

## Válaszok Dr. Varró András Professzor kérdéseire

Ezúton köszönöm Varró Professzor Úrnak, hogy elvállalta disszertációm bírálatát, valamint az értékelése során megfogalmazott elismerő szavakat. Kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

**1. A Bevezetésben a jelölt tárgyalta mind a CFTR mind a TRPM2 csatorna farmakológiai befolyásolhatóságának potenciális lehetőségeit. Milyen lehetőséget lát a jelölt saját kutatási eredményei hasznosításának az említett két csatorna modulátorainak terápiás célú gyógyszerfejlesztésében?**

A CFTR vonatkozásában jelenleg aktívan dolgozunk az NPPB szerkezetén alapuló, de a gyakorlatban is hasznosítható potenciátor molekulák fejlesztésén. Egy ilyen potenciátor, esetleg a már klinikai kipróbálás alatt álló lumacaftor korrekttal együtt alkalmazva, hatékonyabbá tehetné a cisztikus fibrózis  $\Delta F508$  mutáció okozta, leggyakoribb formájának jelenleg megoldatlan kezelését.

A TRPM2 csatornán elért eredményeink egyelőre csak nagyon általános, elvi iránymutatást adnak: miután a kapuzás itt egyensúlyi folyamat, gátlószerekként olyan vegyületek jöhetnek szóba, amelyek a csatorna csukott állapotához kötődnek nagyobb affinitással – a nyitott állapothoz erősebben kötődő vegyületek viszont aktivátorok lesznek. Specifikus célpontnak pedig elsősorban a csatorna NUDT9 doménje ígérkezik, hiszen ez az a domén amely egyetlen más ioncsatornában sem található meg. Egyelőre kifejezett antagonistá vegyületet nem ismerünk, de léteznek az ADPR-nak olyan parciális agonista analógjai (pl. 8-Br-ADPR, ill. 1,N<sup>6</sup>-eténoadenozin-5'-O-difoszfóribóz ( $\epsilon$ -ADPR)), amelyek maximális hatásere  $\epsilon$ -ADPR-hoz képest annyira kicsi, hogy az ADPR-zal szemben praktikusan kompetitív gátlószerekként viselkednek. Ezek affinitása azonban egyelőre túl gyenge ahhoz, hogy a gyakorlatban közvetlenül hasznosíthatók legyenek.

**2. A jelölt 30. oldalon leírja, hogy az oocytákat 82.5 mM Na Cl-ot 2mM KCl-ot tartalmazó oldatban tárolták 18 °C-on. Ez erősen hypozmotikusnak tűnik. Nem okozott-e ez problémát a tárolás során és milyen körülmények között történtek a két mikroelektrodás voltage clamp mérések?**

A kétéltűek sejtjeinek ozmolaritása 200-250 mOsmol/l, ez jóval alacsonyabb mint az emlős sejteké. A petesejtek emellett a természetben az állat testén kívül, tóvízben is hosszú ideig életképesek. Az általunk használt oldat tipikus békapetesejtek tárolására bevált oocyta Ringer oldat. A két mikroelektrodás mérések is ebben az oldatban történtek.

**3. A protein kináz A aktivátor IBMX-et és a cAMP aktivátor forskolint igen magasnak tűnő koncentrációban 1 mM és 50  $\mu$ M alkalmazták. Miért volt szükség ezekre a magas koncentrációkra?**

Ezek a vegyületek békapetesejtekben valóban csak az emlős sejteknél megszokott értékeknél lényegesen magasabb koncentrációban hatékonyak. Ennek hátterében valószínűleg a nagyobb sejtterület és az annak legalább felét kitevő szikanyag állhat, amelybe ezek a lipiddoldékony vegyületek beoldódnak. Ugyanezen okból kifolyólag e drogok kimosása is rendkívül lassú folyamat.

**4. A 45. oldal 15. ábráján inside out makro patch felvétel látható kb 20 pA-es áramamplitúdóval, a 76. oldal 34. ábráján pedig 100 pA-nél is nagyobb amplitúdóval. Ugyanakkor a 71. oldal 31. ábráján a single channel áram amplitúdója kb 0.5 pA, a 94. oldal 45. ábráján 2 pA, amely vélhetően mikro patch felvétel eredménye. Mikor és miért használt a jelölt makro és mikro patch elrendezést és mi volt a különbség a kétféle technika esetén patch pipetta végének átmérője között?**

A makroszkópos és egyedi-csatornás mérések egymást kiegészítő technikák. A makroszkópos áramokon mért paraméterek szórása sokkal kisebb, hiszen ezek több száz vagy ezer csatorna sztochasztikus viselkedésének átlagát képviselik. Ezen túlmenően, a makroszkópos áramok alkalmasak a kísérleti körülmények hirtelen megváltozására (pl. a membránpotenciál hirtelen

megváltozására, aktiváló vagy gátló ligand hirtelen alkalmazására vagy elvonására) adott válaszok időbeli lefutásának jellemzésére, az áramrelaxációkhoz illesztett exponenciális görbék sebességi állandóin keresztül. Ilyen módon lehetőség nyílik olyan folyamatok sebességeinek vizsgálatára is, amelyek egyedi csatornás mérésekkel nem, vagy csak nehezen megközelíthetők. Például, a TRPM2 csatornák záródási sebessége a nanomoláros  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációtartományban (36. B ábra, *nyitott körök*) nem vizsgálható egyedi csatornás steady-state mérésekkel, hiszen ilyen körülmények között a csatornák nem nyitnak ki. Másik példaként, a nem-hidrolizáló CFTR mutánsok záródási sebessége olyan lassú ( $\sim 0.03 \text{ s}^{-1}$ ), hogy egyedi csatornákat vizsgálva sok-tízperces mérésekben is csak néhány záródási eseményt lehetne regisztrálni. Ehelyett kézenfekvő és megbízható megoldás a makroszkópos áramok ATP elvonását követő relaxációinak illesztése (pl., 27. B, 28. E, vagy 32. A-B ábrák).

Az egyedi-csatornás mérések információtartalma természetesen sokkal gazdagabb: az ilyen áramregisztrátumokban elkülönítve vizsgálható az egyedi áramamplitúdók nagysága és a kapuzási paraméterek. Meghatározható a steady-state nyitvatartási valószínűség abszolút értéke, és mérhetővé válik a nyitott és zárt állapotban eltöltött intervallumok hossza, sőt azok eloszlása is. E paraméterek rendkívül sok információt hordoznak a kapuzás mechanizmusáról, és makroszkópos áramokból nem határozhatók meg. Ugyanakkor, az egyedi csatornák sztochasztikus viselkedése miatt egy adott paraméter pontos becsléséhez nagyszámú mérésre van szükség.

Mi lehetőség szerint minden tanulmányozott jelenséget mindkét módszerrel megvizsgáljuk. A patch-be kerülő csatornák számának befolyásolása érdekében pedig elsősorban nem a pipetta átmérőjét változtatjuk, hanem a petesejtekbe injektált RNS mennyiségét, az injektálás és a mérés között eltelt időt, illetve a petesejt felületén a patch-húzás helyének az injektálás helyéhez viszonyított távolságát: a csatornák felületi denzitása az RNS mennyiségének és az inkubációs idő hosszának növelésével növelhető, és az injektálás helyének közvetlen környezetében magasabb.

**5. A jelölt a 76. oldalon említi, hogy az TRPM2 méréseket oocytán zavarták az oocytákban jelenlevő endogén  $\text{Cl}^-$  csatornák, ezért  $\text{Cl}^-$  mentes Na-glukonát kádoldatot alkalmazott. Nem lehetett volna ezt a problémát olyan kísérlettel is kezelni, ahol a patch csak 1-2 ioncsatornát tartalmaz és a csatornák analízise a konductancia és a töltéshordozó alapján is szeparálható lett volna?**

A heterológ módon kifejezett TRPM2 csatornákkal ellentétben az endogén kloridcsatornák sejtfelszíni denzitását nem tudjuk befolyásolni. E csatornák egyedi áram amplitúdója olyan kicsi, hogy patch-clamp mérésekkel nem tudjuk azokat feloldani. Ennek ellenére egy kiszakított membrán foltban (-20) – (-80) mV membránpotenciálon tipikusan több 100 pA nagyságú endogén klorid áram aktiválható (ld. 34. ábra), azaz e csatornák denzitása óriási. Egy ilyen hatalmas háttéráram tetején  $\sim 1$  pA nagyságrendű egyedi TRPM2 csatorna eseményeket vizsgálni meglehetősen reménytelen vállalkozás volna.

**6. Az előző kérdéshez kapcsolódóan kérdezném, nem vetődött-e fel a „mammalian cell line” (CHC HEK) használata, amelyekbe tetszőleges mennyiségben lehetett volna expresszálni a CFTR és TRPM2 ioncsatornákat és ezeket mind whole-cell mind single-channel szinten vizsgálni lehetett volna?**

Ez a lehetőség természetesen felmerült. A békapetesejtet azonban számos előnye (mutánsok egyszerű létrehozása, több nagyságrendes tartományban változtatható sejtfelszíni csatorna denzitás, egyszerű kezelhetőség, stb.) nem véletlenül tette a biofizikusok egyik kedvelt rendszerévé. Mindamelllett tervezzük emlős sejt vonalak bevezetését is, különösen a TRPM2 csatorna hőmérséklet-érzékenysége vizsgálatára céljából, amire a békapetesejt rendszer nem alkalmas.

Budapest, 2016. január 13.

Dr. Csanády László