Válasz Dr. Enyedi Péter opponensi véleményére

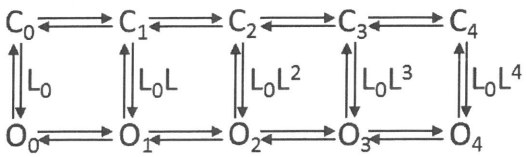
Köszönöm Dr. Enyedi Péternek, az MTA doktorának doktori értekezésem bírálatát, konstruktív megjegyzéseit és kérdéseit, melyekre az alábbiakban válaszolok:

1/ A mutáns csatornán (melyről kimutatták, hogy bizonyos körülmények között azért K+-ot vezet) a pórus záródás lelassul, ez esemény egyben a töltésmozgás sebességmeghatározójává válik. Más ionok (Cs+ és Rb+) esetében azonban a mutáns permeabilitása "elenyésző", amit bizonyít a depolarizációra és repolarizációra kapott áramok szemre azonos mérete. A 30c ábra, azonban a különbözö ionok esetében mért farokáramok időállandóit mutatja be. Mi képezte e számítások alapjait?

A 30c ábra tengelyfelirata és ábraszövege valóban félrevezető, mivel ionvezetés hiányában nem beszélhetünk farokáramról. $Tris^+$ esetén egyáltalán nem, míg Cs^+ és Rb^+ esetén elenyésző ionáram alakult ki. Így csak a K^+ ionok esetén helytálló a farokáram lecsengési kinetikájáról beszélni, míg a másik három nem permeáló ion esetén az OFF, azaz a hiperpolarizáció során kialakuló kapuzási áram kinetikájáról beszélhetünk. Mind a farokáram, mind az OFF kapuzási áram időállandóját egy-exponenciális illesztéssel határoztuk meg, és azt tapasztaltuk, hogy a permeáló K^+ ion esetén ez lényegesen lassabb volt, mint a nem permeáló ionok esetén.

2/ Az eredmények meggyőzőek arra vonatkozóan, hogy az aktivációs kapu teljes záródása minden esetben meg kell, hogy előzze a VSD visszatérését. Nem nyilvánvaló azonban számomra, hogy maga az aktivációs kapu a hordozója annak a "minimális töltésmozgásnak" ami a záródásához szükséges. Nem lehetséges-e, hogy a disszertációban korábban megemlített másik mechanizmus érvényesül, nevezetesen, a VSD részleges/minimális elmozdulása a feltétele a kapu mozgásának.

Valóban, bár az eredmények ismertetésénél mindkét lehetőséget bemutatom, az összefoglalásban hibásan, csak az aktivációs kapu minimális töltését említem, mint a záródás feszültségfüggésének lehetséges forrását. Bár mind a kapuzási töltés, mind a VCF-ből származó fluoreszcenciás jel globális kinetikája lassabb, mint az egyidejűleg mért ionáram lecsengése, ezek a mérések nem zárják ki annak lehetőségét, hogy a hiperpolarizáció először kis mértékű töltésmozgással járó VSD elmozdulást okoz, ami aztán lehetővé teszi a kapu záródását. A disszertációban említett, lazább VSD-PD csatolással rendelkező Kv csatornáknál, mint pl. a Kv7.1, nincs olyan merev kapcsolat a domének között, mint az általunk vizsgált *Shaker* csatornában, így e csatorna allosztérikus kapuzási modellje alapján előfordulhat, hogy a pórus kinyit még az összes VSD aktivációját megelőzően. Így létrejöhet olyan csatorna konformáció, ahol a VSD-k kapuzási töltésének egy része a nyugalmi állapotban van a pórus nyitott állapota mellett. Mivel azonban az allosztérikus modell szerint is nő a pórus nyitott állapotának valószínűsége az aktivált állapotban levő VSD-k számával (ábra lentebb), minimális az esélye annak, hogy ez a töltésmennyiség a teljes kapuzási töltés nagy részét kitegye. A Kv7.1 VCF-es vizsgálata során le is írtak egy kis amplitúdójú fluoreszcencia komponenst, ami szorosan követi a pórus nyitását, és ezt az S4 egy késői konformációs változásának tulajdonították, ami közvetlenül a csatorna nyitásához köthető. Ilyen fluoreszcencia komponenst mi magunk is megfigyeltünk a disszertáció elkészülte óta a Kv10.1 csatornán végzett VCF-es méréseinkben is. Továbbá, hasonló, a pórus nyitásához köthető kis mértékű VSD mozgást írtak le a Shaker csatorna úgynevezett ILT mutánsában is, amely a VSD-PD csatolást lényegesen lazábbá tette, mint a vad-típusú csatornában, így elkülönülten vizsgálhatóvá váltak a konformációváltozások.
Összegezve tehát, valószínűbbnek tűnik, hogy hiperpolarizáció során kis töltésmozgással járó VSD elmozdulás történik először, ami aztán lehetővé teszi a pórus záródását, és a VSD töltésének nagy része csak ezt követően tér vissza a nyugalmi állapotba.



A Kv7.1 csatorna allosztérikus kapuzási sémája.
A jobbra történő lépések az egyes VSD-k aktivációját jelentik, melyek történhetnek a pórus zárt (C), vagy nyitott állapota (O) mellett is. A lefelé irányuló lépések a pórus nyitását jelzik. A pórus nyitása egyetlen VSD aktivációja nélkül is megtörténhet, de valószínűsége L-szeresére nő minden VSD aktivációjával.

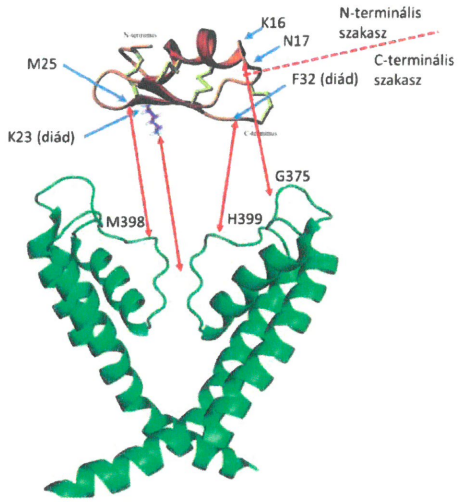
3/ A Shaker csatornát befolyásoló IC és EC pH-változások elemzését követően a limfociták legfontosabb FF K+ csatornájának, a Kv1.3-nak a pH érzékenységét vizsgálták. Kimutatták, hogy fiziológiáshoz közeli ionkoncentrációk esetén a megnövekedett EC protonkoncentráció csökkenti a csatornán folyó áramot, viszont - szemben a Shaker csatornával- lassítja az inaktivációt. Az utóbbi hatásnak fiziológiás jelentőséget is tulajdonítanak, mely szerint az inaktiváció lassulása szerepet játszhat a limfociták negatív membránpotenciáljának fenntartásában, elősegítve a proliferációhoz vezető fokozott Ca2+ beáramlást gyulladásos elsavanyodott környezetben. Kérdésem, hogy véleménye szerint ez a hatás jelentősebb lehet-e annál, hogy acidózisban a nyitott csatornákon folyó áram nagysága csökkent. Tehát gyulladásos körülmények között várható pH-n hogyan viszonyulhat egymáshoz a két ellentétes részhatás, mi lehet az eredőjük?

Az extracelluláris pH (pH_e) csökkentésének valóban komplex hatása van a Kv csatornák kapuzására. Amint az a *Shaker* csatornán végzett tanulmányunkból, és a mutáns Kv1.3 csatornákon végzett kísérletekből látszik, a savas pH_e jellemzően csökkenti az áramamplitúdót és gyorsítja a C-típusú inaktivációt. E két hatás természetesen az időegység alatt a csatornákon átáramló töltés mennyiségének csökkenését eredményezi. A Kv1.3 különleges tulajdonsága, hogy a pórus extracelluláris végénél négy, a fiziológiás pH tartományban titrálható hisztidin található, mely a pH_e csökkentése esetén a C-típusú inaktiváció lassulását eredményezi, bár az amplitúdó csökkenése továbbra is fennmarad.
Kv1.3 esetén a C-típusú inaktiváció által okozott áram lecsengés jól közelíthető egy exponenciális függvénnyel. Mivel egy egykomponensű exponenciális függvény integrálját az amplitúdó és az időállandó szorzata adja, ezért a hosszú idő alatt átáramló töltés számolható az $A \times \tau$ szorzattal. Méréseink szerint a Kv1.3 áram amplitúdója 91,2 %-ra csökkent és időállandója 117,2 %-ra nőtt pH 6,5 esetén, míg pH 5,5 esetén ezek az értékek rendre 67,1 % illetve 138,1 % voltak. A párokat összeszorozva egyhez igen közeli értékeket kapunk, ami azt mutatja, hogy az átáramlott töltés mennyisége nem változott jelentősen, azaz a két részhatás közel semlegesíti egymást.
A disszertációban valóban nem megfelelően fogalmaztam, ugyanis úgy kellett volna helyesen a jelenséget hangsúlyozni, hogy a gyulladásos környezetben fellépő pH csökkenés által kiváltott amplitúdó csökkenést a Kv1.3 hisztidinjei kompenzálják az inaktiváció lassításával. Azaz a Kv1.3 e speciális tulajdonsága „megmenti" a limfociták hatékony aktiválhatóságát még a savas környezetben is azáltal, hogy az inaktiváció lassítása révén megmarad a K^+ kiáramlással mozgatott töltésmennyiség.

4/ A skorpiótoxinokkal végzett vizsgálatok jelentőségét az is kiemeli, hogy a Kv1.3 csatornára specifikusan, nagy affinitással ható gátlószerek a terápiás felhasználás lehetőségét is magukban hordozzák. E toxinok kötődésének, hatásmechanizmusának megértése ezért különös jelentőségű. A Kv1.2-vel szemben (Kv 1.3nál) nagyobb affinitású Css20 toxin esetében érdekes megfigyelés volt Kv1.2 esetében lassabban kialakuló gátlás párhuzamosan a gátlás megszűnésének megnyúlásával. Az utóbbi nagyobb mértéke lehet a hátterében a Kv1.2-höz való nagyobb affinitásnak. E szokatlan jelenség hátterében lévő lehetséges folyamatokat, a kötődés és gátlás kialakulásának lépéseit modellezték, értelmezték és dokkolásos vizsgálatokkal alátámasztották. A magyarázathoz egyéb toxinok (és toxin kimérák) irodalomból származó szerkezeti és affinitási adatai is segítségül szolgáltak. E toxinok világát kevésbé ismerő olvasó/bíráló dolgát megkönnyítette volna néhány extra ábra, ami egyértelműen szemléltette volna az különböző toxinok egyes csatomákhoz való kapcsolódásának, affinitásának és hatékonyságának fontos szerkezeti meghatározóit.

A toxin-csatorna kölcsönhatás és szelektivitás meghatározó aminosavainak analízise valóban elég sok információt zúdít az olvasóra, különösképpen, hogy mind a csatornák, mind a toxinok aminosav számozása eltér, azaz az egymással ekvivalens pozíciókban levő aminosavakhoz más-más szám rendelhető. Egy ábra tényleg segített volna. Készítettem egy ábrát, amely feltünteti a tárgyalt aminosav pozíciókat az anuroctoxin és a Kv1.3 modelljén (ez utóbbi csak a pórusdomént alkotó S5-linker-S6 régiót mutatja két szemközti alegységből az átláthatóság kedvéért). A kék nyilak a tárgyalt toxin aminosavakat mutatják, a diád kritikus lizinjének pozitív töltésű oldalláncát feltüntettem, amely a kötődés során benyúlik a negatív töltésű szelektivitási szűrőbe. A piros szaggatott vonal választja el a tárgyalásban említett N- és C-terminális szakaszokat, melyeket a kiméra toxinok előállításakor cseréltek az egyes toxinok között. A piros nyilak jelzik az irodalomból vagy saját dokkolási számolásainkból ismert

kölcsönható partnereket. Bár az eltérő számozások miatt kissé nehézkes, de az ábra és a táblázat együttes használatával így azonosíthatóak a szövegben említett toxin és csatorna pozíciók, illetve kölcsönhatások.



5/ A Vm24 toxin ideálisnak tűnik a Kv1.3 gátlására. Affinitása pikomólos tartományban van, specificitása Vizsgált Kv csatornák vonatkozásában 3 a nagyságrendet is meghaladja. Ennek tükrében mi indokolta a sokkal kevésbé előnyös eredeti tulajdonságokkal rendelkező anuroctoxinból kiindulni az egyébként bravúros eredménnyel járó peptid—szerkezet módosításos kísérletsorozatban?

A Css20 és AnTx toxinoknál leírt szelektivitást meghatározó tényezők alapján megvizsgálva a Vm24 szekvenciáját a következőket találjuk: A Vm24-ben az AnTx 16 és 17-es pozíciójának megfelelő 18 és 19-es pozíciókban A illetve Q szerepelnek. A disszertációban bemutatott táblázat alapján a 18-asnak megfelelő pozícióban alanin az átmeneti szelektivitású toxinokban található, míg a 19-esnek megfelelő pozícióban glutamin a Kv1.2-szelektív toxinokra jellemző. A diád második pozíciójában Y34 található, azaz a Kv1.2-szelektív toxinokra jellemző tirozin.
Természetesen egy-egy mutáció funkcióra való hatása nem jósolható egyértelműen, és ez különösen igaz a mutációk kombinációjára, de a Vm24 fenti tulajdonságai, szekvenciaanalízisünk, és az AnTx-en sikeresen végrehajtott mutációk alapján úgy tűnik, hogy bőven van potenciál a Vm24 Kv1.3 iránti szelektivitásának javítására például az A18D, Q19A és a Y34T mutációk létrehozásával, vagy ezek kombinálásával. Eredményeink szerint ugyanis a Vm24 szekvenciája e mutációkkal jobban hasonlítana a nagy Kv1.3-szelektivitású toxinokéra.
Három dolog magyarázza, hogy mégsem a Vm24-en hajtottuk végre ezeket a szelektivitás javítását célzó mutációkat:
1. A Vm24 2.9 pM-os disszociációs állandóval gátolta a Kv1.3 csatornát, míg a Kv1.2 csatornán még 1 nM-os koncentrációban is csak 19 %-os gátlást okozott. Ez legalább 1500-szoros szelektivitást jelent a Kv1.3 irányában a Kv1.2-höz képest, ami bőven meghaladja a terápiás alkalmazáshoz javasolt minimum 100-szoros különbséget. A többi vizsgált csatorna irányában ez az arány még nagyobb volt, így nem éreztük szükségességét a toxin szelektivitásának további javítását. Ezt a gyakorlatban az egereken elvégzett toxicitási tesztek bizonyították, melyekben sem a teljes méreg, sem a tisztított toxin nem okozott toxicitási tüneteket még 10 mg / kg koncentráció esetén sem, melyek más csatornákkal történő keresztreakciók esetén felléphetnének.
2. Időrendben 2005-ben jelent meg az eredeti, vad-típusú anuroctoxint leíró közleményünk, 2008-ban pedig a Css20 toxint leíró közleményünk, melyben részletesen összehasonlítottuk ismert toxinok szekvenciáját, és azonosítottunk a Kv1.2 és 1.3 csatornák közötti szelektivitást meghatározó jellemzőket. Bár ebben az időben már folytak a kísérletek a Vm24 toxinnal is, kézenfekvőbbnek tűnt a „proof of concept" kísérleteket egy olyan toxinon elvégezni, melyről már léteztek publikált eredmények, és hasonló nagyságrendben gátolta a Kv1.2 és 1.3 csatornákat. Ezen felül a Vm24 toxinnal épp az extrém magas affinitása, és az emiatt alkalmazott nagyon alacsony koncentrációk miatt igen körülményes és

hosszadalmas volt a munka, mivel mind a bemosódási, mind a kimosódási kinetikák nagyon lassúak voltak.
3. A Vm24-re a mexikói Prof. Possanival nemzetközi szabadalmat nyújtottunk be, mely jellemzően sok éven át elhúzódó folyamat, és a kutatási eredmények nyilvánossá tételét erősen korlátozza. Így nem tűnt célszerűnek e toxinnal végezni a szelektivitási kísérleteket. Emellett, a potenciális gyakorlati felhasználást hangsúlyozandó, a Vm24-nél inkább az *in vivo* kísérletekre koncentráltunk.

6/ A Nav1.5 négy eltérő VSD-jének fluoreszcens jelölésével lehetővé vált az egyes VSD-k mozgásainak követése a ms-os időtartományban és ezek összehasonlítása a csatorna vezetőképességének változásával. A fluoreszcencia változás eredményei értelmezhetők-e úgy, hogy az I-es és II—es VSD esetében a depolarizációra, ill. az azt követő repolarizációra kapott feszültségfüggő változásnak nincs hiszterézise, míg III-as VSD esetében a steady state inaktivációs (SSI) mérési körülmények között van, és a visszatérés sebességét befolyásolja a depolarizált állapotban eltöltött idő?

Valóban erről van szó. A kapuzási töltés immobilizációját már 40 éve leírták Nav csatornákban, ami azt jelenti, hogy kellően hosszú, inaktivációt okozó depolarizációt követően a repolarizáció során a kapuzási töltés egy része lassabban tér vissza. A hagyományos árammérés azonban nem alkalmas arra, hogy ennek okát a VSD-k szintjén feltárja. VCF méréseinkkel viszont megmutattuk, hogy míg a DI és DII VSD-k gyorsan, a depolarizáció hosszától függetlenül térnek vissza a nyugalmi állapotba, addig a DIII lényegesen lassabban, és a depolarizáció időtartamától függő sebességgel tér vissza. Érdekes módon a DIV, ami az inaktiváció kialakulásáért felelős domén, bár lassan, de a depolarizáció tartamától független sebességgel tért vissza. Ez a megfigyelésünk eltér az izomban található Nav1.4 csatornán mások által tapasztaltakkal, mely szerint mind a DIII és DIV domének mutatják az inaktiváció okozta hiszterézist.
Felállított modellünk szerint a szív Nav1.5 csatornájában a DIII VSD lassú visszatérése határozza meg az inaktivációból történő visszatérést, és így a reftakter periódus hosszát.

7/ A jelölt amerikai tanulmányútj án elsajátította a voltage clamp fluorimetria megközelítést, és hazatérését követően e technikát a Debreceni Egyetemen is beállította/meghonosította. A disszertáció Eredmény/Megbeszélés részének 5.4—es pontjában e folyamatban lévő és tervezett kísérleteket három pontját ismerteti vázlatosan. E pontok közül az egyikről néhány előzetes eredményt is bemutat (melyek a membrán koleszterin tartalma és a Kv csatornák kapuzása közötti kölcsönhatásra világítanak rá). A másik két pont csak említés szintjén szerepel 8-10 sorban, és mindössze olyan kevéssé informatív megállapítást tartalmaz, mely szerint az előzetes eredmények szerint a NSV (novel voltage sensor) a membránpotenciál változásait közvetíti intracelluláris jelátviteli útvonalak felé. Valamint csak megemlít egy - a disszertációban nem szereplő újonnan beállított módszert a „substituted cystein accessibility method"-ot. Véleményem szerint az értékes disszertáció végéről ezek a pontok nem hiányoztak volna.

A röviden bemutatott projektek valóban nem illeszkednek szorosan a disszertáció témájához, és talán nem adnak hozzá az értékéhez. Célom ezekkel a rövid szekciókkal az volt, hogy bemutassam a VCF technika sokoldalú használhatóságát akár a már vizsgált Kv csatornák, akár az „elektromosan néma", azaz feszültség-érzékeny, de ionáramot nem vezető fehérjék működésének vizsgálata során. Azóta elfogadásra került a röviden bemutatott, a koleszterin Kv csatornák kapuzására kifejtett hatásának VCF-fel történő vizsgálatáról szóló közleményünk, valamint a bírálatok megválaszolását követően visszaküldésre került az NVS vizsgálatáról szóló közleményünk.

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