



Szegedi Tudományegyetem
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
Igazgató: Prof. Dr. Varró András
6720 Szeged, Dóm tér 12.,
Tel.: (62) 545-682
Fax: (62) 545-680
e-mail: varro.andras@med.u-szeged.hu



Opponensi vélemény

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

A szerző műve, mint azt már a disszertáció címe is jelzi “Az ioncsatorna-enzim határmezsgye: egyedi CFTR és TRPM2 csatornák szerkezete, működése” olyan kifejezett orvosi biológiai alapkutatások eredménye, amely a problémakör megragadását illetően egyaránt magán viseli a biokémia, biofizika, élettan (elektrofiziológia) és farmakológia tudományterületek jellegzetességeit, de a kutatások konkrétan igen körülhatárolt módon biofizikai szubcelluláris elektrofiziológiai módszerekkel és szemlélettel valósultak meg. A nem a szűkebb szakterületen tevékenykedő bíráló számára is nyilvánvaló azonban, hogy a mű komplexitása és a kívülálló kutató szempontjából részleteiben nehezen követhető jellege ellenére fontos gyakorlati jelentőségű témát képvisel.

A CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) csatornák kutatása ugyanis - az alapvető biofizikai törvényszerűségek megismerésén túlmenően - alapvető gyakorlati jelentőséggel is rendelkezik. A CFTR klorid, tehát anionszállító csatorna működésének zavarai különféle betegségek alapjául szolgálnak. A nem is olyan ritka (1/2500) örökletes megbetegedés a cisztikus fibrózis, amely e csatornák funkciójának csökkenése révén súlyos tüdő, bél és hasnyálmirigy megbetegedésekhez vezet. A CFTR kloridcsatorna túlműködése viszont a harmadik világban oly gyakori és sokszor fatális kimenetelű szekréciós típusú bakteriális eredetű hasmenéseket okoz. Mindkét csatorna funkciózavar tehát fontos terápiás célpontot képvisel és mint ilyen a gyógyszerfejlesztések szempontjából is kiemelt figyelmet érdemel. Mivel a CFTR

klorid ioncsatorna az ABC (ATP Binding Cassette) fehérjecsaládba tartozik, amelyek általánosságban részt vesznek a gyógyszerek olyan alapvető transzport folyamataiban mint szöveti elosztás multidrug rezisztencia. Így a CFTR klorid csatornák kutatásának előzőekben említett specifikus farmakológia targetek befolyásolásán túlmenően általános farmakológiai jelentősége sem alábecsülhető. A jelölt által kutatott másik csatornatípus a TRPM2 (Transient Receptor Potential Melastatin 2) egy kationcsatorna, amely a szervezet különféle szervrendszeriben fordul elő és fontos élettani szabályzó és patofiziológiai szerepe lehet. A hasnyálmirigy beta sejtjeiben a TRPM2 aktivitás segíti a glükóz kiváltotta inzulin szekréciót s mint ilyen fontos szerepet játszik a vércukorszint szabályozásában. A Reaktív Oxigén Származékok a továbbiakban röviden ROS aktiválja a TRPM2 csatornákat, amely e csatornákon keresztül Ca^{2+} beáramlásához vezet. A Ca^{2+} beáramlás az immunrendszerben a citokintermelés fokozódásával részt vesz a gyulladásos folyamatokban. Az iszkémiát követő reperfúzió során mind az agyban, mind a szívben jelentős mennyiségű ROS képződik, amely a TRM2 csatornákon keresztül fokozott Ca^{2+} beáramlást és következményes intracelluláris Ca^{2+} túltelítődést okoz, amely apoptózishoz, azaz sejthalálhoz vezethet. Ugyanakkor a TRPM2 ioncsatornák csökkent működése nem kellően tisztázott módon hozzájárulhat az amiotrofiás lateroszklerózis és Parkinson kór súlyosbodásához is. Így nyilvánvaló, hogy a TRPM2 kation csatorna a CFTR anionsatornához hasonlóan fontos, új gyógyszer támadáspont lehet a felfedező gyógyszerkutatások számára olyan fontos betegségekben, mint a stroke, szívizom infarktus, gyulladás, cukorbetegség, vagy éppen az agy neurodegeneratív betegségei. Az elmondottak alapján egyértelműen megállapítható, hogy a jelölt kutatásainak és az ennek eredményeképpen megszületett MTA doktori disszertációjának tudományos biofizikai, biokémiai érdekességén túlmenően nagyon fontos gyakorlati, terápiás jelentősége is nyilvánvaló.

A dolgozat 122 számozott oldalt tartalmaz, a megértést 47 igen szemléletes ábra segíti. A munka célkitűzései érthetőek és világosak, az értekezés is ennek alapján készült. A szerző két fontos transzmembrán ioncsatorna szerkezetének és funkciójának vizsgálatára épül. A BEVEZETÉS kissé hosszadalmasnak és részletesnek tűnhet és 20 oldal terjedelmű. Ez a terjedelem azonban véleményem szerint kívánatos, hiszen ennek

hiányában nagyon nehéz lenne megérteni a munka tudományos tartalmát, a célkitűzéseket és a téma jelentőségét. A CÉLKITŰZÉSEK 3 oldalt foglalnak el és megfelelően vázolják fel a kísérletes munka során megoldásra szánt problémákat. Az ALKALMAZOTT MÓDSZEREK fejezet 6 oldalt tesz ki 3 ábrával. E leírás lehetne ugyan valamivel részletezőbb a bonyolult kísérleti eredmények megértését illetően, de a mélyebben érdeklődő, a kívánt részleteket olvasó meg tudja találni a disszertáció alapjául szolgáló közleményekben. A következő fejezet az EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS, amely összességében 61 oldal terjedelmű és két nagy fejezetre tagolható. Az első rész a CFTR anioncsatornák, míg a második rész a TRPM2 kationcsatornák vizsgálataival foglalkozik. Én magam szerencsésebbnek tartottam volna az eredmények leírását és ezek diszkusszióját külön és csatornatípusonként is elkülönülten tárgyalni. Ez véleményem szerint jobb lehetőséget kínált volna a szerzőnek arra, hogy munkájának részleteit és ennek jelentőségét az ismert irodalom összefüggésében kifejtthesse jobban kidomborítva azt, hogy mi, vagy a kísérletek időpontjában mi volt a „state of the art” tudás, amelyet a jelölt munkatársaival együtt megváltoztatott, illetve továbbfejlesztett. Ez utóbbi probléma kezelésére a szerző egy 4 oldal terjedelmű SZINTÉZIS fejezetet iktatott be, amely némileg pótolja ezt a legalábbis általam kifogásolt megoldást. A disszertációt a LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA és a KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS fejezetek zárják 2-2 oldal terjedelemben. A mű 109 referenciát tartalmaz, amelyből 17-ben a szerző is szerepel.

Dr. Csanády László lektorált, tudományos folyóiratokban megjelent in extenso dolgozatainak száma a bíráló megírásának időpontjában 33, amelyek összesített impakt faktora 171.4 (+1 Cell és 1 J. Gen Physiol). Összes idézettsége 952, amelyből a független idézetek száma 811. Ebből kiemelendő, hogy a jelölt első vagy egyedüli közleményeinek száma 19, utolsó szerzős közleményeinek száma 9 és a H-indexe 15. A közlemények többsége, amelyek jelentős része egyébként az értekezés alapjául is szolgál, a szakterület vezető nemzetközi folyóirataiban (Journal of General Physiology, Biophysical Journal, J of Physiology, Proceedings of National Academy of Sciences USA) jelent meg, amely mint azt az MTA doktori védéseken már közhelyként szokás megjegyezni, részben formálissá is teszi egy ilyen tudományos mű

szakmai jellegű bírálatát. A disszertációban szereplő kísérletek egy része a világ közvetlen élvonalába tartozó Gadsby professzor USA-beli laboratóriumában készültek, ahol a jelölt is tevékenykedett, majd hazatérve a témát kooperációs szinten is és saját maga saját munkacsoportjával folytatta. Külön megemlíetésre méltó, hogy a disszertáció alapjául szolgáló egyik közleménye a Nature-ben megjelent közlemény, amelyben a szerző utolsó szerzőként szerepel.

A jelölt legfontosabb új tudományos megállapításait az alábbiakban foglalom össze:

1. Megállapította, hogy a működőképes CFTR csatornák egymással komplementer rész-szegmensek együttes expressziójával is összeépíthetők.
2. Megállapította, hogy a CFTR csatorna R-domenja döntően gátló hatású, amely egyaránt felfüggeszthető az R domen foszforilációjával vagy deléciójával.
3. Megállapította, hogy a CFTR csatorna kapuzási ciklusa és az ATP hidrolízis között szoros összefüggés létezik, a nyitási események több mint 95 %-a ATP hidrolízissel végződik és az ATP hidrolízis a záródás meghatározó lépése is.
4. Megállapította, hogy a NPPB (5-Nitro-2(3 Phenil-Propionilamino) Benzonsav) az egyik legnagyobb hatáserősségű CFTR stimulátor és az a stimuláló két kinetikailag elkülöníthető hatás a nyitási lépés energetikájának csökkentése és az ATP-hasítási lépés gátlása révén valósult meg.
5. Megállapította, hogy a TRPM2 csatorna egymástól független gyors és lassú kapuval rendelkezik és a csatornák nyitási és záródási sebessége az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció függvénye.
6. Megállapította, hogy az intracelluláris ADP-Ribóz, az intracelluláris Ca^{2+} és a membrán belső rétegében található PIP2 a TRPM2 csatorna co-aktivátorai, amelyek a csatorna intracelluláris lassú kapuját szabályozzák.
7. Megállapította, hogy az ADP-Ribóz elsősorban a zárt konformációjú TRPM2 csatornához képes kötődni és a csatorna kapuzása egyensúlyi folyamat, amely nem csatolódik az ADP-Ribóz hasításhoz.
8. Megállapította, hogy a ciklikus ADP-Ribóz adenzin-5-monofoszfát és a nikotinsav-adenin-dinukleotid-foszfát közvetlenül nem befolyásolják a TRPM2 csatornák aktivitását, így intakt sejtekben tapasztalt moduláló hatásaik közvetettek.

A disszertációval kapcsolatos kérdéseim a következők:

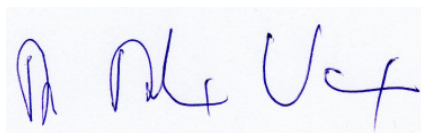
1. A Bevezetésben a jelölt tárgyalta mind a CFTR mind a TMPRM2 csatorna farmakológiai befolyásolhatóságának potenciális lehetőségeit. Milyen lehetőséget lát a jelölt saját kutatási eredményei hasznosításának az említett két csatorna modulátorainak terápiás célú gyógyszerfejlesztésében?
2. A jelölt 30 oldalon leírja, hogy az oocytákat 82.5 mM Na Cl-ot 2mM KCl-ot tartalmazó oldatban tárolták 18 °C-on. Ez erősen hypozmotikusnak tűnik. Nem okozott-e ez problémát a tárolás során és milyen körülmények között történtek a két mikroelektrodás voltage clamp mérések?
3. A protein kináz A aktivátor IBMX-et és a cAMP aktivátor forskolint igen magasnak tűnő koncentrációban 1 mM és 50 μ M alkalmazták. Miért volt szükség ezekre a magas koncentrációkra?
4. A 45 oldal 15. ábráján inside out makro patch felvétel látható kb 20 pA-es áramamplitúdóval, a 76. oldal 34. ábráján pedig 100 pA-nél is nagyobb amplitúdóval. Ugyanakkor a 71. oldal 31. ábráján a single channel áramamplitúdója kb 0.5 pA, a 94. oldal 45. ábráján 2 pA, amely vélhetően mikro patch felvétel eredménye. Mikor és miért használt a jelölt makro és mikro patch elrendezést és mi volt a különbség a kétféle technika esetén patch pipetta végének átmérője között?
5. A jelölt a 76. oldalon említi, hogy az TMPRM2 méréseket oocytán zavarták az oocytákban jelenlevő endogén Cl^- csatornák, ezért Cl^- mentes Na-glukonát kádoldatot alkalmazott. Nem lehetett volna ezt a problémát olyan kísérlettel is kezelni, ahol a patch csak 1-2 ioncsatornát tartalmaz és a csatornák analízise a conductancia és a töltéshordozó alapján is szeparálható lett volna?
6. Az előző kérdéshez kapcsolódóan kérdezném, nem vetődött-e fel a „mammalian cell line” (CHC HEK) használata, amelyekbe tetszőleges mennyiségben lehetett volna expresszálni a CFTR és TMPRM2 ioncsatornákat és ezeket mind whole cell mind single channel szinten vizsgálni lehetett volna?

Összegezve elmondható, hogy Dr. Csanády László új eredményei és felismerései jelentősen hozzájárultak a CFTR és TRPM2 ioncsatorna működésének jobb megértéséhez és remélhetően e csatornatípusok működését befolyásoló terápia kifejlesztéséhez. Megállapítható, hogy az alkalmazott vizsgálati módszerek és kísérleti

megközelítések jól választottak és korrektül, magas szinten kivitelezettek és a célkitűzéseknek megfelelően nyertek felhasználást. A disszertációban foglalt tudományos eredmények hitelesek, magas nivójú nemzetközi folyóiratokban publikáltak és a jelölt saját eredményeinek tekinthetők.

Mindezek alapján úgy gondolom, hogy az értekezés mind formai, mind tartalmi szempontból mindenben megfelel az MTA doktori cím megszerzésével szemben támasztott követelményeknek, így a nyilvános vitára való kitűzést, az értekezés elfogadását és sikeres védelem esetén az MTA doktora cím odaítélését messzemenően támogatom.

Szeged, 2016. január 5.



Dr. Varró András
MTA doktora
egyetemi tanár