

Válasz Mező Gábor professzor úr bírálatára

Köszönöm Mező Gábor professzor úrnak az értekezés alapos bírálatát, az elismerő értékelést és az érdemi kérdéseket. Ezekre az alábbiakban, a Bíráló sorrendjét követve válaszolok.

Az általános formai és terminológiai észrevételek jelentős részét jogosnak tartom. A címdali elírás, a következetlen vegyületnevek és rövidítések, illetve az egyes ábrák és táblázatok hiányos magyarázatai valóban rontják a dolgozat önálló érthetőségét. Azzal is egyetérték, hogy kiterjedtebb rövidítésjegyzéket kellett volna alkalmaznom.

Külön köszönöm a 3. táblázatra vonatkozó észrevételt: a kísérletekben valamennyi felsorolt peptid C-terminálisan amidált volt, amit az értekezésben nem jeleztem. A Lasioglossin III és a Temporin-La töltésértékeit ráadás sikerült felcserélnem a táblázatban, a helyes értékek rendre +6 és +3 (pH 7-en, amidált C-terminussal).

1. „A suramin egy évszázados szintetikus gyógyszer, amelyet elsősorban parazita-fertőzések, például az afrikai álmokró és a folyami vakság kezelésére alkalmaznak. Bár nem klasszikus antibiotikum, molekuláris szinten sokrétű antimikrobiális, vírusellenes és daganatellenes tulajdonságokkal is rendelkezik. A baktériumok és a paraziták (élősködők) egyaránt mikroszkopikus vagy nagyobb méretű élőlények, amelyek betegségeket okozhatnak, ám biológiai felépítésük és életmódjuk alapvetően eltér egymástól. A suramin hatóanyag (nátriumsó formájában) egy erős hatású szer, amelyet szigorú orvosi felügyelet mellett, többnyire kórházi körülmények között adagolnak. Súlyos mellékhatásokat is okozhat, ezért alkalmazása előtt alapos kockázat-előny mérlegelés szükséges. A hatóanyagot intravénás injekció formájában, kizárólag kórházi körülmények között, szoros orvosi felügyelet mellett adják be. Talán érdemes lett volna írni a suraminról a dolgozatban. Ezek alapján miért a suramint használta a kísérletekben, amikor azt is írja, hogy kölcsönhatások megjelenhetnek pl. étkezéssel bevitt mesterséges kismolekulákkal is vagy terápiás együtt adás esetén. Miért nem az előbbiekből választott (pl. tartazin, mint a későbbi kísérletben)? A suramin a második eset lehetne. Akkor viszont az asszociátumok képződését célszerű lett volna a lehetséges terápiás körülmények között vizsgálni. Azt is írja a suraminról, hogy a középső apoláros rész felelős inkább a kötődésért. Lehet, hogy a bázikus aminosav nem tudja lecserélni a Na⁺-t a suraminban? Ez kérdés lehet később a tartazinnál is?”

Köszönöm a kérdést. Először is köszönöm a suramin részletes bemutatását. A molekula modellvegyületként történő kiválasztását ugyan röviden megemlítem, de jogos a megjegyzés, hogy a suraminról részletesebben is írhattam volna. Azért fókuszáltam inkább a peptidek bemutatására, mert ha a suramin háttérét részletesebben tárgyalom, esetleg indokolt lehetett volna a többi kismolekulát is hasonlóan felfeztetni. Ez azonban elvonta volna a hangsúlyt a dolgozatban ezek elsősorban komplexképző és szerkezetmoduláló tulajdonságairól. A suraminra többek között azért esett a választás, mert erősen anionos szerkezete alkalmassá tette a pozitív töltésű CM15-tel kialakuló kölcsönhatások kezdeti vizsgálatára. Különösen kedvezőnek tűnt, hogy a poliszulfonált molekula hat negatív töltése nagyságában megegyezett a rendelkezésre álló CM15 peptid pozitív töltésével. A később alkalmazott élelmiszer-adalékok, kvórumérzékelő molekulák, valamint jelátviteli lipid molekulák kiválasztását szintén hasonló szerkezeti és összetételi megfontolások vezérelték.

A CM15–suramin rendszer vizsgálatakor elsősorban az érdekelt, hogy a suramin által indukált helikális konformáció milyen funkcionális változást eredményez az antimikrobiális peptidben. Azt tapasztaltuk, hogy a komplexképződés csökkenti a CM15 antibakteriális és citotoxikus hatását, így ebben az esetben szinergiáról nem beszélhetünk. Ugyanakkor ez a gátló hatás más biológiai környezetben előnyös is lehet: később kimutattuk, hogy a suramin jelentősen mérsékli az LL-37 és az FK-16 nem kívánt emlőssejt-károsító hatását (Quemé-Peña és mtsai, ACS Pharmacology & Translational Science, 2020). Ezzel szemben a DHVAR4–tartrazin rendszerben a komplexképződés az antibakteriális aktivitás növekedését eredményezte (Ricci és mtsai, Quarterly Reviews of Biophysics, 2020).

Fontos különbséget tenni a közvetlen komplexképződés és két hatóanyag együttes alkalmazása között. Az utóbbi esetben a szinergia gyakran abból ered, hogy a vegyületek különböző molekuláris célpontokon vagy biokémiai folyamatokon keresztül hatnak, anélkül, hogy feltétlenül komplexet képeznének egymással. Vizsgálataink ezzel szemben elsősorban a közvetlen molekuláris kölcsönhatások funkcionális következményeire irányultak.

A suramin saját mellékhatásainak esetleges csökkenését nem vizsgáltuk, mivel az túlmutatott a kutatás célkitűzésein. Ennek érdemi megítéléséhez in vivo vizsgálatokra lett volna szükség, célszerűen a Professzor úr által is említett parazita-fertőzés megfelelő állatmodelljében.

Érdekes felvetés, hogy a suraminhoz kapcsolódó Na^+ -ionok akadályozhatják a pozitív töltésű aminosav-oldalláncok kötődését, és eredményeinkben esetleg emiatt tűnhet kevésbé dominánsnak az elektrosztatikus kölcsönhatás szerepe. Ezt a lehetőséget kísérletileg külön nem vizsgáltuk; a CM15–suramin kölcsönhatásokat molekuladinamikai számításokkal elemeztük. A kapcsolódó közleményben a kölcsönhatás energetikáját 1:1 arányú komplexeken végzett hagyományos MD-szimulációkban vizsgáltuk, melyben azonban nem szerepeltek Na^+ -ionok. Ezek az eredmények rámutattak arra, hogy a suramin negatív töltésű csoportjai és a peptid bázikus oldalláncai közötti elektrosztatikus vonzás mellett a suramin semleges központi részének is jelentős szerepe van. A számítások másik fontos és szintén meglepő eredménye: a suramin nem elsősorban a helikális konformáció kialakulását segíti elő, hanem inkább a már kialakult helikális konformációt stabilizálja a peptidben (Kohut és mtsai, PCCP, 2019). A tartrazin esetében is jogos a felvetés, hogy hasonló energiataakat kapnánk-e, de ennek vizsgálata nem szerepelt a disszertáció célkitűzéseiben.

2. „Miből adódhat a DHVAR4-TZ komplexek szelektivitása a baktérium sejteken a humán sejtekkel szemben? Nem lehetne a kölcsönhatásokat szofisztikáltabb módszerekkel vizsgálni, mint a CD, hogy egyértelműbb válaszokat kapjanak a szerkezet-hatás összefüggésekre? (A C15-Sur esetében is).”

Köszönöm a kérdést. A szelektivitás egyik valószínű oka a bakteriális és az emlőssejt-membránok eltérő összetétele és felszíni töltése: a negatívabb töltésű bakteriális felszín kedvezhet a kationos peptid–festék komplexek kölcsönhatásának. Kísérleteinkben a tartrazin fokozta a DHVAR4 antibakteriális hatását, miközben a vizsgált humán sejtekben nem növelte a citotoxicitást. Ez azonban még nem ad teljes molekuláris magyarázatot a szelektivitásra.

Egyetértek, hogy a CD önmagában nem elegendő, viszont éppen ezért vizsgáltuk ebben a kapcsolódó tanulmányban a DHVAR4–tartrazin rendszert NMR-rel, infravörös spektroszkópiával, fényszórással, elektron- és fluoreszcencia mikroszkópiával, valamint bakteriális és humán sejttesztetekkel. A CM15–suramin rendszernél pedig molekuladinamikát és membránmodelleket is alkalmaztunk. Meg kell említenem, hogy további szerkezetvizsgálati próbálkozásaink is voltak, hiszen az atomi szintű betekintés sokat segített volna a komplexképződés és a másodlagos szerkezetet indukáló hatás jobb megértésében. Röntgenkristallográfiai kísérleteink azonban nem jártak sikerrel: nem tudtunk kristályokat növesztetni ezekből a rendszerekből, noha több módszerrel is próbálkoztunk Dr. Harmat Veronika segítségével. NMR-kísérleteinket Bodor Andrea professzor asszonnyal közösen végeztük, azonban a komplexek esetében nem sikerült elegendő szerkezeti információt nyernünk. A komplexek az NMR mérésekhez szükséges koncentrációkban gyakran kicsapódtak (mikroprecipitátumot képeztek), lipid kettősrétegek jelenlétében pedig a komplexebb mérési körülmények miatt nem vizsgáltuk a dolgotban szereplő rendszereket.

3. „Van-e elképzelés arra, hogy a tervezett nanocsöveket milyen terápiás célra lehetne használni?”

Köszönöm a kérdést. Azt fontos hangsúlyoznom, hogy a hivatkozott nanocsővizsgálatban nem kész terápiás konstrukciót terveztünk vagy állítottunk elő, hanem α - és β -peptid alapú, hordószerű nanoszerkezetek stabilitását hasonlítottuk össze kvantumkémiai módszerekkel. A cél a későbbi molekuláris tervezéshez szükséges szerkezeti szempontok azonosítása volt.

Hosszabb távon az ilyen csőszerű rendszerek membráncsatornaként vagy szabályozott anyagtranszportot biztosító nanostruktúrákként lehetnek érdekesek. Ezek azonban alkalmazási lehetőségek, nem igazolt terápiás funkciók; előbb a tényleges előállíthatóságot, stabilitást, szelektivitást és biokompatibilitást kellene bizonyítani (Beke és mtsai, ACS Nano, 2008). Ennek a kezdeti kvantumkémiai tanulmánynak köszönhető azonban, hogy később felfedeztük a lamelláris morfológiát formáló β -peptideket. Eredetileg ugyanis kísérleti úton szerettük volna vizsgálni az esetleges nanocsövek kialakulását, ám ilyen szerkezeteket nem sikerült előállítanunk. Ennek oka egyrészt a szintetikus korlátokban, másrészt az alternáló kiralitásmintázatú szekvenciák energetikailag kedvező zig-zag konformációjában keresendő.

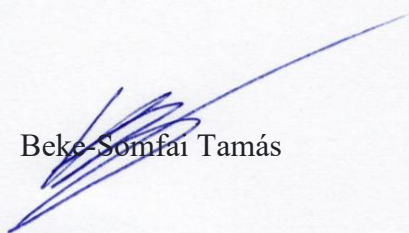
4. „Lamellin β -peptidek környezetérzékeny asszociációja című fejezetben (D10) ha jól értem PBS-ben kialakulnak a szupramolekuláris lamellák, de vízben hatékonyabb az anyag. Talán azért, mert a membránokkal kölcsön hatva elindul a szupramolekuláris lamella képződés, ami benő a membránba, kilyukasztva azt és elkezd az extracelluláris mátrix kiszivárgása. Ezek szerint a PBS-ben ez a membrán átlukasztás (talán mert a lamellák már az extracelluláris mátrixban kialakulnak és nem történik meg a membránba való benövés), nem olyan sikeres, ez okozhatja a kisebb hatást. Akkor

viszont az a kérdés, hogy ez hogy működhet egy in vivo rendszerben, mint terápiás készítmény? A szerkezetvizsgálaton kívül van-e más pozitív hozadéka ennek a kutatási résznek?”

Köszönöm a kérdést. A felvetett, PBS-re vonatkozó értelmezés lehetséges, magam is hasonlóan értelmeztem a jelenséget, de közvetlen bizonyítékunk nincs rá. A kísérlet célja éppen az volt, hogy megvizsgáljuk: foszfátmentes vízben a 3K önmagában kevésbé szerveződik, az E. coli felszínén lévő LPS foszfátcsoportjai viszont elősegíthetik a lamellák helyi kialakulását. Az elektronmikroszkópiás vizsgálatok ezzel korábban nem látott, közvetlen betekintést adtak a szupramolekuláris peptidrendszer antimikrobiális hatásmechanizmusába. PBS-ben valóban már az oldatban is képződnek asszociátumok; ez hozzájárulhat a kisebb antibakteriális hatáshoz, de a különbséget nem vezettük vissza egyetlen bizonyított mechanizmusra, és a PBS-ben kezelt baktériumokról TEM- és krio-EM-felvételeket sem készítettünk. Azóta azonban további kísérleteket végeztünk többféle közegben, komplexebb körülmények között, többek között a LB (Lysogeny Broth, más néven Luria–Bertani) médiumban, ahol a 3K szintén aktív volt.

A munka eredménye így nemcsak szerkezeti jellegű: új, környezet által kiváltott membránroncsolási mechanizmust és in vitro antibakteriális szelektivitást mutatott. In vivo terápiás alkalmazhatóságot azonban még nem igazoltunk; ehhez további vizsgálatok és mindenekelőtt szekvenciafejlesztés is szükséges. A 3K hatása jelenleg azért figyelemre méltó, mert ha eltekintünk az N-terminális csavarodást finomhangoló résztől, valamint az alternáló kiralitási mintázat alkalmazásától, akkor egy roppant egyszerű szekvenciát kapunk. Éppen ezért a jövőbeni fejlesztéstől az aktivitásértékek javulását remélhetjük, ami in vivo körülmények között is kedvezőbb hatást eredményezhet. Érdemes azt is figyelembe venni, hogy a klinikai gyakorlatban alkalmazott peptidalapú antibiotikumok (pl. kolisztin, polimixin B) E. coli ellen mért aktivitás értékei viszonylag közel esnek a 3K általunk mért aktivitásértékeihez.

Budapest, 2026. október 16.



Beke-Somfai Tamás