

**Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet**

Igazgató: Dr. Kellermayer Miklós egyetemi tanár

1094 Budapest, IX. Tűzoltó u. 37-47.

Levélcím: 1444 Budapest, Pf. 263.

Tel.: 267-6261, Fax: 266-6656

E-mail: miklos.kellermayer@eok.sote.hu

Dr. Makai Mihály, az MTA doktora

Titkár

Magyar Tudományos Akadémia

Doktori Tanácsa

1051 Budapest V.

Nádor u. 7.

Tel: 1/411-6286

Fax: 1/411-6233

Bírálat**Kovács Mihály:
Motorenzimek működésének sokfélesége
című MTA doktori értekezésére**

Nagy öröm és megtiszteltetés, hogy Kovács Mihály "Motorenzimek sokfélesége" című MTA értekezését bírálhattam. A bírálónak könnyű dolga van a kiváló disszertáció értékelésekor, mert az egy koncepciózusan felépített, kurrens tematikát felvonultató és rendkívül igényesen összeállított mű, amelynek háttérében komoly hazai és nemzetközi tudományos aktivitás és iskolateremtő teljesítmény húzódik.

Kovács Mihály disszertációjában a motorfehérjék működési mechanizmusait vizsgálja, és arra keresi a választ, hogy a diverz eredetű, szerkezetű és funkcionalitású motorenzimek működési mechanizmusaiban fellelhetők-e hasonló motívumok. Erre a rendkívül izgalmas, és számos tudományterületet feszítő kérdésre a jelölt elegáns kísérletek sorában igyekszik megadni a választ. Az egész értekezésen végigvonul egy közös logikai ív, amely jól megalapozza a koncepciózus iskolateremtő munkásságot. Kutatása részeiben és egészében is alaposan átgondolt és kidolgozott elméleti alapokon nyugszik. A felhasznált módszerek a kurrens biokémiai-biofizikai tudományok élvonalába tartoznak. A jelölt egész tudományos témaválasztása és kísérletezése olyan logikai ívet vázol fel, amelynek folytatását nagy kíváncsisággal várom, hiszen a citoskeletális motorfehérjék és a biológiai információ feldolgozás közötti kapcsolat mind elméleti, mind gyakorlati szinten izgalmas lehetőségeket feszeget.

A jelölt téziseit elfogadom, új tudományos eredményeit a következőkben tudom összefoglalni:

1. Az aktomiozin motor komplex számos új mechanizmusát fedezte fel. A mechanizmusok arra világítanak rá, hogy az élettani feladatnak megfelelő adaptációk történnek molekuláris szinten.

2. Kimutatta, hogy a nem-izom miozin 2 működése során - a korábbi feltételezésekkel gyökeres ellentétben - magas terhelési aránnyal jellemezhető, ami azzal magyarázható, hogy mindkét miozin fej egyszerre kötődik az aktin filamentumhoz.
3. Két miozin 5 izoformáról is kimutatta, hogy azok csak nagyobb molekulacsoportokban képesek processzív haladásra.
4. Kimutatta, hogy a blebbistatin ADP jelenlétében a miozin fejet az erőkifejtő lépés kezdőállapotában stabilizálja, és ezáltal előállított egy felhúzott erőkarú és magas aktin-affinitású molekulaszervezetet.
5. Kimutatta, hogy a miozin fej magjában elhelyezkedő β -lemez energiatovábbító rugóként viselkedik az erőgenerálás során.
6. A nem-izom miozin 2-ben történő nukleotidcsere mechanikai terhelés általi szabályozását írta le.
7. Kidolgozott egy analitikai eljárást, amelynek segítségével a nukleinsavak mentén haladó motorfehérjék legfontosabb működési jellemzői egyetlen tranziens kinetikai kísérletsorozatban meghatározhatók.
8. Meghatározta a humán Bloom-szindróma helikáz DNS-en történő transzlokációjának mechanokémiai mechanizmusát.

Az értekezés alapjául 27, rangos nemzetközi folyóiratokban megjelent közlemény szolgál, melyből a jelölt 18-ban terminális szerző. A cikkek rangját jelzi, hogy a folyóiratok között található a *Journal of Biological Chemistry*, a *PNAS*, a *Nucleic Acid Research* és a *FASEB Journal* is. Az utóbbi pár év közleményeiben kiérződik, hogy azokban a meghatározó kísérletezési szerep már a tanítványoknak jut, amely ugyancsak aláhúzza a jelölt nagyszerű iskolateremtő törekvését.

A disszertáció rendkívül gondosan szerkesztett, összeállított és kivitelezett mű. Az egész értekezésem az az igényesség, alaposság, körültekintés és kiegyensúlyozottság vonul át, amely Kovács Mihály tudományos hozzáállását összességében jellemzi. Az egyes fejezetek elején olvasható, bekeretezett néhány mondatos összegzések az olvasó öszpontosítását remekül segítik. Dicséretes és élvezetes a racionális, de nem excesszív magyarságra törekvés. Ez alól egy kivétel olvasható, a furcsán ható "emergens" kifejezés (p. 31). A rendkívül lelkiismeretes és szabatos anyagban csupán elvétve fordul elő elírás, szakmai nomenklaturális hiba pedig szinte egyáltalán nem. Ez alól csupán az aleggység *versus* domén a kivétel, amelynek keveredése itt-ott fellelhető (pl. p. 12). A disszertáció bevezetésében a célkitűzések világos, felvillanyozó összefoglalását olvashatjuk. Rendkívül dicséretesnek és követendőnek tartom azt, hogy a jelölt egyértelműen leírja saját szakmai hozzájárulását a kísérletezésekhez és a tudományos eredményekhez. A Tudományterületi háttér fejezet világos és remekül követhető, magával ragadó olvasmány. A Módszertan fejezet alkalmazott metodikák egyszerű, tényszerű és túlzó megnyilvánulásoktól mentes összefoglalása. A Kutatási Eredmények fejezet három témára csoportosítva tárgyalja a tudományos kísérleteket: a) a miozinok működési mechanizmusai, b) az erőgenerálás útvonalai a miozinban, és c) nem citoskeletális NTPázok vizsgálata. A disszertáció tartalmi részét a tézisek összefoglalása és perspektívák felvázolása zárja.

Megjegyzéseim és kérdéseim kizárólag az értekezés nagyszerűségéből és gondolatébresztő jellegéből táplálkoznak:

1. 3.B ábrán a vázlatosan feltüntetett erőkar alakja és szinkódolása sugall-e a papír síkjára merőleges elmozdulást?
2. p. 16. A terhelési arány (duty ratio) sokasági analógiájában fontos kiemelni, hogy az random, szinkronizálatlan motorpopulációra vonatkozik. Egy filamentumba szerveződött miozin esetében elképzelhető-e bizonyos fokú mechanikai szinkronizáció, amely megváltoztatja az effektív terhelési arányt?
3. p. 19. Szál invázió: *in vivo* körülmények között a károsult kromatid egyik szála hogyan találja meg a testvérkromatid megfelelő szakaszát?
4. p. 20. Mi határozza meg, hogy a BLM számos aktivitása közül melyik manifesztálódik?
5. p. 21. Az erőkar hogyan értelmezendő a helikázokban?
6. A single-turnover stopped-flow kísérletek mennyiben vehetők analógnak az egyedi molekula kísérletekkel?
7. A stopped-flow kísérletekben injektált aktin vélhetően F-aktin volt. Mekkora volt az átlagos aktin filamentum hossz? Az injektáláskor fellépő nyíróerő milyen hatással van az aktin filamentumokra és az aktomiozin komplexre? Előfordulhat-e aktin filamentum töredezés? Ha igen, akkor ez milyen hatással lehet az enzimreakcióra, és különösen processzív motorok esetén a detektálható processzív futási hossza?
8. A NM2 minifilamentumok (14. ábra) hosszát mi szabályozza *in vivo*? Lehetséges előállítani NM2 szintetikus filamentumokat *in vitro*? Ezeknek milyen a hosszeloszlása?
9. p. 37-38. Az ADP koncentráció emelésével fellépő NM2 motor lelassulás jár-e a processzivitás növekedésével?
10. A processzivitást valójában mi határozza meg? Bár régóta ismert, hogy a magas terhelési arányú motorok processzívek és megfordítva, azonban ez a tapasztalat nem teljesen fedi fel a molekuláris mechanizmusokat. A processzivitás sínen megtett távolság ("processzív futási távolság") szerinti definíciója egy élettartam típusú változóra emlékeztet. Azonban egy futás során számos, egymást követő, első megközelítésben biokémiailag teljesen azonos egyedi mechanokémiai ciklus valósul meg. Mitől és hogyan lép fel a futási távolság utáni sínről való leválás? Lehetséges, hogy egy adott motormolekulára nézve az egymást követő ciklusok nem teljesen azonosak? Emlékezhets-e a motorfehérje a megtett mechanokémiai ciklusok számára, és ilyen értelemben rendelkezik-e memóriával? Ide tartozik, hogy a miozin 5 esetére, amelyekben az egyedi fejek terhelési aránya 70% (p. 57), hogyan történt az átlagos 10 lépésnyi futási ciklus kiszámítása?
11. p. 37, 24. ábra. Az ábra alapján nagy a kísértés, hogy függvénykapcsolatot állítsunk fel a terhelési arány és a ciklusidő között. Lehetséges ez? Ha igen, mi az alapja és mi lehet az értelme?

12. Az akto-NM2B-HMM komplex ADP chase kísérletében (38. ábra, p. 55) hogyan történt a két fázis miozin fejek szerinti azonosítása? Más szóval, honnan lehet tudni, hogy a gyors illetve lassú átmenetek az elülső vagy hátsó fejre vonatkoznak-e?
13. Ugyancsak az akto-NM2-HMM kísérletekre vonatkozóan, meg lehet-e becsülni a fejekre ható torziós erőt a nyaki domén polimermechanikai tulajdonságai alapján?
14. p. 47. A miozin mechanokémiai kinetikai útvonalainak kellő megválasztásával elvben lehetségessé válhat, hogy a nem-processzív izom-miozin 2 egyedi molekula mechanikai kísérletekben vizsgálhatóvá váljék? Bármennyire hihetetlen ugyanis, az izom-miozin 2 által kifejtett maximális, egy molekulára eső izometriás erőt mind a mai napig nem ismerjük.
15. p. 53. Ha a mechanikailag terhelt NM2 molekulában nincs elmozdulás, és ráadásul gyakorlatilag teljesen leáll az enzimátikus ciklus, akkor értelmezhetlenné válik a munkavégzés (amely ekkor 0) és így a fizikai értelemben vett hatásfok is. Nemde egyszerűen arról van szó, hogy ilyenkor a molekula egyfajta "lakatként" viselkedik?
16. p. 55-56. A NM2 molekulára ható visszahúzó erő hatására az erősen aktin-kötött állapot stabilizálódik, és aktomiozin disszociáció nagymértékben lelassul. Külső mechanikai erő hatására a kémiai kötések élettartama rövidül, a kötési reakció lassul, és a disszociáció gyorsul. A predikcióval ellentétes megfigyelésről van szó tehát. Mivel az aktomiozin állapotokban számos kötés vesz részt, jogosan merül fel a kérdés, hogy a mechanikailag torzított (és stabilizált) akto-NM2 állapotban kialakulnak-e újabb kötések az aktin filamentum és a miozinmolekula között?
17. A mechanikai erő hatására fellépő ADP-disszociáció gátlásnak mi lehet a molekuláris mechanizmusa? Elképzelhető, hogy az ATP-kötő zseb geometriája torzul, és mintegy mechanikai akadály lép fel a disszociációval szemben?
18. A miozin motorok szerkezetéből és működéséből adódóan az erőhatás nem csak a csuklópontra, hanem a nyak és a rúd csatlakozási pontján is kell, hogy jelentkezzen. Van-e, vagy várható-e bármilyen speciális szerkezeti feltétel vagy tulajdonság a miozin molekulának ezen a pontján?
19. A hét béta-láncból felépülő transzducer domén érdekes lehetőségeket vet fel. Van-e szerkezeti hasonlóság ezen domén és a hasonlóan hét béta-láncból felépülő Ig vagy FN domének között? Lehet-e következtetni a transzducer domén mechanikai tulajdonságaira az Ig és FN domének mára már aránylag jól jellemzett mechanikai tulajdonságaiból (lásd pl. titint felépítő domének).
20. A BLM mint helikáz ugyancsak mechanoenzim. Van-e a jelöltnek elképzelése arról, hogy mechanikai erő ellenében hogyan dolgozik ez a molekula, és hogy mekkora lehet a stall force (megálláshoz szükséges erő)? Egy ilyen molekulakomplex esetében egyáltalán milyen kísérletekben lehetne ezt megmérni?
21. A BLM egy mechanikai ciklusra eső lépéshossza valójában mekkora? A disszertációban ennek a definíciója az egy ATP-re eső elmozdulás. Azonban nincs itt cirkuláris logika? Nemde arról a mára a molekuláris biofizikában dogmatikus álláspontra vezethető vissza ez a definíció, hogy a mechanoenzimekben szoros csatolás (1 mechanikai/1 enzimátikus ciklus) működik?

22. A post-rigor és pre-powerstroke állapotok közötti átmenet reverzibilis lépés. Ez felveti annak elvi lehetőségét, hogy ATP szintézis jöjjön létre az ellentétes irányú reakcióban. Van ennek realitása? Mik volnának ennek feltételei? Ebből a szempontból lehet-e analógiát vonni az ATP szintézis motor komplexével (F1FO ATPáz)?
23. Az izomkutatás korábban örökzöld, mára talán inkább elfeledett (de megnyugtatóan meg nem válaszolt) kérdése, hogy az izom-miozin 2 két feje a szarkomérben vajon együttműködik-e? A NM2-n szerzett megfigyelések adhatnak-e választ erre a kérdésre?
24. A jelölt által többször is felemlgetett mechanobiokémia izgalmasnak kínálkozó tudomány. Kérdésem, extrapolálhatóak-e az erővezérelt (vagy erőnek kietett) biokémiai folyamatok a motor enzimeken túl egyéb vagy bármely enzimre?
25. A disszertáció két, talán leggyakrabban előforduló kifejezése és szava az ATP és a határfok. A jelölt által vizsgált biomolekuláris rendszerek mindegyike ATP felhasználó. Az élő sejtben található, mára megismert ATP-t használó biomolekulák száma szinte megbabonázó. Általános biológiai kérdésként kínálkozik, meg lehet-e becsülni, hogy az élő sejt biomolekuláris folyamatainak fenntartásához mekkora mennyiségű steady-state ATP felhasználásra van szükség? Ki lehet-e fejezni egy határfok paramétert ebből a szempontból az élő sejtre nézve?

A fenti kérdések mit sem vonnak le azon meggyőződésemből, hogy Kovács Mihály elsőrangú, és nemzetközi vonatkozásban is meghatározó jelentőségű és fontosságú tudományos teljesítményt foglalt össze disszertációjában. Részére a nyilvános vita kitézését és a mű elfogadását feltétlenül javaslom.

Budapest, 2011. december 3.

Dr. Kellermayer Miklós
Egyetemi tanár, az MTA doktora