

BÍRÁLAT

Dr. Homolya László “Humán ABC transzporterek funkcionális vizsgálata” című MTA doktori értekezéséről

Az MTA doktori értekezés a jelölt tizenhárom megjelent eredeti angol nyelvű közleményének anyagára épül, a jelölt két cikkben első szerző, négy cikkben pedig utolsó szerző. A felhasznált közlemények összesített impakt faktora 78. Az impakt faktor zömét a Physiol Review-ban megjelent kiváló összefoglaló adta. A bekötött cikkek összesített impakt faktora az összefoglaló közlemény nélkül is több mint 40. Az értekezésben felhasznált közleményeken kívül húsz közleménye jelent meg, ami alátámasztja a jelölt produktivitását. A jelölt közleményei közül azokat a közleményeket választotta ki, illetve használta fel értekezésében, amelyek témái szorosabban összefüggtek, és segítségükkel egy homogén dolgozatot tudott elkészíteni.

Az MTA doktori dolgozat 98 oldal terjedelmű, ebből 5 oldal címlap, tartalomjegyzék és rövidítések jegyzéke, 14 oldal bevezetés és irodalmi áttekintés, 1 oldal célkitűzés, 3 oldal alkalmazott módszerek, 53 oldal eredmények és következtetések, 2 oldal magyar nyelvű összefoglaló, 2 oldal a dolgozatban felhasznált saját közlemények jegyzéke, 3 oldal az egyéb közlemények jegyzéke, 1 oldal köszönetnyilvánítás, 14 oldal irodalomjegyzék. A kísérletes adatok bemutatását és értelmezését 32 ábra és 1 táblázat segíti. Az értekezés érdemi részét követi a 13 közlemény fénymásolata, bekötve a dolgozatba, megkönnyítve ezzel a bíráló feladatát.

Az értekezés formailag teljes egészében megfelel az MTA doktori értekezéssel szemben támasztott követelményeknek. Ezeket a követelményeket már előttem is több fórum részletesen megvizsgálta és mindig pozitív döntéseket hozott. Az értekezés formai részével kapcsolatban csak néhány apró hibára hívom fel a figyelmet a későbbi, kritikai megjegyzéseim során.

A dolgozat témaválasztása modern és időszerű, jelölt a humán ABC fehérjék funkcionális vizsgálatával, illetve az ennek az érdekében kifejlesztett módszer kiterjesztésével, valamint az ABC fehérjék élő szervezetekben betöltött szerepével foglalkozott. A dolgozatban ismertetett eredmények közül tudományos szempontból az alábbiakat fogadom el új eredményeknek:

1. A jelölt kimutatta, hogy az általuk kidolgozott calcein assay segítségével nemcsak az MDR1 hanem az MRP1 is vizsgálható. A kiterjesztett calcein assay segítségével kimutatta, hogy a drogok egy részét az MRP1 glutation konjugátumként pumpál ki a sejtből. A calcein assay segítségével akut limfoid leukémiában meghatározta az MDR fenotípust, és ez prognosztikai jelentőséggel bírt.
2. A jelölt megállapította, hogy az Iressa-val szembeni rezisztencia az ABCG2 transzportaktivitásának következménye, valamint, hogy a membrán koleszterintartalma modulálja az ABCG2 transzportaktivitását.
3. A jelölt létrehozta az ABCG2 transzporter GFP-vel jelzett változatát, és segítségével megállapította, hogy a mitoxantront a transzporter közvetlenül a membránból pumpálja ki a sejtekből.
4. Sikerült előállítani monoklonális antitestet az ABCG1 és ABCG4 féltranszporter fehérjével szemben. Kimutatta, hogy a két fehérje rendelkezik ATPáz aktivitással, és hogy ezek a féltranszporterek képesek mind homo-, mind heterodimerként működni.
5. Kimutatta, hogy az ABCG1 fehérje jelenléte apoptózist indukál makrofágokban, rámutatva ennek jelentőségére az ateroszklerotikus léziók kialakulásában.
6. Retrovirális transzdukciónak segítségével létrehozott egy olyan modell rendszert, amely alkalmas az ABCA1 sejtfelszíni expressziójának detektálására, és amelynek segítségével kimutatta, hogy az ezetimib gyógyszer az ABCA1 sejtfelszíni megjelenését funkciófüggő módon befolyásolja.

Ezek jelentős és új tudományos eredményeknek tekinthetők, amit bizonyít az is, hogy a kísérleti eredmények nemzetközileg elismert tudományos folyóiratokban jelentek meg.

A bírálatom kritikai kifejtése előtt szeretném leszögezni, hogy az értekezést összességében pozitívan értékelem, a benne összefoglalt munka bizonyítja, hogy a jelölt képes egy nagyobb kutatócsoportban aktívan részt venni, illetve egy kisebb kutatócsoport munkáját irányítani. Az itt következő kritikai megjegyzéseim, kérdéseim nem vonják kétségbe a munka egészének értékét.

Az alkalmazott módszerek részt egy kicsit rövidnek találtam, még akkor is ha a módszerek részletebben az értekezéshez csatolt közleményekben megtalálhatók. Szerencsésebb lett volna, ha hivatkozott volna a jelölt, hogy melyik csatolt közleményben

található meg az alaposabb leírás. A módszer leírások rövidítése miatt történhetett meg, hogy ilyen enigmatikus kifejezések kerültek be a leírásba, mint “megfelelő mosási lépések közbeiktatásával”. Ez vajon hány mosási lépést jelent? A sejtfelszíni expresszió mérése alfejezetben azt írja, hogy 10 mg/ml propidium jodiddal 2 percig festette a sejteket. Ilyen nagy koncentrációban használták a propidium jodidot? Vagy microgram/ml koncentrációról kell beszélni? Minden sejtfelszíni jelölés esetén 1% PFA-val fixálták a sejteket? Élő sejtek immunfluoreszcens jelzését soha nem próbálták?

Az első közleményben megállapította, hogy az MRP1 képes a calceint acetoximetilészter és szabad sav formájában kipumpálni. Kérdésem az, hogy meg lehet-e állapítani, hogy a kipumpálás milyen arányban oszlik meg a két kémiai forma között? Az MRP1-et gátló anyagok esetén változik-e ez az arány? Vannak-e olyan szelektív inhibitorok, amelyek vagy az egyik kémiai forma, vagy a másik kémiai forma kipumpálását gátolják elsősorban?

A harmadik közleményben kimutatta, hogy a calcein módszer alkalmas a klinikai minták kvantitatív jellemzésére. Az MDR pozitív és negatív betegek túlélési görbéjét összehasonlítva a 10. ábra c. paneljében szignifikáns különbséget állapított meg. A szövegben és a közlemény 3. ábrájában pedig $p = 0.07$ szinten nem tartja szignifikánsnak a különbséget. Szerintem ugyanarról az ábráról beszélünk. Akkor most mi az igazság? Használják-e ezt a tesztet rutinszerűen a klinikai gyakorlatban? Hogyan lehetne növelni a teszt predikciós erejét?

Az ötödik közleményben kimutatta, hogy a membrán koleszterin szintje jelentősen befolyásolja az ABCG2 transzporter működését? Milyen kölcsönhatást képzelnek el a koleszterin és a transzporter között? Vizsgálták-e, hogy milyen mértékben lokalizálódik az ABCG2 a koleszterin gazdag lipid tutajokban? Változik-e ez a lokalizáció a koleszterin túltöltés és elvonás hatására?

A hatodik közleményben leírja, hogyan sikerült fluoreszcens fehérjével megjelölni az ABCG2 transzportert. Szükszavúan megjegyzi, hogy mindez számos sikertelen próbálkozás után valósult meg. Szeretném, ha röviden összefoglalná, hogy milyen megközelítéssel sikerült végül elérni a célt, melynek eredményeképpen fluoreszcensen jelzett és funkcionális fehérjét sikerült előállítani.

A hetedik közleményben az ABCG2 fehérje transzportmechanizmusát vizsgálta. Megállapította, hogy az ABCG2 az erősen hidrofób mitoxantront a “floppáz” mechanizmus révén távolítja el a sejtekből. Végzett-e a jelölt hasonló kísérleteket kevésbé hidrofób szubsztátokra vonatkozóan? Ha nem, található-e az irodalomban ilyen jellegű átfogó kísérleti adat az ABCG2 transzportáló képességére vonatkozóan?

A nyolcadik közleményben az ABCG1 és ABCG4 féltranszporterek funkcionális jellemzését végezte a jelölt. Az irodalmi adatokkal egyezően kimutatta, hogy ezeknek a fehérjéknek homo- vagy heterodimerizálódniuk kell aktivitásuk eléréséhez. Hogyan befolyásolja a membrán koleszterin szintje ezen fehérjék dimerizációs hajlamát? Véggeztek-e erre vonatkozólag kísérleteket? Ha nem, milyen irodalmi adatok állnak rendelkezésünkre?

A kilencedik közleményben kimutatta, hogy szoros korreláció van az ABCG1 expressziója és a sejtek apoptózisa között az általa vizsgált makrofág rendszerben. A közleményben nem sikerült magyarázatot adni az apoptózis mechanizmusára. Vannak-e azóta újabb eredmények, amelyek felderítették az ABCG1 által kiváltott apoptózis mechanizmusát?

A tizedik közleményben a koleszterin-anyagcsere fontos szereplőjének, az ABCA1 fehérjének funkcionális vizsgálatára hozott létre egy jó modell rendszert. A hemagglutinin epitóp (HA) bevitelével sikerült az ABCA1 fehérjék sejtfelszíni expresszióját könnyebben kimutatni. Van-e jelentős különbség az eredeti fehérje és a HA-ABCA1 (azaz a hemagglutinin-t tartalmazó ABCA1) fehérje funkciója között? Milyen koleszterin-anyagcserét befolyásoló gyógyszer tesztelését tervezik a közeljövőben az így létrehozott modell rendszerben?

Összefoglalásképpen még egyszer leszögezem, hogy kérdéseim és kritikai megjegyzésem semmit sem vonnak le az értékezés értékeiből. Ennek megfelelően a dolgozat nyilvános vitára bocsátását és sikeres védés esetén az MTA doktor fokozat odaítélését messzemenően javaslom.

Debrecen, 2011. október 24.



Dr. Szöllősi János
biol. tud. Doktora