

Válaszok Dr. Katona István Tudományos Tanácsadó, Osztályvezető Úr bírálatára

Tisztelt Osztályvezető Úr,

Nagyon köszönöm az Akadémiai Doktori Értekezésem végtelenül konstruktív és nagyon alapos bírálatát. Számomra óriási megtiszteltetés, hogy a világ egyik vezető kannabinoid kutatója bírálta az Értekezésemet, és erre a bírálatra válaszolhatok. Szintén óriási megtiszteltetés, hogy munkámat a Hőgyes Endre, Jancsó Miklós, Jancsó-Gábor Aurélia, Jancsó Gábor és Szolcsányi János által lerakott kapszaicin kutatás útjára illeszti. Hőgyes Endre, Jancsó Miklós és Jancsó Gábor úttörő munkássága és iskolateremtése meghatározó a magyar kapszinnel kapcsolatos élettani kutatásokkal kapcsolatban. Hőgyes Endre majdnem 150 évvel ezelőtt született, a kapszaicin fogyasztás hatásáról szóló, illetve Jancsó Miklós több mint 55 évvel ezelőtt született, a neurogén gyulladás lehetséges mechanizmusairól szóló tudományos leírásainak az olvasása ma is élményszámba megy.

A Tisztelt Bíráló kérdéseire, tartalmi megjegyzéseire a következőket tudom válaszolni:

1. A dolgozat egyik központi témája, amelyet sok kísérletben vizsgált a szerző, hogy a CB1 kannabinoid receptorok hogyan szabályozhatják a TRPV1 ioncsatorna működését. A központi idegrendszerben ugyanakkor a szabályozási mechanizmus iránya pont fordított. Lee et al 2015 Journal Neuroscience tanulmánya leírja, hogy az anandamide és/vagy rokon N-acil-etanolaminok a TRPV1 aktiválásán keresztül csökkentik a 2-AG endokannabinoid termelését, ami pedig alacsonyabb tónusos CB1 receptor aktivációhoz, azaz gyengébb endokannabinoid jelhez vezet. Ez a modell első lépéseiben egyezik Mario van der Stelt és munkatársainak úttörő munkájával (2005, EMBO Journal), amely a hátsószarv ganglionok neuronjaiban az anandamid intracelluláris TRPV1-en keresztül kalcium felszabadító hatását írja le, ráadásul a 2-AG szintéziséhez szintén kalcium szint emelkedésre van szükség. Kérdésem, hogy figyelembe vették-e kollégáival az ellentétes irányú jelátviteli mechanizmus létezését a gerincvelői hátsó gyöki ganglionok neuronjain végzett méréseiben és vannak-e esetleg olyan eredmények a dolgozatban, vagy akár publikálatlanul, amelyek megerősíthetik, vagy elvethetik ennek a mechanizmusnak a működését a DRG-ben.

A megjegyzés/kérdés az endokannabinoidom működésének egy nagyon izgalmas kérdését feszegeti, nevezetesen, hogy a CB1 receptor és a TRPV1 hogyan befolyásolják egymás működését az idegrendszerben. Ezeket az egymást befolyásoló hatásokat természetesen alapvetően meghatározza, hogy az endokannabinoidom egyes elemei milyen celluláris és szubcelluláris kifejeződési mintázatot mutatnak. Úgy tűnik, hogy az idegrendszer különböző területein, ezek a kifejeződési mintázatok különbözőek.

A munkánk során vizsgált elsődleges érző idegsejteken a CB1 receptor és a TRPV1 nagyfokú együttes kifejeződést mutat. A CB1 receptort és a TRPV1-t együttesen kifejező sejtek egy jelentős része anandamidot szintetizál és FAAH-t is kifejez. Ezt az általunk leírt molekuláris elrendeződést egészítik ki a Tisztelt Bíráló és munkatársai által kimutatott MAGL enzim kifejeződése az elsődleges érző idegsejtekben, valamint a 2-AG-t szintetizáló DGL α enzim kifejeződése a gerincvelői másodlagos érző idegsejtekben.

A Lee és munkatársai (2015) irigylésre méltóan elegáns kísérletei során vizsgált hippokampusz piramis sejtek periszomatikus kapcsolataiban a TRPV1, CB1 receptor, anandamid és 2-AG szintézis és a FAAH és MAGL kifejeződés mintázata jelentősen különbözik az elsődleges és másodlagos érző idegsejtek közötti

szinapszisokban talált kifejeződési mintázattól. Így, a CB1 receptorok és TRPV1 kifejeződés sejtes elkülönülést mutat, a CB1 receptor a preszinaptikus membránban, míg a TRPV1 a posztszinaptikus dendritben fejeződik ki. Ráadásul, a TRPV1 nem a plazma membránban, hanem intracelluláris membrán struktúrákon található. Mind az anandamidot mind a 2-AG-t szintetizáló enzimikus apparátus azonban a posztszinaptikus sejtekben fejeződik ki. Ugyanakkor, ismét szemben az elsődleges érző idegsejtekkel, a FAAH és MAGL kifejeződés is sejtes elkülönülést mutat, a FAAH-t a posztszinaptikus sejtek, míg a MAGL-t a preszinaptikus sejtek fejezik ki.

A kifejeződési mintázatok alapján, az elsődleges érző idegsejtekben lehetőség van kétirányú direkt TRPV1 - CB1 receptor interakcióra, vagy a FAAH vagy MAGL által szabályozott anandamid, illetve 2-AG által közvetített indirekt interakcióra. A periszomatikus kapcsolatokban csak a TRPV1 és a CB1 indirekt interakciója lehetséges. Ebben az indirekt interakcióban (az anandamid közvetítésével) a TRPV1 aktiválása gátolja, (a 2-AG szintézis gátlása útján), a preszinaptikus CB1 receptor ligand-indukált tónusos aktiválását. Az Értekezésben bemutatott adataink alapján az elsődleges érző idegsejtekben mind a direkt mind az indirekt interakció iránya valóban fordított, hiszen a CB1 receptor aktivitása befolyásolja a TRPV1 aktivitását.

Azonban, az endokannabinoidommal kapcsolatos munkám kezdetén vizsgáltuk, hogy a kalcium beáramlás, például a TRPV1 aktiválása után, milyen hatással van az anandamid szintézisére az elsődleges érző idegsejtekben, ami esetleg befolyásolhatja a CB1 receptor működését (Ahluwalia és munkatársai, 2003). Ebben a munkában elsőként mutattuk ki, hogy az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedése, többek között a TRPV1 kapszaicinnal történő aktiválása útján, anandamid szintézishez vezet az elsődleges érző idegsejtekben. Ennek az anandamidnak a szerepét a fenti munkánkban nem vizsgáltuk, csak valószínűsítettük, hogy egy "intracelluláris fék"-ként működhet, tehát a TRPV1 indirekt módon képes lehet a CB1 receptor aktivitását befolyásolni.

Ezeket az adatokat azonban nem tudtam az Értekezésbe beépíteni, ugyanis az azokat leíró közleményünket, annak ellenére, hogy a leírt jelenségek valódiak, létezőek, más csoportok által közvetve megerősítettek, valamint a NAPE-PLD-nek az elsődleges érző idegsejtekben történő kifejeződése által alátámasztottak, vissza kellett vonnunk. Egy Akadémia Doktori Értekezés bírálatára adott válasz, illetve a nyilvános vita nem adhat fórumot a visszavonás okainak részletes ismertetésére. Ezért összegezve, csak annyit említenék, hogy a visszavonásra a University College London és az Imperial College London között, a közlemény első szerzőjére irányuló jogos vagy kevésbé jogos fegyelmi eljárás során kitört vita lezárásának elősegítésére került sor. A jelenség valóságát ellenőrző, később részben megismételt kísérleteink eredményét az Értekezés 104. oldalán egyebként röviden ismertettem.

A Tisztelt Bíráló által említett, van der Stelt és munkatársai (2005) által leírt adatok, így a mi adatainkat bővítették ki azzal, hogy az intracelluláris kalcium raktárakból felszabaduló kalciumnak hasonló, anandamid szintetizálást aktiváló hatása van mint az extracelluláris térből beáramló kalciumnak, és az így szintetizálódott anandamid a TRPV1-t aktiválja. Sem mi, sem van der Stelt és munkatársai nem vizsgálták, hogy kalcium függő módon szintetizálódó anandamidnak van-e hatása a CB1 receptor aktivitására. Azonban az értekezésben bemutatott adatok (Varga és munkatársai, 2014) alapján úgy tűnik, hogy az elsődleges érző idegsejtekben szintetizálódó anandamid, legalábbis ami a kalcium független szintézis során keletkező anandamidot illeti, inkább a TRPV1-t mint a CB1 receptort aktiválja.

2. Nagyon izgalmas a szerző számos polimodális aktivációs állapotot bemutató eredményei, amelyek a gerincvelői hátsó gyöki neuronok később hatalmas molekuláris és celluláris sokféleségével összhangban vannak. A bemutatott anatómiai eredmények ugyanakkor gyakran 15-20 évesek és annak idején a megfelelően specifikus és szenzitív ribópróbák, antitestek és a szükséges kontroll KO állatok még nem álltak rendelkezésre. Az esetleges fals-pozitív vagy akár fals-negatív eredmények miatt elképzelhető, hogy a kolokalizációs adatok mennyiségi elemzése során kapott több látszólagos ellentmondás megmagyarázható. Ezeket később részletezem. Ugyanakkor az elmúlt évek káprázatos egysejt-RNA-szekvenálási forradalma lehetővé teszi, hogy újraértékeljük a korábbi *in situ* hibridizációs és immunfestésen alapuló számadatokat. Ezek a legmodernebb eljárások ugyanis korábban elképzelhetetlen pontossággal mutatják be egyes agyterületek vagy például a hátsó gyöki neuronok celluláris taxonómiáját és az egyes sejttípusok molekuláris transzkriptomikai profilját. Ráadásul ezek a génexpressziós adatbázisok szabadon elérhetőek (Usoskin et al. 2015 *Nature Neuroscience*; Ray et al., 2018, Pain; Zeisel et al., 2018 *Cell*). Ezért azt javaslom, hogy a jelölt előadása során röviden térjen ki ezekre az új adatokra és mutassa be, hogy milyen megfigyeléseket milyen mértékben sikerült megerősíteni. Például a számos újonnan felismert DRG sejttípus (minimum 11!), közül melyik tartalmaz TRPV1, CB1, NAPE-PLD és FAAH mRNS-t az egysejt adatbázisok alapján. Valószínűsítem, hogy ezzel a gyors elemzéssel a későbbi kutatásokban is hasznosítható új hipotézisekhez is juthat a jelölt által vezetett kutatócsoport.

Teljes mértékben egyetértek a Tisztelt Bíráló immunfestésre irányuló kritikai megjegyzésével. A festések eredményeinek elemzése és interpretálása mindig óriási körültekintést igényel.

Ennek a körültekintésnek a fényében természetesen megpróbáltuk egyrészt az immunreakciókkal nyert korábbi eredményeinket utólagosan megerősíteni, másrészt az új, nem az endokannabinoidomra vonatkozó, immunreakciókkal nyert adatainkat ellenőrizni az egysejt RNS szekvenálással nyert eredmények felhasználásával. Ezek során egy sor nyilvános adatbázist néztünk át. Azt találtuk, hogy míg ezek az adatbázisok végtelenül hasznosak az egyes gének általános kifejeződésének az ellenőrzésére, az egyes sejttípusokon belül, az egyes gének kifejeződési gyakoriságának a megerősítésére vagy becslésére kevésbé alkalmasak. Így például az Usoskin és munkatársai vagy a Ray és munkatársai adatai alapján a TRPV1-t kifejező sejtek (NF2), NF4, (NF5), NP1, NP2, NP3, PEP1, (PEP2) és (TH) típusúak. Azonban, míg Usoskin és munkatársai a PEP1-ben, Ray és munkatársai a PEP2-ben, amiben Usoskin és munkatársai gyakorlatilag nem találtak TRPV1-t kifejező sejtet, találták a legmagasabb TRPV1 kifejeződést. Usoskin és munkatársai adatai alapján, az NF2, NF4, NF5 valamint a PEP1 csoportba tartozó TRPV1-t kifejező sejtek mutathatnak nagyobb CB1 kifejeződést.

A sejt típusok közötti bizonytalanságok mellett a kifejeződési gyakoriság is egy jelentős probléma. Például, az adatok szerint összességében a sejteknek csak 9%-10% fejezi ki a TRPV1-t. Ez a kifejeződési gyakoriság nyilvánvalóan jelentősen különbözik a funkcionális vizsgálatokkal nyert adatoktól, illetve a riporter génekkel kimutatott kifejeződés mértékétől (pl. Cavanaugh és munkatársai, 2011). A CB1 receptor RNS és protein kifejeződési gyakorisága is jelentős különbséget mutat, hiszen az RNS-t a sejteknek mintegy 15%-a fejezi csak ki az egysejtes RNS szekvenálással nyert eredmények alapján.

De nem csak CB1 receptor és a TRPV1 esetében vannak ilyen jelentős különbségek. A CGRP, FAAH és NAPE-PLD esetében is jelentős különbséget mutat az RNS és protein kifejeződés. Míg a CGRP kifejeződés esetében egyöntetű az

álláspont, hogy ezt a peptidet elsősorban nociceptív sejtek, azon belül is a PEP sejtek fejezik ki, és az összes sejt 35-40%-ban található meg. Ezzel szemben, az RNS kifejeződést a sejtek majdnem 80%-a mutatja, a mintában analizált NF3 és NP2 (nem peptiderg!) sejtekben szinte 100%-ban jelen volt, és a kifejeződés mértéke minden vizsgált NF3 és NP2 sejtben magas volt. A sejtípusokon belüli kifejeződés hasonló különbséget mutat a FAAH és a NAPE-PLD esetében is. A különbség a FAAH esetén szintén különösen meglepő, hiszen az antitest sokak által tesztelt és használt, a FAAH génhányos egerekben jelölést nem adó antitest. Míg az immunfestés eredménye elsősorban a nociceptív sejtekben, addig az RNS szekvenálás a nem nociceptív sejtekben mutatja a FAAH kifejeződését. Az NF3 és NF5 sejtekben a kifejeződés igen magas, 70% feletti, míg az NP2, NP3 és PEP1 sejtekben, ahol a TRPV1 RNS (és protein) kifejeződés magas (35-70%), a FAAH RNS kifejeződés gyakorisága 10% alatti.

Nyilvánvalóan, amikor az RNS és protein kifejezéseket hasonlítjuk össze, nem felejtkezhetünk meg a poszt-transzkripciós szabályozási mechanizmusokról, amikről azonban jelen pillanatban nem tudunk eleget. Így összességében sajnos úgy tűnik, hogy az egysejt RNS szekvenálással nyert eredményeket is csak a funkcionális adatokkal, riportter gének által szolgáltatott adatokkal és a protein kifejezési eredményekkel együtt szabad vizsgálni és interpretálni.

3. A TRPV1 ioncsatorna funkcionális működését egyaránt feltételezik intracelluláris membránokon (például az endoplazmatikus retikulumon) és a plazmamembránon. A bemutatott áramok és elektronmikroszkópos képek valószínűleg a plazmamembránba ágyazott TRPV1-et jelzik. Lehet-e a dolgozatban bemutatott összetett élettani hatások egy részéért felelős az intracelluláris TRPV1 és lehet-e az exogén és az endogén anandamid hatások közötti különbségek magyarázata, hogy eltérő ioncsatorna populációt aktiválnak?

Valóban, az elsődleges érző idegsejtekben is kifejeződik a TRPV1 az endoplazmatikus retikulumon (Liu és munkatársai, 2003). Az intracelluláris TRPV1 aktiválása a kalcium raktárak egy részéből kalciumot szabadít fel, ami többek között egy sor kalciumkötő fehérjén keresztül intracelluláris jelző folyamatokat indít el. Ezen kívül, mint említettem, az intracelluláris kalcium szint emelkedése anandamid szintézist is indukál.

Egy sor vizsgálat eredménye azt mutatja, hogy az anandamid szintézis, legalább is bizonyos útvonalakon keresztül, a membránok lipid raftjához kötött folyamat. (pl. Plazcek és munkatársai, 2008, Dainese és munkatársai, 2007). *In silico* eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a koleszterin, ami a lipid raftok egyik jellemző molekulája, képes az anandamid megkötésére, és ez a koleszterin-anandamid komplex diffundál a célmolekula kötőhelyhez (Di Scala és munkatársai, 2018).

A célmolekulák közül, a CB1 receptor lipid rafthoz kötött (Bari és munkatársai, 2005). Ugyan az első vizsgálatok nem igazolták, de ma már egy sor adat azt mutatja, hogy a TRPV1 is lipid raft függő (pl. Sántha és munkatársai, 2010). A lipid raftok nem csak a plazma membránnak, hanem az endoplazmás reticulum membránnak is jellemző alkotó elemei (Browman és munkatársai, 2006). Azonban, legjobb tudomásom szerint, a plazma membrán lipid mikrodoménjeivel összefüggő anandamid szintézissel ellentétben, arra vonatkozóan, hogy az endoplazmás reticulum membránja kifejezi-e az anandamidot szintetizáló valamelyik mechanizmust, nem áll rendelkezésre adat. Így, míg a Tisztelt Bíráló felvetése egy lehetséges magyarázat az exogén és endogén anandamid különböző hatásának, ennek bizonyítása további vizsgálatokat igényel.

4. Ahogy a jelölt a 19. oldalon említi is, számos más endokannabinoidokkal rokon lipid, például az N-acil-etanolaminok közé tartozó oleil-etanolamine (OEA) szintén agonistája a TRPV1 receptoroknak (Ahern, 2003, Journal of Biological Chemistry). Ráadásul az OEA hasonlóan aktiválja a szenzoros neuronokat (lásd például Wang et al. 2005 Journal of Physiology). Mivel a NAPE-PLD képes OEA szintézisre, a FAAH pedig lebontja az OEA-t, ezért tulajdonképpen, ha jól értelmezem, akkor nem jelenthető ki a dolgozatban bemutatott kísérletekről, hogy az endogén anandamid hatását jelzik számunkra, ugyanolyan jogos az endogén OEA élettani funkcióját feltételezni. Kérem a szerzőt kommentálja ezt a megállapítást. Továbbá kérdezem, hogy végeztek-e esetleg exogén OEA-val kísérleteket, amelynek feltételezhetően eltérő hatásprofilja lehet, mint az AEA-nak hiszen az OEA nem agonistája a CB1 receptoroknak. Ha történet ilyen kísérlet, akkor kíváncsian várom, hogy mit tapasztaltak, mert az OEA szerepe valami okból meglehetősen kevésbé ismert és kutatott, a fenti adatok sem igazán közismertek.

A kalcium-indukált endogén anandamid szintézis során valóban egy sor más N-acil-etanolamin is szintetizálódhat, hiszen a szintézisben résztvevő enzimatis utak nem specifikusak az anandamidra. A kalciummal indukált anandamid szintézis mérései során egy sorozat mintában, az anandamid mellett, mértünk a 2-AG, PEA és OEA szinteket is kapszaicin és kálium klorid adagolása után. Az anandamidon kívül más molekulák koncentrációja nem nőtt meg azokban a mintákban.

Ami a közös prekuzorral történő anandamid szintézis indukcióját illeti, ott az 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-arachidonoyl-t, használtuk. Ezeknek a kísérleteknek az első mintáiban is mértük az OEA koncentrációkat. Amint azt várni lehetett, míg az anandamid koncentráció jelentősen megnőtt, az OEA koncentráció változatlan maradt. Ezen adatok alapján kijelenthetjük, hogy az OEA-nak nagy valószínűséggel nem volt szerepe az eredményeink alakulásában.

Ugyan az OAE aktiválja a TRPV1-t, ennek relevanciáját és a hatás élettani szerepét az szabja meg, hogy *in vivo* körülmények között az OEA valóban jelen van-e a TRPV1 közvetlen környezetében. Irodalmi adatok alapján vannak olyan szövetek, ahol igen (pl. striatum, Gonzales-Aparicio és Moratall, 2014) és ott valóban van is szerepe. Mi a gyulladt húgyhólyagban vizsgáltuk az OEA koncentrációját, és méréseink alapján az OEA koncentrációja abban a szövetben nem változott a gyulladás hatására (Charrua és munkatársai, 2020). Természetesen itt nem szabad megfeledkeznünk, az OEA más célmolekuláiról, illetve az azokon keresztül indukált hatásokról, például a PPAR α receptorról sem.

Ami a kérdés utolsó részét illeti, sajnos OEA-val történő kísérletekre nem került sor.

5. Egy általános megállapítás, hogy ahhoz képest, hogy milyen elképesztően sok molekula nevet és rövidítést használ a szerző, amelyeket ráadásul dicséretesen igyekszik angolból magyarosítani elenyészően kevés nyelvi pontatlansággal találkoztam olvasás során. A néhány konzekvens elírás az „az hátsó”, „mellet”, „nitrikoxid” stb. esetleg a közreadott téziszüzetekben javítható.

Köszönöm, a Tisztelt Bíráló megjegyzését, és sajnálom, hogy helyesírási hibák maradtak az Értekezés szövegében. Ha lehet változtatni a Tézisekben, ezeket kijavítom.

6. A 31. és 35. és a 174. oldalakon egyaránt megjelenik, hogy a CB1 receptorok anandamid kötőzsebe extracelluláris található. Ugyanakkor Tian Hua és munkatársai CB1 kristályosításon alapuló térszerkezeti munkáiból ma már tudjuk, hogy a CB1-nek is a plazmamembránon belül található a kötőzsebe (Hua et al. Cell, 2016; Hua et al. 2017, Nature; Hua et al., 2020, Cell).

Egyetértek a Tisztelt Bíráló megjegyzésével és sajnálom, hogy nem jeleztem, hogy az extracelluláris kötőzsebe egy hipotézis volt a kísérleteink végzésének idején. Sajnálom, hogy elmulasztottam beírni, hogy a legújabb vizsgálatok egyértelműen kimutatták, hogy a kötőzsebe a plazmamembránon belül helyezkedik el.

7. A 37-38 oldalakon bemutatott transzport mechanizmusok kapcsán a FLAT szerepét ma már műtermékek tartják, ugyanakkor az FABP fehérjék köztük az FABP5 szerepe egyre biztosabbnak látszik (Haj-Dahmane et al. 2018, PNAS).

Ismét teljes mértékben egyetértek a Tisztelt Bíráló megjegyzésével. Sajnálom, hogy nem aktualizáltam a Bevezetést az Értekezés beadása előtt.

8. Az 5.1 és 5.2 ábrákon nehéz eldönteni, hogy mi alapján lehet a halványpiros sejtekről kijelenteni, hogy immunnegatívak, elképzelhető, hogy alacsony expressziós szint miatt halványak (ezt segítheti például eldönteni az sc-RNAseq elemzés).

Az immunpozitivitás és immunnegativitás közötti határ megállapítására az utóbbi kb. 20 évben intenzitásmérést követő statisztikai elemzéseket használunk. Az ábrán bemutatott reakciók 2000 előtti munkából származnak. Míg a TRPV1 ellenes antitest magas minőségű volt, a CB1 receptor ellenes antitestről ez nem volt elmondható. Mivel az ábrán nem jelöltük a pozitív és negatív sejteket, így utólag nem tudom kommentálni, hogy például az 5.2 ábrán a membránon minimális festést, illetve a jobb felső sarokban látható halványan festődő sejtet melyik csoportba soroltuk.

9. Az 5.3 ábrán nyilak és rétegek jelölése segíthet egy nem szakembernek eligazodni, ha ez az ábra az előadásban is bemutatásra kerül.

Köszönöm a Tisztelt Bíráló javaslatát, egyetértek, hogy a rétegek jelölése segít a nem szakembereknek a tájékozódásban.

10. Sem a TRPV1, sem a CB1, sem a FAAH, sem a NAPE-PLD immunfestések esetében nem derült ki, hogy milyen kontroll kísérleteket végeztek a szerzők. Ezt érdemes megemlíteni röviden, ha az előadásban bemutatásra kerülnek ezek az eredmények.

Egyetértek a megjegyzéssel. Részletesebb Anyag és Módszer leírásra lett volna szükség, hogy fontos részletek, mint például a kontrol immunreakciók ne maradjanak ki az Értekezésből.

A kontrol kísérletekben, TRPV1, CB1 receptor, NAPE-PLD és a FAAH ellenes antitestek esetében génhányos egerek szöveteit használtuk. A NAPE-PLD ellenes antitestet esetében *in situ* hibridizációs technikát is használtunk.

11. Az 5.5 ábrán meglepő módon az immunjel nem a humán urothél sejtek felületén van vagy a teljes citoplazmában, hanem a sejtmag körüli részeken figyelhető meg. Mi ennek az oka?

Az eredeti felvételek, de talán az Értekezésben bemutatott ábrán is látszik, hogy a citoplazma sejtmag körüli részén lévő erős immunpozitivitás sejt organellumokhoz, feltehetően endoplazmás reticulumhoz kötött. Az citoplazma membránon sokkal gyengébb a jel. De, a sejteket lehetett kapszaicinnal és hővel is aktiválni. Az aktiválással kiváltott kobalt beáramlás azt mutatja, hogy a citoplazma membránban kifejeződő ligand-aktivált ion csatorna aktiválódott, és a kapszaicinnal kiváltott kobalt beáramlást kapszazepinnel gátolni tudtuk. Így teljes biztonsággal kijelenthetjük, hogy a TRPV1 a plazma membránon is kifejeződik.

12. Kiemelkedően érdekes része a dolgozatnak a Nagy és Rang 1999-es tanulmány eredményeit bemutató rész. Kiderült azóta az 5.7-es ábrán a 63. oldalon bemutatott hatásról, hogy melyik ioncsatorna felelős érte? A Megbeszélésekben röviden említett TRPV2 vagy más ioncsatorna is szóba jöhet?

A magas küszöbű hő indukált áramok hőküszöbe, a sejtek átmérője, előfordulási gyakorisága és a kapszaicinre adott válaszaik hiánya alapján eddigi tudásunk szerint, az áramokat a TRPV2 aktiválása válthatta ki, ugyanis a kapszaicinnal nem aktiválható TRPV2 hőküszöbe 50°C körül van, a kapszaicinre válaszoló sejteknél a TRPV2-t kifejező sejtek valamivel nagyobbak, a TRPV1 és TRPV2 nem mutat közös kifejeződést az elsődleges érző idegsejteken, és a TRPV2-t kifejező sejtek a TRPV1-t kifejező sejteknek körülbelül az 1/3-1/4-t teszik ki.

13. Az 5.8 ábrán bemutatott korreláció nagyon látványos. Ha jól gondolom ez csak a minimális választ mutató sejteket ábrázolja és látszik, hogy nem normális eloszlásúak az adatok. Mennyi volt a Spearman rang korrelációs koefficiens értéke? A szövegben és az ábrán nem szerepel tételelesen és a szignifikanciája sem.

Az ábrán bemutatott adatok természetesen csak a küszöbérték felett válaszoló sejtek adatai. Sajnálom, hogy a korreláció értéke és a szignifikancia szint ($r^2= 0.53$; $p<0.001$) is kimaradt az ábramagyarázatból és a szövegből is.

14. A 74. oldalon bemutatott feltételezett eltérő TRPV1 ioncsatorna populációk is nagyon érdekesek. A Megbeszélésekben röviden felmerül, de nem volt számomra világos, hogy a publikálás óta eltelt több mint 10 évben kiderült a molekuláris magyarázat? A CB1-el képzett heteromer nem valószínű alacsony gyakorisága miatt (lásd alább).

A konkrét magyarázatra továbbra is csak elképzelések vannak. A publikálás óta azonban, világossá vált, hogy a TRPV1 molekulák képesek heteromer csatornák, illetve molekuláris komplexek létrehozására, más TRP molekulával. Így pl. TRPV3, TRPV4 és a TRPA1 molekulával heteromer csatornát, a TRPA1 csatornákkal molekuláris komplexeket képes létrehozni (pl. Weng és munkatársai, 2015, Cheng és munkatársai, 2007 és 2012, Alessandri-Haber és munkatársai, 2009, Kim és munkatársai, 2016). Ezek az interakciók nagymértékben befolyásolják a csatornák válaszadási tulajdonságait. Legjobb tudásom szerint azonban ma még nem tisztázott, hogy a kapszaicinre, alacsony hőre vagy mind kettőre válaszoló csatornák összetétele, illetve közvetlen környezete milyen.

Természetesen az is elképzelhető, hogy a csak hőre válaszoló membránfoltokban nem TRPV1 fejeződött ki. A kísérletek végzésekor a TRPV1 és a TRPV2 voltak az ismert hőre aktiválódó ion csatornák. Azonban a TRPV2 50°C felett aktiválódik, így a TRPV2 jelenlétét kizárhattuk, hiszen az hőinger nem érte el ezt a hőmérsékletet.

Ma már azonban tudjuk, hogy néhány más hőre érzékeny ion csatorna hőküszöbe is 42-43°C környékén van. A kísérletek során nem végeztünk rutin hőküszöb meghatározást, így elképzelhető, hogy a csak hőre válaszoló membránfoltokban a csatorna aktivitásért nem a TRPV1 hanem más csatorna, például a TRPM3, vagy a TRPV4 volt felelős.

15. A Veress et al. 2013 cikkben alapuló 5.19-es ábra a 80.oldalon nagyon szép. Ugyanakkor a halványan jelölt sejtek a CB1 festésben miért biztos, hogy negatívak?

Természetesen mindent elkövetünk munkánk során, hogy minél alacsonyabb legyen a háttérfestés. Azonban egy bizonyos szintű nem specifikusnak tűnő festődés lényegében mindig tapasztalható. Ennek következtében a pozitivitás és negativitás megítélése sokszor tűnik nehézkesnek.

Hogy a szubjektivitást elkerüljük, a megvilágítási hibák kompenzációja után, minden sejt festődési intenzitás értékét megmérjük, és ezek alapján vizsgáljuk a sejtpopulációk jelenlétét. Ezek alapján, statisztikai módszerekkel állapítjuk meg a küszöbértéket, ami alapján a sejteket jelölt és jelöletlen csoportba soroljuk. A kapott eredményeket természetesen összevetjük a saját vagy mások immunfestés, *in situ* hibridizációs, funkcionális adataival, illetve újabban az egysejt RNS szekvenálás adataival. A kérdésben szereplő anyag az egysejt RNS szekvenálási adatok publikálása előtt készül, de az adatok utólagos összevetése az egysejt RNS szekvenálás eredményeivel azt mutatja, hogy a jelöléssel feltárt CB1 receptort kifejező sejtek nagy valószínűséggel azokat mutatják, amelyek valóban kifejezhetik a fehérjét. Azonban, amint azt egy előző kérdésre adott válaszomban írtam, az egysejt RNS szekvenálás és az elfogadott fehérje kifejeződési adatok között jelentős az eltérés, aminek egyik oka lehet eddig nem ismert poszt-transzkripció mechanizmusok létezése, illetve az egysejtes RNS szekvenálás mintájának nem reprezentatív volta. Az ábrán mutatott halványan festődő sejtek egy részét a statisztikai módszer alapján immunpozitívnak minősítettük.

16. Az egyik legmeglepőbb a dolgozatban az egyes tanulmányokban leírt kolokalizációs arányok eltérései. Főleg ha feltételezzük, hogy összefüggő jelpályákról van szó, meglepő például hogy a TRPV1 pozitív sejteknek mindössze 64%-a FAAH-pozitív. Mivel a FAAH inhibitor módosítja a TRPV1 hatást ezért nagyobb kolokalizáció lenne várható. Bízom benne, hogy az scRNA-seq elemzés segít kideríteni, hogy a legalább 11 DRG sejtípusból melyikben fordul elő a TRPV1, a CB1 és a FAAH és melyekben működhet leghatékonyabban az anandamid endovanilloid vagy endokannabinoid jelpálya.

Amint azt a 2. kérdésre adott válaszomban részletesen leírtam, sajnos az egysejt szekvenálás eredményei egyes fehérjék közös kifejeződésére nem feltétlenül szolgálnak döntő adatokkal. Így például a NP2, NP3 és PEP1 sejtekben, ahol magas a TRPV1-t kifejező sejtek aránya (35-70%), a FAAH kifejeződése kifejezetten alacsony, ami azt jelenti, hogy a FAAH kifejeződést mutatható TRPV1- kifejező sejtek aránya a 10%-t sem éri el. Ez nyilván ellentétes az immunfestés eredményével, amelyeket génhianyos egerek szövetein tesztelt antitestekkel végeztünk.

A munkánk során feltárt együttes kifejeződések, én úgy gondolom, hogy konzisztensek. Azt is gondolom, hogy nem meglepő, hogy nem minden TRPV1-t kifejező sejtben található FAAH, hiszen csak az RNS kifejeződést vizsgálva a sejteket 11 jelentősen különböző csoportba lehet besorolni. Az egyes csoportokon belül található sejtek még valószínűleg alcsoportokba oszthatók például a posztzinaptikus célsejtek, illetve a szinaptikus kapcsolatainak alapján. Bizonyára, az anandamidot szintetizáló TRPV1-t kifejező sejtekben jelen van a FAAH ami az intracelluláris anandamid jel kontrollálására szolgálhat. Az anandamidot nem szintetizáló TRPV1-t kifejező sejtekben nem biztos, hogy szükséges a FAAH kifejeződése, azokban inkább a MAGL kifejeződése lehet fontos.

17. A Sousa-Valente et al. 2017 tanulmányon alapuló 5.32 és 5.33 ábrákból levont következtetéseket nem tudom elfogadni. A nagy sejtek szinte ugyanolyan intenzívek, mint a kis sejtek és a kontroll kísérletben is látszódik mindegyik sejt. Milyen elemzés alapján tudták a szerzők eldönteni, hogy egy adott sejt pozitív vagy negatív?

Mint fentebb említettem, valamennyi jelölés értékeléséhez statisztikai módszereket használtunk. Az 5.32 b ábra az *in situ* hibridizációs próba jelenlétében, míg az 5.32c ábra a próba hiányában inkubált metszetek egyikéről készült. Míg a b ábrán láthatóak a jelölt sejtek a c ábrán valamennyi sejt csak a háttérjelölést tartalmazza. Az 5.33 b ábráján egy sor negatív sejt is van. Egyes sejtek jelenlétét csak a pozitív tűnő szatellita sejtek jelzik. Ezeken a sötét területeken nagy átmérőjű sejtek vannak. A nyílhegygel jelölt idegsejtek mellett egy sor gyengébben jelölt sejt is látható, amelyek szintén kis átmérőjűek. Sajnálom, hogy az Értékezésbe nem került be a kontrol kísérlet eredményét mutató ábra. Ezekben a kontrol kísérletekben NAPE-PLD génhányos egerek szöveteit is használtuk. A NAPE-PLD ellenes antitest nem generált immunfluoreszcens jelet azokban a szövetekben.

18. Hasonlóképpen a Varga et al. 2014-en alapuló 5.37 és 5.38 ábrákon használt antitestek a bíráló laboratóriumában knockout egereken nem bizonyultak specifikusnak. Elképzelhető a sejt kultúrában megjelenő eltérő expresszió hatása is és ezt dicséretesen korrigálja a szerző a Megbeszélések 6.1-es táblázatában.

Sajnos a kísérletek végzésekor génhányos egerek szöveteihez nem jutottunk hozzá, több még nem is létezett. A közlemény megjelenése körül sikerült Inpp5 génhányos egér szövetekhez jutni, és azokban az antitest nem mutatott jelölődést.

19. Az exogén anandamid koncentráció függő hatása CB1 illetve TRPV1 receptorokon nagyon izgalmas. Ugyanakkor a 116 oldalon az 5.47-es ábra hiányzik, érdemes lesz majd az előadásban pótolni.

Végtelenül sajnálom, hogy a nyomtató ezt az ábrát nem nyomtatta ki. Próbáltam a kötés előtt valamennyi kinyomtatott oldalt átnézni, ez nyilvánvalóan nem volt sikeres. A nyomtatásra került PDF file-ban valamennyi ábra jelen van.

20. Több helyen kijelenti a szerző, hogy hatást tapasztalt, de a szignifikancia nem érte el a megállapított szintet. Ezzel a megközelítéssel nem értek egyet. Például nem lehet kijelenteni hogy a HU-210 csökkenést okozott ha az adatok közötti különbség nem volt szignifikáns (125 oldal, 5.53. ábra). Ugyanez a FAAH inhibitor által kiváltott „növekedésre” is igaz (5.55 ábra nem mutat szignifikáns különbséget). A 170.

oldalon azt írja a szerző, hogy a „hatás egyértelmű volt” habár nem volt szignifikáns különbség. Érdeemes lenne a mintaelemszám becslés, illetve első vagy másodfajú hibák valószínűségének számolásából utána járni, hogy érdemes-e, lehetséges-e a mérés megismétlésével az esetleges alulminta vételezésből származó statisztikai hibák elkerülése.

Egyetértek a Tisztelt Bíráló kritikai megjegyzésével. Valóban nem szerencsés az ilyen megfogalmazás, hiszen ha nem éri el a változás a szignifikancia szintet, akkor az nem változás. A FAAH inhibitor esetében inkább arra szerettünk volna utalni, hogy sem az anandamid, sem a FAAH inhibitor magukban nem, csak együttesen okoznak változást, emelik meg a jelölt sejtek számát.

21. A dolgozat másik csúcspontja a Chen et al. 2016 Scientific Report anyagának bemutatása. Ezzel kapcsolatban azonban a fehérje-fehérje interakciók jelentőségében nem vagyok biztos. A co-IP a tisztítási eljárás során eredményezhet hamis eredményt, a bemutatott egyébként gyönyörű elektronmikroszkópos képen pedig összesen 3 esetben van a CB1 és a TRPV1 receptorokat reprezentáló immunarany szemcse megfelelően közel az összesen 43 arany szemcséből. A PCA elemzésen kívül volt olyan elemzés, amely ennek a 3/43 aránynak az adott térrészre való előfordulási valószínűségét mérte (azaz a véletlen sűrűségtől eltér-e a kolokalizáció)?

Nagyon köszönöm a Tisztelt Bírálónak a Chen és munkatársai (2016) eredményeit dicsőítő megjegyzését. A valóban gyönyörű elektronmikroszkópos felvételekért járó dicséret Kulik Ákost illeti, akinek ezennel is hálás vagyok a kivételes segítségéért.

Az ábrán mutatott kép egy része a 7 és 17 membrán darabnak, amelyek legfontosabb morfológiai jellemzői az 5.1. táblázatban láthatóak. Ugyan a táblázat nem mutatja a molukuláris denzitásokat, amint az 5.42 ábrán látható, azok nagy része, beleértve a TRPV1-től mért CB1 receptor „kritikus” távolságok egységnyi területre számolt mennyiségét is, szignifikánsan eltér egymástól az egyes csoportokban található membrán foltokon. A táblázatból számolt egységnyi területen található TRPV1-től mért CB1 receptor „kritikus” távolságok is jelentősen különböznek egymástól, 0 és 8.9 távolság/ μm^2 között vannak.

A 6.67B ábra területe megközelítően $1.5\mu\text{m}^2$. Így, a TRPV1-től mért CB1 receptor „kritikus” távolságok denzitása 2, ami valóban csak 66%-a az átlag értéknek. Ezen a teljes membrán darabon összesen 5 darab TRPV1-től mért CB1 receptor „kritikus” távolságok találtunk. Valóban választhattunk volna olyan ábrát, amelyen a TRPV1-től mért CB1 receptor „kritikus” távolságok száma közelebb van az átlaghoz. Azonban azokon esetleg más paraméterek tértek volna el jobban az átlagtól.

A PCA és a PLS-DA analízist a minták statisztikai hasonlóságának-különbözőségének a vizsgálatára használtuk. Az ezen analízisek eredményei alapján talált csoportok egyes paramétereit ANOVA (+Fischer-test) segítségével analizáltuk tovább, ami azt mutatta, hogy a TRPV1-től mért CB1 receptor „kritikus” távolságok denzitása a sárga színnel jelölt sejtekben jelentősen különbözik a másik két csoportba tartozó sejtek hasonló paraméterétől.

Természetesen azt is megnéztük, hogy a „kritikus távolságon” belüli CB1 receptor szomszéddal rendelkező TRPV1 molekulák aránya az összes TRPV1 molekulán belül a sárga színnel jelölt sejtekben és a többi sejtben különböző-e. A Fischer egzakt teszt alapján a különbség szignifikáns ($p < 0.00009$).

22. A 157. oldalon bemutatott PIA molecula nem általánosan használt FAAH inhibitor. Ez a kísérlet később megerősítésre került-e szélesebb körben használt specifikus FAAH gátlószerrel?

Valóban, a palmitoil isopropyl amide (PIA) nem egy általánosan használt FAAH gátló, különösen nem napjainkban. Azonban a kísérletek végzésének idején a ma használatos gátlók még nem léteztek, legalább is kereskedelmi forgalomban nem voltak.

Igen, 2020-ban közzétük az URB937-el végzett kísérleteink eredményét, amelyek azt mutatták, hogy a FAAH gátlása magas dózisu URB937-el megemeli az LPS-el kiváltott cystitis-ben a hólyag összehúzóadások számát (Charrua és munkatársai, 2020).

23. A 182. oldalon bemutatott FAAH inhibitor nem a FAAH gátlásán keresztül okozott halált, hanem más szerin-hidrolázokon kifejtett széles mellékhatás profilja miatt (van Esbroeck et al. 2017 Science).

Sajnálom, ha a megfogalmazásom félreérthető volt. A "nem kívánt mellékhatást is kiválthatnak" megfogalmazással nem a FAAH gátlás mellékhatásait értettem, hanem a vegyületek off-target hatásait.

24. Végül utolsó kérdésem a gyulladást modellező kísérletekben a CB1 szerepének csekély szerepet tulajdonítanak. Azonban széleskörű irodalom támasztja alá a CB2 kannabinoid receptorokon ható molekulák potenciális analgetikus hatását gyulladásmoellekben. Próbálta a szerző kutatócsoportja vizsgálni, hogy mi lehet a CB2 receptorok szerepe az általuk vizsgált moellekben?

Ez ismét egy nagyon izgalmas és érdekes kérdés.

Valóban, a CB2 receptor agonisták állatkísérletekben analgetikus hatást mutatnak különböző moellekben. Ezek közül különösen a neuropátiás moellekben mutatnak jó hatást. Ennek hátterében nagy valószínűséggel az idegrendszeri gyulladás csökkentése áll, hiszen az idegsejtekben (bizonyos esetektől eltekintve) a CB2 receptor nem fejeződik ki. Ezt a lehetőséget támogatja egy CB2 agonistával folytatott klinikai vizsgálat eredménye amely szerint a GW482166 nem csökkenti a 3-as moláris fog eltávolításával összefüggő fájdalmat.

A patológiás körülmények között létrejövő fájdalom kialakulásában és fenntartásában a neuronális mechanizmusok mellett nagyon fontos a glia sejtek moduláló hatása, amelyek közül a gerincvelőben a mikroglia aktivációja talán a legjelentősebb és a legismertebb. A mikroglia, az idegrendszeren kívüli makrofágokhoz hasonlóan, kifejezi a CB2 receptort, aminek aktiválása csökkenti a mikroglia által termelt gyulladáso proteinek mennyiségét. Ez a csökkenés antinociceptív hatású, hiszen csökkenti az excitatorikus sejtek szenzitizációját.

A perifériás idegsérülésekkel összefüggő fájdalmak esetében azonban az elsődleges érző idegsejteken kifejeződő CB2 receptor aktiválásának is lehet szerepe. Amíg fiziológiás körülmények között a CB2 receptor nem fejeződik ki az elsődleges érző idegsejteken, a perifériás axon sérülése után a kifejeződés jelentős növekedése figyelhető meg.

Munkánk során eddig nem vizsgáltuk a CB2 receptor aktiválásának hatását, hiszen figyelmünket elsősorban az elsődleges érző idegsejteken belüli mechanizmusok kötötték le. Azonban a néhány éve a „fiókban” ülő adataink, amely szerint a gerincvelői mikroglia sejtek specifikusan fejezik ki az egyik lehetséges anandamid szintetizáló útvonban jelenlévő enzimet (Inpp5), átvezethet bennünket a CB2 receptorral kapcsolatos vizsgálatokra.

Tisztelettel,

Dr Nagy István

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'István' or similar, written in a cursive style.