

Válasz Prof. Kovács Mihály kérdéseire

Hálásan köszönöm Kovács Professzor úrnak, hogy elvállalta disszertációm bírálatát, az elismerő szavakat, valamint az inspiráló kérdéseket, amelyek a továbblépés lehetséges irányait firtatják. Válaszaim a kérdésekre a következők.

1. A szerző hipotézise szerint az IL-2Ra, IL-15Ra és más transzmembrán fehérjék transzmembrán régiójához közeli régiók töltéeloszlása a membránpotenciáltól függő módon szerepet játszik e fehérjék mobilitásának szabályozásában. Kérem vázoljon fel egy kísérleti tervet ennek a potenciálisan nagy jelentőségű javaslatnak a felderítésére.

A vizsgált mobilitás változást több tényező is okozhatja. Ezek közül az alábbiakkal tervezünk foglalkozni:

- i) Érdemes lenne csökkenteni, illetve növelni a fehérjék dipólmomentumát, hogy az alapkoncepciót, miszerint a dipólmomentumból származó konformációváltozás okozhatja a mobilitás változását, megvizsgáljuk: kicserélni a TM régióhoz közeli töltött aminosavakat más (semleges) töltésűekre, illetve még több töltött aminosavat hozzátenni ezekhez a régiókhoz és megmérni a mutások mobilitását.
- ii) Az FCS a lokális, néhány száz nm-es mobilitást méri a konfokális térfogatban. Érdemes lenne a hosszabb távú, néhány mikrométeres tartományú mobilitást FRAP-pal vizsgálni.
- iii) Alaphipotézisünk a membránpotenciál változás által okozott mobilitásbeli és működésbeli eltérésekre az, hogy a dipólmomentumra ható változó elektromos mező miatt változik a fehérje konformációja. Vizsgálható a fehérje konformáció oly módon, hogy az ec., illetve ic. domén egy-egy aminosavját nem természetes, bioortogonálisan jelölhető aminosavra cseréljük, és közöttük FRET-et mérünk különböző membránpotenciálok mellett.
- iv) A membránfehérjék konformációja oly módon is változhat, hogy megváltozik az ic. vagy ec. domének kiemelkedése a membránból. Ez vizsgálható lenne a receptor ec. vagy ic. régiójában a TM domén közelében elhelyezett, bioortogonálisan jelölt nem természetes aminosavak és fejcsoportjukon vagy zsírsavláncukon fluoreszcensen jelölt lipidek, fluoreszcens glikozil-foszfatidil-inozitol horgonyzott mCherry-GPI fehérje közötti FRET mérések segítségével.

- v) A membránfehérjére ható súrlódási erő nagyságát befolyásolhatja a fehérje TM doménje és a lipid kettősréteg közötti felület nagysága, ami függ a lipid kettősréteg vastagságától. Bár becslésünk szerint (Nagy Éva és mtsai, Biophys J, 2018) a depolarizációból származó membránvastagság változás várt értéke csak kb. 1%-ra tehető, érdemes lenne ezt kísérletesen is ellenőrizni. Erre lehetőséget nyújt a MIET vagy a GIET (metal/graphene induced energy transfer), melyek hatótávolsága 20-30 nm, illetve >100 nm, jelentősen meghaladva a FRET hatótávolságát. Ezen módszereknél a fém/grafén felszín működik akceptorként. A fémfelületre vagy grafén felületre kitapasztott sejtek belső, ic. membránfelszíne jelölhető pl. fejcsoportján jelölt PS vagy PE lipidekkel (Avanti) vagy a belső membránfélhez lipid horgonyzással kötődő, GFP-vel ellátott H-Ras/K-Ras vagy Lyn fehérjefragmentumokkal. A membránjelölő fluoreszcencia élettartamát FLIM méréssel meghatározva vizsgálható lenne a fém/grafén felület és a belső membránfél távolsága, ami tükrözné a membránvastagság esetleges változásait. Korábban felvettük a kapcsolatot Prof. Jörg Enderlein-nal (Göttingeni Egyetem), aki a módszer egyik szakértője.
- vi) Szükségesnek tartom molekuláris modellezéssel is vizsgálni a kérdést, ebből a célból Dr. Fehér Bencével (SE Biofizikai Intézet) kezdtünk kollaborációt, aki a membránpotenciál változást szimuláló külső elektromos terek jelenlétében kísérli meg leírni a fehérje mobilitást és a membrán vastagságának változását.
- vii) A depolarizáció hatására létrejövő mobilitásváltozást olyan transzmembrán fehérjék esetében tapasztaltuk, melyek lipid tutajokban dúsulnak fel. Ezért érdemes lenne különféle membránmódosítások, pl. metil-béta-ciklodextrinnel történő koleszterinkivonás – ez megbontja a lipid tutajok épségét – vagy koleszterinnel töltött MBCD-vel való dúsítás után is megvizsgálni a mobilitást különböző membránpotenciálok mellett. Ez segítené tisztázni, hogy a lipid környezet szerepet játszik-e a membránpotenciál mobilitást moduláló hatásában.
- viii) Intézetünkben Prof. Nagy Péter és munkacsoportjának önálló kutatóvá érett tagjai, Dr. Kovács Tamás és Dr. Zákány Florina vizsgálják egy másik membránpotenciál komponens, a dipólpotenciál hatását elsősorban az erbB receptorok működésére. Míg a transzmembrán potenciál az ionok egyenlőtlen koncentrációeloszlásából származik a membrán két oldalán, a dipólpotenciál eredete a membránt alkotó foszfatidok és szterol származékok, valamint az ezekhez hidrogénkötéssel kapcsolódó vízmolekulák dipólmomentumainak térbeli rendezettsége. A becslések szerint a dipólpotenciálból származó elektrosztatikus térerősség nagysága jelentősen meghaladja a transzmembrán potenciálból származó térerősségét. Ennek nyomán mi is elkezdtük ezen

paraméter hatását is vizsgálni az IL-2 receptor működésére és mobilitására. A dipólpotenciált floretin-nel, illetve 6-ketokolesztanollal (6KC) történő inkubálással csökkentjük, illetve növeljük. Eddigi, Szolyka Levente TDK-s hallgató által végzett kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a 6KC csökkentette az IL-2 által kiváltott pSTAT5 jelet. Az FCS mérések a mobilitás meghatározására folyamatban vannak.

2. Kérem, hogy a szerző fejtse ki meglátásait arról, hogy az (orvos)biológia mely területein lát a saját életművére is jellemző precíz, kvantitatív molekuláris biofizikai vizsgálatok által teremtett áttörési lehetőségeket.

- i) A szuperfelbontású mikroszkópiák és a megfelelő jelölési módszerek kombinációja forradalmasítja az élő sejtrendszer biológiai folyamatainak kvantitatív nyomon követését. Az egyedi molekula mikroszkópiás módszerekkel a molekuláris folyamatok közvetlenül vizsgálhatók. Pl. a génszabályozás során a transzkripciós faktorok tranziens vagy stabil kötődése, a kialakuló fehérje komplexek összetétele, a kromatin-módosító enzimek működése közvetlenül megfigyelhetővé válik.
- ii) A MINFLUX mikroszkópia egyes esetekben felválthatja a molekuláris asszociációk közvetett, FRET alapú megfigyelését. Segítségével 1-2 nm-es felbontással vizsgálható fehérjekomplexek összetétele. A korlátozó tényező a fehérjesűrűség, ami nem haladhatja meg a diffrakció limitált térfogatban a néhány darabot. Kombinálható a DNA-PAINT technikával, ami a festék villogását fluoreszcens DNS oligók tranziens kötődésével helyettesíti. Kollaborációs partnerünkkel, Prof. Jerker Widengren-nel együttműködve sikerült MINFLUX és DNA-PAINT kombinációjával HEK sejtekben kifejezett RXR oligomereket detektálnunk.
- iii) A PicoQuant berlini mikroszkópos cég 30 évvel ezelőtti indulásakor az egyedi molekula mikroszkópia műszereinek és módszereinek fejlesztését tűzte ki célul. A 30 éves jubileumi konferencián inspiráló előadások hangzottak el, melyek közül néhányat szeretnék megemlíteni.
 - DNS origami: DNS-molekulákból olyan platformokat hoznak létre, melyeken egyedi molekula szinten tudják vizsgálni a biomolekuláris kölcsönhatásokat. A DNS origamit egyedi molekula mikroszkópiával kombinálva használják nanorobotikai platformként, nanoantennaként patogén nukleinsav molekulák attomoláris detektálására, DNS számítógépként (Philip Tinnefeld és mtsai);
 - A Claus Seidel (Düsseldorfi Heine Egyetem) által kifejlesztett multiparaméteres egyedi molekula fluoreszcencia spektroszkópia egyszerre méri két vagy több festék élettartamát, mobilitását, anizotrópiáját, segítségével „élőben” lehet

követni a biomolekulák működését és szerkezeti változásait (kölcshatások, konformációs változások, aggregáció).

A fentiek mutatják, hogy az általunk alkalmazott „klasszikus” FCS, FLIM-FRET módszerektől van hova fejlődnünk.

Végezetül még egyszer köszönöm Kovács professzor úr gondolatébresztő kérdéseit.

Debrecen, 2026. 05. 19.



Dr. Vámosi György