



## SEMMELWEIS EGYETEM

Általános Orvostudományi Kar

Biokémiai Tanszék

igazgató

Dr. Csanády László

### **MTA Doktori Értekezés Bírálata**

**Szerző/Jelölt:** Dr. Hegedűs Tamás, Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

**Disszertáció címe:** Membrán ABC fehérjék működése és gyógyszer-kölcsönhatásai a 3D bioinformatika tükrében

A Jelölt doktori disszertációjának hivatkozások nélküli terjedelme 34 oldal (rövid disszertációs forma; a hivatkozáslista 7 oldal terjedelmű). A dolgozat külalakra igényesen szerkesztett, a doktori szabályzatban írottak tekintetében is fokozatszerzés céljából megfelelő minőségű munka. A dolgozat gazdagon illusztrált a kísérleti/számítási eredményeket bemutató - tudományos igényességgel elkészített - színes ábrákkal és diagrammokkal. A disszertáció szövege tiszta, világos nyelvezetű, helyesírási hibák elvértve jelentkeztek.

A disszertációban tárgyalt tíz közleményből kettőben a Jelölt társszerző, azonban a cikkekben szereplő szerzői hozzájárulások alapján egyértelműen megállapítható volt a tényleges tevékeny hozzájárulás. A két társszerzős közlemény mellett egy elsőszerzős és hét utolsó szerzős közleményt mutat be a Jelölt a disszertációjában. A Jelölt által bemutatott cikkek mind nemzetközi – többnyire igen színvonalas – folyóiratokban jelentek meg angol nyelven.

A dolgozat egésze híven tükrözi a Jelölt felkészültségét a művelt tudományterületen. A Jelölt leírta a Bevezetés és a Célkitűzések után a Módszerek fejezetben az alkalmazott vizsgálati módszerek legfontosabb elméleti megfontolásait, gyakorlati aspektusait és a kísérlettervezés egyes elemeit is. A disszertáció a Jelölt munkáját mutatja be a membrán ABC fehérjék tudományterületen. Az elvégzett kutatómunka ezen fehérjék működését és gyógyszer-kölcsönhatásait volt hivatott vizsgálni, az alkalmazott módszerek pedig elsősorban a bioinformatika tárgykörébe tartoznak. A bemutatott munkákat három fő csoportba lehet besorolni: *i.* a CFTR fehérje szerkezetének, dinamikájának és CF-gyógyszer jelöltek vizsgálata, *ii.* az ABCG2 fehérje szerkezete, dinamikája, és működése, és *iii.* membrán (ABC) fehérjékhez kapcsolódó (web) alkalmazások fejlesztése. A CFTR fehérje tekintetében mechanizmus-alapú

korrektor kombináció lehetőségét vizsgálta a  $\Delta F508$ -CFTR kijavítására, potenciátor molekulák hatását vizsgálta a  $\Delta F508$ -CFTR funkcionális expressziójára, ill. a kloridionok legvalószínűbb átjutási útvonalát is azonosította. Eredményei hozzájárultak egy olyan módszer fejlesztéséhez, amely hatékonyabb CFTR korrektor molekulák szűrését teszi lehetővé, ill. olyan szerkezeti adatokat szolgáltatott, amelyek CF elleni gyógyszer-molekulák hatásmechanizmusának megismeréséhez járulnak hozzá.

Az ABCG2 rendszerben a fehérjeszerkezetet vizsgálta homológia modellezés alapján, ill. a fehérje szabályozását és transzport működését jellemezte. A homológia modellezés azt mutatta meg, hogy az ABCG2 NBD/TMD interfész szerkezete más mint a CFTR megfelelő régiójának szerkezete. Ez arra is rámutat, hogy a Q141K - köszvényet is okozó - variáns megmentésére a CFTR megmentésére alkalmazott módszerektől eltérő megközelítést lehet érdemes alkalmazni. Dokkolási kísérletekkel azonosította egy fiziológias szubsztrát feltételezett átjárási útvonalát is. Az útvonal megerősítésére experimentális szerkezeti információkat felhasználva MD szimulációkat is végzett. Az eredmények áttörést jelenthetnek a szubsztrátranszport folyamatának és koleszterin általi szabályozásának megértésében. Bioinformatikai módszerekkel a központi kötőhelytől eltérő gyógyszerinterakciós helyet tárt fel. Szintén azonosított egy dinamikus transzportútvonalat, amely alkalmas eltérő szerkezetű szubsztrátok szállítására. Eredményei alapján feltételezhető, hogy a membrán koleszterintartalma a fehérje citoplazmatikus régióinak zárását segíti elő, így gyorsítva a transzportot.

Az ABC fehérjékhez kapcsolódóan web alkalmazásokat is fejlesztett munkacsoportjával. Ilyen például az adatbázis ABC fehérjék mutációinak összehasonlító elemzéséhez, az alkalmazás Pgp-szerű ABC fehérjeszerkezetek kvantitatív összehasonlítására konftorokkal, ill. a MemBlob szerver alkalmazás TM-régiók krio-EM denzitásból való meghatározására. Szintén dolgozott transzmembrán fehérjék AlphaFold2 predikcióján, ill. fejlesztette a MemMoRF adatbázist is lipidekkel kölcsönható rendezetlen fehérjerégiók analízisére.

A Jelölt új tudományos eredményeinek a következőket fogadom el:

1. Bemutatta, hogy a CFTR korrektorok többsége az NBD1/CL4 interfészt stabilizálja, ám a terápia hatásosságának növelésére szükség van más helyen ható vegyületekre is, amit interfész stabilizált mutáns fehérjével érdemes keresni.

2. Kimutatta, hogy a VX-770 potenciátor a CFTR fehérje funkcióját annak destabilizálásán keresztül javítja, ami viszont a korrektorok hatását gyengíti, ezért új potenciátorok fejlesztése szükséges.
3. Molekula dinamika szimulációkkal a klorid-vezetéshez szükséges geometriával rendelkező CFTR-konformációkat tudott azonosítani és jellemezte a klorid-átjutást is.
4. Elsőként modellezte az ABCG2 fehérje szerkezetét és molekula dinamika szimulációk alkalmazásával meghatározta a köszvényel asszociált Q141K és a szubsztrátspecifitás változását okozó R482G mutációk lehetséges szerkezeti hatásait is.
5. Az ABCG2 legjelentősebb fiziológias szubsztrátja, a húgysav jelenlétében végzett MD szimulációkkal jellemezte a transzlokációs útvonalat *in silico* dokkolás alkalmazása mellett.
6. Az ABCG2 fehérjével végzett MD-szimulációi alapján megállapította, hogy a koleszterin a transzportfolyamatot a transzmembrán hélixek intracelluláris oldalon történő zárásának megkönnyítésével segíti elő.
7. Az ABCM2 web-alkalmazásában lehetővé tette különböző ABC fehérjék szekvenciálisan homológ pozícióiban lévő variánsainak összehasonlítását.
8. ABC fehérjeszerkezetek összehasonlítására és osztályozására szabványosított, automatikusan generálható mérőszámokat, *konftorokat* hozott létre.
9. Kifejlesztette a MemBlob munkafolyamatot, amely kísérletes adatokból meghatározza a fehérje lipiddel körülvett TM részét.
10. Bemutatta, hogy az AF2 membránfehérjékre is hasonló minőségű szerkezeteket tud jósolni, mint szolubilis fehérjékre.
11. Adatbázisban tette elérhetővé az olyan rendezetlen régiókat, amelyek kísérletes adatok alapján lipidekkel is képesek specifikus, reverzibilis kölcsönhatásokat kialakítani (MemMoRF).

A Jelölt általánosságban véve racionális konklúziókat vont le eredményeiből. A vizsgálati eredmények hasznosak lehetnek a membrán ABC fehérjék molekuláris szintű mechanizmusainak tisztázásában.

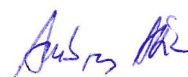
### **Megjegyzés**

- A Bevezetés mindössze 1,5 oldal terjedelmű, amelyet a bíráló nagyon rövidnek tart a háttérinformációk megfelelő mélységű bemutatása tekintetében. Megjegyzésre érdemes azonban, hogy az eredmények tárgyalása során a szükséges háttérinformációk általában megfelelő mélységben bemutatásra kerültek.

## Kérdések

1. Nem teljesen egyértelmű a disszertációból – de sokszor a cikkekből sem –, hogy hogyan kezelte a Jelölt az MD szimulációk során a nem szerkezeti (bulk) vizet. Implicit/explicit verziót/modellt alkalmazott, milyen vastag vízköpeny volt általában jelen, egy vagy kétrétegű volt-e a köpeny és ez utóbbival összhangban hogyan oldotta meg a hőpufferelést általában? Alkalmazott-e valamilyen beépített potenciálfelszín a vízmolekulák szökésének megakadályozására?
2. Amikor alkalmazott vízköpenyt, volt-e referencia futtatás víz nélkül is? Mi volt az alapvető különbség az eredményekben és változtatta-e bármikor is a levonható konklúziókat az, hogy vízzel vagy anélkül hajtotta végre a szimulációkat?
3. Az *in silico* CFTR vizsgálatok esetében próbálták-e esetleg változtatni a klorid-koncentrációt és ha igen az milyen hatást eredményezett? Változtatták-e esetleg az ellenion minőségét? Hogyan hat a klorid-koncentráció változása a főbb patogén csatorna-variánsokra? Lehet ennek az információnak terápiás relevanciája esetleg?
4. Mi az az egyensúlyi szimuláció és a metadinamika? Utóbbi röviden említi a 14.o.-on, de nem teljesen egyértelmű, hogy mit ért ezek alatt és milyen információkat szolgáltatnak ezek a technikák.
5. Egy érdeklődő technikai kérdés: A bírálónak limitált tapasztalata van az MD szimulációk terén és megtörtént vele, hogy a szimulációk során meglehetősen „szétrázódott” a szerkezete. Mitől jöhetett ez létre, mire kell vigyázni, hogy ez ne történjen meg egy szimuláció során? Ilyen nem fordult elő a disszertációban vizsgált rendszereken?

A Jelölt MTA doktori dolgozatában bemutatott munka jelentős mértékben járult hozzá a vonatkozó tudományterület fejlődéséhez. A bíráló a disszertációt és a tudományos teljesítményt/munkásságot magas - az MTA doktori fokozathoz elvárt - színvonalúnak ítéli meg. Ezek alapján a nyilvános vita kitűzését, illetve sikeres védés esetén a cím odaítélését javasolja.



Dr. Ambrus Attila  
*egyetemi docens*

Budapest, 2023. március 13.