



Bírálati vélemény

Hegedűs Tamás

**„Membrán ABC fehérjék működése és gyógyszer-kölcsönhatásai a
3D bioinformatika tükrében”**

című MTA doktori értekezéséről

Hegedűs Tamás MTA doktori értekezésében az ABC transzporterek családjába tartozó két fehérje modellezési módszerekkel végzett szerkezeti vizsgálatáról számol be. Ezek közül az első a CFTR, aminek mutációk miatt kialakuló csökkent és/vagy hibás működése okozza a cisztás fibrózis néven ismert megbetegedést. A téma jelentőségét és időszerűségét mutatja, hogy FDA 2019-ben fogadta el a betegség kezelésére alkalmas összetett terápiát, ami 3 CFTR modulátor együttes alkalmazására épül, és javulást jelenthet az ebben a betegségben szenvedők közel 90 %-ának. A terápiához számos fontos felismerésre volt szükség a vad típusú és a mutáns CFTR fehérje szerkezetére, illetve a modulátorok működésére vonatkozóan. Ezen eredmények megszületéséhez elengedhetetlenek voltak a kísérleti és a számítógépes modellezésen alapuló szerkezetfelderítő módszerek. Hegedűs Tamás szimulációs és bioinformatikai módszerekkel elért eredményei jelentősen hozzájárultak ehhez a munkához.

Az utóbbi évtizedben a gyógyszergyártók figyelme is a transzporter fehérjék felé fordult. A motivációt nem csak a gyógyszer-rezisztencia megelőzése adja, hanem a kedvezőtlen gyógyszerkölcsönhatások kiszűrése is. Az érdeklődésre számot tartó transzporterek közé tartozik az értekezésben tárgyalt másik fehérje az ABCG2 vagy más néven BCRP, ami más funkciók mellett fontos szerepet játszik a köszvény, illetve egyes mellrák gyógyszerekkel szembeni rezisztencia kialakulásában is. Így a fehérje működésének megértése, illetve a transzport preferenciáinak felderítése mindenképpen nagy jelentőségű és széles érdeklődésre számot tartó kutatási téma. Ebben a kísérletes megközelítés mellett – az előző területhez hasonlóan – alapvető jelentősége van a bioinformatikai módszereknek, a dokkolásnak és a különböző molekuladinamikai szimulációknak is.

A CFTR és az ABCG2 transzporter fehérjékhez kapcsoló kutatások során született módszertani eredmények, valamint az összegyűjtött szerkezeti adatokat tartalmazó nyilvánosan hozzáférhető adatbázisok ugyancsak komoly érdeklődésre tarthatnak számot és jelentős hasznára lehetnek a szakterület kutatóinak.

Az értekezés tézises formában került összeállításra, ami a 41 oldalas összefoglalóból és az ehhez csatolt, az értekezés alapjául szolgáló tíz rangos publikációból áll, melyekből nyolcban Hegedűs Tamás

meghatározó szerző. Nyolc publikáció a szakterületi rangsor felső tizedébe, a maradék kettő a felső negyedébe tartozó folyóiratban jelent meg.

Értekezés alapvetően arányos szerkezetű, gondosan összeállított és szerkesztett, jól érthető és hiteles összefoglalója a tézispontok alapjául szolgáló tíz közleményben közzétett kutatási eredményeknek. Talán csak az alkalmazott módszerek leírása túlzottan szűkszavú, amit csak részben kompenzál a csatolt publikációkban található részletes módszer ismertetés. Az utolsó fejezet kitekintést ad a szerzőnek a disszertációban ismertetett témákban folyó aktuális kutatásaikra és bemutatja az ezekhez kapcsolódó nemzetközi együttműködéseket és pályázatokat, ezzel is alátámasztva az eredmények fontosságát és időszerűségét. Ezen túl kitér szakterületének lehetséges fejlődési irányaira, felvázolva a mesterséges intelligencia és a kvantumszámítógépek alkalmazásához kapcsolódó lehetőségeket. Általánosságban érdemes kiemelni Hegedűs Tamásnak azt – a munkája során gyakran tetten érhető – törekvését, hogy kutatásaiban a legfrissebb bioinformatikai eredményeket alkalmazza, nem elhanyagolva azoknak a saját vizsgálataihoz kapcsolódó validálását sem. Üdvözlendő továbbá a Jelölt azon szándéka is, hogy az angol szakkifejezéseket átültesse magyarra, bár a fordítások első olvasásra meglepőnek tűnnek néhol (ilyen például a 25. oldalon olvasható „membránpaca”).

Az eredményeket bemutató tizenegy tézispont világosan és jól érthetően megfogalmazott, ezek mindegyikét új és jelentős tudományos eredményként fogadom el.

A szerző értekezésében közölt eredményeit az alábbiakban foglalom össze:

1. A CFTR fehérjéhez kapcsolódó eredmények:

- a. $\Delta F508$ -CFTR fehérjére ható korrektorok többsége az NBD1/CL4 interfészt stabilizálja, de nem befolyásolja az NBD1 stabilitását, ami a működés szempontjából ugyancsak alapvető. Az ilyen típusú hatóanyagok vizsgálatára új módszert javasoltak, aminek lényege, hogy kísérletekben olyan CFTR fehérjét kell alkalmazni, amelyben az NBD és a TMD kapcsolatát megfelelő mutációval stabilizálták.
- b. Felderítették, hogy a $\Delta F508$ -CFTR mutációt hordozó betegek esetében miért nem hatékony a VX-809 korrektor és a VX-770 potenciátor együttes alkalmazása. Molekuladinamikai modellezés segítségével javaslatot tettek a CFTR fehérje ioncsatornájának fehérjén belüli elhelyezkedésére.

2. Az ABCG2 fehérjéhez kapcsolódó eredmények:

- a. Az ABCG5/ABCG8 heterodimer kristályszerkezetének felhasználásával elsőként modellezték az ABCG2 fehérje szerkezetét. Az ebből a szerkezetből indított molekuladinamikai szimulációk alapján meghatározták a gyógyszerkutatás szempontjából fontos két mutáció szerkezeti hatásait is.
- b. Számítógépes dokkolás és molekuladinamikai szimulációk segítségével javaslatot tettek a húgysav molekula transzlokációs útvonalára az ABCG2 fehérjén belül.
- c. A membránba ágyazott ABCG2 transzporterrel végzett MD-szimulációk segítségével

megállapították, hogy a koleszterin a transzportfolyamatot a transzmembrán hélixek intracelluláris oldalon történő zárásának elősegítésével mozdítja elő.

3. Ezen túl a kutatások során összegyűjtött adatok és az általuk kidolgozott módszerek felhasználásával öt internetes adatbázist hoztak létre:
 - a. Az ABCM2 az ABC transzporter fehérjék természetes variánsait és laboratóriumban előállított mutációit tartalmazza. Az ott elérhető alkalmazással összehasonlítható ezen fehérjék szekvenciálisan homológ pozícióiban lévő variánsainak szerkezete is.
 - b. A CONFORS adatbázis a Pgp-szerű ABC fehérjeszerkezetek kvantitatív összehasonlítását teszi lehetővé a speciálisan erre a fehérjecsaládra kifejlesztett szerkezeti leíró mennyiségek a konftorok segítségével.
 - c. MemBlob internetes oldalon keresztül elérhető saját fejlesztésű alkalmazással a krio-EM sűrűsége felhasználásával azonosíthatók a transzmembrán fehérjék lipid kölcsönhatásai és így transzmembrán régiója is. A korábbi eredmények a honlapon keresztül letölthetők.
 - d. Megmutatták, hogy a mesterséges intelligencián alapuló AlphaFold2 program a membránfehérjékre is hasonló minőségű szerkezeteket állít elő, mint a szolubilis fehérjékre. A megfelelő webalkalmazáson keresztül transzmembrán fehérjék szerkezetét állíthatjuk elő, illetve elérhetünk már elkészült szerkezeteket is.
 - e. A MemMorF a membránnal kölcsönható rendezetlen fehérjerégiók adatbázisa, amelyek képesek specifikus, reverzibilis kölcsönhatásokat kialakítani a membránt alkotó lipidekkel.

A szerteágazó eredményeivel és az elérésükhöz innovatív módon felhasznált, önállóan fejlesztett eszközök széles tárházával Hegedűs Tamás a saját kiváló kutatói kvalitásain túl igazolja a bioinformatika nélkülözhetetlen szerepét is napjaink gyógyszerkutatásában.

A disszertációban leírtakkal kapcsolatos kérdéseim és megjegyzéseim:

A CFTR ioncsatornával összefüggő eredményekhez kapcsolódó kérdések:

1. A VX809 molekula chaperon-ként viselkedve stabilizálja a CFTR szerkezetét, ami megnöveli a funkcionális fehérje mennyiségét. Ismert-e a NBD1-TMD1/2 interfészt stabilizációjának mechanizmusa, és az, hogy milyen kölcsönhatásokat alakít ki a VX809 molekula a CFTR fehérjével a stabilizáció során?
2. A 2013-ban a Nature Chemical Biology folyóiratban közölt vizsgálataik idején csak nonspecifikus NBD1 korrektorok voltak ismertek. Milyen eredmények születtek az elmúlt 10 évben a specifikus NBD1 korrektorok kutatásának területén?
3. A 2019-ben az FDA által jóváhagyott cisztás fibrózis kezelésére szolgáló Tricafort egyik összetevője az "új generációs" CFTR modulator az elexacafort (VX-445). Mi a hatásmechanizmusa ennek a vegyületnek?
4. A CFTR csatorna Cl⁻ ion transzportjának aktiválásában egyes kutatók szerint szerepet játszhat

a kialakuló membrán potenciál. Lehet-e szerepe a membránpotenciál figyelembevételének az iontranszport modellezése során?

5. Homológia modellezés és molekuladinamikai szimulációk segítségével megmutatták, hogy a CFTR csatorna falát alkotó TM8 hélix megtört szerkezete kísérleti műtermék lehet. Megerősítették-e azóta az újabb szerkezeti adatok ezt a következtetést?

ABCG2 transzporterrel kapcsolatos kérdések:

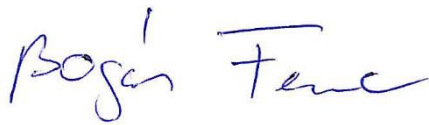
6. Az ABCG2 transzporter térszerkezetének hiánya nagyban hátráltatta a működésének megértésére illetve a működés befolyásolására irányuló kutatásokat. Ezt a problémát részben megoldották az ABCG5/ABCG8 dimer szerkezeten alapuló homológia modell elkészítésével. A munka magas minőségét mutatja, hogy az 2017-ben a Nature-ben közölt krio-EM szerkezet transzmembrán doménjének és a homológia modell megfelelő tartományának RMSD-je csupán 2.2 Å-ös eltérést mutatott a szerzők szerint. Megállapították továbbá, hogy lényeges különbség két helyen mutatkozott az egyik a TM2 és TM5a hélixek egy aminosavval történő elcsúszása, a másik az EL3 hurok szerkezete. Mennyiben befolyásolhatják ezek az eltérések a homológia modellen alapuló szimulációkból levont következtetéseiket?
7. Az utóbbi időben több olyan publikáció is megjelent, ami az ABCG2 transzport folyamatának részleteit (pl. Yu és mts. *Nat Com* **12**,4376 (2021)), illetve a szubsztrát kötés mikéntjét tárgyalja (pl. Kowal és mts. *J Mol Biol* **433**, 166980 (2021)). Hogyan viszonyulnak az Önök szimuláción alapuló következtetései ezen kísérleti vizsgálatok eredményeihez?

Adatbázisokkal kapcsolatos kérdések:

8. ABCMdb: Disszertációjában említi, hogy a 2012-ben létrehozott, az ABC transzporterek mutációit tartalmazó ABCMdb adatbázist új funkciókkal bővítették 2017-ben. Kérem, ismertesse ezeket!
9. Conftor: A Pgp-szerű transzporter szerkezetek kísérleti szerkezeteinek kvantitatív összehasonlítása jelentős segítséget ad a növekvő számú kísérleti eredmény, elsősorban krio-EM szerkezetek közötti eligazodásban. Ez szorosan összefügg azzal a törekvéssel is, ami a működése során térszerkezeti változáson áteső fehérjék állapotainak azonosítását tűzi ki célul. Vizsgálataik során bebizonyították, hogy a bevezetett térszerkezeti leíró mennyiségek, a konftorok, jól használhatók a transzporter fehérje állapotainak elkülönítése során. Mennyire általánosítható ez a megközelítés más transzporterekre, esetleg más fehérjékre? Automatizálható-e a konftorok kiválasztása egy adott fehérjére/fehérje családra?
10. Megmutatták, hogy az AlphaFold2 eljárás membránfehérjékre is hasonló minőségű szerkezeteket állít elő, mint a szolubilis fehérjék esetében, annak ellenére, hogy a betanítás során nem használtak ilyen fehérjéket. Mi lehet az oka ennek a számomra váratlan eredménynek?

Összefoglalva, a disszertáció igen magas színvonalú, hiteles, innovatív és produktív kutatómunkáról ad számot. Hegedűs Tamás jelentős és fontos eredményeket ért el a transzporter fehérjék szerkezetének és működésének modellezése és az ahhoz kapcsolódó bioinformatikai vizsgálatok területén. Mindezek alapján a disszertációban bemutatott tudományos eredmények kielégítik MTA doktori cím megszerzésének feltételeit, ezért messzemenően támogatom a nyilvános védés kitűzését és sikeres védés esetén az MTA doktora cím odaítélését.

Szeged, 2023 április 24.

A handwritten signature in blue ink that reads "Bogár Ferenc". The signature is written in a cursive style with a horizontal line above the name.

Bogár Ferenc, PhD

tudományos főmunkatárs

ELKH-SZTE Biomimetikus Rendszerek Kutatócsoport