

Válasz Dr. Matkó János egyetemi tanár, Biológiai Tudományok (MTA) Doktora opponensi véleményére

Köszönöm Dr. Matkó János Professzor Úrnak értekezésem bírálatát, építő megjegyzéseit, javaslatait. Külön köszönöm a munkám, tudományos aktivitásom és az utánpótlás nevelés terén végzett tevékenységem értékelését, és azt, hogy a disszertáció téziseinek nyilvános vitára bocsátását támogatta.

Válaszok a bíráló megjegyzéseire:

1. *Az 5. Eredmények fejezet szerkesztésére tett megjegyzését* elfogadom, és a védeken igyekszem az egyes fejezetek és eredmények közti logikai összefüggéseket jobban kiemelni. A 4 alfejezetre osztott eredmények ugyan követik a célkitűzésekben megfogalmazott 4 fő kutatási célt, de az átvezetés az egyes kísérletek leírása között valóban nagyon rövid. Ez talán az angol nyelvű közleményekre alapozott szerkesztésből és az ott megszokott megfogalmazás tömörségéből adódik. Az eredmények értékelése a 6. fejezetben történt, amely ugyancsak követi a 4 alfejezetre bontó szerkesztési módot.

Köszönöm a dolgozatban szereplő elütések és angol elnevezések használatára tett kritikai megjegyzését. Sajnos annak ellenére, hogy többször is átolvastam a dolgozatot és használtam a Word helyesírási ellenőrző programját, még így is maradtak bent hibák.

2. *A kolokalizáció konfokális mikroszkópiás kvantitatív analízisének leírása a módszertani fejezetben (55. oldal)* valóban rövid és talán nem teljesen fejt ki az eljárást, ami különösen a téma olyan szakértője számára, mint Prof. Dr. Matkó János nem elfogadható. A GR mitokondriális lokalizációjának vizsgálata során a GR-FITC és a CMX-Ros mitokondriális festék morfológiai asszociáció elemzése, valamint a többi kolokalizáció vizsgálata során Talabér Gergő munkatársam, (akkori PhD hallgatóm) 2009-es International Immunology cikkében leírtak szerint jártunk el (a közlemény módszertana a dolgozat 221. oldalán található). A sejtfelszíni CD4/CD8 jelölés alapján azonosított sejtekben a GR-FITC-et a zöld a CMX-Ros-t a vörös csatornában mértük 3-3 keretben, amely képeket egymásra helyezve az ImageJ software használatával analizáltuk. A pixel fluoreszcencia intenzitás analízise alapján a specifikus festést a háttértől egy 0 – 255-ös skálán értékeltük az 50 fölötti értéket tartva pozitívnak. Ezután a CMX-Ros és GR közti egybeeső pixeleket számoltuk és ábrázoltuk. 100-100 kettős pozitív timocitában a kolokalizált pixeleket számoltuk DX kezelés előtt és után és ez került ábrázolásra.
3. Az 5.2. fejezet címében valóban helyesebb lett volna a „Tímusz sejtes összetételének változása Dexametazon hatására” megfogalmazás.
4. A 24. ábrán egyszeri, 10 mg/kg Dexametazon kezelés hatásának idő-kinetikáját ábrázoltuk a tímusz sejtes összetételére 15 napon át követve azt. Ehhez 15 egykorú egér egyszerre történő beoltásával indultunk ki és minden nap fel kellett áldozni 1-1 egeret és a tímusz CD4/CD8 jelölése után vizsgáltuk a DN, DP és SP sejtek arányát 3 párhuzamos mintában. A szórás elhanyagolható volt, ezért nem került szórás az ábrára. Az ábra nem jelent meg idegen nyelvű publikációban, csak kongresszuson mutattuk be, de a fejezetbe illőnek találtam ezt az eredményt és ezért került be a dolgozatba.

5. *A galamb citokróm C (PCC) kezelés valójában mit takar* kérdésre a válaszom, hogy a glukokortikoid hormon és a T sejt receptor (TcR) aktiváció együttes hatásának vizsgálatát a timociták apoptózisára két megközelítéssel végeztük. A kísérletekben a TcR stimulációt egyrészt aktiváló anti-CD3 antitest oltással, másrészt a T sejtekre specifikus antigén beadásával értük el. Az antigén hatékonyságának vizsgálatához AND TcR transzgenikus egértörzset (B10.Cg-TgN TcrAND 53Hed) használtunk (Kaye et al. 1989 Nature.). A törzsre jellemző, hogy T limfocitái a Vbeta3 / Valfa11.1 transzgen TcR-t hordozzák, amely specifikus a galamb cytochrome C (PCC) KAERADLIAYLKQATAK peptidjére I-E^k (MHC-II) restrikcióval. Az egerek T sejtjei a pozitív szelekció során nagyrészt CD4⁺ T sejté érnek ki a transzgen TcR-t hordozva. A tímusz sejtes összetétele eltér a nem transzgen egerekétől (20. ábra), mert 30% DP és 60% CD4⁺ SP sejt található benne. A homozigóta egerek perifériás vérében is 96% fölött a transzgent hordozó T sejtek találhatóak. Ezeket az egereket kezeltük 2 napig a specifikus antigénnel (PCC) vagy 1x anti-CD3 antitesttel Dexametazon jelenlétében vagy anélkül. Ezzel modelleztük a kettős antagonizmus teóriát, amely szerint a DP timocitákat, ha TcR és GC hatás is éri egyidőben, a két jelátviteli útvonal összekapcsolódása révén a sejtek túlélése jön létre.

A 30. ábra feliratában valóban elírás van és a $p < 0,05$ a helyes

Válaszok a bíráló kérdéseire:

1. *Milyen génmintázat ill. fehérje expressziós vagy jelátviteli útvonalbeli különbségek állhatnak a CD8⁺ T sejtek relatív GC rezisztenciája mögött a CD4⁺ T sejtekkel szemben?* Számos klinikai adat és tapasztalat is alátámasztja a GC kezelésben részesülő autoimmun (SLE, MS stb.), asztmás és COPDs betegeknél is, hogy a CD8⁺ T sejtek perzisztálnak a gyulladással szövetekben, jelezve relatív GC rezisztenciájukat. Ezen jelenség molekuláris mechanizmusát vizsgálta Ling-bo Li és munkacsoportja (Blood 2007. 110(5): 1570–1577.) és azt találták, hogy a CD4⁺ sejtekben erőteljesebb a GC transzaktivációs hatása, mint a CD8⁺ sejtekben, míg a transzrepressziós hatás azonos a két sejttypusban. Ennek az lehet a következménye, hogy a CD8⁺ sejtekben késik a GC hatásra elinduló transzaktiváció és ezzel az anti-inflammatorikus gének expressziója. A jelenség mögött a CD8⁺ sejtekben DX hatására bekövetkező csökkent hiszton H4 K5 acetilációt írják le, amely a CD8⁺ T sejtek alacsonyabb ATF2 hiszton acetyltransferáz (HAT) expressziója magyaráz. Ennek kromatin kondenzáció a következménye és a GC-GR komplex GRE elemekhez kapcsolódásának gátlása. ATF2 csendesítéssel CD4⁺ T sejtekben is csökkent GC válaszreakciót tudtak kimutatni, amely jelenség rámutat az ATF2 aktivitás változtatásának lehetőségére a szteroid válaszkészség módosítása során.
2. *A 26. ábrán mi az oka annak, hogy az endogén GC szintézis gátlása ugyanazt a jelentős sejtszám csökkenést váltja ki, mint a GC analóg DX jelenléte?* Annak bizonyítására, hogy a kortikális epitelsejtek által termelt endogén GC (ezt leíró összefoglaló közlemény Talabér et al. Steroids 2015 103;58-63.) jelenléte szükséges a pozitív szelekcióban a DP timociták túléléséhez, *in vitro* tímusz szövetkultúrát használtunk, amelyben gátoltuk a kortikális epitelsejtek endogén lokális GC termelését. Az itt tapasztalt fokozott apoptózisból arra következtettünk, hogy a lokálisan termelt alacsony GC hormonszint jelenléte szükséges a DP timociták túléléséhez. Ez a lokális GC hormon koncentráció alacsonyabb, mint az általunk 10-7M DX hozzáadása a tápfolyadékhoz, ami már fokozott timocita apoptózist okozott. Ezért láttunk ennél a GC hormon dózisonál már fokozott apoptózist is.

3. *A ZAP-70/Syk redundáns hatása hogyan hozható összefüggésbe a nagy dózisú GC kezelés hatására létrejövő GR/ZAP-70 kapcsolódással?* Az immunrendszer sejtjeiben számos nem-receptor tirozin kináz működik, amelyek jelátviteli folyamatokat közvetítenek az immunreceptorok (BcR, TcR, NK sejt KAR, Fc ϵ szilonRI, Fc γ RI,-III) ITAM motívumainak foszforilációja után. Az Src és Bruton tirozin kinázok mellett a harmadik családot képezik a Syk és ZAP-70 kinázok. Annak ellenére, hogy hasonló az alapszerkezetük, expressziójuk és működésük eltér egymástól (Immunol. Today. 2000. 21/3. 148-154.). Egyrészt a Syk nagyobb affinitással kötődik az ITAM motívumokhoz, mint a ZAP-70, másrészt a Syk működése nem vagy csak kevésbé függ a Src-kinázok (Fyn, Lck) jelenlététől és képes transz-autofoszforiláció révén ön maga aktiválódni, szemben a ZAP-70 aktiváció nagyfokú Src-kináz függésével. Az expressziójuk is eltér, a Syk minden hematopoetikus sejtben jelen van, míg a ZAP-70 jellemzően a T sejtekben és NK sejtekben jelenik meg a timocita differenciálódás kezdetén és az érett T sejtekben upregulálódik, melyet a Syk downregulációja kísér (J. Immunol., 152 (1994), pp. 4758-4766). Jellemző, hogy ZAP-70 deficiens egerekben zavart a T sejt képzés, míg a Syk hiánya nem befolyásolja azt. A Syk és ZAP-70 eltérő jeltovábbítási mechanizmusát jelzi az is, hogy az aktivált Syk képes önmagában B és NK sejtekben az SIp-76 foszforilációra, míg a ZAP-70 esetében ez Src-kináz függő (Front. Immunol. 07 July 2017 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00789>). Ez a jelenség egybevághat a megfigyelésünkkel, hogy a ZAP-70 Y315 és Y492 mutáns sejt vonalakban, amely tirozin maradékok a molekula autofoszforilációjában és a Src kináz asszociációban játszanak szerepet, Dexametazon kezelés hatására nem jön létre az SIp-76 és Cbl foszforiláció. Ez alapján úgy tűnik, hogy a nagy dózisú GC azonnali hatása T sejteken a GR-ZAP-70 asszociáció révén akadályozza a Src kinázokkal történő kapcsolódást és ezzel a sejtaktivációt. Saját megfigyelésünk, hogy ugyanezen nagy dózisú Dexametazon kezelés nem okozott azonnali Syk tirozin foszforiláció változást RBL-3H3 hízósejteken. Mások megfigyelése szerint hízósejteken a Syk foszforiláció gátlása Dexametazon kezelés után a Src-like adaptor protein (SLAP) expressziójának fokozódása révén jön létre (J. Immunol. 2006.177.2047-50.), vagyis nem közvetlen GR-Syk kapcsolódás, hanem egy gátló fehérje, az SLAP expresszió növekedése révén a GR genomikus hatásmechanizmusával.
4. *Az 56. ábrán az összes timocita szám és a Treg sejt arány összefüggésére kérdez rá a bíráló.* Talán a magyarázó szöveg nem hívja fel a figyelmet arra, hogy az ábra alatti 8. táblázat is szorosan összefügg az eredmény értékelésével. A táblázatban az ábrán szereplő abszolút timocita számból és a Treg %-ból számolt Treg számokat hasonlítottuk össze a tímuszban és a perifériás nyirokszervekben a kezeletlen és Dexametazon kezelt állatokban. Ebből derül ki, hogy a tímuszban a Treg sejtek abszolút sejtszáma nem változik, vagyis a tTreg sejtek rezisztensek a Dexametazon kezelésre, míg a perifériás nyirokszervekben a pTreg sejtszám minimum a felére csökken.

Végezetül köszönöm Dr. Matkó János Professzor Úr pozitív véleményét és támogatását eddigi munkám során és mostani bírálatában is.