



Vélemény

Dr. Tóth Judit MTA doktori értekezéséről

Tóth Judit MTA doktori értekezése mintegy 15-17 év kutatásait öleli át, legalábbis ami a disszertációt megalapozó, első és utolsó szerzős közlemények publikációs évszámaiból kiolvasható. Az értekezés a végletekig homogén, monofókuszos, a dUTPáz enzimek szerkezetvizsgálatával és az ebből levonható funkcionális következményekkel foglalkozik. Ez ugyanaz a témakör, amit a jelölt a Vértessy iskola posztdoktoraként is már igen magas színvonalon művelt, mégis sikerült - hajdani mentorával közösen - a kutatási területen belül egy sajátjának mondható „niche”-t kialakítania, melynek vizsgálatával saját kutatói kvalitásait is bőven volt alkalma megcsillantania. Ezt az önálló kutatói habitust tükrözi, hogy az értekezést megalapozó 12 közlemény közül a jelölt csak háromban nem utolsó szerző. Az imponáló publikációs listán végigtekintve szinte kizárólag a tudományterület elsőrangú, magas impakt faktorról és/vagy közismerten magas igényességgel kitűnő folyóiratait, mint a Nucleic Acid Research, a PNAS vagy a JBC dominálnak, ami önmagában is egy fontos minőségi értékmérője a tudományos teljesítménynek.

A disszertáció eredményeket bemutató gerince három részre tagolódik, melyben a leghangsúlyosabb, 7 alfejezetből álló rész a humán dUTPáz enzim mechanizmusának szinte atomi szintű feltárását mutatja be. Három alfejezet (három közlemény) a dUTPáz élettani szerepéhez ad szerkezeti alapon nyugvó adalékokat, míg a harmadik részben két közlemény által alátámasztott két alfejezet egy módszerfejlesztést és egy adatbázis létrehozását taglalja. Az alkalmazott módszerek közül kiemelendő a rekombináns fehérjék előállítása, a dNTP készlet meghatározása, mutáns Mycobaktérium törzsek előállítása, oldatbeli és kristályosított fehérjeszerkezetek meghatározása, szerkezeti modellezés, enzimkinetikai és termodinamikai módszerek (thermo-fluor és izotermális titráló kalorimetria)

A szinte hibátlan szöveg hű tükrözi a munkák mögötti gondos tervezést, a kristálytisztaság logikával átgondolt, precíz kísérletezéssel megvizsgált, és kritikusan kiértékelt tudományos eredményeinek, mely jellegzetességek nyilván a Vértessy iskola normáival „öröklődtek át” Tóth Judit munkásságába is.



Elért eredmények

Hogy mit is sikerült felfedezni ebben a közel két évtizedben, azt egy szerkezetbiológiában teljes mértékben járatlan bírálónak nem is volt annyira könnyű megállapítania, bár ehhez a jelölt a disszertáció lényegre fókuszáló szerkesztésével, tüpontos megfogalmazásaival, tárgyyszerű megbeszéléseivel és mértéktartó következtetéseivel maximális segítséget adott. Így meg merem kockáztatni e pontok ismertetését.

5.1.1. A jelölt korábbi munkája során részt vett a hdUTPáz kristályszerkezetének meghatározásában, melynek folytatásaként oldatkinetikai vizsgálatokat is végezve az enzimen célul tűzte ki az enzim konformációs változásainak felderítését a hidrolízisciklus során. Ehhez egy konzervált fenilalanint cserélt triptofánra az aktív helyre ráhajló C-terminális karban, s e triptofán érzékelő által adott optikai jel segítségével vizsgálta az enzimeciklus eseményeit. Tranziens kinetikai módszerekkel, fluoreszcencia alapú stopped flow mérésekkel, radioaktív quench-flow technikával feltárták a hdUTPáz enzimeciklusának lépéseit, ezen belül az enzim-ligandum kölcsönhatásban kulcsszerepet játszó C-terminális kar szerepére fókuszálva.

5.1.2. Az aktív centrumban található aromás oldalláncú aminosav jelenléte alapján feltételezték az erősen konzervált F158 (fenilalanin) és a nukleotid bázis közötti aromás π - π kölcsönhatás szerepét a hdUTPáz enzim általi katalízisben. A humán és *M. tuberculosis* dUTPáz mutánsait létrehozva, kinetikai és spektroszkópiás módszerekkel bizonyították, hogy az aromás kölcsönhatás fontos a katalízisben, de a szubsztrát kötésében elhanyagolható szereppel bír.

5.1.3. A szubsztrát nukleotid γ -foszfátjával kialakítandó kapcsolatot elvesztő mutánsok előállításával feltárták a dUTPáz P-hurokszerű motívumában a szubsztrát szelektivitás (nevezetesen a dUDP szubsztrátként történő el nem fogadásának) szerkezeti alapjait.

5.1.4. Vizsgálták a dUTPáz szupercsaládon belül az allosztéria megnyilvánulását és funkcionális következményeit. E célból a homotrimer hdUTPáz olyan variánsait hozták létre, melyekben a három lánc egymástól függetlenül kicserélhető volt pl. uracilgyűrűt befogadni képtelen, vagy a katalitikus vizet koordinálni nem képes (ezért nem hasító), illetve a γ -foszfát koordinációért felelős és az uracillal aromás kölcsönhatásba lépő P hurokszerű V. motívumot



nem tartalmazó mutánsokra. Az így létrehozott hibrid trimer enzimeken végzett kinetikai mérések segítségével megállapították, hogy az alegységek egymástól függetlenül működnek az enzimen, mivel a trimerek aktivitása épp olyan mértékben csökkent (harmadával vagy kétharmadával), amilyen arányban az inaktív monomereket tartalmazott. Valószínűsítették, hogy az egyetlen szubsztrátra, a dUTP-re történő specializáció eredményezhette az allosztérikus kommunikáció megszüntét az enzimen.

5.1.5. *M. tuberculosis* dUTPázában létrehoztak a hdUTPázban korábban megvalósított és jellemzett mutációkat, melyek kristályszerkezetin kvantummechanika és molekuláris mechanika kombinációjával megállapították, hogy a P-hurokszerű motívum hiánya szétkapcsolja a protonátvitelt és a foszfáthasítást, ami egy magas energiagáttal jellemzett reakcióutat eredményezett.

5.1.6. RAMD (random acceleration molecular dynamics) módszer alkalmazásával az *M. tuberculosis* dUTPázában a kötőzseb markáns, nyitott-zárt konformációváltozásával szemben 10-15 aminosavat érintő, kis amplitúdójú mozgásokat valószínűsítettek a nukleotidnak az aktív helyről történő távozása során.

5.1.7. A Mg^{2+} ion nukleotidokat hidrolizáló enzimek működésében játszott általános szerepéből kiindulva vizsgálták a fémion kelátor EDTA kötődését humán és *M. tuberculosis* dUTPáz enzimjeihez, melynek során megállapították, hogy a kelátor a szubsztráthoz hasonló kölcsönhatást alakít ki az enzimekkel. Ezek alapján felvetették EDTA alapú gátlószerek kifejlesztésének lehetőségét.

5.2.1. A *M. tuberculosis* dUTPáz modellezésére *M. smegmatis* enzimet vizsgáltak, és azt találták, hogy a) a monofunkciós dUTPáz esszenciális a baktérium számára; b) az enzim egy egyedi, mycobacterium specifikus hurkot tartalmaz az aktív hely bejáratának közelében, mely szelektív hatóanyagcélpontként szolgálhat, mivel szükséges az élettani hatáshoz, pl. más fehérjékkel vagy ligandumokkal történő interakciók révén.

5.2.2. Mutánsokkal elvégzett kísérletek alapján azt a hipotézist állították fel, hogy mycobacteriumokban munkamegosztás alakult ki a monofunkciós és a bifunkciós dUTPáz között, amennyiben az előbbi felelős a dUTP DNS-be történő beépülésének megelőzéséért, míg az utóbbi a megfelelő dCTP:dTTP arány fenntartásáért.



5.2.3. Vizsgálták egy helper fágól származó dUTPáz Staphylococcus aureus génexpressziójának szabályozásában betöltött funkcióját, melyet egy Stl-nek nevezett represszorfehérjéhez kötődve fejt ki. Az intrinsic fluoreszcens jellel ellátott enzim és az Stl interakciójának fluoreszcens titrálásával arra a következtetésre jutottak, hogy az Stl a dUTP-vel verseng a dUTPáz kötődéséért, és EMSA kísérletekben megállapították, hogy a dUTP ellensúlyozza a de-repressziót a dUTPáz:Stl komplex képződésének gátlásával.

5.3.1. Célul tűzték ki egy sejtes dNTP szintek meghatározására szolgáló módszer kifejlesztését, amit egy korábban publikált, DNS polimerizáción alapuló, Wilson-féle fluoreszcens metódus limitációinak kiküszöbölésével értek el. Ennek kiegészítéseként kidolgoztak egy NucleoTIDY névre keresztelt szoftvert is, mely a kinetikában kevésbé jártas kutatókat segítheti az adatelemzésben.

5.3.2. Létrehoztak egy adatbázist (dNTPpoolDB) a dNTP szinteket vizsgáló közlemények biokémiai szemléletű rendszerezésére.

A fentiekben a disszertáció alfejezeteinek megfelelő 12 pontban próbáltam összefoglalni a műben leírt eredményeket, melyeket a jelölt végül 11 tézisben összegzett.

A jelölt által felsorolt tézisek mindegyikét elfogadom új tudományos eredményként.

Kérdések

1. A dUTPázzal kapcsolatos irodalomban az utóbbi években több virális dUTPázzal foglalkozó közlemény is feltűnik. Mennyire ismert e virális enzimek szerkezete, és hogyan ítéli meg a bennük rejlő esetleges terápiás lehetőségeket?
2. Az 5.2.3.-hoz kapcsolódóan: Lehetségesnek tartja-e, hogy a dUTPáz közvetett vagy közvetlen módon szerepet játszik az emlős gének (sejtmagi vagy mitokondriális) expressziójában? Ehhez kapcsolódóan felmerül, hogy ismertek-e az enzim esetleges intracelluláris lokalizációjának megváltozását stimuláló körülmények?
3. Ismertek-e a humán/emlős dUTPáz interakciós partnerei? Történtek-e erre irányuló szisztematikus vizsgálatok, és ha igen, akkor ezek eredményeiből milyen moonlighting funkciók valószínűsíthetők?



4. Fokozott érdeklődéssel olvastam az EDTA dUTPázhoz történő kötődéséről szóló fejezetet, melyben felveti EDTA alapú gátlószerek fejlesztésének lehetőségét is. A fokozott érdeklődésem abból az önző gondolatból táplálkozott, hogy sok évvel ezelőtt az általam tanulmányozott, és szintén a nukleotidokkal rokon szubsztrátot (a dinukleotid NAD⁺-ot) használó enzim, a PARP1 aktivációját vizsgálva tapasztaltuk, hogy emlős sejtekben a sejtpermeábilis EDTA-AM épp ellenkező hatást fejtett ki a PARP1 aktivációjára és a PARP1 függő sejthalálra (fokozta azt), mint az összes többi kalcium kelátor (EGTA-AM, BAPTA-AM, Quin2-AM), melyek citoprotektív hatásúak voltak. Bár ennek hátterében ionszelektivitásbeli különbségeket feltételeztünk, talán nem kizárható az EDTA PARP1-hez történő kötődése, és ennek révén az enzim direkt modulációja sem. Mennyire tartja elrugaskodottnak ezt a felvetést, és vizsgálták-e más, nukleotid szubsztráttal dolgozó enzim EDTA-val történő esetleges kölcsönhatásait?
5. A disszertációban több helyen tárgyalja a felfedezéseinek transzlációs potenciálját, amit az értekezés sok erénye közé sorolok. Történtek-e próbálkozások a saját laboratóriumában tett, magas szintű kísérleti eredmények gyakorlati alkalmazására?

Összefoglaló értékelés

Összefoglaló értékelésként szeretném leszögezni, hogy a jelölt eddigi tudományos teljesítményét, beleértve mind az önálló kutatásirányítási korszakot megelőző, mind a jelölt által irányított kutatócsoporthoz köthető eredményeket példa értékűnek, rendkívül magas színvonalúnak és az MTA doktori címhez feltétlenül méltónak gondolom.

A doktori művet a nyilvános vitára alkalmasnak találtam.

Dr. Virág László
egyetemi tanár, az MTA doktora
DEÁOK Orvosi Vegytani Intézet