Válasz Dr. Vizler Csaba tudományos főmunkatárs, PhD bírálatára

Hálásan köszönöm Dr. Vizler Csaba tudományos főmunkatársnak értekezésem értékelését, észrevételeit és kérdéseit, és a sikeres védés esetén az MTA doktora cím megítélésére tett támogató javaslatát.

Az értekezésem bírálatában tett kérdéseire a következő válaszokat adom, a releváns irodalmi hivatkozásokkal.

Kérdések:

1. A szerző adatainak ismeretében mi a különleges a lépben, egyéb nyirokszervekhez hasonlítva? Más szavakkal, a lép egy a nyirokcsomók között, és csupán mérete miatt fontosabb az egyedileg kisebb nyirokcsomóknál, vagy kulcsfontosságú egyedi funkciókkal is rendelkezik?

Számos vizsgálat és humán klinikai adat (veleszületett asplenia miatt, valamint lépeltávolítás utáni fokozott fogékonyság fertőzésekkel szemben) utal a lép egyedi immunológiai jelentőségére. Ez a jelentékeny mennyiségű naív és memória limfocita-tartalom mellett magába foglalja a B-sejt képzésben (prenatális, illetve a posztnatális időszakban a csontvelői B-sejt képzés kiegészítése), a vérkeringésbe iktatott marginális zóna (MZ) mint egyedi antigén-szűrő funkciót. Emellett a B-1 B-sejt homeosztázisban betöltött funkciói is szorosan kapcsolódnak a lép meglétéhez, Tlx1/HOX11-hiányban valamint lépeltávolítást követően a hasüregi B-1a ($CD5^+$/$MAC\text{-}1^+$) sejtek száma drasztikusan csökken. Saját (egyelőre nem publikált) adataink szerint Nkx2-3 hiányos (vörös pulpa és MZ defektív) léphez a B-1a sejtek számának csökkenése mellett a B-1b ($CD5^-$/$MAC\text{-}1^+$) relatív gyakoriság-emelkedése figyelhető meg. Ezek alapján a lép vörös pulpa része tűnik elsődlegesnek a B-1a sejtek fenntartásában. Ezeken kívül az utóbbi időben több új B-sejt alcsoport azonosításáról (IRA [innate response activator] B-sejtek, ABC [age-associated B cells], $CD11c^+$/T-bet^+ B-sejtek) számoltak be a lépben, ugyanakkor a korábban (egérben) lép-specifikusnak gondolt MZ B-sejtekkel analóg B-sejtek nyirokcsomói (nodális MZ B-sejtek) kimutatása némiképp árnyalja a lép ezen feltételezett egyediségét.

- Pedersen GK, Li X, Khoenkhoen S, Ádori M, Beutler B, Karlsson Hedestam GB. B-1a Cell Development in Splenectomized Neonatal Mice. Front Immunol. 2018 9:1738. doi: 10.3389/fimmu.2018.01738.
- Rauch PJ, Chudnovskiy A, Robbins CS, Weber GF, Etzrodt M, Hilgendorf I, Tiglao E, Figueiredo JL, Iwamoto Y, Theurl I, Gorbatov R, Waring MT, Chicoine AT, Mouded M, Pittet MJ, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. Science. 2012 335 (6068):597-601
- Naradikian MS, Hao Y, Cancro MP. Age-associated B cells: key mediators of both protective and autoreactive humoral responses. Immunol Rev. 2016 269:118-29.
- Golinski ML, Demeules M, Derambure C, Riou G, Maho-Vaillant M, Boyer O, Joly P, Calbo S. $CD11c^+$ B Cells Are Mainly Memory Cells, Precursors of Antibody Secreting Cells in Healthy Donors. Front Immunol. 2020 11:32. doi: 10.3389/fimmu.2020.00032.
- Palm AK, Friedrich HC, Kleinau S. Nodal marginal zone B cells in mice: a novel subset with dormant self-reactivity. Sci Rep. 2016 ;6:27687. doi: 10.1038/srep27687.

2. Van-e a B-sejtes leukémiasejtek felfedezett új intraperitoneális behatolási útvonalának klinikai relevanciája? Ha igen, elképzelhető-e az új bejutási útvonal blokkolásának terápiás kihasználása, például blokkoló ellenanyagokkal, vagy kis molekulákkal?

A peritoneális B-sejtes tumor-expanzió klinikailag kettős relevanciával jár. Egyrészt az extranodális limfómák képalkotó (PET CT és MR) diagnosztikus lehetőségeinek érzékenysége és specificitása kérdéses, másrészt a megtapadás mechanizmusa, valamint annak terápiás modulálása sem ismert. Vizsgálataink szerint az általunk kialakított high-grade B-sejtes limfóma peritoneális oltást követően

tipikusan nem okoz hasűri folyadék-szaporulatot, ugyanakkor kiterjedt hasi nyirokcsomó-áttétet generál. Feltételezésünk szerint ebben elsődleges szerepe a bélfodorban futó nyirokkapillárisoknak van, amibe való belépés megfelelhet a nyirokcsomó parenchimából a nyirokcsomó medulláris nyirokereibe történő belépésnek majd az efferens nyirokereken keresztüli továbbhaladásnak (egress). Ennek megfelelően érdemesnek tűnhet a S1PR-antagonista FTY720 (Fingolimod/Gilenya) alkalmazása, erre irányuló kísérleteink a Bc.DLFL1 limfóma felhasználásával jelenleg folyamatban vannak. A jelenlegi radiodiagnosztikus eljárások kimutatására vonatkozó preklinikai kollaborációs kutatásaink szintén adatokat nyújthatnak akár a radiotracer molekulák alkalmazási módjára (intraperitonealis illetve intravénás) valamint a radiodiagnosztikus eljárás módjára (PET/Cserenkov-sugárzás), ami jelenleg közlés alatt áll.

- Kaneko K, Masunari S, Yoshida T, Omagari J. FDG-PET/CT findings of peritoneal lymphomatosis. Clin Nucl Med. 2012 37:1117-9.
- Cabral FC, Krajewski KM, Kim KW, Ramaiya NH, Jagannathan JP. Peritoneal lymphomatosis: CT and PET/CT findings and how to differentiate between carcinomatosis and sarcomatosis. Cancer Imaging. 2013 13:162-70.
- Liu Y, Deng J, Wang L, Lee H, Armstrong B, Scuto A, Kowolik C, Weiss LM, Forman S, Yu H. S1PR1 is an effective target to block STAT3 signaling in activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2012 120:1458-65.

3. A szerző véleménye szerint használják-e ezt a belépési útvonalat nem malignus sejtek is? Tervezi-e a vizsgálatok kiterjesztését nem malignus B-sejtekre, illetve más immunsejtekre, például a más modellben általuk is használt vitális fluoreszcens festékekkel történő jelöléssel?

Az elmúlt évben a szerozális nyirokszöveteket bemutató összefoglaló cikkünkben számos nem-tumoros sejt illetve nem-limfoid tumoros sejtek lehetséges FLAg/FALC sejt-adhéziós jellemzőit említjük. Ezek közül fontos szerepe lehet az immunszuppresszív hatásaik miatt a zsírszöveti mezenhimális őssejteknek/multilineage mezenhímális progenitoroknak (MSC/ADMPC), melyek szintén szelektív szerozális megtapadást mutatnak, valamint a neutrofil granulocitáknak, amik NET-képzésükön keresztül segíthetik elő egyéb (pl. petefészek vagy bélrendszeri) eredetű tumorok megtapadását. A Bc.DLFL1 B-sejt limfoma szelektív kötődésének igazolását követően kimutattuk a normál B-sejtek FLAg/FALC kötődését is, ugyanakkor egyelőre nem vizsgáltuk a B1 és B2 alcsoportok esetleges eltérő kötődési különbségeit, bár azokról igazoltuk eltérő homeosztatikus peritonális recirkulációs kinetikáját.

A B-sejt biolumineszcens nyomonkövetésre rendelkezésre áll megfelelő Luciferáz-konstrukciót hordozó egérmodell, ugyanakkor feltételezhető, hogy a kapott jel feloldása intakt állatban a fluoreszcens kimutatáshoz hasonlóan nem lesz megfelelő. Ugyanakkor in vivo mikroendoszkópos fluoreszcens bioimaging (Cellvizio) eljárással várhatóan lehetséges a B-sejtek peritoneális megoszlásának in situ vizsgálata.

- Jia X, Berta G, Gábris F, Kellermayer Z, Balogh P. Role of adipose-associated lymphoid tissues in the immunological homeostasis of the serosal surface. Immunol Lett. 2020 228:135-141.
- Jia X, Gábris F, Jacobsen Ó, Bedics G, Botz B, Helyes Z, Kellermayer Z, Vojkovics D, Berta G, Nagy N, Jakus Z, Balogh P. Foliate Lymphoid Aggregates as Novel Forms of Serous Lymphocyte Entry Sites of Peritoneal B Cells and High-Grade B Cell Lymphomas. J Immunol. 2020 204:23-36.
- Lábadi A, Balogh P. Differential preferences in serosal homing and distribution of peritoneal B-cell subsets revealed by in situ CFSE labeling. Int Immunol. 2009 21:1047-56.
- Laemmel E, Genet M, Le Goualher G, Perchant A, Le Gargasson JF, Vicaut E. Fibered confocal fluorescence microscopy (Cell-viZio) facilitates extended imaging in the field of microcirculation. A comparison with intravital microscopy. J Vasc Res. 2004 41:400-11.

4. Lehet-e a bél indukált immunszöveteinek vizsgálata során kapott eredményeknek direkt relevanciája az IBD vagy a Crohn betegség jobb megismerésében, esetleg terápiájában?

Kutatásaink – elsősorban az Nkx2-3 faktor IBD-ben játszott szerepének tisztázása - elsődleges célja az in vivo állatkísérletekben nyert adatok felhasználása a kórfolyamat lefolyásának a pontosabb megértése, valamint hatékony kezelésének előmozdítása. Eddigi teljes genom-szintű (GWAS) tanulmányok alapján az Nkx2-3 génnek a regulátor régióban kimutatott pontmutációihoz kapcsolódó fokozott kifejeződése egyike azon kevés eltéréseknek, melyek mind Crohn-betegség, mind colitis ulcerosa formákban kimutathatók, ugyanakkor nem ismert az oki kapcsolat. A DSS-indukált colitissel szemben általunk megfigyelt rezisztencia Nkx2-3 hiányában megerősíti ezeket az adatokat. Ugyanakkor arra is figyelmeztetnek, hogy a bél nyirokszöveteinek érelemei rendelkeznek azzal a plaszticitással, hogy megváltoztassák addresszin-kifejeződésüket, ebből következően feltételezhető, hogy az α4β7-integrin gátló eljárások (Vedolizumab etrolizumab, illetve anti-MAdCAM-1) veszíthetnek hatékonyságukból, amennyiben a bél nyirokszövetek HEV endotel sejtjei MAdCAM-1→PNAd addresszin-váltáson mennek keresztül. További, jelenleg is folyamatban lévő vizsgálatokkal az Nkx2-3 kifejező humán intesztinális stromális sejtek azonosítása és izolálása nyújthat további eredményeket.

- Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol. 2008 8:458-66.
- Lamb CA, O'Byrne S, Keir ME, Butcher EC. Gut-Selective Integrin-Targeted Therapies for Inflammatory Bowel Disease. J Crohns Colitis. 2018 12(suppl_2):S653-S668.

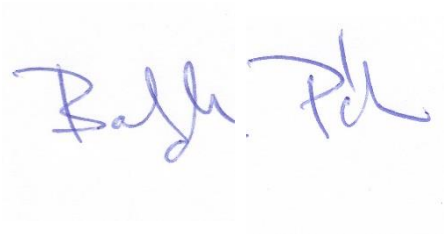
5. A fiatal és idős nyiroktüsző közti különbségek megismerésével elképzelhető-e olyan terápiás eljárás vagy hatóanyag, amivel az időskori antigénprezentáció hatékonyabbá tehető? Vagy tekintsük-e úgy azt a mechanizmust, mint az életkorral felhalmozódó memóriasejtek potenciális autoreaktivitása elleni védvonalat?

Az FDC-asszociált antigén-prezerválás biológiai értelme azoknak a nagy affinitású B-sejteknek a kiválasztása és expanziójának elősegítése, melyek B-sejt receptorukon keresztül képesek közvetlenül kapcsolódni az FDC-n immunkomplexként lerakódott antigénhez. Az antigén-immunkomplex follikuláris eljuttatásában a CXCL13 kemokin-grádiens mentén szövet-függő módon eltérő antigén-transzportáló sejtek (lépben MZ B-sejtek, nyirokcsomóban szubkapszuláris makrofágok) vesznek részt. Ilyen módon az antigén/immunkomplex prezerváláshoz az antigén-transzportáló sejtek és FDC közötti kölcsönhatásra is szükség van, és ennek időskori jellemzőiről semmiféle adat nem áll rendelkezésre, ugyanúgy, mint az FDC időskori megújulásának jellemzőiről sem. Erre elvi lehetőség lenne jelzett FDC-sejtvonallal (pl. vad típusú B-sejttel repopuláltatott, *Cr2*-promoter által irányított eGFP-hordozó kiméra) rendelkező egerek LTβR-antagonista kezelése, majd az FDC újdonképződés kinetikájának és immunkomplex-kötő képességeik összehasonlítása. Miután az FDC képződés kulcseleme az LTβR-közvetítette alternatív NF-κB szignalizációs mechanizmus, felvetődhet (1) vagy ennek erősítése agonisták révén, vagy (2) az útvonalat gátló A20 és más deubikvitináz enzimek/komplexek irányított gátlása. Az előbbiek potenciáljának egyik drámai igazolása a LTα-hiány miatt nyirokcsomó-hiányos egér agonista anti-LTβR antitesttel történő intrauterin kezelése révén nyirokcsomó-előtelep indukciója. Mint azonban jószerivel minden immunológiai folyamatot manipuláló eljárást, ezt a lehetőséget is egy veszélyes kétélű fegyvernek gondolom, ami számos egyéb mellett a Bíráló által említett következményhez (fokozódó autoreaktivitás vagy B-sejtes limfoproliferáció) is vezethet.

- Mackay F, Browning JL. Turning off follicular dendritic cells. Nature. 1998 Sep 3;395(6697):26-7. doi: 10.1038/25630. PMID: 9738494.
- Rennert PD, James D, Mackay F, Browning JL, Hochman PS. Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor. Immunity. 1998 Jul;9(1):71-9. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80589-0. PMID: 9697837.
- Harhaj EW, Dixit VM. Regulation of NF-κB by deubiquitinases. Immunol Rev. 2012 Mar;246(1):107-24. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01100.x. PMID: 22435550; PMCID: PMC3540820.

- Lopez-Castejon G, Edelmann MJ. Deubiquitinases: Novel Therapeutic Targets in Immune Surveillance? Mediators Inflamm. 2016;2016:3481371. doi: 10.1155/2016/3481371. Epub 2016 Aug 14. PMID: 27597804; PMCID: PMC5002299.

Ismételten köszönöm Vizler Csaba főmunkatárs bírálatát és értekezésem elfogadását támogató véleményét. Bízom benne, hogy a kérdéseire adott válaszaimat is megfelelőnek találja.



Dr. Balogh Péter

Pécs, 2021. 01. 31.