

Dr. Varga Zoltán MTA Doktori értekezésének bírálata

Dr. Varga Zoltán "Feszültség-függő ioncsatornák kapuzása és kölcsönhatása skorpió toxinokkal" címmel, 140 oldal terjedelemben nyújtotta be doktori értekezését. Az értekezés a feszültségfüggő kálium és nátrium csatornák szerkezetének, molekuláris mozgásainak pontos megértésére irányuló kiterjedt, tudományos szempontból rendkívül magasszintű, munka összefoglalása. A Bevezetés fejezet részletesen ismerteti a feszültségfüggő kálium és nátrium csatornák szerkezetének, működésének alapvető sajátosságait, az ezzel kapcsolatban rendelkezésre álló ismereteket valamint a nyitott kérdéseket. Az anyagok és módszerek fejezet szemléletesen és közérthetően mutatja be az alkalmazott technikákat, ezzel megkönnyítve a specializált technikákban nem jártas olvasó számára a bemutatott eredmények értelmezését. Különösen említést érdemel a feszültség-zár fluorometria és a Cut-open Oocyte Vaseline Gap feszültség-zár technika, amelyeket az ioncsatornák szerkezetének, működésének vizsgálatával foglalkozó laboratóriumok közül is csak nagyon kevés helyen alkalmaznak, és amelyeket Dr. Varga Zoltán Magyarországon elsőként honosított meg. Az Eredmények és Megbeszélés fejezet, tematikusan végighaladva, a kísérleti eredményeket azok értelmezésével együtt mutatja be, ami segíti az olvasót a bonyolult kísérleti protokollok motivációjának, illetve a mérési eredményekből levonható mechanisztikus következtetéseknek, megértésében.

Összességében a munka tudományos értéke világszinten is kiemelkedő, Magyarországon pedig egyedülálló. Az alábbiakban megfogalmazott kérdéseim, megjegyzéseim a munka tudományos értékét, illetve annak eredményeit, nem kérdőjelezik meg, inkább csak személyes kíváncsiságomat tükrözik. Ezek alapján a munkát az MTA Doktora cím megszerzésére messzemenően alkalmasnak tartom, és a nyilvános védés kitűzését javaslom.

I. Formai észrevételek:

Elírások:

7. oldal: "hat transzmembránból álló hélixet tartalmazó alegység"

7. oldal: "APT szenzitív"

17. oldal: a beillesztett 6. ábra eltakarja a szöveg egy részét

82. oldal: Table 3 – ilyen táblázatot nem találtam

72. B ábra: a fluoreszcencia jel pA-ben van megadva

Pontatlanságok:

8. oldal: "A Kir6.2 csatornák spontán nyitását az intracelluláris ATP szint emelkedése gátolja a szulfonilurea receptorokon keresztül." Valójában az ATP gátló hatását közvetlenül a Kir6.2 alegység citoszolikus doménjéhez kötődve fejt ki, a szulfonilurea receptornak a MgADP okozta csatorna aktivációban van szerepe.

Idegen szavak indokolatlan használata:

35. oldal: "fundamentális események"

Magyarázatot igénylő megállapítások:

41. oldal: "Mivel a HEK sejteken több ioncsatorna természetes, endogén expresszióját is leírták, a sejteken minden esetben outside-out patch konfigurációban végeztük az elektrofiziológiai méréseket."

54. ábra: CFSE – nincs definiálva

II. Tartalmi megjegyzések, kérdések:

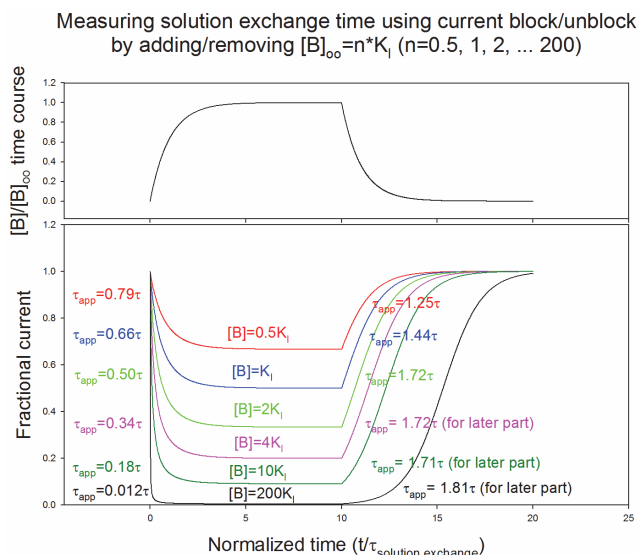
1.

Az 5.1 fejezetben a 27–31. ábrákon bemutatott kísérletek során többször említi az inaktiváció hatását a pórus záródására, de nem pontosítja, hogy N- vagy C-típusú inaktivációról van-e szó. Vajon ezek a mérések teljes hosszúságú csatornákon készültek, vagy N-terminálisan csonkított csatornákon, amelyek nem rendelkeznek inaktivációs peptiddel (Shaker IR)? Ezt érdemes lett volna tisztázni az 5.1 fejezet elején.

2.

64. oldal, 32. E-F ábrák: "Eredményeink azt mutatták, hogy a gátlás a rendszerünk időbeli feloldási határán belül kialakult, azaz igen gyors. A kimosás kinetikája szintén gyors volt, viszont konzisztensen lassabb, mint a gátlás kialakulásának kinetikája és szigmoid kinetikát követett. Bár nem bizonyítottuk további kísérletekkel, ennek lehetséges magyarázata, hogy több proton kötőhely van a szelektivitási szűrő intracelluláris bejáratánál, melyek közül egy betöltöttsége elegendő a gátlás kialakulásához."

Talán kézenfekvőbb a következő magyarázat. Az oldatcsere során a lecserélt ion (jelen esetben a proton) koncentrációja időben exponenciális lefutással áll be az új koncentrációra. A csatornaáram azonban nem-lineáris függvénye a proton-koncentrációnak, hanem a protonok okozta blokk nagyjából hiperbolikus telítési görbét követ (ld. 32. D ábra): $I/I_0 \sim K_I/([H^+] + K_I)$. Az áramgörbe időbeli lefutását tehát az $I(t) = I_0 \cdot K_I / ([H^+](t) + K_I)$ függvény írja le, ahol a protonkoncentráció időbeli lefutása $[H^+](t) = ([H^+]_0 - [H^+]_\infty) \cdot (\exp(-(t-t_0)/\tau)) + [H^+]_\infty$. Az áram nem-lineáris protonfüggése miatt a blokkoló protonok rámosásakor (pH=7.3 $\rightarrow$ pH=4.2 váltás) az áram az oldatcsere τ időállandójánál rövidebb időállandóval csökken, a protonok elmosásakor (pH=4.2 $\rightarrow$ pH=7.3 váltás) viszont csak késéssel, és az oldatcsere τ időállandójánál hosszabb időállandóval áll helyre. Ez az aszimmetria annál kifejezettebb, minél magasabb az alkalmazott protonkoncentráció a blokk K_I értékéhez képest. A 32. E-F ábrán pl. a blokkoló iont (a protont) a gátlást okozó K_I értéknél 200-szor magasabb koncentrációban alkalmazták ($K_I = 10^{-6.5}$ M, alkalmazott $[H^+] = 10^{-4.2}$ M), így a tapasztalt aszimmetria nem meglepő, hanem megfelel annak, amit egy szimpla egykötőhelyes blokk mechanizmus jósol (ld. illusztráció).



3. A 76-77. oldalon leírja, hogyan számolták ki a toxinkötődés illetve disszociáció sebességeit a mért áramgörbékéből. A 77. oldal tetején szereplő, a toxinkötődés sebességi állandóját kifejező egyenlet feltételezi, hogy a kötődés sebessége lineárisan függ az alkalmazott toxinkoncentrációtól. Ugyanakkor a toxinkötődés 77-78. oldalon leírt kétlépéses modellje azt jósolja, hogy a kötődés sebessége a toxinkoncentráció nem-lineáris, telíthető függvénye. Tapasztalták-e méréseikben a

kötődési sebesség telíthetőségét magas toxinkoncentrációk esetén, vagy mindig olyan alacsony toxinkoncentrációkkal dolgoztak, amelyek mellett a toxinkötődés diffúziógátolt, azaz a fenti egyenlet érvényes, maradt, mint pl. az 51. D ábrán?

III. Legfontosabb új megállapítások:

1. A Shaker kálium csatornában a hiperpolarizációt követően az aktivációs kapu záródása minden esetben megelőzi a VSD visszatérését. Fiziológias körülmények között az aktivációs kapu igen gyorsan záródik be, és a VSD visszatérése jóval lassabban ezt követően történik meg. Hosszú depolarizációt követően azonban az inaktiváció hatására a csatorna záródása lassúvá, s ezzel sebesség-meghatározóvá válik, ezáltal hátráltatva a VSD visszatérését a nyugalmi állapotba.
2. Az intracellulárisan a protonok már fiziológias pH tartományban is blokkolják a Shaker kálium csatornák pórusát, de kapuzásukat nem befolyásolják. Az extracelluláris protonok nem blokkolják a pórust, de – jóval alacsonyabb pH tartományban – felgyorsítják az inaktivációt.
3. A $K_v1.3$ csatornában az alacsony pH-n protonált H399-es aminosav gátolja a K^+ ionok mozgását mindkét irányba a pórus extracelluláris bejáratánál. Ez megmagyarázza a $K_v1.3$ csatorna inaktivációs kinetikájának fiziológias ionkörnyezetben megfigyelhető fordított extracelluláris pH függését (alacsony pH lassítja az inaktivációt).
4. A Vm24 toxin a $K_v1.3$ csatornák jelenleg ismert legnagyobb szelektivitású (szelektivitási hányados > 1500), és legnagyobb affinitású ($K_d \sim 3$ pM) gátlószere, amely in vitro hatékonyan gátolja a T-sejt aktivációt, in vivo pedig a késői hiperszenzitivitási reakciót, így immunszuppresszív terápiára alkalmas kiindulási molekulaként szolgálhat.
5. A vad típusú anurotoxin $K_v1.3$ csatorna iránti szelektivitását (a $K_v1.3$ csatornához képest) az N17A/F32T dupla mutáció három nagyságrenddel növeli, a hatást a toxinszerkezet merevségének növekedése okozhatja.
6. A szív feszültségfüggő nátrium csatornájában a négy feszültség szenzor domén mozgása az aktiváció és inaktiváció során is egymástól eltérő feszültségfüggést és kinetikát követ, amelynek részletei jelentősen eltérnek az izom nátrium csatornában leírtaktól. A szív nátrium csatornáiban a 4. feszültség szenzor domén határozza meg az inaktiváció kialakulását, míg 3. feszültség szenzor domén szabályozza az abból történő visszatérést.
7. Két Brugada szindrómát okozó Na csatorna mutáció egymástól eltérő mechanizmussal okozzák az ionáram aktivációjának lassulását.

Budapest, 2018. szeptember 17.

Csányi László