



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

Válasz

Dr Vonderviszt Ferenc (MTA doktora, egyetemi tanár, Pannon Egyetem) opponensi véleményére

Szeretném megköszönni bírálónak, hogy dolgozatomat alaposan tanulmányozta, és a nyári szünet ellenére véleményét rekordidő alatt elkészítette. Köszönöm továbbá, hogy formai és szakmai megjegyzéseivel körültekintőbb, pontosabb fogalmazásra, valamint egyes eredmények ismételt átgondolására ösztönzött. Kérdéseire és építő kritikai észrevételeire az alábbiakban válaszolok.

A doktori mű formai részével kapcsolatosan elfogadom, hogy a felsorolt eredmények jelentősége erősen eltér. Ezt a publikációk is jól tükrözik. A dolgozat összeállításakor ugyanakkor az az elv vezérelt, hogy a specifikus DNS felismerésről alkotott képet tegyem minél teljesebbé. Szükségesnek éreztem felsorolni mindazon pontokat, ahol a klasszikus modellhez képest változtatás történt. Ezek gyakorlati vagy elvi jelentősége természetesen erősen szór. Mindkét szempontból a leginkább kiemelkedő a bolyhos komplexekkel kapcsolatos utolsó rész.

- A „Célkitűzések” rész elég eklektikus, amely meglehetősen eltérő súlyú és jelentőségű feladatok kavalkádját tartalmazza. Hiányzik egy egységes keretbe foglalás. Bár elég nyilvánvaló, hogy a célkitűzések az eredmények alapján lettek megfogalmazva, olykor még sincs megfelelő összhang a célkitűzések és az elért eredmények között. Pl. a 4. célkitűzés: „A katalízis és a DNS-kötés kapcsolata, szerepe a restriktív enzimek szelektivitásában”. Ez egy nagyon általános célkitűzés, ami 4. tézispontban leírt speciális egyedi eset vizsgálata alapján aligha teljesíthető.

Hasonlóképpen a 7. célkitűzés: „A határfelületi víz szerepének magyarázata a specifikus DNS felismerésben”. Az erre reflektáló 7. tézispont teljesen általánosan fogalmaz, holott a csatolt cikk szerint csupán a BamHI esetében történt a szimuláció, s ott is csak egyetlen szekvencia variáns lett összehasonlítva a specifikus szekvenciával. Kérdéses, hogy egyetlen egyedi eset vizsgálata alapján mennyire megalapozott általános következtetést levonni és modellt felállítani. Jó lett volna több példával és kísérleti eredményekkel is alátámasztani a hipotézist.

A célkitűzéseknél az a rendező elv vezérelt, hogy a specifikus DNS felismerés problémájának minél több vetületét és ezen keresztül az általam az utóbbi 13 évben végzett kutatómunkát bemutassam. Számomra az egységes keret a szelektivitás elérése és az ennek alapjául szolgáló mechanizmusok feltárása volt. E cél elérése irányította munkámat is. A célkitűzések tehát a kutatás során felmerült valós kérdéseket foglalják össze. Sajnálom, hogy nem sikerült egységesebb képbe illesztenem ezeket és a bírálóban utólag „összedobált”, kusza célok benyomását keltette. Ez adódhat részben abból a tényből is, hogy a specifikus DNS felismerés egy nagyon összetett folyamat, melynek eddig csak szűk vetületei kerültek részletes elemzésre.

A 4. célkitűzésben felvetett, a katalízis és DNS kötés kapcsolatára vonatkozó kérdést a Pingoud A, Fuxreiter M, Pingoud V, Wende W (2005) Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62(6): 685-707 cikkben vetettük fel (Coupling between recognition and catalysis) és irodalomban közölt

kísérleti adatok összehasonlító elemzésével kerestük a választ. Célzott kísérleteket és ezt alátámasztó számításokat valóban csak egy rendszeren végeztünk. Ebből az II típusú enzimesalád 2 tagjára lehetett következtetést levonni (EcoRI és RsrI), melyeket más enzimekre vonatkozó szerkezeti és mutációs adatokkal vetettünk össze. Egyetértek azon kritikai észrevétellel, hogy dolgozatomban a kapott és az irodalomban közölt eredményeket kapcsolatát részleteznem kellett volna, megerősítve a levont következtetéseket.

A 7. célkitűzésnél ("A határfelületi víz szerepének magyarázata a specifikus DNS felismerésben") szerencsésebb lett volna kevésbé általános cél megfogalmazása. Az idézett közleményben (Fuxreiter M*, Mezei M, Simon I, Osman R (2005) Interfacial water as a "hydration fingerprint" in the noncognate complex of BamHI. *Biophys J* 89(2): 903-911) – a rendszer számításigénye miatt- csak a BamHI enzimet vizsgáltuk. Ezért eredményként „a hidratációs ujjlenyomat” modelljének bevezetésére szóló javaslat és nem ennek általános igazolása szerepel.

- **Kérdés:** Vajon egyéb restriktációs enzimek esetében is igaz-e, hogy a hasítóhely környékén lazábban és ritkábban kötődnek a vízmolekulák a nemspecifikus régiókhoz képest? Rendelkezésre állnak-e ezt alátámasztó kísérleti megfigyelések?

Nem-specifikus, illetve csillag fehérje-DNA komplexről viszonylag kevés szerkezeti adat áll rendelkezésre. Röntgenkristallográfiával, valamint NMR-el tanulmányozott rendszerek: EcoRI, EcoRV, BamHI, glükokortikoid receptor, Cro represszor, CAP. Ezen esetekben mind a specifikus, mind az ettől eltérő szerkezet a rendelkezésre áll, tehát összehasonlító elemzést lehet végezni. A magasabb hőmozgástényezők, valamint egyéb dinamikai paraméterek minden esetben azt támasztják alá, hogy a nem-specifikus komplexekben a vízmolekulák gyengébben kötődnek, mint a megfelelő szubsztrát szekvencia esetén. Ezt tovább erősítik ozmotikus stressz mérések is (pl. Rau, *JMB* 2006 vol. 361, 352), melyek a különböző komplexekben kötött vizek hőkapacitását határozták meg. Érdekességgéppen megjegyzem, hogy a gyengén kötött vizek pozícióit fehérje-fehérje kölcsönhatási „hot-spot” meghatározásra lehet használni és ezt az eljárást az USA-ban egy kollegánk szabadalmaztatta.

- A Jelölt munkáját elsősorban elméleti módszerekkel, számítógépes eljárásokkal végezte. Ezek a módszerek azonban természetüknél fogva számos leegyszerűsítést és közelítést tartalmaznak, ezért a kapott eredmények értelmezésénél fontos a kellő elővigyázatosság és a kísérleti megerősítés. A bíráló több helyen is óvatosabb fogalmazást tartott volna indokoltnak: az igazoltuk/megállapítottuk/ megmutattuk helyett inkább az eredményeink azt valószínűsítik, illetve a számításaink arra utalnak kifejezések használata helyesebb lett volna. Pl. a 12. tézispontban az áll, hogy „A rendezetlen N-vég jelenléte csökkenti a kötési szabadentalpiát. A teljes, valamint az N-vég nélküli homeodomén kötődésének termodinamikáját elemezve kimutattuk, hogy ezért nagyrészt a hidrofób effektus a felelős.” Valójában az elvégzett szimulációk a teljes és az N-vég nélküli homeodomén esetén a szabadentalpiában csupán minimális különbséget mutattak, ami azért sem tekinthető nyomós érvenek, mert a számítások alapján kapott szabadentalpia értékek (-1.7/1.8 kcal/mol) a kísérleti adatoktól (-11.4/13.0 kcal/mol) drasztikusan eltérnek. A kötődés során a vízmolekulák felszabadulásából eredő hidrofób effektus becslés révén történő figyelembevételével jelentősen kisebb (-23.0/26.0 kcal/mol) szabadentalpia értékeket kaptak, ami egyértelműen jelzi a hidrofób effektus fontos szerepét. De a Privalov és munkatársai által kalorimetriával meghatározott kísérleti adatok (Tóth-Petróczy és mts., 2009; Table 1) azt mutatják, hogy a kötési szabadentalpia csökkenéséért alapvetően az entalpiikus járulékok (-2.9 vs. -1.7 kcal/mol) felelősek, ellentétben a tézispont állításával. Ez az eset is azt mutatja, hogy az elméleti számítások segíthetnek a kötődés hátterében álló molekuláris folyamatok azonosításában, a tendenciák felismerésében, de a kapott eredmények értelmezése fokozott óvatosságot kíván.

Köszönöm opponensemnek az árnyaltabb megfogalmazásra vonatkozó megjegyzését. A javasolt kifejezések használata valóban helyesebb lett volna.

A Tóth-Petróczy, J. Am. Chem. Soc. 2009 cikk értelmezésével kapcsolatban a következőket kell végiggondolni. A teljes és az N-vég nélküli homeodomén kötődésének kísérletileg meghatározott szabadentalpia-értékei között a kalorimetriás mérések szerint lényeges különbség mutatkozik: Antp esetén 1.6 kcal/mol, NK2 esetén 2.56 kcal/mol (Dragan és mtsai, *Biochemistry* 2006, vol. 45, 141; 3. táblázat). A

számítások alacsony felbontású, ún. coarse-grained szimulációval történtek, melyben önkényes energiaegységeket használtunk. A számított és a mért adatok ezért közvetlenül nem vehetők össze. A relatív értékekből azonban világosan kiderül, hogy a kísérletileg tapasztalt tendencia - a teljes, rendezetlen véget is tartalmazó homeodomén kötődése kedvezőbb, mint a csonkolt variánsé - a hidrofób effektus figyelembevétele nélkül egyik homeodomén esetén sem volt reprodukálható. Ez mindenképpen arra utal, hogy a hidrofób effektus lényeges eleme a teljes, valamint a csonkolt homeodomén affinitása közötti különbségnek. A hidrofób effektus fontosságát a keskeny-árokban kötődő homeodomének esetén több kísérletes cikk is megerősíti (Cell 131, 530; Nature 461, 1248; Cell, 147, 1270; Ann. Rev. Biochem. 79, 233).

Az 1. táblázatban a kísérleti értékek az entalpikus járulékok között nagyobb különbséget mutatnak, mint az entrópikus tagok között. Elfogadom opponensem azon észrevételét, hogy a csonkolt és a teljes homeodomén kötődése közötti különbség elsősorban entalpikus eredetű. A kísérletes cikk az affinitás ionerősségtől való függés elemzése alapján arra a következtetésre jut, hogy az általunk vizsgált homeodomének N-terminális végeinek hozzájárulásában a hidrofób és nem az elektrosztatikus kölcsönhatások dominálnak (ellentétben más HMG box-okkal). Ebből az általunk használt erőterrel a Lennard-Jones, valamint az elektrosztatikus kölcsönhatásokat számítottuk a fehérje-fehérje és fehérje-DNS kontaktusokra:

$$\sum_{\substack{\text{native-contacts} \\ |i-j|>3}} \left(\varepsilon \left[5 \left(\frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 6 \left(\frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^{10} \right] \right) + \sum_{\substack{\text{non-native} \\ \text{contacts} \\ |i-j|\geq 4}} \varepsilon_{rep} \left(\frac{C}{r_{ij}} \right)^{12} + K_{Coulomb} B(\kappa) \sum_{i,j} \frac{q_i q_j \exp(-\kappa r_{ij})}{\varepsilon_r r_{ij}}$$

- Kérdés: A hidrofób effektus figyelembevétele során a vízmolekulák DNS felszínéről való eltávolításának entalpia járuléka miért nem tükröződik a Tóth-Petróczy és mts. (2009) cikk 1. táblázatának adataiban?

Az általunk használt modell – a legtöbb coarse-grained módszerhez hasonlóan – ún. implicit módon reprezentálja a biomolekulákat körülvevő vízmolekulákat. Ez azt jelenti, hogy az egyedi vízmolekulák nem jelennek meg a szimuláció során, hatásuk elsősorban az elektrosztatikus tagok skálázásán és a dielektromos állandó értékén keresztül mutatkozik meg. Emiatt a vizek entalpikus járuléka a kialakuló fehérje-fehérje és fehérje-DNS kölcsönhatásokon keresztül jelenik meg a számított mennyiségekben. Ugyanakkor a víz-víz kölcsönhatásokat közvetlenül nem számítjuk a modellben. (Erre történtek kísérletek pl. PNAS 2002;99;16064-16068, PNAS 2002;99;685-690, de itt számos más probléma vetődik fel). Tehát a felszabaduló vizek entalpikus járulékát csak részben vettük figyelembe, a kísérletileg legfontosabbnak talált hidrofób kölcsönhatásokon keresztül. Ugyanakkor ez nem volt elegendő a megfelelő, kísérletileg megfigyelt tendenciák reprodukálásához. Ezért a vizek entrópikus járulékát külön becsültük az alábbiak szerint.

A hidrofób effektus entrópia-hozzájárulását a cikk kiegészítő részében (Supplementary data) részletesen leírtuk. Az általunk használt közelítés a Fuxreiter M, Mezei M, Simon I, Osman R (2005) Interfacial water as a "hydration fingerprint" in the noncognate complex of BamHI. Biophys J 89(2): 903-911 cikk a első koordinációs szférára vonatkozó eredményein, valamint Jana és mtsai 2006-ban, a J Phys Chem B 110, 19611-8 cikkben közölt számításain alapul. Az entrópia korrekciót 7 Å-on belül alkalmaztuk. Ezeket minden összegyűjtött konfigurációra átlagoltuk és a WHAM analízisből nyert szabadentalpia értékhez adtuk.

- Az értekezés alapját 15 közlemény képezi, a téziszfűzetben mégis 16 került felsorolásra.

A téziszfűzetben történő felsorolásban szerepel a 2011-ben szereplő Springer által kiadott bolyhos komplexekről szóló könyv is.

- Jelentősen megkönnyítette volna az olvasó tájékozódását, ha a disszertáció végén található közlemények legalább a felsorolásuk sorrendjében lennének csatolva.

A közleményeket időrendben állítottam sorba. Valóban szerencsésebb lett volna a felsorolás sorrendjében csatolni őket.

- Helyenként a disszertáció nem kellő körültekintéssel megfogalmazott kijelentéseket tartalmaz: 2. oldal közepe: „... a fehérje eltávolítja a partnert a kötőzsebből.”

Valóban helyesebb lett volna a „partner távozik a kötőzsebből” kifejezés használata.

- 2. oldal alja: „Mivel a lineáris diffúzió Brown mozgás jellegű és így kitüntetett irányultsága nincs, a fehérje nem tud a teljes DNS szál mentén végighaladni.” A fehérje nem azért nem tud a teljes DNS szál mentén végighaladni, mert a Brown mozgásnak nincs kitüntetett irányultsága. A kölcsönhatás energetikai viszonyai szabják meg, hogy átlagosan mennyi ideig van a fehérje a DNS-sel kontaktusban. Irányított mozgás esetén nyilván jóval hosszabb lenne a végigpásztázott szegmens, de még ebben az esetben sem volna arra esély, hogy a fehérje a teljes DNS szál mentén végighaladjon.

Elfogadom, hogy a dolgozatban használt érvelés nem helyes. A DNS-en lineáris diffúziót végző enzimek laza asszociációt képeznek a DNS-el. Ezt a nem specifikus komplexek röntgenkristallográfiával meghatározott térszerkezetei (pl. Lac represszor, Cro represszor), valamint ozmotikus stressz mérések is igazolják. Ennek következtében a fehérje viszonylag rövid időt tud a DNS-en tölteni, restriktív enzimek esetén pl. a pásztázott szakasz általában 40 bázispár hosszú (Gowers és mtsai Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 1;102(44):15883-8.).

- 15. oldal: „A hibás DNS megnövekedett flexibilitása következtében a bázis kifordulásának gátja a hibás szekvenciák esetében annyira lecsökken, hogy összemérhetővé válik a fehérje haladási sebességével a DNS-en.” Egy energiagátat nyilván nem lehet közvetlenül a fehérje haladási sebességével összevetni.

A dolgozatban pontatlan a megfogalmazás. A kifordulás energiagátjából a bázis kifordulásának sebességére lehet következtetni. A hibás DNS szekvenciák esetén a DNS torzíthatósága annyira megnő, hogy a kifordulás gátja 10 kcal/mol alá csökken. Ez a bázis kifordulásának sebességét $4 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ növeli a szabályos DNS szekvenciákban lévő $\sim 10^2 \text{ s}^{-1}$ értékhez képest. EcoRV esetén a fehérje 1.6×10^6 bázispár s^{-1} sebességgel olvassa a DNS-t (UDG és EndoV esetén nem áll kísérleti adat rendelkezésre). Ez a sebesség összemérhető azzal a báziskifordulási sebességgel, melyet a hibás szekvenciákra számítottunk, de több nagyságrenddel eltér az ép DNS-ben mért sebességtől. Ebből az adódik, hogy a hibás szekvencia esetén a javító fehérjének jóval nagyobb esélye van kölcsönhatásba lépni a kiforduló bázissal. Ezért ez a felismerési mód hatékony megkülönböztetést biztosít abban az esetben is, ha a kifordult bázis és a javító enzim közötti kölcsönhatások gyengék.

- Sokszor zavaró a (szak)szavak egybe- és különírásával kapcsolatos bizonytalanság. Pl. ily módon (helyesen: ily módon), alap-pillér (alappillér), rák-ellenes (rákellenes), szerkezet-meghatározás (szerkezetmeghatározás) stb.

Elnézést kérek a nyelvtani pontatlanságokért, erre igyekszem a jövőben jobban odafigyelni.

- A bolyhos fehérje-DNS kölcsönhatás esetén javasolt lehetséges mechanizmusok megfigyelhetők-e a bolyhos fehérje-fehérje kölcsönhatások esetén is? Esetleg ismertek voltak-e ezek már korábban is?

Ezt a Fuxreiter M (2012) Fuzziness: linking regulation to protein dynamics. *Mol Biosyst* 8(1): 168-177 cikkben elemeztem. Fehérje-fehérje kölcsönhatásoknál sikerült olyan példákat találni, ahol a komplexben is rendezetlen (bolyhos) szakasz kompetitív partnerként szolgál a kötődésnél (pl. mielin-aktin komplex). Bemutattam olyan példákat is, ahol a kötött formában is rendezetlenül maradó szakasz pányvaként működik (pl. UPF1-UPF2). A másik két mechanizmusra: amikor a bolyhos szakasz a kötő rész konformációját befolyásolja, illetve annak flexibilitását módosítja akkor nem akadt példa. Jelenleg folyik egy bővített bolyhos komplex adatbázis építése, reményeim szerint ennek segítségével sikerül kiegészíteni erre vonatkozó eddigi ismereteinket.

Az általam leírt mechanizmusok bolyhos komplexekkel kapcsolatban korábban nem voltak ismeretesek, ezek rendszerezésére nem történt kísérlet. Más rendszerekkel kapcsolatban természetesen használatosak voltak ezek a fogalmak, amint azt a TiBS 2011 cikkben részletesen megemlítem. A konformációs szelekció mechanizmusát rendezetlen fehérjéknél néhány évvel korábban mi írtuk le (Fuxreiter és mtsai 2004).

Még egyszer szeretnék köszönetet mondani opponensemnek, hogy a nyári szünetben időt szentelt munkám alaposan átgondolásának és kérdéseivel, kritikai megjegyzéseivel további kutatásaimat segítette.

Debrecen, 2013. augusztus 28.

Fuxreiter Mónika