

BÍRÁLAT

Dr Kacs Kovics Imre: Háziállatok neonatalis Fc receptorának karakterizálása; az FcRn fokozott kifejeződésén alapuló új transzgenikus technológia az immunválasz jelentős fokozására c. MTA doktori értekezéséről

Dr Kacs Kovics Imre Háziállatok neonatalis Fc receptorának karakterizálása; az FcRn fokozott kifejeződésén alapuló új transzgenikus technológia az immunválasz jelentős fokozására c. MTA doktori értekezése szerves folytatása a kutató korábbi munkájának, mellyel a háziállatok immunglobulinjainak karakterizálását végezte el. Most viszont figyelme a másik oldal, a receptorok irányába fordult.

Az értekezés 92 oldal terjedelmű, melyet 250 irodalmi hivatkozás követ. A bevezetés és irodalmi áttekintés világos, a továbbiak megértéséhez szükséges valamennyi ismeretet tartalmazza, rendkívül precízen és szépen beillesztett ábraanyaggal. A 3. fejezet együtt képezi az Eredményeket és azok diszkutálását, példásan összeállított, a megértést megkönnyítő ábra anyaggal illetve ábramagyarázatokkal. Ezt követi az eredmények és azok gyakorlati jelentőségének összefoglalása, mely visszafogottsága és lényegre törése ellenére is rendkívül bőséges, akár két értekezés anyagát is képezhetné. Az anyagok és módszerek az értekezés végén kerülnek tárgyalásra, és lényegre törőek, hiszen a részletek megtalálhatók a mellékelt közleményekben. A közlemények külön kiadványt alkotnak, mely magába foglalja azt a 21 publikációt, melyek a z értekezés alapjául szolgálnak, és 2000 és 2012 között jelentek meg, magas impakt faktorú, közismerten színvonalas folyóiratokban. Ezek közül 16 közleményben első vagy utolsó szerző. Az értekezés mind a tartalmi mind a formai követelményeknek megfelel. **Egyetlen egy ábrával kapcsolatos megjegyzés: az 1. ábra bemutatja az emlősök anyai immunglobulinjának utódba jutását. Helyes-e, hogy a főemlőst képviselő majomnál az IgA van legnagyobb mértékben megjelölve?**

A kísérletekhez alkalmazott módszerek a modern immunológiai, molekuláris biológiai illetve genetikai módszerek teljes tárházát reprezentálják, pl. Southern blot, Northern blot, Western hibridizálás, bioinformatika, IgG kötés ellenőrzése plazmon rezonancia méréssel, transzgenikus egerek előállítása, stabil bFcRn-t kifejező sejtvonala előállítása, rekombinációs fehérjék előállítása, klónozási technikák. Ezekhez képest már szinte szokványosnak tűnő ám

rendkívül munkaigényes immun hisztokémiai, valós idejű PCR, ELISA, ELISPOT áramlási cytometria, immunizálás, poliklonális és monoklonális ellenanyagok előállítása hihetetlen methodikai gazdagságot reprezentálnak, és mint ahogy az eredményekben is tükröződik, rendkívül szofisztikált módon és eredményesen voltak megtervezve.

Jelen értekezésének egyik témája a neonatális Fc receptorok vizsgálata, melynek az IgG hámsejteken keresztül történő Ig G szekréciójában és így a természetes passzív immunválaszban kitüntetett szerepe van

Először a szarvasmarha, juh, illetve tevé neonatális Fc receptorának (FcRn) karakterizálását végezték el. Ennek során meghatározták a szarvasmarha, juh és tevé FcRn alfa láncának teljes cDNS-ét. Elemezték az FcRn humorális immunválaszra gyakorolt hatását. Elemezték a nyúl FcRn alfa lánc szekvenciáját, melyhez szintén RACE –PCR eljárást alkalmaztak. Ezeket összehasonlították a humán és egér FcRn alfa lánc cDNS szekvenciákkal. Megállapították, hogy a vizsgált fajok FcRn aminosav szekvenciája nagymértékű, 60 %-os hasonlóságot mutat. Azonosították azokat az aminosav maradványokat, melyek az Fc receptor és IgG közötti pH függő kapcsolatban jelentősek.

Megállapították, hogy az FcRn citoplazmatikus régiója a szarvasmarha, juh, sertés és tevé fajokban 10 aminosavval rövidebb, mint a főemlősök és a rágcsálók esetében. Ezek az eltérések tükrözik az egyes fajok filogenetikai pozícióját.

Kimutatták, hogy a szarvasmarha FcRn is pH függő módon köti a bIgG molekulát, sőt képes azt a sejteken keresztül is juttatni.

Munkájukat jelentős mértékben elősegítette, hogy FcRn specifikus ellenanyagot állítottak elő nyúlban, így a szarvasmarha és juh tögyből származó epithel sejtek immun hisztokémiai vizsgálatát is meg tudták oldani. Vizsgálataikat juh, és tevé tögymetszetein is elvégezték.

Az FcRn kimutatása a tögyszöveti epithel sejtekben in situ hibridizációs és immun hisztokémiai vizsgálatokkal arra mutat, hogy az FcRn részt vesz a tejmirigy IgG secretiójában. Ismeretes, hogy kérődzők esetén az ellés előtt és azt követően az IgG1 jelentős mértékben szekretálódik, de azt követően lényegesen lecsökken az IgG1 tejbe való szekréciója. Ez szoros összefüggést mutat azokkal az eredményekkel, melyek a tögyhámsejtben való FcRn lokalizációs változását mutatják.

Technikai jellegű kérdésem, hogy miért éppen a tevé választották egyik kísérleti alanynak?

Nagyon szép és logikailag szinte várható eredmény annak kiderítése, hogy az FcRn a lánc kifejeződik-e a vizsgált állatok bélcsatornájában, hiszen emberben fontos szerepe van az FcRn-ek az IgG molekulák szállításában az epithel sejteken keresztül a bél lumenébe, ahol azok a jelen levő antigénekhez kötődnek. A kérődzők enterocitáiban nem igazolták az FcRn kifejeződését, amiből arra következtettek, hogy az ember esetén megismert immunfelismerési reakció a kérődzőkre nem jellemző. Ugyanakkor, in situ hibridizációs módszerrel szarvasmarha tüdőszövetben kimutattak FcRn ex pressziót, a bronhiolusokban, de nem a tracheában. Ez utóbbiban nyilván az IgA a meghatározó izotípus.

Kínai kooperációval rendkívül szofisztikált módszerekkel olyan transzgenikus egereket hoztak létre melyek a bovin neonatalis Fc receptort laktáció idején fejezik ki, és ezt kontrollálni is tudták. A bFcRn képes volt megkötni az egér IgG-t is, sőt a humán IgG-t is. Kísérletesen bizonyították, hogy a bFcRn fokozott kifejeződése a tejmirigyben emeli a szérum IgG koncentrációját. Egérben tehát az FcRn megakadályozza az IgG tejbe történő ürülését és fokozza a szérum IgG koncentrációját.

Kísérleteikben azt is tapasztalták, hogy –a várákozásnak megfelelően –a csirke IgY nem kötődött a neonatális bovin Fc receptorhoz. Ismeretes hogy az emlős Fc receptorok nem kötődnek szárnyas ellenanyagokkal. Ezért is nagyon jól, háttér reakció nélkül használhatók in vitro immunológiai tesztekben a csirke ellenanyagok. **Kérdésem, hogy ennek oka az ellenanyag, vagy a z Fc receptorok lényeges eltérésében keresendő?**

A munka másik része azért érdekes, mert a humán therápiában is alkalmazható poliklonális ellenanyagokkal is kapcsolatos.

.

Előállítottak olyan transzkromoszomális szarvasmarhát, melynek vérében is megjelennek a humán immunglobulinok, ennek pedig óriási ipari, ill. terápiás jövője van. Ezért fontos, hogy tanulmányozzák a szarvasmarha és a humán IgG és a szarvasmarha FcRn kapcsolódásának sajátosságait. A szarvasmarha és humán IgG - FcRn kötődésének elemzését nemcsak a szokásos, izotóp jelöléssel illetve Scatchard analízissel vizsgálták, hanem felületi plazmon rezonanciával (SPR) is.

Megállapították, hogy hogy a bovin FcRn nemcsak a faj specifikus, de a humán IgG-t is megköti. Ez azért jelentős, mert a humán IgG-t termelő transzkromoszomális borjakban ez a receptor védelmet nyújt a humán IgG a gyors lebomlásától.

Érdekes megfigyelés, hogy egyes, bFcRn-t expresszáló transzgenikus egerek immunizálása után a lépből izolált, IgM illetve IgG termelő B sejtek száma is megemelkedik. Igen alapos kísérletekkel, többek között diverzitáselemzéssel, microarray rendszerben megállapították a transzgenikus egerekben, hogy sokféle naív B sejtet aktiválnak. Ez egyik plauzibilis magyarázata lehet a megnövekedett B sejtszámnak. **Vannak-e ezen a téren további eredményeik, mely a megnövekedett humorális immunválaszt magyarázzák?**

Miután bizonyították, hogy a bFcRn transzgenikus egerek nagyobb mértékű immunválasszal reagálnak, egy rendkívül izgalmas kérdéshez nyúltak hozzá: Az univerzális influenza vaccina egyik aspiránsa, a hemagglutinin 2-es alegysége nem elég jó immunogén. A peptid konjugáltatás után a transzgenikus egerekben igen jó IgG választ indukált.

A transzgenikus egerek immunizálásával CXCR4 specifikus monoklonális ellenanyagok termeltetése teszi fel a kísérletekre a koronát: hiszen ismeretes hogy kötődésével megakadályozhatja a HIV kapcsolódódását a receptorhoz.

Kérdésem: jelenleg hol tartanak ezek a kutatások?

A neonatalis Fc receptorok vizsgálatát nyulakban is elvégezték, sőt, a transzgenikus egerek után FcRn-t fokozottan expresszáló nyulakat is előállítottak. A poliklonális ellenanyagok előállítására nyilván ezek az állatok alkalmasabbak. A nyúl FcRn kifejeződésének fokozása transzgenikus nyulakban mennyiségi és minőségi javulást eredményezhet a majdani humanizált nyulakban is.

Kérdésem: ez a rendkívül izgalmas munka-túl a szabadalmaztatáson jelenleg hol áll, vannak-e újabb fejlemények?

A 70.-ik oldalon nagyon szemléletes ábra magyarázza az FcRn fokozott kifejeződésének hatását a humorális immunrendszerre. Itt szó esik, a kísérletekben is bizonyított dendritikus sejt aktivációról, T helper stimulációtól. **Van-e arra vonatkozóan adatuk, hogy a neonatális Fc receptor fokozott expressziója transzgenikus állatban befolyásolhatja-e a T sejt immunválaszt? A kérdés talán nem túl logikus, de a citokin termelésen keresztül bármi –akár váratlan –előfordulhat.**

Új megállapítások

Az eredmények összefoglalása és gyakorlati jelentősége a doktori munkában szűkre szabottan is 3 oldalt tesz ki, a szerző a bőség zavarával, az opponens az idő –és a terjedelem-zavarával küzd. Ezért csak a legfontosabbnak tartott eredményeket emelném ki, azzal a megjegyzéssel, hogy ezekhez kapcsolódóan természetesen számos más új megállapítás is fűződik. A legfontosabb eredményeket tulajdonképpen az értekezés címe is jelzi:

- I. Karakterizálta a háziállatok neonatális Fc receptorát,
- II. Jelentős eredményeket ért el az immunválasz fokozására FcRn receptort fokozottan kifejező transzgenikus állatokban

Ad I.

1. Elvégezték a szarvasmarha, juh, teve neonatális Fc receptorának jellemzését
2. Összefüggést találtak az FcRn szöveti lokalizációja és a tejmirigy élettani állapota között, amit ez ideig sem humán, sem egér vizsgálatokban sem mutattak ki.
3. Igazolták, hogy a bFcRn szerepe a tögyből a vérkeringésbe irányuló reciklizáció.

Ad II

1. Szarvasmarha neonatalis Fc receptort (bFcRn) kifejező transzgenikus egér modelleket hoztak létre. Ezekben a transzgenikus egerekben a receptor megakadályozza az IgG tejbe ürülését, és fokozza a szérum IgG koncentrációját. A tejmirigyben kifejeződő bFcRn ugyanis az IgG-t a tejmirigyből a vérbe, nem pedig a vérből a tejbe juttatja.
2. Olyan transzgenikus egereket és nyulakat is alkalmaztak kísérleteikhez, melyek a neonatalis Fc receptort fokozott mértékben expresszálták. Ezen állatokban kimutatták, hogy a humorális immunválasz mértéke fokozódott. még gyengén immunogén antigén esetén is. Ez új lehetőségeket nyújthat terápiás célú monoklonális vagy poliklonális ellenanyagok előállítására terén. Ezzel kapcsolatosan szabadalommal is rendelkezik
3. Megállapították, hogy az IgG homeosztázisának szabályozásában az FcRn szerepe kulcsfontosságú, mivel a hozzá kapcsolódó IgG lebomlását megakadályozza. Kimutatták, hogy hIgG-t termelő transzkromoszomális borjakban a humán IgG lebomlása is lassú, mivel a bovin FcRn a humán IgG-t is köti; aminek nyilván gyakorlati jelentősége is van.

Dr Kacs Kovics Imre doktori értekezése gyönyörű példája annak, hogy az immunológia nemcsak határtalanul szép és összetett, de hogy valóban nincsenek átjárhatatlan határok állatorvosi és humán immunológiai kutatások között. A neonatalis Fc receptorok funkcióinak magas színvonalú kutatása a szarvasmarhától a transzgenikus egereken és nyulakon át elvezethet olyan humán vaccinálási lehetőségekhez, mint az influenza, vagy a HIV megelőzése.

A doktori disszertáció, valamint annak alapját képező közlemények egyaránt kimagasló tudományos teljesítményt reprezentálnak. Ezért a doktori munka tudományos eredményeit messzemenően elegendőnek tartom az MTA doktori cím megszerzéséhez, és a nyilvános vita kitűzését javaslom.

Szeged, 2013. márc.18.

Dr Mándi Yvette
egyetemi tanár
MTA doktora