



4032 Debrecen Nagyerdei krt. 98., tel.: +36 52 416-432, fax: +36 52 314 989

Válasz

Dr Haracska Lajosnak (MTA doktora, tudományos tanácsadó, BME MTA SZBK Genetikai Intézete)
opponensi véleményére

Szeretném megköszönni bírálónak dolgozatom alapos áttanulmányozását és a bírálat gyors elkészítését. Kérdéseire alábbiakban, pontonként válaszolok.

Egyetértek bírálómmal, hogy a dolgozat megértését nagymértékben segítette volna néhány ábra beillesztése. A tézises dolgozat formai követelményeivel kapcsolatos bizonytalanságok és ellentmondó tájékoztatás vezetett oda, hogy eredeti szándékkal ellentétben nem kerültek ábrák a dolgozatba.

- 1. A bemutatott eredmények olvasata szerint a DNS kötőfelszíntől távoli fehérje részeknek fontos szerepe van a DNS kötés szabályozásában és a környezettől függő specificitás kialakításában. Kérem a jelöltet, hogy bővebben fejtsse ki milyen konkrétabb gyógyszerkutatás számára is alkalmazható vetülete lehet ennek és milyen haladási irányokat lehet megfogalmazni ennek kiaknázására.*

Külön köszönöm bírálónak, hogy lehetőséget adott ennek a gyakorlati perspektívának a kifejtésére. Amint a dolgozatban is említettem, a DNS célszekvenciával közvetlenül kölcsönható fehérje szakaszok megváltoztatása általában sokféle mellékhatással jár. Ezek közül leggyakoribb a szerkezetre gyakorolt hatás, a kötőfelszín torzulása vagy a közvetlen környezet perturbációja. A távoli részek általában a rendszer dinamikáját befolyásolják és sokkal kisebb a rájuk ható szerkezeti kényszer. Ezt világosan mutatják laboratóriumi evolúciós kísérletek, melyek a DNS specificitás megváltoztatását célozzák (pl. Shmuel-Rockah L., Nucl. Acids Res. 40, 11627-37). Ebből adódik, hogy lényegesen könnyebb a távoli, dinamikus részekben a fehérje többi, kötés szempontból kritikus szegmenseit alapvetően nem módosító változtatásokat tenni.

i) Kismolekulák (gyógyszermolekulák) kötésével a távoli, esetleg rendezetlen szegmens dinamikai tulajdonságait megváltoztatjuk. Több esetben bizonyított (részben saját munkák), hogy a fehérje fejlődése során a rendezetlen vagy bolyhos szakasz dinamikus állapota megőrződik és ez vezet a funkció megmaradásához. Ha a kismolekula kötődésének hatására a mozgékonyság lecsökken, akkor a rendezetlen szakasz tranziens kölcsönhatásai nem, vagy csak csökkent mértékben valósulnak meg. A képlékenység csökkenése szintén kedvezőtlen a bolyhos szakasz környezetében elhelyezkedő rövid motívum(ok) kölcsönhatásai szempontjából. Ily módon egy gyógyszermolekula távoli, rendezetlen részen történő kötődése elrontja a rendszer természetes finom-hangolását. Ezt az elvet használjuk jelenleg a Measles vírus nukleokapszidját alkotó N nukleoprotein elleni inhibitor fejlesztésben.

ii) A természet gyakran használja szabályozásra a bolyhos részeket pl. poszt-transzlációs módosítások révén (Fuxreiter TiBS 2011 és Fuxreiter Mol BioSyst. 2012). A poszt-transzlációs módosulások bevétele, vagy éppen azok kialakulásának gátlása is lehetséges út lehet a fehérjék működésének befolyásolására. Ismeretes, hogy a rendezetlen részek a 20S proteoszóma által ubikvitináció nélkül is lebomlanak. Fehérjék evolúciója során az élettípus gyakran a rendezetlen rész hosszán keresztül szabályozódik (Intrinsically disordered segments affect protein half-life and its evolution. Lee, Lang, Kruse, Gspöner, Sánchez de Groot, Huynen, Matouschek, Fuxreiter and Babu bírálat alatt a Cell-ben). Ha tehát a rendezetlen rész hosszát akár kismolekula kötődése révén, akár egy más izoforma kifejezésével megváltoztatjuk, akkor elősegíthetjük, vagy akadályozhatjuk a fehérje lebomlását.

iii) Szintén a fehérjék életidejének befolyásolásával kapcsolatos lehetőség, amikor a rendezetlen vagy bolyhos transzkripció faktort egy távoli részen történő kölcsönhatás védi meg a lebomlástól. Ilyenkor a partner kifejeződésének gátlása a rendezetlen fehérje lebomlásához vezet (pl. ritmus-szabályozó fehérjéknél).

iv) Sikertől összefüggést teremtenünk a szövet-specifitás és a különböző izoformákban lévő bolyhos szakaszok között (Bulján és mtsai Mol Cell 2012). A közölt eredmények alapján a rákos sejtvonalban előforduló izoforma bolyhos szakaszának megváltoztatása (pl. gyógszermolekula kötésével) megszüntetheti a beteg szövetben fellépő nem kívánatos kölcsönhatásokat.

A felsoroltakon kívül számos lehetőség van még, melyeket jelenleg kísérletesen vizsgálunk. Remélem, hogy erőfeszítéseink sikerrel és gyakorlatban is megvalósítható eredményekkel járnak.

2. *Szabadenergia számítások alapján a dolgozat világosan rámutat a DNS sérülések, konkrétan a T-T dimer és az uracil, javítása során annak jelentőségére, hogy a DNS sérülés következtében bekövetkező DNS lokális meghajlás elősegíti a hibás bázis enzimatisz kiforgatását a DNS tengelyéből. Mennyire segít megérteni, ill. általánosítható-e ez a konklúzió más DNS hibajavító folyamatok esetén, amelyek nem a báziskivágáson alapulnak pl. NER, mismatch hibajavítás.*

Kísérleti adatok arra utalnak, hogy minden olyan DNS sérülés esetén, ahol a bázisok közötti kapcsolat gyengül, a flexibilitás lokális változása hozzájárul a specifikus felismerés és javítás folyamatához (Bouvier B, Grubmüller H Poor base stacking at DNA lesions may initiate recognition by many repair proteins DNA Repair 5: 654-666, 2006)

Ismeretes, hogy a nem megfelelő bázispárokat javító (mismatch) hibajavítás hatékonysága erősen függ a lokális szekvenciától (B. Kramer, W. Kramer, H.J. Fritz, Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*, Cell 38, 1984, 879–887.) A nem megfelelő bázispárosodásból adódó energetikai különbségek ugyanis 100-1000-szeres affinitáskülönbséghez vezetnek az ép bázispárokhöz képest. A mismatch hibajavítás (MMR) esetén azonban a szelektivitásnak $10^{-6} - 10^{-8}$ értéket kell elérni, hogy a normál DNS (helyes bázispárok) ne károsodjanak. Az MMR/NER hibajavításban szereplő fehérjéknél a hiba felismerése és kémiai átalakítása kettéválk. A felismerésben résztvevő MutS (MMR) és UvrA, XPA and XPC (NER) fehérjéknek széles szubsztrát-specifitása van, de nincs katalitikus aktivitásuk, a sérülés eltávolítását egy nukleázra végzi. Ezért további, ún. kinetikus ellenőrző (proofreading) mechanizmusok szükségesek a hatékonyság javítására (Yang W, DNA Repair (Amst) 5, 2006, 654–666).

A MutS fehérje a mismatch hibajavítás felismerő eleme. Szabad állapotban rendezetlen, csak DNS jelenlétében vesz fel stabil szerkezetet (G. Obmolova, C. Ban, P. Hsieh, W. Yang, Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA, Nature 407, 2000, 703–710.; M.H. Lamers, A. Perrakis, J.H. Enzlin, H.H. Winterwerp, N. de Wind, T.K. Sixma, The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G×T mismatch, Nature 407, 2000, 711–717.) Ez a fehérje az egyedülálló nukleotid vagy a nem megfelelő bázispárosodás által meggyengített DNS szerkezetet ismeri fel és a lehetséges konformációk közül egy kitüntetett állapotot stabilizál. Hasonló modellt nukleotid kivágásban (NER) résztvevő fehérjékre is javasoltak (R.J. Isaacs, H.P. Spielmann, A model for initial DNA lesion recognition by NER and MMR based on local conformational flexibility, DNA Repair (Amst) 3, 2004, 455-464).

3. *Kérem, fejtse ki mit tart jelenleg tudományterülete legfontosabb kérdésének. Lehetségesnek tartja-e, hogy a fehérjeszerkezet és működés tanulmányozásában a fehérjemodellezés átveszi dominanciáját esetleg nélkülözhetővé is teszi a fehérje kristályszerkezeti vizsgálatokat.*

A fehérjék háromdimenziós szerkezetének megismerése nagymértékben segítette megértésünket a fehérjék működését illetően és számos, racionális úton tervezett gyógyszer kifejlesztéséhez vezetett. Ugyanakkor az oldatfázisú technikák fejlődésével a 90-es évek közepére világossá vált, hogy a krisztallográfiai eredmények alapján nyert kép túl merev, nem tükrözi a fehérjék változatosságát sem funkcionális, sem szerkezeti értelemben. Nagyobb fehérjék, komplexek, ún. fehérje-gépezetek (protein machines) működését nem lehetett így értelmezni. Egyre több kísérleti adat támasztotta alá a fehérje-dinamika kitüntetett szerepét jelátviteli folyamatokban, de akár enzimeknél is. Mostanra világossá vált, hogy a fehérjékről alkotott determinisztikus képünk revízióra szorul. Ehhez egy sztochasztikus modellre van szükség. A rendezetlen fehérjéknél sokat hangoztatott szekvencia-rendezetlenség paradigmával ellentétben az igazi kihívás a klasszikus szekvencia → szerkezet → funkció

modellt olyan elméletté alakítani, ahol mindhárom kulcselemet sokasággal helyettesítjük.

Jelentős mennyiségű kísérleti bizonyíték áll ugyanis rendelkezésre ahhoz, hogy egy adott funkció sok esetben különböző, azonos kompozíciójú szekvenciával valósítható meg (pl. H1 hiszton C-vég, H4 hiszton N vég, GCN4 és EWS transzkripció faktorok, Sup35 és Ure2 élesztő prionok). Ugyanakkor számos kísérlet és evolúciós tanulmány igazolja, hogy a legtöbb fehérjének egynél több funkciója van, sőt a rejtett (másodlagos) funkciók viszonylag kevés mutációval elsődleges működéssé tehetők. A középső, szerkezeti sokaságokról szóló bizonyítás pedig számos, a dolgozatban idézett cikkben is szerepel. A jelenleg legfontosabb probléma, hogy a sokaságok között kvantitatív, gyakorlatban is használható összefüggést teremtsünk. Ennek konkrét kérdései a következők:

- i) Körülmények hatására hogyan befolyásolhatók a szerkezeti sokaságok, hogy a funkcionális lehetőségek közül egy adott működés valósuljon meg?
- ii) Milyen mértékű szekvencia változtatással lehet funkcionális változást elérni és ez hogyan kapcsolódik a kizárólag dinamikus részeket érintő távoli részekhez?
- iii) Milyen aminosav-cserékkel lehet egy funkcionális változást egyértelműen elindítani? Az oda- és visszaváltoztatás útja mennyire tér el egymástól?
- iv) Az élő sejtben mennyire érvényesülnek azok a szerkezeti alapú módosító elvek, melyeket in vitro feltárunk?

Ezt kísérleti és elméleti módszerek együttes alkalmazásával lehet elérni. A nagy méretű vagy képlékenyebb rendszereknél természetesen előtérbe kerülnek az oldatfázisú vagy az egymolekulás technikák. Ezek eredményeinek interpretációjához, a sokaság részletes jellemzéséhez azonban elengedhetetlenül szükségesek a modellezéshez használt módszerek.

Végezetül: a magyarul bolyhosságnak fordított elmélet egy olyan koncepció (angolul fuzzy concept), mely számos tudományágban (pl. számítástudomány, nyelvészet, pszichológia) létezik. Azt jelenti, hogy valami (függvény, alkalmazás) értéke a környezettől lényegesen függ és más körülmények esetén más érték valósulhat meg. Pontosan erre van szükség ahhoz, hogy egy biológiai rendszer a környezetéhez megfelelően alkalmazkodjon és túléljen. Ezt szeretnénk molekuláris szinten értelmezni.

Még egyszer szeretnék köszönetet mondani opponensemnek, hogy a nyári szünetben időt szentelt munkám alaposan áttanulmányozásának és lehetőséget adott jövőbeli terveim kifejtésére.

Debrecen, 2013. augusztus 29.

Fuxreiter Mónika