

Opponensi vélemény

Dr. Csanády László "Az ioncsatorna-enzim határmezsgye: egyedi CFTR és TRPM2 csatornák szerkezete, működése" című MTA Doktori értekezéséről

Dr. Csanády László MTA doktori értekezése két témakörben elért kutatási eredményeit foglalja össze, a CFTR, valamint a TRPM2 csatornák szerkezetének és működésének összefüggését vizsgálja. A dolgozat 17 tudományos közleményre épül, a jelölt az adott (PhD. fokozat megszerzését követő) periódusban további 12 referált folyóiratban megjelent közlemény és 2 könyvfejezet szerzője. A jelölt hivatalos tudományometriai paraméterei jóval meghaladják az MTA doktori fokozat megszerzéséhez szükséges határokat, 31 eredeti közlemény, 171 összesített IF, 700 feletti független és 800 feletti összes idézettség, 15-ös H index. Véleményem szerint azonban e számértékek nem tükrözik teljes egészében a tudományos teljesítményt. Úgy gondolom érdemes kiemelni, hogy dr. Csanády László az értekezés alapjául szolgáló közlemények közül csak egyben nem kiemelt szerző, emellett a disszertáció végén felsorolt további publikációkban is többségben vannak az első és utolsó szerzős közlemények. Mi több, 2000-ben postdoc-ként megérkezve a CFTR kutatások egyik vezető műhelyébe, a David Gadsby által vezetett munkacsoportba a New-York-i a Rockefeller Egyetemen, egyedüli szerzős közleménye jelent meg az egycsatornás mérések matematikai analíziséről a Biophysical Journal folyóiratban. Másik fontos értékelendő szempontnak tartom, hogy tanulmányútjáról hazatérve, a Semmelweis Egyetem Biokémiai Intézetében is folytatni tudta a New York-i periódushoz hasonló színvonalon kutatómunkáját. Ehhez nyilván elengedhetetlen volt több nemzetközi (Howard Hughes, Wellcome Trust, NIH) valamint hazai (MTA Lendület, OTKA) pályázati támogatás elnyerése, és a külföldi műhellyel való fenntartott kollaboráció. Ugyanolyan fontos volt azonban, hogy Dr. Csanády László bizonyította, nemcsak egy jól működő munkacsoport hasznos, önálló munkát is végezni képes tagjaként, hanem egy újonnan létrehozott labor vezetőjeként is megállja a helyét. Nem tartozik közvetlenül a tudományos munka/teljesítmény megítéléséhez, mégis érdemes megemlíteni, hogy a kutatások mellett az egyetemi graduális és posztgraduális (PhD) képzésben is aktívan részt vesz.

Magára az értekezésre rátérve, az írásmű 122 számozott oldalból áll, az előírásoknak megfelelően tagolt, áttekinthető, gondolatmenete jól követhető. Formai szempontból is kifogástalan, mindenben megfelel az MTA Doktori Értekezéssel szemben támasztott követelményeknek.

A *Bevezetés*ben röviden jellemzi a sejtmembránon keresztüli különböző transzportformákat külön exponálva a dolgozat egyik fontos elméleti kérdését, a csatornák egyensúlyi/nem egyensúlyi kapuzását (ez egy lényeges tartalmi kérdés lesz a dolgozatban), majd két fő kutatási témának megfelelően részletesebben bemutatásra kerülnek a vizsgált CFTR és TRPM2 csatornák. Mindkét csatorna esetében ez a bemutatás elsősorban a szerkezet-funkció jellegzetességeire összpontosít, talán a CFTR esetében e bevezetésben érdemes lett volna egy a félmondatos említésnél bővebben írni arról, hogy a mutáció(k) jelentősen befolyásol(hat)ják a csatorna megfelelő feltekeredését, degradációját, sejtfelszínre való kijutását, sejten belüli sorsát. Annak ellenére, hogy a saját funkcionális vizsgálatok nyilván a sejtfelszínen

megjelenő CFTR-t célozzák e kérdés -fontossága miatt- megérdemelt volna egy további bekezdést.

A *Célkitűzések* fejezet világosan megfogalmazza és "felvezeti" a későbbi *Eredmények* fejezetben kifejtett kérdéseket.

Az *Alkalmazott Módszerek* ismertetése megfelelő, egyértelműen tükrözi azt a körültekintést és precizitást, ami az egész kísérleti munkát is jellemzi. A "gyári tiszta" vegyszerek ellenőrzése, majd e teszten "megbukott" nukleotidok tisztítása jó példája annak, hogy megfelelő gondossággal hogyan lehet elkerülni hibákat és az azokból adódó téves következtetéseket. Külön alfejezetben szerepelnek itt azok az igen hasznos, a jelölt által kidolgozott, alkalmazott majd közkinccsá tett matematikai analízisek, melyek nagyban segítik az egyedi (vagy több) csatornás mérések kiértékelését, valamint a különböző kinetikai modellek statisztikai rangsorolását.

Az *Eredmények és Megbeszélések* közös fejezetben a végigkövethetjük azokat a vizsgálatokat egyben gondolatmeneteket melyek meggyőzően alátámasztják és bizonyítják a következtetéseket, melyek néhol "csak" gazdagítják ismereteinket, néhol viszont alapvetően változtatták meg a folyamatokról korábban alkotott képet, ezáltal új perspektívát nyitva mind elméleti vonalon, mind a farmakológiai megközelítés számára. E kérdésekre a véleményem szerint legfontosabb új eredmények pontban részletesebben visszatérek.

A dolgozat befejezéseként a *Köszönetnyilvánítást*, az *Irodalomjegyzéket*, ill. a *Saját közlemények jegyzékét* olvashatjuk.

Az Eredmények rész egyes alfejezeteinek megfelelően tulajdonképpen több pontban is fel lehetne sorolni a jelölt új eredményeit. Ezek közül véleményem szerint a legfontosabbak (közülük néhány csoportosítva) a következők:

- 1/ Molekuláris biológia és elektrofiziológiai módszerek kombinálásával feltérképezte és pontosította a CFTR molekula doménszerkezetének határait. kimutatta, hogy a külön fehérjeként kifejezett domének működőképes csatornává tudnak összeállni.
- 2/ A regulátoros (R) doménről kimutatta, hogy alapvetően gátolja a csatornaműködést és ezt a hatást szüntetik meg a PKA hatására több helyen bekövetkező szabályozó foszforilációk.
- 3/ Kimutatta, hogy a PKA egyik célpontja a 786-os szerin foszforilációja következtében lerövidül csatorna átlagos nyitvatartási ideje és ez vezet a csatorna makroszkópos áramának (ill. aktiválhatóságának) csökkenéséhez.
- 4/ Igen fontos eredménynek tartom, annak bizonyítását, hogy a CFTR kapuzása nem egyensúlyi folyamat. A csatorna a megnyílását eredményező ATP-kötést követően mindaddig nyitva van, amíg az ATP nem hidrolizál, tehát az enzimátikus folyamat és a kapuzás szigorúan kapcsolt. Ez a felismerés alapvetően megváltoztatta a CFTR kapuzásáról korábban elfogadott elképzelést és termodinamikai megfontolásokat követően iránymutatást jelent arra, hogy milyen módon befolyásolható a csatorna aktivitása.
- 5/ Kimutatta, hogy a TRPM2 csatorna működését az intracelluláris $[Ca^{2+}]$, az ADP ribóz (ADPR) valamint a sejtmembrán PIP_2 szintje szabályozza. Tekintettel arra, hogy a TRPM2 Ca^{2+} -kötő helyei a csatorna pórusának belső szájadékához közel helyezkednek el (és a nyitott csatorna Ca^{2+} -ra permeábilis), az aktív állapotot az EC térből való Ca^{2+} beáramlás is fenntarthatja. Számos további -sejtes rendszerben

nyert- eredmény alapján a TRPM2 szabályozójának vélt anyag (H_2O_2 , cADPR stb.) hatása indirekt.

6/ Többféle megközelítéssel egyértelműen cáfolta, hogy a TRPM2 ADPR hasítása és kapuzása kapcsolt folyamatok lennének. A kapuzás tehát az esetleges enzimaktivitástól (ADPR hasítástól) független, egyensúlyi folyamat ennek megfelelően célszerű tervezni működésének farmakológiai szabályozását.

Mivel az eredmények és azok megbeszélése teljes mértékben meggyőző, kérdéseim inkább a továbbgondolkodás, és a szerző által előrevetített gyakorlati jelentőség vonatkozásában lennének:

Kérdések:

- 1/A cisztikus fibrózis viszonylagos gyakorisága és a betegség súlyossága érthetővé teszi, hogy miért folynak génterápiás és velük párhuzamosan intenzív gyógyszeres próbálkozások a hibás transzportfehérje funkció helyreállítására. Ez utóbbiak a "korrektorok" ill. "potenciátorok" a mutáns gén által kódolt fehérje más-más természetű hibáját célozzák meg. Vannak már klinikai fázisban is alkalmazott "potenciátorok". Van-e esetleg olyan vizsgálat, ami ezeknek (pl: Ivacaftornak (1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide), vagy egyéb szernek) csatorna kapuzására kifejtett hatását elemzi a dolgozatban leírt részletességgel? Miért pont az NPPB molekula hatását elemezték ennyire behatóan, amikor annak egyaránt vannak (eltérő végső hatást eredményező) pórusblokkoló, ill. kapuzást befolyásoló tulajdonságai is.
- 2/ Ismereti szerint a "corrector", ill. "potenciátor" effektusok között van-e, és ha igen, milyen az összefüggés. A mutáns csatornákra ható különböző támadáspontú vegyületek befolyásolják-e egymás hatásait?
- 3/ Az ABC transzporterek közül az MDR és MRP család tagjai számos, élettani és orvosi terápiás szempontból is igen fontos szerepet játszanak. Működésük, az általuk katalizált transzportfolyamatok követésére csak sokkal kisebb időbeli felbontással van mód, mint ami az akár milliszekundumos tartományban vizsgálható egy-csatorna áramok esetében lehetséges. Érdekes felvetés, hogy a szerkezetileg rokon CFTR-en megismert törvényszerűségek esetleg modellként szolgálhatnak az MDR-MRP fehérjék működésének tisztázásához. Van-e a jelöltnek ismerete arról, hogy éltek-e már ezzel a lehetőséggel, tehát modellként való alkalmazásról, ill. azon alapuló eredményről/következtetésről számolt-e már be valaki?

Az érdeklődő kérdések után véleményemet összegezve Dr. Csanády László értekezése egy eddig is sikeres és ígéretes kutatói munka összefoglalása, ezért a nyilvános vitára bocsátását valamint a jelöltnek az MTA Doktori fokozat megítélését javaslom, és támogatom.

Budapest, 2015. szeptember 16.

Dr. Enyedi Péter
Az Orvostudomány doktora