

Válasz Dr. Széll Márta Professzor, MTA Doktora opponensi véleményére

Köszönöm Dr. Széll Márta Professzor Asszonynak, hogy értekezésem bírálatát elvállalta és azt pozitívan értékelte. Köszönöm mindenre kiterjedő kritikai véleményét, építő megjegyzéseit, javaslatait. Külön köszönöm a dolgozat kiállítására és szerkesztésére tett dicsérő szavait és sajnálattal, de elfogadom kritikai megjegyzését a dolgozatban bent maradt gépelési hibákért.

Válaszok a bíráló megjegyzéseire, kérdéseire:

1. Az ábrákra tett megjegyzéseire az alábbiakat válaszolom:

A bevezetésben valóban vannak magyar és angol feliratú ábrák is, amelyeket saját vagy mások közleményeiből emeltem be a dolgozatba és az ábra feliratban a forrást idéztem. A saját ábrák közül valóban kerültek be magyarra fordított feliratúak, melyeket magyar folyóiratban, vagy kongresszuson is bemutattunk, ezért választottam azok magyar feliratos változatát.

A 3. ábrát a nukleáris receptorok alapszerkezetéről azért tettem be, hogy a doménes szerkezetüket és azok funkcióit jobban láthassa az olvasó, ill. a későbbiekben az 5.4.1. fejezetben leírt saját fejlesztésű anti-GR monoklonális ellenanyag család a glukokortikoid receptor variábilis, regulatórikus doménjében a csak erre a receptorra jellemző APTEK26-os szekvencia elhelyezkedése egyértelmű legyen.

A 13. ábra sajnálatos módon egy 2009-es közleményből került a dolgozatba, ami azóta kiegészült a Th9 és Tfh sejt irányú differenciálódást indukáló citokinek és transzkripciós faktorok leírásával. Th9 sejtek a Th2 irányú differenciálódástól annyiban térnek el, hogy IL-4 mellett TGFbeta is kell az IL-9 szekréció elindításához, melyek a PU.1 és STAT6 transzkripciós faktorok révén segítik elő a GATA3 és IRF4 transzkripciós faktorok megjelenését, amelyek az IL-9 szekréciót biztosítják (Rukhsana Jabeen és mtsai. Curr Opin Immunol. 2012; 24(3): 303–307). A folliculáris Th sejtek differenciálódásánál ezzel szemben az IL-6 és IL-21 citokinek és a Bcl-6, egy gátló transzkripciós faktor jelenléte jellemző.

A 15. és 17. ábránál valóban a dolgozat szerkesztésekor történt elcsúszás a magyar felírozásban, amely rontja az ábra esztétikai értékét.

2. Az idézett publikációk idejére vonatkozó kérdésre a válaszom, hogy miután egy közel 20 éves munka történetéről szól a dolgozatom, igyekeztem a saját munkákat az akkori publikációs környezetbe elhelyezni. Természetesen új összefoglaló közlemények is kerültek a dolgozatba, de ezért fordulhatott elő, hogy 2009-es cikkekre hivatkoztam a GR mitokondriális transzlokációját leíró fejezetben, mert ekkor írtuk le Talabér Gergely munkatársammal a GR transzlokációját kettős pozitív timocitákban (Int. Immunol. 2009. 21. 1269-76). Azóta több sejttypusban is leírták a GR mitokondriális génszekvenciákkal (GRE) történő kapcsolódását és mitokondriális génátírás fokozását Dexametazon kezelés hatására pl. HepG2 hepatoma sejteken (Psarra AM. és mtsai. Biochim Biophys Acta. 2011 Oct;1813(10):1814-21). Ugyancsak GC kezelés és stressz hatására létrejövő mitokondriális GR transzlokáció szerepét erősítik meg Hunter RG. és mtsai (Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Aug 9;113(32):9099-104.) patkány hippocampus sejtekben, ahol a GR mitokondriális GRE-hez kapcsolódva a mitokondriális RNS expresszió változást írják le.

3. *A Dexametazon-Aktinomycin D kölcsönhatás szerepel-e mint gyógyszer mellékhatás leírása kérdésre válaszolva* hivatkozok HG. Sie és mtsai. 1967-ben a J. Biochem-ben leírt közleményére, akik Actinomycin D-vel gátolták májban a GC indukálható glikogén szintézis enzimeit. Ismert, hogy az eredetileg antibiotikumként leírt, de sejtosztódást gátló hatása miatt kemoterápiás szerként elterjedt Actinomycin D gátolja a transzkripciót az iniciációs komplexhez kapcsolódva és ezzel gátolja az RNS elongációt és a fehérje szintézist. Ezzel gátolja a ligand-kötött GR összes genomialis hatását is, ami azt jelenti, hogy fiziológias GC koncentrációknál a GR transzaktivációs mechanizmusai nem érvényesülnek, ami megnyilvánul a szer leírt mellékhatásaiban is: csontvelő szuppresszió, májkárosodás tünetei. Sajnos a szer ennél súlyosabb mellékhatásai is gyakoriak, amelyek a sejtek fiziológias működéséhez és sejtosztódáshoz szükséges fehérjék szintézisének a gátlásából adódnak.
4. *Mi lehet az oka annak, hogy a CD8+ T sejtek ellenállóbbak a DX kezeléssel szemben? Összefügg-e ez a relatív GC rezisztencia azzal, amit munkacsoportunk is kimutatott, hogy a CD8+ T sejtekben magasabb a GR expresszió, mint a CD4+ T sejtekben?*

Klinikai adatok is alátámasztja a GC kezelésben részesülő autoimmun (SLE, MS stb.), asztmás és COPDs betegeknél is, hogy a CD8+ T sejtek perzisztálnak a gyulladáshoz vezető szövetekben, jelezve relatív GC rezisztenciájukat. A GC hormon rezisztencia hátterében számos mechanizmust feltételeznek, többek között a GR izoformák arányának megváltozását és a gátló GRbeta és GRgamma szintjének emelkedését (Zou et al. *Autoimmunity* 2013. 46:531–536) a hormonkezelésre aktiválódó GRalfa szinthez képest. Saját áramlási citometriás vizsgálatainkkal mind egér timociták jelölése (*Int. Immunol.* 2002; 14(5):463-9) mind klinikai minták vizsgálata (*Transplant International* 2002. 15: 132-138) során a CD8+ T sejtekben magasabb GR expressziót mértünk, mint a CD4+ T sejtekben. Miután az intézetünkben előállított anti-GR ellenanyag a receptor regulatórikus doménjét ismeri fel, mindegyik GR izoformát jelöli. Így feltételezhető, hogy a CD8+ T sejtek magasabb GR expressziója és GC rezisztenciája mögött a magasabb GRbeta izoforma jelenléte áll.

Egy másik közleményben a gyulladáshoz vezető citokinek, mint TNFalfa és INFgamma hatását teszik felelőssé a GC rezisztencia kialakulásáért, amely citokinek a MERMI methyl transzferáz enzim degradációját okozzák, aminek kromatin kondenzáció lesz a következménye, mely akadályozza a GR DNS-hez kapcsolódását és ezzel gátolja a GC hatását az adott sejten (*Clin Endocrinol (Oxf).* 2015;83(4):441-8). Hasonló mechanizmust írt le Ling-bo Li és munkacsoportja (*Blood* 2007. 110(5): 1570–1577.) a CD8+ sejtekben, amelyekben DX hatására csökkent hiszton H4 K5 acetilációt írnak le, amely mögött a CD8+ T sejtekben a CD4+ sejtekhez képest alacsonyabb ATF2 hiszton acetyltranszferáz (HAT) expresszió áll. Ez szintén gátolja a GR kromatin hozzáférést és kötődést és ezzel gátolja a GC-ok hatását a CD8+ T sejtekben.

5. *Arra a kérdésre, hogy a DX indukált apoptózis mérésre használtunk-e az Annexin V mellett PI jelölést is* a válaszom, hogy sajnos nem tudunk, mert ebben a kísérletben a CD4+CD8+ DP és SP timocita alcsoportok azonosítására használt ellenanyagok fluorofórijai elfoglalták a PI csatornát, és a rendelkezésünkre álló FACSCalibur áramlási citométer 4 csatornájában a PI nagy átfedése miatt nem tudtuk azt is mérni az Annexin-FITC, CD4PE és CD8CyCr mellett. Ezért alkalmaztunk az apoptózis egy későbbi stádiumát és a mitokondriális apoptózis útvonalat jelző CMX-Ros festést.
6. *Feltételezhető-e a különböző timocita alcsoportok eltérő CMX-Ros jelölődése alapján azok komoly metabolikus aktivitásbeli különbözősége?*

Azt tapasztaltuk, hogy kezeletlen Balb/c egerek tímuszában a kettős pozitív sejtekben a legalacsonyabb a CMX-Ros fluoreszcencia intenzitása, ami alacsonyabb mitokondriális membrán-potenciált jelez ezekben a sejtekben. Ennek a magyarázata lehet, hogy a DP sejtekre a kortikális epitélsejtek által termelt GC hat, amely a többségükben - párhuzamos TcR szignál nélkül - elindít egy mitokondriális apoptózis útvonalat. *In vitro* 30 perces DX kezelés hatására a CMX-Ros fluoreszcencia intenzitás tovább csökkent, jelezve a DP sejtek további mitokondriális funkció romlását, vagyis az intrinsic apoptózis útvonal aktiválódását. Ebben a kísérletben a GR mitokondriális transzlokációjának bizonyítása volt a célunk és a többi timocita alcsoportot nem elemeztük, mivel azokban 30 perc után már létrejöhet a GC-ok magi transzlokációja és genomiális hatása, ami fehérje szintézis révén pl. a Bcl-2 családba tartozó Bim útján befolyásolja az apoptózis válaszukat.

7. *A GC gyors, nem-genomikus jelátviteli útvonalát vizsgálva felmerült-e annak a lehetősége, hogy a Jurkat sejteken kapott eredményeket timocita alpopulációk esetében is validálják? A sejtvonalon kapott eredmények milyen mértékben képezik le a primer timociták jelátviteli folyamatait?*

Köszönöm a kérdést, amely valóban jogos, és további kísérleteket igényel szeparált timocita alcsoportokon. Ugyanakkor a Jurkat sejt, mely egy immortalizált T limfocita sejt vonal széles körben elfogadott modellje a T sejt jelátviteli folyamatok vizsgálatának. A Jurkat sejteken kimutatott gyors GC jelátviteli útvonal aktiválódás egyik kulcspontja a membrán-közeli GR-ZAP-70 asszociáció melynek vizsgálatát Boldizsár Ferenc kollégám folytatja, aki a GC hatás szempontjából fontos ZAP-70 mutációkat hordozó egértörzsek létrehozásán dolgozik, amelyek alkalmasak lesznek az egyes tirozin maradékok szerepének további tisztázására primer sejteken is ezen egértörzsekben.

8. *Az általuk azonosított és vizsgált ZAP-70 tirozin maradékok mutációja összefüggésbe hozható-e bármely ismert humán immundeficienciával?*

A ZAP-70 expresszió hiánya vagy teljes funkcióvesztése emberben súlyos kombinált immundefektust okoz (SCID). A SCID ezen formájában a perifériás vérben jellemző a CD8⁺ T sejtek teljes hiánya és funkcióvesztett, de normál CD4⁺ sejt szám. SCID-et okozó ZAP-70 mutációk főleg a molekula kináz doménjét érintik (Elder ME. és mtsai. J. Immunol. 2001;166:656-661.) Ugyanezek a mutációk egérben teljes CD4 és CD8 T limfocita kiéricsi zavart okoznak és T sejt hiányt a periférián. Ez jelzi a ZAP-70 eltérő szerepét a pozitív szelekcióban humán és egér viszonylatban. Feltételezhető, hogy a humán tímuszban a DP timocitákban még a Syk kináz képes helyettesíteni a ZAP-70 szerepét, de érett CD4⁺ T sejtekben már nincs jelen és ez az oka a zavart jelátvitelnek (Wang H. és mtsai. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010;2.1-17).

Érdekes ugyanakkor, hogy a terminális SH2 doménben előforduló pontmutáció és az általunk is vizsgált Y315 és Y319 az interdomén B-ben előforduló mutációk egérben (SKG és YYAA egértörzs) a T sejtek zavart jelátviteli folyamata miatt a negatív szelekció zavarát és következményes autoimmun betegségek képét okozzák. SKG egérben reumatoid arthritis alakul ki RF és anti-CCP antitest megjelenéssel, míg YYAA egérben a Treg sejtek zavarát és RF pozitivitást találtak (Sakaguchi, S. és mtsai. Immunol. Cell Biol. 2012;90.277–287.). Emberben ezeket a ZAP-70 pontmutációkat immundefektusban és azt kísérő autoantitest-mediált autoimmun betegségben nem írták le, de leírtak autoimmun colitis, proteinúria és bullosus pemphigoiddal járó ZAP-70 pontmutációkat egy testvérpárnál. Az R192W mutáció az SH2 doménben csökkent kötődést okozott a foszforilált ζ-lánchoz, míg az R360P

mutáció a katalitikus doménben megakadályozta a ZAP-70 autoinhibitoros tulajdonságát és ezzel hyperaktiv ZAP-70-et eredményezett (Chan AZ és mtsai. J. Exp. Med. 2016; 213:2 155-165). Ezek alapján feltételezhető, hogy számos autoimmun betegség hátterében a T sejt jelátviteli útvonal valamely kulcsmolekulájának, így a ZAP-70-nek a mutációja állhat.

9. *Mi a legfrissebb álláspont a Helios transzkripció faktor használatára Treg markerként?*

A Helios expressziót tímusz eredetű tTreg sejtekben és perifériás Treg sejtek egy részében Thornton AM. 2010-ben írta le egerekben. Azóta számos, közleményben cáfolták a Helios alkalmasságát a tTreg pTreg elkülönítésére, de ezek főként humán Treg sejt vizsgálatok voltak. Humán pTreg sejtekben aktiváció hatására indukálható a Helios megjelenése és összefüggésbe hozható azok szuppresszív funkciójával, de aktiválódott és proliferáló perifériás T sejtekben is kimutatható (Sebastian M. és mtsai. J Immunol (2016) 196(1):144–55.). Összességében a mai álláspont szerint a Helios pozitivitás epigenetikailag stabil Treg fenotípust jelez fokozott immunszuppresszív tulajdonságokkal (Elkord E. Front Immunol. 2016; 7: 276.).

10. *Lehet-e jelentősége a lépben és tímuszban található Treg sejtek eltérő Foxp3 és GR expressziójának? Milyen megközelítéssel fogják a GR-FoxP3 ko-lokalizációt tovább vizsgálni?*

Áramlási citometriás eredményeink alapján a lépben szignifikánsan magasabb a pTreg sejtek GR expressziója, mint a tímuszban elhelyezkedő tTreg sejtekben, de FoxP3 expressziójuk nem tér el. Ennek oka feltételezésünk szerint a tímusz mikrokozonyete lehet, ahol a lokális GC hormon szintézis miatt alacsony a DP sejtekben és a negatív szelekció során azokból keletkező CD4+ Treg sejtek GR expressziója. Ugyanakkor a GC apoptózist indukáló hatása kevésbé érvényesül ezekben a tTreg sejtekben, mint a lép Treg sejtekben, ami azt jelzi, hogy tTreg-re jellemző stabil Foxp3 expresszió szerepe lehet a GR jelátviteli útvonal gátlásában. A lépben levő pTreg sejtekben DX kezelésre tapasztalt Foxp3 mRNS expresszió emelkedés a GC-ok Treg irányú elköteleződésben játszott szerepére utalhat.

A két molekula interakcióját feltételezve a GR-FoxP3 ko-lokalizáció konfokális mikroszkópos vizsgálati eredményeit Vereb György Professzorral kollaborációban folytatjuk a két molekula között FRET (fluoreszcencia energia transzfer (FRET) vizsgálatokkal.

11. *A témához kapcsolódó klinikai kollaborációs munkákról hiányolja a bíráló, hogy nem kerültek azok eredményei említésre, pl. a horvát kollégákkal együtt vizsgált háborút megjárt katonák limfocitáiban a poszt-traumás stressz (PTSD) okozta GR expresszió változás.*

Az eredmények fejezetben tudatosan csak a saját laboratóriumunkban saját munkatársakkal végzett kísérleti eredményeket mutattam be, kihagyva a külföldi és hazai kollaborációs munkákat. Ezzel részben az volt a célom, hogy bebizonyítsam, hogy hazai laboratóriumban is lehet koherens kutatómunkát végezni, bár egy frissen indult új munkacsoportból a publikációk sokkal nehezebben fogadtathatók el nemzetközi folyóiratokban, mint egy nagy hagyományokkal bíró, nemzetközileg ismert kutatóhelyről.

A PTSD érdekes módon a katonák alacsonyabb szérumban kortizol szintjét eredményezte és a limfocitáikban a GR downregulációját (Gotovac K. és mtsai. Clin Exp Immunol

2003;131(2):335-9.) Az NK sejtekben maradt a legmagasabb a GR, ezt követte a B sejtek és legalacsonyabb a T sejtekben volt a GR expresszió.

12. *Ismertek-e akár a GR akár a Hsp90-et kódoló géneken olyan ritka mutációk vagy gyakori polimorfizmusok, amelyek a GC választ befolyásolják, esetleg betegségek pathogenezisével állnak kapcsolatban?*

Régóta ismert betegség a familiáris glukokortikoid rezisztencia hypertóniával, hyperandroszenizmussal, emelkedett szérumszinttel Cushing's szindróma tünete nélkül. Hurley DM. és csoportja már 1991-ben leírta (J.Clin Invest 1991; 87(2): 680–686.) a jelenség mögött a 2054-es nukleotid mutációját, ami valin-aszparaginsav cserét eredményezett a 641-es aminosavnál a ligand-kötő doménben és ezzel jelentősen csökken a receptor ligand kötő képessége. Klinikai tüneteket csak a homozigóta utódoknál tapasztaltak. Azóta számos mutációt írtak le a GR DNS kötő doménjében is, pl. a hGR α V423A aminosav csere ugyancsak primer generalizált GC rezisztenciát okoz következményes zavarral a GR nukleáris transzlokációjában és a DNS kötő képességben a GRE génszekvenciákon (Roberts ML. és mtsai., J. Clin. Endocrinol Metab. 2013;98(4):E790-5. doi: 10.1210/jc.2012-3549.)

Nicolaidis NC. és Charmandari E egy 2017-es review-ben részletes leírását adja azon GR pont mutációknak melyek a primer generalizált GC rezisztencia ((PGGR), későbbi nevén “Chrousos szindróma”, és a primer generalizált GC hyperszenzitivitás szindróma (PGGS) mögött állnak (Hormones 2017, 16(2):124-138). A GR izoformákat az NR3C1 gén kódolja (5-ös kromoszóma) és 10 exonból épül föl. Az 1-es exon szövet-specifikus non-coding DNS régiókat tartalmaz, míg a 2-9 α /9 β alkotja a sokféle GR izoforma fehérje expressziós régióját. A GR minden doménjében írtak le mutációkat, deléciókat és inserciókat, melyek a fenti két betegségecsoportot okozzák.

A hGR polimorfizmusok a normál populáción belül előforduló hGR α interindividuális variációit eredményezik, következményes eltérő GC szöveti érzékenységgel és metabolikus aktivitással. Az ER22/23EK hGR génvariáns két kapcsolt mutációt tartalmaz a 2-es exonban. Ennek csökkent GC érzékenység és emelkedett kortizol szérumszint valamint jobb metabolikus tulajdonságok, inzulin érzékenység, LDL koleszterin szint a következményei hosszabb várható élettartammal. A gyakori BcII restrikciós fragmens hossz polimorfizmus (rs 41423247) ezzel szemben fokozott GC érzékenységet, inzulin rezisztenciát, hypertóniát és viscerális elhízást okoz. Ugyancsak leírtak a hGR β esetében egy aminosav cserét nem okozó pontmutációt, mely a hGR β élettartamát növeli, akadályozva a GR α működését következményes GC rezisztenciával. Ez a polimorfizmus ugyan csökkent obezitással és jobb lipid paraméterekkel társul, de gyakoribb ezekben az egyéneknél a gyulladási reakció, a rheumatoid arthritis és a cardiovascularis megbetegedések (Syed AA. és mtsai. Obesity (Silver Spring) 2006;14:759–764.).

Végezetül köszönöm Dr. Széll Márta Professzor Asszony pozitív véleményét munkámról, gondolatébresztő kérdéseit, és azt, hogy a doktori művem alkalmasnak tartja nyilvános vitára bocsátani.