

„Művészetben és tudományban csakúgy, mint tetteinkben s cselekedeteinkben mindig az a lényeg, hogy a tárgyat tisztán ragadjuk meg és természetének megfelelően kezeljük.” (Goethe)

Opponensi vélemény

Dr. Nagy Péter

Az ErbB fehérjék klaszterizációjának biofizikai karakterizálása és biológiai jelentősége

Nagy érdeklődéssel vettem kezembe Nagy Péter dr. disszertációját. Egyben nagy megtiszteltetésnek is érzem, hogy egy biofizikai-sejtbiológiai akadémiai doktori disszertáció véleményezésére alkalmasnak véltek engem, aki gyakorló patológus vagyok, és a malignus daganatok növekedési faktor receptor expressziójának kérdéseit egy egészen más vetületből látom és ismerem.

Az utóbbi években elmosódik a tudományterületek határa, ezt patológusként magam is átélem: a patomorfológia és a molekuláris biológia mára szorosan összefonódó, el nem választható tudományterületté váltak. Ugyanígy, a biofizika és a molekuláris sejtbiológia határa sem vonható már meg élesen, összekapcsolódásuk a sejt funkcióinak magasabb szintű tudományos megközelítését, a sejt felszínén és belsejében zajló folyamatok jobb megértését teszi lehetővé és vonja maga után.

Nagy Péter dr. disszertációja ennek az utóbbi években zajló óriási szemléletváltozásnak és e szemléletváltozás eredményességének tanúságtétele.

A disszertáció akár egy teljes kutatói pálya életmű-szerű összefoglalása is lehetne, de Nagy doktor mindössze szűk 10 év alatt végzett kutatásai publikált eredményeit foglalja össze ebben a munkában.

Magyar nyelven írt 132 oldalas és 250 irodalmi hivatkozást felsorakoztató munka, amely mellett csatolva találjuk a Jelölt 12 angol nyelven, igen rangos folyóiratokban közölt, 5 első-, 1 második- és 6 utolsó szerzős közleményét, amelyek a disszertáció alapjául szolgáltak. A közleményeket a disszertációban a megjelenésük szerint időrendi sorrendben csatolta.

A disszertáció bevezetésében részletes és plasztikus leírást kapunk az epidermális növekedési faktor receptor család tagjainak működéséről, az ErbB családba tartozó receptorok homo- és heterodimereinek pontos működéséről, az asszociátumok hatékonyságáról, az általuk aktivált jelátviteli útvonalakról, amelyek között a gyakorló orvosok számára kevésbé ismert jelátviteli útvonalak leírása is szerepel. Megismerjük ezen receptorok gátlásának mechanizmusait és lehetőségeit, onkológiai szerepüket. Kiemelten foglalkozik a trastuzumab rezisztencia kérdésével, hiszen e disszertáció szerzőjének nevéhez fűződik humán sejtvonalon két fontos rezisztencia mechanizmus leírása is: a Her2 receptor MUC4 ill. a CD44 ligand hialuronsav általi maszkírozása.

A sejtfelszíni receptorok komplex működésének további, elsősorban fiziko-kémiai folyamatokon alapuló mechanizmusait is megismerjük, elsősorban a sejtmembránokban található ún. lipid-tutajok, kisméretű aggregátumok és ún. „karók” tulajdonságait ismerteti. Ezen mechanizmusok részletes ismerete szükséges ahhoz, hogy a receptor dimerizáció nagyon bonyolult folyamatát jobban megérthessük, ugyanakkor ezen a ponton is a Szerző egy nagy jelentőségű felismerését kell hangsúlyozni: az ErbB-1-ről korábban már ismert volt a lipid tutajokkal való kapcsolata, de az ErbB2-ről e disszertáció szerzője mutatta ki, hogy ugyancsak a membrán ilyen nagyságrendű mikrodoménjeivel áll kapcsolatban.

A kutatások során a sejtmembránban zajló fiziko-kémiai folyamatok mérésének és képi megjelenítésének kivételesen széles tárházát alkalmazta, a molekuláris folyamatok és kölcsönhatások számos aspektusára kiterjedő, és éppen ezért nagyon hiteles módszereket párhuzamosan alkalmazva jutott el végül igen jelentős eredményeihez. A kísérletei során saját fejlesztésű számítógépes programokat is használt az összehasonlító értékelésekhez.

Kutatásai során két nagy célt tűzött ki maga elé: az epidermális növekedési faktor receptorok klaszterizációjának részletes megismerését, beleértve olyan új módszerek kidolgozását is e jelenség vizsgálatára, amelyek segítségével pontosabb képet kaphatunk a klaszterizáció folyamatáról. A másik célkitűzés pedig a terápiás vonatkozások, részben a célzott terápiával szembeni rezisztencia, részben a trastuzumabtól eltérő hatásmechanizmusú célzott szerek hatékonyságának elemzése.

A kísérleteket emlőrák sejtvonalakon és SCID egereken, xenograft tumor modellben végezte. Mint az előzőekben próbáltam érzékeltetni, a vizsgálatokat sokszorosan ismételve, igen bonyolult módszereket alkalmazva végezte, ugyanazt a jelenséget számos szemszögből, számos módszerrel közelítve meg. A disszertáció rendkívül precíz, a biológiai folyamatok összetettségét mindig szem előtt tartó módszerek leírását, sok esetben a módszernek magának a kidolgozását is tartalmazza. Ezért is, a jövő biofizikus vagy biológus kutatói számára – többek között - megkerülhetetlen forrásmunka.

Eredményeit és ezek rövid diszkusszióját 20 pontban ismerteti, itt csak röviden összefoglalva azokat sorolom fel, amelyek véleményem szerint a legnagyobb jelentőségűek.

- (1) Munkacsoportjával kidolgozott két áramlási citometriás módszert, melyek kvantitatív FRET méréseket és a fluoreszcensen jelölt fehérjék homoklaszterizációjának kvantitatív jellemzését teszik lehetővé.
- (2) Kidolgozta a heteroklaszterizáció kvantitatív jellemzésére alkalmas FSAB módszert, amely konfokális mikroszkóp felhasználásával az egymással kölcsönható receptorok arányának meghatározását teszi lehetővé.
- (3) Új módszereit alkalmazva leírta az ErbB receptorok dimernél magasabb szervezettségű hierarchikus klasztereit és ezek pontos biológiai szerepét e receptorok működésében.
- (4) Elsőként írta le a trastuzumab rezisztencia korábban nem ismert mechanizmusát, az ErbB2 receptor gyógyszer kötőhelyének MUC4 és a hialuronsav általi maszkírozását.
- (5) Felismerte a CD44 és az ErbB receptorok szoros biológiai kapcsolatát, amennyiben ezek funkcionális molekuláris komplexeket képeznek, ezért a hozzájuk kötődő ligandumok az egész komplex működését befolyásolják. Ezzel az ErbB ellenes célzott gyógyszerek hatásmechanizmusának egy új vetületét tárta fel.
- (6) Megállapította, hogy ErbB1 overexpressziót mutató sejtekben az expresszió RNS interferencia segítségével történő gátlása apoptózishoz vezet.
- (7) Kutatási eredményei potenciális terápiás lehetőségeket vetítenek előre: i) a fehérje asszociációk magasabb szintjeinek strukturális megbolygatása megakadályozhatja a receptorok aktivációját, ii) a trastuzumab rezisztencia felfüggesztése a maszkírozó molekulák gátlása által, iii) specifikus siRNS felhasználása ErbB1 overexpresszió gátlására.

Ezek a nagyon röviden felsorolt eredmények véleményem szerint önmagukért beszélnek, és nem hagynak kétséget afelől, hogy e disszertáció szerzője maximálisan érett és feltétlenül méltó az akadémiai doktori cím elnyerésére, ezért a magam részéről a legmesszebbmenőkig támogatom és javaslom Dr. Nagy Péter doktori értekezésének nyilvános vitára bocsájtását és számára az akadémiai doktori fokozat odaítélését.

Az opponens munkájához hozzátartozik kritika megfogalmazása is a munkával kapcsolatban, ami jelen esetben komoly nehézségekbe ütközik, ezért itt csak a nagyon kevés, és a disszertációra egyáltalán nem jellemző apró pontatlanságokat sorolom fel.

A 44. oldalon a CD 44 intramembrán proteolízis kvantitatív analízisét leíró szövegrészben a 2.9 pontra hivatkozik vissza, ami helyesen a 3.9 pont.

A 76. oldalon a 25. ábrán szereplő CLSM és SNOM rövidítések a disszertáció elején megadott Rövidítésjegyzékben nem szerepelnek.

A 81. oldalon kevésbe íródott kevésbé helyett.

A 98. oldalon szereplő 40. ábra aláírásában először tévesen hivatkozik az A ábrára, ami nem mikroszkópos kép, hanem a B és C mikroszkópos képek kvantitatív analízisének eredményét bemutató grafikon.

A 102. oldalon a 43. ábrán az alsó grafikonon nem derül ki a fehér és fekete oszlopok jelentése az ábra aláírásából. Ez az eredeti cikkben szerepel, és ott teljesen egyértelmű.

A 103. oldalon a színes ábrán a képaláírásban hivatkozott „lila terület” nem jól látható, ez az eredeti közlemény csatolt másolatában viszont tökéletesen látszik.

Egy helyen fordul elő az angol szövegből kicsit sután magyarázott kifejezés: „nem kompetáló”; „non-competing” vagy „nem versengő” kifejezések bármelyike talán érthetőbb, közismertebb.

Az Anyag és Módszer fejezetben folyó szövegben szerepelnek a kísérletekhez felhasznált reagensek, anyagok, hígítások. Ugyanúgy, ahogy a sejtvonalak táblázatos formában kerülnek bemutatásra, talán ennek a résznek a táblázatos formában történő bemutatása is áttekinthetőbb lett volna.

Kérdések:

1. A Szerző által ismertetett módszereken kívül az utóbbi években jelennek meg közlemények a Nanopipette, atomic force microscopy, scanning ion conductance microscopy, dynamic single molecule co-localisation módszerekről, amelyek segítségével egyes sejtfelszíni molekulák térbeli helyzetét, működésük közben, ill. aktivációjukat követően bekövetkező konformális-, vagy kémiai szerkezetükben bekövetkező változásait láthatóvá lehet tenni. A Jelöltéhez hasonló célból végzett vizsgálatok ezekkel az eszközökkel vajon mennyiben hozhatnak további eredményeket a disszertációban leírtakhoz képest?
2. Mi az oka annak, hogy intraperitoneálisan oltották a kísérleti állatokat trastuzumabbal? Klinikai körülmények között intravénás vagy subcután adagolást használnak, ezért felmerül a kérdés, hogy vajon a modellkísérletben észlelt hatás mennyire vonható párhuzamba a humán gyakorlattal?
3. Humán emlődaganatok vizsgálatakor az utóbbi időben egyre inkább előtérbe kerül a heterogenitás, mint a daganat egyik alapvető biológiai tulajdonsága. Ebből a szempontból a 2005-ben publikált Cancer Research cikk diszkussziójában a JIMT-1 sejtekkel kapcsolatban felvetett „molekuláris evolúció”, amelynek során – elvben - a kezdeti ErbB2 overexpressziót ezen molekula hatékonyságának elvesztéséig lehet követni, korát megelőző gondolat. A heterogenitást és ennek biológiai következményeit mennyire lehet észlelni és vizsgálni sejtvonalakon?
4. A JIMT-1 sejtvonal molekuláris genetikai karakterizálása rávilágított arra, hogy egyidejűleg Her2+ és basalis csoportra jellemző molekuláris genetikai eltéréseket hordoz: Her2 gén amplifikáció mellett PIK3CA aktiváló mutációja, PTEN alacsony szintje, neuregulin1 fokozott expressziója is jellemzi. Vajon a trastuzumab

rezisztenciában ezek az eltérések mennyiben játszottak szerepet a MUC4 maszkírozáson kívül?

5. Véleménye szerint a trastuzumab vagy más hatásmechanizmusú ErbB2 ellenes molekulárisan célzott szer hatását befolyásolja-e az, hogy az ErbB2 milyen heteroasszociátumban van jelen a daganatsejtek felszínén?
6. Vita tárgya az irodalomban az emlőtumorok egy részének K-ras mutáció hordozása. A Jelölt által vizsgált sejtvonalak között volt-e olyan sejtvonal, amely ezt a mutációt hordozta, és ha igen, ez a gyógyszeres kísérletekben észlelt jelenségeket befolyásolta-e?

Budapest, 2013. március 25.

Dr. Kulka Janina PhD
egyetemi tanár