

Bíráói vélemény Laczka Csilla "A sejtmembrán gyógyszertranszporterei: módszerfejlesztéstől a szerkezet-hatás vizsgálatokig" című MTA doktori értekezéséről

Az értekezés szép, meggyőző munka. Arányos több értelemben is. Az egyes fejezetek terjedelme (Összefoglalás (1 old.), Irodalmi bevezető (22 old.), Célkitűzések (1 old.), Módszerek (10 old.), Eredmények és megvitatásuk (50 old), Új tudományos eredmények összefoglalása (1.5 old), Következtetések és kitekintés (11 old) mutatja a gondos szakmai bevezetést, a metodikai sokrétűséget, a munka eredményességét és helyét a tudomány szakmai fórumain. Legalább ennyire fontos, és a Jelölt szakmai magabiztosságát mutatják a sokrétű munka prezentációjának mélységét illető döntések. Az Irodalmi bevezető képet ad a state of art-ról, míg a Következtetések és kitekintés, az Eredmények és megvitatásukban részletezett munka helyét, kontextusát mutatja. Az, hogy a fejezetek közötti átmenet ilyen zökkenőmentes annak köszönhető, hogy a kísérleti munka méltó társa, integráns része a tudomány élvonalában folyó nemzetközi kutatómunkának.

A disszertációban az innovatív gondolkodás folyamatosan jelen van. Ezt mutatják a beadott szabadalmak is. A kidolgozott módszerek szolgálják az alapkutatói és az alkalmazott kutatói, elsősorban gyógyszeripari kérdésfeltevések megválaszolását. A disszertáció alapjául 16 magas impakt faktorú lapban megjelent közlemény, és 2 benyújtott szabadalom szolgál. A közleményekben a Jelölt első vagy utolsó szerző, ami jelentős hozzájárulást tükröz. A disszertációhoz kapcsolódik további 12 közlemény, amelyben a Jelölt társszerző.

Igen impresszív, hogy a téma és a labor produktivitása új megközelítéseket lehetővé tévő hazai és külföldi kollaborációkat eredményezett a kémia, modellezés és farmakológia területén,.

Összességében a biztos szakmai alapok, példásan szép tudományos építkezés és lendületes prezentáció jellemzi a disszertációt.

#### *Általános formai megjegyzések*

-A nomenklatúra használata kissé következetlen. Az ABCG2 esetén a szisztémás nomenklatura, míg az MRP2 esetén az egyik tradicionális nomenklatúra lett használva

-A saját közleményekből származó adatok / ábrák / táblázatok jól lettek beválogatva, adaptálva. De segítené az olvasást, ha bizonyos alapinformációk (pld. a 3. Táblázat esetében az ATPáz méréseknél használt aktivátor / szubsztrát) szerepelnének a lábjegyzetben.

-Néhány ábra (4. ábra az Irodalmi bevezetőben vagy a 19. ábra az Eredmények és megvitatásuk fejezetben) nem lett idézve a releváns fejezetben. Ezek összefoglaló ábrák, és a megfelelő fejezet elegendő szakmai háttérrel ad, de az olvasó rutinszerűen keresi a szövegben.

#### *Tartalmi megjegyzések és kérdések*

A kísérletes rész, és az új tudományos eredmények a Tézisek V. rész "Az új tudományos eredmények összefoglalása" sorrendjében kerülnek kommentálásra.

1., Jellemezték az ABCG2 mutációs forró pontját, és megállapították, hogy az R482, vad típusú változat egyedi, csak rá jellemző szubsztrát felismeréssel rendelkezik, és több funkcionyeréses mutánst találtak (diszkutálva a Tézisek IV.1 fejezetében).

A munka jelentőségét az is mutatja, hogy a vezető lapokban térszerkezeti vizsgálatokról publikált közlemények idézték és diszkutálták a Jelölt eredményeit.

A 3. Táblázat (disszertáció 45. old.) szerint R>K mutáns szignifikánsan különböző aktivitási profilt mutatott mint a vad típus. Mi lehet az oka ennek?

2. Az ABCG2 koleszterol-szenzor régióját felderítése érdekében több szteroidkötő motívumot vizsgáltak. Ezek a vizsgálatok három fontos tudományos eredményhez vezettek (Tézisek IV.2-3 fejezet).

a., Megállapították, hogy az LxxL szteroidkötő motívum leucinjai az ABCG2 fehérje szubsztrátfelismerését és aktivitását is befolyásolták. Szerepük lehet továbbá a fehérje megfelelő térszerkezete kialakításában.

Ezek a vizsgálatok hozzájárultak az ABCG2 fehérjében a dileucin szelepet alkotó motívum jellemzéséhez, és a munkát diszkutálják jelentős, az ABCG2 szerkezetet cryo-EM módszertannal tanulmányozó kéziratok.

b., A potenciális CRAC (koleszterinkötő) motívumok tirozinjai közül hármat azonosítottak, melyek a fehérje expresszióját, illetve működését befolyásolták.

Az eredmények, ahogy azok Következtetés és kitekintés-ben adott diszkussziója is mutatja összhangban vannak a terület eredményeivel, különösen a Y459 és a Y469 vonatkozásában. A Y413 mutánsal kapott eredmények is újak és érdekesek, mégha a kutatások fő vonulatában ez az aminosav egyelőre nem is játszik címszerepet.

A disszertáció 15. ábrájának a címében feltehetően elírás az Y431S, hiszen a fejezetben a Y413S került tárgyalásra?

A bírálóban felmerült, hogy szerencsés volt-e a Y>F mutánsok eredményeinek a Y>S mutánsokkal való egy ábrában történő prezentálása. Illetve, nem kellett volna-e minden vizsgált tirozinra a Y>F mutánst is elkészíteni?

c., Az eredmények és a későbbi térszerkezet alapján az LxxL és a CRAC motívumok nem vesznek részt a koleszterinérzékelésben, viszont közvetett (allostérikus) hatásuk nem kizárható.

3., Jellemezték egy ABCG2-t felismerő antitest (5D3) kötődését (Tézisek IV.5-6).

a., Megállapították, hogy az 5D3 konformáció érzékeny antitest, ami az ABCG2 inhibitor-kötött formáját ismeri fel, kevésbé tud kötődni az ATP hidrolízis kezdeti fázisaiban megrekedt fehérjéhez.

Az 5D3 antitest alapreagenssé, egy fontos próbává vált. A Jelölt sikeresen alkalmazta az antitestet az ABCG2 transzport mechanizmus egyes állomásainak jellemzésére.

A bíráló feltételezi, hogy a disszertáció 59. oldalán a Na-ortovanadát (Vi) 5D3 kötődést csökkentő hatása lenne a helyes megfogalmazás az 5D3 Vi kötődést "fokozó" hatása helyett?

b., Megállapítást nyert, hogy az 5D3 antitest epitópja az ABCG2 fehérje monomeren, a 3. extracelluláris hurokban van, és az epitóp rögzítésében az intramolekuláris diszulfidhíd vesz részt.

4., Többféle specifikus és általános fluoreszcens OATP szubsztrátot azonosítottak. A nátrium-fluoreszcein általános szubsztrátként lett bemutatva (Tézisek IV.7. , de kutatómunka további fejezetei is elvezettek új OATP szubsztrátokhoz).

Széleskörűen alkalmazták az Sf9-bakulovírus expressziós rendszert OATP-ék vizsgálatára. A Na-fluorescein mint egy pan-OATP szubsztrát eredeti megállapítás.

A szubsztrátfüggő gátlás OATP-ék esetében ismert jelenség. A szubsztrát-transzporter kölcsönhatások jellemzésénél összehasonlításra kerültek-e gyógyszerkölcsönhatás releváns szubsztrátokkal kapott gátlási adatok ( $IC_{50}/K_i$ ) a Na-fluoresceinnel mint szubsztráttal kapott adatokkal?

Néhány molekula, köztük a ciklosporin A fokozta az OATP1B1-mediált Na-fluorescein transzportot. Közelmúltbeli adatok alapján a ciklosporin A OATP1B1 gátló hatását az előinkubálás potenciózza. Van-e adat (irodalmi vagy saját) az előinkubálás esetleges hatásáról az OATP1B1-mediált Na-fluorescein transzportra?

5., OATP-eket nagy mennyiségben kifejező sejteket állítottak elő fluoreszcens festék felhalmozódása és a sejtek kiválogatása alapján (Tézisek IV.8).

A viabilitás festékek alkalmazása sejtek kiválogatására nagy jelentőségű úgy az alap mind az alkalmazott tudomány módszertanában. A csoport innovatív gondolkodásának kiváló példája.

6., Érzékeny, fluoreszcencia alapú, közepes áteresztőképességű módszert dolgoztak ki több OATP vizsgálatára (Tézisek IV.8).

A kifejlesztett sejtes modellek lehetőséget adtak közepes áteresztőképességű módszer beállítására. Az alkalmazott szubsztrátok között több szulfonsav is leírásra került, közöttük új szubsztrátok.

7., Kidolgozásra került az MRP2 és OATP1B1 hepatikus transzporterek együttes vizsgálatára alkalmas, fluoreszcencia alapú módszer (Tézisek IV.11).

Az OATP1B1 / MRP2 kettős transzfektált rendszer fontos kísérleti rendszer és korábban már leírásra került, ahogyan az a dolgozatban jelezve volt. A leírt, szulfopiréneket és szulforodamin 101-et alkalmazó fluoreszcens módszer OATP1B1 / MRP2 kettős transzfektánsok vizsgálatára új, amit a szabadalmi beadvány is érintett.

Történt-e a bemutatott funkcionális vizsgálatokon túlmenően egyéb vizsgálat (pld. konfokális mikroszkópia) a korrekt lokalizáció megmutatására? Különösen arra való tekintettel, hogy az OATP1B1 / ABCG2 kettős transzfektáns nem transzportált olyan OATP1B1 szubsztrátot (pld Cascade Blue hidrazid), ami vezikuláris transzport kísérletben ABCG2 szubsztrátnak bizonyult.

8., Kidolgozásra került az első fluorogén szubsztrát felvételén alapuló módszer, amely lehetővé teszi hepatocelluláris OATP-ék valós idejű vizsgálatát. (Tézisek IV.9).

Az  $IC_{50}$  értékek összehasonlítása a különböző tesztekkel és az irodalmi adatokkal megtörtént. A releváns adatok az Ungvári és mtsai 2021, 10. sz közleményben kerültek bemutatásra.

9., Igazolták, hogy az OATP1B1 efflux transzporterként is működhet és két, akár nagyméretű szerves molekula kicserélésére is képes. Erre alapozva a szubsztrátok és nem transzportálódó inhibitorok elkülönítésére alkalmas (kompetitív ellenáramláson alapuló) módszert dolgoztak ki (Tézisek IV.10).

Van-e arra adat nagyobb molekulaszámon, hogy milyen pontossággal lehet az inhibitorokat és a szubsztrátokat ezzel a módszerrel megkülönböztetni?

10., Az OATP2B1 új inhibitorait és egy potenciális új szubsztrátját azonosították a  $13\alpha$ -ösztron származékok között (IV.13)

A célsejt szelektivitás influx transzportereken keresztül történő biztosítása / erősítése vonzó, és ez szép példa erre. Milyen megfontolásokat kell ilyenkor tenni, és mik jelenlegi tudásunk szerint a korlátai ennek a megközelítésnek?

11., Új transzporter-gyógyszer kölcsönhatásokat mutattak ki (Tézisek IV/4,12,14)

a., Elsőként fedezték fel, hogy az ABCG2 a klinikumban is alkalmazott tirozin kináz gátlószereket, Gleevec és Iressa felismeri, és az ABCG2 fehérje gátlószerei.

b., Egyes, a COVID-19 elleni terápiában is alkalmazott antivirális szerek a multispecifikus 1A2, 1B1, 1B3 és 2B1 fehérjék inhibitorai

A hepatikus OATP-ék (OATP1B1/1B3) esetében orálisan adott gyógyszerekre a releváns koncentráció a szisztémás és béltraktusban felszívódó komponensekből álló szabad "inlet" koncentráció. Az OATP2B1 esete széles szövetspecifitása miatt komplexebb, a gyomornedv koncentrációkkal és a vékonybél traktusban való gátlással is számolni kell. Az OATP1A2-re nincs egyértelmű példa. Figyelembe véve ezt az összetettséget a disszertáció 6. Táblázatában a maximális plazma koncentráció mellett a májra prediktált koncentrációk is leírásra kerülhettek volna, hiszen az *in vitro* gátlások *in vivo* relevanciái ez alapján kiszámolásra is kerültek (Ambrus és mtsai 2021).

A favipiravir plazma koncentrációja esetében a "nincs hatás" a disszertáció 6. Táblázatában (93. Old) a maximális plazma koncentráció oszlopban feltehetően egy szerkesztési hiba.

c., A harmadik generációs P-glikoprotein inhibitorok az OATP1A2 gátlószerei, és az elacridar potenciális OATP1A2 szubsztrát

Össességében, a disszertáció hiteles és nagyon produktív kutatómunkáról számol be.

A Tézisek-ben listázott eredményeket új tudományos eredményeknek fogadom el.

Mindezek alapján Laczka Csilla MTA doktori disszertációját magas szintű munkának tartom, és a nyilvános vitára alkalmasnak ítélem. Az MTA doktora cím odaítélését messzemenően támogatom.

Budapest, 2022 05 31



Krajcsi Péter PhD, DSc