SEMMELWEIS EGYETEM
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

Hegedűs Tamás Zoltán, PhD, DSc
kutatóprofesszor, tudományos igh.
Telefon: +36 20 775 3411
E-mail: hegedus.tamas@hegelab.org

Bírálat

Karancsiné Menyhárd Dóra

„Kölcsönhatási hálózatok és dinamikai sajátságok vizsgálata élettani szempontból jelentős fehérjékben” című

MTA doktori művéről

Karancsiné Menyhárd Dóra doktori művében több mint két évtizedes kutatómunkájának azon eredményeit foglalja össze, amelyek biológiai szempontból jelentős fehérjék szerkezet-dinamika-funkció összefüggéseinek megértésére irányulnak. A dolgozatban tárgyalt rendszerek első látásra igen változatosak: hemfehérjék, egy RNS-módosító enzimkomplex, a K-Ras onkoprotein, a vese szűrőrendszerében szerepet játszó podocin, valamint különböző eredetű acil-aminoacil-peptidázok. A munkákat azonban világos közös szemlélet kapcsolja össze: annak vizsgálata, hogy a makromolekulák működését miként határozzák meg a statikus szerkezeten túlmutató konformációs sokaságok és kölcsönhatási hálózatok, továbbá hogyan terjedhet tovább egy lokális perturbáció - például protonációs állapot megváltozása, mutáció vagy ligandkötés - a fehérje vagy fehérjekomplex távolabbi funkcionális régióira.

A dolgozat további erőssége, hogy egyben jól követhető tudományos és módszertani fejlődéstörténetet is bemutat. A korai munkák elsősorban kvantumkémiai és molekulamodellezési módszerekkel értelmezik a rendelkezésre álló kísérleti eredményeket. A későbbi vizsgálatokban a számításos megközelítés mind szorosabban kapcsolódik a kísérleti szerkezetbiológiai módszerekhez, az NMR-spektroszkópiához, a röntgenkrisztallográfiához és végül a kriogén elektronmikroszkópiához. Különösen értékesnek tartom azt a szemléletet, amelyben a modellezés nem utólagos interpretációs eszköz, hanem a kísérletek tervezésével és eredményeivel kölcsönösen egymást pontosító kutatási folyamat része.

A doktori mű öt fő tudományos témakörre épül:

1. A hemfehérjékkel végzett vizsgálatokban a jelölt a nitrogén-monoxid fiziológiai szerepéhez kapcsolódó, alapvető mechanisztikus kérdéseket tanulmányozta. A nitrogén-monoxid-szintáz esetében számításai rámutattak arra, hogy a tetrahidrobiopterin kofaktor puszta kötődése nem elegendő az elektrontranszfer kiváltásához, míg annak deprotonációja elősegítheti az elektronátadást és a hemhez koordinált oxigén aktiválását. A nitrophorin 4 vizsgálata során egy pH-érzékeny Asp oldallánc szerepét azonosították az NO kötését szabályozó felszíni hurkok átrendeződésében. A H-NOX fehérjékkel végzett munkák pedig azt mutatták meg, hogy az oxigénkötés szelektivitása nem vezethető vissza egyetlen hidrogénkötés-donor jelenlétére, hanem a nyugalmi állapotban mintavételezett konformációs sokaság és az aktív hely vízszerkezete együttesen határozza meg.

2. A box H/ACA pszeudouridináz komplex vizsgálata különösen szép példája annak, hogy a betegséget okozó mutációk hatása nem szükségszerűen lokális. A jelölt és munkatársai megmutatták, hogy az aktív helytől távol, egy fehérje–fehérje kölcsönhatási felszínen elhelyezkedő DKC1- és NOP10-mutációk olyan kölcsönhatási hálózatokat perturbálhatnak, amelyek végül a katalitikus centrum szerkezetét és aktivitását is befolyásolják. Mechanisztikus szempontból fontos eredménynek tartom azt is, hogy a szubsztrát uridin torzult kötött konformációja csökkenti a reakció meghatározó C–N kötésfelhasadási lépésének energiagátját. A szubsztrát-RNS viszonylag gyenge szekvenciaspecificitásának felismerése pedig a pszeudouridiláció programozható RNS-módosításra történő felhasználásának lehetőségét vetette fel.

3. A K-Ras onkoprotein vizsgálatában NMR-mérések, molekuladinamikai szimulációk és QM/MM számítások együttes alkalmazása tette lehetővé a katalitikus ciklus dinamikai részleteinek feltárását. A Tyr32 oldallánc orientációjának változása közvetlen kapcsolatot teremt a nukleotid állapota, a switch-I régió szerkezete és a katalitikus vízmolekula pozicionálása között. Fontosnak tartom azt a felismerést is, hogy a GDP-kötött, különösen Mg^{2+}-mentes K-Ras olyan minor konformációkat mintavételez, amelyek a nukleotidcserét és ezáltal az aktivációt készítik elő. Mivel ezek az állapotok mutációfüggőek, a munka farmakológiai szempontból is érdekes lehetőséget vet fel az onkogén variánsok állapotspecifikus célzására.

4. A podocin vizsgálatai a szerkezeti modellezést közvetlen klinikai genetikai problémához kapcsolják. A p.R229Q variáns és az ahhoz társuló patogén mutációk vizsgálatával a jelölt és munkatársai olyan dimerizációs modellt dolgoztak ki, amely szerkezeti magyarázatot ad a mutációfüggő recesszív öröklődésre és az interallelikus kölcsönhatásra. Külön erénye ennek a munkának, hogy az alapkutatási eredményekből a genetikai tanácsadásban alkalmazható értelmezési szempontok is születtek.

5. A dolgozat legterjedelmesebb és véleményem szerint egyik legerősebb egységét az acil-aminoacil-peptidázok vizsgálata alkotja. A bakteriális és archaeális enzimeken végzett munkák

megmutatták, hogy az oligomerizáció és a doménmozgások aktívan részt vesznek a katalitikus állapot és a szubsztrátszelekció kialakításában. A későbbi kriogén elektronmikroszkópos vizsgálatok lehetővé tették az emlős AAP tetramer szerkezetének meghatározását és annak felismerését, hogy az aktív centrum jelentős konformációs heterogenitással rendelkezik. A meropenemmel és klasszikus szerin-proteáz inhibitorokkal alkotott komplexek szerkezeti, molekuladinamikai és QM/MM elemzése különösen meggyőzően mutatja be, hogy az aktív hely szokatlan tágassága és képlékenysége miként járul hozzá a ligandpromiszkuitáshoz. A P506 környezetéhez kapcsolódó kölcsönhatási rendszer az aktív centrum flexibilitásának lehetséges szerkezeti szabályozójaként jelenik meg.

A doktori mű tudományos háttere erős. A tézisek alapjául 21 közlemény szolgál, köztük számos olyan munka, amelyben a jelölt első, önálló vagy levelező szerzőként meghatározó szerepet vállalt. A publikációk között a szakterület jelentős nemzetközi folyóirataiban - többek között a Proceedings of the National Academy of Sciences, Nature Genetics, ACS Catalysis, Chemical Science, Journal of Biological Chemistry és Protein Science hasábjain - megjelent munkák találhatók. A publikációs háttér és a dolgozat tartalma együttesen egyértelműen igazolja a jelölt tudományos önállóságát és a bemutatott kutatások nemzetközi színvonalát.

A dolgozat igen széles tématerületet fog át. Ennek előnye, hogy világosan láthatóvá teszi a szerző módszertani sokoldalúságát és azt, hogy hasonló molekuláris gondolkodásmódot képes nagyon eltérő biológiai rendszerekre alkalmazni. Ugyanakkor egy rövid, keresztmetszeti összegző fejezet, amely az öt rendszerben feltárt jelenségeket közös fogalmak - például konformációs szelekció, alloszterikus kölcsönhatási hálózatok, oligomerizáció és a funkcionális flexibilitás - mentén hasonlítja össze, még erőteljesebben kiemelte volna a dolgozat általános tudományos mondanivalóját. Ezt azonban nem tekintem a munka tudományos értékét érintő hiányosságnak.

A tézisfüzetben öt témacsoportban megfogalmazott 16 tézispontot a bemutatott eredmények és az alapjukul szolgáló publikációk alapján új tudományos eredményként elfogadom.

Kérdéseim a jelölthöz

A kölcsönhatási hálózatok általánosíthatósága.
A dolgozat több egymástól távoli rendszerben mutatja meg, hogy egy lokális perturbáció - mutáció, protonációs változás vagy ligandkötés - kölcsönhatási hálózatokon keresztül távoli funkcionális változást okozhat. Lát-e lehetőséget arra, hogy ezekből az egyedi rendszerekből olyan általános, kvantitatív deszkriptort vagy módszert lehessen kialakítani, amely egy új fehérje esetében előre jelezné, hogy egy aktív helytől távoli mutáció várhatóan alloszterikusan befolyásolja-e a működést? Milyen kísérleti adatot tartana a legfontosabbnak egy ilyen predikció validálásához?

A programozható pszeudouridiláció lehetősége.

A pszeudouridináz-vizsgálatok egyik izgalmas következtetése a szubsztrátfelismerés viszonylagos szekvenciafüggetlensége és ennek lehetséges felhasználása programozható RNS-módosításra. Az azóta megjelent eredmények alapján a kívánt funkcionális hatás erősen kontextusfüggő lehet. A most rendelkezésre álló szerkezeti és mechanisztikus ismeretek birtokában a rendszer mely elemét módosítaná elsőként egy valóban hatékony és specifikus RNS-editáló eszköz létrehozása érdekében: a vezető RNS-t, a szubsztrát pozicionálását, az aktív centrum dinamikáját vagy esetleg a termék felszabadulását?

Az AAP aktív centrumának flexibilitása és evolúciós szerepe.
Az emlős AAP egyik legérdekesebb sajátossága a szokatlanul tág és képlékeny aktív centrum, amelynek kialakulásában a P506 környezetének fontos szerepet tulajdonítanak. Tekinthető-e ez egyfajta evolúciós „flexibilitási kapcsolónak", amelynek megváltoztatása a szubsztrátspecificitás jelentős beszűkülését vagy kiszélesedését okozhatná? Milyen mutációs és funkcionális kísérletet tartana a legközvetlenebb módnak ennek a hipotézisnek az igazolására vagy cáfolására?

Összegző vélemény

Karancsiné Menyhárd Dóra doktori művét magas tudományos színvonalú, jelentős új eredményeket tartalmazó, gondosan összeállított munkának tartom. A dolgozat és az annak alapjául szolgáló publikációs teljesítmény egyértelműen bizonyítja a jelölt tudományos önállóságát, módszertani felkészültségét, valamint azt a képességét, hogy összetett biológiai problémákat kísérleti és számításos szerkezetbiológiai módszerek integrálásával vizsgáljon.

A doktori műben bemutatott tudományos eredményeket elegendőnek tartom az MTA doktora cím megszerzéséhez, és a nyilvános vita kitűzését egyértelműen javaslom.

Budapest, 2026. szeptember 1.

Hegedüs, Tamás

Dr. Hegedűs Tamás
MTA doktora