

Válasz Dr. Széll Márta opponensi véleményére

Először is köszönöm Dr. Széll Mártának, hogy MTA doktori értekezésemet részletesen elbírálta, és hogy alkalmasnak tartja a nyilvános vitára.

Kérdéseire, megjegyzéseire az alábbiakban válaszolok.

Hasznosnak láttam volna, ha a Jelölt a disszetációban szereplő betegségek pathogeneziséről, pathomechnizmusáról egy-egy féloldalmi áttekintő ismertetést ad.

Bár a dolgozatban elsősorban a H-faktor molekulacsalád és az alternatív komplement út szerepére koncentráltam, elfogadom a kritikát, hogy valóban szerencsésebb lett volna az egyes érintett betegségek pathogeneziséről, pathomechanizmusáról egy rövid áttekintést adni, ez megkönnyíthette volna a bíráló és az olvasó helyzetét.

A Jelölt a 9. oldalon ír az RCA gén klaszterről. Milyen információnk van arról, hogy mikor történtek a gén klaszter létrejöttéért felelős génduplikációk az evolúció során? Az evolúció során mikor jelentek meg a humán komplement szabályozó faktorokkal funkcionálisan analóg molekulák? Humán vonatkozások tekintetében mennyire hasznosak az alacsonyabb rendűek komplement szabályozásával kapcsolatos tanulmányok eredményei?

Az RCA génklaszterben kódolt fehérjékre jellemző az SCR vagy más néven CCP domén. A különböző fehérjékben, különböző fajokban található CCP szekvenciákra számos konzerválódott aminosav jellemző, ami a közös eredetüket és funkcionális jelentőségüket is mutatja. A CCP domén egy evolúciósan meglehetősen sikeres és elterjedt domén, ami nemcsak komplementszabályozó fehérjékben fordul elő (így pl. az IL-2R alfa lánc is tartalmazza), a CCP domének tehát nemcsak a komplementrendszer működésében és szabályozásában fontosak. A humán komplementfehérjék CCP-íhez hasonló szekvenciák megtalálhatók szivacsokban, a *Caenorhabditis elegans* és a *Drosophila* genomban is, így ősi eredete valószínűsíthető. Ezeknek a géneknek a fehérje termékeit azonban a komplementrendszerben betöltött esetleges szerepüket illetően nem vizsgálták, az ilyen vizsgálatokat nehezzé teszi a megfelelő reagensek hiánya és az eltérő fajok komplementfehérjei közötti inkompatibilitás.

A génklaszter kialakulására és funkcionálisan igazolt komplement szabályozó molekulák létére a csontos halaktól kezdve vannak adatok. Kimutatták, hogy a humán C3b és C4b is hasítódik, ha egyes halak szérumával inkubálják őket. Egy tengeri sügérfajban (*Paralabrax nebulifer*) megtalálható olyan, 17 CCP doménből felépülő molekula (sand bass cofactor protein, SBP1), amely humán C3b-t és C4b-t is köt, mind az alternatív utat szabályozó H-faktor, mind a klasszikus és lektin utakat szabályozó C4b-kötő fehérje aktivitásával is bír, és ezeket a funkciókat a CCP1-4 domének közvetítik (Kemper et al., J. Biol. Chem. 1998;273:19398-19404). Vagyis ezek a funkciók meglehetősen konzerváltak, hiszen a két evolúciós vonal már 100 millió éve elvált egymástól. A külön H-faktor és C4b-kötő fehérje később jelent meg, feltehetően génduplikációt követő funkcionális divergencia következtében. A kromoszómán elfoglalt helyük

és szekvenciájuk alapján is két csoportra oszlanak az RCA gének, a H-faktor és FHR fehérjék csoportjára, és a C4b-kötő fehérje és membránkötött komplementreceptor/komplementregulátor fehérjék csoportjára. Megjegyzendő, hogy az említett tengeri sügérben egy mindössze 3 CCP doménből álló H-faktorról rokon molekulát is azonosítottak (SBCFR-1, sand bass cofactor-related protein) (Zipfel et al., Dev. Comp. Immunol. 1996;20:407-416.).

A sejtmembránon kifejeződő komplementszabályozó fehérjék közül rácsálókban az emberi DAF (decay accelerating factor) és MCP (membrane cofactor protein) sejtmembrán fehérjék funkcióit egy fehérje, a Crpy (complement receptor-related protein gene y) látja el, bár egérben található külön DAF gén is. Hasonlóképpen, a CR1 és a CR2 komplement receptorok funkcióját ellátó fehérjék egérben egy génről, alternatív splicing révén képződnek, míg emberben már két külön gén kódolja a CR1 és a CR2 molekulákat. A sejtmembránon megjelenő szabályozó fehérjék C3b/C4b-kötő és regulátor funkcióval rendelkező (N-terminális) doménjei konzerváltak és homológok a H-faktor és a C4b-kötő fehérje megfelelő N-terminális doménjeivel; feltételezik, hogy az ezeket a funkcionális doméneket kódoló szekvenciák a C4b-kötő fehérje génjének részleges duplikációja révén kerültek a membránkötött komplementfehérjék génjeibe (Krushkal et al., Mol. Biol. Evol. 2000; 17:1718–1730.).

Mindenképpen hasznosnak gondolom az alacsonyabbrendűek komplementrendszerének és annak szabályozásával kapcsolatos kutatásokat is, mert egyrészt ezek során olyan molekuláris kölcsönhatások és szabályozási mechanizmusok merülhetnek fel, amiket aztán humán vonatkozásban is érdemes vizsgálni, másrészt betegség-modellek vizsgálata során kapott eredmények értelmezésében is fontosak ezek az ismeretek. Az utóbbi években például több aHUS és AMD egér modellt próbáltak létrehozni, amelyek több-kevesebb megszorítással használhatók komplementgátló molekulák preklinikai vizsgálata során.

*A 12. oldalon a jelölt bemutatja a H-faktor molekulacsaládot és egy ábrán szemlélteti az egyes domének homológiáit. Ebből jól látszik, hogy a FHR-1*A, FHR-1*B, FHR-2 és FHR-5 fehérjék 1. és 2. doménjei mindössze 41-42 illetve 32-34%-os hasonlóságot mutatnak a H-faktoron homológ 6-7-es doménekkel. Történt-e ennek a nagyfokú különbözőségnek a magyarázatára valamilyen vizsgálat? A H-faktor és a FHR molekulák evolúciója során mikor és milyen változások történtek, melynek eredményeképpen ezekben a doménekben ilyen nagyfokú a szekvencia különbség? Ugyanez a kérdés merül fel az FHR-3, FHR-4A, FHR-4B, FHR-5 molekulák utolsó doménje és a vele homológ H-faktor domén (20-as) relációjában.*

A H-faktor CCP doménjeit – a CCP2 kivételével – egy-egy exon kódolja, amelyek szimmetrikusak, így génduplikációs és rekombinációs események során “kieeshet” vagy be lehet toldani CCP-kódoló exonokat anélkül, hogy eltolódna a leolvasási keret. Más fajokban is létrejöttek ilyen módon FHR gének, ezek eltérő mértékű hasonlóságot mutatnak az adott faj H-faktor génjéhez. Egérben például 5 FHR fehérjét azonosítottak (ebből kettőről azt feltételezik, hogy pszeudogének), ezek doménjei azonban általánosságban sokkal nagyobb mértékű hasonlóságot mutatnak a H-faktor homológ doménjeihez, mint az emberi FHR-ek, illetve eltérő a domén-összetételük is. Például az egér FHR-B fehérje 5 CCP doménje 96, 100, 96, 85 és 89% azonosságot mutat az aminosav-szekvencia szintjén az egér H-faktor CCP 5, 6, 7, 19, illetve 20

doménjeivel. Közvetlen homológiát az egér és a humán FHR-ek között nem lehet kimutatni, ezek feltehetően egymástól függetlenül alakultak ki. Jellemző az FHR fehérjékre a szabályozó funkciókért felelős CCP1-4 H-faktor domének hiánya, de például a zebrafishban található 4 H-faktor-szerű fehérjében vannak a H-faktor CCP1-3 doménekkal homológ domének is. Szekvenciaelemzések alapján valószínűsíthető, hogy ez utóbbi FHR molekulák a hal-embrió vonal elkülönülése után, függetlenül jelentek meg az evolúció során (Sun et al., Funct. Integr. Genomics 2010;10:577–587.).

Az FHR-1, FHR-2 és FHR-5 fehérjék két N-terminális doménje egymáshoz mutat nagy hasonlóságot, a H-faktor CCP6-7-hez alig; ezek a domének is részleges génduplikációk révén kerültek mindhárom fehérjébe, és ezeknek az FHR-eknek a dimerizációját teszik lehetővé (Goicoechea de Jorge et al., PNAS 2013;110:4685-90.). Ezzel ezek az FHR-ek egyes ligandumokhoz (pl. felszínen lekötődött C3b) nagyobb aviditással tudnak kötődni. Hasonló dimerizációt egyelőre nem-humán FHR-ekre nem írtak le. Ahogy a bíráló is említi, a H-faktor CCP20-as doménhez különböző mértékű hasonlóságot mutatnak az egyes FHR-ek megfelelő homológ doménjei, amelyek feltehetően a duplikációk utáni divergenciát, más-más ligandumokra való "specializációt" tükröznék. Jelenleg az FHR-ekkel kapcsolatos fő kihívás a ligandumaik azonosítása, az azokhoz való kötődés erősségének meghatározása, a ligandum-spektrumok közötti átfedések, eltérések meghatározása, végső soron a funkciójuk pontosabb megértése. Az egyes FHR-ek és a különböző fajok FHR-jei közötti eltéréseket magyarázhatják a különböző szelekciós nyomások, például eltérő kórokozókhoz való alkalmazkodás.

A Jelölt a 14. oldalon ismerteti, hogy a H-faktor Y402H polimorfizmusa milyen fontos szerepet játszik az időskori makula degeneráció kialakulásában. Ismert-e, hogy ez a polimorfizmus a különböző populációkban eltérő ritka allélfrekvenciában fordul elő és ennek van-e következménye abból a szempontból, hogy a különböző nagyrasszokban a makula degeneráció eltérő arányban fordul elő?

Igen, van arra adat, hogy az európai nagyrasszban az időskori makula degenerációra hajlamosító H-faktor 402H változat nagyobb gyakorisággal fordul elő, és itt gyakoribb az AMD, mint egyes ázsiai populációkban. Így például a 402H változat allélfrekvenciája a vizsgált japán, kínai és koreai populációkban <1%, míg más vizsgált populációkban 17-42% közötti értékek adódtak. Az AMD prevalenciája az ázsiai populációkban <1%, míg az európai és más vizsgált csoportokban 1,13-9,24% között volt (Nonyane et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010;51:2393-402.). Kivétel egyes afrikai népcsoportok, ahol a rizikó-változat magas allélfrekvenciája az AMD kis gyakoriságával párosul; itt azonban a CFHR3 és CFHR1 gének deléciója jóval gyakoribb, mint például az európai nagyrasszban (Holmes et al., PLoS One. 2013;8:e60352.), és ez a kettős géndeléció egy igazolt protektív tényező az AMD esetében.

Az Anyagok és alkalmazott módszerek fejezet nem részletező, hanem a specifikumokat kiemelő rész, négy oldalban összeállítva. [...] Egyetlen észrevételem a fejezettel kapcsolatosan, hogy a 21. oldalon említett egyetemi tankönyveket, jegyzeteket és szakkönyveket én ajánlatosnak tartottam volna citálni.

Köszönöm az észrevételt, igazat adok a bírálónak abban, hogy az olvasó pontosabb útmutatást kaphatna, ha ezek a referenciák is szerepnének a hivatkozások jegyzékében.

A 26. oldalon a Jelölt írja, hogy a HUVEC sejtek nem fejezik ki a CR1 molekulát. Mi ennek az oka? A sejt immortalizált voltának tudható be, vagy vannak olyan endotél sejtek, amelyek esetleg szervspecifikusan nem fejezik ki ezt a molekulát?

Vannak arra adatok, hogy a glomeruláris endotélsejtek nem fejeznek ki CR1-et (Nangaku M. Kidney Int. 1998; 54:1419-28.); a vesében a podocitákon expresszálódik CR1, illetve glomeruláris epitélsejteken mutatták ki *in vitro* (Thurman és Renner, Laboratory Investigation 2010;1-8). HUVEC-et illetően eltérő adatok találhatók az irodalomban, arra is van adat, hogy *in vitro* kultúrában tartva ilyen sejteket kimutatható a CR1, illetve különböző körülmények között (pl. hipoxia) indukálható az expressziója (Langeeggen et al., Inflammation 2002;26:103-110; Collard et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1999;276: C450-C458). A mi kísérleti körülményeink között tartott sejtek CR1-negatívak voltak; a membrán regulátorok expressziójának vizsgálata fontos volt a H-faktornak a sejt felszíni komplementregulációhoz való hozzájárulásának jellemzéséhez.

A dolgozat következő részében a Jelölt az aHUS-ban azonosított H-faktor mutációk funkcionális vizsgálata során kapott eredményeit ismerteti. Bemutatja, hogy az egyes mutációk hogyan és milyen mértékben változtatják meg a molekula különböző molekulákhoz – például heparin – való kötődését. A hibás fehérje kötődési sajátosságainak megváltozása milyen mértékben jelenítődik meg a kialakított fenotípusban? Készültek-e genotípus-fenotípus összefüggéseket feltáró vizsgálatok, esetleg ezek metaanalízise? (Ezeknek a tanulmányoknak nagy jelentősége lehet az érintett betegek ellátását végző orvosok számára és adott esetben a családok gyermekvállalás előtti genetikai tanácsadásában.)

Genotípus-fenotípus összefüggés olyan értelemben mutatható ki, hogy a H-faktor N-terminális mutációi általában C3 glomerulopátiára, C-terminális mutációi aHUS-ra, illetve az Y402H polimorfizmus (és néhány más rizikó-változat) az AMD-re hajlamosítanak. Az aHUS egy súlyos betegség, a C-terminális H-faktor mutációk esetében, amelyeket a dolgozatban leírt kísérletekben is vizsgáltunk, nem ismert olyan jellegű összefüggés, hogy egyik vagy másik mutáció enyhébb, súlyosabb vagy más kísérő tüneteket is okozna. Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy az aHUS multifaktoriális betegség, ahol az egyes komplementgén-mutációk általában heterozigóta formában, alacsony penetranciával jelennek meg, de esetenként többféle hajlamosító genetikai tényező együttesen is megjelenhet (pl. H-faktor mutáció és MCP polimorfizmus). Vannak azonban arra adatok, hogy egyes esetekben homozigóta vagy kettős heterozigóta C-terminális H-faktor mutációk esetében korai aHUS forma jelentkezik (pl. Caprioli et al., Hum. Mol. Genet. 2003;12:3385–3395; Dragon-Durey et al., J. Am. Soc. Nephrol. 2004;15:787–795; Skattum et al., Mol. Immunol. 2009;46:1573–1594.). Egy érdekes kivétel továbbá az R1210C mutáció, aminek következtében a mutáns H-faktor a szérum albuminhoz kovalensen kötődik. Az így kialakuló komplexekben a H-faktor molekula funkcionális doménjeinek hozzáférhetősége korlátozott, tehát nemcsak a C-terminális funkciói sérülnek, ami magyarázza ennek a mutációnak különböző

betegségekkel való asszociációját (aHUS, C3 glomerulopátia és AMD is); a végső kimenetelt az R1210C mutációtól független egyéb, köztük más genetikai tényezők határozzák meg (Recalde et al., J. Am. Soc. Nephrol. 2016;27:1305-11.).

A 35. oldalon aHUS betegek körében végzett vizsgálataikról ír a Jelölt és említ egy aHUS alcsoportot, az ún. D+aHUS betegek csoportját. Nem találtam a dolgozatban arra nézve háttér információt, hogy ez a beteg alcsoport miben tér el az aHUS betegek körétől, illetve nem találtam a dolgozatban olyan eredményt, amely kimondottan erre a betegcsoportra vonatkozik. Kérem röviden térjen ki a fenti kérdések taglalására!

A hemolitikus urémiás szindróma (HUS), melynek jellemző tünetei az akut veseelégtelenség, mikroangiopátiás hemolitikus anémia és trombocitopénia, egy gyűjtőfogalom, amin belül két nagy csoport különböztethető meg: a típusos és az atípusos (aHUS) formák. A típusos HUS jellemzően akut gastroenteritist követően jelenik meg, ezért gyakran D+HUS-ként (diarrhoea-associated HUS) hivatkoznak rá a szakirodalomban; háttérében leggyakrabban verotoxint/shiga-like toxint termelő enterohaemorrhagiás *E. coli* által okozott fertőzés áll. Ebben a gyakoribb HUS formában a bakteriális eredetű toxin az érendotélre toxikus hatású. A ritkább, aHUS esetek leggyakrabban a komplementrendszer alternatív útjának szabályozási zavaraihoz hozhatók összefüggésbe (komplementgén-mutációk vagy H-faktor autoantitestek miatt), de más, nem a komplementrendszer hibás működése miatt kialakuló formái is ismertek (pl. a diacylglycerol-kináz epszilon gén funkcióvesztéses mutációival összefüggő aHUS). Mi kimondottan az aHUS betegek mintáit vizsgáltuk, a komplementrendszerrel való összefüggése miatt; az említett D+HUS mintákat mintegy beteg kontrollként használtuk az egészségesek szérummintái mellett.

A dolgozat 38-40. oldalán bemutatott eredmények nagyon szépen példázzák a munka translációs jellegét, a disszertáció egyik nagyon értékes részének tartom ezeket az eredményeket. Kérdésem ezzel kapcsolatosan az, hogy mi a helyzet hazánkban az anti-C5 monoklonális ellenanyag eculizumab engedélyeztetésével és finanszírozásával.

Az anti-C5 monoklonális ellenanyag eculizumabot a PNH és az aHUS kezelésére törzskönyvezték, az európai törzskönyv alapján Magyarországon is engedélyezett, elérhető, és lehetőség van egyedi elbírálás alapján történő finanszírozására, off label alkalmazásra is.

A Jelölt az 52. oldalon írja, hogy egész magas arányban azonosítottak egészségesekben is H-faktor ellenes autoantitesteket. Történt-e ezen egészségesek esetében, vagy van-e folyamatban utánkövetés? Ugyanerre a kérdésre a klasszikus példa az a 2003-as NEJM-ben leírt vizsgálati eredmény, miszerint az Egyesült Államok hadseregének vérminta repozitóriumát retrospektív módon megvizsgálva kimutatták, hogy a későbbi SLE-s betegek szérumában jóval a betegség tüneteinek megjelenése előtt már jelen voltak a kóroki autoantitestek (Arbuckle et al, NEJM 2003).

Nincs tudomásom olyan vizsgálatról, amelyben ezt a kérdést vizsgálták volna, vagy folyamatban lenne hasonló vizsgálat. Megjegyezném ugyanakkor, hogy némileg szkeptikus vagyok az

egészségesekben előforduló H-faktor autoantitesteket illetően. Saját vizsgálatainkban nem sikerült egyértelműen H-faktor autoantitest pozitivitást igazolni egészséges egyének szérumban. Sajnos, az irodalmi adatok ezt illetően hiányosak, sokszor nem derül ki, hogy milyen kontrollokat alkalmaztak a fals pozitívítás kizárására, illetve több esetben egyértelmű, hogy hiányoznak ezek a kontrollok. Ezen túlmenően egyetlen példát sem ismerek, ahol egészséges egyénben feltételezett H-faktor ellenes autoantitestet funkcionálisan is vizsgáltak és igazoltak volna. Sőt, több esetben a máshol H-faktor ellenes autoantitestre pozitívnak minősített szérumban a mi vizsgálatainkban negatívnak bizonyult. Ezért mindenképpen további vizsgálatok szükségesek ennek a kérdésnek a tisztázására.

Az 56. oldalon ismerteti a Jelölt az FHR-4 fehérjét és a fehérje két izoformájának elsőként való azonosítását, vizsgálatát. Leírásra kerül az is, hogy ezek a fehérjék glikoziláltak. A kérdésem az, hogy a rovarsejtekben expresszáltatott fehérjék glikozilációja megegyezik-e a májban kifejeződő fehérjék glikozilációjával. Van-e a glikoziláltság mértékének hatása a fehérjék funkciójára?

Az értekezésben ismertetett kísérletekben használt, rovarsejtekben expresszáltatott FHR-4 glikozilációja minden bizonnyal eltér az emberi szervezetben képződő fehérje glikozilációjától, amit az SDS-poliakrilamid gélben mutatott eltérő mobilitásuk is jelez. Egyelőre nincs ismeretünk arról, milyen hatása van a glikozilációnak a fehérje funkciójára. Az ismertetett munkák óta sikerült beszerezni olyan, genetikailag módosított rovarsejteket, amelyek a megfelelő enzimek génjének beépítése miatt a humán sejtekhez hasonlóan képesek a rekombináns fehérjék glikozilálására. A jövőben tervezzük az így előállított FHR-4 és deglikozilált formájának funkcionális összehasonlítását a kérdés megválaszolására.

A dolgozat utolsó fejezetében a Jelölt a mini H-faktor molekulával végzett kísérleteinek eredményét vitatja meg, amelyben kitér arra is, hogy tőlük függetlenül két másik kutatócsoport is végez hasonló kutatásokat, mi több még közös összehasonlító vizsgálatokat is végeztek a három eltérő eredetű mini H-faktoral. Kérdésem ezzel a résszel kapcsolatosan az, hogy valamely molekula tesztelése átlépett-e már a klinikai fázisba, vagy továbbra is a preklinikai vizsgálatok folynak?

Tudomásom szerint egyelőre még csak preklinikai vizsgálatok folynak a mini H-faktor molekulákkal, illetve további módosításuk szükséges, mert a kis méretük miatt túl gyorsan kiürülnek a keringésből.

Végezetül még egyszer köszönöm Dr. Széll Mártának az értekezés részletes bírálatát, az elismerő szavakat és pozitív véleményét.

Budapest, 2018. február 12.

Dr. Józsi Mihály