

Opponensi vélemény Hajdú Péter doktori értekezéséről

Hajdú Péter doktori értekezése az immunsejtek ioncsatornáinak működésével és szabályozásával, elsősorban a T-limfociták aktivációjában kulcsszerepet játszó káliumcsatornákkal foglalkozik. A disszertáció a jelölt elmúlt 20 évben végzett kutatómunkájának legfontosabb eredményeit foglalja össze, és hozzájárul fontos kérdések megválaszolásához az immunsejtek ioncsatorna-függő szabályozásának területén.

A vizsgált téma alap kutatási vonatkozásai is jelentősek, ezen túlmenően potenciálisan klinikai alkalmazás perspektíváját is nyújtja. Az adaptív immunválasz sejt mechanizmusainak megértésében az utóbbi két évtizedben egyre nagyobb figyelem irányult a különböző immunsejtek aktivációja során bekövetkező elektrofiziológiai történésekre. A T sejtek vonatkozásában a Kv1.3 az egyike -talán a legfontosabbika- azoknak a kálium csatornáknak, amelyek a sejt aktivációja során -töltéskompenzációt biztosítva- fontos szerepet játszanak a membránpotenciál szabályozásában és ezáltal a fenntartott Ca^{2+} -jel kialakulásában. A jelölt értekezése elsősorban e csatorna működésének molekuláris és sejtszintű mechanizmusait vizsgálja több, egymással szorosan összefüggő kísérleti megközelítés segítségével.

Az értekezés szerkezete világos, logikus felépítésű. A bevezető fejezet áttekintést ad az immunsejtek ioncsatornáiról rendelkezésre álló ismereteinkről, valamint a T-sejt aktiváció során kialakuló ioncsatorna-függő jelátviteli folyamatokról. A jelölt megfelelően helyezi el saját kutatásait a nemzetközi szakirodalom kontextusában, és jól indokolja a választott kutatási kérdések jelentőségét.

A jelölt központi kérdése annak vizsgálata, hogy a T-limfociták aktivációjában milyen molekuláris és strukturális mechanizmusokon keresztül, továbbá milyen egyéb membrán komponensekkel való interakciók útján vesz részt a Kv1.3 káliumcsatorna. A vizsgálatok azt is célozták, hogy ezen mechanizmusok miként módosulnak különböző patológiás körülmények között. A kutatás kiemelt figyelmet fordít az immunológiai szinapszis kialakulásában szerepet játszó fehérjekomplexek szerveződésére és dinamikájára.

A vizsgálatok során alkalmazott módszertani megközelítés kifejezetten széles és korszerű. A jelölt munkájában elektrofiziológiai mérések, molekuláris biológiai és biokémiai módszerek, korszerű képképző eljárások, farmakológiai megközelítések, valamint áramlási citometriás vizsgálatok egyaránt szerepelnek. A kísérletek tervezése gondos, a bemutatott adatok meggyőzőek és jól dokumentáltak.

A dolgozat egyik fontos eredménye annak bemutatása, hogy különböző eredetű koleszterin-anyagcsere eltérések esetén a T-limfociták működésének egyik kulcsfontosságú szabályozó eleme, a Kv1.3 káliumcsatorna funkciója jelentősen módosul. A jelölt kísérletei arra utalnak, hogy a membrán lipidösszetételének (koleszterin, 7- dehidrokoleszterin) változása közvetlenül befolyásolhatja a csatorna működését, ami a T-sejt aktiváció hatékonyságára is kihat.

Az értekezés jelentős része az immunológiai szinapszis kialakulásának mechanizmusait tárgyalja. A szerző részletesen vizsgálta, hogy a T-sejt aktiváció során miként szerveződnek térben és időben a különböző ioncsatornák és a jelátviteli fehérjék. Kimutatta, hogy a Kv1.3 csatorna, valamint a Ca^{2+} -jel kialakulásában meghatározó STIM és ORAI1 fehérjék koordinált együttműködése alapvető feltétele a hatékony immunológiai szinapszis kialakulásának.

A Kv1.3 csatorna és különböző scaffold/állvány fehérjék közötti kölcsönhatások vizsgálata a dolgozat egyik különösen érdekes része. A jelölt kimutatta, hogy a csatorna több adapterfehérjével – többek között

SAP-97, PSD95 és cortactin fehérjékkel – lép kölcsönhatásba, és feltárta az ezen interakciókban szerepet játszó fehérjedoméneket is.

A T-sejt aktivációban kulcsfontosságú a sejtben létrejövő Ca^{2+} -szignál nagysága és időtartama. A dolgozat részletesen elemzi e szignál kiváltójának, az ORAI1 csatorna immunológiai szinapszisba történő toborzásának és elvándorlásának dinamikáját, valamint az ehhez szükséges fehérje-fehérje kölcsönhatásokat. A bemutatott eredmények szerint az ORAI1 lokalizációját és stabilitását a szinapszisban több fehérjével – köztük a STIM-mel és a SAP97-tel való interakció szabályozza.

A szerző munkájának további jelentős eredménye a Kv1.3 csatorna működésének egy fontos strukturális kérdésének tisztázása. A kísérletek szellemes, molekuláris biológiai és elektrofiziológiai kísérletsorozattal tisztázták, hogy a csatorna C-terminálisának intracelluláris régiójának trunkálása/csonkolása, amennyiben a HRET motívumot is eltávolítja megszünteti a csatorna kapuzását. Viszont a motívum aminosav összetétele nem meghatározó, a funkció egyéb (különböző) aminosavakkal való helyettesítéssel is helyreállítható.

A bemutatott kísérletek és eredmények transzlációs, potenciálisan terápiás alkalmazások irányába irányba mutató része különösen izgalmas. Olyan liposzómákat hoztak létre, melyek felszíne a T_{EM} és T_{CM} sejtekre specifikus ellenanyag (CD45RO) voltak jelölve intravezikulárisan pedig Kv1.3 siRNS-t tartalmaztak. E preparátummal sikeresen célozták meg a kérdéses T sejt populációt ezzel gátolva az aktivációjában alapvető fontosságú Ca^{2+} szignál kialakulását. Az ellenanyaggal irányított liposzóma preparátum alkalmazása ígéretes alternatív megközelítést jelenthet fokozott T sejt aktiválással járó kórképek esetében, a hagyományos farmakológiai megközelítés mellékhatásai nélkül.

A dolgozat két további, a az eddig bemutatottakhoz lazábban kapcsolódó témakört is tárgyal. Az egyik a TASK típusú káliumcsatornák szerepének vizsgálata a T-sejtek működésében, amire -és erre a jelölt is utal- egy publikáció opponensének kérdésére adott válasz miatt került sor. A jelölt eredményei különböző egymást megerősítő kísérleti megközelítésekkel meggyőzően cáfolják e csatornák korábban felmerült jelentőségét a T sejt szabályozásában. A másik a Nav1.7 nátriumcsatorna szerepének vizsgálata a dendritikus sejtek érésében és működésében. Ez új szempontokat vet fel az immunsejtek ioncsatorna-függő szabályozásának kérdésében, azonban a disszertáció törzsanyagához csak lazán kapcsolódik.

Hajdu Péter tudományos eredményeinek többsége rangos nemzetközi folyóiratban megjelent közleményekben kerültek publikálásra. A jelölt a közlemények egy részében első vagy utolsó/levelező szerző, ami meghatározó szerepét jelzi a munkákban. A publikációs tevékenység és a 744 független idézettség alapján a jelölt munkái nemzetközi szakmai érdeklődésére is számot tartanak. A rendelkezésre álló további tudományometriai adatok (összesített IF:91, H index 19) ezt az értékelést egyértelműen alátámasztják.

A méltatás után volna néhány megjegyzésem, illetve érdeklődő kérdésem a jelölthöz:

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)?

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 sejtjeinek 7DHC tartalma?
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?
4. Az immunológiai szinapszis szerveződése szempontjából érdekes megfigyelés, hogy az Orai1 N-terminális 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 deléciója állna?
5. A Kv1.3 expresszióját csökkentő siRNS-alapú megközelítés milyen immunológiai betegségek esetében tűnhet a legígéretesebb terápiás stratégiának, és mik a jelenlegi terápiák kontraindikációi?

E kérdésektől függetlenül, összességében megállapítható, hogy Hajdú Péter értekezése jelentős új tudományos eredményeket tartalmaz az immunsejtek ioncsatorna-függő szabályozásának területén. A bemutatott eredmények nemcsak a T-sejt aktiváció molekuláris mechanizmusainak megértéséhez járulnak hozzá, hanem több ponton új kutatási irányokat is kijelölnek. Mindezek alapján a jelölt doktori értekezése megfelel az MTA doktori fokozat megszerzéséhez szükséges tudományos követelményeknek, és a dolgozat nyilvános vitára bocsátását javaslom, és sikeres védelem esetén a fokozat megítélését messzemenőig támogatom.

Dr. Enyedi Péter
az Orvostudomány Doktora