

Válasz Enyedi Péter opponensi véleményére

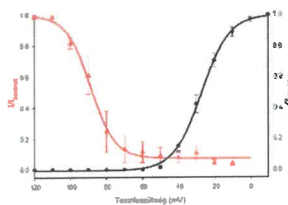
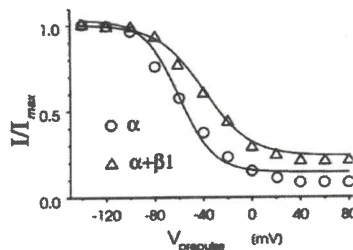
Tisztelt Prof. Enyedi Péter!

Köszönöm szépen, hogy elvállalta és elkészítette MTA doktori értekezésem bírálatát. Külön köszönöm a méltató szavait, hálás vagyok a kritikai megjegyzésekért. A kérdéseire megfogalmazott válaszaimat az alábbiakban részleteztem.

1. A bevezetés 1.3 fejezetében a Nav1.7 bemutatását (szerkezet, expresszió neuronokban, szerepe a fájdalomérzésben) nem igazán tartottam indokoltnak (bár a negatívabb aktivációs küszöb a jelen kísérletek szempontjából is érdekes lehet).

Kérdésem, hogy a Nav1.7-hez -10 mV tartományban társítható-e u.n. „window current” esetleg ki lehetett-e ezt mutatni? Ha nem, akkor mivel magyarázható a stabil -10 mV-os membránpotenciálhoz való hozzájárulás (ami egyébként a kísérleti eredményekből egyértelműen következik)?

Köszönöm kérdését. Az irodalmat (bal oldali ábra, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07091.x>) és az adatainkat (jobb oldali ábra) átnézve az mondható el az Nav1.7-ről, hogy a csatorna steady-state inaktivációjának meghatározásakor perzisztens áram detektálható pozitív tesztfeszültségek esetén. Véleményem szerint ez magyarázhatja a pozitívabb membránpotenciált (MP), melyet a CD1a⁺ éretlen dendritikus sejtekben tapasztaltunk. Megjegyezném, hogy például B sejteken is hasonlóan magas MP értékeket mutattak ki, ugyanis ezen sejtek is expresszálnak számos Nav csatornát, amelyek képesek perszisztens áramot létrehozni (<https://doi.org/10.3390/cells11071225>).



2. A 4.1.2 fejezetben az SLO szindrómás betegekben bekövetkező koleszterin anyagcsere eltérés hatást vizsgálják a T sejt funkcióra. A 4.1.2.1 fejezet végén a sejtek 7Dehidrokoleszterin (DHC) és koleszterin koncentrációjáról ír, a hivatkozott (2.) táblázatban 0.5-1 mmol/l értékek szerepelnek. Ez hogyan vethető össze a későbbi modell vizsgálatban sejteken létrehozott (26-195 µg/mg protein) értékkel, amit metilciklodextrin/7DHC töltés eredményeképpen kaptak? Mennyi lehetett a betegek sejteinek 7DHC tartalma?

Köszönöm kérdését. Kollaborációs partnerünkkel folytatott eszmecsere során az alábbi következtetésre jutottunk.

A két GC-MS mérés eredményeit összehasonlítani nem lehetséges egy az egyben, hiszen a betegek esetében a koleszterin/7DHC szintet a vvt-ék lizálásának segítségével határoztuk meg. Esetünkben ez azért volt célravezető, mert a vvt-ék nem rendelkeznek intracelluláris membránrendszerekkel, így gyakorlatilag a sejtmembránban tudtuk meghatározni a különféle szterolok mennyiségét/jelenlétét. Az in vitro modellrendszerünk esetében (PBMC) viszont a teljes-sejt lizátumba belekerült az intracelluláris membránok koleszterinje/7DHC-je, valamint az összfehérjére lett normálva, emiatt a „hígítási” faktor a két esetben eltérő.

Alaposabban utánajárva a két sejtípus fehérje- és koleszterol/7DHC-tartalmának az alábbiakat érdemes még figyelembe venni: a vvt esetében egy sejt átlagosan 30 pg fehérjét tartalmaz, míg egy limfocita 100-300 pg-ot, továbbá a koleszterin mennyiség 0,05 pg (0.1 fmol/sejt) vvt membránban, míg limfocita membránban 0,25 pg (0.5 fmol/sejt), a teljes sejtben 0,5-1 pg (1,5 fmol). Emiatt nehézkes a két sejtípusban mért értékeket összevetni, hiszen a normálási faktor és a koleszterin/7DHC tartalom is eltérő. Valószínűleg emiatt a SLOS limfociták esetében magasabb lenne az abszolút koleszterin/7DHC tartalom, mint a vvt-éknél. Így az irodalomban/szakterületen a 7DHC/koleszterin moláris arányt használják: az SLOS-es betegek esetében kísérleteinkben 0,1 és 6,5 közé esik, míg a 195 µM-os töltés (legmagasabb töltési koncentráció) esetén kb. 5, ami jelzi, hogy a modellrendszerünk megközelítőleg ugyanolyan arányban tartalmaz 7DHC-t, mint egyes SLOS betegek esetében (természetesen a limfociták esetében magasabb az alapszint). Ennek a megközelítésnek a használata (7DHC/koleszterol arány) kiküszöböl olyan problémákat, mint eltérő protein tartalom, térfogati különbség, membrán hígulási miatti torzítás.

A biofizikai paraméterekben láthatóan már a legalacsonyabb 7DHC/MβCD töltés (32.5 µM) során megjelenik változás, méghozzá a betegből származó sejtekkel azonos módon, azaz a 7DHC viszonylag kis mennyiségű jelenléte már megváltoztatja a Kv1.3 kapuzását. Ezen töltés esetén viszont a koleszterinszint nem változik jelentősen, csupán a 7DHC épül be a membránba. Ez számunkra egyértelműen igazolta, hogy a 7DHC membrámbeli megjelenése idézi elő a Kv1.3 csatorna biofizikai paramétereiben tapasztalt eltéréseket.

3. Meggyőző kísérletekkel mutatta ki, hogy a csatorna IC C-terminálisán 2 szterol kötőhely vesz részt a koleszterinnel, ill. 7DHC-vel történő szabályozásban. Elképzelhetőnek tartja-e, hogy esetleg a két vegyület eltérő hidrofobicitása miatt a csatorna citoplazmatikus C-terminálisához való eljutásban van különbség?

Köszönöm kérdését, viszont csak spekulálni tudok esszenciális információk hiánya miatt.

A 7DHC és koleszterin hidrofóbicitása nem nagyon különbözik egymástól (gyakorlatilag vízben oldhatatlan mindkettő, oldhatóságuk: 0.95 (koleszterin) vs. 1 mg/L (7DHC)); a koleszterin planáris szerkezetű és merev, míg a 7DHC egy kettős kötés miatt kissé hajlott. Ez utóbbi tulajdonság miatt elképzelhető, hogy a szterol kötőhelyekkel (CRAC és CARC) történő hidrogén kötések kialakítása eltérő lehet a két molekula esetében. A 7DHC a kettős kötés megléte miatt gyengébben kötődik a zsírsav oldalláncokhoz, ezért talán a membránból könnyebben képes kidiffundálni, mint a koleszterin.

Kimutatták, hogy az Orai1 citoszólikus N-terminális (ETON régióban, α -helikális szerkezetű), a P2X7 receptor intracelluláris N és C terminális is tartalmaz szterol kötőhelyeket, melyek szerepet játszanak membránkoleszterinszint változtatás hatására létrejött biofizikai sajátságok módosulásában. Ezen tanulmányok esetében nem történt legalább *in silico* vizsgálat, mely a membránbeli szterol és kötőhelye közti vizsgálatot tudná prediktálni.

A Kv1.3 C terminálisa meglehetősen szabadon mozog, másodlagos szerkezete nem ismert (inkább rendezetlen), egyfajta horgászbotként viselkedik (a különféle adapter fehérjék kapcsolódhatnak ide), az S6 régióhoz közeli aminosavaknak (pl. HRETE, ahogy itt is leírtuk) szerepe van a csatorna aktivációs kapuzásában. Véleményem szerint az itt található, általunk azonosított szterol kötőhelyek a membránban található szterolok közelébe kerülve megkötik azt, és mivel nem rendelkeznek másodlagos struktúrával, feltételezhetően szinte azonos affinitással kötik a két szterolt (flexibilisek). Kötődés során a szterol kötőhely proximitása kedvező fiziko-kémiai környezetet teremt, mely lehetővé teszi, hogy a koleszterin/7DHC a membránból kidiffundáljon (utóbbi a fentebb említettek miatt talán könnyebben), majd a csatornához kapcsolódjon. Szterol-csatorna komplex kialakulás valószínűleg képes megváltoztatni a S6-hoz közeli régiót, melynek fontos szerepe van a csatorna aktivációjában (S4-S5 linkerhez kötődik), és ezáltal megváltoznak a Kv1.3 aktiváció egyensúlyi és kinetikai jellemzői.

4. Az immunológiai szinapszis szerveződése szempontjából érdekes megfigyelés, hogy az Orai1 N-terminálisa nem szükséges a szinapszisba való toborzáshoz, viszont szükséges a szinapszis elhagyásához. Az N-terminális hiánya így fenntartott Ca^{2+} szignált, patológiás jelátvitelt eredményezhet. Ismert-e esetleg olyan genetikai elváltozás, aminek a hátterében az Orai1 N-terminális delécioja állna?

Köszönöm kérdését, és azt kell mondanom, hogy a legjobb tudomásom szerint egyelőre nem sikerült olyan Orai1-hez köthető betegséget azonosítani, amelyben a N-terminális delécio áll a háttérben. Megjegyezném, hogy az N terminálist kicsit jobban levágva, mint ahogy mi tettük (76 aminosav hosszúságú részt), nem funkcionális csatornát eredményez.

Ismert azonban, hogy az Orai1 alegységnek két izoformája fordul elő: az „ α ” az általunk is használt teljes hosszúságú Orai1 verzió, „ β ” a rövidebb fenotípus (az első 63 aminosav hiányzik belőle). Az Orai1 β palzmamembránbeli mobilitása magasabb, mindkettő képes CRAC csatornára jellemző, tapsigargin indukált Ca^{2+} választ létrehozni a STIM1-gyel történő aktivációt követően. Viszont kimutatták, hogy az Orai1 α kölcsönhat a scaffolding protein A-kinase anchoring protein 79- azaz AKAP79-cel, mely fontos az NFAT1 aktivációhoz, viszont a Orai1 β izoforma nem, ugyanis a kötődéshez szükséges AKAR régió hiányzik belőle. Továbbá ismert, hogy a Orai1 β alegység kevésbé érzékeny a Ca^{2+} -függő gyors inaktivációra, és emiatt az NFAT4-et képes aktiválni. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a két izoforma együttes expressziójának fontos szerepe van a kétféle NFAT izoforma összehangolt aktivációjában, majd a génexpresszió szabályozásában. Viszont eddig senki nem vizsgálta, hogy ezek miképpen viselkednek T sejtekben az immunológiai szinapszis kialakulása során, van-e funkcionális következménye a rövidebb forma kifejeződésének.

5. A Kv1.3 expresszióját csökkentő siRNS-alapú megközelítés milyen immunológiai betegségek esetében tűnhet a legígéretesebb terápiás stratégiának, és mik a jelenlegi terápiák kontraindikációi?

Az általunk kifejlesztett, Kv1.3 siRNS-esl töltött nanovezikulákat sikeresen alkalmazták humanizált egér modellrendszerben, lupus nephritis kezelésére, sajnos további lépések nem történtek a klinikai alkalmazás irányában. Korábban leírták, hogy reumás artritisz (RA), sclerosis multiplexben (SM) és egyes típusú diabétesz hátterében Kv1.3 csatorna által dominált effektor memória T sejtek játszanak szerepet (ezek hatásozzák meg a K^+ konduktanciát). Elméletben ezen betegségek esetében is lehetne alkalmazni a Kv1.3 siRNS-sel töltött, funkcionalizált nanovezikulákat, viszont a megfelelő „targetálás” egyelőre nem megoldott (az általunk használt CD45RO antitest képes a centrális és effektor memória T sejtekhez is kötődni, közös markerük). Meg kell vallanom, ez talán az Achillesz sarka a projektnek. Reméljük az immunológusok találhatnak majd egy specifikus effektor memória T sejt markert.

Az autoimmun betegségek esetében a terápia a betegség stádiumától függ: lehet szteroid-alapú, amelynek számos mellékhatása van, de hydroxychloroquine (malária ellenes szer) használata is ismert. A szteroidok mellékhatása között szerepel pl.

vércukorszint, vérnyomás megemelése, osteoporozis ill. pszichés problémák, alvási zavarok. A hydroxychloroquine pl. aritmiákat képes indukálni. Megemlíteném, hogy RA esetén klinikai I-es fázisba eljutott egy Kv1.3 gátlószer (dalazatide, ShK-186), subcutan alkalmazták psoriasis esetén, viszonylag jól tolerált, azért vannak mellékhatásai (paresthesia/hypoesthesia).

Végezetül köszönöm még egyszer bírálatát, és remélem, hogy válaszaim megfelelő magyarázatot szolgáltatnak a megfogalmazott kérdéseire.

Debrecen, 2026. 05. 19.



Hajdu Péter Béla
DE Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet
DE Fogorvosi Biokémia nem Önálló
Tanszék

