

Válasz Matkó János professzor úr opponensi véleményére és kérdéseire

Mindenekelőtt nagyon köszönöm Professzor Úr elismerő szavait, kutatásaim fő célkitűzéseinek tömör összefoglalását, támogató elemzését és az önálló kutatási irányvonal megteremtésének elismerését.

Sajnos a disszertáció többszöri átolvasása sem bizonyult elegendőnek ahhoz, hogy a hibákat mind észrevegyem és javítsam. Köszönöm Professzor Úrnak, hogy felhívta a figyelmemet az elírásokra.

Professzor Úr kérdéseire válaszaim a következők:

1. Az első kérdés a 15. és 19. Western blot ábrákon ábrázolt PKC transzlokációs vizsgálatokra vonatkozik.

Az ismételések számát tekintve, illetve a denzitometriás eredményeket is figyelembe véve, a következtetéseink nem tűntek túlzottnak, különösen a különféle inhibítor-kombinációk alkalmazása után, amelyek a kezdeti eredményeket funkcionális tesztekben is alátámasztották. Mivel a cikkben, ha a denzitometriás eredmények grafikonos ábrázolását választottuk volna csupa szürke grafikon került volna közlésre, ezért azt a döntést hoztuk, hogy nem grafikonon mutatjuk be a denzitometriás eredményeket, hanem egy kiválasztott Western-blot eredeti képét tesszük a publikációba. Egyetértek azonban, a denzitometriás eredmények meggyőzőbbek lettek volna.

2. A második kérdés a 24. ábrára vonatkozik.

Egyetértek a bírálattal és szívesen mutattam volna be az eredeti ábrákat, mellyel részletesebben demonstrálhattam volna a vitatott kérdést. Az akkoriban végzett kísérleteink rendszeresen zárultak a konfokális mikroszkópban végzett intenzitás-eloszlás vizsgálatával, továbbá sejtmembrán, citoszol, sejtmembrán izolátumokon végzett Western blot és annak denzitometriás vizsgálatával. Egyetértek, hogy célszerű lett volna annak idején egy részletesebb ábrát is készíteni, de a bírálók a cikket ezen állapotában is publikációra alkalmasnak minősítették, ezért további adatokat nem szolgáltatunk. Ami a sárga szín-re vonatkozó szakkifejezést illeti, köszönöm a korrekciót, valóban hibásan lett feltüntetve az eredeti közleményben.

3. 63. oldalon a 27. ábra értelmezését és az ábra címét kifogásolja Professzor Úr.

Köszönöm, hogy az ábrára irányította a figyelmemet, mivel az eredeti cím nem mond többet, mint azt, hogy a timocita-epitél interakció függ az aktin citoszkeleton polimerizációjától. Mivel a magyar fordításban ez az állítás elferdült, és a timocita-epitél interakció által kiváltott citoskeletális polimerizáció létrejöttét implikálja, különösen köszönöm Professzor Úr észrevételét, melyet 2007, 2008 és 2013-ban megjelent publikációkkal alá is támaszt.

4. A negyedik kérdés a 66. oldalon megjelent ábrára és annak összefoglaló analízisére vonatkozik.

Itt megint fordítási pontatlanságról van szó, mert nem állt szándékomban azt implikálni, hogy a fejlődő timocitákban egyáltalán nem jönnek létre lipid raft-ok. Sokkal inkább arra vonatkozott a

megjegyzés, hogy attól függően, hogy létrejönnek-e vagy sem a lipid raftok, ez a T-sejt szelekcióban fontos különbséget jelent, ugyanis más szelekciós mechanizmust indít el.

5. 32. ábra eredeti címe: „Enforced expression of CD80 by thymic epithelium promotes lipid raft accumulation and a reduction in thymocyte-positive selection”, melynek magyar fordítása újfent pontatlanságot eredményezett a részemről. A „lipid raftok felhalmozódásának elősegítése” talán szerencsésebb megfogalmazás lett volna. Valóban, a CD80 által elindított raft aggregáció és az ezzel együtt aggregálódó MHC molekulák a negatív szelekciós küszöböt meghaladó jelet eredményeztek, mely kísérleteknek ez a konklúziója az eredeti közleményben is. Nagyon köszönöm Professzor Úrnak, hogy a pontatlanságokra felhívta a figyelmemet.

6. A hatodik kérdés a Bim pro-apoptotikus molekula T-sejt receptor közvetítette apoptózisban betöltött szerepére vonatkozik.

Az első közlemények a Bim molekula szerepéről apoptózisban 1998-ban jelentek meg, míg a timocitákban betöltött szerepéről tudomásom szerint 2000-ben jelent meg az első közlemény, amely a C5a indukálta sepszist vizsgálja timocitákban. A kísérletek eredményeként arra a következtetésre jutottak, hogy a Bim szintje (hasonlóan a Bcl2, BAX, Bad expressziós szintjéhez) nem változik az apoptózis indukciójával, csak a BclXL.

(Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. EMBO J. 1998 Jan 15;17(2):384-95)

(J Clin Invest. 2000 Nov;106(10):1271-80. Protective effects of anti-C5a in sepsis-induced thymocyte apoptosis. Guo RF, Huber-Lang M, Wang X, Sarma V, Padgaonkar VA, Craig RA, Riedemann NC, McClintock SD, Hlaing T, Shi MM, Ward PA.: Western blot analysis revealed that the content of Bcl-X(L) (but not of Bcl-2, BAX, Bad, and Bim) significantly decreased in thymocytes after CLP).

Az általunk végzett kísérletek idején ezért nem csak a Bim létezéséről és funkciójáról tudtunk igen keveset, de a vizsgálatokhoz szükséges minőségi ellenanyag sem állt rendelkezésünkre, ezért a már a timociták apoptózisában ismert Bcl család tagjaira koncentráltunk.

További kísérleteket ez irányban nem végeztünk ezt követően, mert számomra a Wnt jelátvitel és a Wnt jelátvitel fejlődő T sejtekre és a tímusz mikrokörnyezet kialakítására kifejtett hatására koncentráltam.

Az elsődlegesen 2010, 2012-ben megjelent irodalmi adatokból megtudhatjuk azonban, hogy a Bim molekulának fontos szerepe van a T-sejtek negatív szelekciójában.

A novel TCR transgenic model reveals that negative selection involves an immediate, Bim-dependent pathway and a delayed, Bim-independent pathway. Kovalovsky D, Pezzano M, Ortiz BD, Sant'Angelo DB. PLoS One. 2010 Jan 13;5(1):e8675. doi: 10.1371/journal.pone.0008675

Proapoptotic protein Bim is differentially required during thymic clonal deletion to ubiquitous versus tissue-restricted antigens. Suen AY, Baldwin TA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jan 17;109(3):893-8. doi: 10.1073/pnas.1114834109

7. A hetedik kérdés az NKT sejtekre ható Notch jelek eredetére koncentrált.

A T sejtek fejlődése hematopoietikus őssejtekből indul a csontvelőben, melyek sorozatos elköteleződések után válnak a periférián immunfunkciót ellátó limfocitákká. Az NKT sejtek is ebből a közös ősből differenciálódnak, melynek első lépéseként az összes közös ő Notch1 receptorokon

kapott megerősítő jelek következtében először a CD34+CD33+ közös limfoid/mieloid progenitorokból előbb CD34+CD33-CD1a- közös T és NK sejt irányba elköteleződött fejlődési állapotba, majd a CD34+CD33-CD1a+ állapotban válnak T és nem NK fejlődési irányban elkötelezetté.

Először a Notch szignálok a T-sejt irányú elköteleződéshez szükségesek, majd a különféle fejlődési irányú elkötelezettség megindulásához elengedhetetlen a különféle a Notch receptorok váltakozó szintű expressziója különféle Notch ligandok jelenlétében

(Journal of Experimental Medicine, 2001, 194:991).

CD4+CD8+, DP fejlődő timociták alkalmasak a további, NKT irányú szelekcióra a tímusz mikrokörnyezetének hatására. Az NKT irányú differenciálódási folyamatban a tímusz dendritikus sejtjeinek szerepét 2010-ben a PLoS Pathogens-ben publikált kísérleti rendszer mutatja meg. Ha CD4+CD8+ DP timocitákat dendritikus sejteket (DC) nem tartalmazó reaggregátum kultúrában inkubálták, akkor nem képződtek CD8+NKT sejtek. Ha a rendszer teljes tímusz strómát, azaz DC sejteket is tartalmazott, akkor viszont differenciálódtak NKT sejtek. A CD8+NKT sejtek aránya tovább nőtt EBV Ag-t prezentáló sejtek jelenlétében.

(Yuling H, Ruijing X, Xiang J, Li L, Lang C, et al. (2010) EBV Promotes Human CD8+ NKT Cell Development. PLoS Pathog 6(5): e1000915. doi:10.1371/journal.ppat.1000915).

Azt is kimutatták, hogy az NKT sejtek fejlődéséhez -hasonlóan a $\gamma\delta$ és NK sejtek fejlődéséhez-, a PLZF transzkripció faktor szükséges. Hogy ennek a transzkripció faktornak az aktiválása hogyan függ össze a Notch jelátviteli rendszerrel, kísérletes bizonyítékát nem sikerült megtalálnom az irodalomban.

(Eidson M, Wahlstrom J, Beaulieu AM, Zaidi B, Carsons SE, et al. (2011) Altered Development of NKT Cells, $\gamma\delta$ T Cells, CD8 T Cells and NK Cells in a PLZF Deficient Patient. PLoS ONE 6(9): e24441. doi:10.1371/journal.pone.0024441).

A saját kísérleteinket is figyelembe véve, az NKT sejtek differenciálódásának szabályozásában a tímusz dendritikus sejtek által expresszált Jagged-2 ligand is szerepet játszhat. Ennek a lehetőségnek bizonyítására kísérletes vizsgálati eredményeket jelen pillanatban azonban nem találtam, további vizsgálatokat saját kutatócsoportommal nem végeztünk.

Összességében, a saját és irodalmi adatok alapján az NKT sejtek fejlődésében is stróma eredetű Notch-ligand jelátviteli kapcsolatok játszhatnak fontos szerepet, tehát nem kizárólag a TEC-ből származó Notch ligandok döntenek az NKT irányú differenciálódási folyamatok megindításában.

8. A Wnt-BMP jelátvitel szoros kapcsolata már egy ideje ismert, de a pontos mechanizmusokról még mindig igen keveset tudunk. Annál is inkább, mert a hatások sokszor szövet specifikusak és épp ezért mikrokörnyezetfüggők is. Más hatáskombináció tapasztalható például a csontok differenciálódásának szabályozása és a T-sejtek fejlődése során ugyanazon jelátviteli molekulák jelenlétében.

(Int J Biol Sci. 2012;8(2):272-88. doi: 10.7150/ijbs.2929. Epub 2012 Jan 21. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. Chen G, Deng C, Li YP)., a fogak vaszkularizációjának (Eur Arch Paediatr Dent. 2012 Dec;13(6):297-304. Molecular factors resulting in tooth agenesis and contemporary approaches for regeneration: a review. Cudney SM, Vieira AR.)

Ami a timocitákból TEC irányba mutató jeleket illeti, a kísérleti rendszerek felállítása nem könnyű. Itt elsősorban azokra a kísérletekre hagyatkozhatunk, amelyek a timociták eliminációja után vizsgálja a

TEC funkcióját és fejlődését. Így azonban csak egy időben „befagyasztott” képet nyerhetünk, a TEC egy adott időpillanatban történő vizsgálatával.

Ami a Wnt molekulákat illeti, a tímusz epitéliumban igen fontos FoxN1 transzkripciós faktor expressziójának indukcióját Georg Hollander professor hozta először kapcsolatba a Wnt4 molekulával és a timocitákkal. Feltételezései szerint a timociták jelenléte és a timociták által termelt Wnt4 indukálja a tímusz specifikus epitéliális sejtek differenciációját. Noha a Wnt4 molekulák zömét a tímusz epitél termeli, a timociták is képesek Wnt4 expressziójára, mint azt saját kísérleteink kimutatták. A timociták által termelt Wnt4 szint azonban sokkal alacsonyabb, mint a TEC-ben. A timociták teljes száma azonban igen nagy, ezért lehet, hogy a timociták által termelt Wnt4 szint szubsztanciálisan hozzájárulhat a TEC differenciáltságának fenntartásához.

(Balcunaite, G., M. Keller, et al. (2002). "Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice." Nat. Immunol. 3(11): 1102-1108)

Eddigi kísérletek a következőket bizonyították: ha a Wnt4-et expresszáló timocitákat 2-deoxiguanozin kezeléssel eltávolítjuk a tímusz kultúrákból, a TEC változatlanul életképes marad, timocitákkal újranepezítve képes a timociták differenciációjának folyamatát továbbra is támogatni, azaz a funkció nem változik. Egy timocitáktól megfosztott tímuszt vesekapszula alá visszaültetve az továbbra is képes a timocitákat a tímuszba vonzani. A TEC a fent leírt képességeit csak akkor veszti el, ha monolayer kultúrában tenyésztik. A funkcióvesztés ilyen esetben már egy éjszakás inkubáció alatt bekövetkezik. Hogy ezt a szekretált faktorok kihígulása, avagy a direkt sejtkinterakciók lecsökkenése idézi-e elő, egyelőre nem ismert.

Eddigi kísérletek közül a tímusz fibroblaszt állományának eltávolítása sokkal drasztikusabb hatást gyakorolt a tímusz sejtes állományára. A sejt szortálás útján szétválasztott 99%-os tisztaságú TEC populációja ugyanúgy reaggregátummá alakítható, mint a timocita-mentes teljes tímusz stróma. Az így nyert reaggregátum kultúrák azonban drasztikusan különböznek a teljes tímusz strómából nyert reaggregátumoktól. Vesekapszula alá visszaültetve a fibroblaszt-mentes TEC aggregátumok ugyanúgy képesek vonzani a timocita előalakokat és támogatni a fejlődésüket, mint a teljes strómát tartalmazó aggregátumok. Egyetlen dologban különböznek azonban, a méretük nem nő, azaz az epitéliális sejtek illetve prekursor sejtek nem osztódnak. Azaz az osztódáshoz illetve az epitéliális őssejtek fenntartásához, nem timocitákra, hanem fibroblasztokra van szükség.

Érdekes megfigyelés, hogy a BMP4, amely mind a tímusz stróma állományára, mind a timocitákra hat, szabályozza a fibroblasztok által termelt FGF7/FGF10 ligand termelést is és ezzel befolyásolja a tímuszban kialakuló mikrokörnyezet faktorainak összetételét.

(Peter T. Tsai, Robert A. Lee, and Hong Wu: BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis, Blood, 2003, 102:3947).

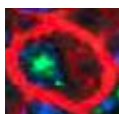
9. A kilencedik pontban két különálló kérdés fogalmazódik meg a tímusz öregedésével kapcsolatosan, melyeket egyenként szeretnék megválaszolni.

i. Az első kérdése Hassal testekre vonatkozik. A Hassal testek úgynevezett epitéliális retikuláris sejteket tartalmaznak, és zömmel a medullában helyezkednek el. Funkciójuk az önfelismerő timociták eliminációjában van.

Hassal testeket tudomásom szerint eddig az ember és emberszabású majmok tímuszán kívül nem sikerült kimutatni. Mivel a kísérleteink gyakorlati szempontok miatt egerekben történtek, amelyek tímusza nem tartalmaz Hassal testeket a kérdés pontos és kísérletekkel is alátámasztott megválaszolására, emberi csecsemőmirigy vizsgálatára volna szükség. A kísérletek előkészítését az engedélyezések beszerzésével megkezdtuk ugyan, de sajnos az eddigi tapasztalataink számos problémát vetítenek előre a hazai minta-beszerzés tekintetében, így lehetségesnek tartom, hogy csak külföldi kooperációs partnereinktől (Kanadából és az Egyesült Királyságból) tudjuk a szükséges emberi szöveteket beszerezni és a felmerült kérdéseket pontosan megválaszolni.

Kísérletek hiányában ezért csak spekulációra szorítkozhatok. Eddigi kísérleteinkből, melyeket irodalmi adatok is alátámasztanak kiderült, hogy a medulla érzékenyebb az öregedési folyamatokat indukáló környezeti hatásokra, ezért lehetségesnek tartom, hogy a Hassal testek az öregedés indukációjának megkezdésével apoptotikus markereket fognak mutatni és eliminálódni, mely esetlegesen alátámaszthatná az öregkori autoimmun kórképek fokozott kialakulását. Ennek a feltételezésnek a kísérletes bizonyítása viszont igen kiterjedt és komplex kísérleti rendszer előállítását követeli meg, melyre jelenleg nem látok lehetőséget.

ii. 55. ábra B paneljére vonatkozik a következő kérdés. Valóban, az EpCAM-1 festődés egyes helyeken túlexponáltságot mutat annak érdekében, hogy az EpCAM-1-re sokkal kevésbé festődő kortikális epitélium sejtjei közül is néhány láthatóvá váljon. Lehet, hogy a ko-lokalizáció az EpCAM1 és a GR esetében nem a legmegfelelőbb megfogalmazás. Itt a kolokalizáció ugyanis azt jelenti, hogy vannak olyan epiteliális sejtek, amelyek mind EpCAM1-t expresszálnak a sejtmembránon, mind GR-t is tartalmaznak a sejtmagban (piros: EpCAM1, kék: sejtmag; zöld: GR).



Tehát a kolokalizáció nem a fehérjék egymáson, azaz egy adott helyen történő lokalizációjára, hanem egy adott sejtben történő lokalizációjára utal, két jól megkülönböztethető sejtalkotón.

Az 55. ábra „A” paneljében látható RT-PCR eredményekkel együtt így már nem volt kétségünk annak tekintetében, hogy epiteliális sejtek is tartalmaznak receptort glukokortikoidra, amely megmagyarázza érzékenységüket szteroid kezelésre.

Végül még egyszer nagyon köszönöm Professzor Úrnak a kritikai észrevételeket és kérdéseit, és remélem, hogy válaszaimat kielégítőnek találja.

Pécs, 2013. április 2.

Dr Pongrácz Judit Erzsébet

egyetemi tanár
Pécsi Tudományegyetem
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet