



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

BÍRÁLAT

FUXREITER MÓNKA

“A specifikus DNS felismerés molekuláris mechanizmusai”

című MTA Doktori értekezéséről

(Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet 2012)

BÍRÁLÓ: DR. POPPE LÁSZLÓ, egyetemi tanár

(MTA doktora, BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék)

FUXREITER MÓNKA nemzetközi elismertségű kutatásait fehérjék és fehérje-DNS komplexek számításhoz kémiai módszerekkel történő vizsgálatával végezte, mindvégig szem előtt tartva eredményeinek és elméleteinek összhangját a kísérletes adatokkal. Kutatásai során több nemzetközi hírű magyar és külföldi intézetben tevékenykedett [University of Southern California (USA), Rutgers University (USA), Mount Sinai School of Medicine (USA), MTA Enzimológiai Intézet, Weizmann Institute of Science (IL), Laboratory of Molecular Biology, MRC (UK)], végül a Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében kapott lehetőséget önálló tudományos iskola megteremtésére. Tudományos tevékenységével nagy nemzetközi elismertségű kutatók (Arieh Warshel, Roman Osman, Alfred Pingoud, Tompa Péter, Yaakov Levy) munkacsoportjainak munkájába kapcsolódott be számításhoz és elméleti eredményeivel.

FUXREITER MÓNKA az MTA Doktora cím megítélése alapjául szolgáló munkásságáról 21 oldal (+ 9 oldal irodalomjegyzék) terjedelemben, tézisszerű összefoglalással számol be. A tézisszerű összefoglalást a témához kapcsolódó 15 közlemény másolata követi, melyek közül 11 eredeti kutatási eredményekről ad számot, 4 pedig eredeti elméleti elgondolásokat is taglaló összefoglaló munka. Az értekezéshez kapcsolódó témájú további 13, zömében eredeti kutatási eredményeket tartalmazó közlemény és egy szerkesztett könyv. A 2012 datálású téziszjegyzék szerint a megadott 28 közlemény (ezek közül jelölt 20 esetben első vagy levelező szerző) impakt faktora 155,5. Összes cikkeinek száma 45, ezek össz impakt faktora 205,6. Összes hivatkozás száma a 2012 közepéről származó adatok szerint 1344 (ebből független 1103). Ez az érték azóta jelentősen megnőtt (jelenleg 2000 körül lehet), mivel az elmúlt 4 évben évente több mint 200 esetben idézték, tavaly 400 felett. Ezek az adatok jól jellemzik jelölt kvalitásait és nemzetközi elismertségét.

A benyújtott tézisszerű összefoglaló és a mellékelt közlemények alapján megállapítható, hogy Fuxreiter Mónika jelentős önálló kutatómunkát végzett a specifikus DNS felismerést végző fehérjék molekuláris mechanizmusainak megismerésében. Munkáját elméleti módszerekkel, számítógépes eljárások segítségével végezte oly módon, hogy a számítások során mindvégig kísérleti adatokból (pl. fehérje – DNS komplex röntgen szerkezetek) indult ki és a számítások eredményeit mindvégig a kísérleti adatokkal szoros összhangban értelmezte. A fehérje-DNS kölcsönhatások hagyományos, statikus szemléleten alapuló tényezői [i) a fehérjének a DNS

bázisokkal kialakított hidrogénkötés-mintázata; ii) a fehérjének a DNS foszfát csoportjaival kialakított elektrosztatikus kölcsönhatásai; iii) a fehérje és a DNS között specifikusan elhelyezkedő vízmolekulák által közvetített hidrogénkötések] mellett számítási módszerekkel további olyan területeket is vizsgált, mint a specifikus DNS hasítás mechanizmusai (1), fémionok és vízmolekulák szerepe a specifikus DNS felismerésben (2), a DNS szerkezeti és mozgékonyság változásának szerepe a DNS hibák azonosításában (3) és a rendezetlen régiók szerepe a specifikus DNS felismerésben (4).

Fuxreiter Mónika munkája során megalapozott számítási módszereket alkalmazott [enzimkatalízis: EVB/FEP-US (Empirical Valence Bond/Free Energy Perturbation-Umbrella Sampling, hibrid kvantummechanikai/molekulamechanikai megközelítés); protonáltsági állapotok és solvatációs szabadentalpia: PDL/D/S (szemi-mikroszkópikus Protein Dipoles Langevin Dipoles); fémion-nukleinsav bázisok komplexek: DFT MP2 (magas szintű *ab initio* kvantumkémia); víz-szerkezet: GCMC (nagykanonikus Monte Carlo), biomolekulák felxibilitása: all-atom MD (összes atom molekuladinamika); rendezetlen régiók és fehérje-feltekeredés: alacsony felbontású („coarse-grained”, CG) MD szimuláció]. Fontos megemlíteni, hogy az említett módszereket nem csak felhasználta, de ezek közül számos eljárás (PDL/D/S, EVB, pK_a számítások, GCMC, CG MD) fejlesztésében is részt vett. A rendezetlen fehérjék és komplexeinek elemzése és a bolyhos “fuzzy” komplexes elméletének finomítása során elsősorban bioinformatikai eljárásokat (szekvencia keresés és összerendezés, szerkezet-becslés, profil számítás) alkalmazott és szerkezeti adatokat valamint irodalomban közölt funkcionális méréseket használt fel.

Összefoglaló, rövid tézisszerű voltánál fogva a munkában zavaró sajtóhibát keveset találtam. Bírálként nem is az esetleges megtalálható sajtóhibák felsorolása fontos, ám fel kell vetnem néhány általános kérdést.

- 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 sorsámozta 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 fémionokkal végzett vizsgálatok során magas szintű *ab initio* módszerekkel (DFT MP2) megállapította, hogy a Mg²⁺ ionok „keményebbek”, míg a Mn²⁺ ionok polarizálhatóbbak és hajlamosabbak töltésátadásra. Mennyire jeleníthetőek meg ilyen szintű különbségek pl. az elsősorban a BamHI restrikciós endonukleáz tanulmányozása során alkalmazott a MS szimulációk során?

- Ugyancsak a *Bam*HI restrikciós 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?
- 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?

Mindezen kérdések tisztázó célúak és semmit sem vonnak le a munka magas színvonalú tudományos értékéből. Hangsúlyozandónak tartom, hogy a számítások olyan dinamikus tulajdonságokon alapuló, molekuláris szintű sajátosságok feltárására nyújtanak lehetőséget, amelyek kísérleti módszerekkel közvetlenül nem tanulmányozhatóak. Mindenképpen újdonságértékűnek és saját tudományos eredményként értékelendők tartom az alábbiakat:

- *A specifikus DNS hasítás mechanizmusainak tanulmányozása* során elsősorban a *Bam*HI restrikciós endonukleáz vizsgálatával értelmezte a PD..D/ExK típusú restrikciós endonukleázok katalitikus oldalláncainak szerepét és egységes katalitikus modellt dolgozott ki a PD..D/ExK típusú restrikciós endonukleázokra.
A PD..D/ExK típusú restrikciós endonukleázok katalízisében értelmezte a fémionok szerepét és megállapította, hogy a *Bam*HI-ben a két fémion pozíció nem egyenértékű (a nukleofil támadó oldalán elhelyezkedő M_A pozíció stabil, míg a távozó csoport kilépése oldalán elhelyezkedő M_B ion helyzete változékonnyabb).
Az *Eco*RI és *Rsr*I restrikciós endonukleázok *Eco*RI-től 22 aminosavban különböző egyik kimérája esetében számításokkal értelmezte a *Eco*RI-nál nagyobb specifikus DNS kötő affinitást (több hidrogénhíd), ám kisebb aktivitást (csökkenő koordináció az alegységek között).
- *A fémionok és vízmolekulák specifikus DNS felismerésben betöltött szerepének tanulmányozása* során magas szintű *ab initio* kvantumkémiai számításokkal értelmezte a restrikciós endonukleázok szelektivitásában a Mg^{2+} és Mn^{2+} ionok jelenlétében tapasztalt 5 nagyságrend különbséget.
A *Bam*HI felismerési komplexben és a célszekvenciától 1 bázispárban eltérő csillag-komplexében a báziscsere helyén lényegesen több vizet talált, valamint a hasítás helyén a vízmolekulák erősebben kapcsolódnak a DNShez, mint a specifikus komplexben (nehezebben hozzáférhetők a fehérje számára, tehát a szoros komplex kialakulását akadályozzák). Javaslatot tett a „hidratációs ujjlenyomat” (tk. a felismerési komplexben vízmolekulák DNS körüli szekvenciaspecifikus eloszlása és energetikája) modell bevezetésére. A specifikus és csillag-komplex összehasonlítása alapján rámutatott a hidrofób effektus bázissorrendtől való függésére és specifikus felismerésben játszott szerepére.
- *A DNS hibák azonosításában tanulmányozta a DNS flexibilitás szerepét.* A DNS dinamikus tulajdonságait sérült és ép szekvencia esetén uracil DNS-glikoziláz (UDG) és a timin dimert (TD) javító endonukleáz V (EndoV) enzimekkel vizsgálva megállapította, hogy mindkét enzim jelentősen torzítja a DNS-t és a megfelelő bázist a DNS tengelyéből „kiforgatja” (base flipping). Mindkét sérüléstípusnál összefüggést talált a DNS lokális

meghajlása és a báziskinyílás között.

Ezt értelmezte azzal, hogy meghatározta a timin dimert és az uracil tartalmazó hibás, illetve a megfelelő ép DNS esetén a szabadenergia-felszínnek alapján a bázis-kinyílás útvonalára vonatkozó kombinált reakciókoordinátát. A könnyebb deformálhatóság következtében hibás szekvenciák esetén a bázisok kifordulásának energiagátja jelentős csökkenést mutatott a megfelelő ép DNS-hez képest.

Ennek alapján általános modellt javasolt a DNS hibák felismerésére, mely a sérült és ép DNS szekvenciák eltérő dinamikai tulajdonságain alapul. A DNS hibák gyengítik a hidrogénkötést a szemközti bázissal (bázisokkal), ami elősegíti a DNS hiba körüli lokális meghajlását és a hibás bázis kifordulását. A javító fehérje kölcsönhatásai révén mindkét koordináta mentén tovább torzítja a DNS-t.

- *A rendezetlen régiók szerepét tanulmányozta a specifikus DNS felismerésben.* Ennek során vizsgálta a rendezetlen *N*-vég („*N*-tail”) szakaszok szerepét a homeodomének (ezek a többsejtű állatok egyedfejlődése során a végtagok, függelékek fejlődését szabályozzák) szerkezetének kialakításában. Az NK-2 és Antp homeodomének feltekeredését és kötődését vizsgálva azt találta, hogy a különböző hosszúságú rendezetlen *N*-végek szabad állapotban destabilizálják a homeodómén globuláris részét. Az *N*-vég specifikus kontaktusokat létesít a DNS-el, így a teljes homeodoméneknél a destabilizáció kötődéskor csökken.

A rendezetlen szakaszok homeodomének specifikus DNS kötéséhez történő hozzájárulásának vizsgálata során úgy találta, hogy a rendezetlen *N*-terminális régióknak jelentős hatása van a DNS-hez kötődés kinetikájára és termodinamikájára is és az *N*-vég jelenlétében a specifikus kontaktusok kialakulásához szükséges idő lényegesen lerövidül. Kimutatta, hogy ezért nagyrészt a hidrofób effektus – a keskeny árokból felszabaduló vízmolekulák entrópiánövekedése – a felelős.

Jellemezte a bolyhos fehérje-DNS komplexeket és feltárta kialakulásuk molekuláris mechanizmusait. A specifikus DNS-komplexek kialakulása során előfordul, hogy a rendezetlen régiók csak részben alakítanak ki stabil térszerkezetet és a kötőfelszíntől távoli, rendezetlenül maradó (ún. „fuzzy”) szakaszok jelentősen befolyásolhatják a DNS-kötés affinitását vagy specificitását. A bolyhos fehérje-DNS komplexek sajátosságait kísérleti adatokkal alátámasztva és elemezve javaslatot tett a következő 4 kötődési modellre, *i*) Konformációs szelekció (a rendezetlen rész eltolja a kötő régió konformációs egyensúlyát a partnerrel kompatibilis szerkezet felé); *ii*) Flexibilitás moduláció (a rendezetlen rész a kötő régió mozgékonyosságát változtatva módosítja a kötés entrópiáját); *iii*) Kompetíció (a rendezetlen vég a DNS-el versenyzik a töltött oldalláncokért); *iv*) Pányvázás (a rendezetlen rész megnöveli az egyik kötő régió lokális koncentrációját a DNS körül).

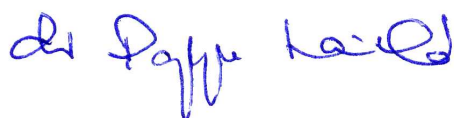
Jellemezte és értelmezte a bolyhos fehérje-DNS komplexek szabályozó mechanizmusait. A bolyhos komplexek távoli, rendezetlen régiói a specifikus DNS kötését szabályozhatják (befolyásolni tudják a kötőfelszín viselkedését úgy hogy nem hat rájuk szerkezeti kényszer). A rendezetlen régiók tulajdonságait további fehérje-fehérje kölcsönhatások, poszttranszlációs módosítások, illetve ún. alternatív splicing módosíthatják.

Jellemezte a bolyhos komplexek szövet-specificitásban játszott szerepét. Szövet-specifikus exonok által kódolt fehérjeszakaszok és a megfelelő teljes fehérjék tulajdonságait megvizsgálva azt találták, hogy a szövetspecifikus exonok nagyrészt rendezetlen régiókat kódolnak, melyek konzervált kötő motívumokat tartalmaznak.

Szerkezeti sajátágaik elemzése azt mutatta, hogy a partnerrel csak rövid motívumok lépnek kölcsönhatásba, míg távolabbi környezetük a partnerhez kötődve is rendezetlen marad, tehát a szövet-specifikus exonok bolyhos komplexek kialakítására alkalmas szakaszokat kódolnak. Ezek jelentős arányban poszttranszlációs módosítási helyeket is tartalmaznak, melyek az előzőek szerint befolyásolják a komplex viselkedését. Ennek példaként részletesen jellemezték az Ultrabithorax transzkripció faktor DNS-hez kötődését.

Az értekezés áttekintésekor igen szép volt látni, hogy elsősorban a mintegy tíz évvel (természetesen nem előzmények nélkül, hanem a korábbi tapasztalatokkal, szellemiséggel és infrastruktúrával a háttérben) ezelőtt elkezdett munkát – a DNS manipuláló enzimek vizsgálata – hogyan használta fel egyre komplexebb módon különböző DNS-fehérje kölcsönhatások jellemzésére. Ezek után jól látható, hogyan szélesedik ki e tevékenység – színvonalas nemzetközi együttműködések is felhasználva – a kötőhelyek és kötésmódok finomabb részleteinek értelmezésére, majd a dinamikus tanulmányok ésszerű következményeként a rendezetlen kötőszakaszok és fehérjék dinamikus viselkedésének elméleti vizsgálatára. A területen elért eredményekből rangos kémiai / biokémiai folyóiratokban közölt 28 közlemény és az ezekre kapott 1500 körülire tehető idézet jól tükrözi ezen erőfeszítések eredményességét. Ennek megfelelően javaslom az értekezés MTA doktora fokozat megszerzéséhez szükséges nyilvános vitára bocsájtását, és sikeres védelem esetén az MTA doktora fokozat odaítélését.

Budapest, 2013. augusztus 21.



(Dr. Poppe László)