Opponensi vélemény

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

Dr. Varga Zoltán MTA doktori értekezése két témakörben elért kutatási eredményeit foglalja össze. A vizsgálatokban dominál a feszültségfüggő K^+ csatornák gondolatköre, ebben egyaránt szerepek mind a csatornák kapuzásának részleteit feltáró munkák, mind olyan vizsgálatok, melyek nagy affinitású és adott esetben specificitású, a K^+ csatornákra ható toxinok hatásmechanizmusára, kötésére, ill. ennek szerkezeti hátterére irányultak . A másik terület, a feszültségfüggő Na^+ csatornák feszültségérzékelésének és kapuzásának összefüggése. Ez utóbbit jelölt a tanulmányútja során elsajátított igen korszerű megközelítéssel vizsgálta, melyben az elektrofiziológiát az igen gyors szerkezetváltozások követésére alkalmas fluorimetriával kombinálta. A módszer kiterjeszthető, más feszültségfüggő folyamatok követésére is alkalmas és a hazai munkacsoportban/intézetben is beállításra került.

A dolgozat 19 tudományos közleményre épül, a jelölt ezek közül 9-ben szerepel kiemelt, első vagy utolsó helyen. A PhD. fokozat megszerzését követő periódusban további 15 referált folyóiratban megjelent közlemény és 5 könyvfejezet szerzője/társszerzője. A jelölt tudománymetriai paraméterei jóval meghaladják az MTA doktori fokozat megszerzéséhez szükséges határokat, 39 eredeti közlemény, 146 összesített IF, közel 650 független és 950 összes idézettség, 19-es H index.

Magára az értekezésre rátérve, az írásmű 143 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 áttekinti a feszültségfüggő csatornák jellemző szerkezeti és funkcionális tulajdonságait. Külön hangsúlyt fektet a T sejtek szabályozásában fontos szerepet játszó Kv1.3 csatorna szerepére, valamint a különböző peptid skorpió toxinok szerkezetéből adódó gátló mechanizmusokra. Ugyancsak exponálja a FF Na^+ csatornák feszültségérzékelésével és kapuzásával kapcsolatos ismereteket. Ezt kiegészíti a feszültségfüggő igen gyors szerkezeti változások valós idejű követésére alkalmas módszer, a voltage clamp fluorimetria jelentőségének bemutatásával és az első hazai VCF munkaállomás létrehozásának megemlítésével.

A *Célkitűzések*, fejezet röviden összefoglalja a kutatás kérdésfelvetéseit, az *Anyagok és Módszerek* fejezet megfelelő részletességgel mutatja be az alkalmazott metodikák teljes spektrumát.

Jó választás volt az *Eredmények és Megbeszélés* fejezetek összevonása ez segíti az olvasót a kísérleti eredmények értelmezésében, adott esetben utal a gyakorlati/terápiás felhasználás lehetőségére is.

A dolgozatot Az *Összefoglalás*, a 237 közleményt tartalmazó *Irodalomjegyzék*, *Köszönetnyilvánítás*, ill. a *Saját közlemények* listája zárja.

A disszertációban összegzett munkák a feszültségfüggő K^+ és Na^+ csatornákkal kapcsolatos ismereteinket számos vonatkozásban jelentősen bővítették. Az Eredmények rész egyes alfejezeteinek megfelelően sorolnám fel a jelölt véleményem szerint a legfontosabb új eredményeit.

1/ Hiperpolarizácó során elemezte, a Shaker csatorna aktivációs kapujának, valamint VSD-jének időbeli mozgásait, és kimutatta, hogy az előbbi minden estben megelőzi az utóbbi bekövetkeztét.

2/ Kimutatta, hogyan, milyen mechanizmussal befolyásolja az EC, illetve az IC proton koncentráció több Kv csatorna működését.

3/ Számos Kv csatornára ható skorpió toxin vizsgálata során azonosított egy Kv1.3-at nagy affitással és specifikusan gátló peptidet, a Vm24-et, melynek tulajdonságai akár terápiás alkalmazás céljára is igéretesek lehetnek.
4/ Célzott mutációkkal tervezett változást hozott létre az anuroctoxin tulajdonságaiban, ezáltal megnövelve a Kv1.3 iránti specificitást.
5/ A szív feszültségfüggő (Nav1.5) Na^+ csatornáján lévő egyes feszültségérzékelő domének mozgásának és a csatorna kapuzásnak időbeli viszonyait elemezte voltage clamp fluoreszcencia segítségével.

A dolgozattal kapcsolatban a következő kérdéseim, megjegyzésem lennének:

1/ A Shaker FF K^+ csatorna kapuzásának elemzésénél a csatorna záródásának és a voltage sensor domain (VSD) mozgásának összefüggését vizsgálták vad típusú és egy (eredetileg egyáltalán) nem permeálónak tartott W434F mutáns csatornán. Az eredmények szerint a WT csatornán a kapu záródása gyors (és bár e sebességet a permeáló ion fajtája befolyásolja) még a lassúbb záródás esetén is gyorsabb mint a VSD mozgása. Ennek megfelelően a kapu záródásának nincs/nem észlelhető hatása a VSD mozgására.
A mutáns csatornán (melyről kimutatták, hogy bizonyos körülmények között azért K^+-ot vezet) a pórus záródás lelassul, ez esemény egyben a töltésmozgás sebességmeghatározójává válik. Más ionok (Cs^+ és Rb^+) esetében azonban a mutáns permeabilitása "elenyésző", amit bizonyít a depolarizációra és repolarizációra kapott áramok szemre azonos mérete.
A 30c ábra, azonban a különböző ionok esetében mért farokáramok időállandóit mutatja be. Mi képezte e számítások alapjait?
2/ Az eredmények meggyőzőek arra vonatkozóan, hogy az aktivációs kapu teljes záródása minden esetben meg kell, hogy előzze a VSD visszatérését. Nem nyilvánvaló azonban számomra, hogy maga az aktivációs kapu a hordozója annak a "minimális töltésmozgásnak" ami a záródásához szükséges. Nem lehetséges-e, hogy a disszertációban korábban megemlített másik mechanizmus érvényesül, nevezetesen, a VSD részleges/minimális elmozdulása a feltétele a kapu mozgásának.
3/ A Shaker csatornát befolyásoló IC és EC pH-változások elemzését követően a limfociták legfontosabb FF K^+ csatornájának, a Kv1.3-nak a pH érzékenységét vizsgálták. Kimutatták, hogy fiziológiáshoz közeli ionkoncentrációk esetén a megnövekedett EC protonkoncentráció csökkenti a csatornán folyó áramot, viszont –szemben a Shaker csatornával- lassítja az inaktivációt. Az utóbbi hatásnak fiziológiás jelentőséget is tulajdonítanak, mely szerint az inaktiváció lassulása szerepet játszhat a limfociták negatív membránpotenciáljának fenntartásában, elősegítve a proliferációhoz vezető fokozott Ca^{2+} beáramlást gyulladásos elsavanyodott környezetben. Kérdésem, hogy véleménye szerint ez a hatás jelentősebb lehet-e annál, hogy acidózisban a nyitott csatornákon folyó áram nagysága csökkent. Tehát gyulladásos körülmények között várható pH-n hogyan viszonyulhat egymáshoz a két ellentétes részhatás, mi lehet az eredőjük?
4/ A skorpiótoxinokkal végzett vizsgálatok jelentőségét az is kiemeli, hogy a Kv1.3 csatornára specifikusan, nagy affinitással ható gátlószerek a terápiás felhasználás lehetőségét is magukban hordozzák. E toxinok kötődésének, hatásmechanizmusának megértése ezért különös jelentőségű. A Kv1.2-vel szemben (Kv 1.3nál) nagyobb affinitású Css20 toxin esetében érdekes megfigyelés volt Kv2.1 esetében lassabban kialakuló gátlás párhuzamosan a gátlás megszűnésének megnyúlásával. Az utóbbi nagyobb mértéke lehet a hátterében a Kv1.2-höz való nagyobb affinitásnak. E szokatlan jelenség hátterében lévő lehetséges folyamatokat, a kötődés és gátlás kialakulásának lépéseit modellezték, értelmezték és dokkolásos vizsgálatokkal alátámasztották. A magyarázathoz egyéb toxinok (és toxin kimérák) irodalomból származó szerkezeti és affinitási adatai is segítségül szolgáltak. E toxinok világát kevésbé ismerő olvasó/bíráló dolgát megkönnyítette volna néhány extra ábra,

ami egyértelműen szemléltette volna az különböző toxinok egyes csatornákhoz való kapcsolódásának, affinitásának és hatékonyságának fontos szerkezeti meghatározóit.
5/ A VM21 toxin ideálisnak tűnik a Kv1.3 gátlására. Affinitása pikomólos tartományban van, specificitása vizsgált Kv csatornák vonatkozásában 3 a nagyságrendet is meghaladja. Ennek tükrében mi indokolta a sokkal kevésbé előnyös eredeti tulajdonságokkal rendelkező anuroctoxinból kiindulni az egyébként bravúros eredménnyel járó peptid-szerkezet módosításos kísérletsorozatban?
6/ A Nav1.5 négy eltérő VSD-jének fluoreszcens jelölésével lehetővé vált az egyes VSD-k mozgásainak követése a ms-os időtartományban és ezek összehasonlítása a csatorna vezetőképességének változásával. A fluoreszcencia változás eredményei értelmezhetők-e úgy, hogy az I-es és II-es VSD esetében a depolarizációra, ill. az azt követő repolarizációra kapott feszültségfüggő változásnak nincs hiszterézise, míg III-as VSD esetében a steady state inaktivációs (SSI) mérési körülmények között van, és a visszatérés sebességét befolyásolja a depolarizált állapotban eltöltött idő?
7/ A jelölt amerikai tanulmányútján elsajátította a voltage clamp fluorimetria megközelítést, és hazatérését követően e technikát a Debreceni Egyetemen is beállította/meghonosította. A disszertáció *Eredmény/Megbeszélés* részének 5.4-es pontjában e folyamatban lévő és tervezett kísérleteket három pontját ismerteti vázlatosan. E pontok közül az egyikről néhány előzetes eredményt is bemutat (melyek a membrán koleszterin tartalma és a Kv csatornák kapuzása közötti kölcsönhatásra világítanak rá). A másik két pont csak említés szintjén szerepel 8-10 sorban, és mindössze olyan kevéssé informatíiv megállapítást tartalmaz, mely szerint az előzetes eredmények szerint a NSV (novel voltage sensor) a membránpotenciál változásait közvetíti intracelluláris jelátviteli útvonalak felé. Valamint csak megemlít egy –a disszertációban nem szereplő újonnan beállított módszert a „substituted cystein accessibility method"-ot. Véleményem szerint az értékes disszertáció végéről ezek a pontok nem hiányoztak volna.

Az érdeklődő kérdések után véleményemet összegezve Dr. Varga Zoltán értekezése egy igen sikeres és egyben ígéretes kutatói munka összefoglalása, ezért a nyilvános vitára bocsátását valamint a jelöltnek az MTA Doktori fokozat megítélését javaslom, és messzemenően támogatom.

Budapest, 2018. október 16.

Dr. Enyedi Péter
Az Orvostudomány doktora