Válasz Dr. Buzás Edit egyetemi tanár, az MTA levelező tagja bírálatára

Hálásan köszönöm Dr. Buzás Edit akadémikusnak értekezésem értékelését, észrevételeit és kérdéseit, és a sikeres védés esetén az MTA doktora cím megítélésére tett támogató javaslatát.

Az értekezésem bírálatában tett észrevételeket a kérdésektől különválasztottam, és azokra az alábbi csoportosításban a bírálatnak megfelelő számozással a következő válaszokat adom, a releváns irodalmi hivatkozásokkal.

Észrevételek:

1. A szokatlan tömörség miatt azonban például nem áll rendelkezésünkre információ arról, hogy a nagyszámú alkalmazott transzgenikus egértörzs honnan származott, mint ahogyan arra sem kapunk választ, hogy pl. a Tg egerek esetében F2 generációból, azonos alomból származó ko és wt egereket használtak-e a vizsgálatokhoz. Hasonlóképpen nem derül ki, hogy pl. a LTβR-Ig fúziós fehérjét maguk állították-e elő. Nem kerül említésre, hogy milyen statisztikai elemzéseket végeztek.

A módszertani leírásban a leglényegesebb alapmódszerek bemutatására szorítkoztam, az egyéb eljárásokra az egyes eredményekhez csatolt cikkekben térek ki részletesen, ezek külön leírását a módszertani részben redundánsnak gondoltam. Ezek közé tartozik az egerek részletesebb bemutatása is, amik a kísérlettől függően eltérő eredetűek lehettek (intézeti SPF állatházban tartott egerek, Jackson Laboratories-től vagy együttműködő partnerektől származó törzsek, vagy esetleg csak küldött szövetminták). Szintén a kísérlet típusától függően állítottuk össze a kísérleti csoportokat, így voltak KO/vad típusú összehasonlítások (pl. az Nkx2-3 hiányának tanulmányozása során BALB/c alapra visszakeresztezett Nkx2-3 KO és BALB/c egér), illetve többszörös mutáció (pl. *Nkx2-3*$^{-/-}$x *mCD19*^{Luc} Tg ill. *Nkx2-3*$^{-/-}$x*Ltbr*$^{-/-}$ kettős KO) esetén KO/heterozigóta alomtárs egyaránt, ahogy azt az egyes cikkek tartalmazzák, az értékeléshez használt statisztikai eljárásokkal együtt. A LTβR-Ig fúziós fehérjét Jeff Browning (Biogen) bocsájtotta rendelkezésünkre.

Az értekezésemben a nyirokszövet-fejlődésre vonatkozó munkám eredményeire szorítkoztam, amiket ilyen formában gondoltam komplettnek, és kihagyásuk az egész értelmezhetőségének a rovására ment volna, illetve az egyes részleteknél gondoltam relevánsnak az eredmények diszkusszióját is.

2. A táblázatoknak csak sorszáma van, de címük nincs.

Az értekezés összeállításánál törekedtem arra, hogy a megfelelő szövegkörnyezetbe helyezve kerüljenek a táblázatok is, de elfogadom Bíráló észrevételét, hogy megfelelőbb lett volna a táblázatokat címmel is ellátni.

3. Az ábrák egy része estén nem került feltüntetésre a vizsgált állatok száma (pl. 6.1 ábra, 6.2 ábra, 6.3, 6.4 ábrák).

Köszönöm az észrevételt, az immunhisztológiai vizsgálatokat tipikusan 3-5 állaton többször ismételten végezzük.

4. A 6.10 ábrán úgy kerül feltüntetésre az Nkx2-3-/- egérből származó metszet, hogy a szövegben még egyáltalán nem esik szó az Nkx2-3-ról. Az értekezés további részében természetesen bőven esik szó erről a genetikailag módosított egértörzsről.

A 62. oldalon lévő 6.10. ábránál valóban nincs szó az Nkx2-3 mutáció jellemzőiről, de előzőleg a bevezetésben a lép fejlődés 3.2. részben tárgyalt transzkripcionális szabályozásának leírásában a 33. oldalon röviden ismertetem az Nkx2-3 korábban leírt jelentőségét. Ugyanakkor egyetértek, hogy megfelelőbb lett volna az Nkx2-3 hiányában kialakuló fontosabb lét-szerkezeti eltéréseket ismét megemlíteni.

5. A 6.22 ábrán az Y tengely jelöléséhez szerencsésebb lett volna a biotin mellett/helyett a Streptavidin PE-t mint fluoreszcens jelölést is feltüntetni.

Bírálónak igaza van, hogy fluoroforként valóban nem a biotin szolgál, hanem az utána alkalmazott Streptavidin-PE. A biotin jelölés használatának az oka, hogy (a CFSE-hez hasonlóan) az ábrán a jelölő ágenseket neveztem meg. A CFSE szintén nem önmagában, hanem intracelluláris hidrolízisét követően válik aktív fluoroforrá.

6. 103. oldal: „GFP-jelölt limfociták” helyett talán helyesebb lett volna a GFP-pozitív limfociták kifejezés, hiszen itt nem jelölt, hanem GFP-t expresszáló Tg egér sejtjeiről van szó.

Egyetértek a kifogással, a továbbiakban ugyanezen az oldalon ekként is szerepel a megjelölés.

7. A 108. oldalon „szuszceptibiltási hely” szerepel, a szuszceptibilitási lókusz vagy allél kifejezés használata ebben az esetben pontosabb lett volna.

Valóban, az alkalmazott magyarosított ebben a módban nem helyénvaló, jobb lett volna a Bíráló által javasolt változat.

8. Néhány ábra esetében angol felirat szerepel (pl. a 110. oldalon a 6.44 és 6.45 ábrák esetében)

Az ábrákat következetesen a releváns közleményből emeltem át, ezért maradtak benne angol kifejezések, rövidítések. Az egyedüli kivétel az eddig még részben nem publikált 6.1 és 6.2 ábra az általunk előállított stroma-reaktív monoklonális antitestek nyirokszöveti festődésének illusztrálására.

9. 122. oldalon olvasható CD45+C3CD19CD90+RORγt+ fenotípus helyesen CD45+CD3CD19CD90+RORγt+

Köszönöm az észrevételt és a javítást.

Kérdések:

1. A szövetfragmentumokkal történő immunizálás során vélhetőleg óhatatlanul nekrotikus sejtmaradványok is beoltásra kerültek. A szövet-fragmentumokkal immunizált patkányokban milyen volt a sejtfelszíni és az intracelluláris antigénekkel reagáló klónok aránya? Tesztelték-e a klónokat nem limfoid szöveteken is?

Bár igyekeztünk a hipoxiás periódust rövidíteni, valóban kialakulhatott szöveti nekrózis, de a kapott hybridomák kiválasztásánál törekedtünk a sejtfelszíni markerekkel reagáló antitestek előállítására. A sejtfelszíni és intracelluláris antigénekkel reagáló klónok arányát nem vizsgáltuk. Az előállított stroma-reaktív antitestek nem-nyirokszöveti (lép, nyirokcsomó, Peyer-plakk, tímusz) reaktivitását vese, máj, agy, szívizom szövetmintákon vizsgáltuk immunhisztológiai módszerekkel. Eredményeink szerint változatos mértékben és megoszlásban nem-nyirokszöveti reaktivitás is megfigyelhető volt, elsősorban endotél-sejtekkel szemben (I. táblázat).

I. táblázat. A nyirokszöveti stroma-elemekkel szemben előállított monoklonális antitestek immunhisztológiai reaktivitása nem-limfoid szöveteken

mAb klón	**Vese**	**Máj**	**Agy**	**Szív**
Sejtfelszíni antigén				
IBL-7/1	glomerulus, proximális tubulus	centrális és portális véna, vénás szinuszok	-	endokardiális és szívizom mikrovaszkuláris endotél
IBL-9/2	-	vénás szinuszok	-	-
IBL-18	glomerulus, disztális tubulus	centrális és portális véna, vénás szinuszok	pl. choroideus	szívizom mikrovaszkuláris endotél
IBL-20	glomerulus, kéregállomány kapillárisok	centrális és portális véna, vénás szinuszok	pl. choroideus	endokardiális endotél
IBL-22	glomerulus, proximális tubulus	centrális és portális véna, vénás szinuszok	-	endokardiális és szívizom mikrovaszkuláris endotél
ECM antigén				
IBL-7/22	Bowman-tok, glomerulus, tubuláris bazálmembrán	vénás szinusz bazálmembrán	vaszkuláris bazálmembrán	endokardiális és kapilláris bazálmembrán
IBL-10	juxtaglomeruláris sejtek	-	-	-
IBL-11	-	-	-	-
IBL-19	glomerulus, tubuláris bazálmembrán	vénás szinusz bazálmembrán	vaszkuláris bazálmembrán	endokardiális és kapilláris bazálmembrán
IBL-21	glomerulus, tubuláris bazálmembrán	vénás szinusz bazálmembrán	vaszkuláris bazálmembrán	endokardiális és kapilláris bazálmembrán

2. Vannak-e az irodalomban „single cell” adatok a lép stroma heterogenitására vonatkozóan?

2019-ben jelent meg Cheng, Ludewig és mtsaitól egy részletes scRNA-seq tanulmány, amelyben a Ccl19 promoter-kapcsolt YFP markergén segítségével a lép fehér pulpa fibroblaszt-hálózatának populáció- és egysejt-mRNS jellemzőit, valamint a LTβR-függő sejtösszetevők differenciálódási útvonalait ismertetik. Ezek alapján 11 fibroblaszt-jellegű sejtpopulációt különítettek el, amiben 6 alcsoportban volt kimutatható Ccl19-függő YFP kifejeződés, valamint alcsoport-specifikus mRNS-mintázat. Ezek közül a perivaszkuláris (PRC) sejtek a LTβR aktivitástól függetlenek, és az érpályát

határoló (murális) és fehér pulpa fibroblasztok előalakjaiként funkcionálhatnak. Ezekből a születést követően LTβR szignál hatására egy T-zóna retikulumsejt (TRC) illetve egy marginális retikulumsejt-follikuláris dendritikus sejt (MRC-FDC) különválás, mint lehetséges differenciálódási specifikáció valószínűsíthető. Ezek az adatok megerősítik azon korábbi megfigyelésünket, ami szerint a posztnatális korban a legkorábbi FDC előalakok (FDC-M1$^+$/CR1.2$^-$) a fejlődő MZ területében mutathatók ki, valamint csíracentrum-reakciót követően a csíracentrum-asszociált FDC VCAM-1$^+$/MAdCAM-1$^+$ MRC kompartmentjei között közvetlen kapcsolódás áll fenn.

- Cheng HW, Onder L, Novkovic M, Soneson C, Lütge M, Pikor N, Scandella E, Robinson MD, Miyazaki JI, Tersteegen A, Sorg U, Pfeffer K, Rülicke T, Hehlgans T, Ludewig B. Origin and differentiation trajectories of fibroblastic reticular cells in the splenic white pulp. Nat Commun. 2019 10:1739. doi: 10.1038/s41467-019-09728-3.
- Balogh P, Aydar Y, Tew JG, Szakal AK. Ontogeny of the follicular dendritic cell phenotype and function in the postnatal murine spleen. Cell Immunol. 2001 214:45-53.
- Balogh P, Aydar Y, Tew JG, Szakal AK. Appearance and phenotype of murine follicular dendritic cells expressing VCAM-1. Anat Rec. 2002 268:160-8.

3. Jólismert tény, hogy a B sejt epitópok azonosítása mennyire nehéz. Az is nyilvánvaló, hogy a patkány monoklonális antitestek előállítása sok évvel ezelőtt történt. A monoklonális antitest panel létrehozása óta eltelt időszakban ismertté vált-e olyan új módszer, amelyet - amennyiben ez lenne a cél – hatékonyan lehetne alkalmazni a létrehozott nagyszámú monoklonális antitest antigénjének és epitópjának azonosítására?

Intézetünkben korábban Czömpöly Tamás sikeresen honosította meg az epitop fág-display eljárást, amivel pl. a CD45RC-specifikus IBL-8 monoklonális antitest epitop-specificitását protein szekvencia adatbázisokban végzett elemzéssel sikerült meghatároznunk. Remélhetőleg az eljárás a legközelebbi jövőben ismét alkalmazható lesz a stromális reaktivitású ellenanyagok epitop-meghatározására.

- Czömpöly T, Lábadi A, Balázs M, Németh P, Balogh P. Use of cyclic peptide phage display library for the identification of a CD45RC epitope expressed on murine B cells and their precursors. Biochem Biophys Res Commun. 2003 307:791-6.

4. Használják-e más kutatócsoportok az előállított monoklonális antitesteket?

A hazai kutatócsoportok közül az ELTE és DE munkatársai ill. PhD hallgatói, illetve nemzetközi munkákban is a stroma-specifikus antitestek közül az IBL-9/2, IBL-11 és IBL-12 antitesteket használták. A leukocita-specifikus ellenanyagok jelentős része (IBL-3/16 és IBL-5/25[anti-CD45], IBL-3/25 [anti-CD8], IBL-5/22 [anti-MHC II], IBL-6/23 [anti-CD90], IBL-6/2 [anti-CD11a]) különböző kiszerelési formában helyi kisvállalkozások révén a nemzetközi piacon hozzáférhető és jelenik meg publikációkban.

- Berahovich RD, Zabel BA, Lewén S, Walters MJ, Ebsworth K, Wang Y, Jaen JC, Schall TJ. Endothelial expression of CXCR7 and the regulation of systemic CXCL12 levels. Immunology. 2014 141:111-22.
- Guo F, Weih D, Meier E, Weih F. Constitutive alternative NF-kappaB signaling promotes marginal zone B-cell development but disrupts the marginal sinus and induces HEV-like structures in the spleen. Blood. 2007 110:2381-9.
- Ojala JR, Pikkarainen T, Tuuttila A, Sandalova T, Tryggvason K. Crystal structure of the cysteine-rich domain of scavenger receptor MARCO reveals the presence of a basic and an acidic cluster that both contribute to ligand recognition. J Biol Chem. 2007 282:16654-66.

5. Végeztek-e funkcionális vizsgálatokat a saját monoklonális antitestekkel (pl. *in vivo* blokkolás)?

Számos antitest esetében in vivo T-sejt depletáló hatást mutattunk ki (IBL-1/anti-CD90, IBL-3/25/anti-CD8), illetve indirekt módon (IBL-12 – anti-MARCO) a MZ makrofágokon keresztül mobilizálta a MZ B-sejteket.

- Mihalj M, Kellermayer Z, Balogh P. Follicles in gut-associated lymphoid tissues create preferential survival niches for follicular Th cells escaping Thy-1-specific depletion in mice. Int Immunol. 2013 25:423-35.
- Kvell K, Czömpöly T, Pikkarainen T, Balogh P. Species-specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 2006 341:1193-202.

6. A follikuláris dendritikus sejtek iccosomáit az 59. oldalon mint komplement-fragmentumokkal fedett komplexeket (iccosoma) említi a Jelölt. A szakirodalom immunkomplexekkel fedett testecskékként is említi az iccosomákat. Van-e az iccosomáknak membrán komponense? Lehetséges-e, hogy az iccosomák az FDC felszínéhez tapadt extracelluláris vezikulák, melyeket immunkomplexek és komplement molekulák borítanak?

Az iccosoma-képződés során affinitás-függő módon rendeződhet el/kapcsolódhat az IgM-Ag komplex az FDC felszínén (az IgG kevésbé hatékonyan kötődik) MZ B-sejtek (lép) vagy szubkapszuláris makrofágok (nyirokcsomók) közvetítésével. Cyster és mtsai intravitális mikroszkópos vizsgálatokkal HEL-PE jelölt antigén felhasználásával nagyméretű iccosomák B-sejtek általi felvételét igazolták az FDC felszívéről, ami alapján feltételezhető, hogy a B-sejtek által felismer iccosomákban membrán-összetevők is előfordulhatnak. Az iccosomák méretük alapján lehetséges extracelluláris mikrovezikula-jelöltek, ugyanakkor ezek képzésének celluláris mechanizmusa jelenleg az FDC tisztításának extrém nehézségei miatt nem tisztázott.

- Zhang Y, Garcia-Ibanez L, Toellner KM. Regulation of germinal center B-cell differentiation. Immunol Rev. 2016 270:8-19.
- Suzuki K, Grigorova I, Phan TG, Kelly LM, Cyster JG. Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. J Exp Med. 2009 206:1485-93.
- Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, de Groot C, Geuze HJ. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. J Immunol. 2000 165:1259-65.

7. Létezik-e MARCO hiányos egér, ha igen, mi volt az oka, hogy nem vizsgálták? Milyen fenotípussal rendelkezik a MARCO KO egér?

A *Marco*$^{-/-}$ egerekre a MZ szerveződésének diszkrét zavara, valamint a T-independens immunválaszok gátlása jellemző, súlyosabb fenotípusbéli eltérések nélkül. A **MARCO receptor** hiánya ugyanakkor nem jelentette a MZ makrofág-szerveződés celluláris defektust, aminek hatásáról Arnon és mtsai számoltak be. Ebben a **SIGN-R1^{+}/MARCO^{+} MZ makrofágok hiánya** (a T_{FH} sejtek differenciálódását kiváltó dendritikus sejtek hiányán keresztül) a T-sejt dependens csíraközpont-reakció defektusát okozta. Így a MZ makrofágok a MARCO molekula részvételével a MZ szerveződéséhez járulnak hozzá, míg további sejtes interakciók révén indirekten a nyiroktüsző érésében is fontos szerepet játszanak. Eddigi kísérleteinkben a *Marco*$^{-/-}$ egerek alkalmazására nem volt szükség.

- Chen Y, Pikkarainen T, Elomaa O, Soininen R, Kodama T, Kraal G, Tryggvason K. Defective microarchitecture of the spleen marginal zone and impaired response to a thymus-independent type 2 antigen in mice lacking scavenger receptors MARCO and SR-A. J Immunol. 2005 175:8173-80.
- Pirgova G, Chauveau A, MacLean AJ, Cyster JG, Arnon TI. Marginal zone SIGN-R1^{+} macrophages are essential for the maturation of germinal center B cells in the spleen. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 117:12295-12305.

8. A 62. oldalon szerepel, hogy a lép nyiroktüszőkben a MARCO az FDC felületén fibrilláris kötegekbe rendezett granulált képleteket alkot. Mik ezek a granuláris képletek? A kérdésem az, hogy lehetséges-e, hogy a MARCO extracelluláris vezikula felszínén van jelen, mely az FDC membránjához tapad?

A FDC-kapcsolt MARCO-tartalmú granulumok egyéb összetételéről, képződésének mechanizmusáról nincs további ismeretünk. Az ECV jelleg megerősítése in situ további ECV markerekkel (CD9, CD63, CD81) és szuperrezolúciós mikroszkópos eljárásokkal (STED) lehetséges. Az FDC intakt formában (nem-enzimatikus) való izolálása ECV kötés vizsgálatára nem kivitelezhető, és nincs bizonyítottan FDC-eredetű sejtvonal. Ugyanakkor a MARCO scavenger receptor (feltehetőleg pozitív töltésű kollagén-részletével) képes exosomák megkötésére, előzetes polyG ligandkötése gátolta az ECV megkötését in vitro CHO sejteken. Ennek a megfigyelésnek az FDC-re vonatkoztatható in vivo relevanciája, ugyanis sejtvonal-függő módon a MARCO kifejeződése eltérhet. A CHO sejtekkel ellentétben különböző egér sejtvonalak saját adataink alapján refrakterek a MARCO sejtfelszíni megjelenítésével szemben, ezért egyelőre nem áll rendelkezésünkre potenciálisan MARCO-tartalmú ECV-t generáló makrofág sejtvonal.

- Kanno S, Hirano S, Sakamoto T, Furuyama A, Takase H, Kato H, Fukuta M, Aoki Y. Scavenger receptor MARCO contributes to cellular internalization of exosomes by dynamin-dependent endocytosis and macropinocytosis. Sci Rep. 2020 10:21795. doi: 10.1038/s41598-020-78464-2.
- Kvell K, Czömpöly T, Pikkarainen T, Balogh P. Species-specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 2006 341:1193-202.

9. Ismert-e lényeges különbség az egyes vad típusú beltenyésztett egértörzsek limfoid szerveinek vaszkuláris és stromális szerveződésében?

Jelenleg nincsenek olyan publikált adatok, amik a leggyakrabban alkalmazott egértörzsek (BALB/c, C57Bl/6) között stromális eltéréseket mutatnának, ugyanakkor jellegzetes limfoid eltéréseket igazoltak T/B-sejt arányban, Treg gyakoriságban (BALB/c > C57Bl/6) illetve MZ B-sejt számban (BALB/c < C57Bl/6).

- Hensel JA, Khattar V, Ashton R, Ponnazhagan S. Characterization of immune cell subtypes in three commonly used mouse strains reveals gender and strain-specific variations. Lab Invest. 2019 99:93-106.
- Turner VM, Mabbott NA. Influence of ageing on the microarchitecture of the spleen and lymph nodes. Biogerontology. 2017 18:723-738.

10. Evolúciósan mikor jelennek meg a Pbx1, Nkx2-3/Bapx1, a Tlx1/HOX11 és a Nkx2-5 transzkripciós faktorok?

A Pbx1 gén (valamint gerincesekben a Pbx2, Pbx3 és Pbx4) a három aminosav (PYP) hurok extenziót tartalmazó (TALE) homeobox-tartalmú transzkripciós faktor szupercsalád PBC osztályába tartozik. Muslicában egy (Exd) analógja az embrionális test szegmentálódásért felelős, fonalféregben három rokon gén fordul elő, a Ceh-20 a mezodermális, a Ceh-40 és Ceh-60 a neuronális (dopaminerg és érző idegsejtek) fejlődést szabályozhatja.

Az Nkx3-2 az NK3-gének (Nirenberg-Kim) közé tartozik, amik közül az ecetmuslica NK3 csoportban három tag van (ventrális idegszövet-defektív [vnd], *bagpipe [bap]* és *tinman [tin]*), ezek közül az emlős Nkx3-2 a *bagpipe* analógnak tekinthető, analógjai az összes gerincesben

kimutathatók. Szerepe a gerincoszlop előtti és a gyomor-lép előtelep körüli mezenhíma fejlődésének irányítása.

Az NK4 csoportban lévő tinman analógja az Nkx2-3 és Nkx2-5, zebrahalban még az Nkx2-7, aminek kifejeződése megelőzi az Nkx2-5 gént, míg csirkében az Nkx2-5-tel párhuzamosan megjelenő Nkx-8 a szívfejlődésben valószínűleg redundáns (így az emlős Nkx2-3-hoz hasonló), míg fontosabb szerepet játszik a thymus fejlődésben (az Nkx2-3-tól eltérően).

A Tlx1/HOX11 szintén az NK klaszter tagja, amely homológja már szivacsokban is kimutatható. Eredetüket tekintve a HOX, ParaHox és NK gének egy ősi ProtoHox Metazoa gén-klaszterben helyezkedtek el, feltehetőleg duplikáció és kromoszóma-törések során. Általánosságban feltételezik, hogy a muslicában és szúnyogokban az NK-csoport egységként megmaradt, de előgerinchúrosoktól kezdődően a szegmentálódással és a jobb-bal oldalpreferenciával párhuzamosan három klaszterre vált szét az egyes tagok tandem duplikációjával, mutációkkal, valamint elvesztéssel.

- Schulte D, Geerts D. MEIS transcription factors in development and disease. Development. 2019 146. doi: 10.1242/dev.174706.
- Selleri L, Zappavigna V, Ferretti E. 'Building a perfect body': control of vertebrate organogenesis by PBX-dependent regulatory networks. Genes Dev. 2019 33:258-275.
- Lettice L, Hecksher-Sørensen J, Hill R. The role of Bapx1 (Nkx3.2) in the development and evolution of the axial skeleton. J Anat. 2001 199:181-7.
- Lee KH, Xu Q, Breitbart RE. A new tinman-related gene, nkx2.7, anticipates the expression of nkx2.5 and nkx2.3 in zebrafish heart and pharyngeal endoderm. Dev Biol. 1996 180:722-31.
- Reecy JM, Yamada M, Cummings K, Sosic D, Chen CY, Eichele G, Olson EN, Schwartz RJ. Chicken Nkx-2.8: a novel homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and pharyngeal pouch-2 and -3 endoderm. Dev Biol. 1997 188:295-311.
- Garcia-Fernàndez J. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. Nat Rev Genet. 2005 6:881-92.
- Luke GN, Castro LF, McLay K, Bird C, Coulson A, Holland PW. Dispersal of NK homeobox gene clusters in amphioxus and humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 100:5292-5.
- Holland PW. Evolution of homeobox genes. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2013 2:31-45.
- Coutinho CC, Fonseca RN, Mansure JJ, Borojevic R. Early steps in the evolution of multicellularity: deep structural and functional homologies among homeobox genes in sponges and higher metazoans. Mech Dev. 2003 120:429-40.

11. A PNAd addresszinek vázfehérjéje esetében poszttranszlációs módosításokat végző enzimek (pl. szulfotranszferázok és fukoziltranszferáciok) génexpresszió szabályozásával kapcsolatban kérdezem, hogy a fenti enzimek génjei milyen transzkripciós faktor kötőhelyeket hordoznak? Van-e pl. Nkx2-3 kötőhely a szulfotranszferáz génekben? A fenti PNAd adresszin vázfehérjék mellett milyen más szubsztrátokat módosíthatnak egyidejűleg?

Az Nkx2-3 vaszkuláris hatásának/szerepének megértésében kulcsfontosságú a célgénjeinek meghatározása. Ennek in silico prediktív analízisére különböző online promoter adatbázisok (pl. JASPAR – http://jaspar.genereg.net/, LASAGNA - https://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu stb. vagy Ingenuity Pathway Analysis applikáció), illetve (pl. a Chst2 enzim potenciális egyéb szubsztrát-partnereinek kijelölésére) fehérje interakciós adatbázisok (pl. https://string-db.org/) felhasználásával bioinformatikai módszerek révén van lehetőség. A promoter-szabályozásra vonatkozó predikciót ChIP módszerrel vagy luciferáz stb. riporter eljárással validálhatjuk. Ilyen jellegű tanulmányokat egyelőre nem folytattunk, de a PTE bioinformatikai kutatócsoportjával tervezzük ezek elvégzését, a jelenleg már folyamatban lévő Nkx2-3-hiányos és vad típusú egérből származó lép- és bélminták génexpressziós/mRNS vizsgálatát követően.

12. Milyen pozitív regulátorai vannak a GlyCAM-1 gén expressziójának?

Eddigi információ alapján a GlyCAM-1 génexpressziót a prolaktin indukálja a Jak2/Stat5 részvételével, utóbbi a Glycam promoter két interferon-gamma aktivált hely (GAS1/2) szekvenciákhoz kapcsolódik.

- Hou Z, Srivastava S, Mistry MJ, Herbst MP, Bailey JP, Horseman ND. Two tandemly linked interferon-gamma-activated sequence elements in the promoter of glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1 gene synergistically respond to prolactin in mouse mammary epithelial cells. Mol Endocrinol. 2003 17:1910-20.

13. A Nkx2-3 ko egér lépében csökkent E. Coli megtapadás figyelhető meg. Mennyire általános ez? Vizsgált-e más baktériumot?

Eddig csak ezt az egy baktérium-törzset vizsgáltuk, más baktérium illetve gomba megtapadási jellemzőit nem tanulmányoztuk.

14. Mi a gyakorisága és biológiai jelentősége/szerepe a vörös pulpában a megakaryocytáknak?

Normál vad típusú egérben kisebb csoportokban helyezkednek el, metszetenként 10-30 közötti számban. Eddigi nem publikált adataink szerint TPO-agonista Romiplostin hatására számuk jelentősen megnő. Számuk szintén változhat az életkorral, a gyakoriságukat szexuálhormonok befolyásolják. A lép megakariocitáknak szerepe lehet a helyi plazmasejt niche kialakításában a csontvelői PC-niche gátlása során, ahol elősegíthetik myeloma sejtek korai expanzióját is.

- Teufel S, Grötsch B, Luther J, Derer A, Schinke T, Amling M, Schett G, Mielenz D, David JP. Inhibition of bone remodeling in young mice by bisphosphonate displaces the plasma cell niche into the spleen. J Immunol. 2014 193:223-33.
- Wong D, Winter O, Hartig C, Siebels S, Szyska M, Tiburzy B, Meng L, Kulkarni U, Fähnrich A, Bommert K, Bargou R, Berek C, Chu VT, Bogen B, Jundt F, Manz RA. Eosinophils and megakaryocytes support the early growth of murine MOPC315 myeloma cells in their bone marrow niches. PLoS One. 2014 9:e109018. doi: 10.1371/journal.pone.0109018.

15. Van-e oka, hogy a vizsgálatok során jellemzően nem végeztek 3D rekonstrukciót. Milyen esetben adhatott volna többletinformációt?

Az általunk vizsgált folyamatokban (posztnatális nyirokszövet-fejlődés) illetve az Nkx2-3 mutációban fellépő szövet-összetétel eltérések kimutatására (pl. FDC megjelenése, különböző fenotípusú endotéllel bélelt érképletek elhelyezkedése, vagy ektopiás HEV-ek és ezek addresszin-jellemzőinek vizsgálata, LTβR szerepe stb.) nem volt szükség 3D rekonstrukcióra a szerkezet-analízis során. A különböző kompartmentek közötti kapcsolódást jelentő follikuláris MARCO elhelyezkedésének, illetve a FLAg képletek ér-szerveződésének vizsgálatára az egyes szövetkomponensek közötti térbeli viszony meghatározására használtuk a konfokális mikroszkóp nyújtotta lehetőségeket, ugyanakkor figyelembe kell vennünk ennek korlátait, első sorban a Z-tengely mentén jelentkező csökkent feloldást és teljes szövetmérethez viszonyítottan kis szövet-terület vizsgálhatóságot. A teljes szövet (embrió, teljes nyirokcsomó vagy lép, vagy kiterjedt bélszakasz) 3D rekonstrukciójára a jelenleg legmegfelelőbb eljárás a light sheet fluorescence microscopy (LSFM) lenne, ami számunkra egyelőre nem elérhető. A 3D vizsgálat az egyes stromális komponensek és limfoid sejtek összekapcsolódására vonatkozóan 2-foton mikroszkópos eljárásban nyújthat további értékes információt, ezek elvégzésére reményeink szerint az egyetemen lesz lehetőség.

16. Hogyan látja az *in situ* intratumorális HEV indukción alapuló tumor terápiás megközelítést?

A modern terápiás daganatimmunológia egyik ígéretes iránya az immunkompetens nyirokszöveti aktivitás erősítése a daganat-terjedési folyamatok egyidejű gátlásával. Egy korábbi megfigyelés szerint számos tumorban megjelenő limfoid infiltrátumban előforduló HEV-jelenlét jobb lefolyással párosult (kevesebb relapszus, hosszabb remisszió), felvetve a HEV-indukció elvi terápiás lehetőségét. Ezek a HEV-indukcióra képes, és esetenként komplex struktúrálódást (nyiroktüsző, csíracentrum, T-sejtes zóna) mutató képletek tercier nyirokszövetnek tekinthetők, képződésükben a szekunder nyirokszöveti morfogének (elsősorban LTβ-közvetítő sejtek, gyakran dendritikus sejtek) vesznek részt. A közelmúltban merült fel ezeknek a specializált érszegmentumoknak a VEGFR2/PD-L1 kombinált gátlásával, valamint az erre refrakter tumorokban a LTβR-agonista kezeléssel elért terápiás indukciója. További terápiás lehetőségként (HEV-irányú tanszdifferenciáció nélkül, de fokozott leukocita-adherencia révén) gyulladásos citokinek és megfelelő effektor T-sejt/NK-sejt megtelepedést irányító kemokinek alkalmazásával is fokozható az addig „immune desert cancer" területek hatékony immunterápiája. Ez egyben szabályozhatja az adott területre irányuló limfocita-összetételt, ezáltal csökkentve az immunszuppresszív aktivitású, így tumorprogressziót elősegítő limfociták felhalmozódását. Ez az eljárás különböző tumorszöveti mikrokörnyezet (tüdő, bél, hasnyálmirigy, petefészek stb.) esetében szövet-specifikus modulációt igényel, és az egyébként is HEV-tartalmú limfoid daganatok valószínűleg kivételt jelentenek.

- Martinet L, Garrido I, Filleron T, Le Guellec S, Bellard E, Fournie JJ, Rochaix P, Girard JP. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. Cancer Res. 2011 71:5678-87.
- Martinet L, Filleron T, Le Guellec S, Rochaix P, Garrido I, Girard JP. High endothelial venule blood vessels for tumor-infiltrating lymphocytes are associated with lymphotoxin β-producing dendritic cells in human breast cancer. J Immunol. 2013 191:2001-8.
- Allen E, Jabouille A, Rivera LB, Lodewijckx I, Missiaen R, Steri V, Feyen K, Tawney J, Hanahan D, Michael IP, Bergers G. Combined antiangiogenic and anti-PD-L1 therapy stimulates tumor immunity through HEV formation. Sci Transl Med. 2017 9:eaak9679. doi: 10.1126/scitranslmed.aak9679.
- Duru G, van Egmond M, Heemskerk N. A Window of Opportunity: Targeting Cancer Endothelium to Enhance Immunotherapy. Front Immunol. 2020 11:584723. doi: 10.3389/fimmu.2020.584723.

17. Milyen mechanizmust feltételez az Nkx2-3 hiányában megfigyelt DSS-sel szembeni protektív hatás mechanizmusára a tunica muscularis mucosae-ban elhelyezkedő VAP-1 pozitív nem haematopoietikus sejtek révén?

A DSS-provokált colitis hatásmechanizmusa elsősorban kémiai detergens-irritáns hatás által kiváltott intesztinális barrier-károsodás, amit a károsodott hámon keresztül bélbaktérium-kolonizáció miatti gyulladás követ. Szintén fontos kórtani összetevő lehet a mucin-összetétel (transzmembrán Muc1 és Muc4 illetve szekretált Muc2) megváltozása és szulfatáltsági állapottól függő viszkozitása, valamint a DSS bélflórára kifejtett hatása. Emellett a gyulladás kiválthatósága az állatházi körülményektől (germ-free, SPF illetve konvencionális) és egértörzstől (a BALB/c általában érzékeny) függően is eltérő lehet.

Az Nkx2-3 hiánya feltehetőleg a hám fokozott regenerációján keresztül enyhíti a colitis súlyosságát, amiben a bélhám őssejt-zug szabályozásának a megváltozása lehet az elsődleges tényező. Ennek lehetőségét egy korábbi cikkben a bőr és bél miofibroblasztok közötti különbség vetette fel, ahol az Nkx2-3 a bél vAP-1-pozitív miofibroblaszt (esetleg alcsoportja) specifikus markere. A hatásmechanizmus egyelőre nem ismert, felderítésében ezen sejtek izolálása és Lgr-5+ intesztinális hám-őssejtekkel való kölcsönhatásainak munkacsoportunk által már elkezdett vizsgálata adhat felvilágosítást.

- Eichele DD, Kharbanda KK. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. World J Gastroenterol. 2017 23:6016-6029.
- Hsia LT, Ashley N, Ouaret D, Wang LM, Wilding J, Bodmer WF. Myofibroblasts are distinguished from activated skin fibroblasts by the expression of AOC3 and other associated markers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 113: E2162-71.
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature. 2007 449:1003-7.

18. Jelen vannak-e FLAg képletek más savós hártyával határolt üregekben is (pl. pericardium)?

A perikardiális zsírszövetben találtunk FLAg képleteket, de ezek szerkezeti analízisét és a hasi FLAg struktúrákkal való összehasonlítását még nem végeztük el.

19. Mi lehet a FLAg képletek fiziológiás szerepe?

Feltételezhetően vagy egy hatékonyabb peritoneális B-sejt megkötésben, vagy B-sejt válaszok facilitálásában játszhatnak szerepet.

20. Intraperitoneális immunizálást (Ag+adjuváns) követően megfigyelhető-e változás a FLAg-ekben?

Ilyen kísérletet egyelőre nem végeztünk, ugyanakkor intraperitoneális zimozán hatására mind a FLAg-ok száma, mind azok mérete szignifikánsan megnőtt.

21. A 140. oldalon a 6.69 A (hasfalon keresztüli) és B (a hasüreg felnyitása utáni) fluorescens jel eloszlás igen eltérő. Mi lehet ennek az oka?

Elképzelésünk szerint a bélfodorban megfigyelt fokális B-sejt akkumuláció fluoreszcenciájának kontrasztosságát a közbeiktatott szövetek (hasfal, bőr stb.) valamint a bélmozgások együttesen torzítják.

22. A 142. 6.71 ábra címe: „Szerozális limfoid organoidok megjelenési formái”. Mi alapján definiálja organoidként a FALC, protrusion és FLAg képleteket? Ismer-e más *in vivo* organoid megjelenési formát?

A megjelenésükben jelentős különbségek vannak, ami alapján a diffúz, felületi elrendeződésű FALC, a megvastagodó és a széles alapon nyugvó, felületből kiemelkedő protrúzió és a rövidebb tömzsi vagy hosszabb vékony nyéllel kapcsolódó FLAg elkülöníthető.

Ismételten köszönöm Buzás Edit akadémikus bírálatát és az értekezésem elfogadását támogató véleményét. Bízom benne, hogy az észrevételeire és kérdéseire adott válaszaimat is megfelelőnek találja.

Dr. Balogh Péter

Pécs, 2021. 01. 31.