



4032 Debrecen, Nagyerdei krt.98. Levelezési cím: 4012. Debrecen Pf. 104.,
Telephone: +36-52-314-091, fax: +36-52-414-489, e-mail: szekanecz.zoltan@med.unideb.hu

Bírálat

Dr Mócsai Attila

„Hemopoetikus eredetű sejtek jelátvitelére egészséges és kóros körülmények között”

c. MTA doktori értekezéséről

A Semmelweis Egyetem Élettani Intézetben folytatott nagyszerű tudományos munka produktumát volt alkalmam bírálni. A bíráló nem állhatja meg, hogy a bírálat megírásának kezdetén feltegyen egy személyes kérdést: miért csak most? A disszertációt olvasva, a publikációs listát átnézve és általában Dr Mócsai Attila hazai és nemzetközi tudományos pályafutását többé-kevésbé követve nyilvánvaló, hogy a teljesítmény többszörösen meghaladja az MTA doktori fokozattal szemben támasztott követelményeket, sőt, óvatosan jegyzem meg, több hazai akadémikus is megirígyelhetné ezt a teljesítményt... Ez akkor is igaz, ha tudjuk, hogy a munka jelentős része külföldön vagy nemzetközi kollaborációban készült, de ez inkább pozitívum. A külföldi ösztöndíjasok számottevő része ugyanis itthon nem tudja hasonló szinten folytatni a tudományos munkát, ez alól Mócsai dr egyértelmű kivétel, hiszen hazatérve, munkacsoportot alakítva, itthonról is a korábbihoz hasonló ütemben és minőségben közöl.

Ez egyben azt is jelenti, hogy a bíráló kicsit kényelmetlenül érzi magát, hogy J Immunol, Immunity, PNAS, Nature Immunology, J Exp Med folyóiratokban publikált adatsorokkal szemben, melyeket az adott újságok bírálói nyilván már ízekre szedtek, bármilyen komoly kritikát fogalmazzon meg. Persze a munkát ilyen kritika amúgy sem érheti.

A scientrometria valóban kiemelkedő: az értekezés alapjául szolgáló 18 közlemény össz-impakt faktora 212,5, szerény számítás szerint ez 11,8-as cikkátlagot jelent... Emellett

további 16 közlemény szerepel még a listában, melyek össz-impakt faktora 164,2 (ez is 10,3-as átlagot jelent). Mindez azt is jelenti, hogy a szerző szinte csak minőségi folyóiratokban közölt. Így a magyar bíráló legfeljebb azt az ilyenkor szokásos kritikát fogalmazhatja meg, hogy egy-két hazai összefoglaló születhetett volna, mely magyar nyelven áttekinti a témát azok számára, akik nem férhettek hozzá minden közleményhez.

Ilyen teljesítmény mellett talán nem is lenne indokolt egy 107 oldalas disszertációt külön megírni, de a munka megszületését mégis fontosnak tartom, mert így, a szerteágazó és klinikusok, alkalmazott kutatók számára talán nehezen érthető és áttekinthető adathalmaz egy közös logikai rendszerbe van ágyazva. Egyben ez a magyar nyelvű disszertáció némileg pótolja is a magyar összefoglalót amire korábban utaltam.

A munka mindenben megfelel az MTA doktori értekezésekkel szemben támasztott követelményeknek. A Bevezetés 13, a Módszertan 12 oldal, ami megfelelően rövid és tömör összegzést tesz lehetővé. Miután a munka 3 főtéma, és ezen belül 7 kulcskérdés köré van építve, jó ötletnek tartom az Eredmények és a Megbeszélés összevonását 69 oldalban, mert így az adatok leírásához kapcsoltn egy-egy résztéma esetében azonnal megkapjuk a magyarázatot is.

Formai szempontból az egyetlen kifogásom, hogy az ábrák, és ebből következően az ábrákon szereplő feliratok sokszor túl kicsik, ami legalábbis sokdioptriás szemüvegeseknek az ábrákon való eligazodást megnehezíti. (Pl a 15., 16. ábrák kimondottan nehezen olvashatók.) A szerző nyilvánvalóan a terjedelemmel kívánt sáfárkodni, de az ábrák, legalábbis a grafikonokat tartalmazók, lehetnek volna teljes oldalszélességűek vagy egynegyed-fél oldal kiterjedésűek. (Megjegyzem, hogy a munkához csatolt 5 cikkben sem sokkal jobb a helyzet, miközben megértem hogy a sokoldalú megközelítés igénye hatalmas, több ábrából álló táblák készítését igénylik...) Formai szemponthoz tartozik az is hogy a dolgozatban nagyon kevés az elütés vagy más nyelvtani hiba, ami igen dicséretes (pl 30. old., 6. bek mintás helyett minták; 48. old., 3. bek. integinek h. integrinek.)

Ami a tartalmi részt illeti, a Célkitűzésekből is kiderül, hogy a jelölt tehát 3 főtéma (hemopoetikus sejt-jelátvitel, gyulladásos betegségmodellek és csontanyagcsere) köré építi fel mondandóját. Egyértelműen a legnagyobb szelet az első főtéma, amelyhez a 7 altémából 4

tartozik. Terjedelmileg is a 69 oldalas Eredmények-Megbeszélés fejezet kétharmada erről szól.

Az *első főtéma* (neutrophil jelátviteli mechanizmusok) fő üzenete, amint azt a szerző is írja a Bevezetésben, egy dogma egyértelmű megdöntése. Más szerzők eredményei korábban azt sugallták, hogy az immunreceptorok és az adhéziós molekulák (integrinek) jelátviteli mechanizmusai alapvetően eltérnek. Mócsai dr munkájából, több oldalról is bizonyítékokkal alátámasztva valóban elfogadható, hogy a receptor-ITAM-Syk/Zap70-PLC γ /SLP-76/65 kaskád és a Src, Fyn, FAK, Ras, Raf, Erk kinázok mindkét alapvető receptortípus esetében alapvető jelentőségű. Ez a nagyszerű felfedezés egyértelmű párhuzamot von az immun- (T-sejt, B-sejt, Fc) receptorok és az integrinek funkciója, az antigénfelismerés/sejttaktiváció illetve a sejtheadhézió között is, amit évtizedekig valóban nehezen lehetett egy kalap alá hozni. A terápiás lehetőségek oldaláról megközelítve a dolgot pedig az ezen rendszerekre nem specifikus módon (pl. TNF vagy B-sejt gátló, T-sejt gátló biológikumok) vagy specifikusan (Syk gátló-fostamatinib, integrin gátló-natalizumab, efalizumab, alefacept) ható célzott terápia (biológikumok és kis molekulásúlyú tirozinkináz-gátlók) nem véletlenül multiplex hatású, hiszen többféle receptorrendszerben fejtenek ki egyidejű gátló hatást.

Ehhez a témához néhány érdeklődő, inkább a jobb megértést szolgáló kérdés, felvetés (hiszen egyébként az adatok magukért beszélnek):

1. Mind a négy altéma döntően a neutrophilekkel kapcsolatos. Reumatológusként is érdekelne a többi sejttípus is, hiszen pl rheumatoid arthritisben (RA) csak a folyamat kezdetén vesznek részt a neutrophilek az acut-subacut gyulladásban, később az RA egyértelműen monocyta/macrophag illetve T-sejtes betegség. Más kórképekben (pl. SLE, Sjögren syndroma, scleroderma) pedig szinte elenyésző a neutrophilek szerepe. A granulocytákra tett számos megállapítás közül, saját vagy irodalmi adatok alapján, melyek érvényesek más hemopoetikus sejtekre is?
2. A Módszertani részből is kiderül, hogy a chemokineknek fontos szerepe van a neutrophil migrációban és aktivációban, sőt az adhézióban is. A munkacsoport aktiválásra a MIP-2-t használja. Kérdésem, hogy miért pont ezt, hiszen egérben más,

talán erősebb neutrophil kemotaktikus hatással rendelkező CXC chemokinek is vannak.

3. A módszertan és az adatok végig egzaktak, de helyenként a szerző igen őszintén de liberálisan fogalmaz („általában”, „kivételesen”, stb) ami nem mindig világos. Egy példa, hogy a 34. oldal 2. bekezdésben a K/BxN arthritis kiváltása „400 ul, kivételesen 150 ul szérummal” váltható ki. Ilyen esetben mit értsünk „kivételesen” alatt, illetve ha van olyan helyzet, amikor 150 ul szérum is elég, akkor a többi esetben miért kell 400 ul? Ezen protokollok tehát nem feltétlenül vannak kőbe vésve?
4. A LAD1 az integrinek, a LAD2 a szelektinek hiányán alapuló betegség. Jelátviteli útvonal bármely elemének (pl Syk -/-) deficienciája megnyilvánul-e LAD-szerű kórképben? (Pl. a 37. oldalon a súlyos nyirokérfejlődési zavar kerül említésre.) Van-e köldökzsinór-fejlődési rendellenesség, heterozigótákban fertőzések, stb? A Syk gátlása (fostamatinib) során vannak-e hasonló jelenségek, mint a Syk-deficiens állatban?
5. Syk-deficienciában mely típusú integrinek működése károsodik? Csak a leukocyta integrineké ($\beta 2$) vagy a többié is?
6. Syk-deficiencia és egyéb integrin-jelátviteli károsodás esetén milyen egyéb szövetfejlődési eltérések figyelhetők meg? Károsodik-e pl a nyirokszövetek, pl a bélfalli Peyer-plakkok szerveződése (ebben pl a $\beta 7$ integrineknek alapvető szerepe van).
7. Számos neutrophil funkció nem károsodik Syk-deficiencia esetén (39. oldal). Milyen egyéb szignálmechanizmusok veszik át a Syk szerepét? Van-e kaszkád ezen mechanizmusok között? A 41. oldalon olvasható, hogy Syk -/- esetén a p38 MAP kináz expressziója is károsodik. Milyen molekuláris interakció van a Syk és a p38 MAPK között? A fostamatinib vajon gátolja-e a p38 MAPK mechanizmusokat is? Mivel már klinikai kipróbálásban is vannak (voltak) p38 MAPK gátlók (pl a szerző által is vizsgált SB203580), felmerül, hogy ezen MAPK gátlása esetén hogyan változik a Syk expressziója és funkciója?

8. Az ITAM fehérjék közül a DAP12 és FcR γ hiánya milyen klinikai fenotípust eredményez? Itt vannak-e LAD-szerű eltérések? (Később kiderül hogy egyéb alaki és csontfejlődési eltérések igen.)
9. Mint láttuk, a chemokinek fő induktorai a neutrophil migrációnak és aktivációnak. A vizsgált szignálútvonalak és messenger fehérjék közül melyek vesznek részt a chemokin receptorok szignalizációjában? Ismeretes, hogy a chemokin receptorok pl. az integrinokkal is funkcionális kapcsolatban vannak, és a chemotaxis az adhézióval párhuzamosan zajló folyamatok. A chemokin receptorok aktiválódása esetén van-e olyan inside-out mechanizmus mely révén az integrinek expressziója és funkciója megváltozik?
10. Ha az alapmegfigyelés igaz, vagyis az immunreceptorok és az integrinek jelátvittele hasonló, ez hogyan nyilvánul meg a kétféle receptor stimulációja által kiváltott válaszok egymást erősítő jellegében? A T vagy B sejt stimuláció ismeretes módon az adhéziós fehérjék fokozott expresszióját eredményezi (inside-out integrin signalling). Másrészt két leukocita integrinek általi összetapadása aktiválja a sejteket, növeli a BCR expressziót és mediátorok felszabadulását is (outside-in signalling). Melyek az ilyen crosstalk szempontjából legfontosabb közös intracelluláris jelátviteli fehérjék?
11. Ezzel szemben az SLP-76 arra jó példa hogy az adhézió és aktiváció szétkapcsolt folyamatok is lehetnek, hiszen az SLP hiányában az adhéziós, migrációs folyamatok károsodnak, a gyulladásos mediátorok (TNF, fMLP) által kiváltott aktiváció viszont nem. Milyen klinikai fenotípust alakít ki az az SLP-hiányos neutrophil, amely, a LAD-hoz hasonlóan, nem adherál és migrál, de egyéb funkciói megtartottak? Mivel SLP hiányában a normál adhézió, migráció károsodik, de a gyulladásos mediátorok által kiváltott funkciók nem, ez jelentheti-e azt hogy az SLP a fiziológiás (homeosztatikus) adhéziós folyamatokban vesz részt, a gyulladásosokban (pl arthritis) nem? Az arthritis részben (később) már nincs szó az SLP-ről. Nincs is tehát abban szerepe, vagy csak nem vizsgálták?

12. A p190RhoGAP-deficiens állatokban mi lehet a velőűr-záródási rendellenesség mechanizmusa? Döntően a folyamat során végig szerepet játszó integrinek működészavaráról van szó?
13. A thrombocyták integrin-függő adhéziójának vizsgálata során a Src kinázok és Syk hiánya esetén károsodott a gpIIb/IIIa integrin-dependens adhézió (szétterülés). A klinikai gyakorlatban, akut coronaria syndromában használnak anti-gpIIb/IIIa antitestet (Integrilin). Érdekes lenne az anti-integrin kezelés hatását megnézni a disszertációban szereplő jelátviteli mechanizmusokra. Src és Syk-deficiencia esetén látunk-e Glanzmann thrombastheniára jellemző fenotípust?
14. Nagyon érdekes és fontos adat, hogy az Fc γ RIII fontos az anti-integrin antitestek aktivációs hatásához. Ennek analógja, hogy egyre több adat mutat arra, hogy pl. a terápiában alkalmazott anti-CD20 antitest rituximab hatékonysága összefügg az Fc γ RIII gén 158-V/F polimorfizmusával. Kérdés, hogy a Fc γ R génpolimorfizmusok is megváltoztathatják-e az integrinek sejtadhézióban és aktivációban kifejtett hatását?
15. A főtéma neutrophil migrációs részének legfontosabb, és a szerző által is legtöbbet vitatottnak tartott, de egyértelműen alátámasztott kérdése azon dogma zseniális megdöntése, hogy az integrin adhéziós funkcióján keresztüli sejtaktiváció illetve sejtmigráció teljersen más szignalizációt igényel. (Korábban valóban csak „egyféle” adhézió terjedt el a köztudatban) Kérdés, hogy a migrációban szerepet NEM játszó Syk, Src, ITAM és egyéb fehérjék helyett mely útvonalak vesznek részt a migrációban? A tofacitinibbel végzett in vitro kísérletek arra utalnak, hogy a JAK1 és/vagy JAK3 szerepet játszhat a leukocita migrációban. Vagy esetleg az ezen munkában vizsgált p38 MAPK utvonal lenne a bypass mechanizmus? Vajon a p38 MAPK és a JAK deficienciája, vagy gátlása (a szerző által is alkalmazott SB203580-cal illetve tofacitinibbel) befolyásolja-e a leukocita migrációt? Esetleg itt is a crosstalknak lehet szerepe és az integrin-közvetített migrációt végső soron más adhéziós molekulák végzik? Számos adhéziós molekula (pl. CD31, CD66 és mások) kolokalizációban (co-capping) helyezkedik el a β 2 integrinnel. Másrészt a többlépcsős adhéziós modell szerint míg az adhézió főleg integrin-dependens, addig a

transendothelialis migrációban már más adhéziós molekulák (pl. CD31, CD44) is szerepet játszanak. Lehetséges-e hogy amíg az adhézió-dependens aktiváció valóban főleg integrin-dependens, addig a migráció végülis ezeken keresztül megy végbe és ezáltal a szignálátviteli fehérjék is eltérőek, mint az integrin szignalizációban? Ezzel az adhézió „four-step” modelljét alapjaiban át kell még egyszer gondolni...

A *második főtéma* (arthritis) az első főtémában leírt alapkutatási, sejtes adatokat ülteti át az alkalmazott immunológiába. Itt már nem mindegyik folyamatot viszi tovább, hanem az arthritis szempontjából legfontosabbakat (Syk, PLC γ , p190RhoGAP és PI3K kináz izoformák). Ezzel kapcsolatos kérdéseim a következők:

1. Hogyan történt a bokavastagság mérése? Ez a Módszertan részben röviden kerül említésre, az ábrákon mm-ben van kifejezve, tehát valószínűleg egy dimenzióban történt. Melyik tengelyen mérték a vastagságot? Esetleg két merőleges vastagságra illesztett ellipszis alapján meghatározott bokakörfogat még jobban tükrözte volna a bokavastagságot. (Mi adjuváns-indukált arthritisben ezt használtuk.)
2. Egyéb klinikai tünetekkel (pl. testsúly, vérkép, stb) jellemezték-e az arthritist? Az ízületi score-okon kívül ugyanis ezen modellekben jelentős testsúlyvesztés figyelhető meg, és egerből is lehet annyi vért nyerni, hogy egy kenetet készítve jellemezhesük a sejtes összetételt, aminek a gyulladás, ezen belül a neutrophilek szerepének vizsgálata során jelentősége lehet.
3. Van-e korreláció az ízületi duzzanat (vastagság) és funkció (rácson maradás) között?
4. Számomra a legizgalmasabb, megválaszolandó kérdés, hogy amíg az első főtémában egyértelműen kiderült, hogy a Syk nem játszik komoly szerepet a leukocita migrációban, addig itt a Syk kiütése a synovialis gyulladás megszűnéséhez vezetett, vagyis Syk hiányában, legalábbis ezen egérmódelben, nincs, jelenlétében pedig van ízületi gyulladás. Milyen olyan gyulladásos, sejtes jelenség(ek) lehet(nek) az(ok), amely(ek) egyértelműen Syk függő(ek) ezen módelben, de nem a neutrophil migrációt jelentik?

A *harmadik főtéma* (osteoclastok) az autoimmun-gyulladásos csontvesztés (osteoimmunológia) egyes aspektusainak jobb megértését célozza. Ez rendkívül fontos nemcsak az általános csontvesztés (osteoporosis), hanem az arthritisekben észlelt erosiok szempontjából is. Mint a biológikumoknál, a közeljövőben az arthritisek kezelésébe bevezetendő tirozinkináz-gátlók (pl fostamatinib, tofacitinib) esetében is követelmény lesz, hogy a klinikai tünetek mellett az ízületek destrukcióját (radiológiai progresszió) is gátolják. Ebben a témában az a kiemelkedő újdonság, hogy az immunreceptor-útvonalak szerepét a csontanyagcserében eddig valóban nem nagyon feltételeztük. Néhány kérdés:

1. Az ITAM fehérje (DAP12 és FcR γ)-hiányos állatokban észlelt alkati és csontfejlődési zavarok más, az ugyanezen útvonalon szereplő fehérjék (pl Syk, ZAP70) hiánya esetén is észlelhetők-e?
2. Az előző főtéma arthritisben számos fehérje szerepét vizsgálta, de a disszertációban arthritis vonatkozásában épp ez a két ITAM fehérje nem szerepel. A DAP12 és FcR γ hiányában létrejön-e arthritis, és vajon milyen fokú erozivitas (csontvesztés) lenne ez esetben a vad típusokhoz képest? Ez a kísérlet az ITAM fehérjéknek az arthritises csonterosiok kialakulásában betöltött szerepére utalna és akkor az erosiok kialakulását ITAM fehérjék blokkolása is gátolhatná.
3. Fostamatinib alkalmazása esetén megfigyelhetők lennének-e azon csontelváltozások amelyek a két ITAM fehérje deficienciája során?
4. A PLC γ 2 szerepét tekintve a normális csontanyagcsere és az ovariectomia-indukált (emberben postmenopausalis?) csontvesztés eltér egymástól. A gyulladásos (arthritishez társuló) csontvesztésben milyen szerepet játszhat a PLC γ 2, ha már szerepe az előző főtéma során az arthritises gyulladás kapcsán igazolódott?

Végül, nemcsak ezen disszertáció kapcsán, hanem minden génkiütéses vizsgálat kapcsán felmerül az az *alapkérdés*, hogy a génkiütés illetve az antitestes vagy más gátlószeres gátlás ugyanazon molekulák mennyire koherens eredményt ad. Egy molekula (pl Syk)

deficienciája veleszületett állapot, mely, ha a deficiencia nem letális, széleskörű alkalmazkodást, több komplementer mechanizmus beindulását eredményezheti. Az egyik első eredmény volt pl. hogy az ubikviter ICAM-1 molekula teljes hiánya dacára a transzplantátum rejekció, a gyulladás zavartalanul végbemegy. Az tehát, hogy pl. a Syk hiányában egyes neutrophil funkciók megtartottak, nem biztos, hogy csak arra utalnak, hogy a Syk ebben nem játszik szerepet. Lehet, hogy a Syk jelenlétében szerepet játszik, de veleszületett hiány esetén más útvonalak helyettesítik a Syk hiányt. A Syk gátlása fostamatinibbel egészen más szituációt teremt: amikor egy eleve meglevő és működő fehérjét gátlunk. Az alapvető kérdés tehát, általánosságban és a Syk esetében is, hogy a Syk-deficiens sejtek, állatok modelljeiben nyert eredmények mennyire korrelálnak a fostamatinib kezelés során észlelt, illetve a jövőben várható hatásokkal?

A bíráló mind a hét alaptémában szerzett adatokat *új eredményként* ismeri el (ez nem is véletlen a közlemények minősége alapján), ezek tehát a következők:

1. Az integrin-jelátvitel hasonló az immunreceptor-szignalizációhoz és a Syk, ITAM fehérjék, SLP-76, PLC γ működését igényli.
2. Az előző pontban említett szignálmechanizmusok egyike sem szükséges a neutrophilek integrin-függő migrációjához.
3. A neutrophilek immunkomplexek által kiváltott aktivációja Fc γ receptorokat és PLC γ 2-t igényel.
4. A Src kinázok és a p38 MAPK fontos a neutrophil degranulációban.
5. Kísérletes arthritis modellben igazolható a Syk és PLC γ 2 kiemelt szerepe a gyulladás kialakulásában, melynek terápiás vonatkozásai is vannak.
6. Az osteoclast aktivációt és csontresorptiót az immunreceptorok és integrinek jelátvitelében is szerepet játszó szignalizációs mechanizmusok aktivációja (Syk, ITAM) kíséri.
7. A PLC γ 2 szerepet játszik a normál csontanyagcserében, de a hormonfüggő csontvesztésben valószínűleg nem.

A munka kiemelkedő értéke még, hogy alkalmazott és klinikai vonatkozásai miatt közvetlen adatokat szolgáltat új célpontok felfedezéséhez és ezen keresztül új terápiák kifejlesztéséhez.

Mindezek alapján messzemenően támogatom a nyilvános vita kitűzését és a mű elfogadását is.

Debrecen, 2012. július 15.



Dr Szekanecz Zoltán
egyetemi tanár
az MTA doktora