

Válaszok Prof. Dr. Balogh Péter egyetemi tanár opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném köszönni, doktori értékezés gondos áttanulmányozását, a pozitív bírálatot és a téma új aspektusait felvető kérdéseket.

(1) A 16-17. oldalon említett TNFR által kiváltott jelpályák szerteágazó eseményei (kanonikus és alternatív NF- κ B útvonala) felvetik a TNF-RI/RII esetleges eltérő szerepeit, illetve a ligandok (szolubilis TNF, transzmembrán TNF, valamint az ugyanezen TNF-receptorokhoz kapcsolódó limfotoxin-a3 által kiváltott szignálok közötti különbségét. Jelölt ismer-e ezek között lefolyásbéli eltérést, illetve mi alapján dől(het) el az eltérő válasz (pusztulás vagy aktiváció) pl. a ligandot hordozó/termelő leukociták és a receptort hordozó (célsejtek vagy nyirokszöveti stromális) sejtek között?

A kérdésnek nagyon sok aspektusa van, a két receptor jelátvitelében, expressziós mintázatában, a ligandumok receptor specificitásában, a termelődésüket kiváltó stimulusokban meglévő különbségek.

A TNF receptor által kiváltott jelpályák valóban igen szerteágazóak. Alapvetően a TNFR1 szignalizáció NF κ B és MAPK aktiváción keresztül sejt aktivációt okoz. Több anti-apoptotikus fehérje expressziója is NF κ B függő, ezért intakt jelpálya esetén a sejthalál útvonala gátoltak. Azonban, ha az NF κ B szignalizációs út vonal nem működik, genetikai módosulások, vagy intracelluláris kórokozók miatt, akkor különböző sejthalál útvonala aktiválódhatnak. Elsősorban a RIPK1 deubiquitinációja, illetve a TAK1 kináz működésének hibái ismertek a TNFR1 jelátvitelének sejthalál irányú tranzíciójában (10.1038/s41419-019-2094-z).

A TNFR2 viszont nem tartalmaz halál domént, ezért ez a receptor nem indukál sejthalált. A TNFR2 stimulálása sejt aktivációhoz vezet az NF κ B nem-kanonikus jelátvitelén és a PI3K aktivációkon keresztül (10.3389/fcell.2021.725473).

A TNFR1 szinte minden sejten expresszálódik, míg TNFR2 expressziója bizonyos sejt típusokra korlátozott, T- és B-sejt alcsoportok, mieloid sejtek, gliasejtek, endoteliális sejt típusok, hámsejtek fejezik ki és indukálható fibroblasztokban és különféle tumor sejtekben is (10.1038/s41419-018-1266-6).

A fenti receptorokat potenciálisan aktiváló ligandumok közül a TNF membránkötött formája hatékonyan aktiválja a TNFR1-et és a TNFR2-t is. Az TNF szolubilis formája aktiválja a TNFR1-et, azonban a TNFR2 jelpályái nagyrészt inaktívak maradnak ennek bekötődés után is. (10.1038/s42003-022-03179-1). A szolubilis limfotoxin LT α 3 homotrimer, képes mindkét féle TNFR-hoz kötődni, és ugyanazokat a jelátviteli út vonalakat aktiválni, mint a TNF, de ennek a citokinnek nincs membránhoz kötött formája. A TNF, illetve a LT α 3 Kd értékei TNFR1 és a TNFR2 receptor esetében is hasonlóak (10.1074/jbc.271.16.9778, 10.1186/ar3376). A képet tovább bonyolítja, hogy mind a TNFR1, mind a TNFR2 megtalálható oldható formákban, amelyek TNF antagonistaként működnek.

A TNF-et főként a természetes immunrendszer sejtjei, míg LT α -t túlnyomórészt limfociták (Th1, CTL, B sejtek) termelik, bár ez az elválasztás nem kizárólagos (10.1186/ar3376).

A TNF, illetve LT α knockout egerek fenotípusa alapján a TNF hiánya nem okoz jelentős fejlődési rendellenességeket, de az állatok veleszületett immunválasza jelentősen gyengül. A LT α elsősorban a nyirokszervek fejlődéséhez szükséges, de az immunválaszban, így a gyulladásban is szerepet játszik (10.1186/ar3376).

A sejthalál vizsgálatok során szinte minden esetben rekombináns, szolubilis TNF-et használnak/használnak *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokban is. Ezek alapján a TNF/TNFR1 interakció önmagában elég a szakirodalomban leírt sejthalál folyamatokhoz. Kizárólag a TNFR2 stimulálása (TNF, vagy TNFR1 deficiens egerek makrofágjain vizsgálva) nem okoz sejthalált. Azonban a TNFR2 stimulációja autokrine TNF termelést eredményezhet, ami fokozza a TNFR1-on keresztüli sejthalált

(10.1038/cddis.2016.285). Egy vizsgálat szerint a $LT\alpha$ apoptózist, nekroptózist és gyulladásos szignálokat is indukál csontvelői makrofágokon, illetve MEF sejtvonalon, ugyanolyan intenzitással, mint a TNF (10.1111/febs.12419).

Klinikai szempontból az anti-TNF terápia széleskörben használt. Az anti- $LT\alpha$ antitest, a pateklizumab, hatásos RA-ban szenvedő betegeknél, de nem ugyanolyan hatékony, mint a TNF-ellenes szer, az adalimumab. Az etanercept egy szolubilis TNF-R2- alapuló fúziós fehérje (ami a fentiek szerint TNF és $LT\alpha$ gátló is)

(2) *Szerző a 19. oldalon írja, hogy a Fas T-sejtre korlátozott hiánya csökkent humorális immunválasszal jár. Összekapcsolható-e ez a jelenség a Treg illetve a folliculáris T citotoxikus sejtek (CXCR5+ Tfc — Yu D et al, Nat Immunol, 2016), mint a (megtartott) Fas-hordozó centroblasztokat kontrollálható sejtek homeosztázisának esetleges megváltozásával?*

Egér modellben, amennyiben a B sejtek expresszálják a Fas receptort, de a T sejtek nem, a T sejteken többszörösére emelkedik a FasL mennyisége. Mivel ilyen kondíciók között a T sejt szám is nő, ez összességében jelentősen növeli a T sejtek citotoxikus aktivitását, ami az antigén-specifikus B sejt választ is gátolhatja (10.1093/intimm/11.7.1035). B sejteken a Fas-FasL interakció leginkább a T dependens válasz szabályozásában ismert (10.3389/fimmu.2012.00207), így valóban elsősorban a CXCR5+ T sejt populációk lehetnek érintettek. Ezek lehetnek az idézett CXCR5+ folliculáris citotoxikus T-sejtek (10.1038/ni.3543), de több Th alcsoport, beleértve a folliculáris helper T sejteket, a Th1 és a Th17 sejteket is expresszálhatják a FasL-ot (10.4049/jimmunol.1700420), és ezt a regulátor T sejtekről is kimutatták (10.4049/jimmunol.178.8.4891). Nem ismerek olyan munkát, amely kimutatná, hogy ezek közül közvetlenül melyik alpopuláció felelős a germinális centrum B sejtek eliminációjáért.

(3) *Az SHP-1 foszfatáz szerepének vizsgálata során Szerző bemutatja, hogy bizonyos közvetítő elemek (pl. a Cbl) foszforilációja független a SHP-1 RNS-interferencia alapú gátlásától. Lehet-e ebben (a) a SHIP-1 alternatív foszfatáz a meghatározó elem, illetve (b) a (teljes) immunglobulinnal végzett antitest-indukált kísérleteikben a tirozin-foszforilációs mintázat és a sejtválasz jellegét befolyásolhatja-e az A 20 célsejteken kifejeződő FcγRII mint inhibitoros receptor (az 50. oldalon a 25. ábra magyarázatában szerepel az anti-IgM F(ab)2 használata)?*

Egy immunreceptor tirozin alapú gátló motívum (ITIM) szerű szekvenciát írtak le 2002-ben a sejthalál receptorok halál doménjében (10.1038/nm0102-61). Az ezt kódoló peptid szakasz az SHP1 és SHP2 mellett az SHIP foszfatázt is megkötötte (hasonlóan az FcγRIIb receptorok ITIM motívumához).

Az SHIP inozitol foszfatázként leginkább indirekten vehet részt a Fas-mediált apoptózis, illetve a túlélő szignálok egyensúlyának szabályozásában. Több a BCR-mediált túlélőjelek közvetítésében résztvevő fehérje tartalmaz az foszfatidilinozitolokhoz kapcsolódó PH domént (BTK, Gab1, Gab2, AKT), illetve az általunk vizsgált Vav fehérje is ilyen.

2010-ben megfigyelték, hogy az SHIP egér T-sejteken elősegíti a CD95 glikozilációját (Ez a folyamat az SHIP ép SH2 doménjét igényli, de független a foszfatáz aktivitásától és az endoplazmatikus retikulumban lokalizál SHIP-hez köthető). A glikozilált CD95 nem tud oligomerizálódni, ami károsítja az apoptotikus kaskád jelátvitelét. Az SHIP feltehetően szabályozhatja a Fas expressziót is (10.1371/journal.pone.0007919). Az Cbl és az SHIP fehérjék asszociációját is leírták már (10.1016/j.exphem.2010.03.010). Ezek alapján az SHIP szerepe a Fas-mediált folyamatokban valóban elképzelhető.

Az FcγIIb receptorok és a Fas direkt interakciójáról nem találtam adatokat. Az Fc receptor-mediált gátló szignálok a BCR-indukált túlélő jeleket csökkentik, így a Fas függő apoptózist indirekt módon szabályozhatják. A két jelátviteli út több ponton hathat egymásra, például az FcγIIb receptorok foszforilációjáért felelős Lyn kináz ismert, hogy szabályozza a Fas expressziót (10.1084/jem.184.3.831). Az eredményeinket részlegesen (leginkább a túlélőjelek dózis függését) befolyásolhatták az FcγRIIb mediált szignálok. Mivel a germinális centrumban zajló szelekciós lépések során a két receptor hatása sok esetben együttesen érvényesülhet, a kísérleti rendszert ezzel együtt is értékelhetőnek érzem.

(4) Az éretlen/tranzicionális (TVT2) B-sejtek fenotípusának részeként a 49. oldalon a CD24 antigén alacsony/hiányzó expresszióját említi — ez az idevonatkozó adatok szerint ellentétes a CD24/HSA intenzív kifejeződésével (Mehler-Bahlburg A et al., JEM 2008; Benitez A et al., JI 2014). Hogyan magyarázza a közölt és alkalmazottfenotipizálás közötti különbséget?

A dolgozatban elírás történt, a HSA/CD24 expresszió magas az éretlen/tranzicionális B sejteken. Az általunk közölt cikkben, mind a szövegben, mind az ábrán helyesen szerepel „Fig.1 shows that the cells isolated from the spleen of irradiated, auto reconstituted animals were highly positive for IgM and HSA and showed faint IgD staining” (10.1016/s0165-2478(02)00017-2). Sajnos ez az ábra a dolgozatban nem került bemutatásra. Elnézést az elírásért és köszönöm az alapos bírálatot!

(5) A 27. ábrán (52. oldal) a TLR5-ligandkötésnek a sejthalál mértékét fokozó hatását a FasL hatásához viszonyítja (ami így a 100%-ot is meghaladja), míg ugyanezen szakaszban a 26. és 28. ábra a felirat alapján nem így ábrázolja az eredményeket. Mi az eltérés indoka? Hogyan magyarázza, hogy a neutralizáló anti-TLR5 antitest nem váltott ki a flagellinhez hasonló hatást?

A 27 ábrán bemutattuk, hogy flagellin sejthalált fokozó hatása nem csak FasL stimulust követően, hanem TNF és T-sejt felülűszó indukált sejthalált követően is fokozó hatású. A kontroll százalékban ábrázolt eredményekkel azt kívántuk bemutatni, hogy a flagellin fokozó hatása a különböző aktiváltó stimulusok esetében hasonló. (Nem volt cél, hogy a sejthalál emelkedés mértékét pontosan számszerűsítsük, de az eredményeinket megerősíti, hogy hasonló intenzitású rekciót kapunk az egyes stimulusok esetében). A többféle aktiváció összehasonlítása indokolta a kontroll százalékban történő ábrázolást. Az eredmények kontroll százalékban való bemutatását validálja, hogy a sejthalál tényleges intenzitását FasL használatával már a 26. ábrán bemutattuk, illetve a vonatkozó publikációban az ábra A és B részeként a TNF és T sejt felülűszóval kiváltott sejthalál numerikus bemutatása is megtörténik. (Ez utóbbi ábra részek nem kerültek a dolgozatban bemutatásra.)

A neutralizáló anti-TLR5 ellenanyag használatára azért volt szükség, hogy bizonyítsuk, hogy a flagellin TLR5 függően fokozza a sejthalált. Nem TLR5 agonista, hanem a flagellint leszorító ellenanyagot használtunk. (A flagellin esetlegesen az NLRC4 receptorokon keresztül is módosíthatná a sejtfunkciókat.)

(6) Az 53. oldalon bemutatott flagellin-kötés és a Fas-indukált sejthalál kapcsolatának vizsgálatakor bemutatja a Fas és a TNFR kifejeződésének mértékét, azok jelentékeny változása nélkül. Miután a TLR5 túlnyomó része CD4+ T-sejtekben citoplazmáris elhelyezkedésű (Crellin NK et al. JI 2005), felvetődik a receptor ligandkötése utáni mennyiség-változás. Vizsgálták-e a TLR5 felszíni/citoplazmáris megoszlást a 24 órás ligand-expozíció során?

A TLR5 felszíni expresszióját vizsgáltuk, ami pozitívnak bizonyult, intracelluláris jelölést és kinetikai vizsgálatot nem végeztünk. Ahogyan arra az előző pontban kitértem, mivel a neutralizáló anti-TLR5 ellenanyag blokkolja a flagellin sejthalált fokozó hatását, ezt elegendő bizonyítéknak találtuk arra, hogy flagellin a sejtfelszíni TLR5-ön keresztül fejti ki ezt a hatást.

(7) A 61. oldalon leírt, az éretlen és érett DC általi citotoxikus hatású faktorok termelése közötti különbség bemutatása (36. ábra) az éretlen DC fokozott Jurkat sejt-ölő hatékonyságát jelzi. Mi lehet a perifériás nyirokszövetekben (elsősorban a nyirokcsomókban) a feltételezett TNF-szinkron citotoxikus DC-hatás elsődleges célsejje?


Más munkacsoportok eredményeinek megfelelően (10.4049/jimmunol.168.4.1823), mi is azt mutattuk, ki hogy a dendritikus sejtek (DC) citotoxikus hatása elsősorban az éretlen DC-kre jellemző. Kísérleteinkben a DC-ek citotoxikus hatása két órával a PRR stimulációt követően kialakult, míg a nyirokcsomóba történő bevándorlás körülbelül 24 órát igényel (10.1038/nri1670). Elméletünk szerint a DC-ek a kórokozó felismerését követően, de még a perifériás szövetben fejthetik ki elsősorban sejtölő hatásukat, ezzel az elhalt emberi sejtekben levő intracelluláris kórokozók fagocitózist lehetővé téve. Az érett DC-ek is rendelkeznek részleges citotoxikus hatással, ami elképzelhető, hogy a nyirokcsomókban is érvényesül, azonban a DC-mediált nyirokcsomókban zajló sejtölésre direkt bizonyítékkal nem rendelkezünk. A célsejtek meghatározása nagyon fontos lenne, a perifériás szövetekben és a nyirokcsomókban is, de erre részletes vizsgálatokat még nem végeztünk. Csak olyan sejteken figyeltünk meg sejthalált, amelyek TNF szenzitívek (HT29, Huvec, Jurkat), de nem minden TNF-re érzékeny sejtvonal esetében volt hatásos a DC felülűző (pl SW480 adenocarcinoma sejtvonal, amely az irodalmi adatok szerint érzékeny TNF-re (10.1038/s41420-024-01984-7)).

(8) A 68. oldalon a kaszpáz-9-re irányuló, eddig túlnyomó részben in vitro kísérletek in vivo kiterjesztésének bemutatásakor említi a kaszpáz-9 hiányos egerek perinatális letalitását. Mi az elhullás oka?

A kaszpáz-9 knock out egerek tulajdonságait két csoport írta le egy időben (10.1016/s0092-8674(00)81476-2, 10.1016/s0092-8674(00)81477-4). A kaszpáz-9 hiányos állatok többsége embrionális korban, vagy perinatálisan elpusztul, amit az agyfejlődés során bekövetkező csökkent apoptózis okoz. Az agyszövet kitüremkedik a koponyából. Az agyszerkezet zavarai a kéregben és az előagyban a leg súlyosabbak, illetve a posztnatális Casp9^{-/-} állatokban az intracerebrális vérzés is gyakori.

Végezetül ismét szeretném megköszönni Balogh Péter professzornak a dolgozatom alapos értékelését és támogató véleményét. Kérem a fenti válaszaim szíves elfogadását.

Debrecen, 2024. december 18.



Koncz Gábor