



**EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOKÉMIAI TANSZÉK**

Válasz Prof. Dér András bírálói véleményére

Köszönöm a bírálónak dolgozatom gondos és precíz bírálatát. A bírálatban feltett kérdések a dolgozatban tárgyalt problémák további alapos végiggondolására ösztönöztek, és a közeljövőre tervezett munkáinkhoz is hasznos kiindulópontokat adtak. A feltett kérdésekre adott válaszaim a következők:

1. 30. oldalon látható séma jól leírja a különböző aktomiozin formák kinetikai jeleit annak ellenére, hogy gyakorlatilag csak a legfontosabb kémiai lépéseket (asszociációs-disszociációs folyamatok, ATP-bontás) tartalmazza. Ez - tekintettel arra, hogy a séma bonyolultságából adódóan sok kinetikai paraméter szerepel - nem túlságosan meglepő, de felveti a kérdést, hogy a valamely „belső” (konformációváltozásos) lépés elhanyagolása nem módosíthatja-e jelentősen az egyszerűsített séma illesztésével meghatározott kinetikai paramétereket, illetve, hogy mekkorára becsüli az illesztésből meghatározott kinetikai paraméterek hibáját?

A kérdés rendkívül fontos – és a kinetikai mechanizmus-vizsgálatokban különösen gyakran előtérbe kerülő – kísérlettervezési és adatértelmezési problémát vet fel; nevezetesen azt, hogy milyen részletességig szükséges (illetve lehet) elmenni a molekuláris működés vizsgálatában ahhoz, hogy a biológiai folyamatokat „megfelelő mélységben” átlássuk, megértsük. A 16. ábrán bemutatott séma – ahogyan arra a bíráló rávilágított – az egyes ligandumok (nukleotidok, aktin) kötése illetve az ATP hidrolízise révén bekövetkező változásokat és az így létrejövő kémiai „species”-ek közötti átmeneteket tükrözi, és (a 2. lépés kivételével) nem tünteti fel az ezekhez kapcsolódó konformáció-változásokat. A dolgozatban az egyszerűsített általános séma használatát az indokolta, hogy az abban szereplő események sorrendisége illetve hálózata valamennyi vizsgált miozin esetében azonos, így a használt keret módszeres összehasonlítást tett lehetővé. A feltüntetett lépésekhez kapcsolódó konformáció-változások kinetikája, energetikája és komplexitása (az elkülöníthető részlépések száma) jelentős különbségeket mutat az egyes izoformák esetén. A 16. ábrán és az 1-2. táblázatokban „nettó” sebességi illetve egyensúlyi állandókat tüntettem fel, amelyek sok esetben részletesen felderített, több részlépésből álló folyamatok egyetlen számértékkel történő jellemzését teszik lehetővé. Fontos hangsúlyozni, hogy az egyes részfolyamatokat vizsgáló kísérleteinkben nem használtunk egyszerűsített sémákat *a priori*, hanem azokat minden esetben az Occam-elv szerint, az ésszerűen legkisebb számú eseményt tartalmazó modell segítségével értelmeztük. Az így illesztett kinetikai paraméterek standard hibája különböző preparátumok és kísérleti elrendezések összehasonlításakor jellemzően a 10-30 % tartományba esett, míg az egyes adatsorok illesztési standard hibája ennél alacsonyabb (jellemzően 2-10 %) volt.

Az aktomiozin-működés több kulcsfolyamatát a dolgozatban részleteiben nem tárgyalt többlépéses sémákkal írtuk le. Ennek példái a katalitikusan aktív enzimszerkezetet létrehozó konformáció-változás és kémiai ATP-hidrolízislépés együttese (18. cikk), a miozin

aktinkötése által indukált konformációs illeszkedés (2., 26., 27. cikkek), illetve az ADP-kötött állapotban megvalósuló, az erőtartó képességet befolyásoló konformációs egyensúly (7. és 17. cikkek).

2. A 49. oldalon tárgyalja, hogy vak dokkolásos elemzése szerint a blebbistatin a miozin aktinkötő árkába köt (33. ábra). Vannak-e molekuladinamikai modellezési eredményei arra nézve, hogyan egyeztethető ez össze azzal a kísérleti ténnyel, hogy a blebbistatin ADP jelenlétében egy aktint erősen kötő intermediert stabilizál?

Mi is váratlannak találtuk, hogy képződhet erős aktinkötő miozin.blebbistatin komplex annak ellenére, hogy az ATPáz ciklus gátlása közben létrejövő miozin.ADP.P_i.blebbistatin komplexben – mind saját dokkolásos eredményeink (6. cikk), mind mások röntgenkrisztallográfiás adatai (190. hivatkozás) szerint – a blebbistatin a miozin aktinkötő árkába köt. Málnási-Csizmadia András kutatócsoportjával kapott előzetes eredményeink azt mutatják, hogy ATP távollétében, a miozin.ADP.blebbistatin hármas komplexben a blebbistatin máshová – mégpedig a miozin erőkar kiindulópontjának közelébe – köt, mint a fenti, korábban leírt termékkomplexben. Ez az eredmény nem befolyásolja a 23. cikkben közölt felfedezésünk jelentőségét; nevezetesen azt, hogy a miozin.ADP.blebbistatin hármas komplex egy eddig ismeretlen, felhúzott erőkarú, de erős aktinkötő köztiállapotot képvisel.

3. Az 55. oldalon a 38. ábra, és a hozzá tartozó 3. táblázat szövegében található számértékek nem tűnnek konzisztensnek. Pl. a kétféjű NM2A ADP-disszociációját jellemző k_{-} az ábra szövegében $0,86\text{ s}^{-1}$, a táblázatban viszont $0,59\text{ s}^{-1}$ értékkel szerepel, továbbá az NM2B hasonló reakciójában a k_{+} és k_{-} sebességi állandók értéke az ábraaláírásban $0,59\text{ s}^{-1}$ és $0,021\text{ s}^{-1}$, a táblázatban ugyanezek $1,1\text{ s}^{-1}$ illetve $0,023\text{ s}^{-1}$ értékekkel szerepelnek. Némileg zavaró, hogy az első nukleotidcsere-reakcióra vonatkozó sebességi állandót az „ATP-„ és az „ADP-chase” ágon ugyanúgy jelöli (k_{+}), valamint, hogy a k_{on} sebességi állandó jelentését nem definiálja.

Az említett különbségek a sebességi állandók értékeiben abból adódnak, hogy a 38. ábra szövegében a bemutatott kísérletben kapott egyedi értékeket tüntettem fel, míg a 3. táblázatban a különböző fehérjepreparátumokkal és különböző kísérleti módszerekkel kapott összes érték átlaga szerepel.

A 37B ábrán az „ATP-” illetve „ADP-chase” ágakon szereplő első nukleotidcsere kinetikáját elvben ugyanaz a biokémiai folyamat – az ADP-nek a hátsó fejről történő disszociációja – határozza meg, ezért indokolt ugyanazon jelölés (k_{+}) használata. (A nagy feleslegben adott ATP illetve ADP „chaser” kötése az ADP-disszociációt követően, annál sokkal gyorsabban történik, ezért nem befolyásolja a tranziensek lefutását.)

A 3. táblázatban szereplő, külön nem definiált $k_{on,ATP}$ illetve $k_{on,ADP}$ elnevezések az ATP- illetve ADP-kötés másodrendű sebességi állandóit jelölik.

4. A dolgozatban ismertetett kutatási eredmények számos érdekes, új problémát vetnek fel (pl. a RecQ helikáz hibajavító működésének vizsgálatára vonatkozóan), amelyeket a jelölt a dolgozat végén található „Tervek és perspektívák” c. fejezetben foglal össze. Kérdezem, hogy a dolgozat beadása óta eltelt időben mennyiben sikerült előrelépni a tervek megvalósításában?

A nem-izom miozin 2 (NM2) élettani szerepével kapcsolatban Robert Adelstein kutatócsoportjával (NIH) együttműködve meglepő (még publikálatlan) felfedezésre jutottunk. Korábban ismeretes volt, hogy a NM2 kiütése illetve blebbistatinnal történő gátlása meggátolja a citokinézist, és sokmagvú sejtek kialakulását eredményezi. Ez alapján tankönyvi ismeretté vált, hogy a NM2 motoraktivitása szükséges a normális sejtosztódás lezajlásához. Mi viszont azt találtuk, hogy olyan NM2 mutánsok, amelyek aktin-kölcsönhatásának mechanikai terhelés-érzékenysége megegyezik a vad típuséval, motoraktivitása viszont elveszett, a fehérjemennyiség függvényében közel teljes mértékben képesek a normális citokinézis helyreállítására. Eredményeink alapján azt javasoljuk, hogy a sejtosztódás során a NM2 fő funkciója nem az aktív mozgatás, hanem az aktinszálak rendezése és az irányfüggő erőtartás.

Egy, a dolgozat beadása óta vizsgált miozin 5 mutáns esetében azt találtuk, hogy arról az ATP-hidrolízist követően – az izom miozin 2-höz hasonlóan és a vad típusú miozin 5-től eltérően – a foszfát felszabadulása lassan, az ADP-felszabadulás pedig gyorsan történik. Ennek ellenére e mutáns nagyrészt az erős aktinkötő állapotokat foglalja el a *steady-state* működés során, illetve egyedimolekula-vizsgálatokban a vad típusú enziméhez hasonló processzív futáshossz megtételére képes. E publikálatlan eredményeink azt sugallják, hogy a mutáció megváltoztatta a miozin mechanokémiai kapcsolását, és így a poszt-hidrolitikus (potenciálisan felhúzott erőkarú) M.ADP.P_i komplex erősen kötődik az aktinhoz. További vizsgálatoktól azt reméljük, hogy az erőgenerálás sokak által keresett, a vad típusú fehérjén rövid élettartama miatt nem vizsgálható köztiállapotát sikerül stabilizálni. E témához kapcsolódik, hogy a miozin.ADP.blebbistatin komplex szerkezet-vizsgálatában áttörést jelenthet a Málnási-Csizmadia András kutatócsoportjában előállított azido-blebbistatin származék, amelyről kimutattuk, hogy UV-megvilágítás alkalmazásával mind *in vitro*, mind *in vivo* kovalensen a miozinhoz köthető (publikálatlan adatok).

A humán BLM helikáznak a dolgozatban ismertetett működési mechanizmusán túlmenően azóta elvégeztük az *E. coli* RecQ helikáz hasonló vizsgálatát is (publikálatlan adatok). A két enzim működésének összehasonlítása érdekes különbségekre derített fényt. A humán fehérje ADP-kötött állapotban lezajló, sebesség-meghatározó szerkezetváltozásához hasonló eseményt a bakteriális enzimben nem találtunk; ez esetben az ATP-hidrolízis kémiai lépése bizonyult sebesség-meghatározónak. Az *E. coli* enzim az ATP-hidrolízist követően rendkívül erős DNS-kötő állapotot vesz fel, ami jelentősen hosszabb processzív futáshosszot –330 nukleotidegység várható értéket – eredményez, mint a mintegy 50 nukleotid-egységet megtevő BLM helikáz esetében. Együttműködő partnerünkkel, Keir Neuman-nel (NIH) végzett mágnesescapdás egyedimolekula-vizsgálatainkkal kiegészítve vizsgáljuk mindkét enzim esetén az egyszálú DNS-en történő transzlokáció és a kétszálú DNS szálszétválasztása során megvalósuló mechanokémiai kapcsoltságot.

A BLM helikáz hét doménből álló, bonyolult szerkezetű enzim, amelynek „funkcionális anatómiáját” rövidített konstrukciók sorozatának mechanizmus-vizsgálatával derítjük fel. Meglepetésre azt találtuk, hogy egy olyan – korábban vizsgált és működésképtelennek talált csonka enzimeknél lényegesen rövidebb – konstrukció, amely mindössze a RecA illetve Zn²⁺-kötő doménekből álló magot tartalmazza, a teljes hosszúságú enzimmel megegyező transzlokációs, szálszétválasztó és szálpárosító aktivitásokat mutat, illetve még hatékonyabban távolít el más fehérjéket (Rad51 rekombinázt, SSB egyszálú DNS-kötő fehérjét) a DNS-szálakról (Gyimesi *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 2012 Jan 16, *Epub ahead of print*). A felfedezés érdekességét növeli, hogy a más RecQ-családbeli helikázok DNS-szálszétválasztásához elengedhetetlennek bizonyult, „tolólapátként” működő szárnyas hélix (*winged helix*) domén teljesen hiányzik ebből a konstrukcióból.

További, részletesebb vizsgálatainkban viszont azt kaptuk, hogy a „zabolátlan” minimálmotor kevésbé hatékonyan és rendezetten bontja szét a bonyolultabb D-hurok szerkezeteket, mint a teljes hosszúságú enzim (publikálatlan adatok). A motormagon kívüli domének ezek szerint a bonyolultabb aktivitásokhoz szükséges koordinációt biztosítják. Ehhez kapcsolódó központi jelentőségű, ám felderítetlen probléma, hogy a BLM helikáz (illetve más RecQ-családbeli helikázok) milyen oligomerizációs állapotban végzik ezen aktivitásokat. Ezt vizsgálva azt az érdekes eredményt kaptuk, hogy a teljes hosszúságú BLM enzim egyszálú DNS és ATP jelenlétében monomerként transzlokál, bonyolultabb (Holliday- illetve D-hurok-szerkezetű) DNS-szerkezetek viszont oligomerizációt idéznek elő (publikálatlan adatok). Az oligomerizáció vélhetően allosztérikus hatások révén valósul meg, amit az mutat, hogy a motormagba nem tartozó N-terminális domén hiányában az enzim valamennyi DNS-szubsztráthoz kötődve monomer állapotot vesz fel.

A RecQ-családbeli helikázok genomkarbantartó funkcióikat *in vivo* partnerfehérjékkel együttműködésben látják el. Ilyen együttműködést vizsgálunk az *E. coli* RecQ helikáz és az SSB fehérje között. Előzetes eredményeink azt sugallják, hogy az SSB a RecQ helikáz mechanokémiai működését közvetlenül nem változtatja meg, hanem egyes DNS-szerkezeti elemek felismerését, és ezen keresztül a bonyolultabb DNS-struktúrák hatékony átalakítását segíti elő (publikálatlan adatok).

Ismeretes, hogy számos különböző helikáz képes a Rad51 rekombinááz nukleoprotein szálak lebontására (pl. Wu *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:19375, Krejci *et al.* (2003) *Nature* 423:305). Ezt a folyamatot jelenleg a rekombináció minőségellenőrzésének egyik kulcseményeként tartják számon. Jelenlegi vizsgálatainkban fordított irányú hatást is sikerült kimutatnunk: azt találjuk, hogy a Rad51 fehérje jelenléte jelentősen megnöveli a D-hurok-szerkezetek helikázok által katalizált lebontásának hatékonyságát.

A biokémiai-molekuláris biofizikai kísérletekben megfigyelt molekuláris történéseket és a mutációk hatását *E. coli* lambda fág-rekombináción alapuló vizsgálattal, az egyedfejlődésre gyakorolt hatást pedig *C. elegans* fonalféreg genetikai rendszerben vizsgáljuk, amely rendszerek jelenleg beállítás alatt állnak.

Budapest, 2012. január 25.

Kovács Mihály