

Opponensi vélemény:

Homolya László

MTA doktora címért benyújtott

## **Humán ABC transzporterek funkcionális vizsgálata**

Doktori Értekezéséről

Előljáróban el kell mondanom, hogy meglehetősen sokat hezitáltam, hogy elvállaljam-e a bírálói felkérést. Aztán, mivel mostanában többször hallottam ezekről a fehérjékről, meg úgy általában ilyen sejtbiológiai vizsgálatokról, amikről korábban vajmi keveset tudtam, gondoltam, hogy ez egy remek alkalom lesz tanulni ezekről a dolgokról. Ha kicsit cinikus akarok lenni, a tudományos eredményeknek úgyis túl kell terjedniük szűkebb területükön, hogy beleolvadhassanak az összegzett ismeretekbe, ez a bírálat most erre lehet próba, hogyan is megy ez, ha egyáltalán, a mai túlságosan is specializálódott világban. Ezért aztán nem ígérhetem, hogy bírálatom teljesen kiegyensúlyozott lesz, azok az eredmények, amik jobban megragadták a figyelmemet, alaposabb utánanézést indukáltak, amik túl messzire álltak ismereteimtől, azokkal kevesebbet foglalkoztam.

### **Ezek után a dolgozatot illető, formailag kötelező megjegyzések:**

Az értekezés az előírt formai követelményeknek megfelel, 80 oldalból áll, amit az alapjául szolgáló közlemények egészítenek ki. Nyelvezete tiszta, világos – már amennyire azt az általános magyar tudományos nyelvezet színvonala lehetővé teszi: Pl. Eltartott egy darabig, míg a dolgozat olvasásának megkezdésekor rájöttem, hogy ezek a fehérjék nem ABC-ket transzportálnak, hanem ABC-alapú transzporterek, de később belenyugodtam a nevezéktanba.

Csak egy példát hozok még fel a nekem kicsit meglepő fogalmazásra, azt is csak azért, mert a tudósok néha megfedkeznek arról, hogy nemcsak az ő szempontjaik vannak a világon: “Az akut leukémiák ehhez a csoporthoz tartoznak, ráadásul gyakorlati szempontból egy olyan előnnyel is bírnak a szolid tumorokkal szemben, hogy a minta könnyen hozzáférhető, és a rákos sejtek izolálása nem igényel különösebb előkészítést.” (31. oldal) A betegek is így gondolnák?

Még egy stilisztikai megjegyzés, a szerző nagyon szereti azt mondani, hogy modulál, ahelyett, hogy megadná, az adott változás növekmény volt-e vagy csökkenés; így az ember kénytelen bolyongani, különösen ha a modulálás idézett közleményre vonatkozik; ahol is rá kellett jönnöm, hogy ez lehet, hogy tudományági sajátosság, az idézett közlemények címei, absztraktjai sem mondják meg hogy nőtt-e valami, vagy csökkent (pl. 86,87). Általában azonban minden rendben van az értekezés szövegével.

A dolgozat 13 közleményen alapul, amelyek közül 10 eredeti kutatási eredményt tartalmaz, 3 összefoglaló közlemény. A közleményeken látszik, hogy Homolya László egy jó méretű, igen sikeres csapat tagjaként dolgozik. Ebben az jó, hogy lehetőséget ad nagyobb léptékű munkákra, ugyanakkor nehezzé teszi a kívülálló számára annak megítélését, hogy mi is az ő speciális hozzájárulása a bemutatott munkákhoz. Vannak olyan doktori értekezések, ahol a pályázó a cikkeknél egyenként kiemeli, hogy mi volt az ő hozzájárulása az adott munkához. Ez a megoldás itt is szerencsés lett volna, pláne, hogy ilyen “külsős” bírálóval hozta össze a sors. Ennek ellenére, nincs semmilyen kétség bennem a pályázó teljesítményét illetően, mert a szerzőlista szerint meghatározó szerepe volt a 6, 7, 9, 10, 12, 13 közleményekben, melyek mindegyike rangos

nemzetközi folyóiratban jelent meg.

**A bevezetés** (6-19. oldal) a területen járatlan olvasó számára, mint amilyen a bíráló is volt, nagyon világosan bemutatja a vizsgálandó fehérjéket, feltételezett funkcióikat, az eddigi ismereteket. Egy megjegyzésem azonban van, a 3. ábra mellett hasznos lett volna feltüntetni a legfontosabb szubsztrátok formuláit is, mert akkor kitűnt volna, hogy van azért azok között hasonlóság is, nem csak különbség...

**A célkitűzések** (20. oldal) gyakorlatilag felsorolják az alapul vett közlemények eredményeit.

**Alkalmazott módszerek** (21-23. oldal) A szerző maga is deklarálta, hogy szándékosan adott ilyen vázlatos leírást, ami a területen otthonosan mozgóknak emlékeztetőül nyilván elegendő is, a részleteket illetően felsorolt irodalmi hivatkozásokban minden szükséges információt megtalálhat és meg is talált a területen járatlanabb bíráló is. Azt itt általánosságban meg kívánom jegyezni, hogy az alkalmazott módszereknek a publikált cikkek belső átnézése alapján elmondható, hogy valamennyi munkát nagy gondossággal, a biológiai anyag természetét, lehetőségeit messzemenően figyelembe véve végezték el. Amennyire, az általam nem túl nagy számban olvasott, ezen a területen más szerzőktől megjelent cikkekkel összehasonlítva meg tudom állapítani, a dolgozatban szereplő valamennyi kísérletes munka minősége kiemelkedő. Különösen tetszett, hogy mindig nagy gondot fordítottak a vizsgált sejtek élő voltának ellenőrzésére, amihez egyre finomabb módszereket is fejlesztettek. Ezért a technikai részletekre a továbbiakban nem is térek ki.

### **Eredmények és diszkusszió:**

Ezt a fejezetet az alapul szolgáló publikációk szerint bontotta alfejezetekre a szerző, én is ezt a felosztást követem.

## **4.1. A calcein assay kiterjesztése és alkalmazásai**

### *4.1.1. Az MRP1 transzport tulajdonságainak vizsgálata (1.sz. közlemény)*

Nagyom következetes, logikus munka.

### *4.1.2. Az MDR1 és MRP1 párhuzamos detektálása (2. sz. közlemény)*

A különböző ABC-transzporterek aktivitásának elválasztására tervezett szép kísérletek, amik közül azt emelem ki, hogy megoldották az MDR1-et és MRP1-et expresszálló sejtek elkülönítését egyes sejt (és nem egy-sejt, mint a dolgozatban szerepel) szinten. Elegáns a két MDR protein szelektív gátlására alapozott sejtválasztás (de a megjelent közleményben nem azt kellett volna mondani, hogy "...*Inhibitors of MDR proteins benzobromarone (40  $\mu$ M) and verapamil (50  $\mu$ M)*", nyilván sajtóhiba!) hanem azt, hogy a benzobromarone az MRP1-et, a verapamil az MDR1-et gátolja. Nem kellett volna utánakeresni, végül egy félmondat a dolgozatban eligazított.)

### *4.1.3. A calcein assay diagnosztikai alkalmazása (3 sz. közlemény)*

Meggyőző kísérletek, ha jól értem, a sikeres assay magával hozhatja, hogy a jövőben a kezelés megkezdése előtt el lehet dönteni, hogy érdemes-e egyáltalán belefogni a kemoterápiába. Bennem egy kérdés merült csak fel: A 33. oldalon azt mondja a szerző, hogy a vizsgált betegcsoportban az MDR fenotípuson kívül csak a beteg kora bizonyult diagnosztikai jelentőségű faktornak a kemoterápiára adott válasz tekintetében. Itt nagyon kíváncsi lettem volna, hogy milyen volt ez a korreláció? Ez a mondat konkrétan megfogalmazva tartalmazhatta volna ezt az információt, ami sajnos nincs benne a megjelent közleményben sem.

## 4.2. Az ABCG2 multidrog transzporter funkcionális vizsgálata

### 4.2.1. Az ABCG2 fehérje Irresa-val való kölcsönhatása (4. sz. közlemény)

*Multidrog Transporter ABCG2 Prevents Tumor Cell Death Induced by the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib)*

(A cikknek én más címet adtam volna, itt az ABCG2 hatása éppen ellentétes céljainkkal, úgyhogy a pozitív, gondoskodó hangulatú “prevents“ helyett inkább a “blocks“ szót használtam volna.) Ez a munka nagyon fontos abból a szempontból, hogy rávilágít a különböző komponensek közti keresztfeffektusokra, itt például arra, hogy az Irresa EGF-receptor gátláson keresztül megvalósuló a rák kezelésben kívánatos hatását hogyan rontja le az ABCG2 Irressa-t kipumpáló hatása. Mindazonáltal, ahogy a közleményből megértettem, a felhasznált A431 sejtek tartalmaztak EGF-receptor jelutat, de ABCG2-t nem, legalábbis olyan keveset, hogy a Western blot nem mutatta ki. Ezért kérdezem, hogy vannak-e olyan sejtek, amik mindkét komponenst tartalmazzák, és fontosak a rák szempontjából? Hogyan viszonyulnak az transzdukcióval elérhető ABCG2 koncentrációk az ABCG2 fiziológias koncentrációihoz? (pl. az A431 és a MCF-7/MX sejtekben?)

### 4.2.2. A membrán koleszterintartalmának hatása az ABCG2 aktivitására (5. sz. közlemény)

Ez az a munka, amit az egyik legjobbnak tartok a dolgozatban. Az az érzésem, hogy ebben az irányban tovább kutakodva, közelebb lehetne kerülni mind az ABC transzporterek szubsztrát promiszkuitásának, mind a membránszerkezetnek a transzporterek aktivitására gyakorolt hatásának megértéséhez. Ha ugyanis megnézzük, hogy milyenek az ABC transzporterek szubsztrátjai, akkor a nagy különbözőségek mellett legalább egy lényegi hasonlóság is látszik (legalábbis nekem). Ezek a molekulák többnyire gyűrűket tartalmaznak, amik egy síkban kimerevítve helyezkednek el, mint a koleszterin is. Ha már most egy membránban több koleszterin van, amik a hidrofób régióban a membrán síkjára merőlegesen helyezkednek el, akkor ezek a koleszterinek segíthetik a szubsztrát molekulák hasonló, rendezett “beállását“ a membránba, ami kedvezhet a transzporter működésének. De ez csak az egyik lehetséges hatása a koleszterin molekuláknak. A membrán fehérjék dinamikája lényegesen eltér a vízdékonnyaktól. Ha a H/D kicserélődést nézzük, pl. a hőmérséklet függvényében, akkor egy vízdékonny molekulában azok a kis szerkezetváltozások, amik a kicserélődéshez szükségesek, reverzibilisek, a fehérje szerkezete nagyjából ugyanolyan lesz a H/D lezajlása után még jó darabig, mint a kicserélődés megindulása előtt volt, egészen addig, amíg, jóval magasabb hőmérsékleten, a fehérje denaturációja meg nem kezdődik. A membránfehérjék esetében a H/D kicserélődés egy irreverzibilis szerkezetváltozással járó folyamat, az első lépésektől folyamatos út vezet a denaturációig, mert amint van valamilyen változás a fehérjében, ami érinti a lipid-fehérje határfelületet is, oda a lipidek azonnal “beteszik a lábukat“, a fehérje nem tud visszatérni eredeti állapotába. Ezen az alapon gondolom azt, hogy esetleg úgy működhetnek az ABC transzporterek, hogy alapállapotban semmire sincsenek optimalizálva, kis állandóval képesek megkötni, de nagyon sokféle molekulát. Amikor azonban az idegen anyagok koncentrációja elég magas lesz – mint látjuk, itt általában magas koncentrációk épülnek fel az idegen anyagokból, mert nincs specifikus partnerük, mint a fiziológias komponenseknek – mégiscsak megkötik az adott molekulát, és a kötés során idomulnak hozzá. Mivel mindig ugyanazok a transzporterek vannak ugyanabban a membránban, sok lépésen keresztül a transzporterek szerkezete hozzáidomulhat a szubsztráthoz, mely szerkezeti módosulást a környező lipid fázis rögzíteni képes. Közvetlenül nyilván nem a koleszterinek maguk, hanem fehérje-lipid határfelület flexibilis lipidjei, amiket viszont a koleszterinek stabilizálnak. Egy “induced fit“ reakcióhoz hasonló, csak esetleg nagyobb skálájú folyamatot képzelek el. Ezt a hipotézist talán ellenőrizni is lehetne, beállítani először egy adott szubsztráttal optimalizált aktivitást, aztán átváltani egy másik szubsztrátra, amit az enzim

kezdetben nyilván gyatrán köt, és megmérni, növekszik-e az enzim sebessége az idő előrehaladtával. Ha ez lenne az eset, akkor az nagyban alátámasztaná a dolgozat végén szereplő kemoimmunitási hálózatra vonatkozó elképzeléseket is. *(Elnézést a kitérőért, a bíráló is kutatóból van, ha érdekes eredményeket lát, meglódul a fantáziája.)*

#### *Az ABCG2 multidrog transzporter GFP-vel való címkézése (6. sz. közlemény)*

A kutató munkájának szinte legfontosabb része, ami azonban sokszor nem látványos, azoknak az eszközöknek a kifejlesztése, a mérések kiértékeléséhez szükséges tudás megszerzése, amik az őt izgató kérdések megválaszolásához szükségesek. Ilyen munka ez is, és ráadásul látványos is. Biofizikusként nem tudom igazán felmérni, hogy mennyit kellett oda-vissza szaladgálni a DNS-en ahhoz, hogy egy ilyen konstrukciót létre lehessen hozni, de az az érzésem, hogy emögött nagy munka van, ami azonban megtérült a további kutatás során.

Itt azért vannak kérdéseim: Korábban felmerült, hogy az ABCG2 egy homodimer transzporter. A 18.e. ábra erre direkt bizonyíték? Ha igen, milyen természetű az a dimerizáció, amit az SDS magában nem old fel, még redukáló körülmények is kellenek hozzá, ami az én olvasatomban -S-S- hidak felszakítását jelentené, amit nem említenek a dolgozatban.

#### *4.2.4. Az ABCG2 transzportmechanizmusának vizsgálata (7. sz. közlemény)*

Számomra ez az értekezés másik kiemelkedő közleménye, a pályázó első szerző benne. A munka nem csak érdekes, hanem elegáns is, nagyon világosan van felvezetve az eldöntendő kérdés és nagyon célszerű, jól megtervezett kísérletekből és számolásból kapjuk meg a választ. Azért van egy kérdésem (i) és egy megjegyzésem (ii): **(i)** A 23.b ábrán a  $t_{\text{intra}}$  törést szenved 300 sec táján, valamelyest hasonlóan a 23.a ábrán az inhibitor hasonló időben történt adásához. Itt azonban nincs inhibitor hozzáadás, az időtartam hosszabb, minek tulajdonítható a  $t_{\text{intra}}$  szigmoid jellege, aminek nem látszik előjele a rövidebb időintervallumban? **(ii)** A szerzők maguk is ambivalensek a floppáz modellt illetően, bár azt mondják, azzal jobb illeszkedést kaptak a kísérleti eredményekkel, amin nem is csodálkozom, növekvő szabadsági fokok rendszerint javítják az illesztés minőségét, de azt hiszem, itt nem lehet megkülönböztetni a kétféle, membránt érintő, mechanizmust, aminek a lipidek javára szóló ilyen mértékű megoszlás esetén (230 000 : 1) nem is látnám értelmét. A szerzők sem erőltetik a floppáz esetét a közlemény hangsúlyos helyein (absztrakt, összefoglalás). *(A membránból történő kipumpálás esetleges membránszerkezeti vonatkozásait már fentebb részleteztem.)* Összegezve, a szerző nagyon meggyőzően bizonyítja, hogy a hidrofób szubsztrátokat az ABCG2 transzporter a membránból löki ki, nem a citoplazmából, azaz, éberem áll a gáton, a betörés ellen véd, nem az előtött területekről pumpálja ki a szennyes levet, és ez valószínű jobb is így nekünk, mármint normál esetben, nem a rák kezelésekor.

### **4.3. A lipídanyagcserében szerepet játszó ABC transzporterek vizsgálata**

#### *4.3.1. Az ABCG1 fehérje funkcionális jellemzése (8. sz. közlemény)*

A korábbiakban kidolgozott módszereket alkalmazza az ABCG1, ABCG4 féltranszporterek jellemzésére. Ami a fehérjék funkcióját illeti, azokról sajnos nem sok minden derült ki, mert több mint 100 vegyületből csak kettő indukálta az ABCG1 működéséhez csatoló ATP-áz aktivitást, az ABCG4-ét pedig egy sem, így ezek az eredmények inkább csak a dimerizáció feltérképezésére voltak alkalmasak. A dimerizációt illetően megkérdezném, hogy míg a szerző a kapcsolódó közleményben határozottan úgy fogalmaz, hogy van mind ABCG1, mind ABCG4 homodimerizáció, a dolgozatban ezt az ABCG4 fehérjére nem látja bizonyítottnak. Felmerült valamilyen újabb körülmény időközben?

#### 4.3.2. Az ABCG1 fehérje apoptotikus hatása (9. sz. közlemény)

A szokásos, magas színvonalú munka, felhasználja az eddig kifejlesztett eszköztárat, arról nem a szerző tehet, hogy a valóság sokkal bonyolultabb, mint amilyen komplexitást az addigi kísérletek átfogni képesek. Nagyon tetszett, hogy a munka végén a szerzők nem bocsátkoztak csillogó, csodákat ígérő spekulációkba, megmaradtak azon a talajon, amit kísérleti eredményeik megengedtek, ez manapság meglehetősen ritka erény. Ami számomra leszűrődött, hogy nem ismerjük még mindig az ABCG1 szubsztrátját, amit megtalálni nem is lesz könnyű feladat, ha a korábban említett 100:2 találati arányra gondolunk. A közlemény technikai részét illetően, ugyan *post festam*, de megjegyzem, hogy nincs benne rövidítések jegyzéke, ami a területen mozgó olvasónak valószínűleg nem jelent semmi gondot, de a kívülálló számára nem mindig egyszerű követni a mondanivalót (Pl. azt csak remélem, hogy az ER endoplazmatikus retikulumot takar, de mi van, ha mást?)

#### 4.3.3. Az ABCA1 fehérje sejt felszíni expresszió változásainak vizsgálata (10. sz. közlemény)

Ez a munka, az eddig látott színvonalon, és logika mentén haladva, először, láthatóan nagyon sok munkával, létrehozta, kipróbálja a későbbi feladatok megoldásához szükséges eszközöket. Lehet, hogy egy “újszülöttnék minden vicc új” alapon, de én úgyesnek találtam hemagglutinin epitóp beépítését a fehérje érzékeny és szelektív azonosításának érdekében. Tekintettel arra, hogy erről a fehérjéről van a legkevesebb ismeret a dolgozatban szereplők közül, a munka ebben a fázisában nem jutott tovább, mint egy olyan kísérleti rendszernek a kialakításán, amivel megbízhatóan lehet detektálni az ABCA1 jelenlétét, funkcionálását a plazmamembránban. Gondolom, ezek a vizsgálatok a dolgozat benyújtása óta eltelt időben már előbbre is haladtak.

#### 4.4. Az ABC transzporterek védőhálója a szervezetben (11-13. sz. közlemények)

Ezek a fejezet három összefoglaló közleményre épül, amelyekben a szerző az irodalmi adatok, és saját vizsgálataik alapján arra a felismerésre jut, hogy a toxikus hatású anyagok, endo- és xenobiotikumok hatásának semlegesítésére a szervezet egy “kemoimmunitási” hálózattal rendelkezik. Bemutatja, hogy ebben hálózatban fontos szerepe van elsősorban a multidrog-, de más ABC transzportereknek is, amik többnyire a szervezet védelmi vonalaiban levő szövetekben fejeződnek ki. Ez egy érdekes gondolat. Ahogy én látom, alapvető különbséget jelenthet a két rendszer között, hogy az immunrendszer egy kezdeti, tanulási folyamat eredményeként alakul ki, és később a sejt genetikai apparátusát használja fel, a kemoimmunitási hálózat elemei pedig meglévő fehérjék, amiknek koncentrációja, aktivitása változhat a sejtben, és amik ellentétben az immunoglobulinokkal, kis szelektivitásúak, “tanulási” mechanizmusuk csak a saját szerkezetük és a membrán környezet által nyújtott fiziko-kémiai lehetőségekre korlátozódhat (Erről fentebb már említést tettem.) A szerző felveti, hogy a kemoimmunitás hasonlóan kettős jellegű, mint a klasszikus immunrendszer természetes, illetve adaptív volta, de inkább csak az természetessé való analógiát fejt ki. Az adaptív válaszok alatt a citotoxikus szerek, a hipoxia, a hő sokk (az utóbbira megadott hivatkozás sajnos szintén hipoxiára vonatkozik) hatására bekövetkező expresszió-, vagy aktivitás-beli változásokat ért, elismerve ugyanakkor, hogy ezek a változások az stresszre adott általános sejt válasz részei is lehetnek. Az összefoglaló közlemények, a számomra sajnos sokszor reménytelenül komplex, sejten belüli kölcsönhatásokat tisztán, világosan leírva, nagyon meggyőzően mutatják a pályázónak az általa vizsgált területen való kiemelkedő jártasságát.

## Összefoglalás

Összefoglalva bírálatomat, a dolgozat végén felsorolt 1-7 pontot új tudományos eredménynek fogadom el, a 8. pontot pedig olyan érdekes elgondolásnak, amely vezérelvként használva sokat segíthet az új összefüggések felismerésében. Ezenkívül szeretnék még egy általános megjegyzést tenni: Nagyon örömteli egy olyan dolgozatot olvasni, ami egy hazai kutatócsoport következetes, céltudatos, fokról-fokra haladó munkájából származik. Olyan munkából, ami van annyira intenzív, hogy felhelyezi az adott csoportot a világ tudományos térképére, és amely munkából a résztvevőknek életműve épül, ami igencsak különbözik a külföldi projektek morzsáiból sokszor itthon csak összerakott valamiktől. A fentiek alapján Homolya Lászlónak az Akadémia Doktora cím elnyeréséért pályázatának elfogadását és részére az MTA Doktora cím odaítélését javaslom.

Szeged, 2011. október 20.

*Balázs: Bal*