

Válasz Prof. Jost Norbert bírálataira

Tisztelt Professor Úr!

Először is szeretném megköszönni Professor Úr baráti hangvételi bírálatát és a munkánkat méltató szavakat. Azzal a formai megjegyzéssel egyet kell értenem, hogy szerencsés lett volna a csatolt különlenyomatok oldalszámozása és táblázatba foglalása. Valamint igaza van a Tisztelt Bírálónak, hogy a disszertációban az adott helyen ki kellett volna emelnem, hogy éppen melyik csatolt cikkről beszélek. Azt hittem, hogy elegendő lesz az első szerző szerint megadott referencia, amit az egyes bekezdések elején vagy végén helyeztem el. Sajnálom, hogy ezzel megnehezítettem az olvasó tájékozódását a csatolt közlemények között.

A további kérdésekre a számozásuk sorrendjében adom meg a válaszaimat.

1. A különböző RyR izoformák jelentősen befolyásolják az egyes speciosekben a sparkok kialakulását és alakját vázizomban. Ennek nagyon széles szakirodalma van, ezért itt most csak röviden az általunk használt három állatmodell összehasonlítására vállalkozom.

Kezdem az időrendben először használt kétéltű (béka) vázizomban előforduló rianodin receptorok szerepének bemutatásával. A békában két fő rianodin receptor izoforma van jelen: RyR α , amely funkcionálisan az emlős RyR1 megfelelője, és a RyR β amely az emlős RyR3 megfelelője. A békákban tehát ezek egyidejű expressziója figyelhető meg ugyanabban az izomrostban. A β izoforma párhozamos jelenlétével magyarázzák, a kétéltű vázizomban a nagy mennyiségű és relatívan magas amplitúdójú sparkok megjelenését. Ennek hátterében a kalcium indukált kalciumfelszabadulás (CICR) jelensége állhat, amely a RyR β csatornákon keresztül indíthatja el a kalciumkiáramlást a szarkoplazmatikus retikulumból és a másik izoformával együtt alakítja ki a relatíve nagy sparkokat. A β izoforma farmakológiai befolyásolásával bizonyították, hogy ezek a kalciumcsatornák jelentősen meghatározzák a sparkok számát és nagyságát (Kashiyama és mtsai., 2010. Plos One, 5:e11526).

Felnőtt emlős vázizomban a RyR1 izoforma a domináns és a RyR3 csak néhány speciális izomban található meg (diafragma, külső szemmozgató izom). Ezért is van az, hogy az egészséges emlős vázizmon alig jelennek meg sparkok és azok amplitúdója is kisebb, mint a kétéltűeken mértéké. A RyR3 izoforma fontosságát a sparkok kialakításában felnőtt emlős vázizmon a csatorna overexpressziójával mutatták ki (Pouvreau és mtsai., 2007. PNAS, 104:5235-5240).

Házi méhek vázizmában csak egy rianodin receptor izoforma található meg. Azonban itt nincs meg az emlős-típusú mechanikai csatolás a dihidropiridin és rianodin receptorok között, hanem a Ca²⁺-függő aktiváció dominál. Ezért bár a sparkok száma így nagyobb az emlősökön találtaknál, de amplitúdójuk összevethető azokkal (Collet és mtsai., 2021. Scientific Reports, 11:16731).

2. A felszíni membrán kémiai eltávolítása („skinning”) klasszikus módszer a Ca²⁺-sparkok mechanizmusának vizsgálatában, különösen vázizomban. A

leggyakrabban használt eljárás a szaponinos vagy detergenses permeabilizálás.

A cél az, hogy kontrollálható legyen az intracelluláris $[Ca^{2+}]$, beállítható legyen az SR Ca^{2+} -tartalma, manipulálható legyen az $[ATP]$, $[Mg^{2+}]$, pH, és közvetlenül vizsgálható legyen a rianodin receptor működése. Így a sparkok csak az SR–RyR rendszer belső tulajdonságait tükrözik, nem a felszíni membránon keresztüli jelátvitelt. A permeabilizálás a szarkolemmát átjárhatóvá teszi, eltávolítja a citoszol oldható komponenseinek nagy részét, de az SR membrán és a triád szerkezet intakt marad. Így az SR funkcionális marad, a RyR klaszter architektúra is megmarad, de a DHPR szabályozó funkciója kiesik. Ezért permeabilizált rostban a spark kizárólag lokális RyR nyitási esemény (CICR-alapú). Permeabilizált rostban magasabb a spontán spark frekvencia, SR töltöttségtől erősen függ az amplitúdó, és néha hosszabb az időtartamuk. Ez különösen jól látszik emlős vázizomban, ahol az intakt rostban kevés spark figyelhető meg. Ezért kritikusan kell kezelni az intakt és permeabilizált izomrostok elemi kalciumfelszabadulási eseményeinek összehasonlítását.

3. A kérdés megválaszolása nagyon hosszú lenne, ha minden specieszt tárgyalnék, ezért csak az emlős izmokra adom meg a választ. A sparkok kialakulása és befejeződése több, egymással párhuzamos futó folyamat eredője. Kezdem a kialakulásukkal. Emlős vázizomban, ahol a domináns izoforma a RyR1, a DHPR–RyR1 mechanikai csatolás kontrollálja a sparkok kialakulását és kevésbé jellemző a spontán esemény. Vagyis főleg membrándepolarizáció hatására alakul ki spark. Szívizomban ahol a domináns izoforma RyR2, az akciós potenciál megnyitja a DHPR-t és direkt csatorna kapcsolat hiányában a lokális Ca^{2+} -beáramlás Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulás (CICR) által egy RyR klaszter aktiválódásával alakítja ki a sparkokat. A CICR azonban depolarizáció nélkül is kialakíthat sparkot, ezért látható szívizomsejteken gyakrabban elemi kalciumfelszabadulás. Olyan vázizomban, ahol RyR3 is jelen van az elsődleges aktiváció mechanikai hatásra vagy spontán RyR1 nyitásra történhet és a másodlagos CICR ezt erősíti fel a RyR3 által.

A sparkok befejeződése még komplexebb folyamat, de kevésbé sejt típus függő. Jelenleg négy lehetséges mechanizmus elfogadott a sparkok befejeződése során.

- a. Lokális SR Ca^{2+} depléció („induction decay”). Ilyenkor a RyR klaszter körüli SR lumen gyorsan kiürül, csökken a Ca^{2+} kiáramlás hajtóereje, ami a RyR nyitási valószínűség eséséhez vezet. Ezt tekintik az egyik legfontosabb mechanizmusnak.
- b. RyR inaktiváció/refrakter állapot. Ez a csatorna jól ismert Ca^{2+} -függő inaktivációja, ami az SR-ből kiáramló Ca^{2+} által valósul meg és konformáció változás általi bezáródáshoz vezet.
- c. Sztohasztikus attríció. Ha néhány RyR véletlenszerűen bezár az a lokális Ca^{2+} -szint hirtelen eséséhez vezet. Így a pozitív visszacsatolás megszakad és a RyR klaszter „kialszik”.

- d. Ca^{2+} eltávolítási mechanizmusok. A folyamatosan működő diffúzió, SERCA pumpa és citoszolikus pufferek képesek csökkenteni lokálisan a kalciumkoncentrációt, ami szintén a spark lecsengését fogja okozni.
4. Nem lehet általánosan kijelenteni, hogy izombetegségekben nő a sparkok száma. Helyesebb megfogalmazás az, hogy számos olyan izombetegségben, amely a RyR kontrollvesztésével és fokozott SR Ca^{2+} csorgással jár, nő a spontán spark frekvencia. Ez azonban nem univerzális jelenség, és függ az SR Ca^{2+} töltöttségétől, a RyR állapotától és a strukturális integritásától. A sparkok diagnosztikai vizsgálatára nézve egyetlen felhasználásról sem tudok vázizom esetében. Terápiás célként szívből a RyR2, vázizomban pedig a RyR1 jöhet szóba. Szívből a kóros diasztolés SR Ca^{2+} csorgás csökkentése, vázizomban pedig a RyR1 stabilizálása lehet a cél, ami a túlzott spark aktivitás mérsékléséhez vezet. Számos olyan készítményt fejlesztettek már ki ezeknek a klinikai tüneteknek a kiküszöbölésére, aminek „mellékhatásaként” csökkent a sparkok száma a kezelt izomszövetben (pl. a következő kérdésre adott válasz vázizom esetére).
5. Számos toxin, gyógyszer és természetes eredetű vegyület hatását vizsgálták rajtunk kívül is a kalcium-sparkokra és a rianodin-receptor működésére vázizomban. Ezek a hatóanyagok nemcsak a RyR csatorna nyitási valószínűségét vagy kinetikáját változtatják meg, hanem közvetlenül befolyásolhatják a sparkok számát, morfológiáját és dinamikáját is. A teljesség igénye nélkül az alábbiakat sorolom most fel.
- a. Skorpió „Calcin” toxinok. A Calcin család peptidjei (pl. hadrucalcin, vejocalcin, az általunk is használt maurocalcin) a RyR-hez kötődnek és módosítják a csatorna kapuzását. A csatornához kötődve stimulálják a Ca^{2+} -felszabadulást az SR-ből, hosszabb nyitott állapotba kényszerítve a RyR-t. Ez növelheti a spontán Ca^{2+} -sparkok gyakoriságát vagy hosszabb, abnormális Ca^{2+} jeleket okozhat (Ward és mtsai., 2020. Biochemical Journal, 477:3985-3999).
- b. Imperatoxin A (IpTx_a) egy másik skorpió toxin, amit vizsgáltak RyR modulátorként. Alacsony koncentrációban szub-konduktanciás nyitást okoz, ami kisebb, hosszán tartó Ca^{2+} felszabadulásként jelenik meg a sparkok helyett, ezzel megváltoztatja a Ca^{2+} jel morfológiáját (Gonzalez és mtsai., 2000. PNAS, 97:4380-4385).
- c. Dantrolén és analógja, az azumolén specifikus RyR1 gátló hatású. Kutatásokban mindkettő csökkentette a spontán Ca^{2+} -sparkok gyakoriságát permeabilizált békavázizomban, anélkül hogy alapvetően megváltoztatta volna a morfológiájukat (Zhang és mtsai., 2005 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 314:94-102). Ez a hatás klinikailag fontos, mert a dantrolén a malignus hipertermia kezelésére szolgál, ahol a RyR1 mutációja túlzott Ca^{2+} -felszabadulást okoz.
- d. Xantin (pl. koffein) származékok a RyR-t aktiválják és fokozzák a Ca^{2+} -felszabadulást. Ezek az „RyR aktivátorok” már klasszikusan is szerepeltek a spark kutatásban (Shirokova és mtsai., 1998. Journal of Physiology, 512:377-384). Mi is használtuk a koffeint egyes

méréseinkben (Cserne-Szappanos és mtsai., 2020, Frontiers in Physiology, 11:599822).

- e. Bizonyos természetes fenolok (pl. az általunk is használt timol, karvakrol) hatással vannak az SR Ca²⁺-ATPázra és a RyR-ra is (Szentandrassy és mtsai., 2004. Life Science, 74:909-921; Szentesi és mtsai., 2004. Biophysical Journal, 86:1436–1453).

Még egyszer köszönöm a feltett kérdéseket és a dolgozatom bírálatát!

Debrecen, 2026. február 23.

Tisztelettel,



Dr. Szentesi Péter

jelölt