



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

Válasz

Dr Poppe László (MTA doktora, egyetemi tanár, BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék) opponensi véleményére

Szeretném megköszönni bírálónak dolgozatom alapos áttanulmányozását és a bíráló gyors elkészítését. Kérdéseire és építő kritikai megjegyzéseire az alábbiakban, pontonként válaszolok.

- *Mivel az értekezés nagy számban használ rövidítéseket mind az enzimek, mind a fehérje-DNS komplexek valamint a számítási módszerek említésekor, az érthetőséghez ill. követhetőséghez hiányzott számomra egy konzekvens rövidítés jegyzék. Jó szolgálatot tett volna az is, ha a mellékelt közleményeket az ezeket felsoroló jegyzék szerint sorszámozta volna.*

A tézises dolgozat terjedelmi korlátai és formai követelményei nem tették lehetővé külön rövidítésjegyzék készítését. Ezért a szakcikkeknel használatos módszert alkalmaztam, zárójelben bevezetve a fogalmakat, rövidítéseket az első előfordulásakor. Egyetértek bírálómmal a rövidítésjegyzék hasznosságát illetően, ezért ezt elkészítettem és válaszomhoz külön csatoltam.

A közlemények felsorolása ABC sorrendben történt az első szerző alapján (Elsevier, Cell formátum). Valóban szerencsésebb lett volna a saját közlemények számozása a csatolt publikációknak megfelelően. Ez esetben viszont az összes közlemény előfordulás sorrendjében történő számozása nem teljesült volna.

- *A fehérje – DNS közötti térben megtalálható vizek tanulmányozása során az eredményeket a kísérleti szerkezetekkel vetette össze. Ismert azonban, hogy a röntgenkristallográfiával nyert kísérleti szerkezetek hibákat tartalmazhatnak (Trends Pharma. Sci. 2005;26:10-14). Ezzel kapcsolatban fontos adat, hogy a jelen dolgozat összehasonlításaihoz felhasznált szerkezetek felbontása 2 Å körül volt. Mivel és egy átfogó tanulmány rámutatott arra, hogy míg a PDB adatbank 2 Å felbontású szerkezeteiben átlagosan 1 víz jut 1 aminosav egységre, addig ez az érték a nagy felbontású szerkezetekben (1 Å) mintegy 1,6-1,7 (Acta Cryst. D Biol. Crystallogr. 1999;55:479-83), felmerül a kérdés hogyan lehetne elemezni az összehasonlításokhoz felhasznált szerkezetekben megtalálható vizek tényleges jóságát?*

A magasabb felbontású szerkezetekben az elektronsűrűségi térképén sokszor a nagyobb mozgékonyassággal rendelkező vízmolekulák is azonosíthatók. A BamHI enzim esetén specifikus komplex (1bhm) felbontása 2.2 Å, míg a csillag komplexszé 1.9 Å volt. A nagykanonikus Monte Carlo módszerrel számított vízmolekulákat mindig az adott szerkezet kísérleti adataival vetettük össze. Magát a módszert magas felbontású szerkezetekre parametrizálták (Resat, H., and M. Mezei. 1994. Grand canonical Monte Carlo simulation of water position in crystal hydrates. J. Am. Chem. Soc. 116:7451–7452; Resat, H., and M. Mezei. 1996. Grand canonical ensemble Monte Carlo simulation of the dCpG/proflavine crystal hydrate. Biophys. J. 71:1179–1190). A BamHI-en végzett számolásoknál a specifikus komplex kötőfelszínén mind a 97 kísérletileg megfigyelt vízmolekulát sikerült azonosítani. A csillag komplexnél 150 vízmolekulából 149-

et találtunk meg. A hiányzó vízmolekula hőmozgástényezője (B faktor) azonban kiugróan magas volt, tehát elképzelhető, hogy itt a szerkezet finomításánál történt pontatlanság. Az opponens által idézett munkáknak megfelelően a megfigyelteknél mi is lényegesen több vízmolekulát találtunk a számítások során, a csillag komplexnél 579 vízmolekula helyett 787-et sikerült megfigyelni. Ezek jóságát a megfelelő kémiai potenciál és a korrekt tömbfázisú vízsűrűség garantálja.

- A fémionokkal végzett vizsgálatok során magas szintű *ab initio* módszerekkel (DFT 2+ 2+MP2) megállapította, hogy a Mg ionok „keményebbek”, míg a Mn ionok polarizálhatóbbak és hajlamosabbak töltésátadásra. Mennyire jeleníthetőek meg ilyen szintű különbségek pl. az elsősorban a BamHI restriktációs endonukleáz tanulmányozása során alkalmazott a MD szimulációk során?

A molekuladinamikai számítások során a finom elektroszerkezeti effektusokat csak korlátozottan tudjuk figyelembe venni, kivéve, ha polarizálható erőteret használunk. Ez utóbbi alkalmazása azonban a parametrizálás és a megfelelő mintavétel (szimulációs időkorlátok és a konvergencia hiánya miatt) újabb problémákat vet fel. A klasszikus erőterek esetén két lehetőségünk van, hogy a finom-elektronszerkezeti hatásokat reprodukáljuk. Az egyik a fémionok van der Waals sugarának megváltoztatása, hogy a számított koordinációs geometria a kvantumkémiai számításokkal egyezzen (lásd Biol Chem 388, 73-78). A másik az elektrosztatikus tagok skálázása, melyeket további, a dolgozatban nem említett munkáknál használtunk (pl. Zn²⁺ ionoknál).

- Ugyancsak a BamHI restriktációs endonukleáz fémion kötő helyeinek tanulmányozása során olvasható (Biol. Chem. 2007;388:73-78), hogy az MD eredmények jó összhangban voltak a reakció QM/MM számításokkal nyert adataival. Ezek milyen QM/MM számítások voltak és közlésre kerültek-e később?

A hibrid kvantumkémiai/molekulamechanikai (QM/MM) számítások a Mones L, Kulhanek P, Florian J, Simon I, Fuxreiter M (2007) Probing the two-metal ion mechanism in the restriction endonuclease BamHI. *Biochemistry* 46(50): 14514-14523 cikkben kerültek közlésre. Itt a reakció teljes szabadentalpia felszínének felderítését végeztük Empirikus Vegyértékkötés módszer, valamint szabadenergia-számítások felhasználásával. 3 lehetséges reakciómechanizmust vizsgáltunk és meghatároztuk a fémionok hozzájárulását az enzim katalitikus effektusához. Ennek eredményei alátámasztották a korábban klasszikus erőtérral végzett számításokat a fémionok pozícióinak tekintetében. A támadó nukleofilt koordináló A fémion lényegesen stabilabbnak mutatkozott a QM/MM számítások során is, és az OH⁻ ion koordinációja a támadás során végig megmaradt. Az 1 fémionnal végzett QM/MM szimulációknál az A fémion esetében megfigyelt átmeneti állapot (A') jó egyezést mutatott a Biol. Chem. Cikkben „M”-el jelölt, klasszikus erőtérral meghatározott pozícióval.

- Az MD számítások során alkalmazott, kísérleti paraméterezéseket tartalmazó módszerek esetében hogyan történt a fémionok paraméterezése? E módszerek hajlamosak lehetnek a rövid távú, ionos hatások túlhangsúlyozására és kevésbé képesek figyelembe venni a távoli diszperz kölcsönhatásokat. Ugyancsak nem alkalmasak tényleges protonátmenetekkel járó folyamatok modellezésére, ami nem kizárható a vizsgált esetekben. Ezt mennyire befolyásolhatja az eredményeket?

A Mg²⁺ ion van der Waals sugarát 1.3 Å-re, a negatívan töltött oxigén atomok sugarát 1.9 Å-re módosítottuk. Ezzel sikerült reprodukálni a fémion és a foszfát oxigének közötti, kristályszerkezetekben megfigyelt távolságot. A parametrizáláshoz a Florian, J., Goodman, M.F., and Warshel, A. (2003). Computer simulation of the chemical catalysis of DNA polymerases: discriminating between alternative nucleotide insertion mechanisms for T7 DNA polymerase. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8163–8177 cikket vettük alapul. Ebben a munkában a dGTP kötődését vizsgálták T7 polimerázhoz templát DNS jelenlétében. Az AMBER 95 erőter alapján végzett, 1.6 ns hosszú molekuladinamikai szimulációk során kiderült, hogy a Mg-O távolságok túl rövidnek bizonyultak a kísérletben meghatározottal szemben (1.8 Å a számolt, míg 2.1-2.3 Å a mért érték). Ezért az eredeti 1.1 Å (Mg) és 1.7 Å (O) van der Waals sugar értékeket megnövelték, hogy a kísérletekkel jobb egyezést érjenek el. Az eredmények elsősorban a Mg²⁺ ion solvatációs szabadentalpiáját befolyásolják, így közvetve a tanulmányozott reakció energiaviszonyait. A fémion töltésének változtatásával (jelen esetben 1.66-ról 2.0 atomi egységre) azonban a mért oldáshőt jól közelítjük.

Még egyszer szeretnék köszönetet mondani opponensemnek, hogy a nyári szünetben időt szentelt munkám alapos áttanulmányozásának és kérdéseivel olyan fontos szempontokra hívta fel a figyelmemet, melyek a további tanulmányokat elősegítik.

Debrecen, 2013. augusztus 27.

Fuxreiter Mónika

Rövidítésjegyzék

Fuxreiter Mónika

A specifikus DNS felismerés molekuláris mechanizmusai

MTA Doktori értekezéséhez

Fehérjék

BamHI: II típusú restrikciós enzim a *Bacillus amyloliquefaciens* H baktériumból. Felismerési szekvenciája: G[^]GATCC. (^ a hasítás helyét jelöli; Uniprot kód: P23940)

Hox gén: homeobox vagy homeotikus gének, melyek a többsejtű állatok egyedfejlődése során a hosszanti tengelyt alakítják ki, hozzájárulva a szegmensekhez tartozó függelékek (pl. csápok) fejlődéséhez.

Homeodomének: a homeoboxok által kódolt, 60 aminosav hosszú fehérje alegységek. Ezek transzkripciós faktorokként működnek, melyek elsősorban a szöveti morfogenezisért felelős géneket kapcsolnak be.

PD..D/ExK típusú restrikciós endonukleázok: II típusú restrikciós enzimek, melyek aktív helyét általában egy P, két savas aminosav és egy lizin alkotja. Divergens evolúcióval alakultak ki.

EcoRI: II típusú restrikciós enzim az *Escherichia coli* RY13 baktériumból. Felismerési szekvenciája: G[^]AATTC. (^ a hasítás helyét jelöli; Uniprot kód: P00642)

RsrI: II típusú restrikciós enzim az *Rhodopseudomonas sphaeroides* baktériumból. Felismerési szekvenciája: G[^]AATTC. (^ a hasítás helyét jelöli; Uniprot kód: P21763)

EERE: Az *EcoRI* és *RsrI* enzimekből létrehozott kiméra (hybrid) enzim, melyben a His147–Ala206 *EcoRI* szegmenst a *RsrI* enzimből helyettesítettük.

UDG: Uracil DNS-glikoziláz. DNS javító enzim, mely a DNS-be hibásan beépült uracilt báziskivágás útján távolítja el.

EndoV: EndonukleázV. DNS javító enzim, mely a DNS-ben képződött cis,syn timin dimert báziskivágás útján távolítja el.

NK-2: Homeodomént tartalmazó transzkripciós factor, mely az idegrendszer kialakulásában és fejlődésében játszik szerepet.

Antp: Az Antennapedia gén által kódolt homeotikus transzkripciós factor, mely a rovarokban a csápok fejlődését szabályozza.

Max: Leucin zipper transzkripciós factor, mely a E-box (CACGTG) DNS szekvenciával történő kölcsönhatása révén a Myc gének kifejeződését gátolja. A fehérje általában homodimer formájában van jelen, a felismerés hélix-kanyar-hélix motívummal történik.

Ets-1: Transzkripciós factor, mely számos gén kifejeződését szabályozza a differenciációtól a rákos sejtek kialakulásáig. Autoinhibíciós modullal rendelkezik, melyet egy rendezetlen rész szabályoz.

Ubx: Ultrabithorax homeotikus transzkripciós factor, mely különböző szövetekben eltérő DNS szekvenciák specifikus felismerésére képes.

- HMGB1*: High-mobility group protein B1, mely a DNS szerkezetét befolyásolva a transzkripció szabályozásban vesz részt. A HMGB1 meghajlítja a DNS-t, mellyel számos más fehérje kötődését segíti elő.
- Oct1*: DNS oktamerekhez kötődő transzkripció faktor, mely két POU domén által kapcsolódik a célszekvenciához (TATGC(A/T)AAT). Ezeket egy rendezetlen linker szakasz köti össze.
- NKx3*: NK-2 homeodomének családjába tartozó prosztata tumor szuppresszor. A szerkezetileg jól definiált homeodomént egy savas, rendezetlen szakasz előzi meg.
- TDG*: Timin DNA-glikoziláz enzim, mely báziskivágás útján a GT és GU hibákat javítja DNS-ben. A rendezetlen N- és C- terminális domének az enzim konformációváltását segítik.
- PPAR-γ*: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma. Maghormon receptor, mely a zsírsavak tárolását és a glükóz metabolizmusát szabályozza. Az aktivátor A/B rész nem rendeződik az RXR-el alkotott komplexekben, hanem dinamikus marad.
- UvrD*: 1A szupercsaládba tartozó DNS helikáz. Működéséhez ATP energiáját használja fel, melynek eredményeképp széttekeri a DNS kettős hélixét.

Számítási módszerek

- EVF/FEP-US*: Empirical Valence Bond/Free Energy Perturbation-Umbrella Sampling módszer, melyet Arieh Warshel fejlesztett ki. Ez a vegyértékkötés módszert, mely formailag egy kombinált kvantummechanikai-molekulamechanikai módszer, ötvözi az ún. esernyő mintavételezéssel. Ez a kombinált eljárás a magas energiájú, átmeneti állapot régiók energiaviszonyainak feltérképezésére alkalmas.
- PDL/D/S*: Szemi-empirikus Protein Dipoles Langevin Dipoles módszer, mely a számunkra érdekes reaktív régió fehérje-környezetének Langevin dipólusokkal történő leírásán alapul. A szemi-empirikus változatot a megfelelő mutációkat kísérő szabadentalpia-változások számítására vezették be, a kísérleti adatokkal történő még jobb egyezés eléréséhez. Ennek lényege, hogy a szimuláció pontosságától függően (pl. indukált dipólusok figyelembevételével történik-e) az eredményeket adott skálafaktorral korrigáljuk.
- MC*: Monte Carlo mintavételezési eljárás, melynek során a rendszerből véletlenszerűen veszünk mintát. Ennek eredményeképp a tanulmányozott rendszer időfüggése nem, de átlagos tulajdonságai számíthatóak.
- MD*: Molekuladinamika. Szimulációs eljárás, melyben a rendszert a Newtoni egyenleteknek megfelelően mozgatjuk és időfüggését tanulmányozzuk.
- GCMC*: nagykanonikus rendszeren végzett Monte Carlo szimuláció, melynek során a rendszerben lévő atomok, molekulák mennyisége változhat.
- CG*: coarse-grained (alacsony felbontású) számítási eljárás, melyben a rendszert leíró energiafüggvény alapegységei nem atomok, hanem egy biomolekula nagyobb egységei. Pl. fehérjénél egy aminosav, nukleinsavnál egy bázis képvisel egy elemet. Parametrizálása minden atomot figyelembe vevő, ún. all-atom számítások alapján történik. Nagyobb rendszerekre, vagy hosszabb időskálán történő szimulációkra alkalmas.