Válasz Dr. Csanády László opponensi véleményére

Köszönöm Dr. Csanádi Lászlónak, az MTA doktorának doktori értekezésem bírálatát, konstruktív megjegyzéseit és kérdéseit, melyekre az alábbiakban válaszolok:

I. Formai észrevételek:
Elírások:
7. oldal: "hat transzmembránból álló hélixet tartalmazó alegység"
7. oldal: "APT szenzitív"
17. oldal: a beillesztett 6. ábra eltakarja a szöveg egy részét
82. oldal: Table 3 — ilyen táblázatot nem találtam
72. B ábra: a fluoreszcencia jel pA-ben van megadva

Köszönöm a Bírálónak, hogy felhívta a figyelmem ezekre az elírásokra. Az első három valóban elírás illetve szerkesztési hiba. A 82. oldali hivatkozás az előző, 81. oldalon található 1. táblázatra kellett volna, hogy mutasson, a szöveg szerkesztése során maradt bent a téves hivatkozás.
A 72. B ábrán a fluoreszcenciás jel nagysága valóban pA-ben van feltüntetve. Ennek az az oka, hogy a fluoreszcenciát detektáló fotodióda áramát egy patch-clamp erősítővel mérjük pA egységekben. Valójában a fluoreszcenciás jel abszolút értékének itt nincs jelentősége, mivel VCF mérésekben az intenzitás változásának relatív nagyságára vagyunk kíváncsiak, melyet százalékosan adunk meg, így az mértékegységtől független, illetve a változás kinetikájára, melyet pedig időegységekkel jellemzünk.

Pontatlanságok:
8. oldal: "A Kir6.2 csatornák spontán nyitását az intracelluláris ATP szint emelkedése gátolja a szulfonilurea receptorokon keresztül." Valójában az ATP gátló hatását közvetlenül a Kir6.2 alegység citoszolikus doménjéhez köződve fejti ki, a szulfonilurea receptornak a MgADP okozta csatorna aktivációban van szerepe.
Idegen szavak indokolatlan használata:
35. oldal: "fundamentális események"

Köszönöm a pontosítást a K_{ATP} csatorna működésével kapcsolatosan.
Valóban, írhattam volna „alapvető események"-et.

Magyarázatot igénylő megállapítások:

41. oldal: "Mivel a HEK sejteken több ioncsatoma természetes, endogén expresszióját is leírták, a sejteken minden esetben outside-out patch konfigurációban végeztük az elektrofiziológiai méréseket."
54. ábra: CFSE — nincs definiálva

Transzfektálatlan HEK tsa201 sejteken depolarizáló impulzus hatására több száz pA amplitúdójú endogén feszültség-függő K^+ áram mérhető teljes-sejt konfigurációban. Annak érdekében, hogy ez az áram ne torzítsa a toxinok gátlása esetén számolt megmaradó áramhányadot, célunk volt a transzfektált csatorna áramának és az endogén csatorna áramának hányadosát maximalizálni. Emelt mennyiségű csatorna DNS bejuttatásával ez el is érhető, viszont teljes-sejtes konfiguráció esetén méréstechnikai korlátokba ütközik. Egyrészt, mivel a HEK sejtek nagyon hatékonyan képesek expresszálni e csatornákat, a mért áram nagyon sok esetben meghaladhatja az erősítő maximális, 20 nA-es méréshatárát. Másrészt, még ha a tartományon belül is marad az áram, sok nanoamperes amplitúdók esetén a soros ellenálláson eső nagy feszültség megakadályozza a sejt membránpotenciáljának a kívánt értéken történő tartását, ezzel jelentős mértékben torzítva mind az áram amplitúdóját, mind a kinetikáját. Kitépett membránfolt esetén (outside-out patch) jól kezelhető, néhány száz pA amplitúdójú áramokat kapunk a transzfektált

csatornákból, viszont az endogén csatornák árama gyakorlatilag mérhetetlen. Így jóval „tisztább" körülmények között végezhetők a mérések.
Valóban, sajnálatos módon kimaradt a CFSE esszé leírása a módszerek leírásánál. A CFSE esszé a karboxifluoreszcein szuccinimidil észter fluoreszcenciás festék használatán alapul, mely képes a sejtbe hatolni, és intracelluláris molekulákhoz kötődni. Sejtosztódás során a festék mennyisége feleződik, és arányosan csökken a sejt fluoreszcenciája is, így áramlási citométerrel meghatározható az osztódások száma, és az osztódott sejtek aránya.

II. Tartalmi megjegyzések, kérdések:
1. Az 5.1 fejezetben a 27—31. ábrákon bemutatott kísérletek során többször említi az inaktiváció hatását a pórus záródására, de nem pontosítja, hogy N- vagy C-típusú inaktivációról van-e szó.
Vajon ezek a mérések teljes hosszúságú csatornákon készültek, vagy N-terminálisan csonkított csatornákon, amelyek nem rendelkeznek inaktivációs peptiddel (Shaker IR)? Ezt érdemes lett volna tisztázni az 5.1 fejezet elején.

Valóban, nem említem sem az 5.1.1 fejezetben, sem az 5.1.2 fejezetben a kísérletekhez használt csatornát, bár az utóbbi fejezetben kiderül, hogy a lassú, C-típusú inaktivációról van szó. Mindkét kísérletsorozat a *Shaker* IR csatornával, azaz a N-terminálisú inaktivációs labdától megfosztott csatornával készült, így az inaktivációra vonatkozó megjegyzések a C-típusú inaktivációra vonatkoznak. Az Anyagok és Módszerek fejezetben ugyan többször is megemlítem a *Shaker* IR csatornát, de hogy ezt mely kísérletekben alkalmaztam, hiányzik. Tényleg ki kellett volna ezt emelni a könnyebb érthetőség kedvéért.

2. 64. oldal, 32. E-F ábrák: "Eredményeink azt mutatták, hogy a gátlás a rendszerünk időbeli feloldási határán belül kialakult, azaz igen gyors. A kimosás kinetikája szintén gyors volt, viszont konzisztensen lassabb, mint a gátlás kialakulásának kinetikája és szigmoid kinetikát követett. Bár nem bizonyítottuk további kísérletekkel, ennek lehetséges magyarázata, hogy több proton kötőhely van a szelektivitási szűrő intracelluláris bejáratánál, melyek közül egy betöltöttsége elegendő a gátlás kialakulásához. "
Talán kézenfekvőbb a következő magyarázat. Az oldatcsere során a lecserélt ion (jelen esetben a proton) koncentrációja időben exponenciális lefutással áll be az új koncentrációra. A csatornaáram azonban nem-lineáris függvénye a proton-koncentrációnak, hanem a protonok okozta blokk nagyjából hiperbolikus telítési görbét követ (ld. 32. D ábra): $I/I_0 \sim = K_I/([H^+]+K_I)$.
Az áramgörbe időbeli lefutását tehát az $I(t)=I_0*K_I/([H^+](t)+K_I)$ függvény írja le, ahol a protonkoncentráció időbeli lefutása $[H^+](t)=([H^+]_0-[H^+]_\infty)*(\exp((t-t_0)/\tau))+[H^+]_\infty$. Az áram nem-lineáris protonfüggése miatt a blokkoló protonok rámosásakor (pH:7.3 → pH:4.2 váltás) az áram az oldatcsere időállandójánál rövidebb időállandóval csökken, a protonok elmosásakor (pH:4.2 → pH:7.3 váltás) viszont csak késéssel, és az oldatcsere időállandójánál hosszabb időállandóval áll helyre. Ez az aszimmetria annál kifejezettebb, minél magasabb az alkalmazott protonkoncentráció a blokk K_I értékéhez képest. A 32. E-F ábrán pl. a blokkoló iont (a protont) a gátlást okozó K_I értéknél 200-szor magasabb koncentrációban alkalmazták, így a tapasztalt aszimmetria nem meglepő, hanem megfelel annak, amit egy szimpla egykötőhelyes blokk mechanizmus jósol (ld. illusztráció).

Köszönöm a részletes, illusztrált, és igen meggyőző magyarázatot. Ez alapján valóban magyarázhatja a látottakat egyetlen proton kötődése, és mivel ez az egyszerűbb modell, ezt célszerű feltételezni a mechanizmus leírására. A közleményünk megjelenését követő évben jelent meg egy közlemény (J. Gen. Physiol. 123: 305-319, 2004), mely még részletesebben vizsgálta az intracelluláris protonok által okozott gátlást a nagy konduktanciájú Ca^{2+}- és feszültségfüggő BK K^+ csatornán. Bár e csatorna szerkezete nem teljesen egyezik meg a Kv csatornák szerkezetével, azokkal közeli rokonságban van, így a mechanizmusra vonatkozó konklúziók valószínűleg érvényesek a *Shaker* csatorna gátlására is. Ezen eredmények, a mi eredményeinkkel egyezően azt mutatták, hogy a protonok az egyedi csatorna áramok csökkenését okozzák, ami a mérőrendszer felbontását meghaladó nagy frekvenciájú kötődési és disszociációs lépések miatt következik be. Bár e tanulmány a gátlás enyhe feszültségfüggését mutatta ki nagy feszültségek (>100 mV) és alacsony pH (6=<) esetén, az általunk is vizsgált tartományban (<100 mV és pH 6,4) a gátlás itt is feszültség-függetlennek bizonyult. Ez az igen enyhe feszültségfüggés arra utal, hogy a membránon

keresztül eső potenciálkülönbség csak kis hányadát érzékelik a gátló protonok. Mivel a feszültség túlnyomó része a szelektivitási szűrőn esik, a gátló protonok nem lépnek be a szűrőbe. Megemelt intracelluláris K^+ esetén csökkent a protonok gátló hatása, ami a két ion közötti kompetícióra utal. Ezek alapján a javasolt mechanizmus az, hogy a protonok a szelektivitási szűrő intracelluláris végén egyszerűen „elakadnak", oda belépni nem képesek, így rövid időre akadályozzák a K^+ áramlást. E modell is megerősíti azt a feltevést, hogy egyetlen proton is elegendő az áram gátlásához, és nem szükséges négy kötőhely létezése.

3. A 76-77. oldalon leírja, hogyan számolták ki a toxinkötődés illetve disszociáció sebességeit a mért áramgörbékből. A 77. oldal tetején szereplő, a toxinkötődés sebességi állandóját kifejező egyenlet feltételezi, hogy a kötődés sebessége lineárisan függ az alkalmazott toxinkoncentrációtól.
Ugyanakkor a toxinkötődés 77-78. oldalon leírt kétlépéses modellje azt jósolja, hogy a kötődés sebessége a toxinkoncentráció nem-lineáris, telíthető függvénye. Tapasztalták-e méréseikben a kötődési sebesség telithetőségét magas toxinkoncentrációk esetén, vagy mindig olyan alacsony toxinkoncentrációkkal dolgoztak, amelyek mellett a toxinkötődés diffúziógátolt, azaz a fenti egyenlet érvényes, maradt, mint pl. az 51. D ábrán?

A legtöbb vizsgált toxin esetében nem végeztünk részletes analízist a gátlás kinetikájával kapcsolatosan, mivel elsősorban a Kv1.3 iránti affinitásukra, illetve más csatornákkal szembeni szelektivitásukra voltunk kíváncsiak. A dózis-hatás görbék felvétele során jellemzően a K_d érték 100-szorosáig mentünk fel, hiszen ennél a toxinkoncentrációnál már csak elenyésző áram marad, így a magasabb koncentrációk már nem sokat alakítanak a görbén, valamint a skorpiókból kinyert és tisztított toxinokból meglehetősen limitáltak voltak a felhasználható készletek. Azokban az esetekben, ahol vizsgáltuk a gátlás kialakulásának kinetikáját, ezeknél a koncentrációknál nem tapasztaltuk az említett telítési jelenséget.
Több toxin esetén egyébként nem is meghatározható a bemosási kinetika nagy koncentrációk alkalmazásakor a Kv1.3 csatornán, a kumulatív inaktiváció kialakulása miatt. Ugyanis sűrűn alkalmazott depolarizáló impulzusok esetén, még akkor is, ha azok igen rövidek, a csatornák egy része inaktivált állapotba kerül, és onnan nem tudnak visszatérni, így az amplitúdó folyamatos csökkenése figyelhető meg. Ha azonban elegendő időt adunk a csatornáknak az inaktivációból való visszatérésre, ami jellemzően minimum 15 s, akkor magas toxinkoncentráció esetén az egyensúlyi gátlás gyakran egy impulzus alatt kialakul, így kinetikája nem meghatározható.

Végezetül ismét szeretném megköszönni Professzor úr értékes bírálatát, kérdéseit, és kérem Professzor urat válaszaim elfogadására.

Debrecen, 2019. február 11.

Tisztelettel és köszönettel:

Dr. Varga Zoltán