut eszébe az olvasónak, hogy „ki gondolta volna!”)

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).* Azon túl, hogy a mondat nem tudható minek a folytatása, arra is kíváncsi vagyok, hogy **mit jelent a ”konzekvens viszony” két diagram között?**

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

A 85. oldal első bekezdésében áttér a jelen idejű igék használatára. Tudjuk, hogy a magyar nyelvben ez bizonyos szöveggörnyezetben jövő időt jelent (pl. megírom a bírálatot, az azt jelenti többnyire, hogy még el sem kezdtem írni). A 26. ábra azt mutatja, hogy ezeket az eredményeket már elérték, sőt közölték színvonalas folyóiratokban. Azaz a múlt idő használata kellett volna.

A 100. oldalon kezdődő összefoglalás második mondata nyelvtanilag helytelen.

A felsoroltak elsősorban formai szempontból tettek kevésbé jó benyomást rám. Az értekezésben leírt eredmények a fehérje és közeg kölcsönhatásában új megközelítést hoztak. Mivel nem vagyok fehérjét kutató kémikus, de ismerek többeket, akik ezzel foglalkoznak, az utolsó kérdésem:

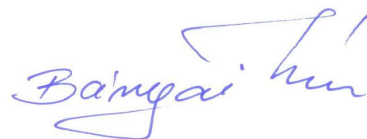
Foglalja össze néhány mondatban, mik azok az eredmények, amiket más módszerrel nem lehetett elérni?

A dolgozat színvonalát jelentősen emelte volna, ha az ábrák színekkel lettek volna ellátva, az eredmények értékelésénél ábrák és kémiai képletek illusztrálták volna a monoton verbális leírást. Az ábrák aláírásai hol oldalt, hol alul, hol felül vannak, ezt egységesíteni kellett volna. Az értekezés szerkezete sem nyerte el tetszésem, az NMR relaxometria elméletének és értékelésének leírása el van szórva több fejezetben. Sokkal jobb lett volna ezt egy fejezetbe írni és ábrákkal bemutatni.

Összességében az elért tudományos eredményeket két részre osztom. A kisterű NMR relaxometria alkalmazása rendkívül kreatív módon történt. Nagyon tetszett a megvalósítás, illetve az egyedi paraméterek megteremtése. Remélem, hogy ez előbb-utóbb széles körben alkalmazásra kerül, például az NMR krioporozimetria területén is. A fehérjékkel kapcsolatos eredmények számomra, aki nem jártas a biokémiában meggyőzőek voltak, ellensúlyozták az értekezés az előzőekben leírt hiányosságait. Bízom benne, hogy erről a részből a másik két értékelésben több segítséget kap.

A jelölt publikációs tevékenysége megfelel az akadémiai doktori cím feltételeinek, amit az MTA Doktori Tanácsa igazolt. Ebben nem nyilvánítok véleményt. A leírtak alapján az értekezést nyilvános vitára alkalmasnak találom és javaslom annak kitűzését.

Debrecen, 2026. január 24.



Bányai István
Az MTA doktora