

Válasz Prof. Várnai Péter bírálataira

Tisztelt Professor Úr!

Először is szeretném megköszönni Professor Úr építő jellegű bírálatát. Először a disszertációm formájára vonatkozó kritikáira válaszolok.

A Bíráló által megadott számok helyesek: a csatolt 17 közleményből 4 db utolsó szerzős és 3 első szerzős (ebből 1 cikkben vagyok megosztott első szerző). Ha csak Ezekre építettem volna a dolgozatomat, akkor nem tudtam volna bemutatni, hogy milyen szerteágazó, mégis az elemi kalciumfelszabadulási események által koherens kutatói munkát végeztem az elmúlt 25 évben. Ha áttekintem az összes felhasznált közleményt, akkor 3 db van közöttük, amely tisztán a sparkokról szól (Szabó 2010; Collet, 2021; Cserné-Szapannos, 2020). Ezek mindegyikében utolsó szerző vagyok. Egy metodikai fejlesztésről szóló közleményben első szerző vagyok (Szentesi, 1997). Az összes többi közleményben pedig én végeztem kollégáimmal az elemi események mérését és/vagy analizisét. Ez nagyrészt szerepel a közlemények Szerzői részvétel (Author contributions) részében.

Két tényre szeretném felhívni a tisztelt Bíráló figyelmét. A vázizom kutatásban ritka az olyan közlemény, amely egy metodikát használ a megválaszolandó kérdés felderítésére. Így mi is kiegészítettük a spark méréseinket számos más mérési módszerrel, mint például elektrofiziológiai, molekuláris biológiai és néhány esetben *in vivo* mérésekkel is. Ez egy összehangolt kutatói csoport munkáját követeli meg, amelyben általában az egyes mérések párhuzamosan folytak ugyan azon az állatból származó izommintákon. Így fizikailag is lehetetlen volt részt venni minden mérésben.

Továbbá a 2010-es évek közepére közleményeinkkel kivívtuk magunknak azt a rangot, hogy Európában elismert szakértői lettünk az elemi kalciumfelszabadulási események mérésében és analizálásában. Ezért történhetett meg az, hogy külföldi kollaborációs partnereink hozzánk fordultak az általuk megmért mikroszkópos képek elemzése érdekében (Kutchukian 2017; Kutchukian 2019). Valamint olyan úttörő jellegű metodika kidolgozásában kértek segítséget, mint a házi méhek harántcsíktolt izomrostjain történő spark mérések (Collet 2021).

Azzal a formai megjegyzéssel egyet kell viszont értenem, hogy a disszertációban az adott helyen ki kellett volna emelnem, hogy éppen melyik csatolt cikkről beszélek. Azt hittem, hogy elegendő 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. Bizonyítandó, hogy az összes csatolt közlemény szerepel a disszertációban, az alábbi táblázatban összefoglaltam, hogy melyik fejezetben és oldalon utaltam a cikkekre. A táblázatban a cikkek sorrendje megegyezik a csatolt kéziratok sorrendjével (az első szerző vezeték neve szerinti ABC sorrend).

Közlemény első szerzője, megjelenés éve	Szerzőségem helye, közreműködésem a cikkben*	Megemlítés fejezete(i), oldalszáma(i)
Almássy, 2008	társszerző	6.2.4 A benzotiazepin származék K-201 hatása az ECRE-kre, 47. oldal
Bodnár, 2014	utolsó szerző; mérés, analízálás	6.1.3 ECRE-k egerek harántcsíkt izmain, 35. oldal; 6.4.2 ECRE-k a természetes mutációval kialakult hipermuszkuláris egerek harántcsíkt izomrostjaiban, 58. oldal
Collet, 2021	utolsó szerző; metodikai fejlesztés, mérés, analízálás	5.1 Vázizomrostok izolálása fluoreszcens kalciumindikátorral végzett konfokális lézerpásztázó mikroszkópos mérések számára, 23. oldal; 6.1.4 ECRE-k házi méhek harántcsíkt izmain, 36. oldal
Cserné-Szapannos, 2020	utolsó szerző; metodikai fejlesztés, analízálás	5.1 Vázizomrostok izolálása fluoreszcens kalciumindikátorral végzett konfokális lézerpásztázó mikroszkópos mérések számára, 23. oldal; 6.2.1 Depolarizáció és koffein hatása béka harántcsíkt izmon, 40. oldal
Fodor, 2008	társszerző	5.1 Vázizomrostok izolálása fluoreszcens kalciumindikátorral végzett konfokális lézerpásztázó mikroszkópos mérések számára, 23. oldal; 6.4.1 A Triadin fehérje szintjének hatása az ECRE-kre tenyésztett harántcsíkt izomsejtektben, 56. oldal
González Rodríguez, 2013	társszerző	6.2.6 A foszfatidilinozitol foszfát hatása az ECRE-kre, 51. oldal
Kutchukian, 2017	társszerző, analízálás	6.4.5 ECRE-k harántcsíkt izomrostokban a centronukleáris miopátia egérmodelljében, 68. oldal
Kutchukian, 2019	társszerző, analízálás	6.4.4 ECRE-k harántcsíkt izomrostokban a miotubuláris miopátia egérmodellben, 63. oldal
Lukács, 2008	társszerző	6.2.5 Egy skorpió toxin hatása az ECRE-kre, 48. oldal
Pierantozzi, 2019	megosztott első szerző, mérés, analízálás	6.4.6 Az Ankirin1 fehérje szintjének hatása az ECRE-kre egér harántcsíkt izomrosjaiban, 68. oldal
Sultana, 2016	társszerző, mérés, analízálás	6.4.3 Az embrionális DHPR jelenlétének hatása az ECRE-kre egerek harántcsíkt izomrostjaiban, 61. oldal
Szabó, 2010	utolsó szerző	5.3.1 A stationary wavelet transzformáció, 26. oldal; 5.3.2 Az egydimenziós (line-scan) képek elemzése, 29. oldal

Szentesi, 1997	első szerző	5.1 Vázizomrostok izolálása fluoreszcens kalciumindikátorral végzett konfokális lézerpásztázó mikroszkópos mérések számára, 23. oldal 6.1.1 ECRE-k patkányok harántcsíkolt izmon, 32. oldal
Szentesi, 2004	első szerző	5.1 Vázizomrostok izolálása fluoreszcens kalciumindikátorral végzett konfokális lézerpásztázó mikroszkópos mérések számára, 23. oldal
Szigeti, 2007	társszerző	5.1 Vázizomrostok izolálása fluoreszcens kalciumindikátorral végzett konfokális lézerpásztázó mikroszkópos mérések számára, 23. oldal; 6.3.1 ECRE-k szívinfarktuson átesett patkányok harántcsíkolt izmain, 52. oldal
Sztretye, 2009	társszerző	5.1 Vázizomrostok izolálása fluoreszcens kalciumindikátorral végzett konfokális lézerpásztázó mikroszkópos mérések számára, 23. oldal; 6.1.2 ECRE-k békák harántcsíkolt izmain, 33. oldal 6.2.2 A nehézfém-ion kelátor TPEN hatása az ECRE-kre, 43. oldal
Vincze, 2015	társszerző	6.3.2 ECRE-k hiperkoleszterinémias patkányok harántcsíkolt izmain, 53. oldal

*A közreműködés fajtája csak abban az esetben van feltüntetve, ha az a közleményben is megadásra került.

A Bíráló kifogásolta, hogy a Bevezetésben a sparkokat nagy amplitúdójú eseménynek írtam le, majd később a mérésük során nehezen megtalálható kis amplitúdójúnak neveztem őket. Ez valóban ellentmondásnak látszik és sajnálom, hogy nem fogalmaztam világosan. A spark nagy amplitúdójú az emberhez viszonyítva. Azonban kis amplitúdójú a teljes sejtes kalcium tranziensekhez hasonlítva.

Egyet kell értenem a Bírálóval, hogy a 16. oldal utolsó bekezdésében elfért volna legalább 3 db referencia. A depolarizációval kiváltott sparkokra béka harántcsíkolt izmon a Klein és mtsai. 1997. PNAS 94:11061-11066, a szívizom sejteken Cheng és mtsai. 1993. Science 262:740-744, és emberek megjelenésére depolarizált intakt emlős vázizomrostokra a Csernoch és mtsai. 2004. J Physiol 557:43-58 lett volna az ide illő referencia.

A Bírálónak teljes mértékben igaza van, hogy az elemi események időbeli hosszát (duration) pontatlan módon csak hosszként említem a disszertációban. Valóban megfelelőbb lett volna az időtartam vagy időbeli hossz megnevezés erre a paraméterre.

A további kérdésekre a számozásuk sorrendjében adom meg a válaszaimat.

1. Az MTM1-funkcióvesztés és az inozitol-lipid szintek változása okozhat vázizom-problémát akkor is, ha akut lipid-hozzáadás nem változtatja meg az elemi Ca^{2+} -jelet, mert a betegség mechanizmusa valószínűleg lokális, krónikus, strukturális és membránon keresztüli ion forgalom zavarokon keresztül valósul meg, nem pedig egy egyszerű, közvetlen Ca^{2+} -jel-amplitúdó csökkenésben. Az, hogy a külsőleg hozzáadott PtdIns3P vagy PtdIns(3,5)P₂ nem okoz különbséget az elemi Ca^{2+} -jelben, egy akut, globális manipuláció eredménye. Ezzel szemben az MTM1 hiánya egy krónikus állapot, ami specifikus intracelluláris kompartmentekben változtatja meg a lipidszinteket és strukturális hatásokat is kivált. A vázizomban a Ca^{2+} -jel nemcsak az aktuális lipidkoncentrációtól függ, hanem a T-tubulus rendszer, a triád struktúra és a membránarchitektúra épségétől is. Ezek a hosszú távú lipideltolódásra érzékenyek. Amint azt a disszertáció 33D. ábráján bemutattam, az MTM1 hiányos egér vázizomrostjaiban jelentős T-tubulus degradációt találtunk. Ez önmagában is súlyos funkcióvesztést okoz a vázizomrost működésében, mivel romlik az elektromos jelek rostba jutása aktivációkor. Illetve nyugalomban nincs meg a DHPR rianodin receptort kontrolláló szerepe, ami az SR kalciumtartalmának csökkenéséhez vezethet a csurgó RyR-ek keresztül. Mindkettő eredménye külön-külön is csökkent kalciumfelszabadulást, ami romló izomösszehúzódást eredményez.
2. Az ellentmondás úgy oldható fel, hogy az MTM1-hiány hatása krónikus, strukturális és mikrodomáin-specifikus lipid-diszreguláció, míg az exogén lipid-hozzáadás akut, globális és nem fiziológiás beavatkozás. Ezért a Ca^{2+} spark frekvenciára gyakorolt hatás iránya eltérhet. Vagyis a MTM1 genetikai hiánya nem modellezhető egyszerű lipid-hozzáadással. A betegség mechanizmusa komplexebb, mint egyetlen lipid közvetlen hatása a RyR1-re.
3. A legkézenfekvőbb magyarázat az, hogy a két egérmodellnek eltér a vad típusú háttere. Az Mtm1-KO egerek 129PAS állatokból lettek kitenyésztve és 4-5 hetes korukban használták fel őket kísérletekre. A másik kísérletsorozatban 6 hónapos KI-Dnm2^{R465W} egereket használtak, amelyek C57BL/6 genetikai háttérből származtak. Az eltérő genetikai állapot és a kor egyenként is okozhatta a kontroll állatok izmán mért sparkok paramétereinek különbözőségét.
4. A különböző RyR izoformák jelentősen befolyásolják az egyes speciesekben a sparkok kialakulását és alakját vázizomban. Ennek nagyon széles szakirodalma van, ezért itt most csak az általunk használt három állatmodell összehasonlítására vállalkozom.
Kezdem a 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 egyidejű 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 vázizmokban 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 kételtűeken 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 Ca^{2+} -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).

A béka és az egér lábizma klasszikus gerinces, SR-domináns, mechanikusan kapcsolt DHPR-RyR úton történő Ca^{2+} -felszabadításon alapul, addig a méh lábizma rovar-specifikus szerveződésű, relatíve nagyobb extracelluláris Ca^{2+} -hozzájárulással és eltérő finomszabályozással működik. Mivel a házi méh izomrostjaiban a sejtmagok centrálisan helyezkednek el (Collet és mtsai., 2021. Scientific Reports, 11:16731, 1. ábra vagy a disszertáció 119. oldala) ezért a T-tubuláris rendszer is eltér a másik két állatfajétól, ahol a sejtmagok a periférián találhatóak és nem befolyásolják a transzverzális tubuláris rendszer elrendeződését.

5. Metodikai fejlesztéseink (enzimatisztos rostizolálás) és a saját fejlesztésű képanalizáló programjaink segítségével sikerült megismételniünk olyan kísérleteket más preparátumokon és adatelemzéseket végezni a mérési eredményeken, amit korábban mások más kísérleti modellben és más adatfeldolgozással végeztek el. Ezekből a kísérleteinkből hasonló megállapításokat vontunk le a vázizmok kalciumhomeosztázisára vonatkozóan, mint elődeink. Ami ezen a téren teljesen újdonság volt, és nagyon büszke vagyok rá, hogy a háziméhek lábából izolált harántcsíkos izomrostokon mi mértünk először elemi kalciumfelszabadulási eseményeket és tudomásom szerint még azóta sem sikerült ezt másnak megvalósítani. Mellesleg megemlítem, hogy ezt az együttműködést a francia kutatókkal tovább vittük és azóta már a méhek szívizomsejtjein is végeztünk spark méréseket.

Amiben még sok újdonsággal szolgáltunk, az az optikai úton mért elemi kalciumfelszabadulási események és a mesterséges lipid membránba épített RyR-on végzett mérések kombinálása és az eredményekből komplex következtetések levonása volt. A Maurocalcin skorpió méreggel végzett méréseink például rámutattak arra, hogy milyen analógia van az egyedi kalciumcsatorna megnyílások és az elemi kalciumfelszabadulási események között.

Végezetül újdonságként szolgált az a tény még számunkra is, hogy bizonyos izombetegségekben vagy genetikai mutációk hatására megváltozhat az elemi

calciumfelszabadulási események előfordulása és alakja. Ez pedig hozzájárulhat az adott vázizom működésében látott elváltozásokhoz.

Még egyszer köszönöm a feltett kérdéseket és a dolgozatom bírálatát!

Tisztelettel kérem a válaszaim elfogadását!

Debrecen, 2026. február 23.

Tisztelettel,



Dr. Szentesi Péter

jelölt