

VÁLASZ

Dr. Czirják Lászlónak

a Dr. Mócsai Attila MTA Doktori Értekezésére adott opponensi véleményére

Köszönöm Dr. Czirják Lászlónak az értekezés alapos bírálatát és méltató szavait. Klinikailag orientált alapkutatóként nagy öröm, de egyben nagy kihívás is Magyarország egyik vezető reumatológusának bírálatát olvasni. A dolgozattal kapcsolatos, a reumatológiai betegségek molekuláris alapjait mélyen érintő kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

Általános megjegyzés: ...az autoimmun gyulladásos betegségek prototípusaként a jelölt a rheumatoid arthritis immun-patomechanizmusát érinti, röviden. Megjegyezném, hogy ez a kérdés vita tárgya, a rheumatoid arthritist általában nem tekintjük „klasszikus” modell autoimmun kórképnek, annak igen komplex patomechanizmusa miatt. Az arthritis állat modellek és a rheumatoid arthritis (és más autoimmun kórképek) kapcsolata egyébként is egy problematikus kérdés, az biztos, hogy nem egyetlen, hanem több arthritises modell együttes elemzése, talán közelebb visz a rheumatoid arthritis immun pathomechanizmusának megértéséhez.

Talán tényleg szerencsésebb lett volna a rheumatoid arthritist nem mint az autoimmun betegségek prototípusát tárgyalni, de abban szerintem széles egyetértés mutatkozik, hogy a betegség létrejöttének jelentős autoimmun komponense van. Az állatkísérletekkel kapcsolatban messzemenően egyetérték a bírálóval, miszerint nem szabad túlzott következtetéseket levonni egyetlen állatmodell alkalmazásából. A laborban folyamatban van számos más in vivo gyulladásos modell beállítása; az ezekkel kapott eredmények jelentősen befolyásolják a humán betegségekre való extrapolálhatóság mértékét.

1. Véleménye szerint lehet-e kapcsolat az allergiás reakciókban kimutatott, a humán neutrofileken, hízósejteken és bazofileken expresszáldó, a szabályzó funkciókat betöltő FcγRIIIA és FcγRIV, valamint az allergiás reakció triggerelésében szerepet játszó FcγRIIA család és a PLCγ2 között?

Bár saját magunk nem vizsgáltuk a PLCγ2 szerepét humán sejtekben (és nem is rendelkezünk ehhez megfelelő eszközökkel, pl. specifikus gátlószerekkel), a PLCγ2 humán immunológiai folyamatokban való részvételére több humán funkcionyeréses PLCγ2-mutáció is utal^{1,2}, melyek közös jellemzője az immunológiai és gyulladásos folyamatok kóros aktiválódása és következményes autoimmun és autoinflammatorikus betegségek megjelenése. Az egyes mutációk sejtszintű vizsgálata nagyon összetett képet mutat, ezért azokra nem térek ki részletesen.

2. Kísérletileg bizonyította, hogy a Syk alapvető szerepet játszik a neutrofileknek az adherens aktivációt követő szabadgyök termelésében. Nagyon demonstratív a Syk/- neutrofilekben a „downstream” jelpályák foszforilációs mintázatának összehasonlító vizsgálata a vad típusú neutrofilekkel. Ismertek a szisztémásan adott fostamatinib

gátlószerezrel humán rheumatoid arthritisben kapott pozitív eredmények és a komoly mellékhatások is. Miért tűnik rheumatoid arthritisben a tofacitinib talán hatásosabbnak, mint a fostamatinib, és miért kevesebb a mellékhatása?

Ez egy nagyon összetett kérdés, amivel kapcsolatban én is csak spekulálni tudok. Bár a Syk teljes genetikai hiánya számos folyamatot gátol, a fostamatinib-et kifejlesztő munkacsoporttal történt beszélgetéseim alapján humán terápiában a Syk-nek csak mintegy 50%-os gátlását tűzték ki célul, ami magyarázhatja a kisebb mértékű hatékonyságot. A fostamatinib és a tofacitinib hivatalosan megnevezett elsődleges célmolekulái (a Syk, illetve a Jak-kinázok) eltérnek egymástól, ami szintén magyarázhatja a különböző hatás- és mellékhatás-spektrumot. Egy 2011-ben megjelent Nature Biotechnology közlemény³ szerint ráadásul a fostamatinib kb. 40 másik kinázt gátol a Syk-nél hatékonyabban, miközben a tofacitinib-re legérzékenyebb 4 kináz pont a Jak-család négy tagja. Az eltérő hatás- és mellékhatás-spektrumot az eltérő mértékű specificitás is magyarázhatja.

3. Lehetségesnek tartja-e, hogy a Syk blokkolásával új, nem szisztémásan, hanem inkább lokálisan alkalmazható gyulladáscsökkentő gyógyszerek is kifejleszthetők?

Igen, mindenképpen, sőt a lokális alkalmazás a mellékhatásokkal kapcsolatos problémák egy részét is kiküszöbölhetné. A fostamatinib-et kifejlesztő Rigel cég a Syk-gátlószereket eredetileg allergiás rhinitis és egyéb légzőszervi betegségek kezelésében tervezte alkalmazni⁴, és csak utólag (tudomásunk szerint részben a saját eredményeink alapján) merült fel a szisztémás alkalmazás lehetősége. Nem publikált saját kísérleteinkben ezen túlmenően azt találtuk, hogy a Syk genetikai hiánya meggátolja az autoantitest-indukált bőrgyulladás és a kontakt hiperszenzitivitás létejét is, ami a Syk-gátlószerek esetleges lokális dermatológiai alkalmazását tenné lehetővé.

4. Nehezen elképzelhető, hogy a Syk ITAM-függő aktiválódásával „szemben” nincs fiziológiásan egy gátló (pl. ITIM függő) útvonat. Mi a jelölt véleménye erről?

Természetesen van számos gátló folyamat. Mind az Fc-receptorok⁵, mind az integrin-jelátvitel⁶ esetén kimutatták az ITIM-jelpályák gátló szerepét. A Syk ezen túlmenően ubikvitinálódik is, ami a fehérje degradációját és inaktiválódását eredményezi⁷.

5. A neutrofilek igen aktív szereplők az autoimmun folyamatokban. Milyen új, igényes metodikák kidolgozására lenne szükség a kérdés vizsgálatára? A neutrofil sejtek könnyen izolálhatók. Van-e javaslata arra, hogy néhány fontos „modell” betegségben, a fenti útvonat immun-patofiziológiai jelentősége autoimmun-autoinflammációs kórképekben hogyan vizsgálható?

A kérdés humán betegségek esetében nagyon bonyolult, mert nincs megfelelő eszköz, amivel jelentős mellékhatások veszélye nélkül lehetne a neutrofileket gátolni vagy a számukat csökkenteni. Utóbbira egyébként granulocitaferézis formájában voltak biztató próbálkozások rheumatoid arthritisben⁸, de a módszer nem vált szélesebb körben ismertté, feltételezhetően a megközelítés nehézsége, költsége és a lehetséges mellékhatások miatt. In vitro körülmények között ugyanakkor számos kísérlet történt humán neutrofilek autoimmun folyamatokban való részvételének vizsgálatára (ezekről részletesen írtunk egy nemrégiben megjelent összefoglalóban⁹). Egérkísérletekben mindez sokkal egyszerűbb, ekkor mind antitest-mediált deplációval¹⁰, mind különböző genetikai megközelítésekkel¹¹⁻¹⁴ csökkenteni lehet a neutrofilek számát, miáltal lehetővé válik azok funkcionális szerepének a vizsgálata.

6. Milyen teszt rendszer lenne jó a „megfelelő” betegségek kiválasztására, ahol a Syk inhibíció vizsgálatának van értelme? Gondolnék a lupusban észlelhető (NETs-hez köthető) aktiválódásra, a pulmonalis fibrosist okozó neutrophil alveolitisre, és a neutrophil dermatosisokra. Másképpen fogalmazva: milyen jelátviteli utakat lehetne szűrni és milyen módon?

Minket is aktívan érdekel, hogy a NET-képződéshez szükség van-e a Syk-re. Az egyéb betegségekben nagyon nehéz megmondani, hogy a Syk funkcionális szerepet játszik-e emberben. Esetleges szűrővizsgálatként felmerül a Syk foszforilációjának vizsgálata szövettani biopsziában foszfo-specifikus anti-Syk-antitestekkel. De félek, hogy az egyes betegségek pathomechanizmusának részletesebb megértését nem lehet „megspórolni”.

7. További kérdésem, hogy a kóros granulóma képződéssel járó kórképekben érdemes-e a Syk utat gátolni? A jelölt az összefoglalójában utalt rá, hogy ennek bizonyos vasculitisekben is lehet jelentősége.

Szerintem ennek egyértelműen lenne értelme, különösen mivel a neutrofilek fontos kóroki szereplők és gyakran autoantitestek (pl. ANCA) is kialakulnak, melyek feltételezhetően Syk-függő módon fejtik ki hatásukat.

Általános kérdés: Az oralisan szedhető JAK 1/3 inhibitor tofacitinibet a közelmúltban regisztrálta az FDA rheumatoid arthritisben, a Syk inhibitor fostamatinibbel pedig reménytelen klinikai vizsgálatok folynak rheumatoid arthritisben. Az opponensben maradt ezért némi hiányérzet, hiszen az utóbbi időben a klinikai immunológia egyik leggyorsabban fejlődő területéről van szó, és ennek diszkutálása csak nagyon visszafogottan történt meg az értekezésben, pedig manapság már az alap kutatás szintű eredmények nagyon gyorsan átkerülnek a klinikumba.

Sajnálom, hogy ezzel kapcsolatban hiányérzetet okoztam az opponensben. Dolgozatom célja saját eredményeim bemutatása és a nemzetközi irodalmi környezetbe helyezése volt, de az ezen túlmutató irodalmi adatok „referálása” már terjedelmi korlátok miatt sem volt lehetséges. Ez különösen igaz az egyes jelpályák biológiai szerepének a sokrétűsége, illetve a gátlószerek kérdéses specifitása miatt - ezek tárgyalása nem fért volna bele a dolgozatba, nélkülük pedig félek, hogy félrevezettem volna az olvasót.

Még egyszer köszönöm Dr. Czirják László alapos és gondolatébresztő bírálatát és kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2013. febr. 10.



Dr. Mócsai Attila
egyetemi docens
Semmelweis Egyetem
ÁOK Élettani Intézet

Hivatkozások jegyzéke

1. Ombrello MJ, Remmers EF, Sun G, Freeman AF, Datta S, Torabi-Parizi P, Subramanian N, Bunney TD, Baxendale RW, Martins MS, Romberg N, Komarow H, Aksentijevich I, Kim HS, Ho J, Cruse G, Jung MY, Gilfillan AM, Metcalfe DD, Nelson C, O'Brien M, Wisch L, Stone K, Douek DC, Gandhi C, Wanderer AA, Lee H, Nelson SF, Shianna KV, Cirulli ET, Goldstein DB, Long EO, Moir S, Meffre E, Holland SM, Kastner DL, Katan M, Hoffman HM and Milner JD: Cold urticaria, immunodeficiency, and autoimmunity related to PLCG2 deletions. *N Engl J Med* 2012, 366: 330-338.
2. Zhou Q, Lee GS, Brady J, Datta S, Katan M, Sheikh A, Martins MS, Bunney TD, Santich BH, Moir S, Kuhns DB, Long Priel DA, Ombrello A, Stone D, Ombrello MJ, Khan J, Milner JD, Kastner DL and Aksentijevich I: A hypermorphic missense mutation in PLCG2, encoding phospholipase Cy2, causes a dominantly inherited autoinflammatory disease with immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 2012, 91: 713-720.
3. Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, Ciceri P, Wodicka LM, Pallares G, Hocker M, Treiber DK and Zarrinkar PP: Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* 2011, 29: 1046-1051.
4. Meltzer EO, Berkowitz RB and Grossbard EB: An intranasal Syk-kinase inhibitor (R112) improves the symptoms of seasonal allergic rhinitis in a park environment. *J Allergy Clin Immunol* 2005, 115: 791-796.
5. Daron M, Jaeger S, Du Pasquier L and Vivier E: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol Rev* 2008, 224: 11-43.
6. Pereira S, Zhang H, Takai T and Lowell CA: The inhibitory receptor PIR-B negatively regulates neutrophil and macrophage integrin signaling. *J Immunol* 2004, 173: in press.
7. Mócsai A, Ruland J and Tybulewicz VL: The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 2010, 10: 387-402.
8. Ohara M, Saniabadi AR, Kokuma S, Hirata I, Adachi M, Agishi T and Kasukawa R: Granulocytapheresis in the treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Artif Organs* 1997, 21: 989-994.
9. Németh T and Mócsai A: The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett* 2012, 143: 9-19.
10. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS and Albina JE: Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 2008, 83: 64-70.
11. Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Traver D, Bronson RT, Cameron S and Orkin SH: Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* 2003, 18: 109-120.
12. Jonsson H, Allen P and Peng SL: Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis. *Nat Med* 2005, 11: 666-671.
13. Dzhagalov I, St John A and He YW: The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood* 2007, 109: 1620-1626.
14. Ordonez-Rueda D, Jonsson F, Mancardi DA, Zhao W, Malzac A, Liang Y, Bertosio E, Grenot P, Blanquet V, Sabrautzki S, de Angelis MH, Meresse S, Duprez E, Bruhns P, Malissen B and Malissen M: A hypomorphic mutation in the Gfi1 transcriptional repressor results in a novel form of neutropenia. *Eur J Immunol* 2012, 42: 2395-2408.