

## Válaszok Dr. Enyedi Péter Professor kérdéseire

Mindenek előtt szeretném megköszönni Enyedi Professor Úrnak a részletes és igen pozitív hangvételű bírálatot. Kérdéseire a válaszokat alább részletezem.

**1/A cisztikus fibrózis viszonylagos gyakorisága és a betegség súlyossága érthetővé teszi, hogy miért folynak génterápiás és velük párhuzamosan intenzív gyógyszeres próbálkozások a hibás transzportfehérje funkció helyreállítására. Ez utóbbiak a "korrektorok" ill. "potenciátorok" a mutáns gén által kódolt fehérje más-más természetű hibáját célozzák meg. Vannak már klinikai fázisban is alkalmazott "potenciátorok". Van-e esetleg olyan vizsgálat, ami ezeknek (pl: Ivacaftornak (1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide), vagy egyéb szernek) csatorna kapuzására kifejtett hatását elemzi a dolgozatban leírt részletességgel?**

Az ivacaftor kapuzásra kifejtett hatását több csoport is behatóan vizsgálta (Jih és Hwang, 2013, *PNAS* 110:4404-9; Kopeikin és mtsai., 2014, *J Cyst Fibros* 13:508-14; Wang és mtsai., 2014, *Br J Pharmacol* 171:4490–4503). Bár vad típusú CFTR csatornákon az ivacaftor is növeli a nyitási és csökkenti a záródási sebességet, a részletes hatásmechanizmus egyértelműen különbözik az NPPB molekuláétól: a nyitási sebesség gyorsítása itt nem az energiagátra gyakorolt "katalizátor" hatás, hiszen az ivacaftor a nem-hidrolitikus záródás sebességét nem növeli, hanem csökkenti. A különböző felvetett modelleket összevetve az ivacaftor legvalószínűbb hatásmechanizmusa az  $O_1$  nyitott állapot szelektív stabilizálása lehet (mind a  $C_1$ , mind az  $O_2$  állapotokhoz képest).

**Miért pont az NPPB molekula hatását elemezték ennyire behatóan, amikor annak egyaránt vannak (eltérő végső hatást eredményező) pórusblokkoló, ill. kapuzást befolyásoló tulajdonságai is.**

Az NPPB-vel kapcsolatos eredeti kérdésfelvetéseink szigorúan akadémikus, a szerkezet/funkció összefüggések jobb megértésére irányuló kérdések voltak. Nevezetesen, arra voltunk kíváncsiak, hogy az NPPB molekula a csatorna záródását lassító hatását a transzmembrán domének befelé nyitott állapotba történő "visszabillenésének" (azaz az  $O_2 \rightarrow C_2$  lépésnek) vagy az ATP hidrolízisének (azaz az  $O_1 \rightarrow O_2$  lépésnek) akadályozásán keresztül fejti ki. (Miután a drogról ismert volt, hogy bejut az intracelluláris vesztibulumba, az első lehetőség is reálisnak látszott, eredményeink azonban végül a második elképzelést támasztották alá.) Amikor azonban az alacsony aktivitású (pl.  $\Delta F508$ ) csatornákra gyakorolt stimuláció óriási mértékére (10-20-szoros) fény derült, világossá vált, hogy e hatásmechanizmusnak akár gyakorlati jelentősége is lehet – különösen annak fényében, hogy az egyetlen jelenleg a klinikumban is alkalmazott potenciátor, az ivacaftor, nem bizonyult hatékonynak a CF leggyakoribb formájának kezelésében (ld. alább), így továbbra is szükség van új, hatékony potenciátorok fejlesztésére.

**2/ Ismeretei szerint a "corrector", ill. "potenciátor" effektusok között van-e, és ha igen, milyen az összefüggés. A mutáns csatornákra ható különböző támadáspontú vegyületek befolyásolják-e egymás hatásait?**

Logikusan feltételezhetnénk, hogy egy korrektor vegyület, ha egyszer helyrehozza a szerkezeti hibákat, akkor a funkciót is helyreállítja, azaz potenciátor hatással is fog bírni. A gyakorlat azonban ezt nem igazolta. A korrektorok hatásmechanizmusa jelenleg nagyon kevésbé ismert, egy részük valószínűleg nem is közvetlenül a CFTR fehérjéhez kötődve, hanem a sejt chaperon rendszereinek befolyásolán keresztül hat. Ezidáig legrészletesebben a klinikumban már használt két vegyületet, a korrektor lumacaftort (Vx-809) és a potenciátor ivacaftort (Vx-770) vizsgálták. A hosszútávú lumacaftor kezelés ismeretlen hatásmechanizmussal növeli a  $\Delta F508$  csatornák sejtfelszíni expresszióját, de nem növeli a csatornák aktivitását, azaz a lumacaftor korrektor, de nem potenciátor (Kopeikin és mtsai., 2014). Ezzel szemben, az akut ivacaftor kezelés növeli a  $\Delta F508$  csatornák aktivitását, azaz az ivacaftor potenciátor (Jih és Hwang, 2013; Kopeikin és mtsai., 2014; Wang és mtsai., 2014), azonban a hosszútávú ivacaftor kezelés egyenesen csökkenti a  $\Delta F508$  csatornák sejtfelszíni expresszióját, sőt lerontja az egyidejűleg alkalmazott

lumacaftor korrektor hatását is (Cholon és mtsai., 2014, *Sci Transl Med* 6:246ra96; Veit és mtsai, 2014, *Sci Transl Med* 6:246ra97). Valószínűleg ez az "anti-korrektor" jelenség okozza az ivacaftor klinikai hatásának hiányát a  $\Delta F508$  mutációt hordozó CF betegekben.

**3/ Az ABC transzporterek közül az MDR és MRP család tagjai számos, élettani és orvosi terápiás szempontból is igen fontos szerepet játszanak. Működésük, az általuk katalizált transzportfolyamatok követésére csak sokkal kisebb időbeli felbontással van mód, mint ami az akár milliszekundumos tartományban vizsgálható egy-csatorna áramok esetében lehetséges. Érdekes felvetés, hogy a szerkezetileg rokon CFTR-en megismert törvényszerűségek esetleg modellként szolgálhatnak az MDR-MRP fehérjék működésének tisztázásához. Van-e a jelöltnek ismerete arról, hogy éltek-e már ezzel a lehetőséggel, tehát modellként való alkalmazásról, ill. azon alapuló eredményről/következtetésről számolt-e már be valaki?**

Az ABC fehérjék sokaságát vizsgáló csoportok általában odafigyelnek egymás munkájára, és az egyes rendszerekben feltárt törvényszerűségek megtermékenyítőleg hatnak a többi rendszer vizsgálatára is. Ez a kommunikáció a CFTR és a többi ABC fehérje viszonylatában is kétirányú. A CFTR fehérje szerkezeti vizsgálata rendkívül nagy kihívás, és két évtized erőfeszítése ellenére sem ismerjük a csatorna nagyfelbontású térszerkezetét. Ezzel szemben több tucat ABC fehérje térszerkezetét sikerült már többféle konformációban is meghatározni: ezek a szerkezetek templátként szolgálnak a CFTR térszerkezetének modellezésére. Ugyanakkor, a CFTR-en végzett funkcionális kísérletek főleg az aszimmetrikus ABCC alcsalád működésének modellezését, értelmezését segíti. Például, a bakteriális Tm287/288 aszimmetrikus ABC exporter ATP-mentes, befelé nyitott konformációjú kristályszerkezetében (Hohl és mtsai., 2014, *PNAS* 111:11025-30) az inaktív 1-es kötőhely körül az NBD dimer érintkezési felületei csak részlegesen nyílnak szét, ami megfelel a CFTR-en végzett korábbi kísérleteink alapján felrajzolt képnek (Szöllősi és mtsai., *J Gen Physiol* 2011, 137:549-62; Csanády és mtsai, 2013, *J Gen Physiol* 142:61-73). A Tm287/288 aposzerkezet értelmezésekor a szerzők a mi csoportunk munkájára hivatkoztak.

Budapest, 2016. január 13.

Dr. Csanády László