



Dr. Makai Mihály, az MTA doktora
Titkár
Magyar Tudományos Akadémia
Doktori Tanács
1051 Budapest V. Nádor u. 7.
Tel.: 1-411-6286
Fax: 1-411-6233

Bírálati vélemény

Nagy Péter „Az ErbB fehérjék klaszterizációjának biofizikai karakterizálása és biológiai jelentősége”
című MTA doktori dolgozatáról

Örömmel olvastam végig Nagy Péter dolgozatát. Nem is feltétlenül azért, mert szakterületem lenne az ErbB fehérjék vizsgálata, hanem sokkal inkább azért, mert egy koncepciózusan, nagy alaposággal és szakértelemmel, és szellemesen kutató kolléga munkájába és gondolkodásába nyerhettem bepillantást.

A pályázónak 2012 decemberéig 45 közleménye jelent meg, melyek összesített impakt faktora 171,797, és a rájuk kapott független hivatkozások száma 1581 volt (H index 20). Ezek az értékek többszörösen meghaladják mind a Biológiai Osztály, mind az osztályközi Biofizikai Bizottság által támasztott hivatalos minimum követelményeket.

Nagy Péter „Az ErbB fehérjék klaszterizációjának biofizikai karakterizálása és biológiai jelentősége” címmel nyújtotta be az MTA doktori dolgozatát. A dolgozat alapjául 12 közlemény szolgál. Ezek közül a pályázó 11-ben terminális szerző. A szerző kutatási területe, amelle, hogy őt magát is leköti immár két évtizede, jelentős hagyományokkal rendelkezik a DE Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében is. A dolgozat 132 oldalon ismerteti a szerző eredményeit, a kötet végén a dolgozat alapjául szolgáló közlemények másolatait találhatjuk. Az olvasó egy gondosan összeállított, logikusan felépített, érthetően és helyes magyarsággal megírt munkát tarthat a kezében. Nem találtam benne betűhibát, és az írás nyelvezete és stílusa is példaértékű. Formai tekintetben egy ponton érzem még javíthatónak a dolgozatot, az ábrák sok esetben túl kicsik (pl. 49., 51., 52., 70., 74. oldalakon). A rajtuk bemutatott információ kényelmesebb átadásához ezen ábrákat érdemes lett volna nagyobbra tervezni. A dolgozat elején a szerző ismerteti az ErbB fehérje családokat, az ErbB fehérjék alapvető szerkezeti elemeit, és részletesen leírja a funkciójukkal kapcsolatban eddig megismert részleteket is. Már itt világossá válik, hogy a sejtmembránon történő asszociációjuk, klaszterképzésük a különböző biológiai funkciók szerves részét képezi, és részt vesz a szabályozásukban is. Ezt követően számos megfigyelést ismerhetünk meg az ErbB fehérjék működése és szabályozása kapcsán. A dolgozat ugyancsak tartalmaz egy érdekes és forrásmunkaként is remekül használható szakaszt, amelyben bemutatja a szerző vonatkozó mérési eljárásokat.

A dolgozatban a szerző részletesen leírja azokat a kísérleteket, amelyeket az ErbB fehérjék megismerése érdekében végzett. Ezek a fehérjék fontos szerepet játszanak számos jelátviteli

folyamatban, és funkciójuk a daganatos betegségekben kimutatott összefüggéseken keresztül fontos orvosi jelentőséggel is bír. Tekintve, hogy a biológiai szerepük megvalósítása során, elsősorban is a szabályozásuk révén, a klaszterképzésük központi szerepet kap, a szerző szellemes kísérletei hatékony eszköznek bizonyultak a központi jelentőségű biológiai kérdések tisztázására. Az elvégzett kísérletek bemutatása pontos és jól érthető, az eredmények értelmezése szabatos.

A dolgozat első felében, a korábban alkalmazott módszerek leírásból kiderül az is, hogy ezen módszerek korlátai, valamint a felvetett tudományos kérdések természete miatt szükségessé vált új eljárások kidolgozása is. A szerző külön fejezetben mutatja be azon módszertani fejlesztéseit és eredményeit, amelyek segítségével a sejtfelszíni klaszterek jellemzése kvantitatív, pontosabbá és részletesebbé válik. Az ebben a részben bemutatott eljárások értelemszerűen nem ErbB specifikusak, azaz más fehérjerendszerek vizsgálata során is jól alkalmazhatóak lesznek.

A dolgozat megismerése után a szerző saját tudományos eredményeit a következőkben látom:

1. A szerző fontos megfigyeléseket tett az ErbB receptorok lokalizációját és működését illetően. Igazolta, hogy az ErbB fehérjék lipid tutajokban helyezkednek el, és hogy a receptorok a nagyobb klaszterekben a klaszterek perturbációjával is aktiválhatóak.
2. Megmutatta, hogy az ErbB 1 ligand indukálta internalizációját az ErbB 2 gátolja, míg ezen folyamatra az ErbB 3-nak nincs hatása.
3. Ismertette a trastuzumab rezisztencia egy új mechanizmusát (MUC4 és hialuronsav vizsgálatok), amely az ErbB maszkírozásán keresztül valósul meg.
4. Igazolta, hogy az ErbB 1 expresszió gátlása apoptózishoz vezet a receptort fokozottan kifejező sejtekben.
5. Megmutatta, hogy az elisidepsin hatását a sejtek ErbB expressziója nem befolyásolja, és hogy ez a hatóanyag lipid tutajokon keresztül fejti ki a hatását.
6. Speciális – a FRET jelenségének alkalmazásán alapuló – citometriai eljárásokat dolgozott ki a sejtfelszíni klaszterek tanulmányozására.

A dolgozat olvasása során a következő kérdések merültek fel bennem:

1. A dolgozat megismerése után az mindenképpen világossá válik az olvasó számára, hogy mind a klaszterképződés kinetikája, mind a kialakult klaszterek mérete fontos biológiai funkcióval rendelkezik. A klaszterek ilyen tekintetben történő jellemzésére a pályázó számos érdekes és hatékony, sokszor FRET alapú módszert ismertet és használ. Az alkalmazott logika szerint (pl. a homotranszfer mérésekben) a donorral és akceptorral megjelölt szomszédos fehérjék fluorofórai között energia transzfer jön létre, ami aztán láncszerűen is terjedhet. Az alkalmazott modell szerint a közvetlen szomszédokon túlra már nem transzferálnak a donorok. Ez nyilván igaz is lehet az adott R_0 értékének ismeretében. A FRET ugyanakkor – ellentétben a dolgozatban többször felbukkanó állítással – nem feltétlenül a 2-10nm távolság tartományban hatékony. Sokkal inkább érdemes a hatótávolságot az adott R_0 -hoz viszonyítva meghatározni (pl. annak a fele és másfél szerese között, bár még ez is nyilván csak közelítő állítás). Ennek megfelelően egy nagyobb R_0 -al rendelkező rendszerben elvégzett mérés értelemszerűen más adatokat ad, mint egy rövidebb R_0 -al kivitelezett vizsgálat. Érzésem szerint a kétféle mérés eredményeinek eltérése információt hordoz mind a klaszter méretét, mind a klaszter összetételét illetően, azaz a látszólagos távolságeloszlások meghatározásával jellemezhetőek a klaszterek. Van-e

létjogosultsága egy olyan FRET alapú mikroszkópai eljárásnak, amelyben a sejtfelszíni klaszterek jellemzéséhez az alkalmazott fluorfór párok R_0 értékeinek az eltérése szolgál alapul? Esetleg történtek-e olyan vizsgálatok, ahol az R_0 értékének különböző megválasztásával, de egyébként azonos kísérleti elrendezésben mért a pályázó?

2. A homotranszfer mérések során – felételezve a FRET-el szétterjedő energiát – a méréseket a fluoreszcencia emissziós anizotrópia meghatározásával valósították meg. Nem értettem meg ebben a szakaszban, hogy a fluoreszcencia élettartam miért nem alkalmas a kialakuló FRET hatásfokának a meghatározására (az intenzitás mérés esetében a hasonló állítást érteni vélem). Én úgy látom, hogy ebben az esetben is rövidülnie kellene a donorok élettartamának. Hol tévedek?
3. Érintőlegesen a szerző is foglalkozik azzal, hogy a sejtfelszíni ErbB klaszterizációban, és talán a lipid tutajok szerveződésében is szerepe van vagy lehet a citoskeleton egyes elemeinek (pl. 18 oldal 4. pont). Mennyiben ismertek ezek a szabályozási kapcsolatok? Milyen citoskeletonális komponensek játszanak szerepet abban, hogy a sejtfelszíni fehérje asszociátumok kialakulnak, méretük változik, illetve hogy ezek mozognak és kölcsönhatnak egymással és más komplexekkel? Itt elsősorban a citoskeletonális filamentumok, esetleg membrán asszociált citoskeletonális fehérjék, vagy motor fehérjék szerepe domborodik ki? Milyen mérések vezethetnének a háttérben húzódó molekuláris mechanizmusok és kölcsönhatások pontosabb megértéséhez?
4. A 41. oldalon a 21. képlet nem egy egyenlet. Hogyan történt ezzel az összefüggéssel az illesztés?
5. Az Eredmények fejezet elején a szerző ismerteti azokat az eljárásokat, amelyekkel a citometriás FRET módszerek alkalmazását megbízhatóbbá és pontosabbá tette. A 49. oldalon bemutatott eredmények CFP-YFP fúziós fehérjékre vonatkoznak. A vonatkozó kérdésem technikai jellegű: ezekben a mérésekben megkapnánk a nulla energia transzfert abban az esetben, ha a YFP-t és CFP-t pusztán összekevernénk, mindenféle molekuláris kapcsolódás nélkül?
6. A jelölt esetenként olyan különböző hosszúságú peptideken mért FRET-et, amelyekhez donor és akceptor is kapcsolódott (tipikusan CFP és YFP). Volt-e olyan peptid konstrukció, vagy lenne-e értelme a használatának, amelyben a két fluorofór között még egy enzimátikus hasító hely is beépülne, és a mérések során így a két fluorofór egymástól eltávolíthatóvá válna?
7. Kifejezetten elgondolkodtatónak találtam az 52. oldalon a 6. ábrát. Az ábra szép mérési eredményeket mutat be, és alátámasztja a szerző azon következtetését, hogy a donor koncentrációjának növelésével mért átlagos FRET hatásfok nem módosul (B panel). Az ábrán ugyanakkor értelmezésem szerint az izo-FRET vonalak a FRET hatásfok eloszlását is bemutatják. Ezek szerint a kisebb donor intenzitásokon, azaz kisebb donor koncentráció mellett mérve a FRET hatásfok eloszlása viszonylag széles, míg a magasabb koncentrációk mellett az eloszlás kifejezetten keskenyvé válik. Ezt jól látom? Mi ennek az oka? Hogyan módosul a klaszterképződés ha növelem a résztvevő fehérjék koncentrációját? Változik



esetleg a klaszterek sűrűsége is? Általánosabban fogalmazva, milyen folyamatok játszódnak le a koncentráció emelésével a FRET hatásfok növekedése, illetve csökkenése irányában?

8. A klaszterek méretének karakterizálásakor a szerző felteszi, hogy az ErbB vagy monomer állapotában van jelen, vagy egy adott méretű klaszterben helyezkedik el. Ez egy közelítés, ami gondolom elsősorban azért volt fontos, hogy a kiértékelés ne bonyolódjon nagyon el. Ugyanakkor a valóságban a klaszterek mérete inkább egy folytonos eloszlást mutatna. Lát-e a szerző lehetőséget a modell ilyen irányban történő bővítésére, kiterjesztésére?
9. Nem találtam olyan fejezetet a dolgozat végén, ahol a kutatások jövőjét egyfajta kitekintésként a jelölt ismertetné. Kíváncsi lennék ugyanakkor arra, hogy ez a remek kutatássorozat milyen irányban fog továbbfejlődni, milyen aspektusok módszerfejlesztések és biológiai vizsgálatok jelentik majd a továbblépést.

Mindezen kérdéseim és felvetéseim pusztán azt tükrözik, hogy az olvasmány magával ragadott és továbbgondolásra késztetett. Nagy Péter eddigi munkásságát, céltudatos, alapos és ötletes kutatásait nagyra értékelem. A saját eredményekként bemutatottakat elfogadom jelentős új tudományos eredményeknek.

A nyilvános vita kitűzését és az MTA doktori cím Nagy Péter számára való megítélését javasolom.

Pécs, 2013. április 6.

Dr. Nyitrai Miklós
Egyetemi tanár, az MTA doktora
PTE ÁOK Biofizikai Intézet