

Válasz Dr. Kurucz István opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Kurucz Istvánnak, hogy számos elfoglaltsága ellenére elvállalta értekezésem bírálatát, azt alaposan áttanulmányozta, és az értékelését elkészítette. Köszönöm, hogy a benyújtott értekezésemet olyan innovatív és kiemelkedő munkának tartja, amely mind formailag mind pedig tartalmilag egyértelműen eleget tesz az akadémiai doktori disszertáció követelményeinek.

A kritikai észrevételeket elfogadom. A 11. ábra F panel esetében valamilyen módon fel kellett volna hívnom az olvasók figyelmét, hogy a többi paneltől eltérően a vízszintes tengely értékeit itt logaritmikus skálán ábrázoltam.

Feltett kérdéseire az alábbiakat válaszolom:

1. A munka során vendortól származó, vagy saját gyűjtésű intakt pollenszemeket is használtak, különféle kísérletekhez. Többek között az ezekkel kezelt dendritikus sejtek T-sejt proliferációs és T-sejt polarizációs képességét vizsgálták meglehetősen hosszú sejttenyésztést igénylő kísérletekben. Kíváncsi lennék rá, hogy okozott-e ez valamilyen nehézséget, vagy igényelt-e valamilyen speciális kezelést a sterilitás fenntartásában?

Válasz: Azokban a kísérletekben, amelyekben tenyésztett sejteket kezeltünk intakt pollenszemekkel, minden alkalommal a Greer Laboratories cégtől vásárolt parlagfű pollenszemeket használtuk. Bár a tápfolyadékok csak az általánosan használt antibiotikumokat (100 U/ml penicillin, 100 ng/ml streptomycin) tartalmazták, egyetlen esetben sem tapasztaltuk, hogy a sejt kultúrák befertőződtek volna. A dendritikus sejteken végzett kísérletek előtt, *Limulus* amoebocita lizátum teszt felhasználásával, meghatároztuk a kezelésekhez használt pollen minták LPS tartalmát. A teszt 16 pg/ml LPS kontaminációt mutatott ki. A kísérletek során ez, a kontrollként alkalmazott 16 pg/ml-es LPS koncentráció nem bizonyult elegendőnek a dendritikus sejtek aktiválásához.

2. A légúti gyulladás *in vivo* modelljében számos alkalommal használtak intranazális kezelést nemcsak az allergén, hanem inhibitorok és siRNS bejuttatására is. A

módszertani leírásban és az eredeti publikációkban is csak nagyon kevés részlet található ennek technikai lebonyolításáról (térfogat, anesztézia említésre kerül pl.: Ogg1 kifejeződésének gátlása leírásakor a dolgozat 28. oldalán, vagy ugyanitt az eredeti cikkben; DNA Repair 12:18-26(2013) de más esetekben nem nagyon). Szeretném tudni mi volt a maximális térfogat amelyet intranazálisan adagoltak, illetve valóban végeztek-e ilyen típusú kezelést éber állatokon?

Válasz: Az intranazális kezeléseket minden esetben anesztézia alatt végeztük el. Ehhez az egereket ketamint (18 mg/ml) és xylazint (2 mg/ml) tartalmazó fiziológiás sóoldattal oltottuk intraperitoneálisan (100 µl). A mozgásképtelenné vált állatokat függőleges helyzetben úgy rögzítettük, hogy a fejük hátrahajoljon. Ebben a testhelyzetben az intranazálisan bejuttatott oldat mélyebbre hatol a légutakban. A kezeléshez használt oldat maximális térfogata 60 µl volt, amit 4 x 15 µl-es dózisokban juttattunk be, automata pipetta segítségével. Az egerek a kezelés után még egy percig függőleges pozícióban maradtak.

3. Számos inhibitort, illetve stimulátort használtak a munka során *in vitro* és *in vivo* is. Ezek közül néhány esetben nekem az alkalmazott koncentrációk viszonylag magasnak tűntek (in vitro DPI kezelések [pl. 58. ábra], vagy in vivo pl. a [JCI 115:2169, 2005]-ben leírt 12 µM GSSG vagy 75 µM 4-HNE per egér = 29,2 g GSSG/80 kg ember, illetve 46 g 4-HNE/80 kg ember dózissal;). Az lenne a kérdésem, hogy az inhibitorok illetve a kémiai anyagok alkalmazott koncentrációinak kiválasztása előkísérletek alapján dózis-hatás összefüggések felhasználásával, vagy pedig irodalmi adatok alapján történt?

Válasz: Az alkalmazandó DPI koncentráció meghatározásánál irodalmi adatokat vettünk alapul. Korábbi megfigyelések alapján a fagocita NADPH oxidázok és a növényi plazma membránban, vagy a sejtfalban található szuperoxid aniont termelő enzimek között fontos különbség, hogy az előbbiek sokkal érzékenyebbek a DPI gátló hatására ($K_i = 5-10 \mu\text{M}$), míg a növényi enzimeket csak nagyobb koncentrációjú DPI-vel (100 µM) lehet gátolni (Frahry és Schopfer, *Planta* 212: 175-183, 2001). Természetesen kipróbáltunk alacsonyabb DPI koncentrációt is kísérleteinkben (10 µM), de csak részleges gátló hatást tapasztaltunk.

A GSSG és a 4-HNE esetében a kezelésekhöz használt koncentráció kiválasztása előkísérletek alapján, dózis-hatás összefüggések vizsgálatával történt. Az alkalmazott koncentrációknál semmilyen toxikus hatás nem volt megfigyelhető az egerekben. Ha ezeket a

dózisokat emberre akarjuk vonatkoztatni, akkor figyelembe kell vennünk a két faj eltérő testfelület-testtömeg arányát (Kállai, L., *Magyar Állatorvosok Lapja* 123: 173-179, 2001). A metabolikus dózis figyelembevételével az egerekben alkalmazott dózisok az emberben a következőknek felelnek meg: 4,1 g GSSG/80 kg és 6,6 g 4-HNE/80 kg.

4. Lát-e arra reális esélyt, hogy a pollen NAD(P)H oxidázokat specifikusan gátló inhibitor lehessen fejleszteni: elképzelhető-e (esetleg már ismert) különbség a pollen és a humán NAD(P)H oxidázok (1) szerkezete (2) szubsztát felhasználása, illetve (3) ismert inhibitorokkal (pl. flavoprotein-, hem ligand-, bipiridil-, vagy benzimidazol típusú inhibitorok) való gátolhatósága között?

Válasz: Ha sikerül is ilyen specifikus gátlószert találni, az bizonyára nem lesz könnyű feladat. A növényi NADPH oxidázok (respiratory burst oxidase homologs: Rbohs) szerkezete ugyanis homológ a fagocita NADPH oxidázok gp91^{phox} alegységével: 6 transzmembrán domént tartalmaznak, amelyek két hem proszterikus csoportot kötnek, a C-terminális végükön egy FAD-kötő régió, és a NADPH-kötő hely található (Bedard et al., *Biochimie* 89: 1107-1112, 2007). Ennek megfelelően a flavoprotein inhibitorok, vagy a hem csoporthoz kötődő gátlószerek (idetartoznak a piridil- és az imidazol-származékok is) mind a két típusú enzim működését gátolják (Auh és Murphy, *Plant Physiol.* 107: 1241-1247, 1995). Fontos különbség azonban a fagocita NADPH oxidázokhoz képest, hogy a növényi NADPH oxidázok működéséhez nincs szükség más, szabályozó funkciójú fehérjékkel alkotott komplex kialakítására. Jelenlegi ismereteink szerint a pollen NADPH oxidázok működése az alábbiak szerint szabályozódik: 1.) Receptor-szerű kinázok (RLKs) (Boisson-Dernier et al., *PLoS Biol.* 11: e1001719, 2013) és Rac/Rop GTPázok (Potocky et al., *J Plant Physiol.* 169: 1654-1663, 2012) működésének eredményeként a protein N-terminális vége foszforilálódik. 2.) Ennek hatására a Ca²⁺-kötő motívumok (EF-hands) Ca²⁺-ot kötnek, ami ROS termeléshez vezet. 3.) A ROS termelés Ca²⁺-csatornák aktiválásával fokozza az intracelluláris Ca²⁺ szintet. 4.) A Ca²⁺-függő protein kinázok (CDPK) aktivitása fokozódik, ami az enzim N-terminális részének újabb foszforilálódását és a ROS termelés fokozódását eredményezi (Wudick és Feijo, *Mol. Plant* 7, 1595–1597, 2014; Jiménez-Quesada et al., *Front Plant Sci.* 7: 359, 2016). A receptor-szerű kinázok és a Rac/Rop GTPázok működésének gátlása elképzelhető, hogy nem befolyásolja a fagocita NADPH oxidázok működését. A pollen NADPH oxidázok működését szabályozó mechanizmusokat a gyakran használt laboratóriumi növényekben

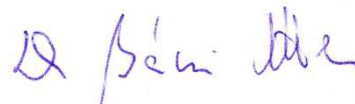
(lúdfű, dohány, olíva) vizsgálták részletesen. Nem tudjuk ma még, hogy ezek a mechanizmusok hasonlóan működnek-e a légúti allergiák szempontjából fontos fajokban is.

Tovább nehezíti a kérdés megválaszolását, hogy eddig még nem publikált megfigyeléseink szerint a parlagfű pollenben legalább kétféle enzim a felelős a szuperoxid anion termeléséért. Az egyik csak a NADPH-t, míg a másik a NADH-t és a NADPH-t is tudja használni szubsztrátként a szuperoxid anion előállításához. Feltételezésünk szerint a csak NADPH-t használó enzim a Rboh fehérjecsaládba tartozik, míg a másik egy sejtfalhoz asszociált peroxidáz (Prx) (Jiménez-Quesada et al., *Front Plant Sci.* 7: 359, 2016). A peroxidázok III. osztályába tartozó Prx enzimek glikoproteinek, amelyek hem proszterikus csoportot tartalmaznak, szerkezetüket négy diszulfid híd és két Ca^{2+} stabilizálja (Richards et al., *J Exp Bot.* 66: 37-46, 2015). A pollen Prx proteinek specifikus gátlószerének kifejlesztéséhez először azt kellene megvizsgálni, hogy a különböző fajokból izolált enzimeknek mennyire hasonlít a szerkezete és működése, ugyanis az eddig részletesen megvizsgált növény fajokban több tucat gén kódolja az enzimes család tagjait (pl.: lúdfűben 73 gén, rizsben 138 gén) (Almagro et al., *J Exp Bot.* 60: 377-390, 2009).

5. Sikerült-e előbbre jutni az adjuvánssal kiegészített vakcinálás kérdésében; nevezetesen lehet-e már tudni, hogy a szintetikus CpG szekvenciákban a G→8oxoG csere milyen hatással van az oligonucleotid adjuváns aktivitására?

Válasz: Kapacitás hiányában még nem tudtuk az értekezésben megemlített kísérleteket elvégezni, de az alábbi, mások által elvégzett vizsgálat eredményei megerősítik a koncepció helyességét. Yoshida és munkatársai (*Free Radic Biol Med.* 51: 424-431, 2011) 8-oxoguanin tartalmú oligodeoxinukleotidok (ODN-ek) gyulladáskeltő hatását vizsgálták. A tesztekhez az CpG motívumot tartalmazó ODN1668-at és a CpG motívumtól mentes ODN1720-at választották ki. Mindkét kiindulási ODN-nek 2-2 változatát állították elő. Az oxo(G9)-1668 a CpG motívumon belül, az oxo(G15) a CpG motívumon kívül tartalmazta a 8-oxoguanint. Az oxo(G8)-1720 és oxo(G15)-1720 volt a másik két vizsgált ODN. Az oxo(G15)-1668 szignifikánsan nagyobb mennyiségű TNF- α -t indukált a RAW264.7 makrofágokban, mint az ODN1668. Ezzel szemben az oxo(G9)-1668, az oxo(G8)-1720 és az oxo(G15)-1720 ODN-ek egyike sem aktiválta a sejteket. Az ODN1668-indukálta TNF- α termelést szignifikánsan növelte az oxo(G8)-1720, vagy oxo(G15)-1720 együttes adása, de az ODN1720-é nem. Ez a jelenség primer egér makrofágokban is megfigyelhető volt. Az egerek talpába szubkután

oltott ODN1668 lokális ödémát váltott ki, ami fokozható volt oxo(G8)-1720 egyidejű injektálásával, de ODN1720 beadásával nem.



Dr. Bácsi Attila

egyetemi docens

Debrecen, 2017. június 08.