

VÁLASZ OPPONENSI VÉLEMÉNYRE

OPPONENS:

Dr. Jost Norbert 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 Dr. Jost Norbertnek, hogy elvállalta az értekezésem bírálatát, általánosan pozitív véleményt fogalmazott meg és támogatta a dolgozat nyilvános vitára bocsátását.

A Bíráló az értekezés formai kritikája kapcsán részletekbe menően kifogásolta az értekezés terjedelmét. Minden szubjektív szempontot mérlegelve elfogadom jogos kritikaként, hogy az értekezés hosszú, mindazonáltal ezt a kérdést objektív módon is megvizsgáltam. Összegyűjtöttem az MTA REAL-d adatbázisából a címük alapján orvosi vagy orvosi alapkutatói témájú doktori műveket 2018 és 2021 között, illetve ezek tartalomjegyzékéből kikeresem az utolsó oldalszám adatokat. Az oldalszámok átlaga 162 ± 48 volt, ahol a szórás standard hibának (SD) felel meg, $n=57$ elemszám mellett. Az adatok eloszlása a Shapiro-Wilk teszt szerint nem tér el szignifikánsan a normálistól. A 224 oldalas értekezésemet az extrém értékek (outlier-ek) kimutatására használatos IQR és Grubb's tesztek nem azonosították. Ezek a tesztek egyébként nem mutattak ki outlier-t az adathalmazban, habár az IQR tesztnél, a megengedő 1.5-szörös szorzófaktort használva, a leghosszabb (284 oldalas) értekezés ehhez már közel járt. Az eloszlásfüggvényt és statisztikai analízist tekintve, az értekezésem ugyan az adatsor felső negyedébe tartozik, azonban terjedelme nem kivételes a hasonló témájú MTA doktori dolgozatok sorában.

A Bíráló bevezető általános értékelésében azt írja, hogy idézem "Összes közleményeinek száma az értekezés benyújtásának idejében 32 volt, és ebből 22-öt használt fel az MTA értekezésben bemutatott eredmények ismertetéséhez". Később a részletes bírálat részben azt állítja, hogy "a Jelölt nem akart kihagyni semmit munkáiból, ezért az értekezés túl hosszú, helyenként túl burjánzott lett". A két megállapítás közül én inkább az első tényszerű változattal értek egyet, amely szerint a közleményeim 30 %-ának eredményeit meg sem említettem az értekezésben. Továbbá, a felhasznált 22 közlemény mindösszesen 155 ábrát tartalmaz, ezzel szemben az értekezésben 69 ábra található és összevonás elenyésző mértékben történt. A 69 ábrából hat nem publikált eredmény, négy bevezető ábra pedig mások munkáján alapul. Tehát a 155 cikkábrából összesen 59-et használtam fel, amely 38 %-nak felel meg. Ez meggyőzően mutatja milyen jelentős összefoglalás, szelekció és leegyszerűsítés történt az értekezés elkészítésekor. Sajnálom, hogy az Opponens helyenként túlburjánzónak érezte a dolgozatot. Az kétségtelen, hogy így is sok adatot ismertettem, azonban mindvégig arra törekedtem, legjobb szándékom szerint, hogy a munkám lényegretörő és egyben jól érthető legyen.

A Bíráló kérdéseire a következő válaszokat adom:

1. **Kérdés:** A logika azt mondaná, hogy a TRESK-csatorna, azért a TWIK, de különösen a TREK 1 és 2 (TWIK Related K⁺-channels” 1 and 2) csatornákhöz kellene nagyon hasonló tulajdonságú legyen. Ezért kérdezném, hogy igaz, hogy nem jellemző a TRESK-csatornák mechanoszenzitivitása, amely viszont tipikus a TREK-csatornákra, és ha igen miért nem? Az értekezésben sem találtam erre vonatkozó kísérleteket, csak a Megbeszélés rovatában van némi diszkusszió erre vonatkozóan, amely elsősorban mások munkáját taglalja.

Válasz: A K_{2P} csatornákat hat alcsládba osztályozzuk, ahogy ez stílusos megfogalmazással szerepel a Bíráló véleményében is. A hat alcsládba tartozó csatornák aminosav szekvencia tekintetében nagyon különböznek egymástól. Pl. a TWIK-1 és TREK-1 között mindössze 28 % a szekvencia egyezés [1]. Leegyszerűsítve azt mondhatjuk tehát, hogy a K_{2P} alcsládok között nem sokkal nagyobb a hasonlóság, mint a K_{2P} csatornák és az egyéb klasszikus K⁺-csatorna családok, pl. feszültségfüggő, befelé rektifikáló vagy kalcium-aktivált K⁺-csatornák között. Az aminosav szekvencia azonosság szinte kizárólag a transzmembrán régiókra és pórusdoménekre korlátozódik, tehát a csatorna szabályozásában fontos intracelluláris régiók általában teljesen különbözők. Mindezek miatt sokkal jobban működő megközelítés a különböző alcsládokba tartozó K_{2P} csatornákat szabályozási szempontból teljesen különálló entitásokként kezelni, mintsem megkísérelni, hogy rájuk általános megállapításokat tegyünk. Megegyezik a K_{2P} csatornák membrántopológiája, 4 transzmembrán szegmens és 2 pórusdomén alegységként, illetve sejthetően azonos a fő kapuzási mechanizmusuk, azonban a kapuzást befolyásoló szabályozó tényezők lényegében teljesen eltérőek az alcsládok között.

A TREK alcslád tagjai a TREK-1, TREK-2 és TRAAK a jelenleg legjobban megértett működésű mechanoszenzitív csatornák közé tartoznak, amelyek vizsgálatában a Nobel-díjas Roderick MacKinnon meghatározó szerepet játszott [2-5]. A csatornák átmenetét a "down" konformációból, a membrán síkjában nagyobb felületű "up" konformációba a foszfolipid kettősréteg feszülésének fokozódása okozza, ehhez a citoszkeletonra vagy egyéb járulékos pányvázó fehérjére nincs szükség. Azonos vizsgálati körülmények között, a TWIK-1 egyáltalán nem mutatja az up/down szerkezeti átrendeződést, a TWIK-1 down konformációban stabilizált [6]. A TRESK-ről, az ilyen irányú erőfeszítések ellenére, egyelőre nem rendelkezünk kristályszerkezettel, és ennek a csatornának a mechanoszenzitivitását kevésbé vizsgálták. A Gasull munkacsoport leírta, hogy a TRESK nagyon mérsékelten mechanoszenzitív [7], azonban ezt idáig senki sem erősítette meg. Munkacsoportunk a TRESK mechanoszenzitivitását nem vizsgálta célzottan. Jelenleg nem ismert és izgalmas kérdés, hogy a TRESK és TREK alegységek által alkotott heterodimer csatornák "öröklik-e" a kifejezett mechanoszenzitivitást a TREK-1, TREK-2 vagy TRAAK alegység komponensektől.

1. Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., Lazdunski, M. (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J* **15**, 6854-6862
2. Brohawn, S. G., del Marmol, J., MacKinnon, R. (2012) Crystal structure of the human K_{2P} TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science* **335**, 436-441
3. Brohawn, S. G., Campbell, E. B., MacKinnon, R. (2013) Domain-swapped chain connectivity and gated membrane access in a Fab-mediated crystal of the human TRAAK K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **110**, 2129-2134
4. Brohawn, S. G., Su, Z., MacKinnon, R. (2014) Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 3614-3619

5. Brohawn, S. G., Campbell, E. B., MacKinnon, R. (2014) Physical mechanism for gating and mechanosensitivity of the human TRAAK K⁺ channel. *Nature* **516**, 126-130
6. Dong, Y. Y., Pike, A. C., Mackenzie, A., McClenaghan, C., Aryal, P., Dong, L., Quigley, A., Grieben, M., Goubin, S., Mukhopadhyay, S., Ruda, G. F., Clausen, M. V., Cao, L., Brennan, P. E., Burgess-Brown, N. A., Sansom, M. S., Tucker, S. J., Carpenter, E. P. (2015) K₂P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science* **347**, 1256-1259
7. Callejo, G., Giblin, J. P., Gasull, X. (2013) Modulation of TRESK background K⁺ channel by membrane stretch. *PLoS One* **8**, e64471

2. **Kérdés:** Az értekezésben Módszerek fejezetében a Jelölt kiemeli, hogy a *Xenopus* oocytákban végzett két-elektrodos voltage-clamp mérések szobahőmérsékleten kerültek sorra. Kerestem, de nem találtam utalást, hogy a COS-7, illetve HEK-293 sejtvonalakon készült standard patch-clamp kísérleteket milyen hőmérsékleten végezték, így csak feltételezem, hogy azok is szobahőmérsékleten készültek. Kérdésem, hogy mit lehet tudni általában a K₂P-csatornák, és azon belül is az értekezés témáját képező TRESK csatornák hőmérsékletfüggő (csatorna kinetika, aktiváció, szenzitivitás, stb.) tulajdonságairól?

Válasz: Az értekezésben szereplő, COS-7 és HEK-293 sejteken végzett teljes sejt patch-clamp mérések is szobahőmérsékleten készültek. A hőmérséklet-függést leíró, általában használt paraméter, a Q₁₀ érték a legtöbb ioncsatorna esetében 1 és 3 közötti. A legegyszerűbb interpretáció szerint ennyiszeresére növekszik az áram 10 °C hőmérséklet növekedéskor. A K₂P csatornák között a TREK alsó család tagjainak Q₁₀ értéke 10 körüli a 30-42 °C tartományban, tehát ezek kifejezetten hőmérséklet-érzékeny csatornák. (Összehasonlításképpen, az erősen hőmérséklet-érzékeny TRP csatornák Q₁₀ értéke általában 20 vagy afölötti.) A TREK csatornák talán szerepet játszanak a hidegre érzékeny primer szenzoros neuronok aktivációjában [8,9]. A TREK/TRAAK hőmérséklet érzékelésének mechanizmusa kevésbé értett.

Kang és munkatársai azonos körülmények között összehasonlították a TREK-2 és TRESK csatornák hőmérséklet-függését hátsó gyöki ganglion primer szenzoros neuronokból kivágott membrán foltokban [10]. Q₁₀ értékeket ugyan nem határoztak meg, de vizsgálataikból kitűnik, hogy a TRESK aktivitás változása a hőmérséklet 24 °C-ról 37 °C-ra növelésekor messze elmarad a TREK-2 csatornákétól, vagyis a TRESK áram nagysága csekély mértékű hőmérséklet-függést mutat.

8. Noel, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalié, A., Lazdunski, M. (2009) The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* **28**, 1308-1318
9. Pereira, V., Busserolles, J., Christin, M., Devilliers, M., Poupon, L., Legha, W., Alloui, A., Aissouni, Y., Bourinet, E., Lesage, F., Eschalié, A., Lazdunski, M., Noel, J. (2014) Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *Pain* **155**, 2534-2544
10. Kang, D., Kim, D. (2006) TREK-2 (K₂P10.1) and TRESK (K₂P18.1) are major background K⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **291**, C138-C146

3. **Kérdés:** A Jelölt átfogóan ismerteti a TRESK-csatorna kalcium-függő szabályozását. A citoplazma kalcium koncentráció emelkedésének hatására növekedő K^+ áram több mint 25 ábrán szerepel az értekezésben. Azonban az összes ilyen mérés *Xenopus* petesejtekből származik, annak ellenére, hogy farmakológiai mérések történtek emlős sejt vonalakban is. Mi ennek az oka? Miért nem szerepel az értekezésben a TRESK kalcium-függő szabályozása HEK-293 vagy COS-7 sejtekben?

Válasz: A TRESK kalcineurin-függő aktivációja emlős sejt vonalakban is kimutatható teljes sejt patch-clamp módszerrel, azonban jóval körülményesebben, mint a *Xenopus* petesejtekből. Kezdetben a TRESK kalcium-függő aktivációját nem tudtuk igazolni patch clamp mérésekben és Kang és munkatársai is csak kis mértékű, 20-80 %-os aktivációról számoltak be, éles ellentétben a *Xenopus* petesejtekből jellemző 5-15-szörös K^+ -áram növekedéssel [10,11]. A *Xenopus* rendszerben a sejt citoplazmájának összetétele fenntartott a mérés kezdetén. Ezzel szemben a teljes sejt patch clamp-nél a citoplazma ekvibrálódik a pipettaoldattal, például a nyugalmi ATP és kalcium koncentráció, illetve a kalcium pufferekapacitás is módosul. Mindezek viszont alapvetően befolyásolják a TRESK foszforilációtól függő szabályozását. Ezért aztán a kísérleti feltételek helyes megválasztása nem magától értetődő a patch clamp méréseknél. Végül sikerült olyan feltételeket találnunk, amelyek között a TRESK áram többszörösére növelhető HEK-293 heterolog expressziós rendszerben. Az extra- és intracelluláris oldat is alacsony 50 μ M-os koncentrációjú EGTA kelátort tartalmazott, hozzáadott kalcium nélkül és magas 2.5, illetve 3 mM Mg^{2+} -ot a seal képződés elősegítésére. Ezen a módon keláltuk az oldatainkban esetleg szennyezésként jelenlévő alacsony koncentrációjú szabad Ca^{2+} -ot, de nem emeltük drámai módon a citoplazma kalcium pufferekapacitását, illetve hatékonyan alacsony szinten tartottuk a citoplazma Ca^{2+} koncentrációt a kalcineurin aktiválódás megelőzésére az ingerlés előtt. Az ingerlés során az ionomycin mellett az extracelluláris kalcium koncentrációt 2 mM-ra növeltük, a kalcium beáramlás elősegítésére, és a magas kalciumot az ionomycin elvonása után is megtartottuk. Ezzel a megközelítéssel mintegy hatszoros TRESK áram növekedést idéztünk elő, amely összemérhető a *Xenopus* rendszerben jellemzővel. Tekintve a fiziológiától szükségszerűen távolos körülményeket és a durva beavatkozást a TRESK-et szabályozó jelátviteli rendszerekbe, a továbbiakban nem a HEK-293 sejteket használtuk rutinszerűen a vizsgálatainkban.

10. Kang, D., Kim, D. (2006) TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K^+ channels in dorsal root ganglion neurons. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **291**, C138-C146
11. Kang, D., Kim, G. T., Kim, E. J., La, J. H., Lee, J. S., Lee, E. S., Park, J. Y., Hong, S. G., Han, J. (2008) Lamotrigine inhibits TRESK regulated by G-protein coupled receptor agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **367**, 609-615

4. **Kérdés:** A kísérletek alátámasztják, hogy a TRESK-csatornát a kalcineurin foszfatáz serkenti. Nem említi viszont az értekezés egyáltalán, milyen mechanizmus felelős a defoszforiláció csatorna aktivitás növelő hatásáért. Hogyan függ össze a csatorna foszforiláltsági állapota a csatorna kapuzásával? Mit gondol a Jelölt erről a kérdésről?

Válasz: A K_{2P} csatornák kapuzási mechanizmusát nem ismerjük egészen pontosan, de mostanra általános konszenzus alakult ki az irodalomban arról, hogy a kapuzás döntően a szelektivitási filter területén történik [12-14]. Talán még kevésbé értjük, hogy a szabályozó tényezők hatása hogyan terjed a szelektivitási filterre. Mindazonáltal teljesen áthatja a terület irodalmát, hogy a K_{2P} alegységek intracelluláris C-terminális régiója alapvető szerepet játszik a szabályozó tényezők érzékelésében és a hatás továbbításában [15]. A legtöbbet vizsgált TASK és TREK csatornáknál, a negyedik (C-terminális, utolsó) transzmembrán régiót követően található a szabályozó foszforilációs helyek és fehérje

interakciós motívumok. Leírták továbbá a C-terminális dinamikus asszociációját a plazmamembránhoz, amelyet a szabályozó tényezők módosítanak és ezáltal okoznak csatorna konformáció változást.

Ahogy az Opponens célzott kérdésével rávilágított, eredményeink alapján teljesen nyilvánvaló, hogy a TRESK nem illeszkedik ebbe az általános koncepcióba, mivel az általunk azonosított, kalcineurin hatására defoszforilálódó aminosav maradékok szokatlan elhelyezkedésűek. Ezek a szerinek ugyanis nem az intracelluláris C-terminálisban, hanem a második és harmadik transzmembrán régió közötti hurok területén található. Ez a szerkezeti elrendezés arra utal, hogy a kalcineurin-függő szabályozás az egyéb mechanizmusoktól eltérő módon kapcsolódik a csatorna kapuzásához. Befolyásolhatja a TRESK foszforiláció a kapuzást teljesen különálló útvonalon, de felvetődik az a lehetőség is, hogy a TRESK-ben esetleg interakció jön létre az intracelluláris hurok és a C-terminális régiók között. További kísérletek szükségesek ezeknek a lehetőségeknek az elkülönítésére.

12. Bagriantsev, S. N., Peyronnet, R., Clark, K. A., Honore, E., Minor, D. L., Jr. (2011) Multiple modalities converge on a common gate to control K2P channel function. *EMBO J* **30**, 3594-3606
13. 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
14. Rinne, S., Kiper, A. K., Vowinkel, K. S., Ramirez, D., Schewe, M., Bedoya, M., Aser, D., Gensler, I., Netter, M. F., Stansfeld, P. J., Baukrowitz, T., Gonzalez, W., Decher, N. (2019) The molecular basis for an allosteric inhibition of K(+)-flux gating in K2P channels. *Elife* **8**, e39476
15. Enyedi, P., Czirják, G. (2010) Molecular background of leak K+ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* **90**, 559-605

5. **Kérdés:** Ismert, hogy a TREK-1 csatornák esetében, bizonyos esetekben megváltozik a csatorna permeabilitása/szelektivitása, és így már nem K⁺, hanem Na⁺-ionra válik érzékeny. Ezzel magyarázták például a hipokalémiában ismert depolarizációs paradox jelenséget is (Ma et al, *J Biol Chem* 287: 37145-37153, 2012), illetve ezen érzékenységszere lehet felelős adott körülmények között szívritmuszavarok (például kamrai tachycardia) megjelenésért (Decher et al, *EMBO Mol Med* 9: 403-414, 2017). Kérdésem az, hogy ismert-e a TRESK-csatornákra is valamilyen hasonló tulajdonság.

Válasz: A plazmamembránban található K⁺ csatornák szelektivitási filter régiója konzervált, konszenzus aminosav szekvencián alapul. A szelektivitási filter kísérletes módosítása mutációkkal a K⁺-szelektivitás elvesztésével járhat [16]. A csatorna Na⁺-ot kezd vezetni, vagyis a mutáció funkcionyerő (gain-of-function) abból a szempontból, hogy a hiperpolarizáló K⁺-áram helyett depolarizáló hatású Na⁺-áram jelenik meg. Ilyen mutációt megfigyeltek kísérleti állatban, pl. a "weaver" egérben, ahol a mutáns GIRK2 (Kir3.2, KCNJ6) befelé rektifikáló K⁺-csatorna szabályozatlan Na⁺-árama a kisagyi szemcsesejtek pusztulásához és ataxia kialakulásához vezet [17]. Másik példa hasonló jelenségre a GIRK4 (Kir3.4, KCNJ5) funkcionyerő mutációja a Conn-szindrómás betegek nagy hányadában, ahol a mellékvesekéreg glomerulóza sejtek tartós depolarizációja szabályozatlan aldosteron túltermelést okoz [18]. Érthető módon, a mutációk funkcionális következményei az érintett csatorna lokalizációjától függenek. Decher és munkatársai, a Bíráló által idézett közleményükben [19], hasonló funkcionyerő mutációról számolnak be a TREK-1 csatorna szelektivitási filterében, amely egy betegben ventrikuláris tachycardia kialakulását okozta. Ez a megfigyelés tehát teljesen konzisztens az ismereteinkkel és jól illeszkedik a korábbi eredmények sorába.

A Bíráló által idézett másik közleményben viszont Ma és munkatársai azt állítják, hogy a TWIK-1, TASK-1 és TASK-3 csatorna, mutáció hiányában, az extracelluláris közeg savanyításának hatására válik Na⁺-ra áteresztővé. A TASK csatornák pH-függő gátlását a 90-es évek végén, 2000-es évek elején vizsgálta a területen legnagyobb névnek számító Lazdunski és Goldstein munkacsoport [20,21], és jómagam is [22-24]. Egyikünk sem írta le jelentős Na⁺-áram megjelenését. Ma és munkatársai közleményükben a túlexpresszált nagy TASK áramok és a savanyítás hatására töredékére csökkent kis áramok megfordulási potenciálját hasonlították össze. A gátolt kis áramok abban a tartományban lehettek, ahol a sejt endogén áramai arányukban már nem elhanyagolhatók. Az NMDG-vel végzett kontroll kísérletek pedig nem különítették el, hogy a Na⁺-áram tényleg a TASK csatornákon vagy azoktól független útvonalon folyik. A TASK pH-érzékenységére vonatkozó, *Xenopus* petesejtekben végzett méréseimet annak idején nagyban nehezítette, hogy a TASK-ot expresszáló sejtekben, csakúgy mint a kontroll oocytákban, a savanyítás hatására endogén nem szelektív konduktancia jelentkezett, sejtenként variábilis mértékben. A TASK csatornához hasonlóan, feltűnő Na⁺-vezetőképesség fokozódást nem tapasztaltam a TRESK csatorna esetében sem, habár néhány százaléknyi Na⁺-áramot nem tudok kizárni, mivel nem vizsgáltam az áramokat kimondottan ebből a szempontból.

16. Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., MacKinnon, R. (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J* **66**, 1061-1067
17. Navarro, B., Kennedy, M. E., Velimirovic, B., Bhat, D., Peterson, A. S., Clapham, D. E. (1996) Nonselective and G betagamma-insensitive weaver K⁺ channels. *Science* **272**, 1950-1953
18. Choi, M., Scholl, U. I., Yue, P., Bjorklund, P., Zhao, B., Nelson-Williams, C., Ji, W., Cho, Y., Patel, A., Men, C. J., Lolis, E., Wisgerhof, M. V., Geller, D. S., Mane, S., Hellman, P., Westin, G., Akerstrom, G., Wang, W., Carling, T., Lifton, R. P. (2011) K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* **331**, 768-772
19. Decher, N., Ortiz-Bonnin, B., Friedrich, C., Schewe, M., Kiper, A. K., Rinne, S., Seemann, G., Peyronnet, R., Zumhagen, S., Bustos, D., Kockskamper, J., Kohl, P., Just, S., Gonzalez, W., Baukowitz, T., Stallmeyer, B., Schulze-Bahr, E. (2017) Sodium permeable and "hypersensitive" TREK-1 channels cause ventricular tachycardia. *EMBO Mol Med* **9**, 403-414
20. Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., Lazdunski, M. (1997) TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* **16**, 5464-5471
21. Lopes, C. M., Gallagher, P. G., Buck, M. E., Butler, M. H., Goldstein, S. A. (2000) Proton block and voltage gating are potassium-dependent in the cardiac leak channel Kcnk3. *J Biol Chem* **275**, 16969-16978
22. Czirják, G., Fischer, T., Spät, A., Lesage, F., Enyedi, P. (2000) TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol. Endocrinol* **14**, 863-874
23. Czirják, G., Enyedi, P. (2002) Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J. Biol. Chem* **277**, 5426-5432
24. Czirják, G., Enyedi, P. (2002) TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol. Endocrinol* **16**, 621-629

6. **Kérdés:** Az értekezésben a Jelölt ismertette, hogy számos vegyülettel ellenőrizték a TRESK-csatornák gátlószerait, de igazándiból egyetlen vegyület sem bizonyult hatékony szelektív gátlószernek. Kérdezném azt is, hogy azóta sincsen ismert hatékony gátlószer/aktiválószer a csatornáknak? Ha nincsen, hogyan volna egyáltalán lehetséges ezen csatornák farmakológiai „hasznosítása”?

Válasz: A Paul Wright által azonosított cloxyquin a TRESK aktiválószer [25], amelynek kémiai módosításával, kollaboráció keretében munkacsoportunk az A2764 gátlószert kifejlesztette [26]. Ezek a vegyületek aránylag szelektív módon hatnak a TRESK-re a K_{2P} csatornák körében és munkacsoportunk [27] és mások is [28] felhasználták ezeket a TRESK áram módosítására kísérletes körülmények között. Sajnos azonban a cloxyquin és származékai nem elég hatékonyak, 100 μ M-os koncentráció szükséges a kifejezett hatás eléréséhez. Hatékonyabb aktiváló vagy gátlószer kifejlesztése messze meghaladja személyi és anyagi erőforrásainkat, azonban ez nem jelenti feltétlenül azt, hogy ilyen hatóanyagokat ne lehetne találni. Egyetértek a Bírálóval abban, hogy a TRESK farmakológiai "hasznosítása" elsősorban csak a hatékony és szelektív csatorna aktiválószer kifejlesztését követően várható.

25. Wright, P. D., Weir, G., Cartland, J., Tickle, D., Kettleborough, C., Cader, M. Z., Jerman, J. (2013) Cloxyquin (5-chloroquinolin-8-ol) is an activator of the two-pore domain potassium channel TRESK. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **441**, 463-468
26. Lengyel, M., Erdélyi, F., Pergel, E., Balint-Polonka, A., Dobolyi, A., Bozsaki, P., Dux, M., Király, K., Hegedűs, T., Czirják, G., Mátyus, P., Enyedi, P. (2019) Chemically Modified Derivatives of the Activator Compound Cloxyquin Exert Inhibitory Effect on TRESK (K2P18.1) Background Potassium Channel. *Mol Pharmacol* **95**, 652-660
27. Lengyel, M., Hajdu, D., Dobolyi, A., Rosta, J., Czirják, G., Dux, M., Enyedi, P. (2021) TRESK background potassium channel modifies the TRPV1-mediated nociceptor excitability in sensory neurons. *Cephalalgia* **41**, 827-838
28. Pettingill, P., Weir, G. A., Wei, T., Wu, Y., Flower, G., Lalic, T., Handel, A., Duggal, G., Chintawar, S., Cheung, J., Arunasalam, K., Couper, E., Haupt, L. M., Griffiths, L. R., Bassett, A., Cowley, S. A., Cader, M. Z. (2019) A causal role for TRESK loss of function in migraine mechanisms. *Brain* **142**, 3852-3867

7. **Kérdés:** Milyen szövetekben fejeződik ki a TRESK-csatorna a hátsó gyöki és trigeminális ganglion primer szenzoros neuronokon kívül? Van szerepe a csatorna kalcium-függő szabályozásának ezekben a lokalizációkban?

Válasz: A TRESK a hátsó gyöki és trigeminális ganglion neuronokban nagy mennyiségben megtalálható, azonban emellett kisebb mennyiségben előfordul egyéb neuron típusokban is, ahol működésének szintén funkcionális következménye lehet. Leírták a TRESK kifejeződést vegetatív idegrendszeri ganglionokban, a szimpatikus posztganglionáris (effektor) neuronokban a ganglion cervicale superiusban és a vagus visceroszenzoros neuronjaiban a ganglion nodosumban [29]. Felvetődött a lehetősége, hogy a TRESK kalcineurin-függő aktivációja és a következményes hiperpolarizáció hozzájárul a csökkent mértékű vagovagális reflexekhez diabeteses patkány modellben [30,31].

Megtalálható továbbá a TRESK a nucleus suprachiasmaticus egyes neuronjaiban is, ahol szerepet játszik az éjszakai alacsony nyugalmi citoplazma kalcium koncentráció stabilizálásában, kalcineurin-függő hiperpolarizáló hatásán keresztül [32]. Ez biztosítja a neuronok válaszkészségének fenntartását a glutamátra, amely a retino-hypothalamicus pályán keresztül érkező megvilágítási információ hatására szabadul fel.

A legújabb eredmények szerint, a TRESK kalcineurin-függő aktivációja, többféle egér epilepsziás modellben vizsgálva is, szerepet játszik a roham leállításában és az annak gyors visszatérését akadályozó posztiktális depresszió kialakulásában [33]. Az epilepsziás kóros depolarizáció magas citoplazma kalcium koncentrációt hoz létre, az ennek hatására aktiválódó TRESK csatorna pedig ellensúlyozza a túlzott ingerlékenységet.

A TRESK élettani vagy patofiziológiás szerepét kimutató vizsgálatok hivatkozásokkal jól dokumentált módon támaszkodtak a kalcineurin-függő TRESK aktiváció általunk elsőként leírt mechanizmusának ismeretére.

29. Cadaveira-Mosquera, A., Perez, M., Reboreda, A., Rivas-Ramirez, P., Fernandez-Fernandez, D., Lamas, J. A. (2012) Expression of K2P channels in sensory and motor neurons of the autonomic nervous system. *J. Mol. Neurosci* **48**, 86-96
30. Grabauskas, G., Wu, X., Song, I., Zhou, S. Y., Lanigan, T., Owyang, C. (2016) Increased Activation of the TRESK K(+) Mediates Vago-Vagal Reflex Malfunction in Diabetic Rats. *Gastroenterology* **151**, 910-922 e917
31. Grabauskas, G., Wu, X., Zhou, S., Li, J., Gao, J., Owyang, C. (2019) High-fat diet-induced vagal afferent dysfunction via upregulation of 2-pore domain potassium TRESK channel. *JCI Insight* **4**, e130402.
32. Lalic, T., Steponenaite, A., Wei, L., Vasudevan, S. R., Mathie, A., Peirson, S. N., Lall, G. S., Cader, M. Z. (2020) TRESK is a key regulator of nocturnal suprachiasmatic nucleus dynamics and light adaptive responses. *Nat Commun* **11**, 4614
33. Huang, W., Ke, Y., Zhu, J., Liu, S., Cong, J., Ye, H., Guo, Y., Wang, K., Zhang, Z., Meng, W., Gao, T. M., Luhmann, H. J., Kilb, W., Chen, R. (2021) TRESK channel contributes to depolarization-induced shunting inhibition and modulates epileptic seizures. *Cell Rep* **36**, 109404

8. **Kérdés:** A receptor ingerlés és nagyfokú citoplazma kalcium koncentráció növelés egyaránt összetett membrán foszfolipid változásokat okoz. Befolyásolja a TRESK-csatornát a membrán foszfoinozitidek szintjének változása?

Válasz: Az ionomycin hatására létrejövő TRESK aktivációt a kalcineurin gátlószer (ciklosporin A) lényegében teljesen kivédte (25.A ábra az értekezésben). Teljes gátlást okozott a VIVIT peptid mikroinjektálása (32.A ábra), illetve a TRESK kalcineurin kötőhelyének elroncsolása mutációkkal (35. ábra). A kalcineurin kötőhely mutációja kivédte az M₁ muszkarinos acetilkolin receptoron keresztül kiváltott TRESK aktivációt is (30.B ábra). Ezek a kísérleti beavatkozások megakadályozták a kalcineurin és TRESK interakcióját, azonban nincs okunk feltételezni, hogy befolyásolták (vagy azonos módon módosították) volna a kalcium jelet és a foszfolipid változásokat. Az eredmények tehát erősen valószínűsítik, hogy a kalcium-függő TRESK aktivációt a kalcineurin okozza és a foszfolipid változások lényegében nem járulnak hozzá a szabályozáshoz. Mindez természetesen nem jelenti azt, hogy a foszfolipidek nem játszanak fontos szerepet a TRESK működésében, hiszen az egyéb csatornához hasonlóan a TRESK is foszfolipid környezetben működik, tehát a foszfolipidekkel óhatatlanul közvetlen és folyamatos kölcsönhatásban van. A Gasull munkacsoport leírta, hogy a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) aktiválja a TRESK csatornát [34], azonban ezt a következtetést a Baukrowitz munkacsoport néhány napja megjelent közleményében cáfolta [35]. Eredményük szerint a PIP₂ nem befolyásolja a TRESK aktivitást kivágott membránfoltban.

34. Giblin, J. P., Etayo, I., Castellanos, A., Andres-Bilbe, A., Gasull, X. (2018) Anionic Phospholipids Bind to and Modulate the Activity of Human TRESK Background K⁺ Channel. *Mol Neurobiol* **56**, 2524-2541.
35. Riel, E. B., Jurs, B. C., Cordeiro, S., Musinszki, M., Schewe, M., Baukrowitz, T. (2022) The versatile regulation of K2P channels by polyanionic lipids of the phosphoinositide and fatty acid metabolism. *J Gen Physiol* **154** (in press)

A Bíráló kérésének megfelelően az előadás végén a legfontosabb új eredményeket összefoglaltam tömören három pontban.

Végezetül még egyszer köszönöm Dr. Jost Norbertnek az értekezésem bírálatára fordított időt és energiát, és kérem szépen a kérdésekre adott válaszaim elfogadását.

Budapest, 2021. 12. 22.



Dr. Czirák Gábor
egyetemi docens
Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet