

Bírálat Józsi Mihály „H-faktor molekulacsalád tagjainak élettani funkciója és szerepe komplement-közvetítette betegségekben” c. MTA doktori értekezéséről.

Az értekezés a kutatómunkáról beszámoló húsz eredeti közleményből, és az eredmények megbeszéléssel egybekötött összefoglalásából, valamint a szakirodalmi háttér vázlatából épül fel. A közlemények közül Jelölt hétben első, egyben megosztva első, nyolcban utolsó, háromban megosztva utolsó szerző. A közlemények elismert nemzetközi folyóiratokban jelennek meg, többségükben magas impakt faktorral.

A kutatási terület megválasztása helyeselhető. A komplement rendszer a veleszületett immunvédekezés leghatásosabb humorális tényezője. Ez a több, mint 30 fehérjét magába foglaló kaskád-rendszer szabályozottan működik, ami biztosítja, hogy – normális körülmények között – a rendszer a vele kapcsolatba kerülő idegen objektumokat eliminálja, de a szervezet saját sejtjeit ne károsítsa. A szabályozó mechanizmus fontos fehérjéje a H faktor, szerepének jelentősége elegendő okot szolgáltat arra, hogy a korszerű kutatások fókuszába kerüljön.

Az első témakör az értekezésben a H faktor C-terminális doménjeihez kötött funkcionális tulajdonságok vizsgálata. Ennek során domén-specifikus monoklonális ellenanyagok segítségével kimutatták, hogy a H faktor C-terminális doménjei szükségesek a molekula homolog endotélsejtekhez való kötődéséhez. Alátámasztották, hogy a sejtfelszínhez kötődő H faktor szerepet játszik a sejtek komplement-közvetítette károsodásának kivédésében. C-terminális doméneket érintő mutáns H-faktor molekulák vizsgálatával feltárták a szerkezeti eltérések hatását a H-faktor heparinhoz, köldökzsínor endotél-sejtekhez, valamint C3b-hez és C3d-hez való kötődésére.

Kérdések: A 11D ábrán a C3b –nek H faktor jelenlétében, I faktor által történő hasadását ábrázolták. A H faktor különböző doménjeihez kötődő monoklonális ellenanyagok jelenlétében megjelentek a várható hasadási termékek, azonban az E14 jelű ellenanyag mellett végzett hidrolízis után láthatólag kisebb molekulatömegű termékek jelentek meg. Vizsgálták-e, hogy ez a monoklonális ellenanyag hogyan befolyásolja a C3b –nek H és I faktorról való kölcsönhatását?

A 12D ábrán bemutatott kísérletben hogyan ellenőrizték a PI-PLC γ kezeléssel történő CD55 és CD59 eltávolítás mértékét?

A 12B és D ábrán bemutatott kísérletben H-faktor depletált normál humán szérumot alkalmaztak. Hogyan ellenőrizték a depleció mértékét?

A következő témakör az atípusos urémiás szindróma patomechanizmusának feltárásához kapcsolódik. Ilyen betegségben szenvedő, de H faktor mutációt nem hordozó betegek vérében H faktorthoz kötődő autoantitesteket mutattak ki. Megállapították, hogy az autoantitestek elsősorban a H faktor 19.-20. doménjéhez kötődnek. Megállapították, hogy – ellentétben a normál plazmával – az autoantitest-pozitív betegek plazmája a birka vörösvérsejtek lízisét váltja ki. Ez a hatás gátolható tisztított H-faktorról, valamint az IgG eltávolításával.

Kérdés: Autoantitest-pozitív aHUS beteg plazmája birka vörösvérsejtek lízisét idézte elő. Milyen adatok támasztják alá, hogy a BVVS-ek lízise és az autolog sejtek komplement-mediált károsítása között korreláció áll fenn?*

Megállapították, hogy a H-faktor elleni autoantitestek jelentős része az 1. H-faktorról rokon fehérjéhez is kötődik. Ez várható volt, hiszen az autoantitestek elsősorban a H faktor 19. és 20. doménjét ismerik fel és ezek a domének az 1. H-faktorról rokon fehérjében is jelen vannak, azonos vagy csaknem azonos aminosav szekvenciával. Ezáltal az 1. rokon fehérje (FHR-1) az autoantitest hatását ellensúlyozhatja. Rekombináns FHR-1 fehérjével gátolni tudták az autoantitest-tartalmú plazma által kiváltott hemolízist.

Kérdés: Mit jelenthet az autoantitestek specificitása szempontjából, hogy nem mutattak kereszt-reakciót sem FHR-3-mal, sem FHR-4A-val?

A vizsgált autoantitestek gyakran IgG3-as, ritkábban IgG1-es típusúak voltak, az esetek többségében csak egyik könnyű-lánc izotípus volt kimutatható, ami az oligoklonalitásra utalhat. Elsőként írtak le IgA típusú H faktor autoantitestet aHUS-ban.

Megállapították, hogy a H-faktort kötő autoantitesteket hordozó aHUS betegek nagy részénél hiányzik az 1. és 3. H-faktorról rokon fehérje. Megállapították, hogy a H faktor 20. doménjében az a szakasz, amely az autoantigént alkothatja flexibilis és az autoantigénnek megfelelő struktúra ligand-kötés, pl. mikrobiális struktúrákkal való kölcsönhatás útján alakul ki. A FHR-1 fehérjében – a csekély szerkezeti eltérés következtében – ez az autoantigenitást hordozó szerkezet jelen van ligand-kötés nélkül is. Az autoimmunitás – feltételezésük szerint – úgy jöhet létre, hogy a H faktor bizonyos, valószínűleg mikrobiális ligand-kötés hatására immunogénvé válik, ami nem következik be normális FHR-1 génexpresszió mellett, ugyanis a kifejeződő FHR-1 fehérje immuntoleranciát hozna létre a H faktor potenciálisan autoantigénként viselkedő struktúrájával szemben.

Kérdések: Egyes esetekben H-faktor- antitest olyan betegekben is megjelent, akik FHR-1-et is termelnek. Van-e különbség az ilyen betegek autoantitestjei és a FHR-1 hiányos betegek autoantitestjeinek epitóp specificitása között?

Egyes irodalmi adatok (pl. Amomsiripanitch et al.: Clin. Cancer Res. 16, 3226-31, 2010 ; Campa et al: Cancer Immunol. Res. 3., 1325-32, 2015) szerint H faktor autoantitestek más betegségben is megjelenhetnek. Van-e adat arra, hogy nem aHUS beteg H faktor autoantitest hordozókban is előfordul FHR-1 hiány?

A harmadik témakör a H faktorról rokon fehérjék funkcionális tulajdonságainak feltárása. Emberi máj expressziós fág könyvtár szűrésével izoláltak a korábban ismert FHR-4-re hasonlító klont. Ez a FHR-4 molekula hosszú formájának felel meg, 9 doménből áll, tartalmazza a rövid forma doménjeit, valamint négy, duplikáció útján létrejött domént. Megállapították, hogy az FHR-4 molekula felületet adhat az alternatív C3 konvertáz kialakulásához: a FHR-4-hez kötött C3b-hez kötődhet B faktor és properdin. Ez a konvertáz kevésbé hajlamos a H-faktor által serkentett szétesésre, mint a C3bBb konvertáz, tehát az FHR-4 serkenti a komplement aktivációt, és nem gátolja.

*Rövidítések: aHUS: atípusos hemolitikus szindróma, BVVS: birka vörösvérsejt, CCP: complement control protein domain, FHR: H-faktorról rokon fehérje.

Az FHR-4 gyulladásos reakciókban játszott szerepére utalhat, hogy kötődik a pentamér C-reaktív proteinhez. A pCRP –kötőhelyét az FTHR-4 1. doménjére lokalizálták. A kötődést nem csak izolált pCRP használatával mutatták ki, hanem magas CRP-tartalmú, patológiás eredetű szérumból is. Kimutatták, hogy a FHR-4 kötődik több sejt kultúra nekrotikus sejtjeihez, de az ép sejtekhez nem. Az FHR-4 fokozta a pCRP kötődését a nekrotikus sejtekhez. Mivel a ligandumhoz kötött pCRP C1q kötésen keresztül a komplement klasszikus aktivációs útját megindíthatja, az FHR-4 - pCRP kölcsönhatás a nekrotikus sejtek opsonizációjában szerepet játszhat.

Az FHR-1 szerepével kapcsolatban megállapították, hogy hasonlóan a H faktorhoz, az FHR-1 C-terminális doménjein keresztül kötődik vörösvérsejtek vagy endotél sejtek felszínéhez, de (ekvimoláris koncentrációban) nem tudja a H-faktort leszorítani.

Vizsgálták a H faktor és az FHR-1 kölcsönhatását pentraxin 3-mal. Megállapították, hogy az FHR-1 bázikus izoformája gyengébben kötődik a pentraxin 3-hoz, mint a savanyú izoforma. Azonosították a pentraxin 3 kötő helyet a H faktor 20., ill. az FHR-1 5. doménjében. aHUS-betegekből izolált H-faktor autoantitestek gátolták a H faktor, valamint a FHR-1 pentraxin 3 kötődését.

Az FHR-5 funkcionális tulajdonságait vizsgálva megállapították, hogy ez a fehérje is kötődik pentraxin 3-hoz. Az FHR-5 dózistól függően gátolta a H-faktor kötődését immobilizált pentraxin 3-hoz. A kötődés gátlása tükröződött abban is, hogy az FHR-5 csökkentette a pentraxin 3-hoz kötött H faktor jelenlétében bekövetkezett I-faktor mediált C3b hasadást. MaxGel mátrix kivonattal vizsgálva azt találták, hogy az FHR-5 kötődik az extracelluláris mátrixhoz és gátolja a H-faktor kötődését. Mindez arra mutat, hogy az FHR-5 a H-faktor egyes ligandumaihoz való kötődésének kompetitív gátlása útján fokozhatja a komplement aktiválódást. Megállapították, hogy – hasonlóan az FHR-4-hez – az FHR-5 -höz kötött C3b-n kialakulhat az alternatív C3 konvertáz.

Kérdések: A 49B. ábrán pentraxin 3-mal, ill. zselatinnal fedett mikrotiter lemezen mérhető H-faktor, ill. FHR-5 kötést mutatják be. A kötést anti-humán H faktor ellenanyaggal detektálták. Az alkalmazott ellenanyag ugyanúgy reagált-e H-faktoral, mint a FHR-5-tel? Eltérő reaktivitás esetén a mért értékek nem feltétlenül tükrözik a kötött FHR-5 tényleges mennyiségét.

Van-e adat a H-faktor és a rokon fehérjék szénhidrát oldalláncainak funkcionális jelentőségére? A rekombináns FHR fehérjék funkcionális viselkedését modulálhatta-e a hiányzó, vagy eltérő glikolizáció?

A negyedik témakör a H-faktor funkcióját hordozó mesterséges fehérje előállítása és jellemzése. Mivel mind a konvertáz-szétesést serkentő (decay accelerating) mind az I-faktor által mediált C3b hasítás kofaktor aktivitás az 1 - 4. doménekhez kötött, a saját-sejt felismerésért pedig a 19. és 20. domén felelős, géntechnológiai módszerekkel előállítottak az N-terminális négy, és a C-terminális két doménből álló fehérjét (CCP 1-2-3-4-19-20). A mini H-faktornak elnevezett mesterséges fehérje a (plazmából izolált) H-faktorhoz hasonlóan kötött C3b-t, míg C3d-t a H faktornál erősebben. Kimutatható volt a konvertáz-szétesést serkentő hatás is. A mini H-faktor a H faktornál hatékonyabban gátolta az endotél sejtek felszínén végbemenő komplement aktivációt és a H-faktor mutációt, ill. H-faktor autoantitestet hordozó aHUS betegek széruma által kiváltott BVVS lízist. A mini H faktort más munkacsoportok által létrehozott H-faktor szerű rekombináns fehérjékkel is összehasonlították. A funkcionálisan aktív rekombináns fehérjék előállítása és vizsgálata terápiás értékű készítmények létrehozásához is elvezethet.

Az értekezés színvonalas kutatómunkát tükröz. Az alkalmazott metodikai repertoár imponánsan sokrétű, molekuláris genetikai eljárásoktól fehérje biokémiai módszereken keresztül funkcionális komplement tesztekig terjed. A módszereket körültekintően, a kitűzött célnak megfelelően alkalmazták. A következtetések mértéktartóak, a bemutatott kísérleti adatoknak megfelelnek. Az értekezés megfelelően sűríti a hús közlemény anyagát. Az egyes közleményeket olvasva kirajzolódik Jelölt és a munkacsoport szemléletének fejlődése, ahogy az egyes kérdéseket egyre átfogóbban, az újabb megismerések beépítésével gazdagítva értelmezik. A feltett kérdések nem vonják kétségbe az értekezésben leírt alapvető megállapításokat, egyes esetekben a kísérleti eljárások részleteinek pontosítására, más esetekben távolabbi összefüggések feltárására vonatkoznak.

Az értekezésbe foglalt főbb tudományos eredményeket és azok jelentőségét az alábbiakban foglalom össze:

Több oldalról megerősítették, hogy a H faktor 19. és 20. doménje felelős a fehérje saját sejtek felszínéhez való kötődéséért, valamint azt, hogy ennek a kötésnek fontos szerepe van a sejtek komplement-közvetítette károsodásának kivédésében.

Megállapították, hogy autoimmun atípusos hemolitikus urémiás szindrómában termelődő H-faktor autoantitestek elsősorban a 19. és 20. doménhez kötődnek. Megállapították, hogy a H faktorról rokon FHR-1 fehérje az autoantitestek hatását ellensúlyozhatja. Elsőként írtak le IgA típusú H-faktor autoantitesteket. Megfigyeléseik alapján feltételezhető mechanizmust vázoltak fel az aHUS betegségben manifesztálódó H-faktor autoimmunitás kialakulására.

Az FHR-4 fehérje eddig ismeretlen izoformáját fedezték fel és klónozták. Ezzel elsőként írtak le H-faktor géncsaládon belül alternatív splicing jelenséget.

Kimutatták, hogy a H faktorról rokon 4. és 5. fehérje közvetlenül is fokozhatja a komplement aktivációt, amennyiben felületet szolgáltatnak alternatív C3 konvertáz felépüléséhez. Megfigyeléseik alapján betekintés nyerhető a komplement aktiválás finom-szabályozásának működésébe és egyes patológias jelenségek mechanizmusába.

A H faktor funkcióiért elsősorban felelős doménekből álló fehérjét hoztak létre géntechnológiai úton és ezt funkcionálisan jellemezték. A mesterséges mini H-faktor a komplement rendszer működési rendellenességeinek helyreállítását célzó terápiás készítmények fejlesztésének kiindulópontja lehet.

Fentiek alapján az értekezés nyilvános vitára bocsátását és Jelölt részére az MTA doktora cím odaítélését javaslom.

Budapest, 2018. január 4.

Medgyesi György
a biológiai tudomány doktora