

Dr. Várnai Péter disszertációját a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Karának Élettani intézetéből nyújtotta be az MTA Orvosi Tudományok Osztályához. Tudományos kutatómunkáját nemzetközileg is magas szinten elismert kutató műhelyekben végezte olyan neves professzorok és kutatók irányításával, mint Spät András akadémikus, Hunyady László akadémikus és Balla Tamás az MTA külső tagja. Az itt felsorolt mentorokon felül a Spät iskolából kikerült, azóta komoly nemzetközi karriert befutó kutatókkal is szoros együttműködésben és nemzetközi kollaborációban végezte tudományos kutató munkáját. Ez utóbbiak közül kiemelném Hajnóczky Györgyöt és Rohács Tibort, akik jelenleg az Egyesült Államok különböző egyetemein professzorok.

A disszertáció kiváló példa a molekuláris biológiai módszerekkel előállított, fluoreszcensen jelölt molekulák használatára alapvető sejtbiológiai kérdések tisztázása során. A disszertációból kitűnik, hogy Várnai doktor nem a manapság divatos, nagy teljesítményű szűrő és vizsgáló módszerekre épülő, hipotéziseket alig tartalmazó irányt, hanem a számomra sokkal értékesebb, hipotézis vezérelt és célzottan tervezett vizsgálatokat végzett, melyek egyértelmű és világos következtetések levonását engedik meg. A disszertáció témáját illetően időszerű, a sejtek jelátviteli folyamatait, ezen belül is az inozitol lipidek és a Ca^{2+} jelátvitel molekuláris szintű vizsgálatát végezte el kurrens, az esetek nagy részében az általa kifejlesztett molekuláris szenzorok segítségével. A doktori disszertáció tudományos értéke tehát nem csak közvetlenül a disszertációban bemutatott eredményeket jeleni, hanem olyan molekuláris szenzorok előállítását, amellyel igen értékes eszközöket adott a szakterülettel foglalkozó kutatók kezébe. Ezek közül mindenképp kiemelném az inozitol lipid szenzorok, inozitol lipid szintet módosító molekulák és a rapamicinnel indukálható heterodimerizációs rendszerek kifejlesztését és azok célzott kifejezését a sejten belüli egyes kompartmentek vizsgálatához. A kifejlesztett módszerek tudományos értékét megítélésem szerint nagyon világosan mutatja közleményeinek igen magas idézettsége. A disszertációban bemutatott kísérletek nagy részének alapja a kifejezett fluoreszcenciás molekulák konfokális mikroszkóppal történő vizsgálata. A kísérletek tökéletes technikai kivitelezése nem csak lélegzetállítóan látványos képeket eredményezett, hanem a megfelelő kontroll elvégzésével, fontos következtetések levonására alkalmas kvalitatív és kvantitatív eredményeket adott. A fentebb említett technikai eljárásokat protein expressziós és *in vitro* ligand kötést mérő kísérletekkel kombinálta, melyek szervesen kiegészítik a sejtes kísérletekből kapott eredményeket és logikus következtetések levonását teszik lehetővé.

A disszertáció 18 *in extenso* közleményre alapszik, melyek 10 év kutatómunkájából származnak (1998-2008) és lektorált folyóiratokban kerültek közlésre. E közlemények közül 4 összefoglaló, a többi eredeti közlemény. A disszertáció alapját képező közlemények közül 11-ben Jelölt első ill. megosztott első szerző, ami hűen tükrözi a bemutatott eredményekhez történő jelentős hozzájárulását. A közlemények összesített impakt faktora 120,868, az ezen közleményekre kapott független idézetek száma 363. E közlemények egy része magas impakt faktorú, a szakterület meghatározó lapjaiban közölt cikkeket jelentik. A kiválasztott 5 legfontosabb közlemény mindegyikében első szerző, a cikkek a PNAS, J. Cell. Biol., J. Biol.Chem., J. Cell Sci. folyóiratokban

jelentek meg. Külön kiemelném, hogy disszertációban szereplő közleményeken felül még 24, a Ph.D. disszertáció megvédését követően publikált cikk szerzője, melyek a disszertációban bemutatottakhoz hasonlóan magas impakt faktorú folyóiratokban jelentek meg igen tekintélyes független idézettségi mutatóval (128,098 kumulatív impakt faktor és 1158 idézet).

A molekuláris szenzorok igen eredeti alkalmazása sejtbiológiai és molekuláris élettani szempontból megítélésem szerint az alábbi önálló új tudományos eredményeket adta:

1. Kimutatta, hogy a foszfolipáz C enzim PH doménjének PtdIns(4,5)P₂ kötése szükséges, de nem elégséges feltétele a domén és a plazmamembrán közötti kölcsönhatás kialakulásának.
2. A PH domén mutációs analízisével kimutatta, hogy a domén β6 és β7 redők közötti része az inozitol lipid kötésétől függetlenül szerepet játszik a PH domén és a membrán közötti kölcsönhatásban
3. Az Akt és a GRP1 fehérjék PH doménjében pontmutánsok létrehozásával bizonyította, hogy a funkcionálisan eltérő tulajdonságokért az inozitol lipid kötést nem érintő kölcsönhatások felelősek.
4. Igazolta a GRP1 PH doménje és az az Arf6 fehérje közötti kapcsolatot
5. Kimutatta, hogy az ER citoplazmatikus felszínére irányított InsP3 receptor ligandkötésért felelős doménjének C terimális, helikális része az endogén InsP₃ receptorokat aktiválja
6. A plazmamembrán PtdIns(4,5)P₂ szintjének kontrollálható csökkentésére alkalmas, rapamicin-indukált molekuláris kölcsönhatáson alapuló rendszert fejlesztett ki
7. A plazmamembrán PtdIns(4,5)P₂ szintjének akut csökkentésével a Ca²⁺-mobilizáló hormonnal létrehozott Ca²⁺-szignál, a Trp M8 ioncsatorna, valamint a transferrin és az EGF receptor endocitózisának PtdInsP₂ érzékenységet bizonyította.
8. Kimutatta, hogy a funkcionális CRAC csatorna kihalkításában a STIM és Orai1 fehérjéken kívül más, meghatározott geometriai feltételeknek eleget tevő fehérjének vagy fehérje komplexnek szükségszerűen részt kell vennie

A disszertáció magyar nyelven készült, 95 számozott oldalt és az öt legjobbnak ítélt közlemény különlenyomatait tartalmazza. Az irodalomjegyzék közel 100 irodalmi hivatkozást tartalmaz, melyek zöme az utóbbi tíz évből származik, ami a téma aktualitását hűen mutatja. A disszertáció elején megtalálható a rövidítések jegyzéke is, mely elősegítette a leírtak megértését. A disszertáció megértését 45 többpanelés, többségében színes ábra könnyíti meg. Az ábrák egy része a kutatás eredményei alapján kialakított modelleket mutatja be, ami hűen tükrözi a mű gondos megírására fordított erőfeszítéseket.

A disszertáció olvasását helyesírási hibák vagy szerkesztési hiányosságok nem nehezítik. Egy-két helyen található csak apró figyelmetlenségből adódó hiba vagy fogalmazási hiányosság amelyek részletezésétől a hibák elhanyagolható volta miatt eltekintek.

(2. Oldal: „domének felfedezése lehetővé utat nyitott „

4. oldal: „Az inozitol lipidek részt vesznek a legkülönbözőbb patológiai állapotok kifejlődésében is”-szokatlan fogalmazás

44. oldal: Az ER-hoz rányított mutáns ugyanis a Ca^{2+} -csúcs késén kívül

46. oldal: „Első menetben....”- szokatlan fogalmazás

22. ábra szövegében a 5. ábrára való utalás nyilvánvalóan az eredeti közlemény 5. ábrájára utal)

Általános észrevételek:

A disszertáció bevezetője tömör, lényegre törő, a megértéshez szükséges információt általában tartalmazza. Az inozitol lipidek kémiájában, azok egymásba történő átalakulásában és az egyes lépéseket katalizáló enzimekben nem készség szinten járatos bíráló számára hasznos lett volna egy olyan ábra elhelyezése a bevezetésben, mely a fentieket a 4. ábrától részletesebben mutatja be.

Az anyagok és módszerek fejezet kellő részletességgel mutatja be a használt módszereket, a megfelelő irodalmi hivatkozások beépítésével lehetőség nyílik a módszerek egyes speciális kérdéseinek tisztázására. Az oldatok ionösszetételének bemutatásakor talán célszerű lett volna az azonos összetételű oldatokat egy közös néven nevezni (pl. normál extracelluláris oldat) és így hivatkozni rá. Ezzel elkerülhető lett volna ugyanazon oldat többszöri felsorolása- ilyenkor ugyanis az olvasó ösztönösen korábbi oldatokhoz viszonyított különbséget keresi, s csak ezután jön rá hogy azonos oldatokról van szó. (pl. 10. oldal alulról 4. sor és 15. oldal alulról 12. sor). A 3.10 fejezetben hiányzik a mérőoldat összetétele, feltételezem az hasonló volt, mint a 3.8 fejezetben.

Az eredmények és megbeszélés fejezetek összevonását jó megoldásnak tartottam tekintve az alkalmazott módszerek és kísérletes problémák sokszínűségét, az egyes fejezetek így egy egységet alkottak, a fejezetek végein a szükséges mértékű diszkusszió megtalálható. Talán célszerű lett volna doktori mű végén egy egy-két oldalas szintézist adni, bár az „Új tudományos eredmények fejezet” ezt többé-kevésbé megteszi, a mű egyes fejezetei közötti összefüggéseket ez kevésbé világítja meg.

Tekintve azt, hogy a disszertáció háttérét adó közlemények magas impakt faktorú, nemzetközi, referált folyóiratokban jelentek meg ahol a szigorú szttenderdeknek az eredmények már megfeleltek, a részletes tartalmi bírálattól el lehet és el is kell tekinteni. Ennek megfelelően csak a disszertáció olvasása közben felmerülő egyes kérdéseimre, észrevételeimre vonatkozóan kérem Jelölt válaszait:

1. 24. oldal –membránlokalizáció vizsgálata FRET segítségével. A disszertációban azt írja, hogy „Amennyiben a CFP-vel és YFP-vel jelzett fehérjék 1:1 arányú expressziója elér egy bizonyos szintet, a plazmamembránhoz kötődő fehérjék esetében kialakul az energiatranszferhez szükséges molekuláris közelség”. Hogyan lehet eldönteni azt, hogy a FRET hiánya az alacsony expresszió következménye vagy a molekuláris asszociáció hiánya? Van-e olyan objektív paraméter amivel az expresszió elégséges szintjét meg lehet határozni?

Mekkora becsült membránfelszíni sűrűség kell ahhoz, hogy a random FRET kialakulhasson, tekintve a FRET igen szigorú távolság-függését?

2. 10. ábra. Az 1. és 4. sor paneljeinek összehasonlításakor az számomra az látszik, hogy az ET igen érzékenyen jelezte az Ionomycin hatását, azaz az asszociáció csökkenését. Ezzel szemben a konfokális képen a PLC δ_1 PH-GFP szabad szemmel is azonosítható membrán jelet adott, ugyanakkor a p130 95-164/PLC δ_1 (71-170) PH-GFP esetén a konfokális képen a kontrol körülmények közt és az ionomicin kezelést követően felvett képek között nem szembetűnő a különbség, holott itt is azt várná az olvasó hogy a kiméra membrán lokalizációt mutat. Alkalmaztak-e objektív mérőszámot a membránlokalizáció/citoplazmatikus lokalizáció arányának összevetésére? Befolyásolhatta-e a FRET eredményeket a citoplazmában található kiméra fehérjék jelenléte?
3. A membrán asszociációban szerepet játszó 8 aminosavból álló minimális domén a kísérletek alapján egyértelműen befolyásolja a PH-doménnel rendelkező fehérjék kötődését a membránhoz. A kötődés molekuláris mechanizmusára vonatkozóan születtek-e újabb eredmények a disszertáció beadása óta?
4. a 12. ábra B panelje azt mutatja, hogy mind a PLC δ_1 PH-GFP mind pedig a PLC δ_4 PH-GFP szignálból számított fluoreszcencia hányados időfüggő. A hányados csökkenése hasonló kinetikát mutat, a hányados visszatérése azonban kinetikailag eltérőnek látszik. Volt-e statisztikailag szignifikáns különbség a két kinetika között, ha igen, mi lehet a kinetikai különbség magyarázata? Talán az, hogy a PLC δ_4 PH-GFP esetén a membránhoz való visszakötődés a gyorsabb? Vagy a sejtek eltérő kinetikával szintetizálták újra a lebomlott inozitol lipideket?
5. 14. és 15. ábrák. azon esetekben ahol az inozitol ipidek kötésére képtelen mutánsok is jelentősen befolyásolták a sejtek választ (pl. ARNO-PH (3G)) nem-specifikus, talán a fehérjék overexpressziójával magyarázható hatásról lehet szó. Mi erről a Jelölt véleménye?
6. 22. ábra B panel: a 0,467 és a 0.261 r^2 értékek elég alacsonynak tűnnek ahhoz, hogy a fehérje expresszió és a Ca²⁺ jel késése közötti korrelációt egyértelműen megállapítható legyen.
7. Az ER citoplazmatikus felszínére irányított IP₃R-LBD-vel végzett kísérletek egyik sarkalatos pontja, hogy az LBD valóban az ER citoplazmatikus felszínére kerül. Igazolták-e ezt valahogy? Vagy a konstruktból egyértelműen következik a citoplazmatikus felszínre történő lokalizáció? Esetleg fluoreszcencia quenchinggel igazolni lehetne a megfelelő orientáltságú elhelyezkedést?
8. Amint az a disszertációban olvasható az IP₃R-LBD 427-605 közötti helikális szegmense egy homotetramer csatorna esetén akár az alegységen belül, akár egy szomszédos alegységben a csatorna funkcióért felelős részt aktiválhatja. A bemutatott kísérletek esetében véleményem szerint egyik mechanizmus sem lehetséges, a homotetramer csatornához valamilyen módon asszociálódó, csak a LBD megfelelő részét tartalmazó ER targetált fehérje hozza létre a csatorna rész aktiválását. Mit gondol, lehet-e ebből az információból következtetést levonni arra, hogy az LBD helikális része a homotetramer csatorna felszínéhez kötődik? Lát más lehetőséget is arra hogy az ER targetált fehérje LBD-je a homotetramer csatorna más részéhez kötődhessen?
9. A 31. ábra értelmezéséhez utalni kellett volna arra, hogy TRMP-8 csatorna azon csatornák egyike, melynek aktivitásához a plazma membrán PtdIns(4,5)P₂ nélkülözhetetlen, azaz nem csak egy véletlen hatás

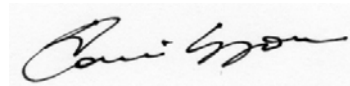
ismertetéséről van szó, hanem egy stratégiailag kiválasztott csatornáról (TRMP8), és egy korábban ismert jelenség mechanizmusának egyértelmű tisztázásáról (TRMP-8/PtdIns(4,5)P₂)

10. A disszertáció fénypontja számomra kétségtelenül a kapacitív Ca²⁺ beáramlás mechanizmusának vizsgálata volt. E vizsgálatokban a disszertáció korábbi fejezeteiben bemutatott molekuláris interakciós vizsgálatokat Jelölt szellemesen kombinálta, ill. kiegészítette TIRF mikroszkópos vizsgálatokkal. A téma vizsgálata során egyik meghatározó felfedezése az volt, hogy a kapacitív Ca²⁺ beáramlásért felelős molekuláris komplex a Stim1 és Orai1 molekulákon kívül egyéb fehérjéket is tartalmaz. A Stim1-Orai1 által kialakított CRAC csatorna vizsgálata az egyik leggyorsabban fejlődő ága az ioncsatorna kutatásnak. Arra lennék kíváncsi, hogy a Jelölt által jósolt komplex elemeit sikerült-e azóta azonosítani?

A fenti kérdések/megjegyzések érdemben nem befolyásolják Jelölt tudományos eredményeinek igen pozitív megítélését. Összefoglalásképp megállapítható, hogy az MTA doktori cím megszerzésének feltételeit a disszertáció alapján magasan teljesítette. Javaslom a disszertáció nyilvános vitára történő kitűzését és sikeres védés esetén az MTA doktori cím odaítélését.

Végezetül szeretnék gratulálni a példamutatóan magas szintű kutatómunkához, és további sikeres munkát kívánok!

Debrecen, 2011. március 04.



Panyi György
az MTA doktora