

Dr. Csanády László: Az ioncsatorna-enzim határmezsgye: egyedi CFTR és TRPM2 csatornák szerkezete, működése

c. MTA doktori értekezésének bírálata

Ezúton is köszönöm a lehetőséget és a megtiszteltetést, hogy Dr. Csanády László MTA doktori disszertációjának értékelésében a bíráló feladatát elláthatom. A bírálói feladatot azért látom el örömmel, mert jól ismerem Dr. Csanády kiváló kutatómunkáját, hosszú évek óta figyelem érdeklődéssel az általa vizsgált szerkezet-funkció összefüggéseket. Nem régen pedig Ph.D. hallgatójának disszertációját, ill. Jelölt habilitációs téziseit volt szerencsém részletesen átnézni opponensi minőségben, azaz a az MTA doktori disszertációban leírt kísérleti eredmények egy részének igen részletes elemzésére is már módom nyílt.

Dr. Csanády László disszertációját a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Karának Orvosi Biokémiai intézetéből nyújtotta be. Tudományos kutatómunkáját nemzetközileg is magas szinten elismert kutató műhelyekben végezte olyan neves professzorokkal és kutatókkal együttműködésben mint pl. David Gadsby (The Rockefeller University, New York). Csanády Dr.-nak lehetősége nyílt arra is, hogy már PhD tanulmányait Prof. Gadsby laboratóriumában végezze, ami igen komoly lökést adott tudományos karrierjének, amely lehetőséggel kiválóan élt.

A disszertáció kiváló példa a molekuláris biológiai módszerekkel előállított, módosított ioncsatornák használatára alapvető biofizikai, élettani sejtbiológiai és farmakológiai kérdések tisztázása során. A disszertációból kitűnik, hogy Csanády 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. Csanády Dr. szakmai munkájából kiemelem, hogy modern, a kor kihívásainak megfelelő ioncsatorna szerkezet-funkció vizsgálatokat végzett két olyan ioncsatorna esetén (CFTR és TRPM2), amelyek élettani szempontból jelentősek, a csatornák röntgen krisztallográfiás szerkezete pedig a vizsgálatok idején még nem volt meg, vagy nem voltak megmagyarázhatók pusztán a szerkezet alapján az elektrofiziológia tulajdonságok. A disszertáció témáját illetően időszerű, olyan kísérleteket végzett melyek összekötik egymással az ioncsatornák, a transzporterek és az enzimek tanulmányozását, és fontos megállapításokat tesz a fentebb említett, a fehérjék által ellátott alapvető funkciók közös tulajdonságaira vonatkozóan. A doktori disszertáció tudományos értéke tehát nem csak közvetlenül a disszertációban bemutatott eredményeket jelenti, hanem olyan alapvető, a csatornák működésére vonatkozó megállapításokat tesz, melyek más kutatócsoportok számára is támpontot jelenthetnek a szerkezet-funkció vizsgálatok során. Az általa kifejlesztett, a csatornák kapuzási paramétereit nehezített körülmények között (=több csatorna egy patch-ben) is meghatározni engedő statisztikai módszert elterjedten használják a világban, számos nagy formátumú közlemény írásához jelentette a matematikai-statisztikai alapot. A disszertációban bemutatott kísérletek nagy részének szintén ez a statisztikai eljárás az alapja. A kísérletek tökéletes technikai kivitelezése nem csak lélegzetállítóan látványos egy-csatorna méréseket és élettartam hisztogramokat eredményezett, hanem fontos következtetések levonására alkalmas kvalitatív és kvantitatív eredményeket adott. Külön kiemelést érdemel, hogy tudományos eredményeinek nem csak elméleti, hanem komoly gyakorlati következményei is lehetnek, különös tekintettel a CFTR csatorna stimulátorok közé tartozó 5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoát szerkezet-aktivitás vizsgálatára. A nevezett

csoportba tartozó vegyületek a cisztikus fibrózis betegség egyik terápiás lehetőségét jelentik, így a hatásmechanizmus ismerete további terápiás célzatú molekula fejlesztést indíthat el.

A disszertáció alapját 17 közlemény adja, melyek közül 14 a PhD fokozat megszerzését követően készült. E közlemények közül 16 esetben meghatározó (első vagy utolsó szerző) volt. Ezt egészíti ki további 12 közlemény, melyek nagy részében Pályázó szintén meghatározó szerző (8 közleményben első vagy utolsó szerző). Ez utóbbiak egy kivételével mind a PhD megszerzése óta keletkeztek. A közlemények döntő része egy-kétszerős munka, ami tovább emeli Pályázó szakmai munkájának súlyát a közleményekben. Az említett cikkek kizárólag a szakma vezető folyóirataiban jelentek meg (J.Gen.Physiol., J. Physiol., Biophys. J.) ill. volt közöttük egy igen magas impakt faktorú összefoglaló közlemény is (Nature).

Teljes életműve a disszertáció benyújtásának pillanatában 29 közlemény (kumulatív IF: 171,4), ezek átlagos impakt faktora 5,91, ami kiemelkedően magas az elektrofiziológia területén. Megjegyezném, hogy a terület első számú lapja a J. Gen. Physiol, ahol Pályázó számításaim szerint 15 közleményt publikált. A disszertáció beadásakor a független idézetek száma 707-volt, ami szintén kiemelkedő az ioncsatorna biofizika területén.

A CFTR s a TRPM2 csatorna biofizikai és farmakológiai vizsgálata során megítélésem szerint az alábbi új önálló tudományos eredményeket érte el:

- megállapította, hogy működőképes CFTR csatornák állíthatók elő egymással komplementer részszegmensek együttes expressziójával, ezzel meghatározták a CFTR moduláris felépítéséhez a domén határokat
- kimutatták, hogy a CFTR R-domén gátló hatású, melyet a domén foszforilációval lehet felfüggeszteni
- Meghatározta az egyes potenciális CFTR foszforilációs helyek hozzájárulását a CFTR funkciójának szabályzásához, rámutatott a 768-as szerin foszforilációjának jelentőségére
- A CFTR ATP-függő kapuzási lépéseinek részletes analízise (egyes kapuzási lépések aktivációs entalpiájának, aktivációs szabadentalpiájának és aktivációs entrópiájának becslése) alapján a kapuzást jellemző tovaerjedő konformációs hullámra tett javaslatot és annak egyes mozzanatait is definiálta.
- megállapította, hogy szoros csatolás van CFTR esetén az ATPáz ciklus és a kapuzási ciklus között: a nyitások >95%-a ATP hidrolízissel végződik.
- meghatározta, hogy a CFTR csatorna 5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoáttal (NPPB) történő stimulációja a nyitási lépés energiagátjának csökkentése és az ATP-hasítási lépés gátlása révén valósul meg. A $\Delta F508$ CF mutáció esetén, mely alacsony alapaktivitással rendelkező csatornát eredményez, az NPPB a 10-15-szörös stimulációt is okoz.
- Az NPPB farmakoforjai a 3-nitrobenzoát mely csak a nyitási lépésre, míg a 3-fenilpropilamin rész csak az ATP-hasítási lépésre hat.
- TRPM2 csatorna esetén egy olyan Ca^{2+} aktiváló kötőhelyet azonosított, mely a csatorna kapujától intracelluláris irányban helyezkednek el egy mély üregben, a pórus bemenetének közvetlen közelében
- inside-out patch clamp kísérleteivel fényt derített arra, hogy számos olyan molekula, melyet a TRPM2 modulátorának hittek teljes-sejt konfigurációban végzett mérések alapján valójában nem közvetlenül a csatornákra hatva fejtik ki hatásukat, vagy nem kellően tiszta vegyszerek használata miatti fals pozitív eredmények miatt jutottak téves következtetésre (H_2O_2 , AMP, cADPR, NAADP, és NAAD).
- megmutatta, hogy a nyitott TRPM2 csatornák nagy affinitással kötik a PIP_2 -t valamint azt, hogy a PIP_2 a TRPM2 látszólagos Ca^{2+} érzékenységet befolyásolja.

- Megállapította, hogy a T5L TRPM2 tripla mutáns csatorna (szelektivitási szűrő mutáns) nem inaktiválódik, egyéb tulajdonságai azonban hasonlóak a vad típusú csatornához, így kiválóan alkalmas a TRPM2 modulátorainak részletes vizsgálatához.
- Nem hidrolizálható ADPR analóg (AMPCPR) felhasználásával bizonyította, hogy TRPM2 csatornák ADPR-stimulálta kapuzása és a ligand esetleges hidrolízise között nem áll fenn csatolás, azaz a TRPM2 esetében a pórus kapuzása egyszerű egyensúlyi folyamat.

Dr. Csanády az MTA doktori szabályzatban megfelelő módon elkészítette a doktori disszertációt, mely jó keresztmetszetet adott Pályázó tudományos életművéről. A disszertáció mind formai mind tartalmi szempontból maximálisan megfelel annak a követelménynek, hogy a Pályázó tudományos tevékenysége megítélhető legyen, így a formai vizsgálatnak nem látom jelentőségét, csak néhány statisztikai adatot adnék meg. A disszertáció magyar nyelven készült, 122 számozott oldalt tartalmaz. Az irodalomjegyzék közel 110 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 47 többpeneles, többségében színes ábra könnyíti meg. Itt szeretném kiemelni azt, hogy Pályázó rendkívüli gondossággal járt el az ábrák összeállításakor, figyelmet szentelt arra is, hogy a primer kísérleti eredmények bemutatásán túl a kutatás eredményei alapján kialakított modelleket is grafikusán szemléltesse, ami nagyban megkönnyítette az olykor meglehetősen bonyolult ábrák értelmezését.

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.

Általános észrevételek:

A disszertáció bevezetője tömör, lényegre törő, a megértéshez szükséges információt általában tartalmazza. Annak ellenére írom mindezt, hogy két csatorna működésével kapcsolatos alapvető információt bele kellett sűríteni a bevezetésbe. Mivel a disszertáció egyik meghatározó pontja az ioncsatornák kapuzásának statisztikai leírása és a Pályázó által kifejlesztett algoritmus, emiatt szerencsésnek tartottam volna a bevezetőben ennek kiemelését, megemlítve a korábbi módszerek hiányosságait és kifejlesztett algoritmus előnyeit. Igaz később a módszerek között ír a maximum likelihood módszer felhasználásáról, de ennek részletesebb ismertetését célszerűnek tartottam volna.

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 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. Külön értékelendő a doktori mű végén található szintézis, mely a CFTR és TRPM2 szabályozását, a katalitikus aktivitás és a csatorna kapuzás közötti kapcsolatot és az aktivitás farmakológiai befolyásolásának törvényszerűségeit, hasonlóságait és különbségeit foglalja össze.

Tekintve azt, hogy a disszertáció háttérét adó közlemények magas impakt faktorú, nemzetközi, referált folyóiratokban jelentek meg ahol a szigorú sztenderdeknek 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. Az inside-out patch konfigurációban elvégzett mérések esetén tapasztalataim szerint állandóan felmerülő probléma, hogy a pipettába behúzott membrán ún. omega alakzatot vehet fel, ami megnehezíti a csatorna citoszolikus bejáratánál az oldatok gyors és pontos cseréjét. Ez különösen érdekes lehet ott ahol a Ca^{2+} elvonás után az áram megszűnésének igen gyors ($\sim\text{ms}$) kinetikáját méri. A patch geometria miatt az oldatcsere akkor is nagyon lassú lehet, ha egyébként a gyors perfúziós berendezés $\sim\text{ms}$ alatti oldatcserére alkalmas. Saját tapasztalataim szerint minden egyes patch esetén meg kell határozni az oldatcsere kinetikáját, és erre korrigálni a mért áram változást. Történt-e ilyen kísérlet, mivel lehetett pontosan kimérni az aktuális oldatcsere kinetikát? Történt-e korrekció az oldatcsere kinetikájára?
2. A fentiekhez hasonlóan problémás lehet, különösen nagy áramok esetében az ionok akkumulációja a pipettában, ha pipettába folyó ionáramot mérünk. Jelentett-e ez gondot a Jelölt által végzett kísérletekben? Történt-e erre korrekció?
3. Az elektrofiziológiai mérések esetében a diffúziós potenciál és az arra vonatkozó korrekció kritikus pontja az adatok értelmezésének. Különösen érdekes ez a kérdés akkor, amikor a pipettán belül különböző mobilitású ionokat tartalmazó oldatokat rétegeztek egymásra. Feltehető ugyanis, hogy az idő előre haladtával a Na^+ és a glukonát ionok eltérő mobilitása miatti diffúziós potenciál az oldatok keveredésével megszűnik. Hogyan vették ezt figyelembe? Szintén kérdés, hogy a Na^+ glukonát (v glutamát) és a NaCl mennyi idő alatt keveredett olyan mértékben, hogy a patch Cl^- ionokkal szennyezett legyen?
4. Az oocita expressziós rendszer előnyei mellett komoly hátrányokat is hordoz. Az általam vizsgált Kv1.3 csatorna biofizikai tulajdonságai nagyon különböznek az emlős expressziós rendszerben vagy humán T sejtekben mértektől. TRPM2 esetén ismer-e konkrét különbségeket a két rendszer között (béka oocita vs. emlős expressziós rendszer)? Hogyan viszonyul pl. a béka oocita membrán PIP_2 tartalma az emlőshöz? Elképzelhető-e hogy a TRPM2 aktivátoraira vonatkozó irodalmi megállapítások valamilyen módon a használt expressziós rendszertől is függenek?
5. A disszertáció 41. oldalán azt írja, hogy a cut- ΔR csatornák aktivációjához nincs szükség előzetes foszforilációra. Felhasználható-e ez a konstrukt a csatorna biofizikai és farmakológiai vizsgálataihoz, ugyanis ekkor meg lehetne takarítani egy a csatorna aktivációját beindító kísérletes lépést.
6. A 46. oldalon azt írja, hogy patch kitépést követően is egyensúlyt tud tartani egymással a PKA által katalizált foszforiláció és a feltételezhetően a membránhoz asszociált endogén foszfatáz. Ez teljes sejt kísérleteknél könnyen elképzelhető, kitépett patch esetén azonban, tekintve a membrán folt miniatűr voltát, már kétséges hogy elegendő foszfatáz maradhat-e a membránban. Lehet-e alternatív magyarázata a foszforiláció steady-state beállításának? Van-e független kísérletes bizonyíték arra, hogy elegendő foszfatáz található a kitépett patch-ben?
7. A disszertáció 17. ábra C, D és E panelek összehasonlításakor az tűnik ki, hogy az S768A mutáns csatorna esetében PKA koncentrációtól függetlenül nő az átlagos nyitvatartási idő, ezek értéke kb azonos 55 nM és 550 nM PKA esetében. Ugyanakkor a nyitási valószínűség jelentősen függ a PKA koncentrációtól. A 46. oldalon azonban azt írja, hogy a mutáció megnöveli a csatornák átlagos nyitvatartási idejét, ami miatt megnő a nyitási valószínűség és emiatt növekszik a PKA iránti

érzékenység. A bemutatott adatok alapján nem világos, hogy mely paraméterek tudhatók be a mutációnak és mely lépés lesz PKA szenzitív. Kérem ennek kifejtését.

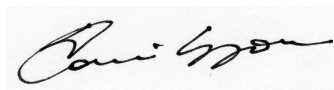
8. A 19. ábrán nagyon látványosan mutatja be a modelleket és modell diszkriminációhoz használt illesztéseket. A C és D ill. az E és F panelek összehasonlításánál az látható, hogy az ábrázolt hisztogramok valóban eltérnek egymástól. Nem látható az azonban, hogy a hisztogramok alakja mennyire függ attól, hogy milyen szélesre választja az események hosszait (bin width). Azt szeretném megkérdezni, hogy milyen elvek szerint választotta ki a bin width-et, és mennyire volt ettől független a modell diszkrimináció és a konklúzió?
9. A 26. ábra címében az szerepel, hogy az NPPB okozta CFTR stimuláció nagymértékben feszültség-független. Az ábrán azonban, ha jól értelmezem, akkor rögzített membránpotenciál mellett kapuzó CFTR csatornák láthatók, ill. az NPPB koncentráció a változó. A 64. oldal tetején is azt írja hogy az NPPB hatása feszültség-független és a 26. ábrára hivatkozik. Kérem tisztázza ezt a kérdést röviden. A 26. ábrán egyébként jó lett volna a $\Delta F508$ CF mutáció esetén bemutatni az NPPB hatását, mert ott sokkal nagyobb változásokat várunk mint WT csatorna esetében.
10. Az NPPB szerkezet-funkció vizsgálata alapján kapott eredményekre építve érdemes lenne jobb tulajdonságú aktivátorokat fejleszteni. Történtek-e erre próbálkozások, és ha igen, akkor milyenek az előzetes eredmények (amennyiben ezek publikusak)?
11. Ismert-e az, hogy a TRPM2 csatorna esetében mi a pórus pontos szerkezete, az aktivációs kapu helyzete, ill., hogy mi biztosítja a ligand kötés és a kapu nyitása közötti kapcsolatot? Tervezték-e olyan vizsgálatokat, melyek ezekre a kérdésekre adnának választ? Ha igen, akkor milyen módszert próbálnak pl. a csatolás vizsgálatára?

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 védelem esetén az MTA doktori cím odaítélését.

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

Debrecen, 2015. november 18.

Tisztelettel:



Dr. Panyi György
egyetemi tanár
az MTA doktora