

Opponensi vélemény

Dr. Málnási Csizmadia András

Utazás a motor domén körül: Konformációs átalakulások és intramolekuláris kommunikációs útvonalak a miozinban

című MTA doktori értekezés pályázati munkájáról.

Az elmúlt évtized biológiai tudományos sikereinek egyike - amely a nagyfelbontású röntgendiffrakción, a hozzákapcsolt számítógépes technikán, valamint a kifinomult molekuláris biológiai módszereken alapul - a mozgást generáló proteinek szerkezetének megismerése és ennek alapján a molekuláris működés valószínűsítése. A szerkezetkutatás és számítástudomány kifinomult módszerei ma már a korábbinál is mélyebb megismerést tesznek lehetővé, megközelíthetővé válnak a makromolekulákon belüli folyamatok, az összetett mozgások időbeli lefolyása, azok kapcsolata és befolyásolhatósága a biokémiai folyamatokkal. A társadalmi átalakulások, a szabadidő hasznos eltöltése, az egészséges életmódra való törekvés, de mindenekelőtt a versenysportban kialakult kíméletlen verseny arra is készíti a biomozgásokkal foglalkozó szakembereket, hogy mielőbb átültessék a gyakorlatba a modellszerű eredményeiket.

Általános értékelés.

A disszertáció szerzője 2000 és 2008 között a miozin szubfragmenthez kapcsolódó aktuálisan felmerülő kérdések és problémák közül néhányra a megválaszolására vállalkozott munkájában. Értekezéséhez 19 dolgozatban megjelent kutatási eredményeit használta fel. A szerzőkolektívában készült dolgozatok közül 6 publikációban első szerző, 6 publikációban utolsó szerző, ami azt bizonyítja, hogy probléma megoldóként, valamint probléma megfogalmazóként is jelentős szerepe volt az egyes témákban. A dolgozatok nagy impakt faktorról jellemezhető folyóiratokban jelentek meg. Szükségesnek gondolom megemlíteni azt a körülményt, hogy a dolgozatok szerzői között a motorproteinek kutatásában meghatározó szereppel bíró kutatók is szerepelnek, mint pl. C. Bagshaw, M. Geeves, neveik biztosítékot jelentenek a munka magas színvonalára és a megfelelő publikációs lehetőségre. A körülmények figyelembevételével kijelenthető, hogy a választott témakörrel kapcsolatos munka jelentős, és nemzetközi érdeklődésre is számot tarthat.

Magam részéről azt a tevékenységet emelném ki, amellyel az értekezés szerzője a molekuláris biológiai ismereteit össze tudta kapcsolni a korszerű műszertechnikai lehetőségekkel és ismeretekkel, nevezetesen a gyors-kinetika mérési módszereivel. Sikertelenül olyan előre megtervezett mutánsokat preparálni, amelyeken a hely-specifikus fluoreszcens jelöléssel a kívánt fehérje domén vagy szegmens mozgási dinamikáját és konformációváltásait tudták detektálni, amely más módszerrel nem vagy csak nehezen elérhető.

A bevezetéssel és irodalom jegyzékkel együtt 130 oldalas dolgozat szerkezeti felépítése, az egyes fejezetek aránya jól átgondolt, az értekezés olvasható, az egyes fejezetekben bemutatott ábrák szépen szerkesztettek, informatívak. Szerencsésnek

vélem, hogy a táblázatok egy része a Függelékben található, így nem törik meg a szöveg folyamatos gondolatmenetét.

A Bevezetés című rész nem tetszett; az értekezés címével is nehezen tudtam megbarátkozni. Hiányoltam az irodalmi összefoglalót, annak kritikáját, különösen a miozin motor domének röntgendiffrakció segítségével elért szerkezeti eredményeinek bemutatását, amelyek szorosan összefüggenek a dolgozatban foglalt problémákkal és a közölt eredményekkel. Ugyancsak nehezményezem a szerző által is hangsúlyozott szerkezeti-kinetikai közelítés összefoglalását az értekezés végén saját elért eredményeinek tükrében.

Az értekezésben használt vizsgálati módszerek sokrétűek, és megfelelő módszertani lehetőséget nyújtanak az elérni kívánt célokhoz: jelentősnek tartom azokat a fejlesztéseket, mint pl. az országban ismereteim szerint biológiai rendszerek vizsgálatára eddig nem alkalmazott hőmérséklet-ugrásos, nyomás-ugrásos, valamint a stopped flow-val kombinált hőmérséklet-ugrásos technikát. A fejlesztések megvalósítása komoly pályázati pénzeket igényelt, amelyek pályázaton keresztüli megszerzése az elért eredmények elismerését is jelentik egyben.

Személyes érdeklődés folytán szívesen olvastam volna azokról az eredményekről, amelyekre a szerző is utal értekezésében, nevezetesen a miozin motor domén W 501+ konstrukción végzett hődenaturációs mérésekről T-jump/stopped flow rendszerben, mivel hagyományos DSC méréseket miozinon korábban már végeztem.

Tudományos munkásság:

Az értekezés fontosabb eredményeit az alábbiakban látom:

A nukleotid kötőhely közvetlen közelébe elhelyezett triptofán molekulák W 129+ és W131+ fluoreszcenciás spektroszkópiai tulajdonságai alapján kimutatja, hogy a nukleotid kötése két elkülönülő fázisban megy végbe. A kötési mechanizmus többlépéses kémiai reakcióval értelmezhető csupán.

Az aktinkötő árok két oldalán elhelyezett fluoreszcens riporter molekulák excimer fluoreszcenciájának segítségével is kimutatja a miozin doménben a nukleotid kötőhely és az aktin kötőhely közötti funkcionális kapcsolatot. A kísérletek szerint a fluoreszcencia változás mindig megelőzi a fényszórással mérhető aktin disszociációt.

A W501+ modellkonstrukció vizsgálata azt mutatja, hogy valamennyi nukleotid állapotban legalább három mikroállapot van jelen, azonban ezekhez nem rendelhető egy meghatározott makroállapot. Az anizotrópia mérések szerint a Trp-501 relé hurok viszonylag rigid valamennyi nukleotid állapotban. Ez azt jelenti, hogy relé hurok nem mutat lényeges átalakulást a konverter régióhoz viszonyítva az ATPáz aktivitás során.

A nukleotid kötőhely és az aktin kötést alkotó struktúra között elhelyezkedő hurok (switch 1) nyitott és zárt állapota a vizsgálatok szerint meghatározza az aktin kötés mértékét. A W239+ konstrukció fluoreszcencia spektrumának vizsgálata azt mutatja, ha a régió γ -foszfát kötőhelye betöltött, akkor a hurok zárt állapotban van, viszont a motor domén és aktin között a kölcsönhatás gyenge. ADP állapotban a kölcsönhatás aktin és miozin között erős. A

megállapítás jól ellenőrizhető egyidejű fluoreszcenciás és fényszórási mérésekkel. Összhangban a mérésekkel a szerző egy termodinamikai kötési modellt is javasol.

A relé régió és a nukleotid kötőhely között elhelyezkedő hurok (switch 2) vizsgálata lehetővé teszi a miozin motor működését elősegítő a konverter régió mozgásának tanulmányozását. A switch 2 hurok végén elhelyezkedő fenilalanin cseréjével létrehozott W461+ konstrukció konformációváltozást mutat az ATPáz ciklus során megegyezésben a szerkezeti vizsgálatokkal. Az aktin miozinhoz való kötődése megváltoztatja a switch 2 konformációját is.

A W501+ és a W129+ modellkonstrukciók segítségével sikerült kimutatni, hogy az ATP hidrolízis ciklusban a sebességmeghatározó lépés nem az anorganikus foszfát felszabadulásával függ össze, hanem a switch 2 hurok-konverter/relé régió u.n. “fel – le” konformációváltozásával. A ligandum kötődésének és leválásának mechanizmusából arra is lehet következtetni, hogy a Yount és munkatársai által korábban javasolt back door mechanizmus átértékelésre szorul.

Érdekesnek és fontosnak is tartom azokat az eljárásokat és méréseket - blebbistatin inhibitor hatásmechanizmusa-, továbbá a proteinek és enzimek hőstabilitásának vizsgálatára irányuló terveket, amelyek egyrészt magasabb hőmérsékleten - a protein denaturációs hőmérséklete felett- bekövetkező változásokat hivatottak tisztázni, – másrészt a protein szerkezet belső súrlódása által okozott hatás hogyan befolyásolja az enzimek reakciók és konformációs átalakulások sebességét. A különböző módszerekkel végzett beható vizsgálatok ugyanis kiderítették, hogy a környezetből érkező szubsztrát a kötés folyamatában nem egy, hanem több barrier-rel is találkozhat, ami a folyamatban korábban feltételezett mechanizmus finomabb részleteinek felülvizsgálatát teszi szükségessé.

Az értekezés kapcsán a következő problémák merültek fel bennem:

1./ Holmes és Geeves egy összefoglaló munkájában a switch 2 hurok zárt állapotára vonatkozóan két konformációt C1 és C2 különbözetet meg. Van-e potenciális lehetőség arra, hogy a W461+ konstrukció segítségével ezen konformációk megkülönböztethetők, vagy a szerző esetleg nem ért egyet kísérletei alapján ezzel a megkülönböztetéssel?

2./ A nukleotidok ATP és ADP kötődésének mechanizmusára a szerző egy többlépéses modellre tesz javaslatot, amely a szubsztrátra nézve egy reorientációs lépést is feltételez. Mi biztosítja az u.n. energiatölcsér kialakulását, amely a reorientációt előidézi?

3./ A W501+ ATP-vel történő reakciójánál a fluoreszcencia intenzitás-hőmérséklet függvényre egy exponenciális függvénnyel történt illesztés, függetlenül a választott hőmérséklettől. T-jump/stopped flow mérések esetén az illesztéshez két exponenciális függvényt használt. Mi indokolta ezt a választást, ha végeredményben a fluoreszcencia változása kétfázisú? Hogyan történik alacsonyabb hőmérsékleten a két fázis (gyors és lassú) szétválasztása, ha a 44. ábra alapján 25-35 °C között nincs szignifikáns változás a lassúnak ill. gyorsnak mondott állapotok között?

4./ A riporter molekulák intakt biológiai rendszerbe történő beépítésének általános problémája, hogy a kapott, speciális mérésre már alkalmas rendszert a manipuláció mennyire perturbálja. A jelen dolgozatban elfogadott kritérium, hogy az enzimkinetikai paraméterek 10 %-nál jobban ne térjenek el a vad típusú enzim esetében mért értéktől. Ha ugyanekkor a

különböző konstrukcióknál néhány százalékos eltérést pl. 52. oldal W458+ konstrukciónál 5 ill. 9 % - os különbséget, a W461+ konstrukciónál 7 % -os eltérést az ATP aktivitásban szignifikánsnak nyilvánítottok, akkor mennyiben tekinthetem a változással kapcsolatos kijelentéseket megbízhatónak?

5./ Az értekezés 53. oldalán a szerző bemutatja a W461+ konstrukció fluoreszcenciájának hőmérsékleti függését apo, ATP és ADP állapotban. Az az állítás szerepel, hogy ADP jelenlétében hasonló lefutást talált W239+ konstrukció esetében is. Nem látom, hogyan következik az azonos lefutásból, hogy a switch 1 mozgása a switch 2 mozgásával korrelál? Összehasonlítva a 19. és 28. ábrát a fluoreszcencia intenzitások hőmérsékleti függése nem azonos, hanem eltér egymástól.

6./Mágneses dipoláris kölcsönhatáson alapuló mérések arra utalnak, hogy miozin esetében, de aktomiozin komplexben is, a felső aktint kötő 50 kDa domén fluktuációja miatt a nyílás a két domén között két konformációban létezik, nyitott és zárt. Ez azt jelentheti, hogy a switch 1 hurok és a nukleotid kötőhely két konformációban létezik függetlenül a kötött nukleotidtól.

Véleményemet összefoglalva: dr. Málnási Csizmadia András értekezésében a nemzetközi tendenciákhoz illeszkedő tudományos témában végzett munkájának eredményeit mutatja be, az elért eredményeket nagy határfaktorú idegennyelvű folyóiratokban publikálta. Az értekezés célkitűzéseit megvalósította, tudományos eredményeivel bizonyította alkalmasságát a biokémiai/biofizikai kutatómunkához és munkacsoport irányításához. Az eredmények élettani jeletőségűek, a mozgások pontosabb megértéséhez járulnak hozzá. Az eredményeknek komoly jelentősége lehet a motorproteinek molekuláris működésének megértésében. A dolgozattal kapcsolatos észrevételek a tézisekben foglalt állítások részleteire irányulnak.

A dolgozatban foglalt eredmények alapján az értekezés nyilvános vitára bocsátását és az MTA doktora fokozat megítélését támogatom.

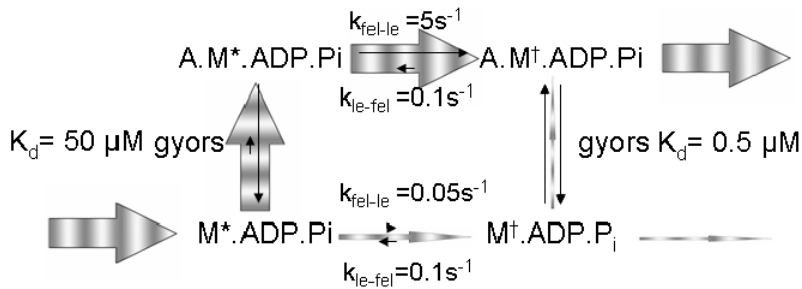
Pécs, 2009. febr. 27.

Belágyi József
biol. tud. doktora

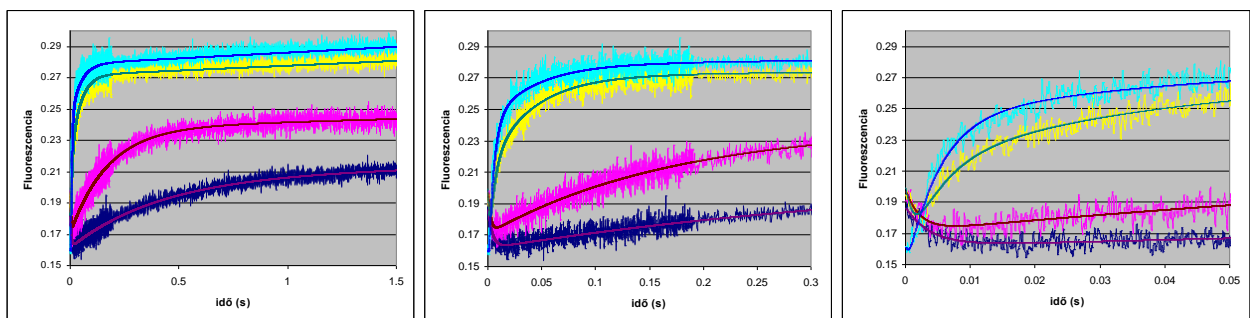
Válasz Belágyi József professzor úr MTA doktori dolgozatom bírálatára

Köszönöm a dicsérő és biztató szavakat, valamint a kritikai megjegyzéseket. Ugyancsak köszönöm az igen mélyreható, alapvető tudományos kérdéseket feszegető felvetéseket, amelyeket 6 pontban fogalmazott meg a Bíráló. Alábbiakban röviden összefoglalom azokat a gondolatokat, és kísérleti eredményeket, amelyek elképzelhető megközelítései, kiindulási pontjai lehetnek a felvetett problémák kifejtésének és/vagy megoldásainak.

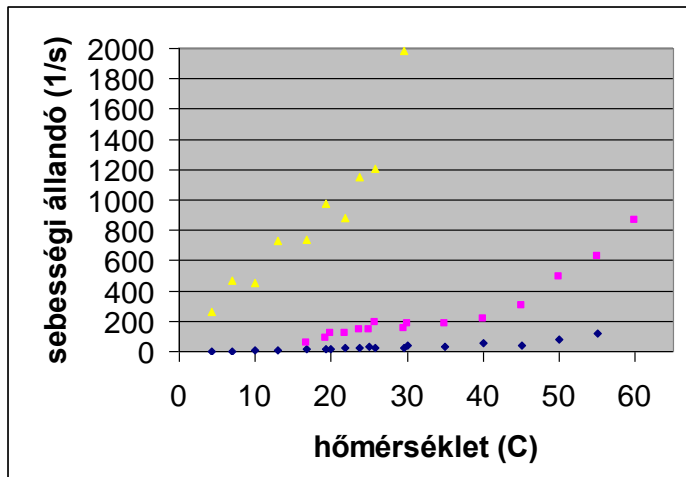
1. Holmes és Geeves többek között az *Adv Protein Chem.* 2005;71:161-93. számában megjelent összefoglaló munkájukban kifejtették, hogy az ún. closed állapotnak két konformációs állapota lehet (C1 és C2). Mindkét állapot a felhúzott erőkar (fel) állapot, a C1 gyengén, a C2 erősen kötődik az aktinhoz, és ez utóbbi állapotból indulna ki az erőgeneráló lépés a lecsapott erőkar (le) állapot felé. Belágyi professzor úr által felvetett kérdés a dolgozatomban kifejtett legfontosabb üzenetet világítja meg ennek a két állapotnak a citálása révén. T.i. a Holmes Geeves modellel ellentétben azt állítjuk, hogy az erőgenerálás lépés iniciálása, vagyis kezdő állapota nem egy erős aktinkötő állapotból indul; az erőgenerálási folyamat során a miozin aktinkötése egyre erősebbé válik. Tehát az általuk feltételezett C2 állapot mint erős aktinkötő állapot nem szükséges, illetve ilyen formában nem is létezik (és valószínűleg egy ilyen állapot a hatékony ciklust is akadályozná). A C2 állapot feltételezése a Lymn Taylor modell hiányosságából következik: a modell nem mondja meg, hogy mi az oka annak, hogy az M.ADP.Pi állapot erősen visszaköt az aktinhoz. Ahogy a dolgozatban kifejtettem és a 13. sémában bemutattam, az aktomiozin ATPáz ciklus fő fluxusa annak ellenére az aktinkötött állapoton keresztül történik, hogy ez az útvonal termodinamikailag kedvezőtlenebb az aktinhoz nem kötött (futilis) útvonalhoz képest. Ennek az az oka, hogy aktin távollétében az ATPáz ciklus sebesség-meghatározó lépése az erőkar lecsapási lépés, amelynek sebességi állandóját az aktin több nagyságrenddel növeli. Kimutattuk azt is, hogy ezt a sebességnövekedést az aktin egy általunk újonnan kimutatott aktinkötőhelyre való bekötődés révén, az erőkar mozgás közvetlen befolyásolása által hozza létre. Véleményem szerint ez a megállapítás egyrészt alapvető paradigmaváltás az aktomiozin mechanizmusában, amelynek számos következménye van: többek között. 1. megmagyarázza a Lymn Taylor modell ellentmondásait, 2. megmondja, hogy melyik a felhúzott állapot. (Ez utóbbit eddig egyetlen modell sem tette meg – sőt ellentmondásokat gerjesztettek azzal, hogy egy ilyen állapotnak egy erősen populált állapotot feltételeztek, ami *per definitio* nem lehetséges. Az alábbi sémában az is látható, hogy a felhúzott állapot miért egy alacsonyan populálódó, átmeneti állapot jellegű állapot). Másrészt sikerült mechanisztikusan és szerkezetileg is megmagyaráznunk az aktin aktivációt, egy hetven éve ismert jelenséget, amelyről nemcsak hogy alig tudtunk valamit, de a funkcióját sem ismertük. Az aktin aktiváció állítja be az aktomiozin ciklus hasznos/futilis útvonalainak arányát. Két héttel ezelőtt részletesen, hosszan tárgyaltam Ken Holmesszal és Mike Geevesszel a fenti problémakörrel, és nagy izgalommal és lelkesedéssel fogadták el a fenti eredményeket és érveléseket.



2. A szubsztrátkötésben esetleg szerepet játszó energiatölcser szerkezetét nem modelleztük, nem vizsgáltuk egyelőre, habár nagyon érdekes, általános biokémiai jelenséget megközelítő kutatás lenne. Az esetleges energiatölcser hipotézist a párhuzamos szubsztrátkötési folyamatok feltárása miatt alkottuk, illetve feltételeztük.
3. Az ATP kötéstől a M.ADP.Pi* állapotig négy lépés történik (9. séma) (ezután következik a sebességhatározó lépés, amely határozottan elkülönül). Az első kettő összességében gyors, kvázi irreverzibilis ilyen ATP koncentrációnál (1mM). Ez a két lépés a W501+ által egyetlen gyors, fluoreszcencia csökkenéssel járó lépésben jelenik meg. A folyamat részletesen elemeztem a dolgozatban (2.4.1. fejezet). A harmadik lépés (3a lépés) a *recovery step*, amely egy gyors egyensúlyi lépés, és kb. 80% fluoreszcencia emelkedéssel jár. A negyedik (3b lépés) a hidrolízis lépés, amely nem jár fluoreszcencia változással. A 3a lépés egyensúlyi állandója hőmérsékletfüggő: alacsony hőmérsékleten visszafelé (az alacsony fluoreszcenciájú állapot) felé van eltolva, magasabb hőmérsékleten a nagy fluoreszcenciájú felé. A legutóbbi időben sikerült olyan nagy precizitású stopped flow kísérletet elvégezni, amelyben mindhárom lépés kimutatható egyetlen reakcióban. Ehhez többek között nagy felbontású, 200 μs holtidejű műszerre volt szükség (a hagyományos stopped flow-k holtidje 1,2 és 2,5 ms között van). Az alábbiakban bemutatok néhány ilyen mérési eredményt.



2,5 μM W501+ motor domén és 1mM ATP összekeverése stopped flow készülékben. A fluoreszcenciát 340nm-nél detektáltam, a gerjesztés 295 nm-en történt. (sötétkék görbe: 4 °C, lila 10 °C, sárga 21 °C, világoskék 30 °C). A három ábrán ugyanazok a mérések láthatók. A 2. és a 3. ábrán a reakció első 0,3 illetve 0,05 másodperces szakasza látható. A kezdeti gyors quench szakasz (amely 30 °C-on lag szakaszként jelenik meg) jól elkülöníthető az azt követő relatív gyors és lassabb emelkedő fázisoktól.



A fenti kísérletekben a mérési görbékre illesztett exponenciális függvényekből származtatott sebességi állandók.

4. Az 52. oldali ábrán a fluoreszcencia változások %-os növekedését adtam meg az apo állapothoz képest, nem pedig a sebességi állandókat. Ettől függetlenül egyetérttek azzal, hogy megfogalmazásom arról, hogy milyen esetekben tekinthető még elfogadhatónak egy riporter csoport által okozott perturbáció pongyola volt. Véleményem szerint ez nem a sebességi állandók megváltozásán keresztül dönthető el, hanem az adott mérésben a tudományos kérdés és a perturbációnak a mechanizmusra gyakorolt hatása közötti összefüggés alapján. Kísérleteinkben ezt tartottuk szem előtt, és amennyire lehetett, azt próbáltuk meghatározni, hogy a perturbáció a vizsgált folyamatra kruciális hatással volt-e (vagyis még mindig azt vizsgáltuk-e a mutáns molekulával, amire a vad konstrukcióban kíváncsiak voltunk). Ezt a hiányosságot Erdődi professzor úr is felvetette.
5. A W239+ és W461+ konstrukciók fluoreszcencia intenzitásának hőmérsékletfüggése ADP jelenlétében kvantitatívan valóban némileg eltérő. Abban azonban hasonlóak, hogy mindkét esetben kizárólag ADP jelenlétében tudtunk több mint egy állapotra következtetni ebből a kísérletből. Ez alapján vontuk le a következtetést, hogy a switch1 és a switch2 mozgása illetve állapotai nem függetlenek egymástól. Pontosabban, ha a gamma foszfát kötőhely ligandum által foglalt, akkor egy állapotuk van, ha pedig üres (ADP-ben), akkor két konformációs állapot egyensúlya jön létre. Azt a cikkeinkben és a dolgozatban is hangsúlyoztam, hogy a W461+ mutánssal végzett kísérletekből levont következtetések óvatosan kezelendők, és csupán indikációs jellegűek, mert a F461W mutáció viszonylag jelentős perturbációt okoz a ciklus azon részében, ami összefügg az erőkar mozgással.
6. A kérdés az, hogy az aktinkötő árok, a switch1 és a nukleotid kötőhely együttesen mozognak-e. Ez nehéz kérdés, és jelenleg több munkacsoport (Chris Berger, David Thomas, Peter Fajer, valamint Roger Cooke és jómagam kollaborációban) is foglalkozik a kérdéssel. Roger Cooke-kal most adtunk be egy kéziratot, amely EPR és fluoreszcencia kísérletek alapján azt állítja, hogy a nukleotid kötőhely és a switch1 mozgása és egyensúlyi állapotai erősen kapcsolatosak. A switch1 és az aktinkötő árok mozgásainak közvetlen kapcsoltsága azonban jelenleg még kérdéses. Véleményem szerint a két régió mozgásai nem kapcsolatosak egymással, de az egyik régió befolyásolja a másik régió konformációs állapotainak egyensúlyi állandóját. Ez a befolyásolás teszi lehetővé azt, hogy a switch1 régió egyensúlyi állapotai meghatározzák az aktinkötés erősségét, ahogy azt részletesen leírtam a dolgozat 2.4.3. fejezetében.

Köszönöm Belágyi József professzor úr izgalmas felvetéseit, és azt, hogy ezen keresztül új, érdekes megvilágításba helyezett néhány kérdést, különösképpen a Holmes-Geeves által javasolt C1/C2 konformációs állapotok funkcionális jelentőségét.

Őszinte tisztelettel,

Málnási Csizmadia András, doktorjelölt

Budapest, 2009. március 26.

O p p o n e n s i v é l e m é n y

Dr. Málnási-Csizmadia András „*Utazás a motor domén körül: Konformációs átalakulások és intracelluláris kommunikációs útvonalak a miozinban*” című MTA doktori értekezéséről

Málnási-Csizmadia András MTA doktori pályázatának általános célkitűzése, hogy kutatómunkájának összefoglalásával hozzájáruljon az enzimek működési mechanizmusának megértéséhez, különösen az enzimfehérjék funkcionálisan fontos doménjei közötti kommunikációs kapcsolatok feltárásával. Napjainkban, amikor számos fehérje röntgendiffrakciós módszerekkel feltárt szerkezete ismert, különösen fontos e statikus szerkezethez kapcsolható dinamikus szerkezeti tényezők megismerése, a különböző konformációs állapotok és azok egyensúlyainak és kinetikájának feltárása. Málnási-Csizmadia András egy széleskörűen kutatott modellrendszer, a miozin motor domén működésének részletes vizsgálatával kíván választ adni a kérdésekre. Az általános és a specificizált célkitűzések aktualitásához kétség nem fér, habár ezek mindössze az irányt jelölik ki. A Jelölt ugyanis a disszertációban meglehetősen egyéni stílusban mutatja be az elért eredményeket és ezek tükrében a célkitűzések változásának dialektikáját. Kiinduló kérdésekként 10 megválaszolandó problémakört vázol, amelyek a miozin II motor domén nukleotid- és aktinkötő régiói működésének, az ezek közötti kommunikációk, valamint az ATP hidrolízis és a munkaütem részleteinek feltárását célozzák. A kérdések kiindulópontja alapvetően két, az 1970-es években felállított, a miozin működését aktin jelenlétében és távollétében leíró mechanizmus. A Jelölt célja, hogy az időközben összegyűjtött szerkezeti információk alapján olyan kinetikai kísérleteket végezzen, amelyek az említett mechanizmusok részleteit feltárják.

Málnási-Csizmadia András kutatásai hazai és nemzetközi kollaborációban végzett munkán alapulnak. Az MTA doktori disszertációját 19 közleményére alapozza, amelyek között 5 első- és 6 utolsó szerzős publikációt találunk, jelezve a Jelölt alapvető szerepét a témák kidolgozásában. Imponáló, hogy a közlemények többsége nagy impakt faktorú folyóiratokban (pl. Biochemistry, J. Biol. Chem., EMBO Journal, Nature Struc. Biol) jelentek meg. A disszertáció formai szempontból megfelel a követelményeknek, de egyben rendhagyó is. A Szerző egy különös időutazásra hívja az olvasót, amelyben a múlt, jelen és jövő szintézisével kísérli meg bemutatni a mintegy 9 éves tevékenységét átfogó munkásságát. Ennek során érzékelteti átalakuló és fejlődő tudományos gondolkodását, a mechanizmusok/elméletek alkotásával kapcsolatos gyötrelmeit, néha már akár tudományfilozófiai ismérveket is felvillantva, különösen, ha az olvasó a lábjegyzeteket is szorgalmasan tanulmányozza. A kísérlet dicséretes, ami könnyen követhető, gördülékeny

stílusú, olvasmányos művet eredményezett. Az eredmények leírása során azok folyamatos értékelése is megtörténik részben, ennek ellenére hiányolok egy olyan átfogó, diszkussziós jellegű fejezetet, amelyben a Jelölt eredményeit szélesebb spektrumban, azok esetleges fiziológiai kontextusait is figyelembe véve értékeli.

Málnási-Csizmadia András legfontosabb új tudományos eredményei az alábbiakban foglalhatók össze:

1. Kidolgozott egy olyan új kísérleti rendszert, amelyben szisztematikusan tanulmányozhatók a miozin motor doménben különböző hatásokra bekövetkező konformációs változások és azok kinetikája. Ehhez a *Dictyostelium* miozin motor doménjének különböző funkcionális egységein olyan mutációkat hozott létre, hogy az exponált régióban csak egy triptofán, vagy fluoreszcens molekulával kapcsolható ciszteinek maradjanak, amelyek fluoreszcenciájának változása híven tükrözi a molekuláris mozgásokat.

2. Módszertani újítást vezetett be, amelyben a hőmérsklet-ugrás (T-jump)/megállított áramlás (stopped-flow) módszereket kombinálta és alkalmazta a miozin működés kinetikai sajátosságainak vizsgálatára.

3. Jellemezte a miozin nukleotid- és aktinkötő sajátosságait és kimutatta ezen kötődési folyamatok többlépéses jellegét. Igazolta, hogy az aktin-disszociáció és a nukleotid kötődés kinetikailag kapcsolt reakciókként írhatók le. Azonosította a *switch1* régiót, mint az aktin- és a nukleotid kötőhely közötti kommunikációt szabályozó szerkezeti motívumot. Kimutatta, hogy a *switch2* régió konformációs mozgásai mind a *switch1* régió, mind a relé régió konformációváltásával kapcsolatos.

4. Feltárta az ATP hidrolízis reakciólépéseit és ezek során létrejövő konformációs változásokat, valamint az ATP hidrolízis és a miozin erőkarjának „felhúzása” közötti kapcsolatot. Kimutatta, hogy az ATPáz ciklus sebességmeghatározó lépése nem a termékfelszabadulás, hanem az azt megelőző konformációs átalakulás, és az aktin ezt a lépést gyorsítja.

5. A miozin motor doménjében azonosított egy olyan prolin-gazdag régiót, amelynek szerepe lehet az aktin kötés érzékelésében és e jelenség közvetítésében a relé/konverter régió felé.

Az eredményeknek bemutatása és értelmezése során a Jelölt segítségével „körbeutazzuk” mindegyik problémakört és megfelelő háttér-információt kapunk az egyes jelenségek magyarázatára és a lehetséges mechanizmusokra. Ha az eredeti közleményeket is tanulmányozzuk - amit igyekeztem megtenni - akkor választ kapunk a felmerülő részletkérdések többségére is. Ezután már kevés tér marad a bíráló megjegyzéseknek,

kérdéseknek. Mégis, néhány, elsősorban az eredmények szélesebb spektrumú értelmezését segítő választ várok az alábbi felvetésekre.

1. A Jelölt nem mutat rá a disszertáció 31. oldalán bemutatott 2. séma egyes lépései és az ezt megelőző kísérletek adatai közötti relációra. Honnan erednek az egyes reakciólépések időállandói? Ugyanitt kissé spekulatívnak, a kísérleti eredményekkel nem kellőképpen alátámasztottnak érzem az „energiatölcser által irányított reorientációs szubsztrátkötési modellt” is ebben a fejezetben.

2. A disszertáció 44. oldalán azt olvashatjuk, hogy „a Mg^{2+} kötés és a nukleotid kötés részben függetlenül történik” Számomra ez azért meglepő mert feltételezésem szerint Mg^{2+} felesleg esetén a vizsgált nukleotidok (ADP, ATP) Mg^{2+} -nukleotid komplexként vannak jelen és így is kötődnek. Ezekben a komplexekben a nukleotid téralkata, töltésviszonyai és következésképpen a kötőfelszínei is eltérnek a Mg^{2+} mentes állapottól. Mit jelent tehát a független kötődés? Külön kötőhelye van a nukleotidnak és a Mg^{2+} -nak, továbbá a Mg -nukleotid komplexnek, vagy csak a kötődések időbeliségében van különbség?

3. A Jelölt kísérleteinek általánosíthatósága a különböző eredetű miozin II molekulákra azon alapul, hogy a Dictyostelium miozin II motor doménje és pl. a vázizom és simaizom miozinok közötti hasonlóság a fehérjék szekvenciájában nagymértékű. E tekintetben azonban nem biztos, hogy minden eredmény egyszerűen alkalmazható más szövetekben előforduló miozin II molekulákra, és itt hiányolom a Jelölt eredményeinek szélesebb körű értelmezését. Simaizom miozin esetén a miozin II ATPáz aktivitása nagymértékben függ a regulációs könnyűlánc foszforilációjától, míg vázizom miozin esetén, habár a foszforiláció lehetséges, hatása nem annyira kifejezett. Ezek alapján szükséges-e újragondolni az ATP hidrolízis mechanizmusa kapcsán tett szerkezet/aktivitás összefüggéseket pl. a simaizom miozin esetén?

4. A Dictyostelium miozin II modellrendszer mutációjával előállított fluoreszcens formái esetén azt állítja, hogy azok kinetikai és enzimatisz szempontról nem térnek el jelentősen a natív, vad típusú fehérjétől. Ezzel kapcsolatban azonban szintén szkeptikus vagyok és ehhez éppen a Jelölt szolgál adatokkal a disszertációt megalapozó egyik cikkében (*Biochemistry, Vol. 39, No. 51, 2000, Table 1*). E táblázat adatai szerint a W36F, W432F, W501F and W584F mutációk, vagy önmagában a W501F mutáció jelentősen növeli az ATPáz aktivitást aktin távollétében és csökkenti az aktinnal való aktiválhatóságot. Ezek után meglepő, hogy a vad típusú fehérje és a kísérletek szempontrából fontos W501+ fehérje ATPáz aktivitása csaknem azonos. A felsorolt mutációk okozta hatások azonban jelentős

szerkezeti változásokat tükrözhetnek és óvatosságra intenek a vad típusú és mutáns miozin formák összehasonlíthatósága tekintetében.

5. Az új, aktin-kötést érzékelő prolin gazdag hurok szerepével kapcsolatban kérdésem, hogy van-e bizonyíték arra, hogy a hurkot képező 519-523 aminosavak közvetlenül is kölcsönhatásba lépnek az aktinnal? Ennek bizonyítása azért lenne fontos, mert a prolin-gazdag hurok közelében van egy, a Phe535 és Pro536 aminosavaknak tulajdonított aktin-kötő hely. Ezek alapján az is elképzelhető, hogy a 519-523 aminosavak deléciójának hatása mindössze egy olyan szerkezeti perturbáció, amely megakadályozza az aktin kölcsönhatását a Phe535 és Pro536 oldalláncokkal? E témakörhöz kapcsolódó kérdés szintén, hogy a különböző régiókkal (CM-hurok, Phe535 és Pro536 oldalláncok, hurok-4, prolin gazdag hurok) történő kölcsönhatások szintjén hogyan magyarázható az erős és a gyenge aktin kötődés? Kevesebb kötőrégióval való kölcsönhatásról, vagy csak azokkal történő gyengébb kölcsönhatásról van szó? Az irodalomban található adatok az aktin és a miozin S1 fragmentum közötti kölcsönhatások NMR dinamikai vizsgálatára, amelyek azonban csak a fehérjék bizonyos szerkezeti részeinek a vizsgálatára szorítkoznak. Lehetségesek-e ilyen vizsgálatok a jövőben a gyenge aktin kötés jellemzésére? A felvetett kérdések a fő tudományos eredményeket és megállapításokat nem kérdőjelezzik meg. Málnási-Csizmadia András MTA doktori értekezése formai és tartalmi szempontból is magas színvonalon eleget tesz az MTA doktori fokozat követelményeinek. Tudományos értekezésében modern szerkezeti/kinetikai kutatásainak nemzetközi szinten is elismert eredményeit foglalta össze, amelyből kitűnik egyéni és eredeti tudományos hozzájárulása a vizsgált témához. Málnási-Csizmadia András tudományos kutatói kvalitásának értékeléséhez megjegyzem, hogy a jelen munkában bemutatott kutatásai mellett a disszertáció végén felvillantotta jövőbeni terveit és ezekkel kapcsolatos előzetes eredményeit. Mindezekből kitűnik, hogy a disszertációban bemutatott modellrendszer mellett törekvése új fehérjeszerkezeti kutatási témák művelése, ami magába foglalja a fehérjék és gyógyszermolekulák közötti kölcsönhatások és a farmakológiai hatásmechanizmusok feltárását is. Úgy tűnik, hogy a téma kidolgozása már elnyert, jelentős támogatások által biztosított.

Összegezve, Málnási-Csizmadia András doktori értekezésének nyilvános vitára történő kitűzését, továbbá a disszertáció elfogadását és a doktori fokozat odaítélését feltétlen javaslom.

Debrecen, 2009. március 9.

Dr. Erdódi Ferenc

MTA doktora

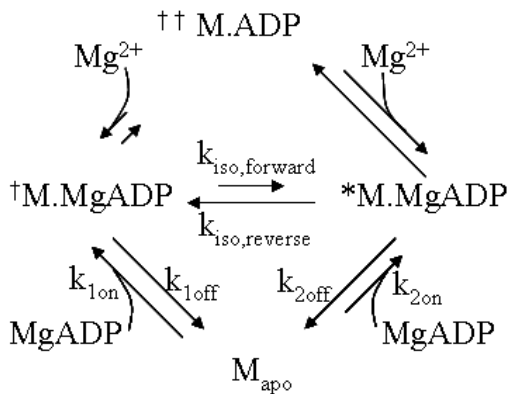
Válasz Erdődi Ferenc professzor úr MTA doktori dolgozatom bírálatára

Bírálómnak köszönöm a méltatásokat és a kritikai megjegyzéseket. Ugyancsak köszönettel tartozom az 5 pontban összefoglalt, a dolgozat olvasása közben felvetett gondolatokért, amelyekre az alábbiakban válaszolok, ahol tudok, illetve ahol nem tudok, ott újabb gondolatokkal próbálok azokat kiegészíteni.

1. A dolgozat kereteit szétfeszítette volna, ha részleteiben feltárom, hogyan jutottunk el a nukleotidkötés mechanizmusának kvantitatív modelljéhez, amelyet a nukleotid kötőzseb melletti szenzorok által érzékelt folyamatok révén állítottunk fel. Hangsúlyozom – amint azt a dolgozatban is megtettem – hogy a közölt modell egy lehetséges interpretációja a kísérleti eredményeknek, és tettünk bizonyos elhanyagolásokat. Mindazonáltal egy olyan modell mellett tettük le a voksot, amely kevés lépésből áll, és jól érzékelteti azt, hogy egy elsőrendű folyamat (konformációs átalakulás) révén válik az ATP kötés erőssé, valamint a folyamatban nem csak szekvenciális, hanem párhuzamos reakcióútvonalak is vannak. Ezek a feltételek mindenképp állnak, még akkor is, ha – a jobb kísérleti illeszkedés miatt – újabb reakciólépésekkel egészítjük ki a sémát. A levezetést a következő két cikkben lehet megtalálni: Kovacs M, Malnasi-Csizmadia A, Woolley RJ, Bagshaw CR. J Biol Chem. 2002 Aug 9;277(32):28459-67. és Conibear PB, Malnasi-Csizmadia A, Bagshaw CR. Biochemistry. 2004 Dec 14;43(49):15404-17, illetve Dr Kovács Mihály PhD dolgozatában, amely dolgozat témavezetője én voltam (a dolgozat ezen részét a bírálat mellékleteként csatolom). Ahogy a dolgozatomban írtam, a levezetést hárman, Kovács Mihály, Clive Bagshaw és én készítettük el 2002-ben.

Azzal a megjegyzéssel, hogy a reorientációs modell spekulatív jellegű egyetértek, és a dolgozatban ezt a vonatkozást valóban nem hangsúlyoztam ki megfelelő mértékben.

2. Régi és az egyik legizgalmasabb kérdés, hogy a nukleotid kötés hogyan függ össze a Mg^{2+} kötéssel. Régebbi elképzelések szerint a Mg^{2+} mindvégig kötve marad az ADP-hez, ami azt jelenti, hogy a két molekula együtt távozik a miozinról. Ezt arra a kísérletre alapozták, hogy a MgATP-vel leszorított MgADP disszociáció sebességi konstansa ugyanakkorának bizonyult, ha a leszorítást EDTA-val végezték ($2s^{-1}$). Ezt a kísérletet azért tudták elvégezni, mert az ADP kötés nyúl miozin II-n sokkal gyengébb, mint a MgADP kötés. Dictyostelium miozin II esetében azonban ez nincs így, ezért a Mg^{2+} és az ADP kötés/disszociáció kapcsoltságát itt jobban lehet vizsgálni. Kutatásainkban erre a kérdésre nem fókuszáltunk mélységeiben, azonban eddigi eredményeink és az atomi szerkezetek számos kérdést új megvilágításba helyeznek. Szerkezetileg az ATP és az ADP miozin másképp köti a Mg^{2+} iont, mert előbbiben a Mg^{2+} iont a γ és a β foszfát köti $80 \mu M$ disszociációs állandóval, míg utóbbi esetben a β és az α foszfát csoport köti azt majdnem egy nagyságrenddel gyengébben. Ennek az a következménye, hogy fiziológiás Mg^{2+} koncentrációnál ($\approx 2mM$) a miozinban az ATP $>95\%$ -a Mg^{2+} kötött, míg ADP esetében ez az arány $\sim 70\%$. Tehát a Mg^{2+} és a nukleotid kötés részben független egymástól, és ennek fiziológiás jelentősége is lehet. Másik oldalról az alábbi modell, ami a dolgozat 3. és 4. sémájának egyesítése, jól mutatja, hogy a két kötés mechanizmusa eltérő: míg a MgADP kötés/disszociáció két útvonalon is létrejöhet, addig az általunk vizsgált miozinban a Mg^{2+} számára az egyik útvonal gyakorlatilag blokkolt. Természetesen más miozinokban elképzelhető a sebességi állandók olyan kombinációja, hogy a két anyag kötése egy kísérlet során szorosban kapcsoltnak tűnik, azonban ez nem változtat azon a tényen, hogy a két folyamat részben független egymástól.



3. A dolgozatban valóban nem fejtettem ki ezeket az összefüggéseket részleteiben. Kutatásaink nyomán azonban számos csoport foglalkozott ezzel a kérdéssel más miozinokon, hasonló technikákkal mint amiket mi alkalmaztunk. Simaizmon C. Berger csoportja, miozin V-ön H.White és L. Sweeney, harántcsíktolt miozin II-n T. Burghardt illetve J. Wray munkacsoportjai végeztek ilyen vizsgálatokat, és az általunk lefektetett modellt erősítették meg. Ezek a vizsgálatok mind nem regulált miozin formákon vagy bekapcsolt állapotú formákon történtek. A Ca^{2+} reguláció kérdése véleményem szerint kinetikailag még tartogathat meglepetéseket.
4. Teljesen egyetérték azzal, hogy megfogalmazásom arról, hogy mikor elfogadható még egy riporter csoport által okozott perturbáció - pongyola volt. Véleményem szerint ez nem a sebességi állandók megváltozásán keresztül dönthető el, hanem az adott mérésben a tudományos kérdés és a perturbációnak a mechanizmusra gyakorolt hatása közötti összefüggés alapján. Kísérleteinkben ezt tartottuk szem előtt, és amennyire lehetett, próbáltuk meghatározni, hogy a perturbáció a vizsgált folyamatra kruciális hatással volt-e (vagyis még mindig azt vizsgáltuk-e a mutáns molekulával, amire a vad konstrukcióban kíváncsiak voltunk). Ilyen probléma pl. a W461+ konstrukció esetében fenn is állt, éppen ezért – ahogy azt a cikkekben és a dolgozatban is hangsúlyoztam- a W461+ mutánssal végzett kísérletekből levont következtetések óvatosan kezelendők, és indikációs jellegűek csupán, mert a F461W mutáció viszonylag jelentős perturbációt okoz a ciklus azon részében, ami az erőkarozgással függ össze. Ezt a hiányosságot Belágyi professzor úr is felvetette.
5. A dolgozat megírása óta a PR-hurokkal kapcsolatban számos új eredmény született. Egyedi mutációval bizonyítottuk, hogy a PR hurok konzervatíván jelenlévő pozitív töltésű aminosav oldallánca közvetlen kapcsolatba kerül az aktin negatív töltésű N-terminálisával (ez az N-terminális nem látszik a kristályszerkezeten). Egy elfeledett cikk Emil Reisler csoportjából ugyancsak a segítségünkre szolgált: ők az aktin negatív töltéseit eliminálták mutációkkal, és ugyanarra az eredményre jutottak mint mi: a mutáns aktomiozin minden tulajdonsága – beleértve a motilitást – megegyezett a vad típuséval, kivéve azt, hogy a mutáns aktin nem aktiválta a miozin ATPáz aktivitását (Biochemistry (1996) 24;35:16557-62). Abban az időben a szerkezetek hiánya miatt nem tudták megfelelően interpretálni eredményeiket, ezért merültek „feledésbe” ezek a cikkek. Az eredmények alapján az aktin aktiváció mechanizmusát a következő három pontba tudom összefoglalni: 1. A miozin sebességhatározó lépése nem a foszfát felszabadulás, hanem az azt megelőző erőkar elmozdulás (*reverse recovery step*, ami analóg az erőkar lecsapással aktin jelenlétében) 2. Az erőkar lecsapás (munkaütem) a miozin azon állapotában iníciálódik, amelyben gyengén kötődik az

aktinhoz. Ez a lépés annak ellenére az aktinkötött formában játszódik le, hogy termodinamikailag kedvezőtlen, azonban az aktin által felgyorsított erőkar lecsapás lépés ebbe az irányba húzza a folyamatokat. 3. Az aktin az enzimatis ciklust a relé/erőkar szerkezeti egység mozgásának akcelerációjával gyorsítja fel azáltal, hogy az aktin N-terminálisa gyenge aktinkötött állapotban kötődik a PR-hurokhoz, amely a relé régió egyik központi eleme.

Az aktinkötés lépésről lépésre erősebb lesz az erőkar lecsapás kezdeti állapotától a termékek felszabadulásáig. Ebben nagy szerepe van a miozin egyéb aktinkötő régióinak és annak, hogy eközben a miozin aktinkötő árka bezáródik, és ezáltal a felső 50kDa domén aktinkötő régiói hozzáférhetővé válnak az aktin számára. Jelenlegi kutatásunk egyik prioritása, hogy feltárjuk, hogy a gyenge és erős aktinkötő állapotok közötti átmenet hogyan viszonyul a miozin munkaüteméhez.

Köszönöm Erdődi professzor úr mélyenszántó kérdéseit, és azt hogy ezeken keresztül lehetőséget kaphattam arra, hogy elképzeléseimet pontosítsam és fókuszáltabban fejthessem ki.

Őszinte tisztelettel,

Málnási-Csizmadia András, jelölt,

Budapest, 2009. március 28.

Melléklet

A melléklet Dr Kovács Mihály PhD dolgozatának részlete (55-65. oldalig).