

Opponensi vélemény

Dr. Czirják Gábor

„A TRESK háttér kálium csatorna molekuláris szabályozási mechanizmusainak vizsgálata”

című MTA doktori értekezéséről

Általános értékelés, szcientometriai szempontok:

Dr. Czirják Gábor értekezésében a TRESK-csatornák molekuláris vizsgálata témakörben végzett tudományos munkáját mutatja be. A TRESK-csatornák egyike az úgynevezett két pórusformáló hurkot tartalmazó káliumcsatornák (K_{2P}) alfajának. A K_{2P} csatornák közül jelenleg 15 humán gén ismert. A csatornákat a következő hat aloszaládra oszthatjuk: mechanikusan kapuzott (TREK), gyenge Kir (TWIK), sav-gátolt (TASK), pH-aktivált (TALK), halotán-gátolt csatornák (THIK) és végül az értekezés témájául szolgáló Ca^{2+} -aktivált (TRESK) csatornák. A hivatalos elnevezések (és rövidítései) természetesen ettől eltérnek. A csatornák jellemzően az úgynevezett háttérkonduktancia kialakításában játszanak szerepet, amelynek révén stabilizálják a sejtek nyugalmi membránpotenciálját (Enyedi&Czirják, Phys Rev 2010).

Az értekezés egy komplett munka, olvasója teljes és részletes képet kap a TRESK-csatornák minden eddig ismert tudásáról. A jelölt szerencsésen részese volt az első perctől kezdve ennek az elmúlt 2 évtizedben azonosított csatorna kutatásainak és bátran elmondható, hogy tevékenységével nagymértékben hozzájárult a TRESK-csatorna tulajdonságainak, élet, kórleletani és farmakológiai jelentőségeinek a vizsgálatához és tudományos ismertetéséhez. Az értekezést átolvasva, teljes képet kapunk, sőt kijelenthető mindent megtudunk, ami eddig megtudható a TRESK-csatornáról. Így értekezés inkább tekinthető egy terjedelmes saját kutatási eredményeket bemutató „*review*” dolgozatnak, mint egy tipikus MTA doktora értekezésnek. Ezt akár rendhagyónak is mondhatnánk, ugyanis az MTA doktori címre pályázók jellemzően 1-3 évtizedes tudományos kutatói tevékenységük ideje alatt több témával is foglalkoznak, így az MTA doktori értekezések is több akár eltérő kutatási témákat ismertető összegző munkák szoktak lenni.

Czirják Gábor értekezése egy relatív homogén monográfia, aminek az oka, hogy a Szerző az első naptól kezdve az értekezés benyújtásáig szinte csak a kétpórusú csatornák vizsgálatával foglalkozott. Eleinte a TASK-csatornákat vizsgálta, így PhD értekezését is megalapozó 4 dolgozatában ezen eredményeket ismertette. Ezután jellemzően viszont csak a TRESK-csatorna vizsgálatával foglalkozott, ezek eredményeit összegzi jelen MTA doktori értekezésében. Összes közleményeinek száma az értekezés benyújtásának idejében 32 volt, és ebből 22-öt használt fel az MTA értekezésben bemutatott eredmények ismertetéséhez. Ellenőriztem és azt találtam, hogy az értekezésben fel nem használt dolgozatok is jellemzően a kétpórusú csatornák vizsgálatát ismertetik, sőt az értekezése benyújtása óta eltelt másfél évben is K_{2P} , illetve azon belül is jellemzően TRESK-csatorna témájú dolgozatokat publikált. Tudományos munkája eredeti, és jellemzően hazai környezetben készült. Tudományos dolgozatainak jelentős részeiben

(80%) a Jelölt szenior első vagy utolsó szerzője, ami nemzetközi szinten is kiemelkedő. A dolgozatok kivétel nélkül vezető magas impakt faktorú, illetve Scimago D1, vagy Q1 folyóiratokban jelentek meg. A dolgozatok összidéztsége (független idézetek száma jelenleg 1500 feletti) is kiemelkedő, ugyanakkor a 20-as Hirsch, illetve 32-es g-indexek azt is jelzik, hogy egyrészt minden dolgozatot jelentős mértékben idéznek, illetve magas a kiemelkedő idéztséget mutató dolgozatok száma is. Utóbbiak, vagyis a 80 feletti idézetekkel rendelkező publikációk esetében is ki kell emelni, hogy ezek között is jelentős a tisztán hazai munkából készült tudományos dolgozatok száma. Fentiek alapján kijelenthető, hogy Dr. Czirják Gábor a téma nemzetközi szinten is számon tartott szakértője. Jelen eljárásnak és bíráltnak már nem témája, de akkor is érdemes kiemelni, hogy a Jelölt tudományos habitusa is kiemelkedőnek tekinthető. Megállapítható, hogy a Jelölt egyértelműen megfelel az MTA Doktori Szabályzatában megfogalmazott, és azon belül is az Orvosi Tudományok Osztálya által támasztott ügyrendi követelményeknek.

Az MTA doktori értekezés részletes bírálata:

Formai és tartalmi szempontok:

Az értekezés 224 oldalnyi, magyar nyelven írott szövegből áll, az érdemi rész 195 oldalt tesz ki, melyet 366 jól válogatott irodalmi hivatkozás egészít ki. A disszertáció megértését 66 ábra, 2 táblázat, illetve az értekezés végén egy függelék (homodimerek eredő keverék áramait ismertető tétel) segíti elő. Az értekezés logikusan szerkesztett, fejezetei kellő gondossággal íródtak, kivitelezése szemre tetszetős. Az ábrák megfelelő méretűek, jól követhetőek, kellő részletességű ábrafelirat segíti önálló megértésüket. Az értekezés nyelvezete gördülékeny, és gyakorlatilag nem találtam említésre méltó gépelési hibát sem.

Viszont mindenképpen kritikával kell élnem az értekezés terjedelme miatt. Igaz, hogy az MTA Orvosi Osztály által megfogalmazott MTA doktori szabályzat ügyrendje nem korlátozza a terjedelmet, hanem csak annyit javasol, hogy olyan doktori művet kell mellékelni, amely önmagában véve is alkalmas a kérelmező eredeti tudományos teljesítményének értékelésére, megítélésére, valamely tudományos kérdés megoldásának bemutatása alapján. Az értekezés, és az értekezést meghatározó 22 dolgozat gondosan átolvasása után mindenképpen meg tudom állapítani, hogy a Jelölt nem akart kihagyni semmit munkáiból, ezért az értekezés túl hosszú, helyenként túl burjánzott lett. Érdemes lett volna figyelembe venni az MTA szabályzat V. (orvosi) osztályának is ajánlásait, amely így fogalmaz a 2.7-es pontnál.

„A saját érdemi tevékenység megítéléséhez a pályázónak a legjobban hivatkozott 10 közleményét vagy az általa kiválasztott 10 közleményt kell mérlegelni. Azoknál a közleményeknél, amelyekben nem első vagy utolsó szerző, a pályázó közleményként nyilatkozzon arról, milyen dokumentálható tevékenységgel járult hozzá a kutatáshoz és a mű létrejöttéhez.”

Mint korábban már kiemeltem, Dr. Czirják Gábornak 18 olyan dolgozata is van, a témából, amelyben első, utolsó vagy levelező szerző, vagyis nyugodtan kihagyhatott volna néhány dolgozatot, különösen úgy, hogy az értekezés témája tulajdonképpen egyetlen relatív

homogén kutatási téma ismertetéséről szól. A Bevezetésben 47 oldalon ismerteti a kétpórusú csatornák tulajdonságait, ami természetesen fontos, mert relatív új témáról van szó, konkrétan az 1990-es évek második felétől kezdtek ezen csatornák intenzív vizsgálatát. A Jelölt ezután közel 40 oldalon ismerteti a K_{2P} -csatornák tulajdonságait, és áramról áramra ismerteti őket, így hosszú oldalakon olvashatunk a TWIK, TREK, TASK-csatornákról anélkül, hogy az értekezés fő témája a TRESK-csatornák szóba kerülnének. Ezt a részt biztosan rövidebben is lehetett volna ismertetni. A TRESK-csatorna vizsgálatának motivációja leírását viszont mindenképpen dicsérnem kell, jól van bevezetve, és iskolapéldája annak, hogy egy téma „beérkezése” egy kutatócsoport számára sokszor fura véletlenek egybeesésének játéka. A Módszerek bemutatása precíz, pontos, arányos és redundancia mentes. Az Eredmények fejezet a másik része az értekezésnek, amely túlméretezett, összesen 100 oldal. Mint néhány sorral fentebb már részleteztem, a Jelöltnek az ügyrendi ajánlás alapján mérlegelnie kellett volna, hogy eddigi életművéből mi legyen az, amit feltétlenül részletesen ismertet, és mi legyen az, amit rövidebben prezentál, vagy akár esetleg kihagy és csak hivatkozik eredményeire (például a Megbeszélés fejezetben).

Nem tisztzem eldönteni, hogy feltétlenül melyik altéma a túltárgyalt, de lehet nem kellett volna kitérni a TRESK-csatorna és a calcineurin kapcsolatának minden aspektusára (14 alfejezetből 4 alfejezet is foglalkozik a calcineurin témáról). A Megbeszélés fejezet 27 oldalas, amelyet így a fentiek alapján akár túl rövidnek is lehetne mondani, de valójában nem az. Ha valamilyen kritikát fogalmaznék meg, inkább csak az, hogy szerkezete nem követi az Eredmények fejezet struktúráját, ezért, aki úgy olvassa, hogy meg szeretne nézni mi annak a részeredménynek a diszkussziója, az nehezen találja meg az oda vonatkozó részeket. A Megbeszélés fejezet három alfejezetből áll, így először a TRESK-csatorna általános funkcionális jellemzőit ismerteti, ezt követi a TRESK-csatornák molekuláris szabályozó mechanizmusának a taglalása, és logikusan a végére hagyta a TRESK csatornák élettani, illetve orvosi jelentőségének az összefoglalását. Nem állítom, hogy ez a választott struktúra helytelen, de tény, a Megbeszélést olvasva, sokszor nehézséget okozott megkeresni az Eredmények, illetve a Diszkussziós részek összeillő részeit vagy gondolatait.

Fentieket összefoglalva elmondható, hogy a bemutatott eredmények a Jelölt saját tudományos megfigyelésein nyugszanak, a Szerző meghatározó szerepét hangsúlyozza, hogy közleményei közül gyakorlatilag szinte csak első, illetve utolsó szerzős publikációkat használt fel az értekezés elkészítéséhez. Az alkalmazott módszertan megfelelően megválasztott, releváns elektrofiziológiai és molekuláris biológiai *in vitro* és *in situ* modellek felhasználásával, vagyis a modern kísérletes tudományos kutatás technikai palettájának elfogadott eljárásai segítségével vizsgálódott. **Kijelenthető, hogy az értekezés egy gondosan megtervezett, koherens kutatási program megvalósítását mutatja be.**

Az értekezés átolvasása során a következő kérdések merültek fel bennem:

1. A logika azt mondaná, hogy a TRESK-csatorna, azért a TWIK, de különösen a TREK 1 és 2 (TWIK Related K^+ -channels” 1 and 2) csatornához kellene nagyon hasonló tulajdonságú legyen. Ezért kérdezném, hogy igaz, hogy nem jellemző a TRESK-csatornák mechanoszenzitivitása, amely viszont tipikus a TREK-csatornákra, és ha igen miért nem? Az

értekezésben sem találtam erre vonatkozó kísérleteket, csak a Megbeszélés rovatában van némi diszkusszió erre vonatkozóan, amely elsősorban mások munkáját taglalja.

2. Az értekezésben Módszerek fejezetében a Jelölt kiemeli, hogy a *Xenopus* oocytákban végzett két-elektrodos *voltage-clamp* mérések szobahőmérsékleten kerültek sorra. Kerestem, de nem találtam utalást, hogy a COS-7, illetve HEK-293 sejtvonalakon készült standard patch-clamp kísérleteket milyen hőmérsékleten végezték, így csak feltételezem, hogy azok is szobahőmérsékleten készültek. Kérdésem, hogy mit lehet tudni általában a K_{2P} -csatornák, és azon belül is az értekezés témáját képező TRESK csatornák hőmérsékletfüggő (csatorna kinetika, aktiváció, szenzitivitás, stb.) tulajdonságairól?
3. A Jelölt átfogóan ismerteti a TRESK-csatorna kalcium-függő szabályozását. A citoplazma kalcium koncentráció emelkedésének hatására növekedő K^+ áram több mint 25 ábrán szerepel az értekezésben. Azonban az összes ilyen mérés *Xenopus* petesejtekből származik, annak ellenére, hogy farmakológiai mérések történtek emlős sejtvonalakban is. Mi ennek az oka? Miért nem szerepel az értekezésben a TRESK kalcium-függő szabályozása HEK-293 vagy COS-7 sejtekben?
4. A kísérletek alátámasztják, hogy a TRESK-csatornát a kalcineurin foszfatáz serkenti. Nem említi viszont az értekezés egyáltalán, milyen mechanizmus felelős a defoszforiláció csatorna aktivitás növelő hatásáért. Hogyan függ össze a csatorna foszforiláltsági állapota a csatorna kapuzásával? Mit gondol a Jelölt erről a kérdésről?
5. Ismert, hogy a TREK-1 csatornák esetében, bizonyos esetekben megváltozik a csatorna permeabilitása/szelektivitása, és így már nem K^+ , hanem Na^+ ionra válik érzékeny. Ezzel magyarázták például a hipokalémiában ismert depolarizációs paradox jelenséget is (Ma et al, J Biol Chem 287: 37145-37153, 2012), illetve ezen érzékenységcseré lehet felelős adott körülmények között szívritmuszavarok (például kamrai tachycardia) megjelenésért (Decher et al, EMBO Mol Med 9: 403-414, 2017). Kérdésem az, hogy ismert-e a TRESK-csatornákra is valamilyen hasonló tulajdonság.
6. Az értekezésben a Jelölt ismertette, hogy számos vegyülettel ellenőrizték a TRESK-csatornák gátlós szereit, de igazándiból egyetlen vegyület sem bizonyult hatékony szelektív gátlószernek. Kérdezném azt is, hogy azóta sincsen ismert hatékony gátlószer/aktiválószer a csatornákra? Ha nincsen, hogyan volna egyáltalán lehetséges ezen csatornák farmakológiai „hasznosítása”?
7. Milyen szövetekben fejeződik ki a TRESK-csatorna a hátsó gyöki és trigeminális ganglion primer szenzoros neuronokon kívül? Van szerepe a csatorna kalcium-függő szabályozásának ezekben a lokalizációkban?
8. A receptor ingerlés és nagyfokú citoplazma kalcium koncentráció növelés egyaránt összetett membrán foszfolipid változásokat okoz. Befolyásolja a TRESK-csatornát a membrán foszfoinozítidek szintjének változása?

Új tudományos eredmények összegzése:

A Jelölt 7 alpontba szedve, mértéktartó módon foglalja össze az értekezés legfontosabb észleléseit. Érdemes lett volna megfogalmazni maximum 3-5 pontban kiemelni a legfontosabb eredményeit úgy, hogy annak megfogalmazása egyrészt legyen érthető a szélesebb

olvasóközönségnek is, beleértve ezek esetleges gyakorlati hasznát is. Javaslom, hogy utóbbi feltétlenül tegye majd meg az MTA értekezésének Nyilvános vitáján bemutatott tudományos előadása során.

Fentiek közül a következőket fogadom el a Jelölt legjelentősebb önálló, új tudományos eredményeiként (kettőt összevontam)

1. A humán genom szekvenciájában azonosították a TRESK (KCNK18) és KV8.2 (KCNV2) géneket, majd a csatorna alegységek cDNS-ét klónozták. Elsőként igazolták, hogy a KV8.2 a retina fotoreceptor sejtjeiben fejeződik ki és a KV2.1 alegységgel heteromerizálódva olyan feszültségfüggő K^+ áramot hoz létre, amely lehetővé teszi a fényre adott elektromos válasz normális lefutását.
2. Elsőként mutatták ki, hogy a Gq-fehérje kapcsolt receptorok ingerlése aktiválja a TRESK-csatornát. Az aktivációt a citoplazma $[Ca^{2+}]$ növekedése hozza létre, de a kalcium ion nem közvetlenül hat a csatornára. A kalcium/kalmodulin-dependens protein foszfatáz kalcineurin defoszforilálja a TRESK-csatornát és ezzel növeli a háttér K^+ áramot.
3. A kalcineurinon kívül *in vitro* kötődik még a csatornafehérjéhez a 14-3-3 adapter fehérje és a tubulin. A 14-3-3 kötődése a TRESK-hez valószínűleg csökkenti a csatorna aktivitást. Emellett a 14-3-3 gátló hatást fejt ki a szerin klasztert foszforiláló kinázra.
4. A szerin klaszter (elsősorban S262 és S264) aminosavait a mikrotubulus-affinitás reguláló kinázok (MARK1-3) foszforilálják, ezzel erőteljes TRESK gátlást okozva. Az S252 aminosavat a protein kináz A foszforilálja.
5. Az új típusú protein kináz C (PKC η és ϵ) úgy eredményezi a humán TRESK defoszforilációját, hogy gátolja azt az endogén kinázt, amely a szerin klasztert foszforilálja. A szerin klasztert foszforiláló kináz aktivitásának hiányában a TRESK K^+ áram lassan megnő.
6. A Hg^{2+} a K_{2P} család más tagjaitól eltérően gátolja a TRESK-csatornát.

A korábban ismertett érdeklődő kérdések nem befolyásolják az értekezéssel kapcsolatos általános véleményemet, miszerint a bemutatott eredmények egy az orvostudományok igen fontos területén végzett és ismereteinket kiterjesztő szintetizáló értékes kutatói munka összefoglalása. Az értekezésben megfogalmazott eredmények és következtetések messzemenően teljesítik az MTA doktora cím elnyerésért meghatározott követelményeket, ezért, a nyilvános vitára bocsátását feltétlenül javaslom, valamint sikeres védelem esetén a Jelöltnek az MTA Doktori tudományos cím megítélését támogatom.

Szeged, 2021. november 22.

Dr. Jost Norbert László
az MTA doktora