

Válasz Dr. Kacs Kovics Imre
Dr. Nagy György MTA Doktori Értekezésére adott opponensi
véleményére

Köszönöm Dr. Kacs Kovics Imre átfogó bírálatát, felvetéseit. A megfogalmazott kérdésekre az alábbiakban válaszolok:

Az első alfejezetben a *Természetes autoantitestek vizsgálata RA-ban* témakörben a *glükózaminoglikán (GAG) specifikus antitestekkel* kapcsolatos eredményeit mutatja be és tárgyalja a szerző. Megállapítja, hogy az RAs betegekben a GAG-specifikus IgM és IgG koncentrációk is emelkedettek, bár az nem derül ki, hogy a különbség szignifikáns-e (általános problémája a disszertációnak, hogy a vizsgálati esetszámot, ismétlés számot nem tünteti fel, bár azok az eredeti publikációkban megtalálhatók). Ismerteti továbbá, hogy a szérum és a synoviális folyadék GAG-specifikus IgM szintjei korrelálnak egymással, GAG-specifikus IgG szintjei viszont nem. Az eredmények megbeszélése mindössze két paragrafus, nem derül ki belőle, hogy más kutatócsoportok vizsgálták-e ezt a kérdést, ill. milyen eredményekre jutottak, vagy hogyan illeszkedik a szerző eredménye az irodalmi adatokhoz, ha vannak olyanok. *Kérem (K), hogy ezt a hiányosságot pótolja a jelölt (K1).*

A hialinporc nagy mennyiségű glükózaminoglikánt (GAG) tartalmaz, GAG-ok jelentős mennyiségben ürülnek a porcszövetből ízületi gyulladás során. Ezért vizsgáltuk a GAG ellen termelődő természetes autoantitesteket rheumatoid arthritisben (RA). Amint az értekezés 44. oldalán olvasható, RA-s betegek szérummintáiban az egészséges kontrollokénál 2-4-szer nagyobb antitestszinteket mértünk ($p < 0,001$). Munkacsoportunk újabb eredményei alapján a szérumban a kondroitin-szulfát C-specifikus IgG-szint magasabb volt myasthenia gravisban ($n=59$) szenvedő betegekben, mint egészséges kontrollokban ($n=54$, $p=0,025$). Továbbá érdekes módon az immunszuppresszív kezelés növelte a glükózaminoglikán-specifikus IgM természetes autoantitestek szintjét ($p < 0,05$) [Pal Z et al. *J Neuroimmunol.* 2014, Nov 15;276(1-2):224-8.].

A természetes autoantitesteknek szerepük van a saját antigének iránti tolerancia fenntartásában, a tolerancia sérülése alapvető játszik az autoimmun betegségek patomechanizmusában. A szérum-IgM jelentős részben a CD5+ B1 B-lymphocyták által termelt, a természetes autoimmunitáshoz tartozó polireaktív, kis affinitású antitest. A természetes autoantitestek az immunglobulinok jelentős részét alkotják, az immunglobulin-készítmények immunszuppresszív hatása jól ismert és alkalmazott számos autoimmun kórképben, ugyanakkor ma még igen

kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a természetes autoantitestek szisztémás autoimmun kórképekben játszott szerepéről.

A szerző felveti továbbá, hogy a nagyobb mennyiségű GAG-specifikus antitest RA-ban védő szerepű lehet. Kérem, magyarázza meg ennek a következtetésnek az alapját, hiszen a saját struktúrák ellen, ebben az esetben a porcszövetből az ízületi gyulladás során nagy mennyiségben felszabaduló GAG-ok ellen termelődő ellenanyagok egy krónikus ízületi gyulladásban károsító hatásúak is lehetnek (K2).

A GAG-ok ellen termelődő természetes autoantitestek gyulladásra kifejtett hatása nem ismert pontosan. Eredményeink szerint a kondroitin-szulfát-specifikus IgM szintje fordított korrelációt mutatott az RA klinikai aktivitásával, ennek alapján feltételezzük, hogy az általunk vizsgált természetes antitestek védő hatásúak lehetnek. A hialuronsav-degradációs termékek damage associated molecular patternként (DAMP) viselkedhetnek [Taylor KR et al. **J Biol Chem.** 2004, Apr 23;279(17):17079-84.]. Az egyik lehetséges magyarázat ennek alapján az lehet, hogy a degradálódó mátrixkomponensekhez kötődve a GAG-ok ellen termelődő antitestek gátolhatják a DAMP-receptorok aktiválódását. Így a GAG elleni természetes autoantitestek védő szerepet játszhatnak RA-ban.

Irodalmi adatok alapján a synoviális folyadék GAG-szintje magasabb a szérumban GAG-szintnél RA-ban [Bensouyad A et al. **Ann Rheum Dis.** 1990, 49(5):301-7.]. A GAG elleni antitestek aktív betegség során a porcból nagyobb mennyiségben ürülő GAG-hoz kötődnek, ez magyarázhatja a fordított korrelációt az antitestszint és a betegségaktivitás között. A synovialis folyadékban nagyobb mennyiségben jelenlévő GAG hasonlóan magyarázhatja a synovialis folyadékban alacsonyabb és a szérumban magasabb anti-GAG-antitest-szinteket ($p < 0,001$). A természetes autoantitestek fiziológias és az autoimmun kórképekben betöltött szerepének további vizsgálata hozzájárulhat a toleranciasérülés és az autoimmunitás patomechanizmusának jobb megértéséhez.

Témával kapcsolatos másik eredményük volt, hogy a HCgp-39 rs4950928 és rs10399931 polimorfizmusa nem asszociál az RA-val. Mivel a dolgozatból nem derül ki, hogy miért pont ezt a polimorfizmust elemezték, hogyan értékelhető ez az eredmény az irodalmi adatok tükrében, a bíráló nem tudja megítélni ennek újdonság tartalmát és jelentőségét.

A HC-GP 39 gén promoter régiójának polimorfizmusait (rs4950928; rs10399931) vizsgáltuk RA-ban, amint az értékezés 48. oldalán olvasható. A chitinase 3 like 1 (CHI3L1), más néven human cartilage glycoprotein 39 (HC

gp-39) synovialis fibroblastokban termelődik [Nyirkos P et al. **Biochem J.** 1990, Jul 1;269(1):265-8.], és szerepe lehet az RA patogenezisében. RA-s betegek plazmájában a HC gp-39-szint magasabb, mint az egészséges kontrollokéban [Vos K et al. **Ann Rheum Dis.** 2000, Jul;59(7):544-8.]. Az rs4950928 polimorfizmus hajlamosít schizopreniára [Zhao X et al. **Am J Hum Genet.** 2006, Jan;80(1):12-8]; az rs10399931 polimorfizmusnak szerepe van sarcoidosisban a CHI3L1 szint szabályozásában [Kruit A et al. **Respir Med.** 2007, Jul;101(7):1563-71]. A vizsgált polimorfizmusokban nem találtuk különbséget az allélok és a genotípusok gyakoriságában az RA-s betegek és az egészséges kontrollok között.

Vizsgálták további filaggrin, vimentin és kollagén peptidek alkalmazhatóságát RA és SLE betegek szérumból történő antitest kimutatás céljából, amelyek a kereskedelmi forgalomban lévő reagensekhez hasonló eredményt mutattak. A disszertáció nem tartalmaz információt arra nézve, miért pont ezeket az oligopeptideket, ill. azok citrullinált változatait választották a kísérletekhez. Kérem magyarázza meg ennek alapját (K3).

Munkánk során olyan argininben gazdag rövid filaggrin (fil306–326; fil311–315), vimentin (vim65–77) és kollagén II (koll359–369) peptidszekvenciákat szintetizáltunk és vizsgáltunk amelyeket a térszerkezetük, továbbá a rendelkezésre álló *in vitro* és *in vivo* adatok alapján a peptidilarginin-deimináz (PAD) enzimek citrullinálhatnak [Burkhardt H et al. **Arthritis Rheum.** 2002, Sep, 46(9):2339-48.; Hill JA et al. **J Immunol.** 2003, Jul 15, 171(2):538-41.; Raats JM et al. **J Rheumatol.** 2003, Aug;30(8):1696-711.; Schellekens GA et al. **J Clin Invest.** 1998, Jan 1;101(1):273-81.].

RA-ra specifikus, ritkán más betegségekben vagy egészségesekben is előfordulhatnak a citrullinált proteinek ellen termelődő antitestek (ACPA). A betegség 2010-es klasszifikációs kritériumainak is a részét képezi az ACPA [Aletaha D et al. **Arthritis Rheum.** 2010, 62(9):2569-81.]. A citrullinált proteinek polipeptidek módosításával, poszttranszlációs modifikációval szintetizálódnak, nem *de novo* proteinszintézis során (citrullin tRNS-t nem ismerünk). A PAD enzimek hatására a polipeptidekben lévő arginin citrullinná alakul. Az ízületekben synovitis során citrullint tartalmazó proteinek mutathatók ki, citrullinált fibrin a citrullinált vimentin, továbbá a citrullinált alfa-enoláz indíthatja be és tarthatja fenn az ACPA-termelést. Az extracelluláris fehérjéket a sejtekből apoptózis és nekrozis során kijutó PAD enzimek citrullinálják. A citrullinált proteinek feltehetően alapvető szerepet játszanak a saját antigénnel szembeni tolerancia áttörésében.

A TNF α -blokkoló kezelésben részesülő betegek CD4 T-lymphocytáinak TNF α kezelése nem fokozza a SLAP kifejeződését.” ÚE10. E témakörrel kapcsolatban

kérdezem, hogy az általuk is vizsgált CD4⁺ T-helper sejteken kívül milyen más T lymphocytá sejtpopulációk lehetnek érintettek? (K4)

Erdeményeink szerint a TNF- α dózisfüggő módon, szelektíven és reverzibilisen csökkenti a CD3- ζ -lánc kifejeződését humán CD4 T-sejteken. A TNF- α -kezelés fokozza a SLAP mennyiségét és a CD3- ζ -lánc proteaszómális lebomlását. A CD3- ζ -lánc szabályozását CD4 T-sejt alpopulációkban is érdemes vizsgálni. Jelenlegi kísérleteink a szabályozó T-sejtek és a Th 17-sejtek CD3- ζ -lánc kifejeződésének vizsgálatára és azok szabályozására irányulnak. Tervezzük a CD8 T-lymphocytákon a CD3- ζ -lánc szabályozásának és a SLAP kifejeződésnek a vizsgálatát is.

Ismert-e más proinflammatorikus citokin hasonló hatása a T-sejtek SLAP mennyiségére, és a ζ -lánc ezt követő csökkenésére? (K5)

Vizsgáltuk proinflammatorikus és antiinflammatorikus citokinek hatását is a CD3-zeta lánc kifejeződésére. Még nem közölt eredményeink szerint a TNF-hez hasonlóan más proinflammatorikus és antiinflammatorikus citokinek (IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 és az IL-35) is csökkentik, ugyanakkor az IL-1, IL-2 és az IL-4 nem befolyásolják a CD4 T-lymphocyták CD3-zeta-lánc expresszióját. A különböző proinflammatorikus és antiinflammatorikus citokinek SLAP-kifejeződésre kifejtett hatását is tervezzük vizsgálni.

Terápiás szempontból, milyen módon lehetne a SLAP termelődését, mennyiségét befolyásolni? (K6)

Irodalmi adatok [**Zhang Z et al. Blood. 2007, May 15;109(10):4328-35.**] alapján a csökkent CD3- ζ -lánc-kifejeződés hozzájárulhat hiporeaktív, proinflammatorikus citokineket termelő T-sejtek kialakulásához. Munkacsoportunk eredményei alapján RA-s betegek T-lymphocytáinak SLAP expressziója fokozott ($p < 0,05$), ugyanakkor a CD3- ζ -lánc szintje alacsonyabb az egészséges kontrollokénál. Így a SLAP szabályozza a T-lymphocytá-aktivációt a CD3- ζ -lánc kifejeződésének szabályozásán keresztül. A SLAP kifejeződik a T-lymphocyták mellett számos más sejtben, így többek között B-sejtekben, osteoclastokban, idegsejtekben és izomsejtekben. A SLAP-kifejeződés csökkentése CD4 T-lymphocytákon génterápiás módon például siRNS alkalmazásával [**Ryther RC et al. Gene Ther. 2005, Jan;12(1):5-11**] gyulladáscsökkentő hatású lehet.

Kérem vázoljon néhány mikrovezikulákkal kapcsolatos lehetőséget, amely klinikailag is releváns lehet az autoimmun kórképek elemzése és esetleges terápiája szempontjából (K7).

Az extacelluláris vesiculák (EV) meghatározó szerepet játszhatnak gyulladáso-
reumatológiai kórképek patogenezisében, az elmúlt években növekvő
érdeklődés kíséri az EV-kutatást, ami az EV-kel foglalkozó közlemények
számának robbanásszerű növekedésén is megnyilvánul. Az EV-k
biomarkerként is szolgálhatnak a gyulladáso-
betegségek mellett daganatos
betegségekben, a tumoros sejtekből származó EV-k korai és igen specifikus
jelzői lehetnek a rosszindulatú daganatos betegségeknek. Az EV-k szállítanak
fehérjéket, RNS-t, DNS-t és membránreceptorait segítségével specifikusan
kötődhetnek különböző célsejtekhez [Buzas EI et al. **Nat Rev Rheumatol.**
2014, Jun;10(6):356-64.]. A szintetizált EV-k alkalmasak lehetnek terápiás
molekulák célzott szállítására, így a jövőben szerepet kaphatnak a betegségek
széles körének gyógyításában is. Terápiás jelentősége is lehet annak az új
megfigyelésnek, amely szerint exosomák adenoasszociált vírusvektort
hordozhatnak. Az EV-asszociált vírusok elkerülhetik a neutralizáló antitestek
hatását [Fitzpatrick Z et al. **Hum Gene Ther.** **2014, Sep;25(9):785-6.**].

Ismételten köszönöm Dr. Kacs Kovics Imre alapos bírálatát és kérem a válaszaim
elfogadását.

Budapest, 2015. május 2.

Tisztelettel:



Dr. Nagy György
egyetemi docens