

Dr. Hajdu Péter Béla „Immensejtek ioncsatornáinak vizsgálata: funkció, szabályozás, lokalizáció és működés normál és patológiás körülmények között” című MTA doktori értekezésének bírálata

Dr. Hajdu Péter Béla MTA doktori értekezésében immunsejtek sejtmembránjában kifejeződő ioncsatornák funkcionális szerepének vizsgálatát tárgyalja fizioiógias és patológiás körülmények között, kiemelt hangsúlyt fektetve a Kv1.3 csatorna sajátosságaira. Az értekezés alapjául szolgáló, 2007 óta megjelent publikációk széles időtávra kiterjedő, több, egymással tematikusan összefüggő kutatási irányt tartalmaznak, amelyek koherens koncepció mentén kerülnek bemutatásra. Az értekezés felépítése logikus, de a szigorúan hagyományos szerkezettől eltérően az eredmények bemutatása és megbeszélése közös fejezetben kerül ismertetésre. Ezt egy rövid összefoglaló fejezet követi, külön az értekezésben tárgyalt eredmények összességére irányuló, átfogó diszkusszió nélkül, amely hiányérzetet kelt az olvasóban.

Az értekezés főbb kutatási irányai 4 fő alegységben foglalhatók össze: 1) a sejtmembrán szterol tartalmának hatása immunsejtek aktivációjára és a Kv1.3 csatornára; 2) az immunológiai szinapszisban lévő immunsejtek ioncsatornáinak (Kv1.3, CRAC) sajátosságaiban bekövetkező változások; 3) memória T-sejtekben Kv1.3 csatornák nanovezikulumokkal való gátlásának következményei; 4) a Nav1.7 csatorna expressziójának és funkciójának szerepe monocita eredetű éretlen dendritikus sejtekben.

Az értekezés kiemelendő erőssége a benne ismertetett módszerek sokrétűsége, amelyekben a klasszikus elektrofiziológiai méréseket sikeresen kapcsolja össze sejtbiológiai, molekuláris biológiai, konfokális mikroszkópos, áramlási citometriás és funkcionális (Ca^{2+} -jelátvitel, migráció, aktiváció) vizsgálatokkal. Külön hangsúlyozandó az elvégzett kutatómunka transzlációs orvostudományi relevanciája: a hiperkoleszterinémias és Smith–Lemli–Opitz szindrómában szenvedő betegekkel végzett vizsgálatok a membránszterol-összetétel és a T-sejt ioncsatorna-működés kapcsolatát klinikai mintákhoz kapcsolják. A Kv1.3 célzott, memória T-sejt specifikus géncsendesítésére kidolgozott nanovezikulás megközelítés pedig kifejezetten terápiás irányba mutató, innovatív fejlesztés, amely funkcionális következményeket is igazol (Ca^{2+} -válasz, NFAT transzlokáció, CD40L-expresszió, effektor funkciók/fenotípus).

A disszertáció összesen 16 eredeti közleményre épül, amely közül a jelölt 10 esetben első vagy utolsó szerző. A közlemények 14 év kutatómunkáját fedik le (2007-2021), összesített

impakt faktoruk 65,092. A közlemények között szerepelnek magasan jegyzett nemzetközileg elismert folyóiratban megjelent munkák, mint például Biomaterials (IF: 8,312), Journal of Autoimmunity (IF: 7,641), illetve az Amerikai Immunológus Társaság által gondozott The Journal of Immunology (IF: 5,646-5,788). Fontos megjegyezni azt is, hogy az értekezésben felhasznált közleményeken kívül további 20 tudományos cikkben (összesített IF: 86,412), 1 könyvfejezetben és 1 szerkesztői összefoglalóban szerepel szerzőként a jelölt, amelyek a PhD disszertációt követően jelentek meg. Összesített impakt faktora: 165,367, független hivatkozásainak száma: 706, Hirsch indexe 19.

Az értekezés 184 számozott oldalból áll, 82 ábrát és 292 irodalmi hivatkozást tartalmaz. Az értekezés elejére beillesztett rövidítésjegyzék nagyban segíti a szöveg megértését, megjegyzendő azonban, hogy a rövidítések használata a szövegben gyakran nem következetes: többször előfordul, hogy már bevezetett rövidítés helyett teljes kiírásra kerülnek tartalmak, míg más esetekben első kiírás helyett rögtön a rövidítés kerül bevezetésre (pl. DC 11. o., de dendritikus sejt 12., 18. o.; PM 14. o., de plazmamembrán 13., 15. o., stb.). Egyes hivatkozások pontatlanul kerültek beillesztésre, például a 22. oldalon Cahalan és mtsai. a 128. helyett helyesen a 129. hivatkozás; 32. oldalon Chandy és mtsai. 13. helyett helyesen az 5. hivatkozás; 38. oldalon hibás a 18. hivatkozás. Összeségében, a dolgozat külalakját, szerkezetét és tartalmát tekintve is igényes munka. Az értekezés gondosan megírt, de gépelési/szerkesztési hibák előfordulnak benne, például: 28. és 77. o.: „mellet”, 41. o.: „prokollja”, 44. o.: „egyexponenciális”, 61. o. „normált”, 77. o.: „Az feszültségfüggő”, 83. o. „plazmamembánbeli”, 84. o. „imulzusok”, 107. o. „contactin”.

Az értekezésben leírt eredmények alapján a következő megállapításokat fogadom el új, eredeti megállapításoknak:

1) Hiperkoleszterinémias betegekből származó T-sejtek esetén a Kv1.3 ioncsatorna működése csak egy esetben, extrém magas szérumkoleszterin esetén változott meg, míg a többi esetben a magas koleszterinszintnek nem volt biológiailag jelentős hatása a csatornára.

2) Smith–Lemli–Opitz szindrómás betegekből a Kv1.3 ioncsatorna működése megváltozott (aktivációs kinetika lassult, az egyensúlyi aktiváció jobbra tolódott). A csatorna kapuzásának megváltozásáért a 7DHC sejtmembránbeli felhalmozódása felelős. A betegekből izolált T-sejtek Ca^{2+} -függő aktivációja és proliferációja elmarad a kontroll sejtekhez képest, amelyet részben a Kv1.3 csatorna funkciójának módosulása magyaráz.

3) A koleszterin és a 7DHC hasonló mechanizmusok által szabályozza a Kv1.3 csatornák működését a CARC1 és CARC2 szterol-kötőhelyen keresztül, azonban a Kv1.3 kapuzás megváltozása 7DHC töltésre érzékenyebb.

4) A Kv1.3 csatorna immunológiai szinapszisba történő berendeződése egér T-sejtekben a csatorna működését megváltoztatja. Jellemző a lassabb aktivációs kinetika és az egyensúlyi aktiváció depolarizáló feszültségek felé tolódása, valamint a gyorsabb inaktivációs kinetika és kisebb áramsűrűség a csatorna defoszforilációja révén.

5) A Kv1.3 csatorna immunológiai szinapszisba történő berendeződését a C-terminálisához kötődő PSD-95 adapter fehérjével történő kölcsönhatás irányítja.

6) A Kv1.3 csatorna C-terminálisának SH3-kötő doménjéhez kapcsolódó cortactin a csatornát kihorgonyozza az aktin filament rendszerhez az F-aktin polimerizáció során. T-sejtekben a cortactin ortológ HS1 az immunológiai szinapszisban felhalmozódó csatornák karboxil végéhez kötődve immobilizálja a Kv1.3-at.

7) A CRAC csatorna Orai1 alegységének felhalmozódása az immunológiai szinapszis kialakulását követő 15 percnél éri el maximumát, majd azután csökken. Az Orai1 N-terminálisának deléciója, valamint a hozzá kötődő SAP97 és STIM1 expressziójának csökkentése gátolta az Orai1 csökkenését. Az Orai1 elnyújtott szinapszisbeli tartózkodása T-sejtekben tartós Ca^{2+} jel oszcillációt idézett elő.

8) A Kv1.3 C-terminálisán elhelyezkedő HRETE szekvencia nem játszik jelentős szerepet a csatorna sejtmembránba történő kijutásában.

9) Kidolgozásra került egy olyan eljárás, amellyel a memória T-sejtek szelektíven megcélozhatók funkcionális liposzómákkal, majd az endocitózist követően a nanovezikulákba csomagolt Kv1.3 siRNS csökkenti a csatorna expresszióját és a CRAC-on keresztüli Ca^{2+} beáramlást, továbbá a sejtek Ca^{2+} -függő aktivációját (NFAT transzlokáció, CD40L expresszió), effektoros funkcióit és a memória sejtek arányát.

10) A Nav1.7 csatorna a CD1a⁺ éretlen dendritikus sejtek membránpotenciálját egy magasabb értéken tartja. A csatorna funkcióvesztése gátolta a MIP-1 α indukálta migrációt, csökkentette az MMP12 expressziót, továbbá serkentette több citokin (TNF- α , IL-10) szekrécióját.

Az értekezésben leírtakkal kapcsolatos kérdéseim a következők:

1) A dendritikus sejtek aktiválásával kapcsolatban fontos lett volna indokolni a 36. oldalon részletezett gyulladásoz kórtól összetételének meghatározását. Mi indokolta kétféle citokin, egy stimuláló faktor és prosztaglandin együttes használatát? Mi alapján lettek

megállapítva a felhasznált koncentrációk? Az egyes anyagok külön-külön hozzáadva nem vagy más hatással bírtak volna? Utóbbi megközelítés elősegíthetné különböző jelátviteli útvonalak azonosítását.

Egy másik ide tartozó kérdés, hogy az alkalmazott (magasnak tűnő) 10 μ M koncentrációban mennyire várható, hogy a tetrodotoxin a Nav1.7 csatornán kívül más nátrium vagy egyéb ioncsatornákra is hat? A Nav1.7 csatornáktól független, nem specifikus hatás mennyire befolyásolhatja a szerrel kapott eredmények interpretálását?

2) A hiperkoleszterinémiás és Smith–Lemli–Opitz szindrómában szenvedő betegekkel végzett vizsgálatok kontroll csoportjai esetén célszerű lett volna megemlíteni, hogy demográfiai szempontból (pl. kor, nem, testtömeg) egyeztek-e a vizsgált csoporttal? Hogyan alakultak ezek a paraméterek az egyes csoportokban a SLOS betegek életkorán kívül (ami ismertetésre kerül a szövegben)?

3) Célszerű lett volna alátámasztani, hogy miért aktin szerepelt kontrollként Western blot során és miért 38B4 a PCR méréseknél. Miért éppen ezek és miért nem ugyanaz a kontroll a két módszernél? A sovány tejpor kiválasztása a Western blot kísérletekhez szintén érdekesnek tűnik: mennyire standardizálható a Dóczy ABC által forgalmazott termék összetétele?

4) A 4.1.1 fejezetben ismertetett eredmények kapcsán felmerül a kérdés, hogy hogyan alakult a vizsgálatba bevont 15 beteg aránya (38. o.) a HC I. és II. csoportokban? A limfociták koleszterin tartalmának meghatározása miért csak $n = 3$ esetben történt a HC II. és kontroll csoportokban, és miért nincs adat a HC I. csoport sejteiről (57-58. o.)? Az elemszámokat illetően a kérdés a SLOS betegekre is vonatkozik, akiknél a módszertani részben $n = 8$ a beteg és kontroll csoport egyaránt, míg a 2. táblázat (65. o.) csak 7 beteg és 5 kontroll adatot tartalmaz.

Milyen (kór)élettani jelentősége lehet a HC II. csoport estén talált szignifikánsan csökkent aktivációs időállandónak (59.o. és 15. ábra)? Az időállandó növekedésének negatív élettani hatásait, ami koleszterin deplécióban bekövetkezik (ld. 66. o.) könnyebb megérteni, de az időállandó csökkenése fokozottabb kinetikára utalhat?

Szembetűnő a különbség az 1. és 3. táblázatban bemutatott kontroll csoportok első 5 paraméterében. Ennek mi lehet az oka? Az alanyok különböző életkorán kívül más is állhat a háttérben?

A hiperkoleszterinémiás betegekből izolált sejteknél talált csökkent T-sejt proliferációnak ismert dokumentált klinikai következménye, például a betegek elmaradó T-

sejtes immunválasza bizonyos kórképekben? Illetve felmerül a kérdés, hogy más immunsejtek esetében is ismert hasonló hatás?

Érdekes megfigyelés, hogy az osztódási index túl magas (HC I. és II., ld. 17. ábra) és túl alacsony koleszterinszintek (SLOS, ld. 22C ábra) esetén is egyaránt alacsonyabb a kontrollnál. Ez akár azt is sugallhatja, hogy valójában nem a koleszterinszint megváltozása felelős az eltérésért. Milyen mechanizmus állhat ennek hátterében?

5) A 75. oldalon olvasható, hogy a Kv1.3 működésének megváltozása a 7DHC és 8DHC felhalmozódásának következménye is lehet, azonban ezek közül csak a 7DHC töltés hatását vizsgálták. Vannak adatok a 8DHC töltés hatására kialakuló változásokról? A jelölt kutatásai során történtek ilyen vizsgálatok?

6) Az anandamiddal és ruténium vörössel végzett kísérletek (4.2.1.4 fejezet) kapcsán azt is meg kell említeni, hogy ezek az anyagok a vizsgált csatornákon kívül más receptorokra is hatással bírnak. Így például az anandamid jól ismert endogén agonista ligandja kannabinoid és vanilloid receptoroknak, amelyek szintén hatással lehetnek kation (pl. Ca^{2+} , K^{+}) áramokra. Hasonló a helyzet a ruténium vörössel is, amely számos különböző ioncsatorna (pl. rianodin, TRP család tagjai) funkcióját képes gátolni. Ezek mennyiben befolyásolhatták a megfigyelt eredményeket?

Mi indokolta az anandamid (3 és 30 μM) és ruténium vörös (10 μM) eltérő koncentrációinak használatát (86. o.)? Az anandamid esetén milyen eredményeket kaptak 30 μM koncentráció esetén (ez sem a szövegben, sem ábrán nem került bemutatásra)?

7) A reprezentatív konfokális képek (pl. 40., 41., 50-52, 54. ábrák) esetén célszerű lett volna a szövegben megemlíteni, hogy a több vizsgált időpont közül, melyiknél készültek a bemutatott felvételek.

8) Mi lehet az összefüggés az immunológiai szinapszisban megfigyelt csökkent Orai1 funkció (Ca^{2+} válasz, 51D ábra), ugyanakkor fokozott Orai1 felhalmozódás (52C ábra) között a STIM1-KD sejtekben? Feltételezhető, hogy valamelyik kompenzációs mechanizmus? Ez esetben melyik lehet a primér elváltozás?

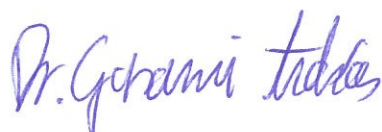
9) A 65. ábrán látható eredmények ismertetése során a szövegből kimarad annak magyarázata, hogy az aktivációs kinetika a WT-polyA esetén nem nőtt (csak a másik 2 konstrukciónál) (65A ábra), míg az egyensúlyi félaktivációs feszültség a WT-Atail esetén csökkent (míg a másik 2 konstrukciónál nem) (65F ábra). Mi lehet az oka, hogy ezekben az esetekben a konstrukciók ilyen különbözően viselkedtek?

10) Mi lehet az oka a 79A ábrán megfigyelhető nagyfokú Nav1.7 mRNS szint növekedésnek EGTA hatására a thapsigarinnal kezelt csoportban?

11) A 82. ábra C és D részében ábrázolt kontroll csoportok MMP12 mRNS szintjei között kb. ötszörös különbség figyelhető meg. Ennek mi állhat a hátterében? A Nav1.7 csatorna gén csendesítése után (siRNA) nem került sor a 82E-F ábrán bemutatottakhoz hasonlóan citokinek koncentrációjának mérésére? A jelölt véleménye szerint milyen eredmények lettek volna várhatók ilyen kísérletekben?

Összességében, az értekezés értékes tudományos alkotás, a benne foglaltak nagyban bővítik ismereteinket az ioncsatornák, elsősorban a Kv1.3 immunsejtekben betöltött funkciójáról. Az értekezés alapján Dr. Hajdu Péter Béla az MTA doktori cím megszerzésének feltételeit teljesítette. Az értekezés vitára bocsátását, valamint – sikeres védést követően – az MTA doktori cím odaítélését támogatom.

Pécs, 2026. február 25.



Dr. Garami András
egyetemi tanár, MTA doktora
PTE ÁOK Transzlációs Medicina Intézet