

Opponensi vélemény

Kacs Kovics Imre „Háziállatok neonatális Fc-receptorának (FcRn) karakterizálása; az FcRn fokozott kifejeződésén alapuló új transzgenikus technológia az immunválasz jelentős fokozására” c. MTA doktori értekezéséről.

Kacs Kovics Imre értekezése jelentős és időszerű témáról szól. A röviden FcRn-nek nevezett IgG-receptort azért nevezték „neonatálisnak” mert szerepe az anyai immunglobulinoknak az utód-szervezetbe való transzportjának kutatása kapcsán vetődött először fel. Később az is nyilvánvalóvá vált, hogy ugyanaz a receptor szabályozza az IgG *in vivo* élettartamát, ezáltal sarkalatos szerepe van az IgG típusú ellenanyagok normális szintjének fenntartásában, sőt az albuminében is. Nem nehéz belátni, hogy az FcRn funkcióval kapcsolatos minden új felismerés jelentősen gazdagítja az immun-folyamatokról alkotott képünket.

Az értekezés 21, 2000 és 2012 között megjelent közleményen alapul. Ebből 20 nívós nemzetközi folyóiratban jelent meg, egy hazai lapban. Jelölt 5 közleményben első, 12-ben utolsó szerző. Két közlemény összefoglaló (review) jellegű, a többi eredeti kutatási eredményeket ír le. Kilenc közlemény impakt faktora nagyobb, mint 3, 11-é 1,5 és 3 közötti. Az értekezésben leírt egyes eredmények alapján európai és ausztrál szabadalmak is születtek.

Az értekezés maga a témaválasztás rövid indokolásával kezdődik, melyet irodalmi áttekintés követ. Az áttekintés, mely az 1950-es évekig visszanyúló kezdetektől kezdve napjainkig terjedően ismerteti a neonatális Fc-receptorral kapcsolatos kutatások fejlődését, önálló esszéként is megállna, tudománytörténeti nézőpontból is izgalmas olvasmány. Kibontakozik előttünk, hogyan ismerte fel a „hőskorban” Brambell munkacsoportja az újszülött emlősök fertőzésekkel szembeni védettségének mechanizmusát a speciesek közötti eltéréseket is elemezve. Az anyából a magzatba, vagy az újszülöttbe irányuló transzfer szelektivitásából következtettek arra, hogy ez specifikus receptor aktivitását igényelheti, és továbbmenve eljutottak annak felismeréséig, hogy ez a receptor döntő szerepet játszhat az ellenanyagok katabolizmusának szabályozásában. Ezek a kutatások már jelentős eredményeket hoztak, mielőtt az immunglobulinok szerkezetének alapvonásai, valamint az immunglobulin osztályok közötti szerkezeti és funkcionális eltérések ismertté váltak volna. A későbbi évek,

évtizedek során a tudományág fejlődésének újabb és újabb fázisaiban nagyon eredményesnek bizonyult az FcRn funkció szerepének ismételt újraértékelése. Az FcRn funkció alapvető jellegzetességeinek leírása után feltárták az IgG molekula és az FcRn közötti kötődés szerkezeti feltételeit előbb az IgG, majd a receptor oldaláról. Ezáltal értelmezhetővé váltak az IgG alosztályok féléletidejében megfigyelt eltérések, és feltárult az IgG hosszú *in vivo* életidejének háttere. Az FcRn funkció vizsgálata szolgáltatott magyarázatot a gastrointestinalis traktuson és más nyálkahártyákon keresztüli immunizálódásra. Kiderült, hogy az FcRn fontos szerepet játszik a fagocitózisban és az antigén prezentációban is. Végül fény derült arra is, hogy egyes autoimmun betegségek IgG-terápiája az FcRn telítésén keresztül hat.

A következő fejezet vázolja fel a kutatómunka kitűzött céljait, ezt követi az eredmények ismertetése azok diszkussziójával. Végül az új eredmények rövid összefoglalását olvashatjuk. Az anyagok és módszerek tekintetében az értekezés a függelékként csatolt eredeti közleményekre hivatkozik, a módszereket csak felsorolás-szerűen adja meg.

Az értekezésben leírt kutatómunka a szarvasmarha neonatális Fc receptor vizsgálatából indult ki. Jelölt a szarvasmarha FcRn α -láncának teljes cDNS szekvenciájának meghatározásával olyan eszköz birtokába jutott, mely számos nagy jelentőségű kérdés adekvát megközelítését tette lehetővé. A bovin FcRn-t laktáló tejmirigyben kifejező transzgenikus egerek előállításánál az FcRn-nek a tejmirigyben betöltött szerepét lehetett közelebbről megvizsgálni. A mesterséges bakteriális kromoszómába integrált bovin FcRn genomikus DNS-t tartalmazó konstrukcióval létrehozott transzgenikus (BAC Tg) egerek segítségével vizsgálni lehetett a bFcRn α -láncát kódoló gén szabályozását. Ezen túlmenve lehetővé vált annak feltérképezése, hogy az FcRn-t fokozottan kifejező állatokban hogyan alakul az IgG katabolizmusa.

Logikusan következő lépés volt a humorális immun-válasz általános jellemzése a bFcRn α -láncot kifejező BAC Tg egerekben. A jelentős gyakorlati alkalmazás felé mutat ezen transzgenikus egerek felhasználása monoklonális ellenanyagok előállítására. A bovin FcRn BAC Tg egereken kapott eredmények nyomán jelölt munkatársaival a nyúl FcRn α -lánc cDNS szekvenciáját is meghatározta, hogy az FcRn-t fokozottan kifejező transzgenikus nyulakat állíthassanak elő. Az értekezésben leírt kutatásoknak fentiek csak a fővonalát jelentik melyből számos elágazás is ered és ezek az elágazások is figyelemre méltó kérdésekhez vezetnek.

A kutatási program megvalósítását megfelelő metodikai arzenál szolgálta.

Genetikai és molekuláris genetikai eljárások: cDNS készítése reverz transzkriptáz - polimeráz-láncreakció segítségével, klónozás és DNS- szekvencia meghatározás, Southern blot a cDNS ellenőrzésére és Northern blot az mRNS vizsgálatára. Rekombináns fehérje előállítása baculovírus vektor segítségével rovarsejtekben. Gén expresszió vizsgálata kvantitatív valós idejű PCR reakció segítségével. Transzgénikus állatok előállítása több úton és ezek alkalmazása. In situ hibridizáció.

Sejt biológiai eljárások: sejt kultúra, transzfekció, sejt fúzió hibridóma képzésére. Áramlási citometria, receptor-kötés vizsgálata radioaktív izotóppal jelzett ligandummal.

Szövettani és immun-hisztokémiai eljárások: receptor-kötés vizsgálata szövettani metszeteken, receptor kifejeződés vizsgálata peroxidázzal-jelölt ellenanyag segítségével.

Immunológiai és immunokémiai eljárások: specifikus ellenanyag előállítása és tisztítása immun-affinitási módszerrel, ELISA, ELISPOT, immunoblot.

Fizikai-kémiai mérések: felszíni plazmon rezonancia, folyadékáramlásos Quartz Crystal Microbalance mérés antigén-ellenanyag kapcsolódás kinetikájának vizsgálatára.

A módszerek megválasztása megfelelő volt, az alkalmazott eljárások alkalmasak a feltett kérdések megválaszolására, vagy megközelítésére.

Jelölt 19 pontban foglalta össze az értekezésben bemutatott kutatások során elért új eredményeket. Legyen szabad kettőt kiemelnem, mivel ezeket tartom legfontosabbnak.

Az első a neonatális Fc receptornak a T-sejttől függő humorális immunválasz szabályozásában betöltött fontos szerepének feltárása. Az FcRn-t fokozottan kifejező transzgénikus állatokban az ellenanyag válsz során jelentősen nagyobb antigén-specifikus IgG szint jelenik meg, ennek következtében több antigén-antitest komplex képződik. A több komplexet több neutrofil sejt szállíthatja a regionális limfoid szervekbe. Ennek következtében több citokin termelődik és fokozott mértékben aktiválódhatnak az immunválaszban részt vevő sejtek. Az FcRn-t fokozottan kifejező dendritikus sejtek hatékonyabban prezentálják az antigént, ami hatékonyabb helper-T-sejt stimulációt eredményez. Mindennek következtében második antigén inger esetén fokozott lesz a memória B-sejtek, valamint a naiv B-sejtek aktiválódása, ami a humorális immun-válasz diverzifikálódását fokozza, azaz több epitóp ellen termelődik antitest, továbbá fokozódik az antigén-specifikus ellenanyag termelés mértéke is. Az FcRn humorális immun-választ szabályozó szerepéről alkotott koncepcióban Jelölt sikeresen szintetizálta saját eredményeit az irodalomban megjelent friss adatokkal.

A koncepció saját vizsgálatokból származó elemei:

- Jelölt és munkatársai kimutatták, hogy FcRn-t fokozottan kifejező állatokban az IgG felezési ideje hosszabb;
- Kimutatták, hogy az FcRn-t fokozottan kifejező transzgenikus állatokban jelentősen magasabb titerben termelődik antigén-specifikus IgM és IgG;
- A bFcRn-t kifejező transzgenikus egerekben a neutrofil sejtek fokozott fagocita aktivitását mutatták ki;
- Megállapították, hogy a bFcRn-t kifejező transzgenikus egerekből származó és antigén-IG komplex-szel „feltöltött” dendritikus sejtek fokozott mértékben aktiválják a fajlagos CD4⁺ T-sejteket;
- Kimutatták, hogy az FcRn-t fokozottan kifejező transzgenikus állatokban T-dependens immun válasz során fokozott antigén-specifikus B-sejt aktiválódás és az antigén specifikus B-sejt populáció fokozott expanziója következik be. Epitop-térképezéssel kimutatták, hogy a transzgenikus állatokban fokozódott az ellenanyag-válasz diverzifikációja.

A második fontos eredmény, amit ki szeretnék emelni annak felismerése, hogy fokozott FcRn expresszió mellett gyengén immunogén epitopokkal szemben is létrejöhet, ill. fokozódhat az ellenanyag válasz. Ez a megállapítás az alábbi kísérletes eredményeken alapul:

- A bFcRn-t kifejező transzgenikus egerekben a gyenge immunogenitásról ismert HA2 influenza vírus antigénnel szemben jelentős ellenanyag választ értek el, szemben a vad-típusú állatokkal, továbbá transzgenikus nyulakban is fokozott anti-HA2 titert értek el;
- Az igen gyengén immunogén humán CXCR4 kemokin receptorral szemben transzgenikus egerekben magasabb ellenanyag titert és lépsejt számot értek el. A transzgenikus állatokból négy különböző monoklonális ellenanyagot sikerült létrehozni.

Ezen eredmények igen nagy jelentőségét nem is szükséges külön hangsúlyozni, hiszen ezen az úton olyan terápiás, vagy diagnosztikai jelentőségű monoklonális, illetve poliklonális ellenanyagok termelése lehet megoldható, melyekhez eddig nem, vagy csak nagyon nehezen sikerült hozzájutni. Ez az értekezésben leírtakat igen perspektívikussá teszi, még ha a bemutatott eredmények a CXCR4 monoklonális ellenanyag vonatkozásában inkább előzetes szintűek is.

További jelentős eredmények:

- Jelölt munkatársaival meghatározta a szarvasmarha, a juh, a tevé, a sertés és a nyúl FcRn szekvenciáját cDNS szinten. Az eredményeket filogenetikai összefüggéseiben értelmezte. Megállapította, hogy a Laurasiatheria öregrendbe tartozó fajoknál hiányzik a citoplazmatikus régió utolsó szakasza. Feltételezik, hogy ez egy közös ősből kialakult pont-mutáció eredménye. Alapvető funkcionális defektust nem okoz.
 - Megállapították, hogy kérődzők esetében az FcRn szöveti lokalizációja a tejmirigy állapotától függően változik. Olyan időszakban, amikor az IgG1 jelentős mértékben szecernálódik, az FcRn az acinus epithel sejtek apikális részén mutatható ki.
 - A bovin FcRn-t a tejmirigyben kifejező transzgenikus egerek vizsgálatával megállapították, hogy a bFcRn megakadályozza a hozzá erősen kötődő immunglobulinoknak a tejbe történő ürülését.
- Felszíni plazmon rezonancia módszerrel kimutatták, hogy a bovin IgG2 lényegesen erősebben kötődik a bFcRn-hez, mint az IgG1. Ennek alapján feltételezik, hogy az FcRn szerepe a tejmirigyben az IgG2 visszajuttatása a keringésbe. A szarvasmarha FcRn funkciójának teljesebb megértése, az IgG1 kolosztrumba való szekréciója mechanizmusának pontosabb leírása azonban további vizsgálatokat igényel.
- Kimutatták, hogy a bFcRn gén (bFCCGRT) promótere NF- κ B kötőhelyeket tartalmaz.
 - Megállapították, hogy a bFcRn –t kifejező transzgenikus egerek szérumában az albumin koncentrációja magasabb, mint a kontroll állatokban, ez azonban csökken az immunizálás során kialakuló magas IgG-szinttel.
 - Megállapították, hogy a nyúl FcRn is a pH-tól függő módon kapcsolódik az IgG-hez.

Jellemző az értekezés egészére, hogy a kísérleti eredményekből levont következtetések mértéktartóak és összhangban vannak a kísérletes adatokkal.

Az értekezés felépítése arányos és áttekinthető. A kísérletes eredményeket bemutató fejezetek végén olvasható dőlt betűs összefoglalások megkönnyítik az áttekintést. Helyes lett volna, ha az eredményeket bemutató fejezeteknél Szerző jelzi, hogy melyik közlemény tartalmazza az adott fejezet anyagát, továbbá az új eredmények pontokba szedett összefoglalásánál is utal a vonatkozó közleményre, ill. közleményekre.

Az értekezés stílusa szabatos, de egyidejűleg élénk és olvasmányos is. Az olvasást csak ritkán zavarják meg kevésbé sikerült kifejezések, vagy a laboratóriumi szleng beszüremkedései (pl. a 18. oldalon olvasható: „...olyan immunkomplexet adtak, amiben az IgG Fc részén kimutálták az FcRn kötő helyet...”).

Fentieket összefoglalva Kacs Kovics Imre értekezésében időszerű és fontos problémakört dolgozott fel. A kísérletes munka színvonala, az eredmények tudományos, és gyakorlati jelentősége alapján az értekezés elfogadását és Jelölt számára az MTA doktora cím odaítélését javaslom.

Budapest, 2013. április 11.

Medgyesi György
a biológiai tudomány doktora