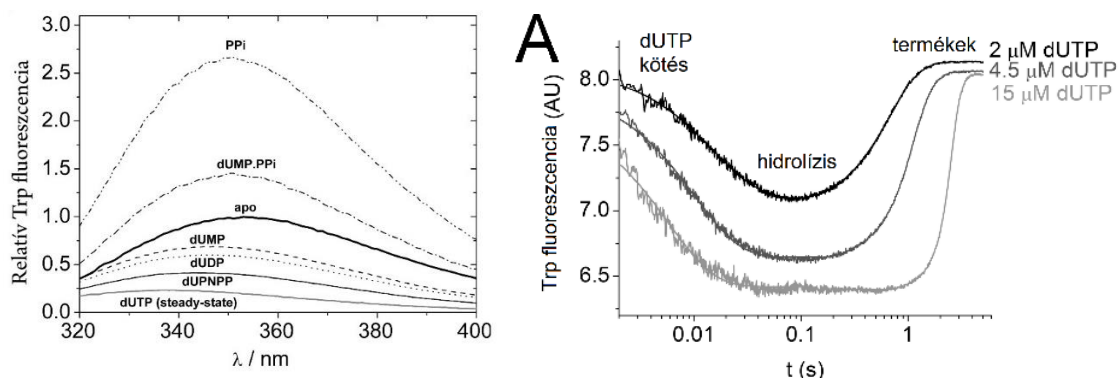


Válasz Dr. Orbán Tamás opponensi bírálatára

Köszönöm Dr. Orbán Tamás a dolgozatom értékelésére szánt figyelmét és konstruktív bírálatát. Az értekezéssel kapcsolatos kérdéseire kérem fogadja az alábbi válaszokat.

1. Ha jól értem, az értekezés 13. oldalán, a 4. ábrán bemutatásra kerül, hogy a dUTPáz enzim különböző ligandumokkal alkotott komplexei hogyan különböztethetők meg egymástól a fluoreszcencia spektrumok segítségével. Ugyanakkor a valóságban soha sincs „tiszta állapot”, vagyis egy reakcióelegyben egyszerre többféle komplex is jelen van, különböző mennyiségben (pl. a dUMP, a dUMP.PPi és a PPi molekulák). Számomra az nem derült ki, hogy ilyen helyzetben, pusztán a spektrum felvételével hogyan lehet, illetve meg lehet-e ezeket egymástól különböztetni – lévén a spektrumok részben átfednek.

A tiszta ligandumkötött állapotok relatív fluoreszcenciája és a kötések egyensúlyi állandóinak ismerete lehetővé tette a hidrolízis reakció időbeni követését és értelmezését a fluoreszcenciás gyorskinetikai mérésekben (1. ábra). Abban a szerencsés helyzetben voltunk, hogy az enzim szubsztrát és termék komplexeiben a ligandummal kölcsönható fluoreszcens szenzor fluoreszcencia intenzitása jelentősen eltért (1. ábra). Ha az apoenzim, a szubsztrát- és a termékkötött enzim relatív fluoreszcencia intenzitásai egy adott hullámhosszon nem különböztek volna egymástól, a reakciót csak a termékfelszabadulás vagy a szubsztrátfogyás mérésével lehetett volna követni, amely az enzim konformációváltozásairól nem nyújt közvetlen információt. A tiszta állapotok spektrumainak tehát az a jelentősége, hogy demonstrálják az aktív helyre beépített Trp szenzor ligandum differenciálási képességét.



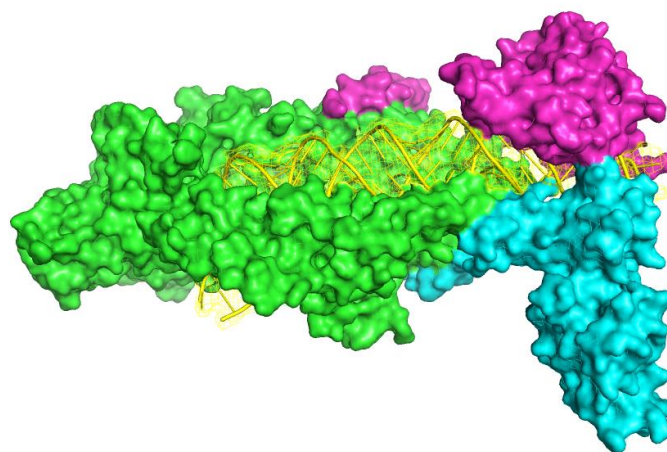
1. ábra (4. és 17.A ábrák a dolgozatban) A bal oldali panelen látható tiszta állapotok fluoreszcencia spektrumainak segítségével rekonstruálni lehet az enzimreakció időbeni lefutásának eseményeit a jobb oldali panelen.

2. Különösen érdekesnek és szellemesnek találtam az 5.1.4. fejezetben, ott is a 12. ábrán bemutatott módszert: a heterotrimerként működő dUTPáz enzimkomplex alegységeinek kovalens összekapcsolását, és az ilyen módon történő vizsgálatát. Mennyire elterjedt ez a módszer, és mik a limitációi? Számíthat-e például a kovalens összekapcsolás sorrendje olyan esetben, ahol a heterotrimer 2 azonos és egy különböző alegységből áll? A kérdés mögött valójában egy olyan esetleges együttműködés ötlete is megjelenik, hogy a bíráló kutatócsoportja által vizsgált, a

mikroRNS-ek processzálását végző Drosha/DGCR8 enzimkomplex vizsgálható lenne-e ilyen módszerrel?

Oligomer enzimek alegységeinek kovalens összekapcsolására vannak példák az irodalomban (1), de jól érzi a bíráló, hogy körültekintően kell eljárni ezek használhatóságával kapcsolatban, és emiatt kevésbé elterjedt a módszer. Meg kell tudni bizonyosodni arról, hogy a kovalensen összekapcsolt enzim konformációváltozásait az összekapcsolás nem akadályozza. Esetünkben ezt a fent tárgyalt fluoreszcens szenzor tette lehetővé. Igen, a sorrend is számíthat egy heterotrimer esetében, ahol a különböző alegységek szabad N- vagy C-terminális végződése befolyásolhatja a komplex működését. Ezen elméleti kritériumok mellett további kihívást jelenthet a konstrukciót kódoló DNS előállítás. Ha azonos alegységeket is tartalmaz a komplex, akkor ez rekombinációs eseményeket indukálhat és hátráltatja a klónozást. További kihívás az alegységeket összekötő megfelelő linkerek kiválasztása, amelyeknek elég hosszúnak kell lenni a szabad mozgás lehetővé tételéhez. Ehhez a feltételhez érdemes ismerni az enzim szerkezetét, amelynek alapján az összekötendő C- és N-terminális távolságokat hozzávetőleg ki lehet számolni. Mindezek figyelembevételével azt gondolom, hogy már jól ismert enzimek, enzimkomplexek esetében nyújthat ez a módszer a feltett kérdésekre adekvát választ.

Tisztelettel köszönöm az együttműködés lehetőségének felvetését! Ennek jegyében utánanéztem a Bíráló érdeklődési körébe tartozó Microprocessor komplexnek a fenti szempontok szerint. Létezik krioelektronmikroszkópos szerkezet a mikroRNS-t kötött, csonkolt polipeptidláncokból képzett heterotrimeréről (2. ábra). Ebben a DGCR8 alegységek N-terminálisai nem látszanak. Ahhoz, hogy a kovalens összekötést tervezni lehessen, fontos lenne ismerni a 3 alegység topológiáját, az összes polipeptidlánc N- és C-terminálisainak egymáshoz viszonyított helyzetét. A megvalósítást az is nehezíti ebben az esetben, hogy a komplex nagy, a csak a szerkezetben látszó része mintegy 1400 aminosav, a natív fehérjekomplex pedig majdnem 3000 aminosav hosszú. Tovább tetézi a komplexitást a mikroRNS kötése, amely a komplex szinte teljes hosszában történik. Ezt a linkerek jelenléte megakadályozhatja, mint a cipőfűző a cipő nyelvének szabad elmozdulását. Összességében úgy látom, hogy a jelenlegi szerkezeti ismeretek birtokában ez a heterotrimer még nem alkalmas a kovalens összekapcsolás racionális tervezésére.



2. ábra A részleges Drosha/DGCR8 enzimkomplex krioelektronmikroszkópos szerkezete (PDB kód: 6V5B). A polipeptidláncok molekuláris felszínként, az RNS szalagmodellként ábrázolva. zöld, Drosha 411-1366 aminosav; kék és magenta, DGCR8 493-750; sárga, mikroRNS

3. Szintén nagyon gondolatébresztőnek találtam az EDTA-t mint kérdéses „inert kelátor”-t vizsgáló kísérletsorozat bemutatását (5.1.7. fejezet). A munka tudományos visszhangja alapján az itt vázolt eredmények mennyire befolyásolhatják más, kofaktorként Mg^{2+} -t használó enzimek esetében kapott mérési eredményeket? Gondolok itt például bizonyos transzpozázok DNS hasító aktivitására, vagy akár több RNS-lebontó enzim működését leíró modellre.

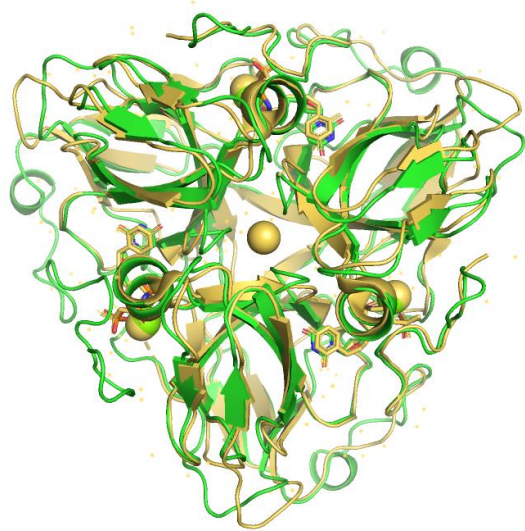
A munka visszhangja sajnos elmarad annak figyelemfelkeltő céljától. Ez volt eddigi pályafutásom legnehezebben elfogadott kézírata (11 releváns szaklapban fordult meg) véleményem szerint a téma „kellemetlensége” miatt. Minden esetre a sok építő kritika mentén az újabb és újabb hozzáadott kísérletek megerősítették azt a megfigyelést, amely szerint minden olyan enzim működését befolyásolhatja Mg^{2+} -tól függetlenül is az EDTA, amely dNTP-t köt, mivel az EDTA a dNTP kötőhelyét foglalja el. Ennek a jelenségnek a gyakorlati jelentősége az adott kérdésfeltevéstől függ. A kofaktorként Mg^{2+} -ot kötő enzim gátlásának céljából alkalmazott EDTA gátlási mechanizmusának esetében (tipikus példa a reakció pillanatszerű leállítása EDTA hozzáadásával) nincs jelentősége annak, hogy az EDTA azért gátol, mert elvonja a kofaktort vagy pedig közvetlenül, az enzimhez való kötődéssel. Akkor azonban, amikor enzimmechanizmust vizsgálunk, eredményeink tükrében érdemes olyan körülmények között is megvizsgálni az enzimreakciót, amelyekben nem használunk EDTA-t a kofaktor elvonására, különben elhamarkodott lehet az a megállapítás, hogy az adott enzim nem működik kétértékű fémion hiányában. A Bíráló által említett transzpozázok nagy energiájú kofaktorok, azaz nukleotidok hidrolízisét nem igénylik a DNS editálásához. Ezért az a nukleotid kötősebben történő EDTA kötés, amelyet leírtunk, nem tud létrejönni. RNS-lebontó mechanizmusból azonban számos létezik. Ezek közül azokra, amelyekben szerepet játszik a nukleotidkötés, lehet olyan Mg^{2+} -tól független gátló hatással az EDTA, amelyre a figyelmet felhívtuk. Ezt prediktálni nagyfelbontású enzimszerkezet meglétében lehet.

4. Az 5.2.1. fejezetben a jelölt a dUTPáz enzimek mikobaktériumokra specifikus felszíni hurokszekvenciáját vizsgáló kutatásokat mutatja be. Ehhez kapcsolódva kérdezném, hogy vajon a „hurok nélküli” *M. tuberculosis* enzim képes-e komplementálni humán sejtekben a dUTPáz hiányát? Illetve szintén kérdés számomra, hogy működhet-e egy humán-mikobaktérium dUTPáz heterotrimer, illetve ennek a működés szempontjából számít-e a sztöchiometrikus összetétele?

A hurok nélküli *M. tuberculosis* enzim hatását nem vizsgáltuk más fajokban. A humán és a *M. tuberculosis* enzim enzimatisz tulajdonságai azonban nagyon hasonlóak. A dNTP készlet fajra jellemző dUTP/dTTP arányának fenntartása szempontjából fontos K_M paraméter a két enzimnél gyakorlatilag megegyezik, mindkettőre $1 \mu M$ körüli értéket mértünk mi és mások is hasonló körülmények között (2–4). Ezért azt gondolom, hogy a humán dUTPáz azon funkcióját, hogy elhidrolizálja a sejtben folyamatosan termelődő dUTP-t, a *M. tuberculosis* enzim megfelelően el tudná látni. Csakúgy, mint a hurok nélküli *M. tuberculosis* enzim, mivel a hurok az enzimatisz tulajdonságokat kevésbé befolyásolja (K_M (WT) = $0,9 \pm 0,5 \mu M$; K_M (hurok nélküli) = $1,1 \pm 0,2 \mu M$ (3)). Hasonlóan indikatív lehet a fajok közötti behelyettesíthetőségre nézve az az eredmény, hogy az eddigi egyetlen ismert StI nevű fehérje inhibitor mind a humán, mind a *M. tuberculosis* enzimet gátolja kiterjedt fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül (5,6).

Egy humán-mikobaktérium dUTPáz heterotrimer működőképessége érdekes szempontokat vet fel. A két enzim monomer szekvenciáinak hossza és konzervált motívumai is közel azonosak. A két trimer kristályszerkezete is jól egymásra illeszthető (3. ábra). Azonban a 3 monomer által alkotott központi csatorna a humán dUTPázban hidofil és $2 Mg^{2+}$ ion befogadására alkalmas, míg a *M. tuberculosis* enzimben a csatorna jórészt hidrofób. Ez lehet egy olyan tényező, amely miatt a heterotrimerek

stabilitása és enzimatis működése szuboptimális lehet. Az, hogy két *M. tuberculosis* és egy humán monomer építi fel a heterotrimert, vagy fordítva, szintén a stabilitást befolyásolhatja leginkább. *In vitro* körülmények között a humán enzim könnyen tisztítható, oldatban napokig megőrzi aktivitását, nehezen kristályosítható. A *M. tuberculosis* enzim ezzel szemben hajlamos a kicsapódásra, aktivitását hamar elveszti és könnyen kristályosodik. Ezek alapján azt gondolom, hogy egy nagyobb humán monomer tartalmú trimer oldatban stabilabb lenne.



3. ábra A humán (PDB kód: 2hqu, sárga) és a *M. tuberculosis* (PDB kód: 2py4, zöld) dUTPáz enzimek kristályszerkezeteinek egymásra illesztése. A polipeptidláncok szalagmodellrel, a Mg^{2+} ionok gömbként, a ligandumok pedig pálcikamodellként ábrázolva.

5. Az enzim fiziológiai funkcióit vizsgáló 5.2.2. fejezetben bemutatott 3. táblázatban a 'D83N Dut' mutáns K_M értéke különösen nagy szórást mutat (meg is van jelölve), ennek mi lehet az oka? Kérdezem ezt annak fényében, hogy a táblázatban közvetlenül fölötte szerepeltetett 'T138stop Dut' mutáns K_M értéke nagyságrendileg összevethető az előbbi mutánséval, a szórás ebben az esetben mégis jóval kisebb mértékű.

A T138stop mutáns a D83N-nél háromszor magasabb aktivitása a K_M paraméter pontosabb meghatározását tette lehetővé. Mindkét említett mutáns alacsony aktivitással rendelkezik, a Bíráló által éles szemmel kiemelt K_M paraméter bizonytalansága az aktivitásmérésre használt módszerünk teljesítőképességének határát jelzi. Megjegyzendő, hogy a különböző fajokból származó dUTPázok katalitikus Asp oldalláncát érintő mutánsokat, mint amilyen a D83N is, az irodalomban gyakran egyszerűen inaktívnak titulálják. Ez praktikus szempontból így is van.

6. 44. oldalon, a 26. ábra aláírásából lemaradt a lila 'ZEN' és a fekete 'IBFQ' molekulák magyarázata. A témához tartozó közleményben ezt megtaláltam, de ott sem volt egészen világos ezeknek a szerepe: a 'ZEN' a tőle 5' irányban elhelyezkedő FAM molekula fluoreszcenciáját csillapítja csak, vagy interakcióba lép az 'IBFQ'-val is?

Elnézést kérek, hogy ez a magyarázat nem szerepelt a dolgozatban. A ZEN és az IBFQ (3' Iowa Black® FQ) is a FAM fluorofór fluoreszcenciájának csillapítására szolgál, a két kvencser abszorpciós spektruma

azonban eltér. Az a tapasztalat, hogy egy belső (ZEN) és egy 3' terminális kvencser molekula alkalmazásával lehet a legkisebb fluoreszcens háttérrel és ezért a legjobb jel/zaj arányt elérni.

Ismételten szeretném kifejezni köszönetemet Bírálóm munkájáért és különösképpen a motiváló kérdésekért. Kérem a fenti válaszaim szíves elfogadását, és az MTA doktora cím odaítélésének támogatását!

Budapest, 2022. augusztus 31.



Tóth Judit

Referenciák

1. Martin A, Baker TA, Sauer RT. Rebuilt AAA + motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature* [Internet]. 2005 Oct 20 [cited 2014 Dec 16];437(7062):1115–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16237435>
2. Tóth J, Varga B, Kovács M, Málnási-Csizmadia A, Vértessy BG, Toth J, et al. Kinetic mechanism of human dUTPase, an essential nucleotide pyrophosphatase enzyme. *J Biol Chem* [Internet]. 2007/09/13. 2007 Nov 16 [cited 2012 Oct 11];282(46):33572–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17848562>
3. Pecsí I, Hirmondo R, Brown AC, Lopata A, Parish T, Vértessy BG, et al. The dUTPase enzyme is essential in *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS One* [Internet]. 2012/06/02. 2012 Jan [cited 2012 Oct 11];7(5):e37461. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3360063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Quesada-Soriano I, Leal I, Casas-Solvas JM, Vargas-Berenguel A, Barón C, Ruiz-Pérez LM, et al. Kinetic and thermodynamic characterization of dUTP hydrolysis by *Plasmodium falciparum* dUTPase. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2008 Sep;1784(9):1347–55.
5. Hirmondó R, Szabó JE, Nyíri K, Tarjányi S, Dobrotka P, Tóth J, et al. Cross-species inhibition of dUTPase via the Staphylococcal StI protein perturbs dNTP pool and colony formation in *Mycobacterium*. *DNA Repair (Amst)*. 2015;30:21–7.
6. Nyíri K, Mertens HDT, Tihanyi B, Nagy GN, Kohegyi B, Matejka J, et al. Structural model of human dUTPase in complex with a novel proteinaceous inhibitor. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2020 Feb 9];8(1):4326. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29531348>