

## Opponensi vélemény

dr. Várnai Péter: *MOLEKULÁRIS KÖLCSÖNHATÁSOK SZEREPE EMLŐS SEJTEK JELÁTVITELI OLYAMATAIBAN*

című MTA Doktori Értekezéséről

Dr. Várnai Péter MTA Doktori Értekezésének témáját az 1998 óta végzett kutatásai képezik. Jelölt ezen időszakból – a 2002 és 2008 közötti évek – választotta ki azon munkáit, melyekben az inozitol lipidekhez köthető jelátviteli útvonalakat, az egyes útvonalak aktiválódása során kialakuló molekuláris kölcsönhatásokat vizsgálta. Értekezésében Jelölt tematikus felosztásban ismerteti az adott témában megjelent munkái közül a legfontosabbnak ítélt öt közlemény eredményeit. A disszertáció összességében 18 *in extenso*, nemzetközi lektorált folyóiratban megjelent közleményre alapszik. E közlemények közül 4 összefoglaló, a többi eredeti közlemény. A disszertáció alapját képező közlemények közül a Jelölt 11-ben első vagy megosztott első szerző, ami hűen tükrözi a bemutatott eredményekhez történő jelentős hozzájárulását. A közlemények kumulatív impakt faktora 120,868, az ezen közleményekre kapott független idézetek száma 363. A közlemények közül több igen magas impakt faktorú, a szakterület meghatározó folyóirataiban került közlésre. Külön kiemelendő, hogy a megjelölt öt legfontosabb közlemény mindegyikében Jelölt első szerző, s ezek a cikkek a PNAS, J Cell Biol, J Biol Chem, J Cell Sci folyóiratokban jelentek meg. Fontosnak tartom kiemelni azt is, hogy disszertáció alapját képező közlemények mellett Jelölt további 24, a PhD disszertáció megvédését követően publikált cikk társszerzője, melyek a disszertációban bemutatottakhoz hasonlóan magas impakt faktorú folyóiratokban jelentek meg, igen tekintélyes független idézettségi mutatóval (128,098 kumulatív impakt faktor és 1158 idézet).

Jelölt tudományos munkáját kiterjedt nemzetközi együttműködésben és nemzetközileg is magas szinten jegyzett kutató műhelyekben végezte. Munkatársai között számos hazai – Spät és Hunyadi professzorok –, valamint az Amerikai Egyesült Államokban dolgozó – Balla és Hajnóczky professzorok –, saját iskolát teremtő, az adott szakterületen nemzetközileg is meghatározónak tekintett mentor található. Jelölt a hazai kutatólaboratóriumban végzett munkáját jól ötvözte ezen nemzetközi kollaborációkkal. Ez a kiterjedt együttműködés lehet a magyarázata, hogy Jelölt egyetlen olyan közleményt sem szerepeltet a Disszertációt megalapozó publikációk listáján, melynek utolsó szerzője lenne, ugyanakkor a közlemények több mint felében első szerző.

Az értekezés, a 101 irodalmi hivatkozást felsorakoztató Irodalomjegyzéken kívül, 82 oldalon, 45 ábrával illusztrálva, részletesen tárgyalja a munka célkitűzéseit, az alkalmazott módszereket és az

elért eredményeket. A rövid irodalmi összefoglalás után Jelölt ismerteti célkitűzéseit, az alkalmazott módszerek fontosabb elemeit, majd kitér a kísérletek eredményeinek és az azokból levonható következtetések felsorolására. Az eredmények tárgyalásakor, tematikusan csoportosítva, az adott témához kapcsolódó fontosabb megállapítások kerülnek bemutatásra, gazdagon illusztrálva és részletesen diszkutálva. Külön kiemelendő a bemutatott ábrák igényes szerkesztése, és az a tény, hogy Jelölt az eredményeket közvetlenül bemutató ábrák mellett számos magyarázó, értelmező sémás ábrát is közöl.

A molekuláris biológia eszköztárának és az élettani vizsgálómódszereknek tervszerű alkalmazásával és szerencsés kombinálásával szerzett ismeretek közül, megítélésem szerint, az alábbiak tekinthetők önálló, **új tudományos eredményeknek**:

1. Kimutatta, hogy a PLC enzim PH doménjének PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> kötése szükséges, de nem elégséges feltétele a domén és a plazmamembrán közötti kölcsönhatás kialakulásának.
2. Rámutatott, hogy a PH domén  $\beta 6$  és  $\beta 7$  redők közötti része az inozitol lipid kötésétől függetlenül szerepet játszik a PH domén és a membrán közötti kölcsönhatásban.
3. Bizonyította, hogy az Akt és a GRP1 fehérjék PH doménjében a funkcionálisan eltérő tulajdonságokért az inozitol lipid kötést nem érintő kölcsönhatások felelősek, valamint kimutatta a GRP1 PH doménje és az Arf6 fehérje közötti kapcsolatot.
4. Igazolta, hogy az ER citoplazmatikus felszínére irányított humán 1-es típusú IP<sub>3</sub> receptor N-terminális, ligandkötésért felelős doménjének helikális része az endogén IP<sub>3</sub> receptorokat aktiválja.
5. Kifejlesztett egy rapamicin-indukált molekuláris kölcsönhatáson alapuló rendszert, mely alkalmas a plazmamembrán PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> szintjének szabályozható csökkentésére. A módszerrel igazolta Ca<sup>2+</sup>-mobilizáló hormonnal létrehozott Ca<sup>2+</sup>-jelnek, a Trp M8 ioncsatornának, valamint a transferrin és az EGF receptor endocitózisának PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> érzékenységét.
6. Kimutatta, hogy a funkcionális kapacitív Ca<sup>2+</sup>-beáramlásért felelős molekulakomplex kialakításában a STIM és Orai1 fehérjéken kívül más, meghatározott méretű fehérjének vagy fehérje komplexnek kell részt vennie.

A disszertáció nem tartalmaz az olvasást zavaró mennyiségben helyesírási hibákat vagy szerkesztési hiányosságokat. Egy-két helyen található csak apró figyelmetlenségből adódó hiba vagy fogalmazási pontatlanság. Ezek részletes felsorolásától eltekintek, azokat a disszertációban megjelöltem, alant csak néhány példát ragadtam ki.

2. oldal: Bár van rövidítések jegyzéke, találhatóak olyan rövidítések, melyek sem abban nincsenek benne, sem a szövegben nem kerülnek értelmezésre.

2. oldal: „domének felfedezése lehetővé utat nyitott”

8. oldal: „molekulák plazmamembrán lokalizációs képessége”

11. oldal: „csatornák közötti átbeszélést” és „az átbeszélés ne okozzon”

12. oldal: „protonnal jelzett inozitollal” – nem igazán érthető, hogy ez a módszer hogyan működik

13. oldal: „A kísérlet során három párhuzamossal dolgoztunk”

6. ábra szövegében „mint a bound 0 %-át ábrázoltuk”

22. ábra szövegében az 5. ábrára történő utalás nyilvánvalóan az eredeti közlemény 5. ábrájára utal

23. ábra szövegében a 21. ábrára történő utalás helyesen a 22. ábrára kellene utaljon

66. oldal „a YFP-STIM1 molekula jellegzetes változást mutatott”

### **Általános észrevételek:**

Az értekezés a hagyományos felépítést követi. A tömör, lényegre törő, a megértést nagyban elősegítő **Bevezetés** tartalmazza azokat az információkat, melyek szükségesek ahhoz, hogy egy, a témában kevésbé jártas olvasó is eligazodhasson az eredmények ismertetése során. A megfogalmazott **Célkitűzések** világosak, és koherens módon jelölik ki azokat a feladatokat, melyeket Jelölt maga elé tűzött a kísérletek megkezdése előtt. A **Módszerek** fejezet kellő részletességgel mutatja be a használt módszereket, a körültekintően elhelyezett irodalmi hivatkozások pedig lehetőséget adnak az alkalmazott technikák részleteinek tisztázására is. Jelölt jól áttekinthető táblázatokban mutatja be a különböző, expresszálni kívánt fehérjék szekvenciái hozzáféréseinek helyeit, valamint a tenyésztés körülményeit. Nem alkalmazza ugyanakkor a táblázatos megoldást a használt oldatok és antitestek esetén. Az **Eredmények** és **Megbeszélés** fejezetek összevonása elfogadható, hiszen Jelölt az elért eredményeit tematikus egységekben tárgyalja, melyek végén a szükséges mértékű diszkusszió megtalálható. Egyedül az kifogásolható, hogy így nem kerül sor egy olyan összefoglalásra, mely szintetizálná az egyes alfejezetekben megismerteket.

Tekintettel arra, hogy a disszertációt megalapozó közlemények magas impakt faktorral rendelkező, rangos, nemzetközi, referált folyóiratokban jelentek meg ahol a szigorú elvárásoknak az eredmények már megfeleltek, a részletes tartalmi bírálatra, véleményem szerint, nincs szükség. Ennek megfelelően csak a disszertáció olvasása közben felmerülő egyes kérdéseimre, észrevételeimre vonatkozóan kérem Jelölt válaszait.

## Konkrét kérdések:

1. Jelölt a 26. oldalon azt írja, hogy „a PLC $\delta_1$ PH C-terminális részével a p130PH szép plazmamembrán lokalizációt mutatott (10. ábra felülről negyedik sor)”. Ez az opponens nem igazán látja ezt a szép lokalizációt a 10. ábra negyedik sorában. Nem lehetett volna valamilyen módon számszerűsíteni a plazmamembrán vs. citoplazmatikus lokalizációt? Milyen feltételek teljesülése esetén tekintette Jelölt egy fehérje jelenlétét a plazmamembránban meghatározónak?
2. A 4.1.5 fejezetben Jelölt a PLC delta 1-es és 4-es izoformái PH doménjének inozitol-foszfát kötését és membránlokalizációját vizsgálja. Mi indokolta a PLC delta 1-es izoformájának vizsgálata mellett pont a 4-es izoforma kiválasztását? Miért nem került sor a 3-as izoforma vizsgálatára?
3. Jelölt a 14. ábrán a PtdInsP<sub>3</sub>-kötő PH domének hatását vizsgálta a sejtek letapadására. Nem teljesen világos miért nincs különbség az ARNO-PH-val és ARNO-PH (3G)-val valamint a Btk-PH-val és Btk-PH (R28C)-val kapott értékek között. Az is több magyarázatot kívánt volna, hogy az ARNO-PH esetén miért nem az Akt-PH vagy Btk-PH esetén kapott értékhez hasonló adatot kaptak. Az ábrán a szignifikáns különbségek jelzése is szerencsés lett volna.
4. Hasonlóan, a 16. ábrán is jó lett volna, ha feltüntetésre kerültek volna a szignifikáns különbségek. Így ugyanis nem érthető mi a különbség a két +wm oszlop adatai között.
5. A 22. ábra A részén talán szerencsés lett volna megadni a színskála kalibrációját. A B panel grafikonjain nem érthető miért csak a „vad típusú” sejtek között vannak olyan sejtek, amelyek nem válaszolnak („no resp”) az ATP adagolásra [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> növekedéssel. Jelölt nem ad semmilyen bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a kapott korrelációs együtthatók szignifikánsan különbözőek-e. Arra sincs bizonyíték a szövegben, hogy a kapott korrelációk azt igazolják, hogy fennáll a kapcsolat az mRFP fluoreszcencia és a Ca<sup>2+</sup> tranziensek time-to-peak értékeiben bekövetkező változás között.
6. Az 51. oldalon Jelölt az IP<sub>3</sub> és a rianodin receptorok szerkezeti hasonlóságai alapján az egyes analóg domének funkcionális szerepének esetleges azonosságára hívja fel a figyelmet. Van esetleg valamilyen irodalmi adata, vagy saját mérésen alapuló megfigyelése, mely erre utalna?
7. A 37. ábra B részén Jelölt fluoreszcensen jelölt STIM1 fehérje expressziójának hatását mutatja be ATP adagolással kiváltott Ca<sup>2+</sup> tranziensekre. Jelölt véleménye szerint mi magyarázhatja a magasabb expressziót mutató sejtek esetén kialakuló oszcillatorikus [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> változásokat? Jelentheti-e ez a megfigyelés azt, hogy az Orai1 molekulák jelentősen nagyobb számban vannak

jelen mint a STIM1 molekulák, s így a STIM1 overexpressziója hatásosabb kommunikációt valósít meg az ER és a plazmamembrán között? Próbálták-e meghatározni, hogy milyen mértékű STIM1 és Orai1 expresszióra van szükség ahhoz, hogy ezek az oszcillációk kialakulhassanak? Előidézhetőek-e az oszcillációk, ha csak az Orai1 molekula expressziója jelentős?

8. Mi magyarázhatja azt a megfigyelést, hogy egyes sejteken eltérő vándorlási kinetikát mutatnak a STIM1 molekulák (38. ábra)? Történtek-e próbálkozások arra, hogy a STIM1 motilitását, illetve annak sebességét (a molekula laterális diffúzióját) közvetlenül meghatározzák? Mi a véleménye a Jelöltnek, befolyásolja-e a STIM1 molekulák motilitását expressziójuk szintje?
9. Jelölt a „rapa-foltok”, a STIM1 és az Orai1 molekulák relatív elhelyezkedése alapján arra a következtetésre jut, hogy az ER és a felszíni membrán távolsága olyan, hogy a „rapa-foltok” területén túl közel kerülnek egymáshoz ahhoz, hogy oda az Orai1 molekulát is magába foglaló molekulakomplex beférjen. Tekintettel arra, hogy fiziológiai körülmények között az Orai1 és STIM1 molekulák interakciója megvalósul feltételezhető, hogy az említett két membrán távolsága normál körülmények között a Jelölt által megadott 10 nm (45. ábra) körüli. Mi Jelölt véleménye arról, hogy hogyan lép kölcsönhatásra a PM-FKBP-mRFP és az ER-FRB-CFP ilyen körülmények között, hiszen kétségkívül rövidebbek, minthogy átérjék ezt a távolságot. Jelentheti-e ez azt, hogy az ER és a plazmamembrán távolsága helyfüggést mutat? Lehet-e ennek a helyfüggésnek szerepe abban, hogy a STIM1 és Orai1 molekulák csak preferált helyeken – punkta – lépnek kölcsönhatásra egymással?

A fenti, lényegi problémát nem érintő kérdések véleményem szerint nem befolyásolják Jelölt tudományos eredményeinek igen pozitív megítélését, valamint azt a megállapítást, hogy az értekezés minden szempontból megfelel az MTA Doktori Tanácsa által támasztott követelményeknek és illeszkedik a nemzetközi tudományos tendenciákhoz. Jelölt célkitűzéseit megvalósította, s tudományos eredményeivel bizonyította nemzetközi szintű tudományos munkára és munkacsoport irányítására való alkalmasságát. Mindezek alapján **a nyilvános vita kitűzését és az MTA doktora fokozat odaítélését támogatom.**

Debrecen, 2011. március 31.

---

Dr. Csernoch László  
egyetemi tanár  
az MTA doktora