



Dr. Katona István
tudományos tanácsadó, csoportvezető
Lendület Molekuláris Neurobiológiai Kutatócsoport
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

H-1083 Budapest, Szigony u. 43.
Telefon : (+36-1) 210-9982
Fax : (+36-1) 210-9412
E-mail: katona@koki.hu

Bírálat

Dr. Nagy István:

Az endovanilloid és endokannabinoid rendszerek szerepe az elsődleges fájdalomérző idegsejtek érzékenységének és aktivitásának szabályozásában

című értekezéséről, amelyet a jelölt benyújtott MTA Doktori Tanácsához elbírálás céljából.

Köszönöm szépen a megtisztelő felkérést, hogy elolvashattam és véleményt mondhatok Dr. Nagy István akadémiai doktori értekezéséről, amely több mint 20 éves szakmai munka eredményeit foglalja össze. A jelölt munkásságát évtizedek óta közelről követem, mert túlzás nélkül kijelenthető, hogy a nemzetközi élvonalat képviseli a dolgozat tématerületén. A hátsó gyöki ganglionok elsődleges fájdalomérző idegsejtjeinek kutatása forró téma elsősorban a krónikus fájdalomszindróma miatt. A fájdalomérzet csillapítása az endokannabinoid és az endovanilloid rendszer befolyásolásán keresztül pedig ígéretes terápiás megközelítések alapjául szolgálhat. A jelölt számos hazai együttműködő partnerrel elért kimagasló színvonalú eredményei Londonban és Debrecenben pedig gyönyörűen illeszkednek be a több mint egy évszázados hazai kapszaicin kutatások történetébe. Talán kevesen tudják, hogy Högyes Endre volt, aki először vizsgálta a kapszaicin élettani hatásait még 1878-ban Kolozsváron, majd Jancsó Miklós és Jancsó Gábor-Aurélia írta le a kapszaicin szenzoros idegekre gyakorolt közvetlen hatását először Szegeden 1949-ben, majd 1959-ben részletesebb tanulmányokban. Ez folytatta tovább Szolcsányi János és iskolája Pécsen a hőszénítív és a gyulladási folyamatok szabályozó szerepének felismerésével. Most pedig Dr. Nagy István akadémiai értekezése újabb izgalmas eredeti felfedezéseket mutat be a kapszaicin által kiváltott áramokról, hőérzékenységükről, endovanilloid/endokannabinoid szabályozásukról és mindezek megváltozásáról gyulladási mediátorok jelenlétében.

Az értekezés 239 oldalon mutatja be Dr. Nagy István munkásságának egy jelentős részét. A bemutatott eredmények 43 eredeti nemzetközi tanulmányban jelentek meg, a főbb megállapításokat a szerző 24 alapvető állításban foglalja össze a dolgozat elején. Dr. Nagy István életművére több mint 4000 hivatkozást kapott a Google Scholar alapján. Rendszeres résztvevője meghívott előadóként nemzetközi konferenciáknak. Számos tanítványa szerzett doktori címet témavezetésével és a rangos londoni Imperial College tanára. Összességében megállapítható tehát, hogy a dolgozat szakmai tartalma, a jelölt szakmai pályafutása és iskolateremtő tevékenysége egyaránt összhangban áll az MTA Doktora cím követelményeivel.

Ezért kérdéseim és megjegyzéseim inkább általános kutatói kíváncsiságot tükröznek és céljuk, hogy a jelölt kollégám figyelmét felhívják olyan szempontokra, amelyek későbbi munkájában segíthetnek.

Specifikus kérdéseim és megjegyzéseim a következők:

1. A dolgozat egyik központi témája, amelyet sok kísérletben vizsgált a szerző, hogy a CB1 cannabinoid receptorok hogyan szabályozhatják a TRPV1 ioncsatorna működését. A központi idegrendszerben ugyanakkor a szabályozási mechanizmus iránya pont fordított. Lee et al 2015 Journal Neuroscience tanulmánya leírja, hogy az anandamide és/vagy rokon N-acil-etanolaminok a TRPV1 aktiválásán keresztül csökkentik a 2-AG endokannabinoid termelését, ami pedig alacsonyabb tónusos CB1 receptor aktivációhoz azaz gyengébb endokannabinoid jelhez vezet. Ez a modell első lépéseiben egyezik Mario van der Stelt és munkatársainak úttörő munkájával (2005, EMBO Journal) amely a hátsószarvi ganglionok neuronjaiban az anandamid intracelluláris TRPV1-en keresztüli kalcium felszabadító hatását írja le, ráadásul a 2-AG szintéziséhez szintén kalcium szint emelkedésre van szükség. Kérdésem, hogy figyelembe vették-e kollégáival az ellentétes irányú jelátviteli mechanizmus létezését a gerincvelői hátsó gyöki ganglionok neuronjain végzett méréseiben és vannak-e esetleg olyan eredmények a dolgozatban vagy akár publikálatlanul amelyek megerősíthetik vagy elvethetik ennek a mechanizmusnak a működését a DRG-ben.

2. Nagyon izgalmas a szerző számos polimodális aktivációs állapotot bemutató eredményei, amelyek a gerincvelői hátsó gyöki neuronok később hatalmas molekuláris és celluláris sokféleségével összhangban vannak. A bemutatott anatómiai eredmények ugyanakkor gyakran 15-20 évesek és annak idején a megfelelően specifikus és szenzitív ribópróbák, antitestek és a szükséges kontroll KO állatok még nem álltak rendelkezésre. Az esetleges fals-pozitív vagy akár fals-negatív eredmények miatt elképzelhető, hogy a kolokalizációs adatok mennyiségi elemzése során kapott több látszólagos ellentmondás megmagyarázható. Ezeket később részletezem. Ugyanakkor az elmúlt évek káprázatos egysejt-RNA-szekvenálási forradalma lehetővé teszi, hogy újraértékeljük a korábbi in situ hibridizáción és immunfestésen alapuló számadatokat. Ezek a legmodernebb eljárások ugyanis korábban elképzelhetetlen pontossággal mutatják be egyes agyterületek vagy például a hátsó gyöki neuronok celluláris taxonómiáját és az egyes sejttípusok molekuláris transzkriptomikai profilját. Ráadásul ezek a génexpressziós adatbázisok szabadon elérhetőek (Usoskin et al. 2015 Nature Neuroscience; Ray et al., 2018, Pain; Zeisel et al., 2018 Cell). Ezért azt javaslom, hogy a jelölt előadása során röviden térjen ki ezekre az új adatokra és mutassa össze, hogy milyen megfigyeléseket milyen mértékben sikerült megerősíteni. Például a számos újonnan felismert DRG sejttípus (minimum 11!), közül melyik tartalmaz TRPV1, CB1, NAPE-PLD és FAAH mRNS-t az egysejt adatbázisok alapján. Valószínűsítem, hogy ezzel a gyors elemzéssel a későbbi kutatásokban is hasznosítható új hipotézisekhez is juthat a jelölt által vezetett kutatócsoport.

3. A TRPV1 ioncsatorna funkcionális működését egyaránt feltételezik intracelluláris membránokon (például az endoplazmatikus retikulumon) és a plazmamembránon. A bemutatott áramok és elektronmikroszkópos képek valószínűleg a plazmamembránba ágyazott TRPV1-et jelzik. Lehet-e a dolgozatban bemutatott összetett élettani hatások egy részéért felelős az intracelluláris TRPV1 és lehet-e az exogén és az endogén anandamid hatások közötti különbségek magyarázata, hogy eltérő ioncsatorna populációt aktiválnak?

4. Ahogy a jelölt a 19. oldalon említi is, számos más endokannabinoidokkal rokon lipid, például az N-acil-etanolaminok közé tartozó oleil-etanolamine (OEA) szintén agonistája a TRPV1 receptoroknak (Ahern, 2003, Journal of Biological Chemistry). Ráadásul az OEA hasonlóan aktiválja a szenzoros neuronokat (lásd például Wang et al 2005 Journal of Physiology). Mivel a NAPE-PLD képes OEA szintézisre, a FAAH pedig lebontja az OEA-t, ezért tulajdonképpen, ha jól értelmezem, akkor nem jelenthető ki a dolgozatban bemutatott kísérletekről, hogy az endogén anandamid hatását jelzik számunkra, ugyanolyan jogos az endogén OEA élettani funkcióját feltételezni. Kérem a szerzőt

kommentálja ezt a megállapítást. Továbbá kérdezem, hogy végeztek-e esetleg exogén OEA-val kísérleteket, amelyek feltételezhetően eltérő hatásprofilja lehet, mint az AEA-nak hiszen az OEA nem agonistája a CB1 receptoroknak. Ha történet ilyen kísérlet, akkor kíváncsian várom, hogy mit tapasztaltak, mert az OEA szerepe valami okból meglehetősen kevésbé ismert és kutatott, a fenti adatok sem igazán közismertek.

5. Egy általános megállapítás, hogy ahhoz képest, hogy milyen elképesztően sok molekula nevet és rövidítést használ a szerző, amelyeket ráadásul dicséretesen igyekszik angolból magyarosítani elenyészően kevés nyelvi pontatlansággal találkoztam olvasás során. A néhány konzekvens elírás az „az hátsó”, „mellet”, „nitrikoxid” stb esetleg a közreadott téziszüzetekben javítható.

6. A 31. és 35. és a 174. oldalakon egyaránt megjelenik, hogy a CB1 receptorok anandamid kötőzsebe extracelluláris található. Ugyanakkor Tian Hua és munkatársai CB1 kristályosításon alapuló térszerkezeti munkáiból ma már tudjuk, hogy a CB1-nek is a plazmamembránon belül található a kötőzsebe (Hua et al Cell, 2016; Hua et al., 2017, Nature; Hua et al., 2020, Cell).

7. A 37-38 oldalakon bemutatott transzport mechanizmusok kapcsán a FLAT szerepét ma már műtermékek tartják, ugyanakkor az FABP fehérjék között az FABP5 szerepe egyre biztosabbnak látszik (Haj-Dahmane et al. 2018, PNAS).

8. Az 5.1 és 5.2 ábrákon nehéz eldönteni, hogy mi alapján lehet a halvány piros sejtekről kijelenteni, hogy immunnegatívak, elképzelhető, hogy alacsony expressziós szint miatt halványak (ezt segítheti például eldönteni az sc-RNAseq elemzés).

9. Az 5.3 ábrán nyílak és rétegek jelölése segíthet egy nem szakembernek eligazodni, ha ez az ábra az előadásban is bemutatásra kerül.

10. Sem a TRPV1, sem a CB1, sem a FAAH, sem a NAPE-PLD immunfestések esetében nem derült ki, hogy milyen kontroll kísérleteket végeztek a szerzők. Ezt érdemes megemlíteni röviden, ha az előadásban bemutatásra kerülnek ezek az eredmények.

11. Az 5.5 ábrán meglepő módon az immunjel nem a humán urothél sejtek felületén van vagy a teljes citoplazmában, hanem a sejtmag körüli részekeken figyelhető meg. Mi ennek az oka?

12. Kiemelkedően érdekes része a dolgozatnak a Nagy és Rang 1999-es tanulmány eredményeit bemutató rész. Kiderült azóta az 5.7-es ábrán a 63. oldalon bemutatott hatásról, hogy melyik ioncsatorna felelős érte? A Megbeszélésekben röviden említett TRPV2 vagy más ioncsatorna is szóba jöhet?

13. Az 5.8 ábrán bemutatott korreláció nagyon látványos. Ha jól gondolom ez csak a minimális választ mutató sejteket ábrázolja és látszik, hogy nem normális eloszlásúak az adatok. Mennyi volt a Spearman rang korrelációs koefficiens értéke? A szövegben és az ábrán nem szerepel tételesen és a szignifikanciája sem.

14. A 74. oldalon bemutatott feltételezett eltérő TRPV1 ioncsatorna populációk is nagyon érdekesek. A Megbeszélésekben röviden felmerül, de nem volt számomra világos, hogy a publikálás óta eltelt több mint 10 évben kiderült a molekuláris magyarázat? A CB1-el képzett heteromer nem valószínű alacsony gyakorisága miatt (lásd alább).

15. A Veress et al 2013 cikken alapuló 5.19-es ábra a 80.oldalon nagyon szép. Ugyanakkor a halványan jelölt sejtek a CB1 festésben miért biztos, hogy negatívak?

16. Az egyik legmeglepőbb a dolgozatban az egyes tanulmányokban leírt kolokalizációs arányok eltérései. Főleg ha feltételezzük, hogy összefüggő jelpályákról van szó, meglepő például hogy a TRPV1 pozitív sejteknek mindössze 64%-a FAAH-pozitív. Mivel a FAAH inhibitor módosítja a TRPV1 hatást ezért nagyobb kolokalizáció lenne várható. Bízom benne, hogy az scRNA-seq elemzés segít kideríteni, hogy a legalább 11 DRG sejttypusból melyikben fordul elő a TRPV1, a CB1 és a FAAH és melyekben működhet leghatékonyabban az anandamid endovanilloid vagy endokannabinoid jelpálya.

17. A Sousa-Valente et al 2017 tanulmányon alapuló 5.32 és 5.33 ábrákból levont következtetéseket nem tudom elfogadni. A nagy sejtek szinte ugyanolyan intenzívek, mint a kis sejtek és a kontroll kísérletben is látszódik mindegyik sejt. Milyen elemzés alapján tudták a szerzők eldönteni, hogy egy adott sejt pozitív vagy negatív?

18. Hasonlóképpen a Varga et al 2014-en alapuló 5.37 és 5.38 ábrákon használt antitestek a bíráló laboratóriumában knockout egereken nem bizonyultak specifikusnak. Elképzelhető a sejt kultúrában megjelenő eltérő expresszió hatása is és ezt dicséretesen korigálja a szerző a Megbeszélések 6.1-es táblázatában.

19. Az exogén anandamid koncentráció függő hatása CB1 illetve TRPV1 receptorokon nagyon izgalmas. Ugyanakkor a 116 oldalon az 5.47-es ábra hiányzik, érdemes lesz majd az előadásban pótolni.

20. Több helyen kijelenti a szerző, hogy hatást tapasztalt, de a szignifikancia nem érte el a megállapított szintet. Ezzel a megközelítéssel nem értek egyet. Például nem lehet kijelenteni hogy a HU-210 csökkenést okozott ha az adatok közötti különbség nem volt szignifikáns (125 oldal, 5.53. ábra). Ugyanez a FAAH inhibitor által kiváltott „növekedésre” is igaz (5.55 ábra nem mutat szignifikáns különbséget). A 170. oldalon azt írja a szerző, hogy a „hatás egyértelmű volt” habár nem volt szignifikáns különbség. Érdemes lenne a mintaelemszám becslés, illetve első vagy másodfajú hibák valószínűségének számolásából utána járni, hogy érdemes-e, lehetséges-e a mérés megismétlésével az esetleges alulmintavételezésből származó statisztikai hibák elkerülése.

21. A dolgozat másik csúcspontja a Chen et al 2016 Scientific Report anyagának bemutatása. Ezzel kapcsolatban azonban a fehérje-fehérje interakciók jelentőségében nem vagyok biztos. A co-IP a tisztítási eljárás során eredményezhet hamis eredményt, a bemutatott egyébként gyönyörű elektronmikroszkópos képen pedig összesen 3 esetben van a CB1 és a TRPV1 receptorokat reprezentáló immunarany szemcse megfelelően közel az összesen 43 aranyszemcséből. A PCA elemzésen kívül volt olyan elemzés, amely ennek a 3/43 aránynak az adott térrészre való előfordulási valószínűségét mérte (azaz a véletlen sűrűségtől eltér-e a kolokalizáció)?

22. A 157. oldalon bemutatott PIA molecula nem általánosan használt FAAH inhibitor. Ez a kísérlet később megerősítésre került-e szélesebb körben használt specifikus FAAH gátlószerrel?

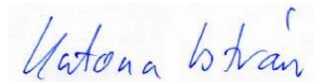
23. A 182. oldalon bemutatott FAAH inhibitor nem a FAAH gátlásán keresztül okozott halált, hanem más szerin-hidrolázokon kifejtett széles mellékhatás profilja miatt (van Esbroeck et al. 2017 Science).

24. Végül utolsó kérdésem a gyulladást modellező kísérletekben a CB1 szerepének csekély szerepet tulajdonítanak. Azonban széleskörű irodalom támasztja alá a CB2 kannabinoid receptorokon ható molekulák potenciális analgetikus hatását gyulladásmodellekben. Próbálta a szerző kutatócsoportja vizsgálni, hogy mi lehet a CB2 receptorok szerepe az általuk vizsgált modellekben?

Ezektől a kérdésektől és megjegyzésektől függetlenül összességében a disszertáció egy kiemelkedően részletes, neuroanatómiai, neurofiziológiai és farmakológiai értékes adatokat bemutató precíz munka, amely funkcionálisan és akár terápiásan is jelentős eredeti tudományos eredményeket mutat be.

Összegzésül tehát megállapítom, hogy Dr. Nagy István nemzetközileg kiemelkedő pályafutása és a dolgozatban szereplő fontos tudományos eredmények alapján az értekezést védelemre alkalmasnak tartom, annak kitűzését javaslom, és az MTA doktora cím adományozását maximálisan támogatom.

Budapest, 2020. május 10.



Katona István