

Válasz Dr. Geiszt Miklós opponensi véleményére

Ezúton is szeretném megköszönni Dr. Geiszt Miklósnak a bíráló elkészítésére szánt idejét és a részletes értékelését. Köszönöm, hogy a benyújtott értekezésemet fontos felfedezéseket tartalmazó, kiemelkedő igényességgel megírt munkának tartja, amely alkalmas arra, hogy nyilvános vita keretében szélesebb körben bemutassam, valamint hogy támogatja az MTA doktora cím odaítélését.

Feltett kérdéseire, megjegyzéseire az alábbiakat válaszolom:

1. A bevezetésben nem szerepel, ugyanakkor jó néhány éve ismert, hogy a légutak epitélsejtjei is tartalmaznak szabályozott ROS-termelést mediáló NADPH oxidáz enzimeket (Duox1 és Duox2), amelyek expressziója IL-4 és IL-13 hatására jelentősen növekszik. Milyen interakciók alakulhatnak ki a légúti epitélsejtek saját ROS-termelése és az értekezésben tárgyalt ROS-termelő mechanizmusok között?

Válasz: A légúti hámsejtek Duox enzimei által folyamatosan termelt H_2O_2 fontos szerepet játszik a fertőzések elleni védekezésében (Forteza et al., *Am J Respir Cell Mol Biol.* 32: 462-469, 2005). A laktoperoxidáz enzim ugyanis H_2O_2 felhasználásával oxidálja a tiocianát aniont, hogy a rendkívül erős antimikrobiális hatású hipotiocianitot előállítsa (Wijkstrom-Frei et al., *Am J Respir Cell Mol Biol.* 29: 206–212, 2003). A Duox1 enzim kifejeződése IL-4 és IL-13, míg a Duox2 enzimé IFN- γ kezelés hatására szignifikánsan megemelkedik (Harper et al., *FEBS Lett.* 579: 4911-4917, 2005).

Az IL-4 és az IL-13 klasszikus Th2 citokinek, ennek ellenére válaszómban a veleszületett immunitás mechanizmusaira fogok fókuszálni, ugyanis megfigyeléseink szerint a pollen-eredetű oxidatív stressz független az adaptív immunválaszoktól. Kísérleteink eredményei alapján a pollen-eredetű ROS hozzájárul a hízósejtek aktiválódásához. Valószínűleg a pollen NAD(P)H oxidázok által termelt reaktív gyökök fokozhatják a légúti hám átjárhatóságát, és elősegíthetik az allergén-hízósejt kölcsönhatás kialakulását. A hízósejtekből a degranuláció során felszabaduló hisztamin a H1 receptorhoz kötődve fokozhatja a bronchiális hámsejtek Duox-mediált H_2O_2 termelését (Rada et al., *Am J Respir Cell Mol Biol.* 50: 125-134, 2014). Az aktivált hízósejtek által *de novo* szintetizált IL-4 és IL-13 szintén fokozni tudja a Duox1 expresszióját, ezzel egy olyan pozitív visszacsatolás

alakulhat ki, ami elhúzódó oxidatív stresszt eredményezhet a pollen expozíciónak kitett hámfelszín környezetében.

A veleszületett limfoid sejtek 2-es típusa (ILC2) szintén képes IL-4 és IL-13 termelésére aktivációt követően, napokkal az adaptív immunválaszok kialakulása előtt (Doherty et al., *J Allergy Clin Immunol.* 132: 205-213, 2013). Egy jelenleg elbírálás alatt álló NKFI pályázat (K125337) keretében tervezzük azt megvizsgálni, hogy a pollen NAD(P)H oxidázok által termelt ROS képes-e olyan citokinek termelődését és endogén danger-szignálok képződését indukálni, amelyek hozzájárulhatnak az ILC2 sejtek aktiválásához, és IL-4/IL-13 termeléséhez.

Szintén ennek a pályázatnak a keretében szeretnénk kideríteni, hogy parlagfű pollen expozíciót követően TLR4-mediált szignálok hozzájárulnak-e az oxidatív stressz kialakulásához a légúti hámsejtekben. Különösen izgalmas ez a kérdés annak a fényében, hogy megfigyeléseink szerint a pollen-eredetű oxidatív stressz neutrophil infiltrációt eredményez a légutakban, ugyanakkor Hosoki és munkatársai szerint (*Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 16: 45-50, 2016) TLR4 knock-out egerekben a neutrophilek beáramlása sokkal kisebb mértékű a pollen kezelést követően. Továbbá, egyes megfigyelések alapján a Doux2 által termelt ROS hozzájárul az LPS-indukálta TLR4 aktivációhoz a tüdőben (Ryu et al., *J Allergy Clin Immunol.* 131: 549-561, 2013), míg mások szerint Duox-mediált szignálok nem szükségesek az LPS által kiváltott neutrophil toborzáshoz a légutakban (Chang et al., *PLoS One.* 10: e0131810, 2015).

2. A jelölt a bevezetőben megemlíti (7. oldal), hogy a mitokondriális ROS termelés nélkülözhetetlen szerepet játszik a hipoxia-indukálható (HIF) transzkripciós faktor aktiválásában. Tudomásom szerint a HIF legfontosabb, jelenleg ismert szabályozását a prolin-hidroxiláz enzimek és ubikvitinligáz enzimek mediálják és a mitokondriumok pontos szerepe továbbra sem tisztázott az oxigénérzékelésében.

Válasz: Normoxiás körülmények között a HIF-1 α nagyon gyorsan degradálódik. Keletkezése után közvetlenül prolin-hidroxilázok (PHD-k) hidroxilálják. A két prolin oldalláncon (P402 és P564) is hidroxilált HIF-1 α -t a von Hippel-Lindau (VHL) tumor szuppresszor fehérjét is tartalmazó ubikvitin ligáz komplex ubikvitinálja, és ezzel megjelöli a proteaszómás degradáció számára. Hipoxiás körülmények között a PHD-k aktivitása csökken, ezzel

lehetővé válik a HIF-1 α stabilizálódása, transzlokációja a sejtmagba és a HIF-mediált transzkripció (Hamanaka és Chandel, *Curr Opin Cell Biol.* 21: 894-899, 2009).

Hipoxia során fokozódik a mitokondriális ROS termelés, és ez hozzájárulhat a PHD-k aktivitásának csökkenéséhez. Azokban a sejtekben, amelyekben nincs mitokondriális DNS (ρ^0 sejtek) hipoxia hatására nem kötődik a HIF-1 a nukleáris DNS-hez (Chandel et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 11715-11720, 1998). Farmakológiai inhibitorok alkalmazásával kimutatták, a mitokondriális légzési lánc III. komplexe felelős a ROS termelésért, amely lehetővé teszi a HIF-1-mediált transzkripciót hipoxia esetén (Chandel et al., *J Biol Chem.*, 275: 25130-25138, 2000). Megerősíti ezt a megfigyelést, hogy a Rieske Fe-S fehérje kifejeződésének gátlása shRNS technológiával, ami megakadályozza a ROS termelődését a III. komplexen, szintén lehetetlenné teszi a HIF-1 stabilizációját hipoxia esetén (Brunelle et al., *Cell Metab.* 1: 409-414, 2005; Guzy et al., *Cell Metab.* 1: 401-408, 2005). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a mitokondriális III. komplex által termelt ROS meghatározó szerepet játszik a HIF-1 α stabilizálódásában hipoxia esetén. A PHD-k működése a hozzáférhető oxigén, Fe²⁺ és α -ketoglutarát mennyiségétől függ (Kaelin és Ratcliffe, *Mol Cell.* 30: 393-402, 2008). A mitokondriális ROS a Fe²⁺ oxidálásával a katalitikus centrumban, vagy a redox-szenzitív ciszteinil-oldalláncok módosításával gátolhatja a PHD-k aktivitását (Fuhrmann et al., *Redox Biology* 12: 208–215, 2017).

Meg kell azonban említeni azt is, hogy vannak szerzők, akik szerint a mitokondriumok nem ROS termeléssel, hanem az elérhető O₂-szint szabályozásával modulálják a celluláris válaszokat hipoxia során (Chua et al., *J Biol Chem.* 285: 31277-31284, 2010). Más megfigyelések szerint a HIF-1 α hidroxilálásával párhuzamosan a PHD-k az α -ketoglutarátot szukcináttá oxidálják (Gottlieb és Tomlinson, *Nat Rev Cancer.* 5: 857-866, 2005), és ennek megfelelően a szukcinát, sőt a fumarát is gátolja a PHD-k működését (King et al. *Oncogene* 25: 4675-4682, 2006). Ha növekszik ezeknek a mitokondriális termékeknek a szintje a sejtben, a szukcinát dehidrogenáz vagy a fumaráz működésének gátlása miatt, ez a HIF-1 α stabilizálódását eredményezi (King et al. *Oncogene* 25: 4675-4682, 2006). Nemrégiben az is kiderült, hogy olyan mitokondriális működési zavarok, amelyek nem közvetlenül a légzési láncához vagy a Szent-Györgyi-Krebs ciklushoz köthetők befolyásolják a HIF-1 α mRNS expresszióját (Shvetsova et al., *Redox Biol.* 12: 1052-1061, 2017).

Mindezek alapján a mitokondriumok nagyon összetett mechanizmusok alapján szabályozzák a HIF-1 α kifejeződését és stabilitását, aminek csak egy szegmense a fokozott mitokondriális ROS termelés, ezért egyetértek a Bírálóval, hogy árnyaltabban kellett volna megfogalmaznom az idézett mondatot.

3. A tiol csoportok H_2O_2 -mediált oxidációja nem feltétlenül vezet diszulfid hidak kialakulásához (11. oldal). A cisztein, cisztein szulfénsavvá történő oxidációja önmagában megváltoztathatja a célfehérje szerkezetét és funkcióját, ahogyan ez pl. a protein tirozin foszfatáz enzimek esetében is történik.

Válasz: Köszönöm a kiegészítést! Bár a mondat megfogalmazása „Az oxidálódás eredményeként a fehérjén belül, vagy a fehérje molekulák között diszulfid hidak alakulhatnak ki.” sejteti, hogy a tiol csoportok oxidációja nem mindig eredményezi diszulfid hidak kialakulását, a következő mondat előtt logikailag hiányzik, hogy a cisztein szulfénsav kialakulása is megváltoztathatja a proteinek szerkezetét/funkcióját. A következő mondat ugyanis a tirozin foszfatázok működésének H_2O_2 általi szabályozására utal: „A H_2O_2 főleg kináz-mediált útvonalak szabályozásában vesz részt, a legjobban jellemzett *in vivo* célpontjai a protein tirozin foszfatázok (pl. PTP-1B, SHP1 és SHP2) [45].”

5. Az anyagok és módszerek fejezetben nem találtam információt arra vonatkozólag, hogy a parlagfű pollen extrakt (ragweed pollen extract) pontosan milyen eljárással készült.

Válasz: A parlagfű pollen extraktot a Greer Laboratories cégtől (Lenoir, NC, USA) vásároltuk liofilizált formában. Az ampullán a gyártó feltünteti a szárazanyag tartalmat és a fehérje tartalmat (Bradford). A parlagfűvet üvegházakban termesztik, a pollenszemeket speciális „porszívókkal” gyűjtik össze, majd vízben hidratálják. A kivonat a pollenszemekből kioldódó anyagokat tartalmazza. Az áztatás után az oldatot többlépcsős szűrőrendszeren átengedve sterilre szűrik, majd liofilizálják. Az ampullák nem tartalmaznak sem tartósítószer, sem puffer sókat.

6. A különböző eukarióta sejtekben expresszáldó NADPH oxidázok membrántopológiájára és működésére jellemző, hogy a NADPH kötő régió intracellulárisan helyezkedik el és a szuperoxid anionok termelése az extracelluláris tér felé történik. Az értekezésben ismertetett kísérletekben viszont azt tapasztalták, hogy az extracelluláris térben alkalmazott NADPH (és néhány esetben NADH) növeli az intakt

pollenszemek és szubpollen részecskék ROS-termelését. Milyen mechanizmussal történhet ez? Elképzelhető-e, hogy a NADPH hiányában detektált és a NADPH-val stimulált ROS termelés hátterében két különböző enzim áll?

Válasz: Igen, elképzelhető. Eddig még nem publikált megfigyeléseink szerint ugyanis a parlagfű pollenben legalább kétféle enzim a felelős a szuperoxid anion termeléséért. Az *in situ* gél NBT esszék eredményei alapján az egyik enzim csak a NADPH-t, míg a másik a NADH-t és a NADPH-t is használni tudja szubsztrátként a szuperoxid anion előállításához. Feltételezésünk szerint a csak NADPH-t használó enzim a Rboh fehérjecsaldába tartozik, míg a másik egy sejtfalhoz asszociált peroxidáz (Prx). A pollen kivonat készítése során a pollenszemek egy része valószínűleg szétesik, és az Rboh enzimet hordozó kis plazmamembrán darabok is belekerülnek az extraktba, míg a Prx enzim egyszerűen kioldódik a sejtfalból.

7. Ha a pollen oxidáz ROS-termeléséhez extracelluláris NADPH vagy NADH jelenlétére van szüksége, akkor milyen mechanizmussal juthat szubsztráthoz a pollen oxidáz a légutakban vagy a conjunctiva felszínén?

Válasz: Eredményeink szerint mind az intakt pollenszemek, mind a szubpollen részecskék önmagukban is képesek voltak szuperoxid anion termelésére exogén NADH vagy NADPH hozzáadása nélkül is, valószínűleg a plazmamembránhoz kötött Rboh enzim működésének köszönhetően. Tenyésztett hámsejtekben, dendritikus sejtekben és az egerek kötőhártyájában az intakt pollenszemek és a szubpollen részecskék oxidatív stresszt indukáltak exogén szubsztrát hozzáadása nélkül is. Ugyanakkor nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét sem, hogy extracelluláris NADH vagy NADPH is hozzájárulhat a pollen ROS termeléséhez. A légúti hámsejteket borító folyadékfilmben Cantin és munkatársai (*J Appl Physiol.* 63: 152-157, 1987) $22 \pm 3 \mu\text{M}$ NADPH koncentrációt mértek. A NADH szérumszintje egészséges egyéneknél $12,2 \pm 2,4 \mu\text{g/ml}$ (Braidy et al., *Brain Res.* 1537: 267-272, 2013).

8. Több különböző sejttípuson is megfigyelték, hogy a pollen vagy szubpollen hatására oxidatív stressz alakul ki a sejtekben. Mivel a kezelt sejtek maguk is expresszálhatnak olyan ROS-termelő enzimeket, amelyek a pollenkezelés hatására aktiválódhatnak, nem

világos a számomra, hogy ezekben a kísérletekben honnan lehet tudni, hogy a detektált ROS milyen forrásból származik. Elképzelhető például, hogy a pollen által termelt ROS aktiválja a kezelt sejtek saját ROS termelését (például az intracelluláris kalcium szint emelésén keresztül).

Válasz: Teljes mértékben egyetértek a Bírálóval, ezeknek a kísérleteknek az alapján nem lehet minden kétséget kizáróan megállapítani, hogy az intracelluláris ROS szintjében detektált növekedésben mekkora szerepe van a pollen/szubpollen-eredetű ROS-nak és az endogén ROS-nak. Az antioxidánsok (NAC) és a nem specifikus inhibitorok (DPI, quinankrin) az endogén ROS termelést is gátolhatják. A kérdés megválaszolásához vagy az kellene, hogy specifikusan tudjuk gátolni a pollen NAD(P)H oxidázokat /erre jelenleg nincs lehetőségünk/, vagy gátoljuk az intracelluláris Ca^{2+} emelkedés hatását pl. BAPTA-AM kezeléssel, vagy csendesítsük azokat a géneket, amelyeknek a termékei részt vehetnek az endogén ROS termelésben. Ezeket az utóbbi kísérleteket azért nem végeztük el, mert nem az volt a célunk, hogy azt bizonyítsuk, hogy kizárólag a pollen/szubpollen-eredetű ROS a felelős az oxidatív stressz kialakulásáért, hanem hogy a pollen NAD(P)H oxidázoknak szerepe lehet a megfigyelt jelenségben. Egy kísérletsorozatban mi magunk bizonyítjuk, hogy pollen expozíciót követően a hámsejtek mitokondriumai válnak a ROS elsődleges forrásává (34. ábra).

Kísérleteink eredményeiből az világosan látszik, hogy az a faktor, ami az endogén ROS termelést esetleg indukálhatja a hámsejtekben és DC-kben a pollen/szubpollen kezelést követően, az 72 °C-on végzett, 30 perces előinkubálással inaktiválható (21., 47. és 54. ábra).

9. A jelölt kimutatta, hogy a laktoferrin, *in vitro* és *in vivo* alkalmazva egyaránt csökkenti az oxidatív stresszt légúti epitelsejtekben, valamint mérsékli a RWE által indukált légúti gyulladást. Vizsgálták-e génhiányos egerek vagy neutralizáló antitestek segítségével, hogy az endogén módon expresszáldó laktoferrinnek van-e hasonló szerepe?

Válasz: Ezeket a kísérleteket nem végeztük el. Eredményeink szerint ugyanis a laktoferrin elsősorban vaskötő képessége révén fejtette ki a kedvező hatását az általunk vizsgált modellrendszerben. Ward és munkatársai (*Mol Cell Biol.* 23: 178-185, 2003) viszont kimutatták, hogy a laktoferrin knock-out egerekben nincs drámai különbség a szérum vas koncentrációjában, a teljes vaskötő kapacitásban, a máj és a lép vastartalmában, a transferrin

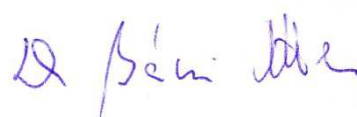
szaturációjában. Ez arra utal, hogy a laktoferrin hiányát más vaskötő fehérjék, pl. a transferrin kompenzálhatják.

A neutralizáló ellenanyagokkal végzett kísérletek eredményeit pedig nagy körültekintéssel kellene interpretálni, ugyanis a laktoferrinről korábban kimutatták, hogy képes hozzákötődni a polimorfonukleáris leukociták felszínéhez (Boxer et al., *J Clin Invest.* 70: 1049-1057, 1982; Deriy et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 275: 241-246, 2000). A laktoferrin-specifikus monoklonális ellenanyagok nemcsak a szolubilis, hanem a membránhoz kötött laktoferrint is felismerhetik. A sejtfelszíni laktoferrinhez kötődő ellenanyag aktiválhatja a polimorfonukleáris leukocitákat, és fokozhatja azok ROS termelését (Hu et al., *Biomed Res Int.* 2015:285237, 2015).

10. Az extracelluláris, mitokondriális DNS oxidációja fokozta a mtDNS pDC-aktiváló hatását. Az értekezésben ismertetett kísérletekben HL60 és Sp2/0-Ag14 sejtek Antimycin A-val történő kezelésével indukálták a mitokondriális DNS oxidációját. Vajon *in vivo* körülmények között milyen oxidatív folyamatok vezetnek a mtDNS módosulásához?

Válasz: A mitokondriális DNS az elektron transzport lánc közelében helyezkedik el, szerkezetét nem védik hiszton fehérjék, és a DNS hibákat kijavító mechanizmusok a mitokondriumokban kevésbé hatékonyak, mint a sejtmagban működők (Wallece D. C., *Sci Am.* 277: 40-47, 1997), ezért normál körülmények között is a mitokondriális DNS-ben magasabb az oxidált bázisok aránya, mint a magi DNS-ben (Hudson et al., *Free Radic Res.* 29: 573-579, 1998). Azok a hatások, amelyek akut vagy krónikus oxidatív stresszt okoznak a sejtekben, a mitokondriális DNS oxidatív károsodásához vezethetnek. Az életkor előrehaladásával a mitokondriumokban halmozódnak az oxidatív elváltozások (Barja et al., *FASEB J.* 14: 312-318, 2000). A légutakban az ózon (Chuang, et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 297: L209-216, 2009), azbesztszálak (Shukla et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 285: L1018-1025, 2003), vagy cigaretta füst (Fahn et al., *Am J Respir Cell Mol Biol.* 19: 901-909, 1998) belélegzése vezethet a mitokondriális DNS ilyen típusú módosulásához. A gyulladásos sejtek bevándorlása a légutakba az asthmás betegeknél krónikus oxidatív stresszt eredményez, és ez a mitokondriális DNS oxidatív károsodását válthatja ki (Reddy P. H., *Pharmaceuticals (Basel).* 4: 429-456, 2011).

Egy nemrégben megjelent tanulmány szerint - amelyben hivatkoztak is a mi megfigyeléseinkre - a mitokondriális ROS szintézisnek fontos szerepe van a neutrophil granulocitáknál megfigyelt extracelluláris csapda (neutrophil extracellular trap, NET) képzés elindításában, valamint a NETózis során kibocsátott oxidált mitokondriális DNS I-es típusú IFN képződést indukál, és hozzájárulhat autoimmun betegségek kialakulásához (Lood et al., *Nat Med.* 22: 146-153, 2016).



Dr. Bácsi Attila
egyetemi docens

Debrecen, 2017. június 08.