

Krenács Tibor - Válaszok Röhlich Pál professzor úrnak.

Köszönöm Professzor Úr alapos bírálatát és kérdéseit, melyekre említésük sorrendjében válaszolok!

1. **Rövidítéslista.** A szövegben igyekeztem, ahol csak lehet elkerülni a felesleges rövidítések használatát és ahol megfelelő magyar változat létezett egy szakzsargonra, azt preferálni. A rövidítéslista hiányát két bíráló is felvetette, ami tanulságos a későbbiekre, nagyobb lélegzetű munkák készítésénél mindenképpen megfogadom.

2. **Képdokumentáció.** A téma, illetve a vizsgált objektumok szerteágazó mivolta miatt nagyon sok, 43 darab, többszörösen összetett ábra szerepel a disszertációban. Ezért a gondolatilag összetartozó ábra részeket nem bontottam meg. Ahol szükséges volt igyekeztem kihasználni az oldal maximális szélességét az ábrák javára, de el kell ismernem, hogy a nyomtatás még nagy odafigyelés mellett is rontott néhány ábra minőségén. Mivel rendelkezésre állt a jó minőségű digitális, tovább nagyítható verzió is, úgy gondoltam kritikus esetekben ezek ellenőrzése jól támogatja a leírtakat.

3. **A nexusok hozzárendelése sejtekhez.** A kimutatott connexin pakkok (nexusok) sejtípusokhoz történő hozzárendelésének vannak korlátai. Azonban arra törekedtem, hogy az azonosítással *in situ* szöveti szinten próbálkozzak, illetve esetenként primeren izolált sejtekben is (pl. FDC és B-sejtek, myoblastok, csontvelői stromasejtek, GCTB stromasejtek esetében). Az immunfluoreszcens jelölés vizsgálata konfokális lézerpásztázó mikroszkópiával a legtöbb esetben megfelelő felbontással segített ebben. Egyetértek azonban professzor úrral abban, hogy a párhuzamos DIC felvétel, amivel néhányszor éltem is, további támogatást adott volna kritikus esetekben. Természetesen még a konfokális mikroszkópia felbontása mellett is előfordulhat, hogy egy vékony sejtnyúlvány nyomul két szomszédos sejt közé és az hordozza csupán a connexin csatornákat, amit szintén nehéz bizonyítani még ultrastrukturálisan is. Azonban nagyszámú mintán és az előfordulás gyakoriságát is figyelembe véve vontam le a végső következtetéseimet.

4. **Mi lehet a connexin (árva) félcsatornák élettani funkciója, idevonatkozó újabb adatok és a Ca^{2+} szerepe a connexon funkcióiban?** Számos esetben megfigyeltünk mi is szomszédos sejt-partner nélküli csatornákat. Felfedezésünk nagy figyelem fordult a connexin félcsatornák felé, hiszen korábban kizártnak tartották az "árva"csatornák működését. Az egyik legjobban vizsgált terület az ATP felszabadulása a félcsatornákon keresztül, mely szomszédos nem érintkező sejtek purinerg receptorain kötődve intracelluláris Ca^{2+} szigált indít el. Ezzel a mechanizmussal a félcsatornák Ca^{2+} hullámokat képesek propagálni, például astrocyták között (Guthrie és mtsai, J Neurosci. 1999, 19:520-528). Hasonló mechanizmussal, Ca^{2+} és ATP felszabadulása révén aktiválják fagocytákban az inflammasomákat, támogatva a proinflammatorikus választ és a szövetpusztulást, ami gátolható félcsatorna blokkolókkal (Becker és mtsai, Semin Cell Dev Biol. 2016, 50:49-58). További félcsatornákon ható terápiás lehetőség, például, hogy az osteoporosis gátló bisfoszfonát (alendronát) kezelés a Cx43 félcsatornák nyitásával az osteoclastok apoptózisát, míg osteocytákban a Scr és a MAPK jelutak aktiválásán keresztül utóbbiak túlélését támogatja (Plotkin és Bellido, Cell Commun Adhes. 2001, 8:377-382). Izgalmas új terület, például, hogy trauma, gyulladás és/vagy ischemia hatására az érendothel félcsatornái kinyílnak, ami fokozott átteresztőképességükben és pusztulásukban játszik szerepet. Retina ischemia-reperfúziós modellben igazolták, hogy intraperitoneális félcsatorna blokkoló (peptid5) adását követően a retina ganglionok és endothel pusztulása, valamint az erek átjárhatósága szignifikánsan csökkent (Danesh-Meyer és mtsai, Brain. 2012, 135:506–520), vagyis a félcsatorna blokkolás neuroprotektív hatású. A Ca^{2+} szint változásának összetett szerepe lehet az izomdifferenciálódás során, aminek szabályozásában a félcsatornák is részt vehetnek, mint az részletesen tárgyaltam az adott fejezetben. A változó Ca^{2+} szintnek szerepe lehet a myoblastok vándorlásában, differenciálódásban és közvetlenül fúzió előtt a sorbarendeződött myoblastokban a megemlekedett Ca^{2+} szint a csatornák zárásával valószínűleg részt vesz a membránfúzió inicializálásában is (David és mtsai, Dev Biol. 1981; 82:297-307).

5. A connexinek finomabb, sejtes lokalizációja. A digitalis változatban pontosabban látszik az említett 5d ábrán a connexin reakció granuláris jellege. A lép tok alatti stromában olyan nagy mennyiségben expresszáldott, hogy valóban a cytoplazmát is kitölti az elnyújtott stromasejtekben, de a kapilláris endothelben és adipocytákban pontszerű és elsősorban a nyúlványok között látszik (sajnos a printen kevésbé). A 23c kettősen jelölt ábrán, korai izomregenerációban a nagymennyiségű desmin zöld színe alatt valóban nehezen látszik, de pontszerű a piros Cx43 fluoreszcencia, ezért önálló csatornaként is szerencsés lett volna betennem. Utóbbi esetben azonban figyelembe kell venni, hogy még 3 napos regenerációban is, bár megindul a myoblast fúzió, nagyon erőteljes gyulladás és jelentős szövettörmelék, némi ödéma is jelen van, ami nem teszi egyszerűvé a metszetkészítést és a struktúra tanulmányozását. Ugyanakkor a connexinek csatornafüggetlen funkcióiról is egyre több irodalom érhető el, tehát cytoplazmatikus lokalizáció is releváns lehet (Laird, 2010, 20:92-101).

6. Több sejttípus összekapcsolása egy szövetben azonos típusú csatornákkal. Csontvelőben és nyirokszervekben, de más szövetekben is előfordul, hogy egy izotípusú connexin csatornái többféle sejttípusban fellelhetők. A Cx43 például a legszélesebb körben elterjedt, legősibb izotípus. A szöveti szintű szabályozás terén pontos adatokkal, a komplexitás miatt nem rendelkezünk, de néhány összefüggés felvethető. Például csontvelőben a csontvelői stroma-, zsírsejtek, osteoblastok és osteocyták azonos típusú (Cx43) csatornáinak az összefüggő stromális-szkeletális váz funkciójának összehangolásában lehet szerepe. Például az adipocytákat összekapcsoló connexin csatornák akut vérképzési igény (vérvesztés) esetén nagy valószínűséggel segítik a zsírsejtek visszalakulását funkcionálisan kapcsolt aktív vérképző stromává. A connexin csatornák mind humorális, mind mechanikus adaptációs ingereket (és tápanyag átadást) közvetítenek az osteocyt-osteoblast hálózatban, ami funkcionálisan kapcsolt a vérképző stromához, így annak működésére is befolyással lehet. Az endothel sejteket a stromasejt hálózattól bazális membrán szigeteli el. A vérképző sejtekben megfigyelt csatornák pedig funkcionálhatnak félcsatornaként is. Az is valószínűsíthető, hogy az adott sejthálózat működését a közvetlen mikrokörnyezete (citokinek, növekedési faktorok, integrinek és matrix) is jelentősen befolyásolja (magát a connexin expressziót is), ami a sejthálózatban csak bizonyos távolságon belül tud érvényesülni. Továbbá, valószínűleg a connexin csatornák száma is korlátozó tényező, néhol bár jelen vannak, de nem elegendő számban ahhoz, hogy bizonyos "ingereket", faktorokat megfelelő hatékonysággal közvetítsenek. Az összekapcsolás és szétválás, hálózatba rendeződött sejteknél leginkább csak a pusztuló, károsodott sejtek leválásával és újonnan képződők csatlakozásával elképzelhető.

Válasz a megjegyzésekre

Connexinokkal összekapcsolt sejtek megemlítése. Itt kellő óvatossággal jártunk el. Ahol szolid szövetekben (pl. emlő luminális hám, illetve myoepithel réteg) szorosan egymással érintkező sejthalmazokban láttunk kompatibilis connexin csatornákat ott feltételeztük a funkcionális kapcsolatukat is, akár például a kétféle típusú emlőhám sejtek közötti kommunikációban. Másutt igyekeztünk a kapcsolatot funkcionálisan is bizonyítani, mint a csontvelői stromasejtek kapcsolatát egymással, illetve, vérképző sejtekkel, vagy az FDC-hálózaton belül, illetve FDC és B-sejtek között. Ha nem volt fizikális kapcsolat a két kompatibilis connexin izotípust expresszáló sejttípus között, akkor csak a potenciális lehetőségét vetettük fel a kommunikációnak, például a sejtek migrációja kapcsán.

A nexus plakkban foglalt, rendezett csatornák mennyisége (**a plakk mérete**) arányos a direkt kommunikáció hatékonyságával. Az ultrastrukturálisan mért connexin (gap junction) plakkok és a lézer pásztázó mikroszkóppal mért plakk (különálló jel) átmérők egymáshoz validálását egy 1993-as, Green és mtsai (J Histochem Cytochem. 1993, 41:1339-1349) elvégezték. Természetesen a konfokális mikroszkóp optikája és a fluoreszcens jel intenzitása (az expozíció függvényében) befolyásolja a különálló connexin immunjelek (gap junction) méretét, mégis egy relatív összevetésre és a méreteloszlás becslésére a módszer alkalmas. Nagy különbségek lehetnek a plakk méretében

sejttípustól függően. Például, működő myocardiumban akár néhány μm átmérőjű Cx43 gap junction csatorna aggregátumok is közvetítik az akciós potenciált, míg az ingerképző csomókban és a His-köteg ágaiban Cx45 csatorna aggregátumai kisebbek, mint $0,5 \mu\text{m}$.

A fagyasztva töréses elektronmikroszkópos ábrán több minta elemzésével feltételeztük, hogy a desmosomát és gap junction plakkot tartalmazó elnyújtott (lapos), egyértelműen follikuláris dendritikus sejtekkel (FDC) érintkező gömbölyű sejtek lymphocyták, persze lehetnek akár T-sejt is, de sokkal gyakoribb a csíracentumban a B-sejt. Utóbbival történő funkcionális kommunikációt sikerült is bizonyítanunk. Továbbá, az FDC sejtek szövetben, akár immunjelölve, akár elektronmikroszkópos megjelenésükben (továbbá pásztázó elektronmikroszkópos mintáink is voltak) soha nem mutattak ilyen gömbölyű formát.

Hogyan lehet a corneát szűrőpapírral eltávolítani?

A stroma lézeres korrekciójához (PRK) a cornea hámot el kell távolítani, mert eltérő ablációs tulajdonságú. Anaesthesia mellett a nyúl corneák kezelési célzóját egy kör alakú optikai marker késsel kijelölték. Ezen a területen belül alkalmazott alkohol fellazítja a hám-bazális membrán kapcsolatot a lamina lucida mentén, ami miatt az érintett hám egy mechanikus eszközzel, pl. alkoholos szűrőpapírral, könnyen eltávolítható.

A Cx43 ($\alpha 1$) és a Cx26 ($\beta 2$) connexinek egymással nem kompatibilisek, nem formálnak vegyes csatornákat, metabolit áteresztő képességük pedig jelentősen eltér, ezért vethető fel, hogy alternatív, de minimum nem egyenrangú és részben párhuzamos szabályozási lehetőségeket kínálnak, összekapcsolt sejthálózatokban, így például a cornea hámban. Szelektivitásukra jellemző, hogy a Cx26 csatornák alacsonyabb Ca^{2+} koncentrációnál zárnak, mint a Cx43 csatornák ($0,5$ vs. $1,8 \text{ mmol/l}$) (Muller és mtsai, EMBO J. 2002. 21:3598-3607). Továbbá, a Cx43 csatornák c-AMP permeabilitása 7-10x nagyobb, mint a Cx26 csatornáké, ami valószínűsíti, hogy hatékonyabban közlelik a Cx43 csatornákon, nagyobb eséllyel elkerülve a foszfodiészteráz hasítás általi inaktiválást még a donorsejtben (Kanaporis és mtsai, J Gen Physiol. 2008, 131:293-305).

111. old. A túlélés természetesen a betegre vonatkozik. Pontosítva: „A Cx43 expresszió hozzájárulhat ER pozitív emlőkarcinómák differenciáltabb fenotípusához és a betegek kedvezőbb túléléséhez”.

A connexinek és csatornák tumor promotor ill. tumor szuppresszor szerepének említése ma már az adott kontextusban betöltött szerep alapján bevett gyakorlat. Például, „Grek és mtsai.: Connexin 43, breast cancer tumor suppressor: Missed connections? Cancer Lett. 2016, 374:117-126”. Maguk a connexin fehérje izotípusok specifikus molekuláris interakcióikkal (az un. gap junction proteom közel 50 tagot számlál), illetve a formált gap junction csatornák kommunikációs funkcióival összefüggésben is játszhatnak ilyen, van olyan szerepet. Például, a tumor diapidezis kapcsán a tumorsejt és endothelsejt között bizonyított direkt sejt-sejt kommunikáció támogatja a tumorsejt túlélését és metasztatikus invázióját, ilyen értelemben tumor promotor. Fordítva, például a glioblastoma sejtek, melyek a transzformációval elvesztették kommunikációs képességüket, Cx43 géntaszfekció után a tumorsejt proliferáció szignifikáns csökkenését mutatják differenciáltabb fenotípussal, ami miatt ilyenkor a Cx43 fehérje jelenléte, illetve belőle formált csatornák működése tumor szuppresszor hatással párosulnak. Természetesen a végeredmény (hatás) pontos molekuláris mechanizmusa az adott kontextusban további tisztázásra szorul.

Még egyszer, köszönöm Röchlich Professzor Úr munkámra adott bírálatát!

Budapest, 2016. augusztus 29.

Tisztelettel:

Dr. Krenács Tibor