

Bírálat

Tóth Judit

A DNS-építőkövek dinamikájának szerepe a genomstabilitásban

címmel benyújtott MTA doktori értekezéséről

készítette: Várallyay Éva

Megtiszteltetésnek vettem és örömmel vállaltam Tóth Judit MTA doktori értekezésének bírálatát. A Vértessy Beáta által vezetett csoport dUTP-ázokat vizsgáló kutatásait már igen régóta figyelemmel kísérem, mivel lenyűgözött az a szerteágazó, mindenre kiterjedő érdeklődés és szemlélet, ahogy a „hiba, vagy jel?” alapkérdéstől a genom szintű szabályozásokig feltérképezték a dUTP-hez, dUTP-ázokhoz kapcsolódó biológiai információt. Tóth Judit ebben a csoportban dolgozva építette és fejlesztette saját csoportját úgy, hogy közben végig aktív része maradt a „nagy egésznek”. Ez a hozzáállás igen sikeres startégiának bizonyul, ami számtalan igen nívós cikk megszületését és komplex biológia kérdések megválaszolását tette /teszi lehetővé.

Az értekezés 12 szakcikk (Össz IF:61,835) eredményeit foglalja össze. A közlemények mind rangos, általában D1-es folyóiratokban jelentek meg, Tóth Judit mindegyiknek levelezőszerzője (8 esetben megosztva), egy esetben első, 9 esetben utolsó szerzője. Ezen cikkekre összesen 260 alkalommal hivatkoztak, ami jól mutatja eredményeik fontosságát.

Tóth Judit szakmai felkészültsége, kutatói teljesítménye elismerést érdemlő, és az, hogy a habitusvizsgálat zöld utat engedett a dolgozat bírálatának is ezt bizonyítja.

A doktori értekezés tézis alapú, egy rövid bevezető után három oldalon kapunk szakmai háttérinformációt. Ezt követi a célkitűzések rész, 10 megfogalmazott céllal, melyek teljesülése a rövid anyagokat, módszereket tárgyaló rész után következik, alapvetően a cikkekre lebontva. Az eredmények ismertetése során kitekintést kapunk a jövőbeli kutatási irányokról, majd az új tudományos eredményeket felsoroló fejezet zárja az érdemi részt. Ezt követve, rövidítésjegyzéket (nagyon kevés tétellel) és irodalomjegyzéket (162 hivatkozott irodalommal, melyből 42 a csoport publikációja). Az értekezést ezután az alapját képező 12 szakcikk és azok kiegészítő információi követik.

A bevezető, szakmai alapsmereteket tartalmazó (nagyon szűkszavú) és a tovább gondolkodást tartalmazó fejezetek igen olvasmányosak, gördülékenyek. A publikációk ismertetésének szövegezése nem sikerült ilyen jól. Ennek oka lehet az, hogy az absztrakt tükörfordításaiként születtek (az értést sokszor nehezítő nem magyaros szórend is ezt sugallja), kiegészítve egy-egy fontos kérdés részletes magyarázatával, ami viszont az egészből kiragadva nagyon nehezen érthető. A tézis alapú dolgozat vállalása nehéz műfaj, nincs rá bevált recept. Jelen értekezést olvasva azt gondolom, hogy talán összefoglalóként, a dolgozat írásáig összegyűlt eredményeket együttesen tárgyalva harmonikusabbra sikerülhetett volna.

Tézis alapú disszertáció opponensének lenni sem egyszerű feladat, hiszen a dolgozat tudományos értékét az elfogadott, megjelent szakcikk adják, ami adott. Az ezeket kontextusba helyező, röviden bemutató, új műként elkészített értekezés viszont, mivel nem célja, nem is lehet alkalmas a kutatások részletes ismertetésére. A beadott doktori értekezés javítására utólag nincs lehetőség, így a

nyelvhelyességi és egyéb szerkesztési javaslatokat sem fogalmaznék meg. Opponensi véleményem elkészítésekor ehelyett inkább az olvasáskor felmerülő kérdéseimre koncentrálnék.

A dolgozat alapvetően három kérdéskört ölel fel. Az első rész hét, a második három, míg az utolsó két szakcikk eredményeit mutatja be.

A humán dUTP-áz enzimatisz mechanizmusát ismertető részben:

1/A humán dUTP-áz, a csoport által meghatározott térszerkezetének ismeretében, a mobilis C terminális karában irányított mutagenézissel létrehoztak egy olyan mutánszt, ami lehetővé tette az aktív centrumba bekötődő szubsztrátok megkülönböztetését és így a katalizált reakció enzimatisz lépéseinek azonosítását. Megoldották a quenched flow kísérletekhez szükséges radioaktívan jelölt szubsztrát szintézisét, aminek a használatával meg tudták állapítani azt is, hogy mi a reakció sebesség meghatározó lépése. A létrehozott kinetikai módszertárral azt is tisztázni lehetett, hogy a kemoterápiában használt 5-fluoro-dezoxiuridin származékokat a dUTP-áz hidrolizálni tudja, így a terápia hatékonyságát növelné, ha egyidejűleg a dUTP-áz aktivitását is gátolni lehetne.

Vajon a cikket hivatkozó munkák között van olyan, ami ez utóbbi felhasználás során használta a csoport által tisztázott mechanizmust?

2/ A PDB adatbázisban található nukleotidokat hidrolizáló enzimek térszerkezetének vizsgálatakor azt találták, hogy ezek aktív centrumában gyakran fordulnak elő aromás oldalláncok. A humán és a Mycobacterium tuberculosis dUTPázának homológ helyeit F₁₅₈ és H₁₄₅ W-re cserélték. A mutánsok térszerkezetének vizsgálatával arra a következtetésre jutottak, hogy az aromás oldalláncoknak nem a szubsztrát kötésre, hanem a kémiai lépés sebességi állandójára voltak hatással.

Az előző kísérleteikben human dUTP-ázban pont ezt a pozíciót F₁₅₈ mutálták W-re. Mivel magyarázták, hogy ennek a mutációnak magára a katalízisre nem volt hatása?

3/ A dUTP-áz C terminálisában azonosítottak egy P-hurokszerű motívumot, amiben mutánsokat hoztak létre. Ezeket kristályosítva és a térszerkezetet meghatározva arra a következtetésre jutottak, hogy a P hurokszerű motívum szerepe kettős: A szubsztrát gamma foszfátjával kialakított H kötésen keresztül elősegíti a z alfa-foszfát katalitikusan kompetens konformációjának felvételét, illetve lehetővé teszi a szubsztrát-nem szubsztrát dUTP és dUDP megkülönböztetését.

Felhasználták-e, vagy tervezik-e használni ezeket a mutánsokat más kísérletekben?

4/A dUTP-áz, ellentétben a dCTP deaminázzal és a bifunkciós dCTP-deamináz-dUTP-ázzal csak a dUTP-t tudja kötni, így elveszik a termékként keletkező dTTP alloszterikus szabályozásának lehetősége. A monomerek aktív helyének vizsgálata után a trimerként aktív dUTP-ázokban vizsgálták az egyes alegységek potenciális alloszterikus hatását. Ehhez egy a trimert egy molekulaként kódoló rekombináns fehérjét hoztak létre, melynek alegységeit különböző kombinációkban mutánsokra cserélték. Ezen mutánsok, vagy képtelenek voltak az uracil kötésre, vagy azok elhasítását nem tudták katalizálni, vagy a katalitikusan kompetens konformációt felvételét nem tudták segíteni. A kiméra dUTP-ázok vizsgálata azt mutatta, hogy az alegységek egymástól függetlenül működnek, a dUTP-ázokban nincs allosztéria, viszont a hidrolízis hatékonysága több nagyságrenddel nagyobb, mint a Dcd-ben, vgy Dcd-dut-okban.

A mutánsok mindegyikében legalább két aktívan működő alegység volt jelen. Vajon működőképes lenne egy csupán egy, funkcionálisan aktív monomert tartalmazó dUTP-áz trimer?

5/ A C terminális kar funkciójának vizsgálatára olyan M. tuberculosis dUTPáz (ez jobban kristályosodik) mutánsokat készítettek, melyekben vagy csak az aromás pi-pi kölcsönhatás szűnt

meg, vagy a teljes pi-hurokszerű motívum hiányzott. A mutánsok térszerkezetének vizsgálatával arra jutottak, hogy a hurok jelenléte felelős a foszfáthasítási és pronotáviteli lépés összekapcsolásáért, hiánya két lépés szétválását, és egy megváltozott nagy energiagáttal rendelkező reakció utat eredményez.

A *Mycobacterium tuberculosis*-ban a dUTP-áz mellett a Dcd_DUT is jelen van. Vajon az, hogy van egy másik, a dCTP-dUMP átalakítást végző enzim ebben a fajban hatással van-e a dUTPázának működésére?

6/A vizsgált dUTP-ázok C terminális karának állapotáról a krisztallográfiai és fluoreszcens-spektroszkópiai adatok ellentmondásosak voltak. A csoport által optimalizált RAMD módszerrel viszont sikerült kimutatni, hogy a C terminális kis amplitúdójú mozgásokkal csak lokálisan nyílik fel, és enged utat a nukleotidok mozgásának. A vizsgálat során a C terminális egy újabb interakcióját (a 21-es AS-sal) is azonosították.

7/A dUTP-ázok aktivitásához szükség van Mg^{2+} -ra. A szakirodalom viszont nem ért egyet abban, hogy hiányában teljesen, elveszik, vagy csak felére csökken az enzim aktivitása. A teljes aktivitásvesztést megállapító csoportok a Mg^{2+} eltávolítására EDTA-t használtak, míg Tóth Juditék dialízissel távolították el azt. Megvizsgálva az EDTA dUTPázra való hatását azt állapították meg, hogy az EDTA versengve a szubsztráttal, be tud kötődni az enzim aktív centrumába. Ezt a kötődést más dNTP-áz aktivitású enzimek esetében is megtörtént ezért felmerül a lehetőség, hogy ezen enzimek specifikus gátlására EDA alapú inhibitorokat lehet fejleszteni. Az eredmények másik igen fontos üzenete az, hogy az enzimreakciók vizsgálatkor használt EDTA, a kelátképzés mellett okozott hatása miatt az eredmények félreértelmezéséhez vezethet.

Megfelelőnek találták a dialízist az EDTA helyettesítésére a kétértékű kationok eltávolítására? Nem okozta-e ez a módszer a vizsgálandó oldat nagymértékű hígítását? Van-e esetleg valami más módszer, ami ennek a gyors, egyszerű szernek a kelátképző hatását kiválthatja?

A dUTP-ázok élettani szerepének vizsgálata során:

8/ A dUTP-áz térszerkezetének és a katalizált reakció mechanizmusának feltérképezése után az enzim élettani szerepének vizsgálatára fordították figyelmüket. Ennek tanulmányozását a human dUTP-áz helyett a TBC kórokozójának dUTP-ázának vizsgálatával folytatták. A *Mycobacterium tuberculosis* azonban amellet, hogy patogén, lassan nő, ezért egy ezt helyettesítő, nem patogén, gyorsan növekvő *Mycobacterium smegmatis* rendszert honosítottak meg. A két baktérium timidilát bioszintézis útvonalát megegyezőnek találták, így kísérleteiket ez utóbbin végezték. A dut gén kiütése letális volt, és csak olyan *Mycobacterium* specifikus dUTP-ázzal volt komplementálható, melyben megtalálható volt a *Mycobacterium*-okra jellemző 5 aminosavból álló inzert a C terminális d loop-jában. Ez az eredmény azért nagyon fontos, mert a dUTP-áz optimális patogén elleni gyógyszer-célpont de a human és a kórokozó dUTP-áza nagyon hasonló, de ennek az enzimszakasznak a meglétében különböznek. Mivel ez esszenciális a patogén életfolyamatához, optimális gyógyszer-célpont lehet.

A *Mycobacterium* bifunkciós Dcd:dut enzimben is jelen van ez a loop- specifikus inzert?

A munka talán még fontosabb eredménye, hogy ezzel egy olyan modellrendszert teremtett egy, melyben a *M. smegmatis*-ban, annak dUTP-ázát kiütve egy olyan rendszert hozott létre, melyben az epizomálisan bevitt dUTP-áz hatása közvetlenül vizsgálható.

9/Ezt a rendszert felhasználva egy sor különböző funkcióban mutáns és csökkent dUTP-áz aktivitású dut és Dcd:dut-ot expresszáló *M. smegmatis*-t hoztak létre. Sajnos a bemutatott táblázatból nem pontosan érthető, hogy az adott mutációval mely funkciók elvesztését kívánták vizsgálni. A kinetikai

paramétereken kívül a mutációs rátát a genom uracil tartalmát is vizsgálták. Eredményeik azt sugallják, hogy a Mycobacteriumban a dUTP-áz két funkciója: a dUTP hidrolízise, és a dUTP/dTTP arány alloszterikus szabályozása szétvált. A dUTP hidrolízise szabályozza a sejt alacsony dUTP szintének beállítását, így akadályozva meg annak DNS-be épülését, míg azg utóbbi funkció a pirimidin építőkövek optimális arányának fenntartásáért.

Ha a bifunkciós enzim csak az Archeákra jellemző, akkor vajon milyen más enzim veszi át a finomhangolás feladatát emberben és más fajokban? Erről van egy táblázat az eredeti közleményben, de annak jelmagyarázatában nem találtam meg hogy vajon a Dctd milyen enzimet jelöl?

10/ A Staphylococcus aureus patogenitási szigetének beépüléséről szóló publikáció alapján kezdték vizsgálni az Stl és a Staphylococcut fertőző helper fág dUTP-ázának kapcsolatát. In vitro rendszerben mutatták ki hogy a dUTP-ázhoz való kötődésben a dUTP és a Stl verseng. A Staphylococcus nem kódol dUTP-ázt a fág fertőzése során annak dUTP-áza az, ami a baktérium dUTP szintjét lecsökkenti. A dUTP-k hiányában a dUTP-áz kötni tudja az STI-t, eltávolítva azt a genomról, ami így hozzáférhetővé válik a patogenitási szigetek átviteli folyamatira. Ez a szabályozás azt is biztosítja, hogy a mobil elem uracil mentes legyen és így nagy hatékonysággal beépüljön majd be a genom más részeire.

A leírás ebben az esetben különösen nehezen volt követhető. Az eredeti Nature közleménynél a saját eredmények ábrája lett hivatkozva, de annak leírása, hogy a vizsgálatok pontosan milyen fehérjéken és in vitro rendszerben történtek hiányzott. Az EMSA eredmények leírásánál az eredeti közlemény modell ábrájára történik a hivatkozás, annak ellenére, hogy ez az ábra a hivatkozás alatt 25-ábraként szerepel.

Az irányok, tervek fejezetben az derül ki, hogy a 2014-es cikk óta nem nagyon találtak további kölcsönható partnert, így azt célzottan kezdték két-hibrid rendszerrel keresni. Milyen szervezetben végezték esetleg ezeket a kísérleteket és a homológ rekombinációban résztvevő nukleáz/helikáz jelöltön kívül esetleg találtak-e még további potenciális dUTP-áz kölcsönható partnert?

Az értekezés harmadik részében azokat a munkákat foglalja össze, melyekben a sejtekben található dNTP készlet mennyiségi meghatározását végezték.

11/Módszerük alapvetően egy szintézis alapú módszer továbbfejlesztése, a szintézis kinetikájának analizését végző (automatizáló) software fejlesztésével. Ennek használatával kiküszöbölték a módszer alapjául szolgáló eredeti assay problémás pontjait. Ugyan a leírásánál azt megtudjuk, hogy a nem megbízható adatok a Taq lassú, nem specifikus exonukleáz aktivitása, a nukleotidok eltérő beépülési sebessége, és a mintában jelenlevő egyéb, a Taq aktivitását befolyásoló tényezők voltak. Arra azonban nem kapunk közvetlen választ, hogy ezeket a problémákat hogyan sikerült megoldani. A Taq mellett rengeteg más, rekombináns DNS polimaráz hozzáférhető. Esetleg nem próbáltak a teszthez más, pl exonukleáz aktivitásban mutáns DNA polimerázt használni?

12/ A dNTP meghatározáson kívül egy szisztematikus review alapú adatbázisfejlesztésben kezdtek, összegyűjtve az összes irodalomban fellelhető információt a különböző fajokban mért dNTP szintekről és az ehhez tartozó információkról. A munka volumenét mutatja, hogy ehhez 1200 publikációból indultak ki. Sajnos a 30. ábráról lemadart a beosztás az y tengelyen így nem tudni hogy vajon végül hány cikk alapján készül az adatbázis, és az sem tudjuk meg pontosan, hogy milyen adatokat (timidin anyagcserét kódoló enzimek aktivitása az adott mintában, mutációk a genom ezen enzimeket kódoló részén, stb) sikerült a dNTP szintekkel együtt rögzíteni.

Hány fajra vonatkozóan sikerült adatokat találni, és rögzíteni az adatbázisban?

A dNTP szintek mérési adatainak mennyisége folyamatosan nő. Van-e arra lehetőség, illetve tervezik-e a létrehozott adatbázist naprakészen tartani?

A 7. fejezetben összefoglalt új tudományos eredményekkel egyet értek, azokat újként és a jelölt eredményeiként elfogadom.

Általános kérdéseim:


A dUTPázok maximalizálták a szubsztrát kötést és a hidrolízis hatékonyságát. Látszódnak-e ez a dUTPázok konzervált szerkezetében? inkább a dUTPázok aminosav sorrendje, aktív centruma, vagy inkább azt ezt kialakító szerkezet konzervált a különböző fajokban?

Tudunk-e valamit arról, hogy a növényekben mennyire konzervált, vagy változó a dUMP keletkezéséhez vezető út?

A genomban levő információt meghatározó nagy-áteresztőképességű szekvenálások kémiája jórészt változatlan, az eredeti szintézis alapú Sanger szekvenáláson alapul. Vajon a nem szintézisen alapuló nanopore szekvenálás azonosítani tudja-e a genomban levő U-t, és ha nem, vajon lehet-e majd a jövőben olyan szekvenálást várnunk, ami ezt az információt is azonosítani tudja?

Ezúton nyilatkozom arról, hogy Tóth Judit MTA doktori értekezésében megfogalmazott új tudományos eredményeit, elfogadom. A jelöltet és a munkáját elegendőnek tartom a cím megszerzéséhez, a doktori értekezés nyilvános védésének kitűzését javaslom. Sikeres védés esetén pedig a legmesszebbmenően támogatom számára az MTA doktori cím odaítélését.

Gödöllő, 2022 május 23.



Várallyay Éva