

Opponensi vélemény Dr. Balla András

AZ AT1 ANGIOTENZIN RECEPTOR MŰKÖDÉSÉBEN

SZEREPET JÁTSZÓ MECHANIZMUSOK VIZSGÁLATA című MTA doktori értekezéséről.

Előjáróban megjegyzem, hogy miután a G fehérjékhez kapcsolt receptorok vizsgálata több évtizeden keresztül különböző szempontok alapján rendkívüli módon érdekelt, nagy figyelemmel tanulmányoztam Dr Balla András munkáját.

Dr Balla András munkájának szakmai színvonalát jól jellemzik a scientometriai adatok (2023 május) Tudományos folyóiratcikkek száma: 40, Összesített impakt faktor: 229, Összes idézettség: 3034, Független idézettség: 2600, Hirsch index: 25. Maga a doktori mű 10 eredeti és 2 összefoglaló közlemény anyagára épül. Fontos azonban megjegyezni, hogy az értekezésből kimaradt 28 közlemény is általában magas impakt faktorú folyóiratban jelent meg: példaként említem a két IF=6 körüli Frontier periodikában tavaly, illetve 2022-ben megjelent közleményt, melyekben Dr. Balla András meghatározó szerző.

Az irodalomjegyzékkel együtt 65 oldal terjedelmű doktori értekezéshez csatoltan találjuk az alapul szolgáló közleményeket. Maga a disszertáció így 225 oldalnyira duzzadt fel, de a referenciák könnyű elérhetősége csak segíti az értékelést.

Térjünk át a tudományos eredmények és jelentőségük értékelésére.

Mindenekelőtt megállapítom, hogy véleményem szerint a munka hitelességéhez nem fér kétség.

A szerző a munka során elért legfontosabb megállapításokat 11 pontban sorolja fel. Ezek a következők (idézem):

- „1. Kimutattuk, hogy a II-es típusú PtdIns 4-kinázok az endoszómákkal asszociálódnak és megklónoztuk a II-es típusú PtdIns 4-kinázok egyik izoformáját (PtdIns4KII β).
2. Bebizonyítottuk, hogy a PtdIns4KIII α enzim szerepet játszik a plazmamembrán a PtdIns(4)*P* szintézisében.
3. Kimutattuk, hogy a PtdIns4KIII α enzim felelős a plazmamembránban az AngII hormon-szenzitív PtdIns(4)*P* és PtdIns(4,5)*P*₂ pool képződéséért és fenntartásáért.
4. BRET módszer felhasználásával feltérképeztük az AT1-receptor stimulusát követő aktiválódást, regulációs lépéseket, illetve receptor-mediált endocitózist élő HEK293 sejtekben. Kimutattuk, hogy az angiotenzin receptor megoszlása az aktivációt követően a plazmamembrán különböző mikrodoménjei között megváltozik az internalizációt megelőzően. Adataink alapján ez a mozgás a receptor G-fehérje aktivációjának az eredménye.
5. Kimutattuk az AT1-receptor szelektív aktiválásának következményeit különböző ligandumokkal. Jellemeztük az eltéréseket a receptor β -arresztin2 kötésében, a kalcium jel generálásban és internalizációs képességében a receptor G-fehérje független aktiválódását követően.
6. A kis G-fehérje aktiválódás mérésére létrehozott BRET bioszenzorok alkalmasak növekedési faktorok, hormonok (pl. AngII) szignalizációjának vizsgálatára, illetve különböző vegyületek ezen szignalizációs jelpályákra történő farmakológiai hatásának tesztelésére élő sejtekben, valamint a szondák targetálásával különböző intracelluláris kompartmentekben demonstráltuk kis G-fehérje jelpályák működését. Jellemeztük a Ras kis G-fehérje aktiválódást az AT1R stimulusát követően, illetve kimutattuk, hogy HEK293 sejtekben ez a folyamat nem az EGF-receptor transzaktiváció következménye.

7. Kimutattuk, hogy az AT1-receptor internalizációja lényegesen korábbi időpontban megtörténik, ha a receptor stimulálása G-fehérje független módon történik. Eredményeink alapján a jelátvitel-szelektív agonisták által okozott gyors korai internalizáció nem az eltérő endocitotikus útvonalakon keresztül jön létre, valamint sem az eltérő β -arresztin kötés erősség, sem pedig a Ca^{2+} jel hiánya nem játszik szerepet a folyamatban.

8. Vizsgáltuk a plazmamembrán PtdIns(4,5)P₂ szerepét az AT1R teljes agonista és funkcionálisan szelektív agonista indukált internalizációjában. A G-fehérje aktiváció következtében létrejövő PtdIns(4,5)P₂ bontás, majd pedig reszintézis meghatározó az AngII által kiváltott lassabb internalizációban.

9. Bebizonyítottuk, hogy a PtdIns 4-kináz III α esszenciális szereppel bír az AT1-receptor endocitózisának szabályozásában.

10. Kimutattuk, hogy az AngII-stimulus hatására számos DUSP izoforma expressziója megemelkedik érfal simaizomsejtekben és bizonyítottuk, hogy ezen változások döntően nem EGF-receptor transzaktiváción keresztül történnek érfal simaizomsejtekben.

11. Kimutattuk, hogy a koleszterin 25-hidroxiláz enzim expressziója jelentősen fokozódik vaszkuláris simaizomsejtekben az angiotenzin II hatására, illetve a stimulus hatására a sejtek 25-hidroxi-koleszterint termelnek, mely az atherosclerosis kialakulásában szerepet játszó gyulladásos folyamatokat segítheti elő.”

Valamennyi felsorolt megállapítást elfogadom új tudományos eredménynek.

Megállapítom, hogy mindezek a következő nagyobb kategóriákba sorolhatók: Az 1-3. és 9. megállapítás a PtdIns 4-kinázok, és különösen a PtdIns 4-kináz III α szerepével foglalkoznak az AT1R működésében;

A 4-8. megállapítások az AT1R aktiválását követő molekuláris lépéseket derítették fel, különös tekintettel teljes agonista és a funkcionálisan szelektív agonisták hatásai közötti eltérésekre;

Végül a 10-11. megállapítások az AT1R AngII-stimulus hatására történő aktivációját követő génexpresszió változásokra vonatkoznak. Itt megjegyzem, hogy a génexpresszió változások vizsgálata úgy tűnik, hogy még igen sok lehetőséget rejt magában, mivel a hivatkozott kísérletek szerint mintegy 100 gén expressziója változott az AT1R stimulációja után, azonban ezek közül csak a kettős specifitású foszfatázok (3 különböző enzim) és a koleszterin 25-hidroxiláz enzimek expresszió változásával foglalkozott részletesebben Dr. Balla András. Módszertanilag a három kategória igen eltérő eljárásokat alkalmaz. A széles módszertani repertoár nagy értéke a disszertációban foglalt munkának. A klasszikus enzim aktivitás méréstől a fehérje gélelektroforézisen keresztül a különböző klónozási és génexpressziós technikák jelentik a hagyományos biokémiai módszereket, míg a műszeres vizsgálatok közül az immuncitokémiával kombinált konfokális mikroszkópia alkalmazásával már a PtdIns 4-kinázok és az AT1R intracelluláris lokalizációjára és kolokalizációjukra nézve tudott értékes információhoz jutni. Számomra azonban a legizgalmasabbak az AT1-receptor stimulusát követő aktiválódásnak, a regulációs lépéseknek, illetve a receptor-mediált endocitózisnak élő HEK293 sejtekben történő vizsgálata voltak BRET (biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer) segítségével. Ezekhez a vizsgálatokhoz különböző BRET szondákat készítettek, amelyek alkalmasak voltak különböző fehérjék, illetve egyes fehérje szakaszok távolságát mérni az idő függvényében, így az AT1R aktiválása után bekövetkező változások dinamikáját, például a Ras kis G-fehérje aktiválódását, vagy az AT1R internalizációjának egyes részlépéseit követni.

Ugyancsak nagyon érdekesnek találom a jelátvitel-szelektív agonista ligandokkal végzett kísérleteket. A G fehérjéhez kapcsolt receptoroknak többféle aktív konformációja létezhet,

amelyek eltérő jelátviteli útvonalakat indíthatnak be. A jelátvitel szelektív agonisták ezek közül egyik, vagy másik aktív konformációt stabilizálva a különböző útvonalakat aktiválhatják. Az AT1R esetében az egyik útvonal a Gq/11 fehérjén keresztül, a másik attól függetlenül a β -arresztin mediált módon aktiválódik. Utóbbi útvonal egyébként a receptor internalizációjához is vezet. A receptor internalizáció folyamatát is időben tudta követni a BRET szondák alkalmazásával Dr Balla András.

Az opponenstől elvárt kritikai észrevételek sorában csak viszonylag jelentéktelen hibákra hívhatom fel a figyelmet a kiváló tudományos eredmények és az értekezés gondos összeállításának a fényében.

A hiányosságok közül a leg súlyosabb szerintem, hogy a Kísérletek leírása, módszerek fejezetből teljesen hiányoznak a hivatkozások. Sajnos az „Irodalmi háttér és a kutatás előzményei” című fejezetben – egyetlen ábraalírástól eltekintve - sem idézi a szakterület más kutatócsoportjainak a munkáit, csupán a saját összefoglaló közleményeire hivatkozik. Ez az eljárás nem csupán unfair, hanem a munka elhelyezését a nemzetközi tudományos eredmények sorában sem segíti.

Szerkesztési kifogásom a Bevezetés és célkitűzések fejezettel kapcsolatban a következő: A bevezetésben a sorrendet megcserélném, előre véve az ATIR tárgyalását, viszont kölcsönhatásait az EGFR és PDGFR rendszerekkel csak érintőlegesen jelezve, hiszen az a célkitűzések között nem szerepel. A bevezetésben indokolt lenne a módszertani fejlesztések szükségességét jelezni.

A Tudományos eredmények összefoglalásában a 8. ábra adatainak elemzésénél írja Balla András: kimutattuk, hogy ... a PtdIns4KII β izoforma enzimaktivitása kisebb, mint a PtdIns4KII α -é (8. ábra, A és B panel). Kifogásolható azonban, hogy az aktivitások nincsenek fehérje mennyiségre vonatkoztatva. Ezért nem tudható, hogy a mért összaktivitás különbség az expresszált fehérjék mennyiségi különbségének, vagy a specifikus aktivitások eltérésének a következménye.

31. és 32. ábrák aláírása elnagyolt, hiányos, nehéz megérteni, hogy melyik panel, illetve melyik görbe mit reprezentál. Például a 32. ábra: mit kell tudni az ott szereplő ligandumokról és mi az egyes jelölések értelme: pl. a TRV120023 ligandum jele az ábrán TRV3.

A rövidítés jegyzékből sajnos hiányoznak egyes gyakran előforduló, nem triviális rövidítések. (pl. RBD=Ras kötő domén, vagy tK=tail K-Ras)

Fentiekén túlmenően néhány kérdés is felmerül az opponensben:

A 22. ábra kapcsán: Mi a magyarázata annak, hogy a GFP-OSH2-PH2x szonda felismeri a plazmamembrán PtdIns(4)P-jét, de nem kötődik a Golgiban található PtdIns(4)P-hoz?

23. B. panel Meglepő, hogy a PAO+DTT hatása jelentősen eltér a PAO+merkaptotetanol hatásától. Lényegében ugyanis a PAO hatást kellene látni mindkét esetben.

A 3.10 „Az eredmények gyakorlati jelentősége” című fejezetben olvasható a disszertáció 57. oldalán a következő megállapítás:

„Az eredmények gyakorlati hasznosítása szempontjából az is lényeges, hogy a jelátviteli folyamatok nyomon követésére kifejlesztett rezonancia energiatranszferen alapuló módszerek továbbfejleszthetők nagy számú vegyület hatásának „high-throughput”

vizsgálatára.” Meg kell jegyezni, hogy kínai szerzők (Guo et al(Am J Physiol Cell Physiol 323: C583–C594, 2022) összefoglaló közleményükben felhívják a figyelmet a FRET/BRET módszerek hiányosságaira és arra is, hogy az RLuc helyett NanoLuc alkalmazásával a fehérje részletek közötti távolság mérés érzékenysége jelentősen javítható, továbbá ezen módszerek high-throughput assaykben történő alkalmazására is hoz példákat. Mi Dr. Balla András véleménye ezekről a fejleményekről?

Végül szeretném felhívni Dr. Balla András figyelmét arra, hogy a jelátvitel szelektív agonisták vizsgálatán túl érdemes lenne a jelenleg forgalomban lévő jónéhány AT1R antagonistá gyógyszer viselkedését abból a szempontból, hogy mutatnak-e jelátvitel szerinti szelektivitást. Ugyancsak az alapkutatáson túlmenő érdekessége lehet jelátvitel szelektív antagonisták kutatásának és megfelelő vegyületek felismerése esetén in vivo farmakológiai vizsgálatuknak és klinikai fejlesztésük kezdeményezésének.

Összefoglalólag megállapítom, hogy Dr. Balla András MTA doktori értekezése kiemelkedő kutatómunka jó színvonalú összefoglalása. A disszertáció nyilvános vitára bocsájtását és sikeres védelem esetén az MTA doktora cím odaítélését javaslom.

Tisztelettel,

Dr. Arányi Péter
a biológiai tudomány doktora

Budapest, 2024. 09. 15.