

## **MTA doktori pályázat téziseinek bírálata**

*Laczka Csilla: A sejtmembrán gyógyszertranszporterei: módszerfejlesztéstől a szerkezet-hatás vizsgálatokig*

Laczka Csilla „A sejtmembrán gyógyszertranszporterei: módszerfejlesztéstől a szerkezet-hatás vizsgálatokig” címmel nyújtotta be MTA Doktori pályázatát, összefoglalva az ABCG2-vel és az organikus anion transzporter polipeptidekkel kapcsolatos eddigi kutatási eredményeit. Ez utóbbi kutatási irány Laczka Csilla vezetésével indult el az intézetben, amit több utolsó szerzőként jegyzett publikáció is jelez. A doktori mű 16, kivétel nélkül első vagy utolsó, tehát meghatározó szerzős közleményre épül.

Az ABCG2 az ABC szuperfamilia egyik igen érdekes transzportere, és tudomásom szerint az ABCB1 mellett az egyetlen másik, melyre specifikus konformáció-érzékeny antitest áll rendelkezésre, ami közvetlenül vizsgálhatóvá teszi a katalitikus ciklus során bekövetkező konformáció változásokat. A transzporter raft-lokalizációja a sejtmembrán laterális organizációjának jelentőségét is vizsgálhatóvá teszi általa. A Szerző munkásságának a tézisekben bemutatott egyik része tehát ezzel a transzporterrel, annak szubsztrátkötését meghatározó térszerkezeti aspektusokkal, a koleszterin szerepével ill. az antitest kötődésének jellemzésével kapcsolatos. A gyógyszerek szerkezetbeli sorsát meghatározó tényezők, az ADME-Tox membrán transzportereket magába foglaló tárgyköre eddigi hazai lefedettségéből a 48 ABC transzporterrel kapcsolatos tudásbázis mellett hiányzott a még 10x népesebb SLC család ADME-Tox szempontból legfontosabb OATP tagjaira vonatkozó kísérleti-tapasztalati és gondolkodási kultúra. A Szerző ennek a kritikus tömegét teremtette meg munkatársaival, és az ezzel kapcsolatos megfigyeléseit foglalja össze a tézisek második részében.

A disszertáció lényegre törő, világos szerkezetű, jól megírt dolgozat, magán hordozza a Sarkadi - Váradi iskolára jellemző professzionalitást, mértéktartást és a gyakorlati hasznosíthatóság előtérbe helyezése jegyeit. A disszertációból nem csak a területen világszerte folyó intenzív kutatás legfontosabb eredményeit ismerhetjük meg, hanem a tudásunk határait, a megoldatlan kérdéseket is.

A tézisek irodalmi áttekintése két részre tagolódik: az ABCG2 és az OATP-k által reprezentált kettős fókuszra megfelelően a területek tömör, lényeglátó áttekintését tartalmazza. A Célkitűzések után a Módszerek rész tartalma elegendő az eredményekben mutatott kísérletek lényegének megértéséhez, de egyes részletek szükségszerűen vázlatos tézisekbeli bemutatása alkalmat ad az opponensnek, hogy az eredmények némelyikével kapcsolatosan kérdéseket vagy kételyeket fogalmazzon meg. Az Eredmények első része az ABCG2 egy mutációs forró pontjával, koleszterin-szenzor régióival, gyakorlati szempontból igen fontos szubsztrát kölcsönhatásaival és az 5D3 antitest kötődésével kapcsolatos adatokat tekinti át. Az Eredmények másik része az OATP-kre fókuszál, egy, mind az alapkutatásban, mind az ADME szempontjából igen jól használható metodikai apparátus kifejlesztéséről számol be és több, gyakorlati fontosságú transzporter-gyógyszer kölcsönhatás felfedezéséről is számot ad.

Ezt követően Új tudományos eredmények összefoglalása c. tömör áttekintés segíti azok felidézését, a Következtetések és Kitekintés c. fejezetben való elmélyülést jól szolgálva. A diszertáció ez után, immár a 107. oldalon, a felhasznált saját ill. idézett egyéb közlemények listájával folytatódik. A dolgozat témájában Szerzőnek két benyújtott szabadalma van, ezek is az előbbiek között szerepelnek.

Az alábbi kérdésekkel és észrevételekkel kívánok Jelöltnek további lehetőséget adni kutatói kvalitásainak minél teljesebb demonstrálására.

1. Gyakran alkalmazta a H342 festéket, mint ABCG2 szubsztrátot. A mérések – a vázlatos metodikai leírás alapján – a steady-state intracelluláris fluoreszcencia intenzitás regisztrációját jelentették, tehát nem szolgáltathattak kinetikai adatokat. A festék felvétele szokatlanul meredek hőmérséklet-függést és, ettől függetlenül, éppen a neutrális tartomány körül pH-függő aggregáció által meghatározott self-quenching jelenséget mutat. A módszertani fejezetből vagy az eredmények interpretációjából nem tűnt ki, hogy ezekre a tényezőkre figyelemmel voltak-e a kísérletek során. A H342 felvétel membránon keresztüli felvételében specifikus membrán lipidekkel való kölcsönhatások játszhatnak szerepet, ami az ismert, drámai transzport sebesség váltást magyarázhatja a gél-szól átmenet során. Mindezek miatt a 14. ábrán mutatott kísérletekben, a koleszterin kivonásának hatása a transzport aktivitásra a festékfelvétel membrán lipid összetétel-függő voltával is, nem csak az ABCG2 aktivitásra kifejtett koleszterin hatással magyarázható lehet. További, ezzel a módszerrel kapcsolatos felvetés: azt tudhatjuk, hogy a ciklodextrin esetleg nem hat-e kölcsön a festékekkel?

2. Az Sf9, stb. sejteken mért transzport aktivitási adatok interpretációját *általában is* kicsit leegyszerűsítettnek vélem minden olyan esetben, ahol a sejteket valamilyen kezelésnek teszik ki, hiszen az nem csak a transzportert érintheti, hanem a transzport passzív folyamatának celluláris szereplőit ill. az egész sejtet, pl. az összfluoreszcenciát befolyásoló savas kompartmentumaival.

3. 15. ábra (54. o.). A bal oldali ábrarész Sf9 membránvezikulákon mért ATPáz aktivitási mérésekben alkalmazott drog koncentrációk 5-50  $\mu\text{M}$ -osak voltak, míg a jobb oldalon mutatott HEK-293-sejtes mérésekben 50-500 nM-os koncentrációk szerepelnek. Mennyire hozhatók ezek a nagyságrendileg eltérő koncentrációk mellett észlelt hatások közös interpretációs nevezőre?

4. A 20. ábrán (60 o.) bemutatott kísérletben a formaldehid ABCG2 dimerizációt okozó hatását tételezte fel és ennek alapján vizsgálta azt a kérdést, hogy a dimerizáció szükséges-e az 5D3 antitest kötődéséhez. A Western blot viszont 250 kDa körüli tömegű 5D3-reaktív molekula asszociátumot mutat, nem dimereket. A 21. ábrán is a különböző keresztköti ágensek által létrehozott asszociátumok nagyobbak a dimernél és egymáshoz képest is kissé különböznek.

5. 25. ábra (68. o.). Az Y skálák pH 5.5. és 7.4-nél a fluoreszcein esetén nagyon különböznek. Ennek mi az oka?

6. 32. ábra. (79. o.) Milyen következtetés vonható le a koleszterinnek az ABCG2 transzportra kifejtett hatásaiból a transzporter raft-lokalizációjának szerepére vonatkozóan?

7. Az 5D3 epitópját a 3. extracelluláris hurokban lokalizálta. Léteznek-e peptid-arrayken alapuló kísérletek, melyek alátámasztják vagy kiegészítik ezt a képet?

8. Az R482X pl. T, S, Y szubsztitúciók, a transzporter-szubsztrát kapcsolat befolyásolásán túl rendellenes foszforilációra teremthettek lehetőséget, ami az élő sejt vizsgálatok eredményét elvileg befolyásolhatta.

9. 8. ábra. (47. o.) Csak a koleszterin töltés hatására vonatkozó adatokat látjuk, nem mutat olyan méréseket, ahol töltetlen ciklodextrin lett volna jelen.

10. Általában a fogalmazás egyszerű, jól érthető. Az 5D3 kötődés és az ATP hidrolízis lépései közti kapcsolatot leíró paragrafus az 59. oldalon kivételt képez, a szöveg és az ábra nem tűnik teljesen kongruensnek egymással, többszöri nekifutással sem.

11. A bevezetőben említi, hogy az OATP-k csak az állatvilágban találhatók meg. Ennek az az oka, hogy az evolúcióban a kloroplasztiszok akvizíciója után jelent meg ez a géncsalád, vagy a növényi létforma valamilyen sejtbiológiai sajátosságával (sejtfal?) ezen transzporterek működés inkompatibilis? Hasonló szubsztrátok transzportját növényekben vajon mi bonyolítja? Bár látszólag elméletieskedő a kérdés, a válasz elősegítheti a nem teljesen feltárt transzport mechanizmus megértését ill. fényében az OATP-k helye a teljes ADME-Tox szereposztásban érdekes megvilágítást nyerhet.

Kutatási eredmények értékét nem pusztán a megállapítások, adatok és következtetések tömege és nyomatéka adja, hanem az általuk felvetett vagy a nyomukban feltehetővé váló kérdések is. Az előbbi kérdésekre adandó válaszoktól függetlenül

a mű alábbi téziseit fogadom el új tudományos eredményeknek:

Részletesen jellemezte az ABCG2 R482 mutációs forró pontját, megállapította, hogy annak legmarkánsabban a szubsztrátfelismerés szintjén van hatása a transzporter működésére, pl. a metotrexát egyedül a vad típus szubsztrátja, viszont a rhodamin transzport szempontjából funkcionyeréses mutánsokat azonosított. Ez nagyon érdekes megfigyelés annak fényében, hogy a ma már ismert térszerkezet szerint az aminosav direct kölcsönhatást a szubsztrátokkal nem létesít. Vagyis ezek a kölcsönhatások nem pusztán a szubsztrátkötő zseb, hanem a teljes 3D struktúra által meghatározottak.

Az ABCG2 koleszterin-kötő motívumainak feltérképezése során az LxxL szteroidkötő motívum szubsztrátfelismerésben és fehérje stabilitásban betöltött szerepét mutatta ki, ill. 3 CRAC motívumot is, melyek a fehérje működését/expresszióját befolyásolják, elmutálásuk nem okozta a koleszterin transzportra kifejtett hatásának szisztematikus változását. A mutációs vizsgálatok itt is az allosztérikus hatások jelentőségére utaltak, melyek kevésbé érthetők tetten a statikus krisztallográfiai térszerkezetekben.

Vizsgálta a konformáció-érzékeny 5D3 antitest kötődése és a transzporter működési ciklusa során zajló fő konformációs változások közötti összefüggést, megállapítva, hogy a fehérje antitest kötése a katalitikus ciklus bizonyos fázisaiban drámaian lecsökken. Megállapította, hogy a monomerikus fehérje 5D3 kötésében a 3. e.c. hurok játszik fontos szerepet.

Számos specifikus és általános OATP szubsztrátot azonosított, segítségével a transzportereket nagy mennyiségben kifejező sejteket állított elő és érzékeny, fluoreszcencia alapú eljárásokat

dolgozott ki vizsgálatukra. Ezek közül a piranin acetoxi-származéka, az “Ace” látszik legígéretesebbnek, mely “competitive counterflow” mérési konfigurációban is jól alkalmazható – az eljárás nemzetközi szabadalmaztatása folyamatban van és remélhetőleg olyan karriert fut be majd, mint ABC transzporter aktivitást detektáló elődje, a calcein-AM.

Ezeknek a munkáknak a keretében megállapította, hogy az OATP1B1 két szerves molekula kicserélésére is képes. Ezen transzporterre specifikus új inhibitorokat talált és annak egy potenciális új szubsztrátját azonosította.

Külön is kiemelem 2021-es közelményeit. Az Enzimológia más csoportjaival és a Solvo-val kollaborációban számos COVID terápiában “újrahasznosított” antivirális szer ADME-releváns transzporterekre való hatását tesztelve több esetben OATP-közvetítette gyógyszerkölsönhatásokat észleltek és ezekről a megfigyelésekről két közleményük is megjelent 2021-ben. Várhatóan ezek a jövőben a Gleevec-kel kapcsolatos munkához hasonlóan nagy figyelmet kapnak.

A jelöltnek összesen 57 publikációja jelent meg nemzetközi folyóiratban, ebből 21-nek a meghatározó szerzője volt (7 esetben első, 14 esetben utolsó szerzőként), ezek közül 19 publikációt a PhD fokozat megszerzése után jegyez. Az összes független hivatkozások száma 2823, a TKI-k és az ABC fehérjék kölsönhatását leíró közleménye kb. 300 idézetet kapott. Összesített impakt faktora 246.4, míg H-indexe 27.

Összefoglalva opponensi véleményemet, tudományos színvonala, az abban bemutatott eredmények a művet egyértelműen alkalmassá teszik a vitára, a disszertáció és annak alapjául szolgáló közlemények magas színvonala, az MTA doktori címre pályázó scientometriai adatai alapján az MTA doktora cím odaítélését javaslom.

Szabó Gábor

Debreceni Egyetem

Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

Debrecen, 2022-04-12