Válasz Kellermayer Miklós professzor úr bírálatára

Köszönöm Kellermayer Miklós professzor úrnak az értekezés gondos olvasását, kritikai megjegyzéseit és a dolgozat egészére vonatkozó elismerő értékelését. Az alábbiakban röviden reagálok az általános megjegyzésekre.

1. Nyelvezet, rövidítések, tipográfiai és helyesírási problémák

Köszönöm az észrevételeket. Egyetértek azzal, hogy a dolgozat olvashatóságát helyenként rontja a nagyszámú rövidítés, néhány szerencsétlenül magyarosított vagy nem kellően pontos szakkifejezés, valamint több tipográfiai és helyesírási következetlenség. Ezek részben abból is adódtak, hogy az értekezés mintegy másfél évtized, eltérő időpontokban és részben eltérő terminológiával készült munkáinak egységes összefoglalására vállalkozott, de ez természetesen nem mentesít a következetes nyelvhasználat követelménye alól.

2. A Célkitűzések fejezet hiánya

Professzor úrnak maximálisan igazat adok abban, hogy az értekezésből formálisan hiányzik az önálló Célkitűzések fejezet. Ugyanakkor a kutatási céljaim tartalmilag szerepelnek az értekezésben, elsősorban a Bevezetés 7. oldalán, a fejezet végén. Ott három fő területet jelöltem meg: (i) a természetes peptidrendszerek magasabb szintű szerveződésének vizsgálatát, (ii) a természetes peptidek homológjainak tekintett β-peptidek ön- és más molekulákkal történő „társ-szerveződésének" feltárását, valamint (iii) az egzotikusabb, nem természetes peptidrendszerek és asszociátumaik jobb megértését. Ehhez közvetlenül kapcsolódóan az alkalmazási irányt is megfogalmaztam: a szerkezeti ismeretek bővítése mellett a vizsgálatok antimikrobiális peptidekre, illetve olyan konstrukciókra fókuszálnak, amelyekből új, makroszkopikus antimikrobiális rendszerek alakíthatók ki. Mindezeket az olvasmányosabb értekezés igényével fogalmaztam, és ilyen formán a célok ismertetése tartalmilag megtörtént, de ismét megerősítem: a megjegyzést formai szempontból teljes mértékben elfogadom.

3. A fejezeteket bevezető személyes idézetek és a „csattanó"

Köszönöm a megjegyzést, és külön örülök annak, hogy az idézetek felkeltették Professzor úr érdeklődését. Az idézetek ötlete azért maradt meg a dolgozat végleges változatában, mert nemcsak saját emlékeimet idézték fel a munka áttekintésekor, hanem reményeim szerint a szűk szakmai közösségen túl is közelebb hozzák a kutatók mindennapjait.
Ezeknek valóban van egy közös gondolati háttere, bár ezt az értekezésben nem tettem kellően explicitté. A Bevezetésben röviden utaltam arra, hogy a dolgozat számos kutató mintegy másfél évtizedes közös munkáját foglalja össze, és az idézetekkel ennek a közös munkának néhány számomra emlékezetes pillanatát próbáltam megőrizni.
A tudományos eredmények letisztult, logikus írásbeli vagy előadásbeli bemutatása mögött sokszor esetlegesnek vagy akár humorosnak tűnő beszélgetések, zsákutcák, kételyek, spontán ötletek és munkatársak közötti párbeszédek-konfliktusok, szakmai frusztrációk tömkelege áll, mely a munkánkat sokkal emberibb megvilágításba teszi, ami véleményem szerint nem szégyenleni való. Nyilvánvaló, hogy ezt a legtöbb kutató pontosan tudja, de aki nem kutató, honnan ismerhetné? Természetesen helyénvaló lehet a kérdés, hogy vajon csak a szűk szakmai közösségnek kell címeznünk egy százhúsz oldalas anyagot, közben arra gondolva, hogy azt aztán csak maroknyi szakember lapozza fel?

4. Aggregáció, asszociáció és a kapcsolódó fogalmak

Egyértelműsítés, vagy akár egy fogalomjegyzék igen hasznos lett volna. Egyetértek azzal, hogy az alkalmazott terminológia szélesebb annál a kettősségnél, amelyet az aggregáció és asszociáció kapcsán

tárgyaltam. Az oligomerizáció, polimerizáció és más magasabb rendű szerveződési folyamatok pontosabb elhatárolása, illetve egy rövid fogalomjegyzék valóban javította volna az értekezés egyértelműségét.
A terminológiai nehézség részben abból ered, hogy az általunk vizsgált rendszerek több szerveződési szintet járnak be, és ezek molekuláris rendezettsége nem minden esetben ismert azonos felbontásban. Ezért a dolgozatban az „aggregátum" és „asszociátum" kifejezéseket helyenként pragmatikusan, részben szinonimaként alkalmaztam. Elfogadom azonban a Bíráló észrevételét, miszerint szigorúbb terminológiai elkülönítés és fogalomjegyzék pontosabbá tette volna a szöveget. Erre tettem is egy kísérletet a 13–14. oldalon, azonban hozzá kell tennünk, hogy a terület még nem kiforrott, több kifejezést az angol szakirodalomban is csoportunk kezdett el alkalmazni, mivel nem volt megfelelő kategória a vizsgált szerveződésekre.

5. Hiányzó magyarázó információk, például a 46–47. ábra nyilai

Egyetértek a megjegyzéssel. Bár az értekezés terjedelmének korlátozása miatt a publikációkban szereplő részletek egy részét tudatosan elhagytam, ez nem történhetett volna a bemutatott ábrák önálló értelmezhetőségének rovására. A 46–47. ábrán látható nyilak a kialakult, vagy kialakulóban levő lamellákra mutatnak a baktérium külső membránján, de ezt explicite meg kellett volna említeni az ábra feliratában.

6. „Fluoreszcens" spektroszkópia és mikroszkópia

Köszönöm a pontosítást, amellyel egyetértek.

Válaszaim a feltett kérdésekre:

1. *„Fehérjék szerkezeti stabilitásának vizsgálatában bevett módszer a denaturáció (ureával, guanidinkloriddal, hővel, vagy utóbbi években mechanikai erővel). Ezek a módszerek mennyire használtak szintetikus peptidek szerkezeti analízisében?"*

Köszönöm a kérdést. A denaturációs módszerek szintetikus peptideknél is alkalmazhatók, de jelentőségük és az általuk nyerhető információ némileg eltér a globuláris fehérjéknél megszokottól. Ennek fő oka, hogy sok rövid, szintetikus peptidnek nincs egyetlen jól definiált natív állapota. Ugyanakkor számos irodalmi példa ismert a peptidek hőfüggő szerkezeti vizsgálatára, köztük magyar kutatócsoportok CD-, NMR- és egyéb spektroszkópiai munkái is. (Például a Farkas Viktor és Perczel András csoportjaiban végzett konformációs vizsgálatok, valamint Kellermayer Miklós, Penke Botond és munkatársaik amiloid-β-peptidrostokon végzett AFM-mérései.) A fibrilláris peptidrendszerek szerkezeti és nanomechanikai jellemzésében tehát az AFM különösen hasznos módszer.
Rövid peptideknél a kísérleteket érdemes lehet molekuláris szimulációkkal kiegészíteni. Saját elméleti munkáinkban a β-redőzött szerkezetek kényszerített kitekeredését és a szerkezeti víz szerepét vizsgáltuk (Beke-Somfai és Perczel, 2010; Papp és mtsai, 2021). E példák megmutatják, hogy a vízmolekulák helyzete a stabilitást és a mechanikai válasz jellegét is befolyásolhatja.
A kémiai denaturációt okozó szerek, így az urea és a guanidínium-klorid is használhatóak peptideknél. Ennek szép klasszikus példái Scholtz, Baldwin és munkatársaik vizsgálatai, melyben különböző hosszúságú helikális peptidsorozaton közvetlenül vizsgálták az urea által kiváltott széttekeredést, kifejezetten azon céllal, hogy modellezzék és jobban megértsék fehérjék urea-denaturációját. Ehhez nagyon hasonló módon guanidinium-klorid hatását is vizsgálták, és kimutatták többek között, hogy a GdmCl hatásában a denaturáló és az ionerősségből eredő komponenseket is figyelembe kell venni. A fehérjékkel ellentétben azonban peptidek esetében a denaturáló szer nem feltétlenül egyszerűen egy „feltekeredett → rendezetlen" átmenetet hoz létre. Megváltoztathatja a hidrogénkötéseket, a hidrofób és elektrosztatikus kölcsönhatásokat, illetve az intermolekuláris asszociációt is, mely akár meglepő

eredményre is vezethet. Itt az egyik saját tanulmányunkat hoznám példaként (Nagaraj és mtsai ACS Applied Materials & Interfaces, 2022), melyben a GdmCl alkalmazása nem denaturációhoz, hanem éppen egy különleges nanoméretű morfológiába történő szerveződéshez vezetett nagyon rövid peptidek esetében. Természetesen azért, mert itt a guanidiniumion nagy valószínűséggel pozitív töltésével rendezte össze a rövid negatív töltésű GLFD motívumot.
Összességében tehát a klasszikus denaturációs módszerek peptidekre is jól alkalmazhatók, és ennek komoly irodalmi előzménye van. Rövid, önszerveződő peptideknél azonban sokszor nem egy klasszikus „feltekeredett → rendezetlen" átmenetet mérünk, hiszen itt a tulajdonképpeni konformációs és asszociációs szabadenergia-felszín átrendeződése miatt egészen más típusú jelenségek is megfigyelhetőek lesznek. A dolgozat példái talán közvetlenül nem kapcsolódnak ide, viszont a részletezett példákban is megfigyelhető a hasonló szerkezeti preferencia és az ebből fakadó egyensúly eltolódása biológiailag releváns perturbációk – kis molekulák, membránok és más molekuláris partnerek – hatására.

Kapcsolódó irodalom:

Scholtz, J. M. és Baldwin, R. L. (1992). The mechanism of alpha-helix formation by peptides. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 21, 95–118.

Scholtz, J. M. és mtsai (1995). Urea unfolding of peptide helices as a model for interpreting protein unfolding. PNAS, 92, 185–189. DOI: 10.1073/pnas.92.1.185.

Smith, J. S. és Scholtz, J. M. (1996). Guanidine hydrochloride unfolding of peptide helices: separation of denaturant and salt effects. Biochemistry, 35, 7292–7297. DOI: 10.1021/bi960341i.

Hughes, M. L. és Dougan, L. (2016). The physics of pulling polyproteins: a review of single molecule force spectroscopy using the AFM to study protein unfolding. Reports on Progress in Physics, 79, 076601. DOI: 10.1088/0034-4885/79/7/076601.

Kellermayer, M. S. Z. és mtsai (2008). Stepwise dynamics of epitaxially growing single amyloid fibrils. PNAS, 105, 141–144. DOI: 10.1073/pnas.0704305105.

Beke-Somfai, T. és Perczel, A. (2010). Zipper-like unfolding of β-sheets accessed by pioneer water molecules. Journal of Physical Chemistry Letters, 1, 1341–1345. DOI: 10.1021/jz100311n.

Papp, D. és mtsai (2021). Structural water stabilizes protein motifs in liquid protein phase. International Journal of Molecular Sciences, 22, 8595. DOI: 10.3390/ijms22168595.

Nagaraj, V. U. és mtsai (2022). Stimuli-responsive membrane anchor peptide nanofoils for tunable membrane association and lipid bilayer fusion. ACS Applied Materials & Interfaces, 14. DOI: 10.1021/acsami.2c11946.

2. *A 16. oldalon szóba kerül a peptidek farmakológiai eliminációja, ami β-peptidek esetén különösen érdekes. A nem természetes aminosavakból álló peptidek vagy fehérjék pontosan milyen mechanizmussal kerülnek eltávolításra a szervezetből? Léteznek olyan proteázok, amelyek hasítják ezeket?*

Köszönöm a kérdést. A β-aminosavakat tartalmazó peptidek egyik fontos és jól dokumentált tulajdonsága a természetes α-peptidekhez képest jelentősen megnövekedett proteolitikus stabilitás. Ennek szerkezeti alapja, hogy a β-aminosavak gerincében egy további metiléncsoport található, így a peptidkötések és az oldalláncok térbeli elrendezése eltér a természetes α-peptidekétől. A klasszikus proteázok kötőhelyei és katalitikus geometriája viszont alapvetően α-peptid szubsztrátokra alakult ki.
Ennek egyik legmeggyőzőbb demonstrációja Frackenpohl, Arvidsson, Schreiber és Seebach klasszikus vizsgálata: 36 különböző β- és γ-peptidet 15 különböző proteolitikus enzimmel, köztük humán eritrocita 20S proteaszómával vizsgáltak. Míg a kontroll α-peptid 15 percen belül teljesen hasadt, a β- és γ-peptidek legalább 48 órán keresztül stabilak maradtak. Későbbi vizsgálatokban β-peptidek tripszinnel, elasztázzal és humán szérumban is jelentős proteolitikus rezisztenciát mutattak.
Ugyanakkor a proteázrezisztencia nem azonos a farmakokinetikai stabilitással vagy a szervezetből történő eliminációval, mely területeken azonban nincsenek részletes ismereteim. Egy β-peptid attól, hogy nem vagy csak lassan hasad a szokásos proteázok hatására, még eltűnhet a vérkeringésből szöveti felvétel, eloszlás és kiválasztás révén. Kis, vízoldható molekulák esetében a renális elimináció potenciálisan fontos út lehet, de ennek jelentősége erősen függ a konkrét peptid méretétől, töltésétől,

fehérjekötődésétől és egyéb fizikai-kémiai tulajdonságaitól. Ezért nem lehet általánosan azt mondani, hogy a β-peptidek egy meghatározott mechanizmussal eliminálódnak; ezt az adott vegyület farmakokinetikai vizsgálatával kell meghatározni.
A korai Seebach-irodalomban már in vivo farmakokinetikai adatok is találhatók. A vizsgált β-peptideknél többórás eliminációs felezési időket írtak le rágcsálókban, miközben a β-peptidek jelentős proteázrezisztenciát mutattak. Ez jól példázza, hogy a proteolitikus felezési idő és az in vivo eliminációs felezési idő két különböző paraméter.
A professzor úr második kérdésére, hogy léteznek-e egyáltalán β-peptideket hasító enzimek, a válasz egyértelműen igen. Különösen érdekesek a bakteriális β-peptidil-aminopeptidázok, például a BapA és a DmpA. Ezek képesek az N-terminális β-aminosavak hidrolitikus eltávolítására β-, illetve kevert α/β-peptidekből. A BapA szerkezetét is meghatározták, és kimutatták, hogy az N-terminális nukleofil hidrolázok DmpA-szerű családjába tartozik.
Ez azért különösen érdekes, mert megmutatja, hogy a β-peptidkötés nem „lebonthatatlan". Sokkal inkább arról van szó, hogy a természetes α-peptidek hasítására kialakult általános proteázrendszer rosszul ismeri fel ezeket a szubsztrátokat. Megfelelően adaptálódott enzimek azonban képesek a hidrolízisükre. Az erre vonatkozó irodalom szerint az első ilyen β-peptid-bontó enzimeket olyan Gram-negatív baktériumokból izolálták, amelyek β-peptideket képesek hasznosítani.
Érdekes újabb árnyalat, hogy még humán enzimeknél sem feltétlenül abszolút a rezisztencia. Kimutatták például, hogy a humán DPP-4 (*dipeptidil-peptidáz IV)* bizonyos α/β-peptidkötéseket képes hasítani, bár a β-aminosav beépítése jelentősen módosíthatja a hasítás sebességét és növelheti a felezési időt. Ezért ma már pontosabb azt mondani, hogy a β-aminosavak beépítése jelentősen növeli a proteolitikus stabilitást, mint azt, hogy általánosan teljes proteázrezisztenciát eredményez.
Farmakológiai szempontból ennek van egy fontos kettőssége. A fokozott proteolitikus stabilitás előny, mert növelheti a peptid biológiai közegben való élettartamát és biohasznosulását. Ugyanez azonban potenciális hátrány is lehet, ha a vegyület vagy metabolitjai lassan eliminálódnak vagy akkumulálódnak. Ezért egy gyógyszerfejlesztési célú β-peptid esetében a szérum- vagy proteázstabilitás önmagában nem elegendő: külön ADME-vizsgálatok szükségesek a szöveti eloszlás, metabolizmus, kiválasztás és a keletkező metabolitok meghatározására.
A dolgozatban vizsgált β-peptidek esetében ilyen in vivo farmakokinetikai vagy ADME-vizsgálatokat nem végeztünk, ezért ezek pontos eliminációs útjáról a saját eredményeink alapján nem tudok állítást tenni. Ez egy esetleges későbbi gyógyszerfejlesztési programban külön vizsgálandó kérdés.

Kapcsolódó irodalom:

Frackenpohl J, Arvidsson PI, Schreiber JV, Seebach D. (2001). *The outstanding biological stability of β- and γ-peptides toward proteolytic enzymes: an in vitro investigation with fifteen peptidases.* ChemBioChem 2, 445–455.

Hook DF et al. (2005). *The proteolytic stability of 'designed' β-peptides containing α-peptide-bond mimics and of mixed α,β-peptides.* Chemistry & Biodiversity 2, 591–632.

Heck T et al. (2006). *Enzymatic degradation of β- and mixed α,β-oligopeptides.* Chemistry & Biodiversity 3, 1325–1348.

Geueke B, Kohler H-PE. (2007). Bacterial β-peptidyl aminopeptidases: on the hydrolytic degradation of β-peptides. Applied Microbiology and Biotechnology 74, 1197–1204.

1. *„Vajon az evolúció miért az α-aminosavakat preferálta/szelektálta a ma ismert biológiai peptidek/fehérjék felépítésében?"*

Köszönöm, a kérdés abszolút jogos, és a megnyugtató válasz hiánya számomra régóta rendkívül frusztráló. Olyannyira, hogy már a PhD-dolgozatom bevezetésében is külön részt szenteltem ennek a problémának.
Az 1953-ban publikált híres Miller-kísérletben nemcsak α-, hanem β-aminosavak is keletkeztek (β-Ala), így prebiotikus hozzáférhetőségük alapján akár ezek is az élet építőkövei lehettek volna. A kísérletet azóta számos változatban megismételték és újraértékelték, de az általam vizsgált tanulmányokban rendre megjelentek β-aminosavak is (β-Ala, β-Abu, β-Aib).
Roppant érdekes probléma, amelyre remélhetőleg egyszer megfelelő választ találunk. Úgy gondolom, hogy a mai élet molekuláris apparátusa rendkívül összetett, és elvileg egyszerűbb, akár β-aminosavakra épülő funkcionális rendszerek is elképzelhetők. Szintetikus módszerekkel ma már egyre közelebb

kerülhetünk ilyen rendszerek megalkotásához, de ezen a területen komoly ellentmondások is megfogalmazhatók.

A tudományos magyarázatot illetően három tényezőt tartok érdekesnek.
Az első a prebiotikus hozzáférhetőség, amely nem indokolja az α-aminosavak kizárólagosságát. A fentebb említett previotikus keletkezés mellett az aminosavak egy része akár földön kívüli eredetű is lehetett: a Murchison-meteoriton β-alanint, az Ivuna és Orgueil meteoritokban pedig további β-aminosavakat is azonosítottak (Engel és Macko, 1997; Ehrenfreund és mtsai, 2001). Ekkoriban ~10^6 tonna meteorit eshetett átlagosan Földünkre, ami megerősíti, hogy az α- és β-aminosavak több forrásból, egyaránt rendelkezésre állhattak az élet kialakulásakor.
A második, számomra különösen érdekes tényező a peptidgerincek eltérő szerkezeti tulajdonsága. Az α-peptidgerinc kedvező egyensúlyt teremthet a konformációs szabadság és a szerkezeti rendezettség és diverzitás között: kellően rugalmas változatos funkcionális szerkezetek kialakításához, miközben viszonylag korlátozott konformációs teret biztosít. Saját korábbi konformációs vizsgálataink rámutattak a β-peptidek jelentős szerkezeti rugalmasságára és az ebből levezethető szűkre szabott másodlagos szerkezeti változatosságra (Beke és mtsai, 2004). A β-peptidek további gerincbeli rotációs szabadsági fokuk ellenére stabil másodlagos és szupramolekuláris szerkezeteket, például nanocsöveket is kialakíthatnak. Elképzelhető tehát, hogy a korai evolúció során nem a nagyobb konstitúciós változatosság, hanem a másodlagos szerkezetek sokfélesége és a reprodukálható feltekeredés közötti kompromisszum jelentett előnyt. Ez természetesen egyelőre hipotézis.
A harmadik tényező az evolúciós rögzülés: miután a genetikai kód és a transzlációs apparátus az α-aminosavakra épült, egy másik gerinckémiára való áttérés rendkívül nehézzé válhatott.
Összességében tehát nem gondolom, hogy az α-aminosavak kizárólagossága kémiai szükségszerűség lenne. Inkább a prebiotikus hozzáférhetőség, a peptidgerincek eltérő szerkezeti tulajdonságai és a korai evolúció történeti esetlegességeinek együttes hatását tartom valószínűnek. A β-peptidekkel végzett kutatásaink éppen azt demonstrálják, hogy a funkcionális molekuláris szerveződésnek más lehetséges útjai is vannak.

Kapcsolódó irodalom:

Miller, S. L. (1953). A production of amino acids under possible primitive Earth conditions. Science, 117, 528–529. DOI: 10.1126/science.117.3046.528.

Engel, M. H. és Macko, S. A. (1997). Isotopic evidence for extraterrestrial non-racemic amino acids in the Murchison meteorite. Nature, 389, 265–268.

Ehrenfreund, P. és mtsai (2001). Extraterrestrial amino acids in Orgueil and Ivuna: tracing the parent body of CI type carbonaceous chondrites. PNAS, 98, 2138–2141.

Beke, T., Csizmadia, I. G. és Perczel, A. (2004). On the flexibility of β-peptides. Journal of Computational Chemistry, 25, 285–307. DOI: 10.1002/jcc.10357.

4. *„A királis, helikális szupramolekuláris rendszerek vizsgálatában, amellyel a jelölt is behatóan foglalkozik (lásd 44-47. oldal), hasznos módszer a másodharmonikus generációs (second harmonic generation, SHG) mikroszkópia, amely jelölésmentes szerkezeti vizsgálatokat tesz lehetővé. Van-e precedens ilyen módszer alkalmazására a helikális AMP-k esetén?"*

Köszönöm a kérdést. A másodharmonikus-keltési mikroszkópia (SHG) valóban ígéretes, jelölésmentes módszer királis, rendezett szupramolekuláris rendszerek vizsgálatára. Helikális antimikrobiális peptideknél ugyan rálátásom szerint nem rutinszerűen alkalmazott technika, de több releváns előzménye ismert. Elöljáróban szeretném megjegyezni, hogy sem az SHG, sem a rokon SFG (Sum-Frequency Generation spectroscopy, összegfrekvencia-keltési spektroszkópia) módszernek nem vagyok szakértője, így az alábbiakat elsősorban a szakirodalom és saját együttműködéseink alapján foglalom össze.
Közelebbi antimikrobiális példa a mycosubtilin, egy ciklikus lipopeptid. Nasir és munkatársai SHG-vel vizsgálták kölcsönhatását membránmodellező lipid monorétegekkel, a tirozinoldalláncot használva optikai jeladóként. Később a mycosubtilin, az iturin A és a bacillomycin D SHG-válaszát is

összehasonlították, kimutatva a tirozin lokális környezetének jelentőségét. Ezek a vizsgálatok elsősorban a határfelületi kölcsönhatásokról és orientációról, nem közvetlenül a helikális másodlagos szerkezetről adtak információt.
A helikális szerkezet szempontjából releváns Mitchell és munkatársainak vizsgálata, amelyben α-helikális poliglutamát-származékok optikai aktivitását mutatták ki SHG-vel a levegő–víz határfelületen. További kapcsolódó példák a membránhatárfelületeken vizsgált, triptofánban gazdag peptidek, köztük a HIV gp41 helikális szakaszai, bár ezek vizsgálatában más határfelületi spektroszkópiai módszereket is alkalmaztak.
Saját kutatásainkban elsősorban azért nem alkalmaztunk SHG-mikroszkópiát, mert kérdéseinkhez a CD, LD, valamint az elektron- és atomerő-mikroszkópia hozzáférhetőbb volt és közvetlenebb információt nyújtott. Az SHG-jel értelmezése emellett körültekintést igényel, mivel erősségét a molekuláris szerkezet mellett a rendezettség, a szimmetria és az orientáció is befolyásolja.
Ugyanakkor Xiaolin Lu professzor csoportjával közös munkáinkban alkalmaztunk összegfrekvencia-keltési spektroszkópiát (SFG). Egyik tanulmányunkban a foszfolipáz A1 határfelületi működését, másikban egy polimer gyógyszermodell membránkölcsönhatását vizsgáltuk SFG, illetve kiegészítő módszerek segítségével. Az SHG és az SFG rokon másodrendű nemlineáris optikai technikák, de eltérő szerkezeti információt szolgáltatnak.
Saját rendszereinkben a SHG-t elsősorban a rendezett peptidaggregátumok, különösen a lamellinek vizsgálatában tartanám ígéretesnek. Polarizációfüggő SHG-mikroszkópiával követhető lehetne a szupramolekuláris rendezettség és orientáció térbeli eloszlása, illetve változása a bakteriális membránnal való kölcsönhatás során. A CM15–suramin aggregátumoknál pedig a membrán által kiváltott szerkezeti átrendeződés vizsgálata lehetne érdekes.

Kapcsolódó irodalom:

Nasir, M. N. és mtsai (2012): *Second Harmonic Generation to Monitor the Interactions of the Antimicrobial Mycosubtilin with Membrane-Mimicking Interfacial Monolayers.* BioNanoScience, 2, 108–112. DOI: 10.1007/s12668-012-0037-6.

Influence of the Tyrosine Environment on the Second Harmonic Generation of Iturinic Antimicrobial Lipopeptides at the Air–Water Interface. (2013). PMID: 24149982.

Mitchell, S. A. és mtsai (2005): *Second-harmonic generation optical activity of a polypeptide α-helix at the air/water interface.* Journal of Chemical Physics, 122, 114707. DOI: 10.1063/1.1862613.

Interfacial Properties and Structure Stability of the gp41 Tryptophan-Rich Peptide from HIV-1. (2010). PMID: 20850757.

Wang, F. és mtsai (2019): *Revealing Interfacial Lipid Hydrolysis Catalyzed by Phospholipase A1 at Molecular Level via Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy and Fluorescence Microscopy.* Langmuir, 35, 12831–12838. DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b02284.

Wang, C. és mtsai (2020): *Revealing Molecular-Level Interaction between a Polymeric Drug and Model Membrane Via Sum Frequency Generation and Microfluidics.* Langmuir, 36, 1615–1622. DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b03676.

Aghigh, A. és mtsai (2023). Second harmonic generation microscopy: a powerful tool for bio-imaging. Biophysical Reviews, 15, 43–70. DOI: 10.1007/s12551-022-01041-6.

5 *„A vizsgált peptidek közül több is mutat jelentős aggregációt. Ilyen aggregációra hajlamos peptidrendszerek esetében többször előfordul, környezeti hatások függvényében, folyadék-folyadék fázisszeparáció. A vizsgált peptidek bármelyike mutat ilyen hajlamot?”*

Köszönöm a kérdést. A dolgozatban vizsgált rendszerek esetében folyadék–folyadék fázisszeparációt (liquid–liquid phase separation, LLPS) célzottan nem vizsgáltunk, és a rendelkezésünkre álló adatok alapján egyik rendszerről sem állítanám, hogy LLPS-t találtunk volna. Ugyanakkor több rendszerünk (pl.: a CM15, az LL37 és a 3K peptidek) is mutat olyan környezetfüggő, multivalens asszociációt, amely alapján az LLPS lehetőségét kifejezetten érdekesnek tartom.
Az LLPS-t érdemes elkülöníteni az egyszerű aggregációtól és az esetünkben látott teljesen vagy részlegesen rendezett asszociátumoktól. Fázisszeparáció esetén egy kezdetben homogén oldatból két együtt létező folyadékfázis alakul ki: egy híg és egy biomolekulákban dús fázis. A folyadékszerű kondenzátumokra jellemző lehet a közel gömb alak, a cseppek fúziója, a gyors molekuláris átrendeződés és bizonyos körülmények között a reverzibilitás. Ezzel szemben egy TEM-en vagy DLS-sel

detektált nagy részecske önmagában nem bizonyítja LLPS kialakulását. E megkülönböztetés fontosságát Alberti és munkatársai módszertani áttekintése is hangsúlyozza (Alberti és mtsai, 2019).
A felvetés azért is érdekes, mert az irodalom szerint számos fázisszeparációra hajlamos fehérje esetében a rendezetlen régiók (IDR-ek) aktívan részt vesznek a kondenzátumok kialakításában. A FUS, hnRNPA1 vagy Ddx4 fehérjék példáján jól látható, hogy a rendezetlen szakaszok gyenge, multivalens kölcsönhatásai elegendők lehetnek a fázisszeparációhoz (Borcherds és mtsai, 2021).
Itt érdekes párhuzam kínálkozik az antimikrobiális peptidekkel. Számos AMP rövid, kationos, amfifil és vizes közegben részben vagy nagyrészt rendezetlen, majd membránhoz kötődve rendezettebb szerkezetet vehet fel. Egyes LLPS-ben részt vevő rendezetlen fehérjerégiók szintén gazdagok töltött, aromás vagy más kölcsönhatásra képes aminosavakban. Ez nem jelent általános szekvenciahasonlóságot, és önmagában nem bizonyítja az AMP-k fázisszeparációs képességét, de a konformációs plaszticitás, a multivalens kölcsönhatások és a környezetfüggő szerkezetváltozás közös fizikai-kémiai vonások.
Ehhez közvetlenül kapcsolódik egy korábbi, bár nem kifejezetten AMP-kkel foglalkozó saját munkánk is, melyben kvantumkémiai számításokkal vizsgáltuk, miként befolyásolja a molekuláris környezet a rövid β-redős motívumok feltekeredésének és kitekeredésének energetikáját kifejezetten a folyadék fehérje fázis hatására koncentrálva (Papp és mtsai, 2021). A számítások azt mutatták, hogy a fehérjében gazdag, kevésbé poláris környezet jelentősen kedvezhet a β-redőzött szerkezet stabilitásának, és a szerkezeti vízmolekulák fontos szerepet játszanak a folyamat energetikájában.
A β-peptidek esetében egyértelmű önszerveződést, oligomerizációt, nanocső- és lamelláris struktúrákat figyeltünk meg, de nincs olyan adatunk, amely folyadékszerű köztes fázis jelenlétére utalna. Ennek lehetőségét célzott koncentráció-, só- és pH-függő vizsgálatokkal lehetne tesztelni.
Ha ma vizsgálnánk újra ezeket a rendszereket, koncentráció–ionerősség–pH fázisdiagram felvételével kezdeném, és különösen hasznosnak tartanám a mikroskálás termoforézis (MST) és a mikrofluidikus rezisztív impulzusérzékelés (MRPS) technikák alkalmazását. Ezeket Kovács Mihály csoportjával közös munkánkban már használtuk az *E. coli* egyszálú DNS-kötő fehérjéjének (EcSSB) fázisszeparációjára: az MST-vel a kondenzáció koncentráció- és időfüggését, az MRPS-sel a kondenzátumok méreteloszlását jellemeztük (Ecsédi és mtsai, 2025). Ezeket esetünkben még megfelelő mikroszkópos kontrollokkal egészíteném ki.

Hivatkozások

Alberti, S., Gladfelter, A. és Mittag, T. (2019). *Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates.* Cell, 176, 419–434.

Borcherds, W., Bremer, A., Borgia, M. B. és Mittag, T. (2021). *How do intrinsically disordered protein regions encode a driving force for liquid-liquid phase separation?* Current Opinion in Structural Biology, 67, 41–50.

Patel, A. és mtsai (2015). *A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation.* Cell, 162, 1066–1077.

Sing, C. E. és Perry, S. L. (2020). *Recent progress in the science of complex coacervation.* Soft Matter, 16, 2885–2914.

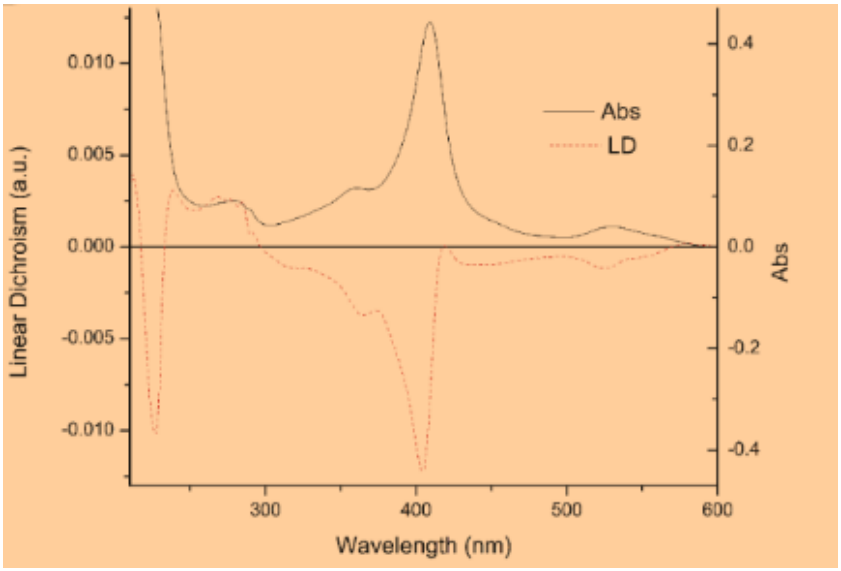
Papp, D., Szigyártó, I. C., Nordén, B., Perczel, A. és Beke-Somfai, T. (2021). *Structural Water Stabilizes Protein Motifs in Liquid Protein Phase: The Folding Mechanism of Short β-Sheets Coupled to Phase Transition.* International Journal of Molecular Sciences, 22, 8595.

Harami, G. M. és mtsai (2020). *Phase separation by ssDNA binding protein controlled via protein–protein and protein–DNA interactions.* PNAS, 117, 26206–26217.

Ecsédi, P. és mtsai (2025). *Phase transition drives bacterial single-stranded DNA binding (SSB) protein mobilization during stress response and metabolic adaptation.* bioRxiv preprint.

6. *„A hemin spektroszkópiai vizsgálata során (21. ábra) a látható spektrális tartomány további részében (500 nm felett) megfigyelhető-e bármilyen változás? Kétségtelen, hogy a Soret-sáv dominálja az abszorpciós spektrumot, azonban a hem csoport 500–600 nm közötti csúcsai is érzékenyek fizikai-kémiai hatásokra.”*

Köszönöm ezt a fontos észrevételt. A hemcsoport 500–600 nm közötti ún. Q-sávnak jelenléte igazolt korábbi LD vizsgálatainkban, ahol a membránhoz kötött citokróm c-t vizsgálva ebben a tartományban is sikerült jelet detektálnunk (Kogan és mtsai, 2011, 2B ábra). Caesar, Esbjörner, Lincoln és Nordén korábbi vizsgálata szintén jól demonstrálta, hogy a hemcsoport LD-spektruma értékes információt nyújthat a fehérje membránfelszíni orientációjáról (Caesar és mtsai, 2009).



Kogan et al. Chem. Comm. 2011, 2B ábra, melyen látható a cyt c esetén az LD spektrumban is a Q-sáv

A dolgozatban bemutatott hemin–peptid–membrán rendszerek esetében próbálkozásaink ellenére az 500 nm feletti tartományban nem sikerült szignifikáns, megbízhatóan értelmezhető LD-jelet kimutatnunk, ezért a részletes elemzést a lényegesen intenzívebb Soret-sávra korlátoztuk. Hiányának egyik lehetséges oka, hogy a szabad hemin a liposzómák felszínén kevésbé meghatározott orientációban helyezkedik el, mint a fehérjeszerkezetbe ágyazott hemcsoport a citokróm c esetében. A Q-sávok eleve kisebb abszorpciós intenzitása tovább nehezíthette az LD-jel detektálását.
A professzor úr felvetésével ugyanakkor teljesen egyetértek: megfelelő jel/zaj arány mellett ez a spektrális tartomány további információt adhatna a hemin orientációjáról, illetve lokális koordinációs környezetéről.

Hivatkozások

Kogan, M., Beke-Somfai, T. és Nordén, B. (2011). *Flow-alignment of bicellar lipid mixtures: orientations of probe molecules and membrane-associated biomacromolecules in lipid membranes studied with polarized light.* Chemical Communications, 47, 7356–7358.

Caesar, C. E. B., Esbjörner, E. K., Lincoln, P. és Nordén, B. (2009). *Assigning Membrane Binding Geometry of Cytochrome c by Polarized Light Spectroscopy.* Biophysical Journal, 96, 3399–3411.

7. *„A jelölt érdekes kísérletekben mutatta be, hogy lipid membrán jelenléte modulálja a CM15-suramin komplex aggregációs tulajdonságait. Izgalmas kérdés, hogy maga az élő sejt vajon hogyan tartja kontroll alatt a polimerizáció, aggregáció, fázisszeparáció és amiloidképződés komplex folyamatait? Kíváncsi volnék a jelölt átfogó, általános álláspontjára ebben a kérdésben.”*

Köszönöm a kérdést. Úgy látom, hogy a sejt ezeket a folyamatokat nem egyetlen mechanizmussal kontrollálja, hanem több, egymásra épülő szabályozási szinten. A polimerizáció, aggregáció és fázisszeparáció fizikailag sokszor ugyanazokra az alapokra – multivalens, nem-kovalens kölcsönhatásokra, koncentrációküszöbökre és nukleációs folyamatokra – épül, ezért a sejt számára a fő feladat az, hogy hol, mikor, milyen koncentrációban és mennyi ideig engedélyezze ezeket a kölcsönhatásokat.
Az első szabályozási szint maga a lokális koncentráció és kompartmentalizáció. A sejt membránokkal, organellumokkal és membrán nélküli kondenzátumokkal térben korlátozza, hogy mely molekulák találkozhatnak egymással. A biomolekuláris kondenzátumok ma már fontos szerveződési elvnek tekinthetők: multivalens fehérje–fehérje és fehérje–nukleinsav kölcsönhatások révén lokálisan nagyságrendekkel megemelhetik bizonyos komponensek koncentrációját.

A második szint a kölcsönhatások aktív módosítása. Foszforilációval, acetilációval, metilációval, ubiquitinációval és más poszttranszlációs módosításokkal a sejt megváltoztathatja egy fehérje töltését, multivalenciáját, konformációját és ezáltal fázisszeparációs vagy polimerizációs hajlamát. Ehhez társul az alternatív splicing és a specifikus kötőpartnerek jelenléte. Az LLPS szabályozásának irodalma szerint ezek a mechanizmusok teszik lehetővé, hogy egy kondenzátum adott helyen kialakuljon, majd szükség esetén gyorsan fel is oldódjon.
A harmadik, szerintem különösen fontos szint a proteosztázis-hálózat. A molekuláris chaperonok nemcsak a helyes fehérjefeltekeredést segítik, hanem gátolják a nem megfelelő intermolekuláris asszociációkat, elősegíthetik az aggregátumok szétbontását, illetve a helyreállíthatatlan fehérjéket a proteaszomális vagy autofágiás degradáció felé irányíthatják. Így a chaperon-, ubiquitin–proteaszóma- és autofágiás rendszerek együtt egyfajta minőségellenőrzési hálózatot alkotnak.
Ebből a szempontból a funkcionális fázisszeparáció és a patológiás aggregáció között nincs mindig éles határ. Egy folyadékszerű kondenzátum idővel viszkózusabbá vagy szilárdabbá válhat, és bizonyos fehérjéknél akár amiloid jellegű szerveződés felé is elmozdulhat. A sejt ezért nemcsak a kondenzátum kialakulását, hanem annak anyagi állapotát és élettartamát is szabályozza. Ha a proteosztázis kapacitása csökken – például stressz vagy öregedés során –, ezek az átmenetek könnyebben tolódhatnak irreverzibilis aggregáció felé.
A membránok ebben különösen érdekesek, és itt látok közvetlen kapcsolatot a dolgozat CM15–szuramin-eredményeivel. A membrán nem pusztán passzív felület: lokálisan koncentrálhat komponenseket, orientálhat molekulákat, illetve alternatív kötőhelyet biztosíthat, így egy asszociációs egyensúlyt egyik vagy másik irányba tolhat. A mi rendszerünkben a CM15 és a szuramin vizes közegben nagy aggregátumokat képezett, míg lipid kettősréteg jelenlétében a peptidek egy része inkább a membránhoz kötődött; PC/PG membránok mellett a komplexképződés visszaszorult. Ez jó modellje annak az általános elvnek, hogy a sejtes környezet alternatív kötőpartnerekkel szabályozhatja a lehetséges szupramolekuláris állapotokat.
Hasonló határfelületi szerveződés figyelhető meg az extracelluláris vezikulák felszínén kialakuló fehérje- vagy biomolekuláris koronában. Saját munkáinkban kimutattuk, hogy membránaktív peptidek e korona egyes fehérjéit eltávolíthatják, és a különböző peptidek membránroncsoló, membránon átjutó és koronát módosító hatása elkülöníthető (Singh és mtsai, 2020, 2023; Sonallya és mtsai, 2025). A korona dinamikus fehérjerétegként indulhat, de bizonyos körülmények között tartósabban kötött, lassan átrendeződő, akár üvegszerűen rögzült állapot felé is eltolódhat; ilyen átmenetet saját vezikularendszereinkben közvetlenül nem igazoltunk (Paolini és mtsai, 2026).
Ehhez még egy fontos tényezőt tennék hozzá: a sejt nem egyensúlyi rendszer. ATP-felhasználó enzimek, chaperonok, kinázok, foszfatázok és citoszkeletális folyamatok folyamatosan energiát fektetnek a szerveződésbe és annak visszafordításába. Emiatt a sejtes asszociációk gyakran aktívan fenntartott, dinamikus állapotok, nem pedig egyszerű termodinamikai végállapotok. Az aktív szabályozás különösen fontos a kondenzátumok méretének, helyének és élettartamának kontrolljában.
Összefoglalva tehát úgy gondolom, hogy a sejt három alapelv kombinációjával tartja kontroll alatt ezeket a folyamatokat: térbeli és koncentrációs szabályozással, a molekuláris kölcsönhatások aktív módosításával, valamint folyamatos minőségellenőrzéssel és degradációval. A fázisszeparáció és az önszerveződés önmagában nem kóros jelenség, hanem alapvető sejtszervezési mechanizmus; a probléma akkor jelentkezik, amikor a reverzibilis, funkcionális szerveződés irreverzibilis aggregáció vagy amiloidképződés felé tolódik, és ezt a proteosztázis-rendszer már nem tudja visszafordítani.
Kapcsolódó irodalom:

Banani, S. F. és mtsai (2017). Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 18, 285–298. DOI: 10.1038/nrm.2017.7.

Alberti, S. és Hyman, A. A. (2021). Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 22, 196–213. DOI: 10.1038/s41580-020-00326-6.

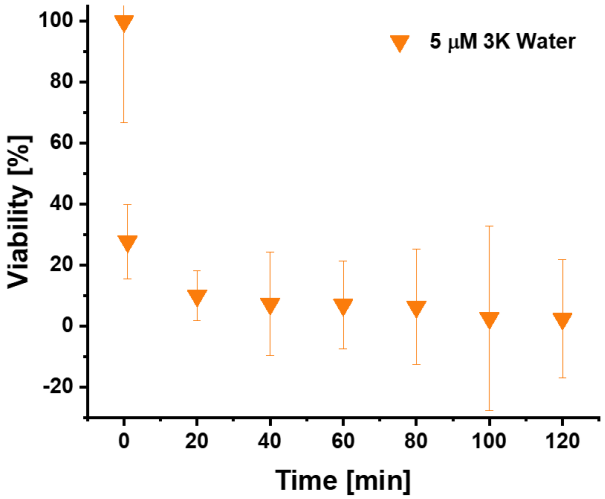
Bratek-Skicki, A. és mtsai (2020). A guide to regulation of the formation of biomolecular condensates. FEBS Journal, 287, 1924–1935. DOI: 10.1111/febs.15254.

Singh, P. és mtsai (2020). Membrane active peptides remove surface adsorbed protein corona from extracellular vesicles of red blood cells. Frontiers in Chemistry, 8, 703. DOI: 10.3389/fchem.2020.00703.

Singh, P. és mtsai (2023). Removal and identification of external protein corona members from RBC-derived extracellular vesicles by surface manipulating antimicrobial peptides. Journal of Extracellular Biology, 2, e78. DOI: 10.1002/jex2.78.
Sonallya, T. és mtsai (2025). Categorizing interaction modes of antimicrobial peptides with extracellular vesicles: disruption, membrane trespassing, and clearance of the protein corona. Journal of Colloid and Interface Science, 679, 496–509. DOI: 10.1016/j.jcis.2024.09.244.
Paolini, L. és mtsai (2026). Biomolecular corona of extracellular vesicles: report on ISEV workshop. Journal of Extracellular Biology, 5, e70172. DOI: 10.1002/jex2.70172.

8. *„A dolgozat szerint (79. ábra) a 3K modellpeptid hozzáadására az antibakteriális hatás azonnal jelentkezett. Ez milyen időskálára értendő?”*

Köszönöm a kérdést. Elismerem, hogy az „azonnal” kifejezés nem kellően kvantitatív sem az értekezésben, sem a publikált közleményben. Az eredeti kézirat átdolgozásai során az idevágó időfüggő mérést végül nem közöltük; ezt az ábrát alább bemutatom. A hatás már a kezelés utáni legelső mérési időpontban megjelent, megközelítőleg 1–2 percen belül.



A 3K peptid baktériumölő hatásának időbeli alakulása vízben. Az exponenciális növekedési fázisban lévő E. coli BL21 baktériumokat desztillált vízben, rázatott tenyészetben, 5 μM 3K peptiddel kezeltük 37 °C-on. A relatív túlélőképességet a kezelt és kezeletlen mintákban mért telepképző egységek (CFU/ml) arányaként határoztuk meg. A hibasávok három párhuzamos mérés átlagának standard hibáját (SEM) jelölik.

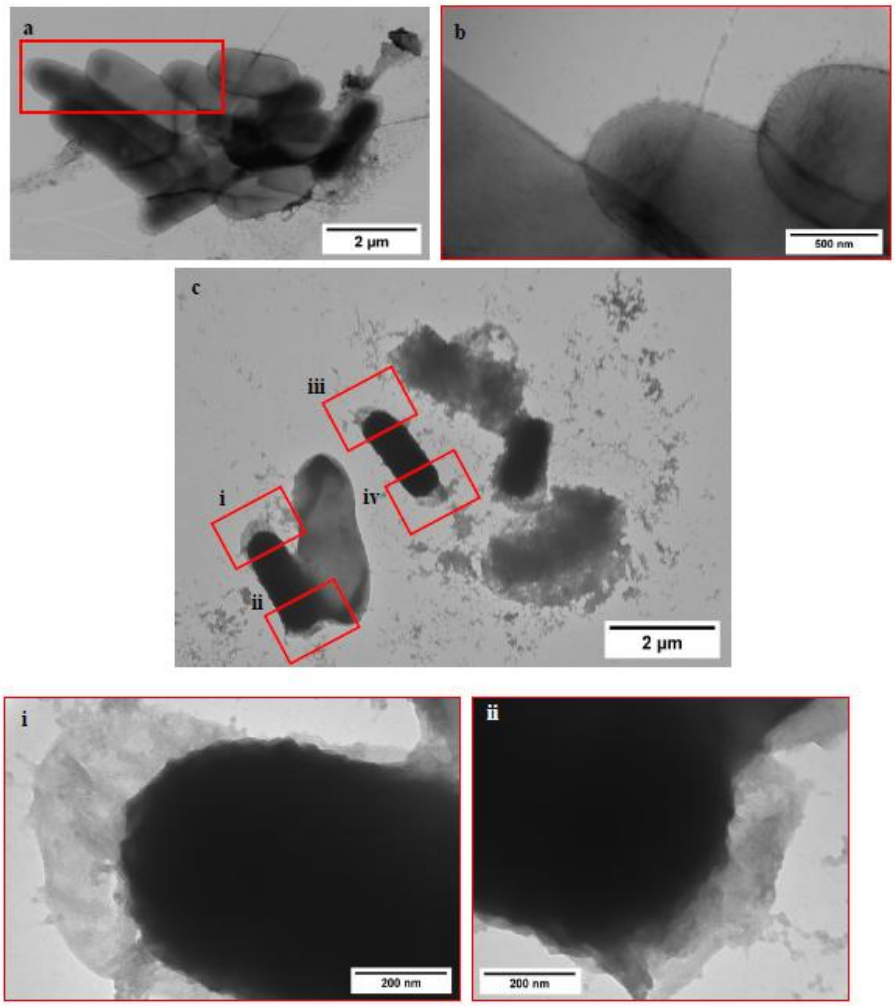
9. *„A baktérium membránjára kitapadt 3K lamellin rendszer miért a sejt belseje felé (és nem kifelé) növekedik? Energetikai szempontból milyen magyarázat jön szóba?”*

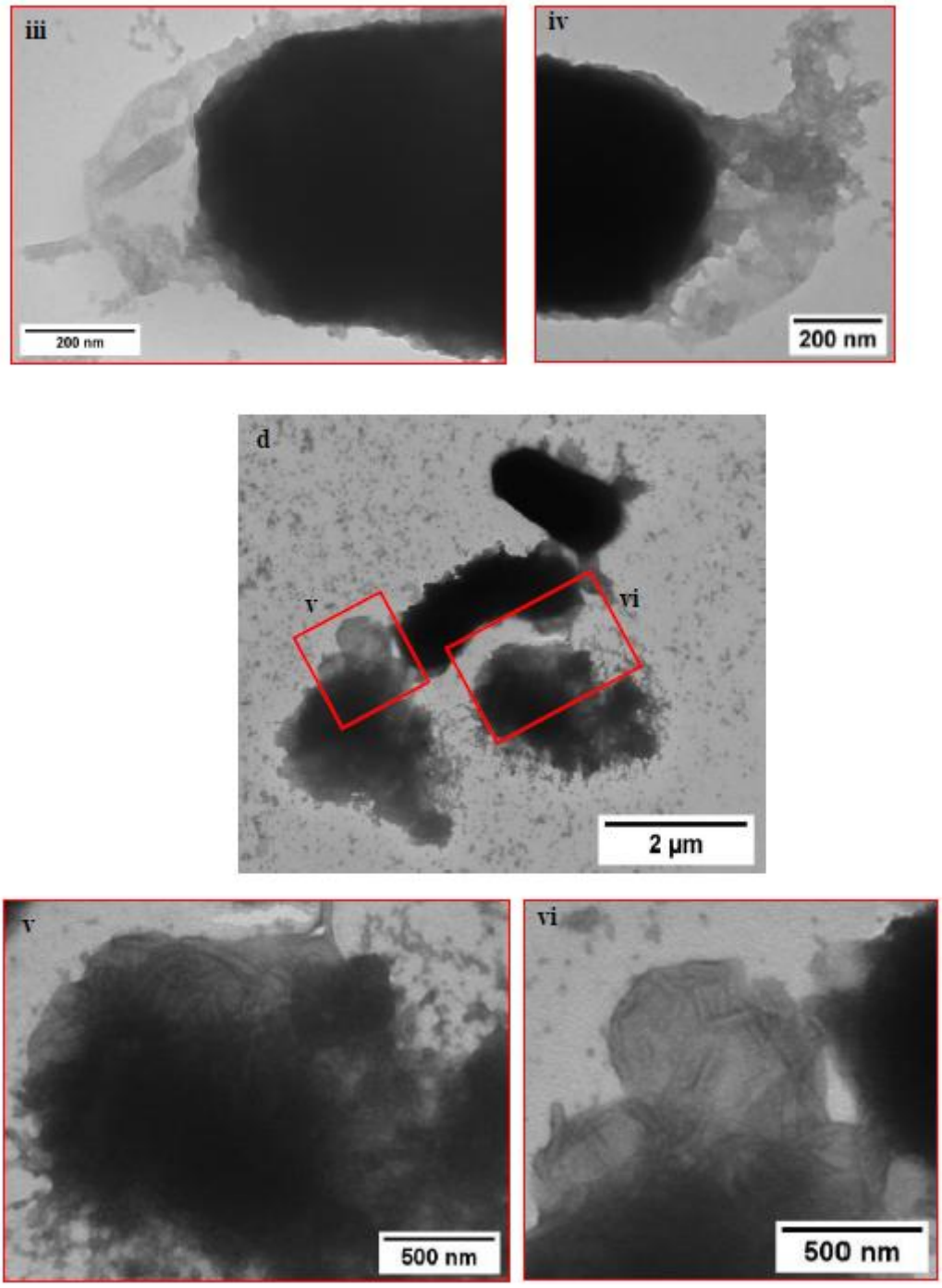
Köszönöm a kérdést. A lamellák növekedési irányának energetikai meghatározására nem végeztünk közvetlen mérést vagy szabadenergia-számítást. A TEM- és krio-EM-felvételek alapján azonban három szempontot érdemes elkülöníteni.
Először fontos tisztázni, hogy a lamellák valóban a sejt belseje felé növekednek-e, vagy a membrán felszínén kialakuló asszociátumok roncsolják meg a sejthatárt, és emiatt látszanak a belső térben. A felvételeken döntően a sejtburok felől befelé húzódó lamellákat figyeltünk meg, többnyire sérült külső membrán közelében; esetenként kifelé álló szerkezeti részletek is előfordultak. Kiterjedt, a felszínen végighúzódó lamellás réteget viszont nem láttunk. A felvételeket szándékosan foszfátmentes vízben készítettük, hogy az oldatból származó foszfát ne indíthassa el előzetesen a szerveződést, és a kezdeti kölcsönhatásban a sejtfelszíni LPS, különösen a lipid A foszfátcsoportjainak szerepe érvényesülhessen. A statikus mikroszkópos képek önmagukban azonban a növekedés időbeli irányát nem bizonyítják.

Másodszor a külső és belső membrán közötti térben, majd a citoplazmában is jelen lehetnek a szerveződést támogató, foszfátot tartalmazó molekulák, köztük szervetlen foszfát és nukleotidok. Így az előrehaladó lamella a sejtburok átjárhatóvá válása után további kötőpartnerekhez juthat. Ez a belső irányú növekedést kedvezővé teheti, de a helyi koncentrációkat nem mértük meg.
Harmadszor a membránon áthaladó asszociátum szerkezete is fontos lehet. Elvileg elképzelhető, hogy a részlegesen megnyílt membránon keresztül hidrofil oldalláncaival a vizes fázis felé fordulva halad tovább, de az is, hogy a lipid acilláncai között átmenetileg más orientációt vesz fel. Korábbi β-peptid Janus-oligomereknél szimulációk és IR-mérések alátámasztották, hogy a kettősrétegbe ágyazódva is létrejöhetnek lamelláris szerkezetekhez kapcsolódó oligomer motívumok (Szigyártó és mtsai, Chemical Science, 2020). Ez azonban nem közvetlen bizonyíték arra, hogy a 3K pontosan így jut át a membránon. Energetikai szempontból ezért leginkább azt tartom valószínűnek, hogy a lizinoldalláncok és a foszfátcsoportok közötti elektrosztatikus kapcsolatok, valamint a lamellán belül kialakuló hidrogénkötések és hidrofób kölcsönhatások együttesen kedveznek a további szerveződésnek. Nem igazoltuk azonban, hogy ez a szabadenergia-nyereség önmagában megmagyarázza a befelé irányuló növekedést; a membrán geometriája és a lokális anyaghozzáférhetőség is szerepet játszhat. A sérült sejtekből kijutó tartalom egyes felvételeken a már kialakult lamellákat kifelé sodorhatja, amire a következő válasz képei is példát mutatnak.

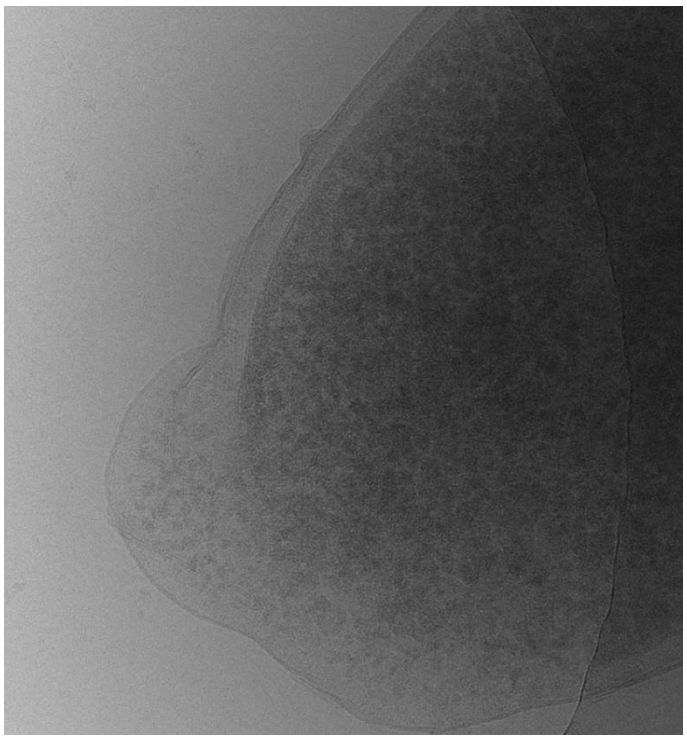
10. *„Lamellin hatásra ‘folyadékszivárgás’ lép fel a baktériumból (82. oldal). Ennek a folyamatnak mik a mikroszkópos (morfológiai, szerkezeti) jelei?”*

Köszönöm a kérdést. Először pontosítanám az értekezésben használt „folyadékszivárgás” kifejezést. A mikroszkópos felvételeken közvetlenül nem magát a folyadék áramlását látjuk, hanem olyan morfológiai változásokat, amelyek a bakteriális membrán integritásának elvesztésére és a sejttartalom kijutására utalnak. Pontosabb tehát membránpermeabilizációról, membránkárosodásról és sejttartalom-vesztésről beszélni. Ezeket a közlemény kiegészítő anyagában és további, nem közölt TEM- és krio-EM-felvételeken is megfigyeltük.
Fontos, hogy az elektronmikroszkópia statikus pillanatfelvételeket ad. Krio-EM-mel különböző, a kezelés utáni időpontokban is készítettünk képeket, de az egyes sejtek változásának folyamatos követése nem volt lehetséges. A részlegesen ép sejtek mellett megjelenő lamellák és a szétszóródott sejttartalom összhangban vannak a membrán károsodásával. Ugyanakkor a felvételekből nem állapítható meg teljes bizonyossággal, hogy a lamellák kialakulását mely intracelluláris komponensek segítették elő.
Összességében a megfigyelések egy, a klasszikus pórusképző modellektől eltérő membránroncsoló mechanizmus mellett szólnak. A folyamat időbeli felbontásához és a sejttartalom kijutásának közvetlen követéséhez fluoreszcens jelölés vagy más, oldatfázisban alkalmazható módszer adhatna további információt.


a
2 µm
b
500 nm
c
iii
i
iv
ii
2 µm
i
200 nm
ii
200 nm



Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek a 3K-val kezelt E. coli sejtek membránkárosodásáról. A baktériumokat desztillált vízben 5 µM 3K peptiddel kezeltük 120 percig, majd uranil-acetáttal negatívan festettük. (a, b) A kezeletlen baktériumok ép sejthatára. (c) A 3K jelenlétében kialakuló lamellás asszociátumokkal együtt megfigyelhető membránkárosodás és a sejttartalom kijutására utaló morfológia; (i–iv) nagyított részletek. (d) Kiterjedt lamellaképződés a membrán alatti régióban; (v–vi) nagyított részletek.



Krio-EM-felvétel 20 μM 3K peptiddel 40 percig kezelt E. coli sejtről.

11. „A 'membránaktivitás' fogalma igen gyakran fordul elő az értekezésben. A jelölt pontosan hogyan definiálná ezt a fogalmat?"

Köszönöm a kérdést. Az értekezésben a „membránaktivitás" kifejezést gyűjtőfogalomként használtam. Membránaktivitás alatt azt értem, hogy egy molekula – esetünkben peptid vagy peptidasszociátum – a lipidmembránnal kölcsönhatásba lép, és annak szerkezetét, fizikai-kémiai tulajdonságait vagy működését mérhetően megváltoztatja. A puszta membránkötődést ezért önmagában nem tekinteném elegendőnek a membránaktivitás megállapításához.
Ez összhangban áll a szakirodalommal: Wimley határfelületi aktivitási modellje a membrán lipidjeinek rendezettségében kiváltott perturbációt hangsúlyozza, míg Brogden áttekintése rámutat arra, hogy az AMP-k membránhatása és antibakteriális mechanizmusa nem mindig esik egybe (Wimley, 2010; Brogden, 2005). A membránaktivitás tehát nem egyetlen hatásmechanizmus: jelenthet lipidátrendeződést, görbületváltozást, hemifúziót, permeabilizációt vagy közvetlen membránroncsolást.
A dolgozatban szándékosan tágabb értelemben használtam a kifejezést, mert a vizsgált rendszerekben különböző szintű membránhatásokat figyeltünk meg. A CM15 esetében például ismert a negatív töltésű membránokhoz való preferenciális kötődés; saját rendszerünkben pedig azt vizsgáltuk, hogy a heminnel vagy szuraminnal történő asszociáció hogyan változtatja meg ezt a membránhoz kötött állapotot. A dolgozatban a CM15 PC-liposzómákhoz csak részleges kötődést mutatott, és a kis molekulák jelenléte módosította a peptid konformációját és membránnal való kölcsönhatását.
A DHVAR4 esetében már közvetlen membránmorfológiai következményeket is megfigyeltünk. PC/PG membránon maga a membrán helikális konformációba rendezi a peptidet, amit a tartrazin tovább erősít. FF-TEM-mel pedig azt láttuk, hogy a DHVAR4 megváltoztatja a liposzómák morfológiáját, és hemifúziós köztes állapotok jelennek meg; tartrazin jelenlétében ez a viselkedés tovább módosul. Ebben az esetben tehát a „membránaktivitás" nem pusztán kötődést, hanem membránátrendeződést is jelent.

A β-peptideknél ugyancsak többféle membránhatást figyeltünk meg. A 3K lamellin esetében ez különösen látványos: az önszerveződő rendszer a bakteriális sejtburokba hatolva súlyos membránkárosodást okozhat.
Az antibakteriális aktivitás és a membránaktivitás ugyanakkor nem szinonimák. Egy antimikrobiális peptidnek lehet intracelluláris célpontja is, míg egy membránaktív peptid által okozott perturbáció nem feltétlenül elegendő a sejt elpusztításához.

Kapcsolódó irodalom:

Wimley, W. C. (2010). Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. ACS Chemical Biology, 5, 905–917. DOI: 10.1021/cb1001558.
Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature Reviews Microbiology, 3, 238–250. DOI: 10.1038/nrmicro1098.

12. *„Igen érdekes jelenség a DHVAR4 és DHVAR4-TZ hatására eukarióta sejteken (HeLa) fellépő blebképződés. A blebképződés miozin II motorfehérje által vezérelt folyamat. Lehetséges, hogy a peptid nem csupán a membrán tulajdonságait, hanem a belső fehérjerendszereket (és így akár a miozin II-t) is modulálja? Ugyancsak ide vonatkozik, hogy blebképződés E. coli sejten is megfigyelhető, pl. fágfertőzés utolsó lépéseként. Lehetséges, hogy a vizsgált peptid akár baktériumokon is képes modulálni a blebképződés folyamatát?”*

Köszönöm a nagyon érdekes felvetést. A HeLa-sejtekben elképzelhető, hogy a DHVAR4 hatása nem korlátozódik a lipidmembránra, hanem közvetve a membrán–citoszkeleton kapcsolatot és az aktomiozin-rendszert is érinti. Ezt azonban a jelenlegi adataink nem bizonyítják. Saját modellmembrán-kísérleteink alapján a közvetlen lipidmembrán-perturbációt tartom a biztosabban alátámasztott kiinduló mechanizmusnak: a DHVAR4 hemifúziós állapotokat és membránmorfológiai változásokat idézett elő citoszkeleton nélküli rendszerekben is, amelyeket a tartrazin módosított.
A HeLa-sejtekben megfigyelt blebképződés morfológiája a két kezelésnél eltért: DHVAR4 mellett 1–2 µm-es, később összeolvadó blebeket láttunk, míg DHVAR4–tartrazin jelenlétében kisebb, de több bleb jelent meg, amelyek kevésbé hajlottak a fúzióra. A peptid internalizálódását is megfigyeltük, így az intracelluláris folyamatok közvetett módosítása nem zárható ki; e különbség pontos eredetét azonban nem vizsgáltuk.
Az Annexin V-vizsgálatok a foszfatidilszerin sejtfelszíni megjelenésére utaltak, ami korai apoptotikus eseményekkel is összefügghet, de önmagában nem bizonyítja az apoptózist. Az apoptotikus blebképződésben a kortikális aktomiozin-rendszer, ezen belül a miozin II szerepe ismert, így annak közvetett érintettsége valós lehetőség.
Két, egymást nem kizáró magyarázatot tartok tehát lehetségesnek: a közvetlen membránperturbációt és a membránon keresztül kiváltott sejten belüli mechanikai vagy jelátviteli választ. A közvetlen miozin II–DHVAR4-kölcsönhatásra nincs adatunk.
Az utóbbi lehetőséget például miozin-II-gátlóval (blebbistatinnal), ROCK-gátlóval vagy a miozin könnyűlánc foszforilációjának követésével lehetne tesztelni.
Ezek a mérések segítenének elkülöníteni a lipidmembránra gyakorolt közvetlen hatást a sejten belüli aktomiozin-választól, de a közvetlen peptid–fehérje-kötődést önmagukban még nem bizonyítanák.
E. coli esetében a morfológiai hasonlóságot el kell különíteni a mechanizmus azonosságától. A baktériumok nem rendelkeznek az eukarióta sejtekre jellemző miozin-II-alapú aktomiozin-rendszerrel. A külső membránból lefűződő vezikulák (OMV-k) képződését ugyanakkor sejtburok-stressz és fágfertőzés is előidézheti. A DHVAR4–tartrazin rendszerrel végzett kísérleteinkben a baktériumok fokozott agglutinációját figyeltük meg, de blebképződést vagy OMV-képződést célzottan nem mértünk. Ezért e jelenségek DHVAR4 általi modulációja jelenleg csak lehetőség.
Összefoglalva: a HeLa-sejteknél a közvetlen membránhatás bizonyított, a miozin II közvetett modulációja lehetséges, de nem igazolt. E. coli esetében a blebképződés más, sejtburokhoz kapcsolódó mechanizmuson alapulna; erre jelenleg nincs közvetlen kísérleti bizonyítékunk.

13. *„A jelölt egy figyelemre méltó molekulaszám-analízissel hasonlítja össze a lamellin és más membránaktív szerek hatékonyságát (82–83. oldal). Érdekelne a jelölt álláspontja (hasznosság, hatékonyság, előnyök, hátrányok) a fágterápiáról, amelyben néhány bakteriofág (amely ráadásul saját magát replikálja parazitaként) elegendő egy-egy baktérium elpuszításához.”*

Köszönöm a kérdést. A fágterápiát az antimikrobiális rezisztencia elleni küzdelem ígéretes, ugyanakkor az általunk vizsgált peptidrendszerektől alapvetően eltérő stratégiájának tartom. Közös vonás, hogy a szokásos MIC nem minden esetben írja le kielégítően a hatást: szupramolekuláris peptideknél a közegfüggő szerveződés, fágoknál pedig a fertőzés és az azt követő replikáció módosítja a dózis–hatás kapcsolatot. A lamellinrendszerben a számítások és elektronmikroszkópos adatok alapján egy 3K-lamellára mintegy 10–12 ezer peptidegységet becsültünk; az erősen károsodott sejteken több ilyen lamellát figyeltünk meg. Egyetlen baktérium jelentős károsításához hozzávetőleg 5×10^4–2×10^5 peptidegység jelenlétével számoltunk. Ezzel szemben egy sikeresen fertőző fág a baktérium saját bioszintetikus apparátusát felhasználva sokszorozza meg az új fágpartikulumokat, vagyis önamplifikáló antimikrobiális ágens.

Hozzátenném ezen a ponton, hogy a két rendszer összevetése természetesen inkább mechanisztikus gondolatkísérlet, mint farmakológiai hatékonyság-összehasonlítás.

A fágterápia legnagyobb előnyének éppen az önamplifikációt és a magas specificitást tartom. Ha a megfelelő fág eléri a megfelelő baktériumot, ott lokálisan replikálódhat, majd lízissel újabb fágpartikulumokat szabadíthat fel. A fágok antibiotikum-rezisztens törzseket is képesek fertőzni, és a szűk specificitás előnyös is lehet. A jelenlegi szakirodalom a biofilmek elleni aktivitást és az antibiotikumokkal való kombinálhatóságot is fontos lehetőségként emeli ki.

Ugyanez a specificitás azonban egyben az egyik legfontosabb hátrány is. Egy fág gyakran csak egy baktériumfaj bizonyos törzseit fertőzi hatékonyan, ezért a terápiához először pontosan azonosítani kell a kórokozót, majd megfelelő fággal vagy fágkoktéllal kell rendelkezni. A gazdaspektrum (host range) ráadásul nem statikus tulajdonság, hanem a fág–baktérium koevolúció és a bakteriális védekező rendszerek függvénye. Akut, gyorsan előrehaladó fertőzésben ez a diagnosztikai és szelekciós idő komoly gyakorlati korlát lehet.

A másik probléma, hogy a baktériumok fágokkal szemben is rezisztenciát fejleszthetnek – például receptorváltoztatással vagy különböző intracelluláris antivirális rendszerekkel. Ugyanakkor itt érdekes evolúciós lehetőség nyílik: a fág maga is evolválódhat, illetve több fág kombinálható koktélban. Bizonyos esetekben pedig a fág-rezisztencia kialakulásának ára a baktérium számára csökkent virulencia vagy más antimikrobiális szerekkel szembeni fokozott érzékenység lehet. Emiatt különösen érdekesek a fág–antibiotikum kombinációk, nem feltétlenül a két megközelítés egymás helyettesítése. (Gordillo Altamirano és Barr, 2019).

További kihívás a fágok szokatlan farmakokinetikája és farmakodinamikája. A fág koncentrációja nem egyszerűen csökken az eliminációval: megfelelő baktérium jelenlétében lokálisan növekedhet is. Ezzel szemben az immunrendszer eltávolíthatja vagy neutralizálhatja a fágokat, és a fertőzés helyére való eljutás sem magától értetődő. A gyártás, tisztítás, stabil formulálás és szabályozás szintén összetettebb egy hagyományos kis molekulájú antibiotikumhoz képest. A klinikai eredmények ígéretesek, de a terápiás eredményeket az *in vitro* érzékenységből továbbra sem lehet egyszerűen megjósolni.

A lamellin és a fág között számomra még egy érdekes koncepcionális párhuzam is van. Mindkét rendszerben a baktérium maga biztosít valamit, ami a pusztító mechanizmus kialakulásához szükséges. A fágnál ez sokkal erősebben igaz: a baktérium teljes molekuláris apparátusát a fág replikációjára fordítja. A 3K esetében nincs valódi replikáció, de a saját eredményeink szerint a baktérium felszíni LPS/lipid A foszfátcsoportjai nukleálhatják a szupramolekuláris szerveződést, majd a lamella a sejtbe növekedve károsítja a membránokat. Tehát mindkét esetben van egyfajta célsejt által aktivált vagy felerősített mechanizmus, csak teljesen más fizikai szinten.

Kapcsolódó irodalom:

Gordillo Altamirano, F. L. és Barr, J. J. (2019). Phage therapy in the postantibiotic era. Clinical Microbiology Reviews, 32, e00066-18. DOI: 10.1128/CMR.00066-18.
Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature Reviews Microbiology, 3, 238–250. DOI: 10.1038/nrmicro1098.

Budapest, 2026. október 16.