

## Válasz Prof. Zimányi László kérdéseire

Hálásan köszönöm Zimányi professzor úrnak, hogy disszertációm bírálatát elvállalta, a méltató szavakat és a gondolatébresztő kérdéseket. Válaszaim a kérdésekre az alábbiak.

1. Az interleukin receptorok fluoreszcenciamikroszkópos vizsgálatai általában a membránra merőleges megfigyelési irányból történtek. Mennyire lehetünk biztosak abban, hogy a kvantitatív fluoreszcencia-emissziós (és FRET) mérésekben a fényemisszió irányfüggését nem kell figyelembe venni?

A kérdéssel az elsők közt D. Axelrod közleménye foglalkozott (Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization, Biophys J, 1979, 26:557-573).

Előre bocsátva, a nagy numerikus apertúrájú objektív használata és a molekuláris sokaságon történő átlagolódás ugyan nem szünteti meg, de jelentősen csökkenti az irányfüggést.

A választ két részre bontom, a gerjesztésre, illetve az emisszióra és annak detektálására. A gerjesztő lézertény a konfokális mikroszkópban síkban polarizált. A gerjesztő fotonok elektromos vektora a fedőlemezzel (sejtmembránnal) párhuzamos, illetve ettől az objektív fénylásszögének megfelelő értékkel térhet el maximálisan, ami egy NA 1,2 vízimmerziós objektívénél kb.  $64^\circ$ . A konfokális mikroszkópos mérésekben Alexa vagy Cyanine festékekkel jelölt antitesteket vagy pedig fluoreszcens fehérjéket használtunk. A gerjesztett fluorofórok jó közelítéssel random orientációjúnak tekinthetők annak köszönhetően, hogy maguk a membránfehérjék a membrán síkjában szabadon rotálhatnak, az FP-k flexibilis linker-rel kapcsolódnak a membránfehérjéhez, illetve az antitestek maguk is flexibilisek és az azokat jelölő festékek több aminosav valamelyikéhez kapcsolódhatnak, valamint az antitesthez képest egy kúpon belül szabadon mozoghatnak („wobbling”). A randomnak tekinthető orientációjú fluorofór populációból történik a fotoszelekció, aminek emisszióját a gerjesztést is végző objektív gyűjti össze. A gerjesztés hatékonysága irányfüggő lehet, ha a festékek a membránhoz képest rögzített orientációjúak. Ez a helyzet egyes membránjelölőknél, pl. a DiI C18 carbocyanine festéknél, ami egy zsírsavláncon keresztül kapcsolódik a lipid kettősréteghez, és a fluorofór orientációja közel párhuzamos a membrán síkjával és limitált rotációs mobilitással rendelkezik. A sejt középsíkjában mérve, ahol a membrán gyűrűszerűen jelenik meg, a membrán két átellenes pontján az intenzitás igen alacsony érték – itt a festék abszorpciós dipólusa kb. merőleges a gerjesztő fotonok elektromos vektorára, eltekintve a nagy NA-ból adódó eltéréstől (Axelrod idézett cikke, 6. ábra). Ez a szélsőséges irányfüggés azonban nincs jelen, ha a fókusz sík a sejtmembrán

fedőlemezhez kitapadó síkjában helyezkedik el és a molekulák a polarizáció irányához képest tetszőleges orientációt felvehetnek. Kísérleteink közül legnagyobb eséllyel az immunszinapszisban végzett vizsgálatok esetében fordulhatott elő a receptorok rendezett orientációja.

A kérdés másik része az emisszió irányfüggése. A festék nem minden irányban azonos intenzitással bocsát ki fluoreszcenciát (a kibocsátás intenzitása az adott irány emissziós dipólusával bezárt szög szinusznégyzetével arányos). Ha a molekula rotációs korrelációs ideje jóval rövidebb a fluoreszcencia élettartamánál, akkor az emisszió izotróppá válik, de ha ez nem teljesül, akkor az emisszió irányfüggő intenzitású és polarizált is marad. Egy GFP molekula rotációs korrelációs ideje kb. 20 ns (Swaminathan R, *Photochemical properties of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and transfected CHO cells: analysis of cytoplasmic viscosity by GFP translational and rotational diffusion. Biophys J.* 1997;72:1900–1907), ami jóval hosszabb a fluoreszcencia élettartamánál (<3 ns). Az antitesthez kötött Alexa festékek fluoreszcencia anizotrópia lecsengése két, kb. azonos amplitúdójú rotációs korrelációs idővel jellemezhető, a rövidebb, 1 ns körüli a festéknek az antitesthez képesti mozgásából egy kúp belsejében („wobbling”), a hosszabb, 10-30 ns közötti pedig az antitest flexibilitásából és saját mozgásából adódik (Hajdu T, Fluorescence labeling-induced structural rearrangement of a monoclonal IgG revealed by biophysical experiments and simulations, *Int J Biol Macromol*, 2025, 321:146209). Így mindkét esetben – az FP-k esetén valamivel nagyobb mértékben – irányfüggő intenzitású és polarizált marad az emisszió. Az intenzitás irányfüggését és a polarizációt is jelentősen csökkenti a nagy numerikus apertúrájú objektívvel történő gerjesztés, ami több irányból gerjeszt és ugyanilyen széles térszögben gyűjti az emissziót. Molekulasokaságon végzett méréseknél, ha a minta nem kifejezetten rendezett, az emisszió irányfüggése feltehetően másodlagos jelentőségű.

Egyedi molekula mérésekben ezeket a hatásokat azonban figyelembe kell venni, sőt éppen ez hordoz extra információt a molekula orientációjáról, amit a „single molecule orientation localization microscopy”-ban ki is használnak (Zhang O, Single-molecule orientation-localization microscopy: Applications and approaches. *Quarterly Reviews of Biophysics* 2024, Brasselet S, Single-molecule orientation and localization microscopy. *Nature Photonics*, 2025).

Végezetül - bár a kérdés nem erre vonatkozott - maga a FRET hatásfok függ a donor és az akceptor dipólmomentumainak relatív orientációjától – ezt fejezi ki az ún.  $\kappa^2$  faktor – és ez nem is kifejezetten a konfokális mikroszkópiás detektáláshoz kapcsolódó kérdéskör. A  $\kappa^2$  értéke 0 és 4 között változhat; abban az esetben, ha legalább a donor orientációja dinamikusan randomizáltnak tekinthető – azaz ha olyan gyorsan forog a fluorofór, hogy a fluoreszcencia emisszió lecsengése során minden pillanatban random orientációjú a gerjesztett donor-sokaság -, akkor a  $\kappa^2 = 2/3$  becsléssel szoktak élni (ami pl. FP-knél nem teljesül). Többek közt ezért is óvatosan kell bánni a FRET hatásfok távolsággá konvertálásával.

## 2. A konfokális sík és a megfigyelő között lévő mintán a fényszórás és az esetleges reabszorpció hatása, kvantitatív vizsgálatokban, teljesen elhanyagolható?

Kísérleti körülményeink között a reabszorpció nem jelentős. Méréseink során egy rétegben kitapadt sejteket használtunk. Egyetlen sejtrétegben az optikai úthossz legfeljebb a sejt magassága, a festékkoncentráció pedig szub-mikromólos, kivételes esetekben néhány mikromólos volt (legalábbis, ahol meghatároztuk). Példaként vegyük az EGFP-t:  $\epsilon_{\text{max}}=56000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  488 nm-nél, ennek kb. ötöde az emissziós tartományban (500-530 nm), ahol reabszorpció felléphet, az optikai úthossz  $l=10 \mu\text{m}=0,001 \text{ cm}$ ,  $c=10^{-5} \text{ M}$ ; ekkor  $A \sim 10000 \cdot 10^{-5} \cdot 0,001 = 0,0001$  – tehát a reabszorpció mérési körülményeink közt nem jelentős. Fényszórás viszont jelen van, főként a belső membránrendszereknek köszönhetően – áramlási citometriában ezt a jelet detektáljuk is. Ennek hatása miatt a PSF a fedőlemeztől távolabbi részeken kiszélesedhet, torzulhat, a felbontás romolhat, illetve a detektált intenzitás is alacsonyabb lehet a gerjesztés és az emisszió szóródása miatt. Ennek hatása vastagabb szövetmetszetekben vagy szferoidokban jelentősebb.

## 3. A FRET hisztogramokban megjelenik a negatív energiaátadási hatékonyság tartománya. Hogyan lehet ilyen értékeket mérni, mi ennek a látszólagos ellentmondásnak a feloldása?

A negatív FRET oka elsősorban az E paraméter számítási hibája főként olyan esetekben, ahol az átlagos FRET hatásfok nullához közeli érték. Az intenzitás alapú FRET mérésekben 3 csatornában mért intenzitásokból (a disszertáció I1, I2, I3-ra felírt, 3. számú egyenletrendszere) határozzuk meg a FRET hatásfokot úgy, hogy az intenzitásokból először levonjuk a megfelelő csatornában mért autofluoreszcenciákat. Utóbbiakat általában jelöletlen sejtpopuláció átlagaként (B1, B2, B3), nem pedig sejtenként határozzuk meg. A negatív FRET értékek elsősorban ezen 6 intenzitásérték mérési szórásából származnak. A hibához hozzájárul, hogy az autofluoreszcencia sejtenként variabilitása miatt a populációátlagok nem egyenlőek az adott sejt tényleges autofluoreszcencia intenzitásaival. Az ebből adódó hiba csökkenthető, ha az autofluoreszcenciát sejtenként becsüljük. Erre lehetőség van az autofluoreszcencia intenzitás mérésével egy további, negyedik csatornában (pl. UV gerjesztéssel). Mivel a különböző csatornában mért autofluoreszcencia jelek elég jól korrelálnak, a sejtenkénti autofluoreszcencia intenzitásokra (az I1, I2, I3 csatornában) a negyedik csatornában mért intenzitás alapján viszonylag jó becslést kaphatunk. Az autofluoreszcencia sejtenkénti vagy pixelenkénti meghatározásával az E hisztogramok szélessége csökkenthető és az eloszlások negatív tartománya kisebb lesz (Sebestyén Sebestyén Zs és mtsai: Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence

significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. Cytometry, 48: 124-35, 2002, illetve Rebenku István és mtsai: Pixel-by-pixel autofluorescence corrected FRET in fluorescence microscopy improves accuracy for samples with spatially varied autofluorescence to signal ratio. Sci. Rep. 2023, 13:1-15, cikkazonosító: 2934). A disszertációban szereplő cikkekben nem alkalmaztuk a sejtenkénti/pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciót.

A FLIM mérésekben a számolt donor élettartamok eloszlásának véges szélessége a fentiekhez hasonlóan eredményezhet látszólagos negatív FRET hatásfokot egyes sejteknel. A referenciaként használt magányos donor intenzitását nem tudjuk a donor-akceptoros mintában megmérni, a csak donoros mintákon mért átlagos fluoreszcencia élettartamot használjuk az  $E=1-\tau_{DA}/\tau_D$  képletben. Egyes donor-akceptoros sejtekben a mért élettartam - az illesztés hibájából vagy tényleges sejtenkénti variabilitás miatt - lehet nagyobb, mint a csak donoros minták átlagos  $\tau_D$  értéke, negatív látszólagos FRET hatásfokot eredményezve. Nyilván egy ilyen sejtben a magányos donor élettartama hosszabb lenne, mint az akceptor jelenlétében mért élettartam, de ez az információ sejtenként nem áll rendelkezésre. Intracelluláris mérésnél ezen kívül előfordulhat, hogy a donor festék élettartama a FRET-től különböző egyéb ok – pl. EGFP esetén pH különbség – miatt változik egy adott sejtben, ami szintén okozhatja a látszólagos negatív FRET-et.

4. A dolgozatban számos példa szerepel FRET donorral és akceptorral jelölt, összeszerelődött fehérjékre, illetve alegységekre. Van-e olyan konkrét eset, amikor ezek eléggé pontos szerkezetének ismeretében – ismerve a fluoreszcens jelölő fehérjék spektrális adatait és szerkezetét is - ki lehetne számolni a FRET hatásfokát és a donor élettartamára kifejtett hatását? Vannak-e esetleg olyan elméleti tanulmányok az irodalomban, amiket össze lehet hasonlítani a jelölt által mért kísérleti paraméterekkel?

A FRET hatásfok jóslásának elvileg nincs akadály, ha bizonyos feltételek teljesülnek. Szükség van arra, hogy a fehérjék ne rendezetlenek legyenek – ez pl. nem igaz egy teljes hosszúságú magreceptorra vagy a teljes hosszúságú Fos/Jun dimerre – de teljesül pl. az általunk is vizsgált, C-terminálisán rövidített Fos215-re és Jun-ra. Figyelembe kell venni a fehérje és a fehérjét az FP-hez kapcsoló linker lehetséges konformációit, ezt ún. rotamer könyvtárak segítségével lehet hatékonyan megtenni. A lehetséges konformációkra ki lehet számítani a FRET hatásfokokat az orientáció figyelembe vételével és ki lehet számítani ezeknek az előfordulási valószínűségekkel súlyozott átlagát. Ilyen számításokat, és erre alkalmas programokat közöltek az irodalomban (exiFRET, thetaFRET, <https://karri.anu.edu.au/exifret/userguide.html>, <https://karri.anu.edu.au/exifret/thetafret/index.html>). Az általunk vizsgált fehérjékre nem találtam ilyen számításokat.

A Dr. Komáromi István által végzett MD szimulációk szerint a teljes hosszúságú c-Fos C-terminális szakasza rendezetlen, viszont a C-végen megrövidített c-Fos215 homodimer vagy Fos215/Jun heterodimer szerkezete jól jósolható volt. Ezeknél a dimereknél a szimulált konformációk egy kis tartományban fluktuálnak. Ilyen és hasonló esetekben lehetséges becslést tenni a FRET hatásfokra.

5. A jelölt szerint a kolokalizációt célzó kísérletekben jelentene-e előrelépést valamelyik szuperrezolúciós technika, illetve a kétfotonos (azaz infravörös) gerjesztés? Vannak-e ilyen tervek vagy a dolgozatból kimaradt újabb eredmények?

A kolokalizációs kísérletekben egyértelmű előrelépést jelent a szuperfeloldású mikroszkópiák használata, hiszen az általunk is vizsgált fehérjeklaszterek mérete kisebb lehet, mint 200 nm. STED mikroszkópiát használtunk IL-R/MHC klaszterek vizsgálatára (Mocsár G Biophys J 2016). Azóta több célra is használtunk STED-et, illetve dSTORM-ot: pl. kimutattuk, hogy B-sejtek mikrovillusain az MHC I/II és az IL-15R $\alpha$  kolokalizálódik, így a prezentáló sejt és a T-sejt közötti első kontaktus létrejöttékor az antigénprezentáció és az IL-15 transzprezentáció együttesen is lejátszódhat (előkészületben). Vizsgáltuk, hogy membrán bleb-eken az MHC/IL-R klaszterek mérete csökken, ami valószínűsíti, hogy azok fenntartásában a citoszkeletonnak is szerepe van (<https://www.researchsquare.com/article/rs-3835276/v1>). Jellemzően a STED-del felvett képekből számított Pearson korrelációs együtthatók kisebbek, mint a konfokális képekből számítottak, mivel két fehérje nem foglalhat el azonos térrészt, és ez jobban érvényre jut jobb felbontás mellett. A 2-3 nm felbontóképességű MINFLUX mikroszkópia és a DNA-PAINT technika kombinációjával RXR oligomereket sikerült közvetlenül kimutatnunk kollaborációs partnerünk, Prof. Jerker Widengren (KTH Stockholm) munkacsoportjával (előkészületben).

A kétfotonos gerjesztés vastagabb minták vizsgálata esetén – akár szuperfeloldású mikroszkópiával kombinálva szintén előrelépést jelenthet.

6. A 40. ábrán és további hasonló ábrákon úgy látszik, hogy a fluoreszcencia korrelációval kimutatott fehérjediffúziós idők lognormális eloszlásúak. Ennek mi a fizikai háttere?

Valóban általában lognormálishoz hasonló a diffúziós idők eloszlása. A diffúziós idők nagy szórását több tényező okozhatja: a) egyrészt a molekulapopuláció heterogenitása, b) másrészt a sejt inhomogenitása, c) harmadrészt a sejtek közötti eltérések.

- a) Ha egyetlen pontban mérünk több autokorrelációs görbét, ezek közt is eltérés van, mert a rövid, néhány másodperces mérési idő alatt pl. egy magreceptornak különféle kölcsönhatásokban résztvevő komplexei diffundálhatnak át, vagy sztochasztikusan

változhat a tranziens DNS-kötődés időtartama. Egy gyenge kölcsönhatás időtartamának eloszlását exponenciális függvény írja le.

- b) A sejt különböző pontjaiban eltérő lehet a mikroviszkozitás.
- c) Különböző sejtekben változhat a vizsgált molekula expressziója, illetve az interakciós partnerek expressziója is. Érdeemes megjegyezni, hogy számos fehérje expressziós szintje is lognormális eloszlást mutat, így az áramlási citometriában a fehérjeexpressziókat általában logaritmikus skálájú hisztogramokon jelenítik meg.

7. Fennáll-e annak a veszélye, hogy a ko-expresszált fluoreszcens fehérjék befolyással lehetnek a célfehérje működésére? Egy konkrét példa: a magreceptorok N-terminálisán lévő, ligandtól független transzaktivációért felelős régió (AF-1 régió) működésére, ami számos kofaktorral kölcsönhat, az N-terminálishoz kötött EGFP fehérje? Úgy általában, mennyire lehetünk biztosak abban, hogy egy célfehérjéhez ilyen módon kötött fluoreszcens fehérje nincs hatással a célfehérje konformációjára és kölcsönhatásaira?

Általában véve a fehérjék doménszerkezete – azaz, hogy a különböző régiók autonóm módon feltekerednek és ellátják funkciójukat – ad valamennyi biztosítékot arra, hogy egy további, megfelelő flexibilis linkerrel hozzátoldott domén nem befolyásolja jelentősen a kölcsönhatásokat és a funkciót, de ezt mindig célszerű ellenőrizni. A magreceptoroknak a ligand-aktivációt követő működését vizsgáltuk, ezért helyeztük a fluoreszcens fehérjét inkább a ligand-független aktivációért felelős N-terminális AF-1 domén elé, mint a C-végen elhelyezkedő, ligand-függő AF-2 mögé. Az EGFP-RAR és az EGFP-RXR esetében ellenőriztük az EGFP-vel jelölt receptorok DNS-kötő képességét a válaszadó doménjükhöz ún. tranziens transzfekciós kísérletekkel, melyekben a válaszadó elem után elhelyezett riporter gén expresszióját mértük. Ezekben a kísérletekben az RAR a  $\beta$ -galaktozidáz génje előtt elhelyezett retinsav válaszadó elemhez (RARE) kötődik, aminek eredményeként a beta-galaktozidáz kifejeződik, és ennek termelődését mérjük kolorimetrikus eljárással. Ez nem mutatott szignifikáns változást a vad típusú RAR-hez képest. Az eredmény a Brázda és mtsai, Journal of Cell Science 2011, 124:3631–3642 közlemény Fig. S5 kiegészítő ábráján látható (az értekezés 284. oldalán).

8. A dolgozat sok fluoreszcencia-autokorrelációs görbét mutató ábrát tartalmaz. Ezek egyik csoportjában az illesztés a (18) – (21) képletek alapján, a triplet állapot és a molekuláris „blinking” figyelembevételével történt. Más hasonló mérések kiértékelésekor mintha nem kellett volna figyelembe venni egyik járulékos folyamatot sem. Mi ennek az oka?

A dolgozatban elsősorban EGFP-t használtunk magreceptorok és Fos/Jun, illetve Alexa festékeket membránfehérjék FCS méréseire.

Az EGFP többféle fotofizikai, fotokémiai folyamat révén kerülhet „sötét állapot”-ba, amelyben nem emittál. A triplet állapot mellett leírták a pH-függő és pH-független (saját aminosavtól származó) protonálódását (Haupts és mtsai, Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy, PNAS, 1998, 95:13573-8). A triplet 2-3  $\mu$ s-os, a „belső” protonálódás a fenti közlemény szerint  $341 \pm 48$   $\mu$ s korrelációs idővel, míg a pH-tól függő időállandója 50-450  $\mu$ s között változik a pH 5-9 tartományban. Mi az EGFP esetében a triplet mellett egy néhány 100  $\mu$ s-os „blinking” időt illesztettünk. Az irodalomban változó, hogy csak a triplet, vagy más blinking időt is illesztenek, ennek jelentősége a szub-milliszekundomos diffúziós idők esetén nagyobb.

Az Alexa festékeket, elsősorban az Alexa Fluor 488-at az Fab-val jelzett membránfehérjék FCS vizsgálatakor használtuk. Az Alexa 488 esetében ~2-3  $\mu$ s-os triplet korrelációs idő jellemző, viszont a festéknek nincs az EGFP-hez hasonló hosszabb időállandóval jellemezhető sötét állapota. Mivel a membránfehérjék jellemzően legalább 10-100 ms-os diffúziós idővel rendelkeznek, az autokorrelációs görbe kezdeti,  $\mu$ s-os tartománya akár teljesen el is hagyható, ami nem befolyásolja lényegesen a diffúziós idők illesztését az ACF további részében. A konfokális térfogat Alexa Fluor 488-as festékkel történő kalibrálásakor azonban figyelembe kell venni a triplet állapotot, mivel a szabad festék diffúziós ideje 20-30  $\mu$ s körüli érték.

A SPIM-FCS méréseknél a képeket 0,5 ms-onként rögzítettük, így a gyors fotofizikai/fotokémiai folyamatok nem jelennek meg az ACF-ben.

Végül a keresztkorrelációs függvényekben, melyek két különböző festék jeléből származnak, nem jelennek meg az egyes festékeket egymástól függetlenül befolyásoló (pl. triplet, blinking) folyamatok, hiszen, ha mindkét festékben ki is alakul pl. triplet állapot, azok létrejötte időben egymással nem korrelál.

9. Az interleukin receptorok és az MHC komplexek együttállását lipid tutajokban alaposan igazolja a dolgozat. Mivel az MHC-I komplex mennyisége nem tűnik sztöchiometrikusan meghatározottnak, felmerül a kérdés, hogy ezeket az együttálló komplexeket a fehérjék doménjei felületének közvetlen kölcsönhatása idézheti-e elő, akár a membránban, akár a folyadékfázisban, vagy pedig a tutajok különleges összetételét alkotó lipidek, „ragasztóként” közvetítik a kölcsönhatást. Van-e erre vonatkozóan adat? Létezik-e a részt vevő fehérjék 3D szerkezetén alapuló dokkolási, molekuladinamikai modellezés az esetleges direkt kölcsönhatásukra? Az MHC-I könnyű láncának géncsendesítése lehet-e hatással a membrán lipidösszetételére és ezzel a lipid tutajokra?

A kérdés nagyon érdekes. Nem tudok az IL-R/MHC kölcsönhatásokkal kapcsolatos dokkolási vagy MD szimulációs számításokról, de érdemes lenne ezt megpróbálni (kollaborációs partnerek bevonásával). Vereb György és mtsai (Cholesterol-dependent clustering of IL-2R $\alpha$  and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. PNAS, 2000, 97: 6013-8) kimutatták, hogy Kit 225 K6 T limfóma/leukémia sejteken a membrán koleszterin-tartalmának metil- $\beta$ -ciklodextrinnel (MBCD) történő csökkentése (vagy a koleszterin molekulák filippinnel való keresztkötése) a lipid tutajok kontúrjainak elmosódásához, a lipid tutajokban feldúsuló IL-2R $\alpha$ , MHC I/II és CD48 klaszterek méretének kiterjedéséhez, immunarany jelölés alapján pedig az azokban található fehérjesűrűség csökkenéséhez vezetett. Tehát valószínű, hogy a lipid környezet a nagyobb, több száz nm-es klaszterek stabilitásában szerepet játszik. Matkó János, Bodnár Andrea és mtsai (GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. Eur J Biochem, 2002, 269: 1199-208) pedig kimutatták, hogy az MBCD kezelés csökkenti az IL-2R $\alpha$  és az MHC II vagy CD48 között mért FRET hatásfokot, azaz a lipid környezet a közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatások szintjén is befolyásolja a klaszterizációt. Annak eldöntésére, hogy a koleszterin vagy más lipidek olyan környezetet teremtenek-e melyben a fehérjék közötti kölcsönhatási energiák mélyülnek, vagy pedig maguk a lipidek közvetítik a kölcsönhatásokat ragasztóanyagként, MD szimulációkkal lehetne vizsgálni. A fehérjék közti közvetlen kölcsönhatásokat klasszikus ko-immunprecipitációs kísérletekkel is lehetne vizsgálni.

10. Az interleukin receptorok és MHC komplexek ko-lokalizációját két szinten mutatja ki a szerző. A nagyobb méretek szintjén is talál, STED mikroszkópiás módszerrel, lazább szuperklaszttereket. Mennyire lehetünk ebben a szerveződésben biztosak, figyelembe véve, hogy a teljesen homogén eloszlás megfigyelésének valószínűsége jóval kisebb, mint valamilyen spontán, látszólagos, statisztikai inhomogenitásnak (ld. pl. Gerhard Schütz munkásságát)?

Gerhard Schütz cikkében megmutatja, hogy egy szimulált véletlenszerű (nem homogén) eloszlás az emberi szem számára klaszterizáltnak tűnik. Véleményem szerint a magasabb szinten is fellelhető klaszterizáltság egyik legjobb bizonyítéka az lehet, hogy a klaszterméretek különböző kezelésekkel befolyásolhatóak, így azok valószínűleg nemcsak szubjektív „érzéki csalódások”. Az előző kérdésre adott válaszomban pl. leírtam, hogy az MBCD kezelés hatására megváltoznak, csaknem kétszeresükre (600 nm-ről 1200 nm-re) nőnek, legalábbis a konfokális mikroszkóp felbontása mellett. Hasonló módon, az MHC I géncsendesítése az MHC I szuperklasztterek méretcsökkenéséhez vezetett többféle klaszterméret analízis – intenzitáscsúcsok félértékszélességének mérése, térbeli korrelációs függvény illesztése, összefüggő magas intenzitású pixelek területe – alapján.

11. A 7.3. paragrafus a c-Fos és c-Jun hetero- és homodimerizációját és DNS-kötését tárgyalja. Ezek az eredmények részben a szerző 2008-as Biophysical Journal cikkén alapulnak, amikor a dimer két tagjának 3D szerkezete csak részben volt ismert, és ez a hiányos szerkezeti ismeret képezte a bemutatott molekuladinamikai számítások alapját. Kérdésem, hogy azóta megvan-e a fehérjék teljes(ebb) röntgendiffrakciós, krio-elektronmikroszkópiás vagy legalább AlphaFold szerkezete. Történt-e előrelépés például a fehérjék két végéhez hozzávarrt fluoreszcens fehérjék valószínű távolságának és orientációjának annál pontosabb meghatározására, mint amit a 71. ábrán látunk, és összevetésére a kísérletekkel?

A röntgenkrisztallográfiás eredmények a rendezett bZip DNS-kötő és dimerizációs doménekről adnak információt, feltehetően azért nincs a többi doménről krisztallográfiás adat, mert azok rendezetlenek. Nem találtam sem krio-EM-mel meghatározott Fos/Jun szerkezeteket, sem fluoreszcens fehérjékkel jelölt Fos/Jun molekula szerkezeteket az irodalomban (saját cikkeinken kívül).

Találtam egy AlphaFold-dal létrehozott modellt a teljes hosszúságú c-Fos-ról (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/AF-P01100-F1>), ennek azonban az alfa-helikális bZip doménen kívüli részeinek megbízhatósága alacsony (Local Distance Difference Test (pLDDT) pontszám 50 és 70 között, „low”, illetve < 40, „very low”). Egy közlemény pedig a különböző Fos és Jun homo és heterodimerek AlphaFold predikcióival foglalkozik (Mitic és mtsai, Assessing the validity of leucine zipper constructs predicted by AlphaFold, Protein Science. 2026;35:e70438). A coiled-coil motívumot alkotó leucin cipzár dimer megbízhatósága magas (pLDDT > 94), de az ezen kívüli területek megbízhatósága itt is alacsony vagy nagyon alacsony, mely utóbbi rendezetlen doménekre utalhat.

Hasonló következtetésre jutottak az MD szimulációkat végző kollaborációs partnereink, Dr. Claus-Wilhelm von der Lieth és Dr. Komáromi István is.

Az AlphaFold2-Multimer program a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat is képes modellezni, melyeket „interface predicted Template Modelling” (ipTM) pontszámmal jellemez 0 és 1 között. Érdekes, hogy a fenti Mitic és mtsai cikk mind a FosB-JunD heterodimerek, mind a FosB-FosB és JunD-JunD heterodimerek esetében hasonlóan magas, 0,7-0,8 közötti ipTM pontszámokat jósolt, noha az irodalom a negatív töltések kedvezőtlen együttállása miatt a FosB homodimer kialakulását korábban elvetette. Ez megerősíti saját eredményünket a c-Fos homodimerizációjára vonatkozóan.

Végezetül még egyszer köszönöm Zimányi professzor úr elgondolkodtató kérdéseit.

Debrecen, 2026. 05. 20.

  
Dr. Vámosi György