

Válasz Dr. Gál Péter opponensi véleményére

Mindenekelőtt köszönöm Dr. Gál Péternek, hogy MTA doktori értekezésemet részletesen elbírálta, és hogy azt alkalmasnak tartja a nyilvános vitára.

Kérdéseire és megjegyzéseire az alábbiakban válaszolok.

1. *A dolgozat egészéből hiányolom a kvantitatív szemléletmódot. Teljesen egyetértek jelölt azon következtetésével, hogy „A H-faktor és az FHR fehérjék mennyiségi viszonyai, valamint affinitásuk különböző ligandumokhoz együttesen képesek a komplementaktiváció, ezáltal az opszonizáció és gyulladásos folyamatok finomszabályozására” (84 oldal). A dolgozatban viszont a kötések erősségéről csak kvalitatív megállapítások találhatók (pl. „a H-faktor viszonylag gyengén kötődik”, „az FHR-1 nem olyan erősen kötődik a sejtfelszínhez, mint a H-faktor”, stb.). Egyetlen kivétel a 67. oldalon a PTX3-FHR-5 kölcsönhatásra meghatározott konkrét K_d érték. A H-faktor molekulacsalád tagjainak fiziológiás koncentrációja szintén nagyon hiányzik a dolgozattól. Jó lett volna ezt a bevezetésben egy táblázatban összefoglalni. Igaz, a X. publikációban (Trends in Immunology review 2008) még arról olvashatunk, hogy az FHR fehérjék koncentrációjának a meghatározása különböző testfolyadékokban nehézségekbe ütközik az antitestek keresztreakciója miatt. A közlemény megjelenése óta eltelt 10 év. Kérem a jelöltet, hogy röviden foglalja össze, a jelenleg ismert koncentráció adatokat.*

Elfogadom ezt a kritikát, egyetértek, hogy szükséges kvantitatívan is leírni ezeket a kölcsönhatásokat, hogy a fiziológiás szerepüket megfelelően tudjuk értékelni. A molekulacsalád tagjainak fiziológiás mennyiségét illetően sajnos valóban az volt a helyzet, hogy nemcsak az FHR fehérjékre, de a H-faktorra vonatkozóan sem állt rendelkezésre pontos szérumszint koncentráció adat. Ennek az antitestek keresztreakciója, illetve nem megfelelő jellemzése volt az elsődleges oka, így például ma is kapható a kereskedelemben számos “H-faktor specifikus” és “FHR-1-specifikus” monoklonális antitest, amelyekről saját kísérleteinkben kiderült, hogy ezek a monoklonális antitestek nem monospecifikusak. Hasonlóan, egyes “H-faktor ELISA kit”-ek a H-faktor mellett az FHR-1-et vagy a H-faktor splice-variánsát, az FHL-1-et is mérik.

A H-faktor szérumszintjét az utóbbi években többen újra mérték olyan monoklonális antitestek segítségével, amelyek az FHR fehérjéket nem ismerik fel, így a jelenleg ismert értékek alacsonyabbak a korábbi mérésekénél. Azonban az új adatok is az FHL-1 és a H-faktor együttes koncentrációjára vonatkoznak: 135-349 µg/ml (0,87-2,25 µM), 78-437 µg/ml (0,5-2,8 µM), illetve 76-247 µg/ml (0,5-1,6 µM) (Hakobyan et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008;49:1983-90.; Hakobyan et al., Kidney Int. 2010; 78:782-8.; Merinero et al., Kidney Int. 2018; 93:470-481). Az FHR-ekre vonatkozóan is csak nemrégiben, új és részletesen jellemzett monoklonális antitestek kifejlesztésével sikerült megbízhatóbb adatokat nyerni. Itt bonyolítja a helyzetet, hogy az FHR-1, FHR-2 és FHR-5 homo- és heterodimer formákban is megtalálható a szérumban. Az FHR-1 homodimerek átlagos koncentrációja 11,5 µg/ml (146 nM), az FHR-2-é 0,5 µg/ml (11 nM), az FHR-1/FHR-2 heterodimereké 5,2 µg/ml (78 nM), az FHR-5 homodimereké pedig 1,49 µg/ml (11 nM) (van Beek et al., Front. Immunol. 2017; 8:1328.). Az FHR-3 átlagos koncentrációját 0,69 µg/ml (18,7 nM), illetve 1,06 µg/ml (28,7 nM) értékben határozták meg (Pouw et al., PLoS One 2016; 11:e0152164.; Schäfer et al., Front Immunol.

2016;7:542.). Az FHR-4A-ra és FHR-4B-re egyelőre nincs pontos koncentráció adat. Ezeket az értékeket a gén kópiaszámok is befolyásolják, így például a nulla vagy egy *CFHR1* génkópiát hordozók esetében értelemszerűen nincs, vagy kevesebb az FHR-1 a szérumban.

2. A 7. ábra C paneljén az látható, hogy a HUVEC sejtekhez a H-faktor és az FHR-1 mellett jól kötődik az FHL-1 is. Hogyan lehetséges ez, hiszen az FHL-1-ből hiányoznak a kötéshez szükséges C-terminális (19-20) domének?

A H-faktorban tulajdonképpen két fő kötőhely van, amelyek töltött molekulákhoz, felszínekhez, így például a proteoglikánok glükózaminoglikán láncához való kötődést tesznek lehetővé. Ezek a CCP 6-7 és a CCP 19-20 doménekben vannak; a szialsav-kötő hely a CCP20-ban található. Így a H-faktor és az FHL-1 is tartalmaz glükózaminoglikán-kötő doméneket (CCP 6-7). A glükózaminoglikánoknak (pl. heparán szulfát, dermatán szulfát) és a szialsavnak fontos szerepe van a H-faktor sejt felszínekhez és extracelluláris mátrixokhoz való kötődésében, így ezek eltérései befolyásolják a H-faktor és az FHL-1 kötődését a különböző felszínekhez. A HUVEC sejtek esetében szérumból mind a H-faktor, mind az FHL-1 kötődése kimutatható volt, ugyanakkor a tisztított FHL-1 kötődését a HUVEC sejtekhez részletesebben nem vizsgáltuk.

3. A 10. ábra A panelje alapján elmondhatjuk, hogy a H-faktor kötődése a HUVEC sejtekhez függ az ionerősségtől. Nagyobb ionerősségű pufferben gyengébb a kötés. Ez arra utalhat, hogy a kötődés elsősorban ionos jellegű. A pH változás jelentősen megváltoztathatja egy fehérje felszíni töltését. Ez azért különösen fontos, mert az alternatív utat gyakran a szérum savanyításával indítják be. Ez történt pl. a 67. ábrán látható kísérletben is, amikor a különböző mini H-faktor molekulák hatékonyságát vizsgálták PNH-vörösvérsejtek lízisének gátlásában. Vizsgálta valaki a H-faktor sejtekhez kötődésének pH függését? Lehetséges, hogy a szérum savanyítására azért indul be az alternatív út a sejtek felszínén, mert a H-faktor gyengébben kötődik?

Köszönöm ezt az érdekes felvetést. Tudomásom szerint a H-faktor sejtekhez kötődésének pH-függését közvetlenül nem vizsgálták. Fishelson és munkatársai azonban kimutatták, hogy a pH csökkentésével a C3b-vel fedett emberi vörösvérsejtekhez a B-faktor, a properdin és a H-faktor is jobban kötődik. 6,4-es pH-n a properdin és a H-faktor kb. másfélszeres, a B-faktor kétszeres, míg 6,0-os pH-n a properdin és a H-faktor kb. kétszeres, a B-faktor pedig háromszoros kötődést mutatott a pH 7,0 pufferben mért kötődéshez képest (Fishelson Z. et al. J. Immunol. 1987;138(10):3392-5.). Ez alapján feltételezhető, hogy alacsonyabb pH-jú közegben több aktív C3-konvertáz keletkezik a sejt felszínen, amivel a pozitív (properdin) és negatív (H-faktor) szabályozó molekulák kötődésének növekedése nem tart lépést, ezáltal a folyamat az alternatív út aktivációjának kedvez.

4. A 11. ábra D panelje alapján egyik vizsgált antitest sem gátolta a H-faktor kofaktor aktivitását a C3b I-faktor általi hasításánál folyadék fázisban. Ez a C-terminálisra kötődő antitestek esetében várható is volt; azonban az E22 antitest sem gátol, ami pedig a kofaktor aktivitáshoz szükséges 1-4 domén régióhoz kötődik. Mi a gátlás elmaradásának magyarázata ennél az antitestnél? Mi a magyarázata az E14 antitest esetében látható, a többitől eltérő hasítási képnek?

A kérdés részben azonos a másik opponens, Dr. Medgyesi György által feltett kérdéssel, így erre a részre hasonlóképpen válaszolok. A 11D ábrán bemutatott kísérletben azt vizsgáltuk, hogy az egyes monoklonális antitestek a H-faktorhoz kötődve gátolják-e annak kofaktor aktivitását, így a C3b I-faktor általi hasítását a folyadék fázisban. A vizsgált antitestek egyike sem gátolta a kofaktor aktivitást, de az E14 jelű H-faktor ellenes monoklonális antitest jelenlétében a C3b α' -lánc tovább hasadt. Ez az antitest a H-faktornak a felszínhez lekötődött C3b-vel való kölcsönhatását gátolta (mivel ebben az antitest által felismert H-faktor C-terminális molekularész vesz részt). A kofaktor aktivitásban szerepet játszó H-faktor N-terminális rész kölcsönhatását a C3b-vel viszont nem vizsgáltuk. Feltételezhető, hogy az antitest a H-faktorhoz kötődve – annak konformáció változását kiváltva – befolyásolja a C3b-vel való kölcsönhatást a folyadék fázisban is. Az egyes monoklonális antitestek között az epitópokban való eltérés magyarázhatja, hogy másképpen befolyásolják a H-faktor kofaktor aktivitását.

Az E22 jelű antitest nem befolyásolta a felszínre kötött C3b-vel való kölcsönhatást, ami érthető, hiszen ebben a C-terminális H-faktor domének szerepe fontos. A folyadék fázisban sajnos nem vizsgáltuk a C3b – H-faktor kölcsönhatást, így nem tudom, hogy az antitest ezt befolyásolja-e. (Feltehetően nem, hiszen nem gátolta a kofaktor aktivitást.) Feltételezhető, hogy az antitest a CCP3 doménen olyan helyre kötődik, ami nem befolyásolja lényegesen a C3b-vel való kölcsönhatást a folyadék fázisban. Más, publikálatlan vizsgálatainkban is találtunk olyan N-terminális doménekhez kötődő monoklonális antitesteket, amelyek a kofaktor aktivitást nem befolyásolták.

5. Jelölt elegáns modellt dolgozott ki az FHR-1 hiányának a H-faktor ellenes autoantitestek kialakulásában játszott szerepére vonatkozóan (48. oldal). E-szerint a bakteriális H-faktorkötő fehérjék olyan konformáció változást indukálnak a CCP20 doménben, amely az FHR-1 CCP5 doménjéhez teszi azt hasonlatossá. A VIII. publikációban konkrét példaként említik a borrelia OspE fehérjét, mint ami ilyen konformációváltozást képes kiváltani. A CCP19- 20:OspE komplex röntgenszerkezetének (Bhattacharjee és mtsai. 2013 J Biol Chem 288, 18685) vizsgálata alapján azonban úgy tűnik a bírálónak, hogy rigid fehérje-fehérje kölcsönhatással állunk szemben: a komplexben lévő CCP19-20 szerkezete gyakorlatilag megkülönböztethetetlen a szabad CCP19-20 szerkezetétől. Nem vonom kétségbe, hogy lehetnek olyan patogén fehérjék, amelyek kiváltják az említett konformáció változást, de az OspE szerintem nem ilyen. További kérdés a modellel kapcsolatban az, hogy a fertőzés elmúltával, amikor már nincs jelen a konformációváltozást indukáló bakteriális fehérje, miért tudnak mégis a neoepitóp elleni autoantitestek hatékonyan kötődni a H-faktorhoz (erősebben, mint az FHR-1-hez, amin pedig az epitópot tartalmazó hurok állandóan exponálva van)?

Egyetértek a bírálóval abban, hogy az OspE szerepe az aHUS-asszociált H-faktor ellenes autoantitestek képződésében valószínűtlen. Egyrészt, ahogy a bíráló is megjegyzi, az OspE-indukálta konformáció változás a CCP20-ban legalábbis minimális mértékű, másrészt ez a bakteriális fehérje közvetlenül az autoantigén hurok régióhoz kötődik a CCP20-ban. A *Borrelia ssp.* által okozott fertőzés is viszonylag ritka, és nem magyarázná a kisgyermekkori autoimmun aHUS megjelenését. Mivel gyakran írtak le felső légúti fertőzést a betegség megjelenését megelőzően, inkább ilyen irányban lehetne keresni az okot. Nem lesz minden eset következménye az autoimmunizáció, feltehetően egyéb, köztük genetikai tényezők szerepe is lényeges abban, hogy a H-faktor ellenes autoantitestek megjelenésének valószínűségét növeljék.

A CCP20 domén adott hurok régiójának több pontja ellen képződhetnek autoantitestek, ez és a betegekben – néhány kivétellel – az FHR-1 fehérje hiánya magyarázhatják a H-faktorról való reaktivitást bakteriális fehérje jelenléte nélkül is.

6. Jelölt és mások eredményei szerint bizonyos FHR molekulák (pl. FHR-4), a H-faktorról ellentétben, nem gátolják, hanem éppenséggel fokozzák a komplementaktivációt. Ez hasznos tulajdonság lehet bakteriális fertőzés esetén, amikor a H-faktort kötő mikroorganizmusok felületén komplementaktivációt okoznak. Az FHR-ek azonban saját sejteinkhez is kötődhetnek. Mi lehet a funkciója ebben az esetben a fokozott komplementaktivációnak?

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint az FHR-1 és az FHR-4 kötődhetnek neutrofil granulocitákhoz, ahol az FHR-1-nek a sejtek adhéziójának fokozásában volt szerepe (Losse et al., J. Immunol. 2010; 184:912-21.). Tudomásom szerint mások nem vizsgálták részletesen az FHR-ek élő sejtekhez kötődését, és még mi sem vizsgáltuk, hogy élő sejtekhez kötődve befolyásolják-e a komplementaktivációt. Apoptotikus és nekrotikus sejtekhez azonban kötődhet az FHR-1 és az FHR-5, amelyek ebben az esetben az apoptotikus/nekrotikus sejtek opsonizációját fokozhatják saját kísérleteink és mások adatai szerint is (Csincsi et al., J. Immunol. 2017;199:292-303.; Chen et al., J. Am. Soc. Nephrol. 2016;27:1413-25.).

7. Az 59. ábra a mini H-faktor C3b-vel képzett komplexét mutatja saját sejt felszínén. A sematikus ábra irodalmi adatok (C3b:CCP1-4 és C3b:CCP19-20 komplexek kristályszerkezete) alapján készült. Nemrég jelent meg egy publikáció (Xue és mtsai. 2017 Nat. Struct. Mol. Biol. 24,643) amely a C3b:mini H-faktor, illetve a C3b:mini H-faktor:I-faktor komplex szerkezetét ismerteti. Ezen legújabb szerkezetek mennyiben támasztják alá a dolgozatban szereplő modellt?

Az idézett szerkezeti adatok lényegében alátámasztják az általunk is vázolt modellt, bár egyes részleteiben eltérnek, hiszen a sematikus ábránk csak hozzávetőlegesen jelezte a C3b molekulát és az egyes H-faktor doméneket, továbbá a szerkezeti adatok a mini H-faktor egy olyan változatára vonatkoznak, ahol egy 12-aminosavas kapocs található a CCP1-4 és a CCP19-20 domének között. Ez nagyobb flexibilitást biztosít, mint ami a mi változatunk esetében várható. A mini H-faktor az idézett cikk eredményei szerint a C3b-hez ugyanúgy kötődik, mint az egyes részei külön-külön, a CCP4 és CCP19 között minimális kontaktus van csak.

Végezetül még egyszer köszönöm Dr. Gál Péter biztató szavait, a részletes bírálatot és az értekezés vitára bocsátásának támogatását.

Budapest, 2018. február 2.

Dr. Józsi Mihály