

VÁLASZ OPPONENSI VÉLEMÉNYRE

OPPONENS:

Prof. Dr. Csernoch László, D.Sc.

SZERZŐ:

Dr. Czirják Gábor

AZ MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS CÍME:

A TRESK háttér kálium csatorna molekuláris szabályozási mechanizmusainak vizsgálata

(dc_1744_20)

Köszönöm Csernoch László professzor Úrnak, hogy elkészítette értekezésem bírálatát, kedvező véleményt fogalmazott meg a munkámról és ez alapján támogatta a nyilvános vita kitűzését. Építően bíráló megjegyzéseire és kérdéseire az alábbi válaszokat adom.

A helytelen vagy furcsa szóhasználatra vonatkozó kritikai megjegyzéseket elfogadom. Az angol nyelvű szakkifejezések magyar megfelelőjének megtalálására vonatkozó, némely esetben sikertelen próbálkozásaimért elnézést kérek.

Válaszaimat a módszerekkel és eredményekkel kapcsolatban feltett, illetve általános kérdésekre az oldalszámozásnak megfelelően adom meg, ahogy a kérdésfelvetés is történt.

Módszerek 54. oldal

Kérdés: Az ionomycinnel történő mérésekről szerző csak annyit közöl, hogy a 2 és 30 mM K⁺ tartalmozó extracelluláris oldatok esetén azok olyan változatát használták „amelyek EGTA helyett kétértékű ionokat (2 mM Ca²⁺ és 0.5 mM Mg²⁺) tartalmaztak”.

A mérések során Szerző feltételezi, hogy növekvő ionomycin koncentrációk adagolásának hatására egyre nagyobb intracelluláris kalciumkoncentráció-növekedés alakul ki. Az értekezésből nem világos, hogy mire alapozza ezt a feltételezést. Történtek kalciumkoncentráció mérések? Ha igen, milyen technikát alkalmaztak, erre ugyanis a Módszerek fejezet nem tér ki?

Ugyancsak feltételezi, hogy a Ca²⁺-k elsődlegesen az intracelluláris raktárakból származnak (pl. 101. o. „a kalcium fő forrása, az intracelluláris raktár”). Miért gondolja a Jelölt, hogy az ionomycin jelenlétében a felszíni membránon keresztül nem történik számottevő kalciumbelépés? próbáltak-e valamilyen módszert ennek igazolására? Található-e raktárvezérelt csatorna a vizsgált sejtek felszíni membránjában? Ha igen, az azokon át történő kalcium belépés miért hanyagolható el?

Az ionomycin eltávolítása után az áramok csökkenése szinte azonnal megjelenik (pl. 36. ábra). Ilyen gyorsan eltűnne az intracelluláris raktárak membránjából az ionomycin?

Válasz: A lépcsőzetesen növekvő ionomycin koncentrációkat (37. és 40. ábra) két-elektrodos voltage clamp mérésben használtuk, ennél a mérésnél ugyanazt, a módszerek fejezet 53. oldalán megadott oldatot alkalmaztuk, mint minden más hasonló petesejt mérésnél. Nem végeztünk közvetlen kalcium koncentráció meghatározást a petesejteken. Ennek ellenére megalapozott következtetés, hogy az 50 nM ionomycinnel történő ingerlésnél kisebb kalcium növekedés jött létre a citoplazmában, mint az 500 nM ingerlésnél. A kísérletet megelőzően már kimutattuk, hogy a TRESK aktivációját a kalcineurin hozza létre. A kalcineurin alaposan tanulmányozott kalcium/kalmodulin-függő foszfatáz, amely citoplazma kalcium szenzornak

tekinthető a rendszerünkben. Minden esetben kisebb TRESK aktivációt kaptunk 50 nM ionomycin alkalmazásakor, mint 500 nM hatására. A kisebb TRESK áram fokozódásnak kisebb kalcineurin aktiváció felel meg, ennek hátterében pedig a kisebb kalcium koncentráció növekedés áll.

Az már kevésbé bizonyos, hogy az 50 nM-ről fokozatosan 500 nM-ra növelt ionomycin minden lépésben kalcium koncentráció növekedést is eredményez. Ugyan a TRESK áram folyamatosan és lépcsőzetesen növekedik a protokoll közben, de ezt nemcsak a kalcium koncentráció, hanem az aktivációs mechanizmus időfüggése is meghatározza. Ezért lehetséges, hogy a kalcium koncentráció már nem növekszik, esetleg csökken is a kalcium raktár ürülése miatt, miközben a TRESK áram még egyre nagyobbá válik. Mindemellett a TRESK áram választ várhatóan a rendszerre jellemző deszenzitizációs folyamatok összessége is befolyásolja. Teljesen egyértelmű, hogy ezek a módosító tényezők számottevők, mivel a lépcsőzetesen növekvő sorozat végén alkalmazott 500 nM ionomycin kisebb TRESK aktivációt okoz, mint az azonnali 500 nM ingerlés. Összességében tehát, a minden lépésben növekvő kalcium koncentrációt nem feltételeztük, egyszerűen a TRESK gradált ingerlésére volt szükségünk. Olyan ingerlésre, amely időben elnyújtott, kisebb és fokozatosabban növekvő TRESK aktivációt okoz, mint a minden vagy semmi jellegű, nagy koncentrációjú ionomycin stimulus. Erre az alkalmazott protokoll tökéletesen megfelelt.

Munkánk során nem volt cél a *Xenopus* petesejt kalcium háztartásának részletekbe menő vizsgálata, amely kiterjedten tanulmányozott különálló kutatási irány. A 101. oldalon is csak azért említettem, hogy az ionomycinnel történő ingerléskor a kalcium fő forrása az intracelluláris raktár, mert ez az irodalmi adat korábban engem is meglepett. Feltételeztem, hogy esetleg az olvasó hozzám hasonlóan azt gondolhatja, hogy az ionomycin a plazmamembránba épül és az extracelluláris térből okoz nagy és folyamatos kalcium beáramlást a citoplazmába. Többszörösen megerősített irodalmi adatok szerint, *Xenopus* petesejtben az ionomycin nem ezen a módon hozza létre a kalcium szint növekedés kezdeti legnagyobb amplitúdójú fázisát, hanem belső raktárból felszabadulással [1,2]. A késői fenntartott kalcium koncentrációért a plazmamembránba épült ionomycinen, és ahogy a Bíráló felvetette, az Orai csatornákon keresztüli áram felelős [2,3]. Természetesen ezeket sem tartom elhanyagolható tényezőknél, annak ellenére, hogy az értekezésben nem részleteztem az ionomycin hatásmechanizmusát, hanem csak a 269. hivatkozás formájában utaltam a kapacitatív kalcium beáramlásra (ref. 269 = [2]).

A 36. ábrán a TRESK áram körülbelül 7 perc után csökken felére az ionomycin eltávolítása után. Az értekezésben nem szereplő eredmények szerint ez az aránylag lassú TRESK áram visszaállási kinetika lényegében független a citoplazma kalcium koncentrációtól. Az ionomycin megvonása után mikroinjektált EGTA+HEPES nem befolyásolja a visszaállás kinetikáját, pedig ugyanez hasonló időtartományban teljesen kivédi a kalcium-függő csatorna aktiválódást, ahogy a 22. ábrán látható az értekezésben. Ennek oka, hogy a visszaállás sebesség-meghatározó lépése a csatorna lassú foszforilációja és nem a citoplazma $[Ca^{2+}]$ csökkenése, illetve az ionomycin eltűnése az intracelluláris kalcium raktárak membránjából. Éppen emiatt volt jól használható az áram visszaállási kinetika követése a TRESK-et foszforiláló kináz azonosításakor. Mindemellett a K^+ -áram csökkenése fenntartott ionomycin inger jelenlétében is megkezdődhet (pl. 44.D és F ábra), talán az ionomycin nem specifikus TRESK gátló hatásának érvényesülése miatt.

1. Yoshida, S., Plant, S. (1992) Mechanism of release of Ca^{2+} from intracellular stores in response to ionomycin in oocytes of the frog *Xenopus laevis*. *J Physiol* **458**, 307-318
2. Thurman, C. L., Burns, J. S., O'Neil, R. G. (2000) Identifying the Ca^{++} signalling sources activating chloride currents in *Xenopus* oocytes using ionomycin and thapsigargin. *Cell Signal* **12**, 629-635

- Courjaret, R., Machaca, K. (2016) Xenopus Oocyte As a Model System to Study Store-Operated Ca(2+) Entry (SOCE). *Front Cell Dev Biol* **4**, 66

Módszerek 94. oldal

Kérdés: Szerző jellemzően 50 nL térfogatot injektál a kísérletek során (pl. 32. ábra). Mekkora egy oocyta térfogata? Található-e az oocytákon mechanoszenzitív csatorna? Ha igen, mekkora térfogat injektálása esetén lenne várható azok aktiválódása?

Válasz: Minden esetben 50 nl térfogatot injektáltunk a petesejtekbe. Egy oocyta térfogata körülbelül 1 µl, ennek mintegy fele lehet citoplazma [4]. Ez azt jelenti, hogy a mikroinjektált hatóanyagok mintegy tízszeresre hígulnak, illetve a sejt teljes térfogata kb. 5 %-kal nő az injektálás közben. A mérésre kerülő petesejt nem feszes, hanem inkább kissé leeresztett focilabdához hasonlítható, ezért benne a nyomás, illetve az ennek megfelelő membránfeszülés általában nem fokozódik számottevően az injektálás miatt. Az injektálás nem igazán kedvező eszköz a mechanoszenzitív csatornák aktiválására, mert nagy térfogat injektálásakor a folyadék már minimális nyomáskülönbség hatására is visszaáramlik az extracelluláris térbe a mikrokapilláris által szakított nyíláson keresztül. A petesejt endogén mechanoszenzitív ioncsatornáit ezért leggyakrabban excised patch körülmények között vizsgálják, ahol többször 10 Hgmm nyomáskülönbség is könnyen létrehozható a membrán két oldala között [5]. Természetesen nem tudjuk kizárni, hogy az injektálás miatt jelentkező áram növekedés, a nem-specifikus leak fokozódásán kívül, részben az endogén mechanoszenzitív csatornák aktiválódása miatt jött létre a méréseinkben. Azonban a mechanoszenzitív csatornák áramának növekedése elhanyagolható nagyságú volt az aktivált TRESK áramhoz képest, az irodalmi adatokkal jó összhangban [6].

- Lin-Moshier, Y., Marchant, J. S. (2013) The Xenopus oocyte: a single-cell model for studying Ca2+ signaling. *Cold Spring Harb Protoc* **2013**
- McBride, D. W., Jr., Hamill, O. P. (1992) Pressure-clamp: a method for rapid step perturbation of mechanosensitive channels. *Pflugers Arch* **421**, 606-612
- Bryan-Sisneros, A. A., Fraser, S. P., Djamgoz, M. B. (2003) Electrophysiological, mechanosensitive responses of Xenopus laevis oocytes to direct, isotonic increase in intracellular volume. *J Neurosci Methods* **125**, 103-111

Eredmények 69. oldal, 18. ábra

Kérdés: Jelölt a TRESK csatornáról megállapítja, hogy az „a nyitott csatorna rektifikáció mechanizmust meghaladó mértékben enyhe kifelé rektifikálást mutat”. Ugyanakkor, bár ez egy fontos csatornatulajdonságnak számít, „a kifelé rektifikálás mechanizmusát nem” vizsgálták tovább. Miért nem folytattak kísérleteket ennek felderítésére? Van-e esetleg valamilyen elképzelésük a jelenség hátterében álló mechanizmusról?

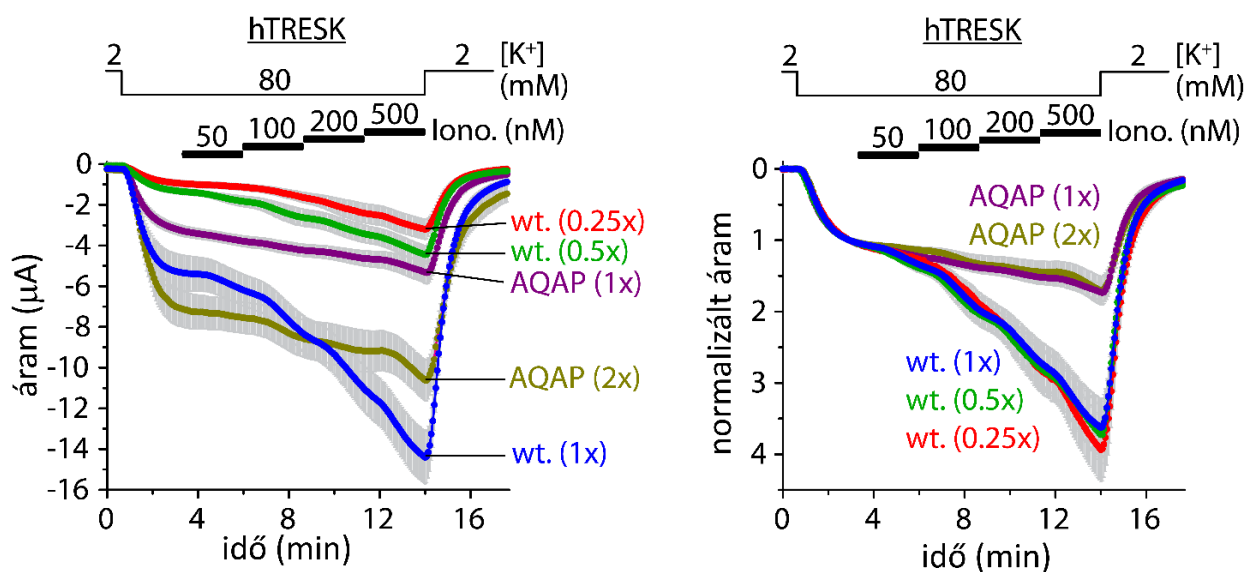
Válasz: Néhány egyszerű vizsgálatot elvégeztem a TRESK áram rektifikálását illetően, de ezeket nem éreztem említésre érdemesnek az értekezésben. Mivel több csatornatípusnál is a divalens ionok koncentrációja összefügg a rektifikációval, ezért megnöveltem az extracelluláris Mg²⁺ vagy Ca²⁺ koncentrációt. Ez azonban nem befolyásolta a TRESK áram kifelé rektifikálását. Ezért a TRESK esetében valószínűleg nem az extracelluláris divalens ionok felelősek a kifelé rektifikálásért. Mások ötletes elméletet dolgoztak ki a K_{2P} csatornák gyors feszültségfüggő kapuzásának magyarázatára, amellyel részben értelmezhető a makroszkópos áram rektifikálása. Az ion-fluxus-kapcsolt kapuzás elméletet a bevezetés 8. ábrájának megfelelően ismertettem az értekezésben [7].

7. Schewe, M., Nematian-Ardestani, E., Sun, H., Musinszki, M., Cordeiro, S., Bucci, G., de Groot, B. L., Tucker, S. J., Rapedius, M., Baukrowitz, T. (2016) A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K(+) Channels. *Cell* **164**, 937-949

Eredmények 101. oldal, 37. ábra

Kérdés: Az értekezésben Szerző vizsgálja a Karbachol által kiváltott TRESK áram növekedést M1 muszkarinos acetilkolin-receptort expresszáló oocytákon. Azon kívül, hogy megállapítja, hogy az M1 receptor aktiválása Karbachollal jelentősen növeli az áram nagyságát, elemzi, hogy ez a növekedés milyen mértékű. Ehhez az agonista adására bekövetkező áramnövekedést az adagolás előtti értékre – a 37. ábrán I_0 -val jelölve – normalizálja.

Fontos szem előtt tartani, hogy a normalizálás igen érzékeny az I_0 értékre, különösen, ha annak nagysága kicsiny. Az ábra B panelén bemutatott esetben a vizsgált két mutáns – az AQLP és az AQAP – esetén az I_0 értéke jelentősen kisebb, mint a vad típusú csatorna esetén. Ez jelentősen befolyásolja a normalizálás után kapott adatokat. Különösen annak tükrében érdekes ez a probléma, hogy az ábra A panelén bemutatott esetben a mutánsok és a vad típusú csatorna I_0 értékei teljesen azonosnak tűnnek. Szerző nem mutat adatokat arra vonatkozóan, hogy az I_0 értékek átlagosan milyenek voltak a mutáns és vad típusú csatornák esetén. Ez szerencsés lett volna a C és D paneleken bemutatott adatok interpretálásához.



Válasz: A Bíráló bazális áramokra vonatkozó kritikája teljesen jogos és megalapozott. Az értekezés megírásakor az eredményeket tömörített formában ismertettem, a fő üzenet tolmácsolása volt az elsődleges cél. A terjedelem korlátok között tartása érdekében helyenként fontos kísérleteket is kihagytam a leírásból. Ez az eset is ilyen. A mutáns TRESK csatornák bazális áramának nagyságát kontrollálni tudjuk a *Xenopus* petesejt rendszerben az injektált cRNS mennyiség beállításával. A vad típusú és AQAP kalcineurin-kötőhely mutáns TRESK kalcium-függő aktivációját különböző expressziós szintek mellett összehasonlítottam. Az AQAP mutáns cRNS mennyiségét növeltem, az egyszeres töménység mellett kétszerest is vizsgáltam. A vad típusú csatorna cRNS-ét viszont hígítottam, egyszeres, félszeres és negyedszeres töménységet is alkalmaztam. (Minden csoportot legalább tízes elemszámmal mértem.) Az alapáramok között így minden lehetséges reláció, nagyságbeli viszony előállt, volt olyan csoport, ahol a vad típusú, és volt olyan, ahol az AQAP mutáns alapárama volt nagyobb. A petesejteket lépésenként növekvő koncentrációjú ionomycinnel ingereltem. A normalizált görbék kiválóan együtt futnak a különböző cRNS hígítások esetén, mutatva, hogy

a vizsgált kifejeződési szintek mellett, a kalcium-függő aktiváció kinetikája teljesen független az expresszió mértékétől. Tehát az AQAP mutáns az expresszió szintjétől függetlenül kevésbé aktiválódik a citoplazma kalcium koncentrációjának mérsékelt növelésekor, mint a vad típusú TRESK.

Eredmények 134. oldal, 52. ábra

Kérdés: Szerző a cAMP hatását is vizsgálta oocytákon mikroinjektálás segítségével. Kapcsolódva a Módszerek-nél feltett kérdésemre, a pipettában alkalmazott 0,1, 1 és 10 mM cAMP milyen koncentrációt eredményezhetett az oocyta intracelluláris terében? Történekekre vonatkozó számítások, becslések? Ha igen, milyen mértékben kellett figyelembe venni, hogy a cAMP nem egyenletesen oszlik meg az egyes intracelluláris kompartmentekben? Hogyan viszonyulna a mikroinjektálással elért koncentráció a sejt fiziológiás aktiválása során elért cAMP koncentrációhoz?

Válasz: A cAMP koncentráció becslésére nehéz realisztikus modellszámítást végezni [8]. A cAMP a plazmamembránhoz diffundál az injektálás helyéről, útközben pedig foszfodiészterázok bonthatják, vagyis a koncentrációja ezen összetett hatások eredőjeként csökken. Ha ezeket a koncentrációt csökkentő hatásokat teljesen figyelmen kívül hagyjuk és a mikroinjektált cAMP egyenletes elkeveredésével számolunk a citoplazmában, akkor az injektált 0,1, 1 és 10 mM cAMP fent említett kb. tízszeres hígulása 10, 100 és 1000 μ M-os végkoncentrációt eredményezne. Irodalmi adatok szerint a nyugalmi és maximális ingerlés hatására jelentkező cAMP koncentráció a kb. 0,2 és 30 μ M közötti tartományban lehet a különböző sejtípusokban [9-11]. Tekintetbe véve azonban a mikroinjektálás és a vizsgált hatás kialakulása között eltelt rövid (2-4 perces) időt, a teljes elkeveredés vélhetően még nem alakult ki a citoplazmában a méréseink közben. A kompartmentalizált cAMP jelátvitel figyelembevétele tovább nehezíti a koncentráció megoszlás értékelését, jelenleg nem tudjuk, hogy a TRESK pl. AKAP horgonyzó fehérjékkel rögzített-e ilyen különleges lokális környezetben. Mindazonáltal, a cAMP mikroinjektáláson kívül forskolin és izobutilmetilxantin (IBMX) alkalmazásával is ki tudtuk váltani a TRESK gátló hatást. Ez azt mutatja, hogy az endogén adenilát-cikláz maximális aktiválása, a foszfodiészterázok gátlása mellett, megnöveli annyira a cAMP koncentrációt, hogy ez a TRESK gátlást négy percen belül kifejti (ld. 51. ábra az értekezésben).

8. Zaccolo, M., Zerio, A., Lobo, M. J. (2021) Subcellular Organization of the cAMP Signaling Pathway. *Pharmacol Rev* **73**, 278-309
9. Iancu, R. V., Ramamurthy, G., Warriar, S., Nikolaev, V. O., Lohse, M. J., Jones, S. W., Harvey, R. D. (2008) Cytoplasmic cAMP concentrations in intact cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C414-422
10. Koschinski, A., Zaccolo, M. (2017) Activation of PKA in cell requires higher concentration of cAMP than in vitro: implications for compartmentalization of cAMP signalling. *Sci Rep* **7**, 14090
11. Sudlow, L. C., Gillette, R. (1997) Cyclic AMP levels, adenylyl cyclase activity, and their stimulation by serotonin quantified in intact neurons. *J Gen Physiol* **110**, 243-255

Általános kérdés

Kérdés: A TRESK áram aktiválódása során (pl. ionomycinnel vagy Karbachollal) a normalizált áram maximuma igen széles határok között mozog (kevesebb, mint 7 – 27. ábra; közel 15 – 37. ábra). Milyen jelenség állhat a jelenség hátterében? Milyen szórást mutat a bazális, nyugalmi TRESK áram? Milyen arányban vannak jelen nyitott TRESK csatornák egy

nyugalomban lévő oocytán? Változik-e az egyedi csatornák vezetőképessége a különböző aktiváló mechanizmusok (pl. defoszforiláció) hatására?

Válasz: Minél jobban előre haladunk a TRESK csatorna molekuláris szabályozó mechanizmusainak megértésében, annál több olyan tényezőt azonosítunk, amely a csatorna kalcium-függő aktivációjának mértékét befolyásolja. Ilyen tényezők lehetnek pl. a kalcium jel nagysága és kinetikája, minden ezt befolyásoló faktorial együtt, a kalcineurin expressziója, a csatorna bazális foszforilációjának mértéke a szerin 252, 262 és 264 területén, az ezeket foszforiláló kinázok aktivitása, vagy a 14-3-3 adapter fehérje mennyiség a citoplazmában. Mindezen tényezők különbözhetnek az egyes *Xenopus* petesejt preparátumokban.

A bazális TRESK áram átlagos nagyságát az injektált cRNS mennyiségével tág korlátok között beállíthatjuk. A bazális áram jelentős szórást mutat petesejt preparátumon belül (ennek mértékét az értekezés több ábráján a kontroll csoport szórásaként ábrázoltuk), emellett a bazális áram nagy eltéréseket mutat a különböző preparátumokban, ugyanakkora mennyiségű cRNS injektálását követően. Úgy tűnik, hogy a kalcineurin nem járul hozzá a TRESK csatorna aktiváltsági szintjének meghatározásához bazális körülmények között. Jó minőségű petesejt preparátumban, magas koncentrációjú EGTA vagy a kalcineurin TRESK csatornához kötődését kivédő VIVIT peptid mikroinjektálása nem befolyásolta a bazális áram nagyságát (32.B ábra az értekezésben). Ezzel szemben a csatornát foszforiláló MARK2 túlexpresszáltatása csökkentette a bazális áramot (ld. az 54.A ábrát), ez arra utal, hogy a bazális áram kialakításában is részt vesznek defoszforilált vagy legalábbis részlegesen defoszforilált csatornák.

Hogy a nyitott csatornák milyen arányban vannak jelen az ingerlést megelőzően, az a körülményektől függően változhat és ezt a nehezen becsülhető kis arányt nem határoztuk meg kísérleteinkben. A TRESK nyitvatartási valószínűsége növekszik defoszforiláció hatására, az egyedi csatorna vezetőképesség állandó marad [12].

12. Lengyel, M., Czirjak, G., Jacobson, D. A., Enyedi, P. (2020) TRESK and TREK-2 two-pore-domain potassium channel subunits form functional heterodimers in primary somatosensory neurons. *J Biol Chem* **295**, 12408-12425

Végezetül még egyszer köszönöm Prof. Csernoch Lászlónak az értekezésem bírálatát és a kutatásaim általánosan pozitív értékelését. Kérem szépen, hogy fogadja el a kérdésekre adott válaszaimat.

Budapest, 2021. 12. 22.



Dr. Czirjak Gábor
egyetemi docens
Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet