

Opponensi vélemény

dr. Czirják Gábor: *A TRESK háttér kálium csatorna molekuláris szabályozási mechanizmusainak vizsgálata*
című MTA Doktori Értekezéséről

Dr. Czirják Gábor MTA Doktori Értekezésének témáját a PhD disszertációjának benyújtását követő közel 20 év kutatásai képezik. Jelölt ezen időszakból választotta ki azon, a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetében működő laboratóriumában végzett méréseket, melyekben a TRESK csatornák működését vizsgálták. Tanulmányozták a TRESK csatornák szabályozásának kalciumfüggését, valamint feltárták a csatorna foszforilációjának szerepét annak nyugalmi állapota stabilizálásában. Értekezésében Szerző tematikus felosztásban ismerteti az adott témában megjelent, a disszertációt megalapozó 22 közleményének eredményeit, melyek közül Czirják doktor 12 esetben első, 6 esetben pedig utolsó szerző. A közlemények rangos nemzetközi folyóiratban – közülük kiemelendő a *Physiological Reviews* és a *Journal of Biological Chemistry* – jelentek meg, amit a 136,1-es összesített impakt faktoruk is mutat. Jelölt további 11 tudományos közlemény szerzője vagy társszerzője, melyek szintén rangos idegen nyelvű folyóiratban jelentek meg.

Az értekezés, a 366 irodalmi hivatkozást felsorakoztató *Irodalomjegyzéken*, a *Tartalomjegyzéken* és a *Rövidítések jegyzékén* kívül, 193 oldalon, 68 (és egy függelék) ábrával illusztrálva, részletesen tárgyalja a munka célkitűzéseit, az alkalmazott módszereket és az elért eredményeket. A részletes, több mint 40 oldalas irodalmi összefoglalás után Szerző ismerteti célkitűzéseit, az alkalmazott módszerek fontosabb elemeit, majd kitér a kísérletek eredményeinek és az azokból levonható következtetések felsorolására. Az eredmények tárgyalásakor, tematikusan csoportosítva, a megismerés útját követve, az adott témában megjelent cikkek fontosabb megállapításai kerülnek bemutatásra, gazdagon illusztrálva és részletesen diszkutálva. Külön kiemelendő a bemutatott ábrák igényes szerkeztése, és az a tény, hogy Jelölt az eredményeket bemutató ábrák mellett azokat magyarázó, értelmező ábraszöveget is közöl, melyek önmagukban is érthetővé teszik az ábrákon bemutatásra kerülő adatokat.

Az értekezés nyelvtani hibát csak elvétve tartalmaz. Ezek legtöbbször Szerző azon törekvését tükrözik, hogy megpróbál az angol szakirodalomban meghonosodott kifejezéseknek magyar megfelelőt találni még akkor is, ha az furcsa szóhasználathoz vezet. Gépelési hiba az értekezésben, a szövegszerkesztő használata miatt szintén elenyésző

számban található, olyankor is úgy, hogy egy egyébként értelmes, de oda nem illő szó helyettesíti a Szerző által írni kívántat. A hibák felsorolásától a bírálóban eltekintek, az alábbiakban csak néhány, jellemző példát mutatok be:

Furcsa szóhasználat:

32. o. „*párolgó folyadék anesztetikumok*”;

69. o. „*az EC [K⁺] kétszeres emelése*”;

77. o. 23. ábra szövege „*belsejét kifordított membrán foltnban*” (megjegyzem Szerző máshol, akár ugyan azon az oldalon is, nyugodtan használja az „*inside-out*” kifejezést;

Helytelen szóhasználat:

53. o. „*mérési feltételek mellet*”;

78. o. 32. ábra szövege „*Az vad típusú*”.

Az értekezés fontosabb új tudományos megállapításait az alábbiakban foglalnám össze:

1. Elsők között azonosították a humán genomban, majd klónozták a TRESK és a Kv8.2 csatornákat. Igazolták, hogy a Kv8.2 csatorna a retina fotoreceptoráiban fejeződik ki és alapvető szerepet tölt be a fényre adott válasz kinetikájának kialakításában.
2. Elsőként mutatták ki, hogy a TRESK csatorna megnyílása G_q-fehérjékhez kapcsolt receptorok aktiválásával is kiváltható. Rámutattak, hogy a megnyílás hátterében az intracelluláris kalciumkoncentráció megemelkedése áll.
3. Igazolták, hogy a kalcium ionok nem közvetlenül, hanem a kalcium/kalmodulin-dependens protein foszfatáz kalcineurin aktiválásán, s a csatorna következményes defoszforilációján keresztül fejtik ki hatásukat. Azonosították a csatorna szekvenciájában azokat a szerin aminosavakat (szerin klaszter), melyeket a kalcineurin defoszforilál, továbbá a csatorna azon régióját, ahova a foszfatáz kötődik.
4. Megállapították, hogy a kalcineurin mellett, *in vitro*, kötődik a csatornához a 14-3-3 fehérje és a tubulin is. Előbbi kötődése a TRESK csatorna működését gátolja, valamint gátolja a szerin klasztert foszforiláló kinázokat is.
5. Rámutattak, hogy a szerin klaszter aminosavai közül az S262-t és S264-et a mikrotubulus-affinitás reguláló kinázok is foszforilálják, gátolva ezzel a csatorna működését. A 252-es pozícióban lévő szerin a protein kináz A foszforilálja.
6. Leírták a TRESK csatorna novel típusú protein kináz C izoenzimek (PKC η és ϵ) általi szabályozását, igazolva, hogy ezek a szerin klaszter aminosavait foszforiláló endogén kinázok gátlásán keresztül fejtik ki aktiváló hatásukat.

7. Farmakológiai vizsgálatokra alapozva bebizonyították, hogy a Hg^{2+} a K_{2P} csatornák közül csak a TRESK csatornákat gátolja.

Mint korábban már utaltam rá, Szerző követte a klasszikusnak számító fejezetekre történő felbontást. Ennek megfelelően kérdéseimet, megjegyzéseimet az értekezésben történő előfordulásuk sorrendjében teszem fel, kapcsolódva a megfelelő fejezethez.

MÓDSZEREK

54. oldal	<p>Az ionomycinnel történő mérésekről szerző csak annyit közöl, hogy a 2 és 30 mM K^+ tartalmazó extracelluláris oldatok esetén azok olyan változatát használták „<i>amelyek EGTA helyett kétértékű ionokat (2 mM Ca^{2+} és 0.5 mM Mg^{2+}) tartalmaztak</i>”.</p> <p>A mérések során Szerző feltételezi, hogy növekvő ionomycin koncentrációk adagolásának hatására egyre nagyobb intracelluláris kalciumkoncentráció-növekedés alakul ki. Az értekezésből nem világos, hogy mire alapozza ezt a feltételezést. Történtek kalciumkoncentráció mérések? Ha igen, milyen technikát alkalmaztak, erre ugyanis a Módszerek fejezet nem tér ki?</p> <p>Ugyancsak feltételezi, hogy a Ca^{2+}-k elsődlegesen az intracelluláris raktárakból származnak (pl. 101. o. „<i>a kalcium fő forrása, az intracelluláris raktár</i>”). Miért gondolja a Jelölt, hogy az ionomycin jelenlétében a felszíni membránon keresztül nem történik számottevő kalciumbelépés? próbáltak-e valamilyen módszert ennek igazolására? Található-e raktárvezérelt csatorna a vizsgált sejtek felszíni membránjában? Ha igen, az azokon át történő kalcium belépés miért hanyagolható el?</p> <p>Az ionomycin eltávolítása után az áramok csökkenése szinte azonnal megjelenik (pl. 36. ábra). Ilyen gyorsan eltűnne az intracelluláris raktárak membránjából az ionomycin?</p>
94. oldal	<p>Szerző jellemzően 50 nL térfogatot injektál a kísérletek során (pl. 32. ábra). Mekkora egy oocyta térfogata? Található-e az oocytákon mechanoszenzitív</p>

	csatorna? Ha igen, mekkora térfogat injektálása esetén lenne várható azok aktiválódása?
--	---

EREDMÉNYEK

69. oldal 18. ábra	Jelölt a TRESK csatornáról megállapítja, hogy az „ <i>a nyitott csatorna rektifikáció mechanizmust meghaladó mértékben enyhe kifelé rektifikálást mutat</i> ”. Ugyanakkor, bár ez egy fontos csatornatulajdonságnak számít, „ <i>a kifelé rektifikálás mechanizmusát nem</i> ” vizsgálták tovább. Miért nem folytattak kísérleteket ennek felderítésére? Van-e esetleg valamilyen elképzelésük a jelenség hátterében álló mechanizmusról?
101. oldal 37. ábra	<p>Az értekezésben Szerző vizsgálja a Karbachol által kiváltott TRESK áram növekedést M1 muszkarinos acetilkolin-receptort expresszáló oocytákon. Azon kívül, hogy megállapítja, hogy az M1 receptor aktiválása Karbachollal jelentősen növeli az áram nagyságát, elemzi, hogy ez a növekedés milyen mértékű. Ehhez az agonista adására bekövetkező áramnövekedést az adagolás előtti értékre – a 37. ábrán I_0-val jelölve – normalizálja.</p> <p>Fontos szem előtt tartani, hogy a normalizálás igen érzékeny az I_0 értékre, különösen, ha annak nagysága kicsiny. Az ábra B panelén bemutatott esetben a vizsgált két mutáns – az AQLP és az AQAP – esetén az I_0 értéke jelentősen kisebb, mint a vad típusú csatorna esetén. Ez jelentősen befolyásolja a normalizálás után kapott adatokat. Különösen annak tükrében érdekes ez a probléma, hogy az ábra A panelén bemutatott esetben a mutánsok és a vad típusú csatorna I_0 értékei teljesen azonosnak tűnnek. Szerző nem mutat adatokat arra vonatkozóan, hogy az I_0 értékek átlagosan milyenek voltak a mutáns és vad típusú csatornák esetén. Ez szerencsés lett volna a C és D paneleken bemutatott adatok interpretálásához.</p>
134. oldal 52. ábra	Szerző a cAMP hatását is vizsgálta oocytákon mikroinjektálás segítségével. Kapcsolódva a Módszerek-nél feltett kérdésekre, a pipettában alkalmazott 0,1, 1 és 10 mM cAMP milyen koncentrációt eredményezhetett az oocyta intracelluláris terében? Történtek-e erre

	<p>vonatkozó számítások, becslések? Ha igen, milyen mértékben kellett figyelembe venni, hogy a cAMP nem egyenletesen oszlik meg az egyes intracelluláris kompartmentekben? Hogyan viszonyulna a mikroinjektálással elért koncentráció a sejt fiziológiás aktiválása során elért cAMP koncentrációhoz?</p>
<p>Általános kérdés</p>	<p>A TRESK áram aktiválódása során (pl. ionomycinnel vagy Karbachollal) a normalizált áram maximuma igen széles határok között mozog (kevesebb, mint 7 – 27. ábra; közel 15 – 37. ábra). Milyen jelenség állhat a jelenség háttérében? Milyen szórást mutat a bazális, nyugalmi TRESK áram? Milyen arányban vannak jelen nyitott TRESK csatornák egy nyugalomban lévő oocytán? Változik-e az egyedi csatornák vezetőképessége a különböző aktiváló mechanizmusok (pl. defoszforiláció) hatására?</p>

A fenti, lényegi problémát nem érintő kérdések mellett véleményem szerint dr. Czirják Gábor értekezése tartalmi szempontból megfelel az MTA Doktori Tanácsa által támogatott követelményeknek és illeszkedik a nemzetközi tudományos tendenciákhoz. Szerző célkitűzéseit megvalósította, s tudományos eredményeivel bizonyította nemzetközi szintű tudományos munkára és munkacsoport irányítására való alkalmasságát. Mindezek alapján **a nyilvános vita kitűzését és az MTA doktora fokozat odaítélését támogatom.**

Debrecen, 2021. december 5.

Dr. Csérnoch László
egyetemi tanár
az MTA doktora