Bírálat Dr K. Menyhárd Dóra "Kölcsönhatási hálózatok és dinamikai sajátosságok vizsgálata élettani szempontból jelentős fehérjékben" című MTA doktori értékezésére

Bíráló: dr Reményi Attila

Az értekezés szakmai anyaga 21 tudományos közleményen alapszik, melyet a jelölt öt különböző területre bontva mutat be. A doktori munka tehát egymástól nagyon élesen elkülönülő fejezetekben kerül ismertetésre, melyekben a vizsgált objektumok általában orvosbiológiai szempontból fontos enzimek, fehérjék illetve ezek magasabb rendű makromolekuláris és/vagy kismolekulás komplexei. A tézisek is az egyes tematikailag különböző fejezetek alapján lettek szétbontva és a fragmentáltság miatt ezek egy elvárhatóan nagy és organikus módon felépített ívet nem írnak le. Igazából öt kisebb ívet láthatunk, melyeket a jelölt egyértelműen széles spektrumú szerkezeti biokémiai érdeklődése köt egybe, ami aztán több esetben is nagyon érdekes eredményeket hozott az egyes vizsgált objektumra vonatkozólag: 1) hem fehérjék, 2) pszeudouridináz, 3, K-ras, 4) podocin és 5) acil-aminoacil peptidáz.

A jelölt állítása szerint a témák és tézisek időrendben kerültek bemutatásra, amiből látszik, hogy a kezdeti in silico modellezés elméleti elefántcsonttornyából kitörve a jelöltnek hogyan sikerült végül nagyon eredményesen bekapcsolódni ún. kísérlet-vezérelt szerkezeti biológiai kutatásokba is, amik így már klinikai szempontból is figyelemreméltó eredményeket hoztak olyan kollégákkal szorosan együttműködve, akik egy-egy biológiai vagy orvosi problémának a szakértői voltak. Szerintem elismerésre méltó az út ahogyan a jelölt a molekulamodellezéses in silico tanulmányaiból kiindulva eljut akár a közvetlen klinikai relevanciáig molekuláris biológusokkal vagy orvosbiológusokkal szorosan együttműködve: s például egy adott fehérjében előforduló patológiás mutációk mechanisztikai hátterének megértésén túl akár genetikai tanácsadásban is hasznosítható tudást tár elénk.

Formai szempontból a dolgozat követi egy-egy nagyobb lélegzetvételű tudományos munka klasszikus szerkezetét (Bevezetés, Alkalmazott módszerek, Eredmények, Összegzés). Tartalmilag azonban a négy részből kettő teljesen más mint amire az olvasó számítana. A Bevezetés (1 oldal) a konkrét tudományos probléma felvezetése, a vizsgálni kívánt problémához kapcsolódó eddig ismert eredmények összegzése, majd a kutató által vállalt célkitűzéseknek ebben a tudományos térben való elhelyezése teljesen hiányzik, s az olvasó lényegében csak egy motivációs leírást kap. Az Összegzés (¼ oldal), amely lényegében csak zárszó és köszönetnyilvánítás szintén hiányérzetet hagy az olvasóban. Az Alkalmazott módszerek (11 oldal) röviden végig veszi a molekulamechanika módszertanát (MM), ennek kvantumkémia számításokkal való együttes alkalmazásának lehetőségét (QM/MM), a röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatot és a kriogén elektronmikroszkópiát. A dolgozat egyértelmű erőssége az Eredmények fejezet (95 oldal) amely az egyes vizsgált rendszerre megadja a felvezetést, az adott rendszerre vonatkozó konkrét tudományos kérdést, leírja annak megoldását és bemutatja ezek jelentőségét. Különösen nagyra értékeltem az aminosav vagy akár atomi szintű részletességgel leírt szövegrészek utáni összegző kitekintéseket, melyek sokat segítettek a szerkezeti dinamikai vizsgálatok után feltáruló térbeli vagy dinamikai változások jelentőségének felismerésében és értelmezésében. Összességében a jelölt dolgozatát tehát egy szerkezeti biokémiai érdeklődés és az elméleti modellezésben megnyilvánuló szakértelem/tudás köti össze, s teszi bizonyos szempontból koherenssé, de a vizsgálat tárgyát képező rendszerek tematikailag csak nagyon lazán kapcsolhatóak össze. Utóbbi következménye a dolgozat prezentációjának és konkrét téziseinek tagoltsága. Fenti kritikus megjegyzéseim ellenére összességében a mű megfelelően szerkesztett és olvasmányos. A szerkezeti biokémiai koncepciók bemutatása során különösen fontosak a megértést elősegítő ábrák, melyekből a munka természetének megfelelően számos (93 db) van. Ezek összességében jól segítik a szövegben

írtak megértését, viszont néhány esetben hibák is becsúsztak (pl. 29. ábrák és 49. ábrák), illetve ennél sokkal kellemetlenebb volt, hogy az ábrák mérete miatt az azokon bemutatni kívánt információ szerkesztési problémák miatt olvashatatlanná vált (általában a túl kicsi méretek vagy felbontás miatt; pl. 2., 4., 36.a, 58.a, 52.b, 76.a, 78.a), vagy az ábraaláírások néha felületesek voltak és nem derültek ki fontos részletek (pl. 13. ábra: MD szimulációhossz, mintavételezés, stb vagy pl. 29. ábra, amiből egyébként kettő volt, mit jelent az R2 és R1; vagy például a 31.ábra, amin a panel értelmezhetetlenül túl sok grafikont tartalmaz, az Y tengely „(normál) B-faktor" mint mennyiség pedig nincs definiálva).

A jelölthöz hasonlóan az egyes témákhoz tartozó általam elfogadott téziseket az Eredmények fejezet tematikájára bontva fogom bemutatni és diszkutálni:

1) Hem fehérjék
Ebben a fejezetben három egymáshoz kapcsolódó téma kerül ismertetésre, melyekben közös, hogy hem prosztetikus csoportot tartalmazó fehérjék működésének QM/MM vizsgálata történik a nitrogén-monoxid-szintázra (NOS), nitrophorin 4-re és az oldható guanilát-ciklázra (sGC) vonatkozólag. A cél a vizsgált enzimek elektron és protontranszfer útvonalainak feltárása volt a pontos reakciómechanizmus feltérképezése végett.

Bemutatásra került, hogy

a) a NOS esetén a kofaktor deprotonálódása révén kiváltható az elektron-átadás és a hemhez koordinálódott oxigén így aktiválódni tud.

b) a rablópoloska nitrophorin 4 fehérje esetén azonosítottak egy aszparaginsav oldalláncot mely a szimulációk alapján úgy tűnt, hogy fontos szerepet játszik a fehérje által becsapdázott NO molekula pH függő felszabadításában, ami alapján értelmezni tudták, hogy miért lehet értágító hatása a rablópoloska csípésének.

c) a humán sGC-hez hasonló szerkezetű bakteriális H-NOX fehérjében az oxigén kötésére csak olyan a modellezés során megfigyelt variánsok alkalmasak, melyek a nyugalmi állapotban úgy kötnek vízmolekulákat, hogy azok a fehérjét az oxigén kötésre alkalmas konformációban rögzítik.

d) illetve kidolgoztak egy olyan modellrendszert melyben a H-NOX-on belüli gázok (pl. oxigén, nitrogén-monoxid és szén-monoxid) diffúzió sebességét becsülni tudják.

2) Pszeudouridináz
Ebben a fejezetben a jelölt betegségokozó mutációk mechanisztikus következményeit tárta fel a pszeudouridináz működésére vonatkozólag, ahol homológia modellezést, MM és QM/MM számításokat végzett.

- A jelölt szerkezeti magyarázatot adott arra nézve, hogy a boksz H/ACA pszeudouridináz komplex – mely a diszkerin, Nop10, Nhp2 és Gar1 fehérjékből illetve egy vezérlő RNS-ből épül fel – katalitkus helyétől távol eső betegségokozó mutációk a pszeudouridilációs hatékonyságot miképp csökkenthetik.

-A jelölt megmutatta, hogy a szubsztrát-RNS közel szekvenciafüggetlen módon kötődik az aktív hely környezetében.

- MD szimulációk alapján bemutatta, hogy a vad típusú enzim esetében a szubsztrát uridin torzult konformációban kötődik az enzim aktív helyén, melynek a reakcióra nézve fontos energetikai következménye van, s ez a kötődési mód a betegség okozó mutánsokban feltételezhetően nem alakul ki.

3) K-ras

Ebben a fejezeteben a jelölt NMR mérésekkel, MD szimulációkkal és QM/MM számításokkal viszgálta a K-Ras GTP-áz jelátviteli fehérjét, melynek számos onkogén mutációja ismert például a P-hurok G12-es poziciójában.

- A fehérje dinamikai viselkedésének, illetve a G12 pozícióban ismert két onkogén mutáció (G12C, G12D) hatásának, felderítésére tervezett NMR mérésekkel azonosította a switch I régióban lévő Tyr32 aminosavat, mely viselkedésében különbséget mutatott az aktív GTP-kötött és a nyugalmi GDP-kötött állapotok között, majd MM és QM/MM számítások alapján felállított egy hipotézist, ami alapján a Tyr32 szerepe eltérő lehet a vad típusú és mutáns enzimek esetében.

- MD szimulációk segítségével megállapította, hogy a katalitikus ciklusba illeszthető minor formák esetében a switch-régiók fellazulnak és ezek a változások mutáció-szenzitívek.

4) Podocin

Podocin a vese szűrőfunkcióját ellátó ún. résmembrán fontos fehérjéje és a jelölt célul tűzte ki, hogy molekulamodellezési eszközökkel feltárja a podocin oligomerek rendező-elveit a résmembránt alkotó fehérjekomplexben, illetve segít értelmezni betegségokozó mutációk hatásmechanizmusát.

- A fejezet első tézisét röviden megfogalmazva: a jelölt feltárta egy recesszív rendellenesség klinikailag is meghatározó interallelikus kölcsönhatásának szerkezeti magyarázatát. Konkrétabban: a podocin polimorf R229Q mutációt hordozó variánsával patogén társulásokat képző ún. asszociált mutációk az intakt rendszertől eltérő dimerpárokat hoznak létre és ezek eltérő dinamikai viselkedése meghatározza a az egyes allélek hatásának penetrációját.

- A számított dimer modellek szerkezeti aspektusait feltáró munkája hozzájárult egy új útmutató kidolgozásához a szteroid rezisztens nefrózissal kapcsolatos genetikai tanácsadásra vonatkozólag.

5) Acil-aminoacil peptidáz (AAP)

A humán AAP egy homotetramer szerin proteáz és a jelölt tanulmányozta bakteriális és emlős változatok működését, szubsztrát-specificitást, karbapanem antibiotikumokhoz való kötődését QM/MM és molekulamodellezési számításokkal, továbbá részt vett különböző multimer szerkezetű enzimek röntgendiffrakcós vagy krio-elektronmikroszkópián (krio-EM) alapuló szerkezetmeghatározásában.

- Krisztállográfiai és molekulamodellezési módszerekkel igazolta, hogy az ősbaktérium (*Aeropyum pernix*) eredetű *Ap*AAP dimer formában aktív, melynek nyugalmi állapota nyitott és csukott formák dinamikus egyensúlyaként képzelhető el: a nyitott forma katalitikusan inaktív és a katalitikus triád összeállását a domének közötti kölcsönhatások alakítják ki.

- Egy hexamer szerkezetű másik ősbaktérium (*Pyrococcus horikoshii*) AAP esetében bemutatta, hogy a merev monomerekből felépülő enzimstruktúra olyan csatornarendszert tartalmaz, amely alkalmas a

szubsztrátok méret és összetétel alapú szelekciójára, illetve hogy ebben a rendszerben a katalitikus triád a monomerben az aktivitásra nézve látens elrendeződésben van.

- Krio-EM módszerrel meghatározták a sertésmájból izolált pAAP tetramer szerkezetét és MD szimulációk alapján a katalitikus (Ser-His-Asp) triád relaxációját lehetővé tévő emlős-specifikus AAP kölcsönhatási központot azonosítottak, mely miatt az enzim katalitikus centruma inaktív állapotban is nagyobb valószínűséggel tartózkodhat.

- Krio-EM kísérletes és számításos hibrid szerkezeti analízis segítségével maghatározták a meropenem karbapenem antibiotikum pAAP-hez való kötődési konformációját.

- Felállítottak egy hipotézist, ami alapján a pAAP aktív hely tágasságában és képlékenységében a P506-os aminosavnak kitüntetett szerepe van.

Fentiek alapján és a jelölt átfogó szakmai teljesítményének ismeretében a doktori munka tudományos eredményeit elegendőnek tartom az MTA doktori cím megszerzéséhez és a nyilvános védés kitűzését javaslom.

Az értekezéshez kapcsolódó kérdéseim/megjegyzéseim illetve a mű bírálata során bennem felmerült Egyéb kérdések, melyeket a nyilvános vitán tárgyalásra érdemesnek gondolok, az alábbiak:

Kérdések/megjegyzések:

a) A dolgozat első fejezetében röviden bemutatásra kerül a H-NOX bakteriális modellrendszer, melyben fontos élettani gázok diffúziós sebességére tudnak becsléseket adni. A munkában konkrétan bemutatásra kerül egy relatív rangsor felállítása három különböző bakteriális enzimre egy-egy adott gáz ra. Ma már a humán SGC enzim szerkezete is ismert, s nyilván érdekes lenne a gázok diffúziójának vizsgálata ezen a komplexebb dimer szerkezetű enzimen is. Érdeklődnék, hogy végeztek-e ilyen diffúziós sebességekre vonatkozó vizsgálatokat az Önök által kidogozott QM/MM módszerrel ezen a humán fehérjén vagy más hem tartalmú komplexebb fehérjén, s vajon a szimulációk alapján meghatározott értékek hogyan viszonyulnak kísérletes mérésekhez, ha egyáltalán voltak ilyenek?

b) A pszeudouridináz katalitikus működésének tanulmányozása során arra a következtetésre jutott, hogy a szubsztrát-RNS közel szekvencia független módon kötődik az enzim aktív helyéhez, s az egyik tézisében felvetette a pszeudouridilációs átalakítás terápiás felhasználhatóságát. Ugyanakkor az értekezésében azt írja, hogy munkája óta két kutatócsoport is feltárta ezt a lehetőséget, s arra jutottak, hogy a hatás nagyon kontextusfüggő és viszonylag gyenge. Amire Ön azt javasolta, hogy „ez azonban csupán azt jelenti, hogy kicsit más úton kell majd az indukált pszeudouridiláció terapeutikus felhasználást megközelíteni”. Kérem ismertesse, hogy a részletes szerkezeti és dinamikai információk birtokában, mely erre az RNS modifikációs rendszerre vonatkozik, milyen betegségek/kórképek ellenében látja lehetségesnek az alkalmazást, illetve mit tenne másképp hogy egy kezelés/terápia penetrációja hatékonyabb lehessen.

c) A K-Ras vad típusú ás onkogén mutánsainak MD szimulációs vizsgálata során arra a következtetésre jut az egyik tézisében, hogy az in silico módszerrel feltárt eltérő dinamikai viselkedések lehetőséget teremtenek az onkogén variánsok specifikus megcélzására. Kérem fejtse ki

konkrétabban, hogy ezt hogyan érti és vajon ez a felismerés mennyiben új a Ras fehérjéket célzó farmakológiai kutatások tükrében.

d) A podocin dimerek patológiás mutációinak analízise során azt találta, hogy az R229Q csere hatására a domének szerkezetében nem történik változás, de azok relatív elhelyezkedése jóval rögzítettebbé válik, s lényegében a domének közötti képlékenység sérül, ami viszont fontos szerkezeti tulajdonság a podocin funkciójában. Felvetődött bennem az a kérdés, hogy vajon ebben a pozícióban csak a glutamin aminosavra történő mutáció okozza ezt a szerencsétlen szerkezeti változást, vagy ugyanez más aminosav csere révén is elképzelhető, s vajon ezek milyen patológiás hatást váltanának ki és/vagy interallelikus kölcsönhatásban vennének részt a többi podocin mutációval. Az Ön által a rendszerre beállított számításos módszertan vajon rendelkezik ilyen predikciós képességgel legalább a domének dimereken belüli képlékenységére vonatkozólag? Más klinikailag releváns aminosav cserék ebben a pozícióban nem fordulnak elő?

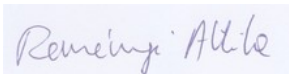
e) A pAAP tetramer esetében a katalitikus triád inaktiválását a jelölt meglehetősen újszerű jelenségként írja le, bár elismeri, hogy ilyesmire vannak más példák is monomer vagy dimer S9 proteázok nyitott konformerjeinek az esetében is (pl. a saját *Ap*AAP szerkezetükben), bár igaz, hogy ott a triád más szerkezeti okok miatt kerül szétkapcsolt állapotba. Az enzimaktivitás regulációban egy magától értetődő egyszerű mechanizmus, hogy alapállapotban nincs egy összeállt katalitikus centrum. Ugyanakkor feltételezhető, hogy minden hasonló reakciómechanizmussal működő enzim aktív szerkezete hasonló, hiszen erre szerkezeti biokémiai kényszerek hatnak, míg a „lefojtott" aktivitásnak sok szerkezeti megoldása lehet. Az ismert szerin proteázok világában talán elterjedt, hogy katalitikusan aktív triád szerkezeteket látunk, de nem gondolja, hogy ez csupán a mi eddigi szerkezet-meghatározási gyakorlatunkból is eredhet, s az aktivitás szabályozás szempontjából releváns konformációs változatosság feltárása nagyobb rendszerekre éppen a krio-EM módszer heterogenitásra való nagyobb toleranciája miatt lehetséges?

Egyéb kérdések:

1) A pszeudouridináz fejezetben a 33. oldalon említi, hogy az AlphaFold előrejelzései jó egyezést adtak az Ön által homológia modellekből MD szimuláció segítségével felépített humán boksz H/ACA PSU szerkezeti együttesre (4+1 fehérje-RNS kompex; 18.ábra). Az Ön tapasztalata szerint a különböző MI algoritmusok már az ilyen komplex makromolekuláris komplexekre is olyan jó modelleket adhatnak, melyek MD szimulációk vagy akár QM/MM számítások kiindulási modelljeiként is megbízható módon használhatóak?

2) A QM/MM szimulációk során egy kényes kérdés annak eldöntése, hogy a vizsgálni kívánt objektum mekkora része fogja majd tartalmazni a kvantumkémiai analízisnek alávetett régiót és mi lesz az, amit „csak" MM-mel kezelünk. A munkában hiányoltam, hogy ez explicit az egyes rendszerekre nem lett leírva/diszkutálva. Véleménye szerint az Ön által végül választott QM régiók modellezése és a választott reakciókoordináták alapján levont következtetések változhatnak e fundamentumaikban, például ha egyre nagyobb QM régiók modellezése válik praktikus lehetőséggé?

A doktori munka és a mű szerkesztésére vonatkozó kritikáim természetesen nem kérdőjelezik meg a munka magas színvonalát és kérdéseim is inkább csak a téma iránti érdeklődésem és kíváncsiságom tükrözik.



dr Reményi Attila
MTA doktora
HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont
tudományos tanácsadó

Budapest, 2026-08-31