

## Opponensi vélemény

**Tóth Judit:**

**„A DNS-építőkövek dinamikájának szerepe a genomstabilitásban”**

című MTA doktori értekezéséhez

Dr. Tóth Judit értekezése 12 meghatározó szerzős tudományos közleményen alapul, amelyek kivétel nélkül rangos nemzetközi folyóiratokban megjelent, nagyon jó tudományos visszhangot kiváltott, vagyis jó idézettségi mutatóval rendelkező publikációk. A bíráló ebből a szempontból könnyű helyzetben van, hiszen egy ilyen, kétségtelenül magas színvonalú eredményekből összeállított értekezés komoly eséllyel messze túlszárnyalja az MTA doktori értekezésekkel szemben támasztott követelményeket. A tudományos eredmények alapos átgondolása kapcsán ugyanakkor egy szakmai olvasóban óhatatlanul felmerülnek kérdések vagy megjegyzések, amelyek azonban semmiképpen sem az eredmények megkérdőjelezését, mintsem inkább az értekezésben felvetett problémák és kutatási irányok jobb megértésére irányuló, tudományos kíváncsiságból fakadó érdeklődést jelentik. Ennek értelmében a formai értékeléstől eltekintve a bíráló további része inkább tekinthető egyfajta tudományos párbeszéd kezdetének, amelyben az opponens őszinte érdeklődéssel tekint az általa relevánsnak gondolt felvetések konstruktív diszkussziója elé.

### **Az értekezés formai értékelése**

A disszertáció a rövidített, úgynevezett „tézises” formát követi, amely véleményem szerint egy nagyon szerencsés konstrukció. A jelölt rövid fejezetekben bemutatja az adott kérdéskört, pontosan megjelölve azt a publikációt, amelyhez az adott tudományos probléma tartozik. Ugyanakkor nem a közlemények száraz és nyers fordításairól van szó, hanem a felvetések és az eredmények rövid, de átgondolt bemutatásáról, amelyek még a szűk szakterületen kevésbé járatos olvasónak is elegendő támpontot adnak az elmélyüléshez. A logikus és követhető szerkezet, az olvasmányos, ugyanakkor szakmai szempontból nagyon precízen megfogalmazott szöveg kifejezetten élvezetessé teszi a művet, és segít az olvasónak fókuszálni a felvetett tudományos kérdésekre. A dolgozatban csak minimális számú elgépelés található, ami jól mutatja, hogy a 'Köszönetnyilvánítás' fejezetben megemlített határidő, amelyet a disszertáció elkészítésére örvendetesen elnyert MTA támogatás jelentett, semmiképpen sem ment az igényesség rovására. A teljesség kedvéért felsorolom az általam felfedezett négy, egyértelműen szövegszerkesztési hibát:

- ilyen az, hogy a 12. oldalon, a 3. ábra aláírásának végén található hivatkozás (Varga és mtsai, FEBS Letters 2007) referencia számozása ('44') lemaradt;
- ilyenek továbbá a 19. oldalon, a 10. ábrához tartozó ábramagyarázat végén található „esetébeni”, illetve „az chasing” elgépelések;
- a 42. oldal első paragrafusának végén található „uracillall” szó;
- valamint a 49. oldal 5 sorában található, nyilvánvaló elírás: „dNTP-készet”.

Az értekezés 'Függelékében' minden bemutatott publikáció teljes terjedelmében, és olvasható formában megtalálható, így a bíráló minden releváns szöveghez és adathoz hozzáfért. A kutatási



projektek során alkalmazott módszerek egy rövid fejezetben történő bemutatása, a mellékelt közleményekkel együtt alkalmas arra, hogy a kísérleteket adott esetben egy szakértő biztonsággal reprodukálni tudja.

Mindezek alapján elmondható, hogy a disszertáció teljes mértékben megfelel az MTA doktori disszertációkkal szemben támasztott formai követelményeknek.

### **Az értekezés tartalmi elemzése**

A disszertáció témája a nukleotid metabolizmus biokémiai háttere és evolúciós aspektusai. A három nagyobb témakörbe csoportosított összesen 12 fejezet között a biológia több szakterületén dolgozó kutatók egyaránt találhatnak „elmélyedni valót”, hiszen a kutatások fő fókuszát jelentő dUTPáz enzim működési mechanizmusának kinetikai leírásán és részletes regulációs elemzésén túl rengeteg szó esik az enzim és homológjainak élettani szerepéről, illetve evolúció kényszereiről is, de a vizsgálatokhoz a csoport által fejlesztett molekuláris biológiai módszerekről egyaránt. Nagyon szerencsésnek tartom, hogy a különálló kutatási eredmények ismertetését követi egy 'Irányok és tervek' címet viselő, általános kitekintést nyújtó fejezet is. Ebben nemcsak a korábbi munkák folytatására szervesen épülő, ígéretes továbblépési irányok kerülnek bemutatásra, hanem a jelölt tételesen megemlíti és részletezi a kutatásokban résztvevő doktorandusz hallgatók munkáját is, ezzel is tanúbizonyságot téve a tudományos kutatások mellett az „iskolateremtő” munkásság melletti elkötelezettségről.

A dolgozatban ismertetett eredmények jól megtervezett, és kellő alapossággal kivitelezett kísérleteken alapulnak, és elmondható, hogy az eredményekből levont következtetések megalapozottak, nem túlzóak. A saját kísérleti eredményekkel szembeni kritikus szemlélet és a szakmai igényesség egyértelműen megmutatkozik a rangos szaklapokban megjelent tudományos publikációkon is. A disszertációban bemutatott kutatási eredményekből a következőket fogadom el új tudományos eredményként:

1. A szerző és kutatócsoportja részletesen feltárta a humán, a *Mycobacterium tuberculosis*, valamint a *Mycobacterium smegmatis* dUTPáz enzimfehérjék részletes kinetikai mechanizmusát, illetve bioinformatikai predikciókon is alapuló célzott kísérletekkel igazolták az enzimkatalízis fontos lépéseit biztosító több szerkezeti elem pontos szerepét.
2. A nukleotid hidrolízis mechanizmusával kapcsolatban tett javaslatok általános érvényűek, és túlmutatnak a dUTPáz enzimek példáján.
3. A vizsgálatokhoz több technológiai fejlesztést illetve újítást is bevezettek: a mikrobakteriális géntechnológia laboratóriumukban történő meghonosítása mellett kidolgozták a dNTP-k újfajta radioaktív jelölését, illetve egy új enzimátikus eljárás alapján mennyiségi meghatározását.
4. Kimutatták, hogy az EDTA szelektíven, és sokszor a fiziológiás szubsztrátnál erősebben képes kötődni és ezáltal gátolni egyes dNTP hidroláz enzimeket, és ez a hatás független a  $Mg^{2+}$ -t komplexáló hatástól.
5. Meghatározták a dUTPáz egyetlen ismert fehérjetermészetű kölcsönható partnere és egyben inhibitora, az StI és a dUTPáz kölcsönhatás kinetikai mechanizmusát.



6. A szerző és munkacsoportja létrehozott egy új, kísérletesen meghatározott dNTP mennyiségek és ezek külső hatásokra történő változásait részletesen bemutató adatbázist.

### **Az értekezés tudományos eredményeivel kapcsolatos kérdések**

A bemutatott tudományos eredményekkel kapcsolatban a következő kérdéseim, illetve megjegyzéseim vannak:

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.
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 processzálasát végző Drosha/DGCR8 enzimkomplex vizsgálható lenne-e ilyen módszerrel?
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.
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?
5. Az enzim fiziológiás 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.
6. A 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



TERMÉSZETTUDOMÁNYI KUTATÓKÖZPONT  
ENZIMOLÓGIAI INTÉZET  
BUDAPEST, H-1117  
MAGYAR TUDÓSOK KÖRÚTJA 2.  
HUNGARY

DR. ORBÁN TAMÁS, PH.D.  
GÉNREGULÁCIÓ KUTATÓCSOPORT VEZETŐ  
TELEFON: +36 1 382 6638  
E-MAIL: [ORBAN.TAMAS@TTK.HU](mailto:ORBAN.TAMAS@TTK.HU)  
WWW.TTK.HU

ezeknek a szerepe: a 'ZEN' a tőle 5' irányban elhelyezkedő FAM molekula fluoreszcenciáját csillapítja csak, vagy interakcióba lép az 'IBFQ'-val is?

### **Végső értékelés**

Összegzőképpen elmondható, hogy a 12 kimagasló nemzetközi közleményre épülő, magas szakmai színvonalon megírt értekezés egyértelműen bizonyítja Tóth Judit jelentős hozzájárulását a tudományterületéhez. A PhD fokozat megszerzése óta az általa társszerzőként jegyzett, a jelen dolgozat témájához kapcsolódó további 12, illetve a dolgozathoz szorosan nem kapcsolódó 5 egyéb publikáció jól demonstrálja a jelölt tudományos együttműködéseit, szakmai elkötelezettségét, és ezáltal a tudományterületen való folyamatos aktív jelenlétét. Mindezek alapján a művet mindenképpen nyilvános védésre alkalmasnak találom, és a jelölt számára az MTA Doktora cím odaítélését egy sikeres védést követően feltétlenül támogatom.

Budapest, 2022. május 30.

**Orbán Tamás, Ph.D.**

tudományos főmunkatárs, kutatócsoport vezető  
Génreguláció Kutatócsoport  
Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet