

Opponensi vélemény

Dr Berki Timea „A glukokortikoid hormon indukálta jelátviteli mechanizmusok vizsgálata T-sejt alcsoportokon” c. doktori értekezéséről

A glukokortikoid származékok (mint például a prednizolon, a metilprednizolon, stb.) mindennapi terápiás fegyvertárunk fontos elemei. Szinte nincs is olyan gyulladásos betegség, ahol ne lenne szükség glukokortikoid hosszabb-rövidebb ideig tartó adására. Habár a glukokortikoidok genomikus hatásait eléggé régóta és elég jól ismerjük, a nem-genomikus hatásai sokkal kevésbé ismertek. Mivel ezek a gyógyszerek igen kevésbé szelektívek, nagyon sok „mellékhatást” okoznak. Hatásmechanizmusuk minél pontosabb megismerése elvezethet újabb molekulák kifejlesztéséhez, amelyek immár célzottabban fejthetik ki áldásos tevékenységüket.

Habár nagyon sokat tudunk a T sejtekről, azok funkciójáról, alcsoportjaikról (az én időmben még szubpopulációknak hívtuk őket), valamint azok – immár meglehetősen bonyolulttá vált – kapcsolataikról és funkcióikról, még nagyon sok terület maradt feltáratlan. A szabályozó (Treg) sejtek fontos szerepet töltenek be az immunfolyamatokban. Különösen izgalmas a szerepük a sokféle autoimmun betegség kialakulásában és perpetuálásában, illetve spontán javulásában vagy éppen gyógyulásában. Jellemzésük, szerepük jobb megértése szintén utat nyithat újabb terápiás eljárások majdani bevezetésére.

Mindezeket csak a a témaválasztás helyes irányának igazolása végett láttam szükségesnek előrebocsátani.

A jelölt elég céltudatosan munkálkodott az elmúlt időszakban a fenti – egyébként egymással összefüggő – témákon. A disszertációt 14 közleményre alapozta, melyeket *in extenso* mellékelte. Ezek között van egy magyar nyelvű és egy angol nyelvű összefoglaló közlemény is, amelyek a disszertáció egyik témáját dolgozzák fel közérthető formában.

Az értekezés témájában megjelent közlemények összesített impakt faktora 70,177. A jelölt tudományometriai adatai (összesített impakt faktora, Hirsch indexe, citációk száma) kiemelkedő és elismerésre méltó.

Az értekezés gondosan kivitelezett szép munka, habár tartalmánál fogva nem könnyű olvasmány. Első részében tárgyalja az alapfogalmakat, a glukokortikoidok szintézisét, a nukleáris receptorok szerkezetét, a genomikus és nem-genomikus hatásokat, a T-sejtek differenciálódását, szelekcióját, aktivációját, a Treg sejtek fontosabb jellemzőit, majd a glukokortikoidok T-sejtekre kifejtett hatásait. Ezután vázolja a 4 nagyobb tételre osztható célkitűzéseit. A módszertani rész kellően rövid, de mindenre kiterjedő. A felhasznált módszerek modernnek, legnagyobb részben áramlási citometriára alapozottak, és teljes mértékben alkalmasak a célkitűzések elérésére. Itt említem meg, hogy az 1998-ban közölt, a vizsgálatok alapját képező antitesttel jelölt glukokortikoid receptorokat vizsgáló módszer, nagyon jó kezdése volt a tudományos munkának – s bár a jelölt nem említi az új eredményei között – a módszer kidolgozása mégis nagyon fontos lépés volt (a SCOPUS szerint 46 közlemény hivatkozik rá).

A következő (5.) részben röviden összefoglalja azokat az eredményeket, amelyek a csatolt közleményekben megtalálhatóak. Az eredményeket Összefoglalás és Megbeszélés követi, majd az új eredmények 11. pontban történő felsorolása. Az irodalomjegyzék bőséges, de nem túlzott, releváns. Ezután következik a 14 csatolt közlemény.

Összegezve, az értekezés a formai szempontok szerint messzemenően megfelel a követelményeknek. Magam részéről szerencsésnek tartom ezt a csatolt közleményekre alapozott formát.

Kritikai megjegyzések:

1. A Bevezetés rövid, lényegretörő, emiatt nagyon sok részlet nincs is megemlítve (ez persze nem róható fel hibául). Néhány apróbb észrevétel:

14. oldal. A glukokortikoidok immunszuppresszív szerepe nem csupán dogma, hanem valóság. Anthony Fauci, 1976-ban ugyan feltételezte a glukokortikoidok immunstimuláns hatását is, de tudnunk kell, hogy abban az időben még a helper/szuppresszor T-sejt dichotomia világát éltük és akkor például ismert volt, hogy a citosztatikus/immunszuppresszív ciklofoszfamid – megfelelően időzítve adva – egér modellben nemcsak immunszuppresszív, hanem immunstimuláns hatású is lehet.

14. oldal. A gyógyszerek nemzetközi neveit magyarosan írjuk (pl. metilprednizolon) vagy ha latinosan, nincs e betű a szó végén. Tekintve azonban, hogy a disszertáció ortográfiaja nem latinos, az előbbi írásmód a helyes.

19. oldal. Az annexin I (vagy annexin A1) azonos a lipokortin-1-gyel – ennek a gyulladásgátló hatása az arachidonsav anyagcserét beindító foszfolipáz A2 (PLA2) gátlása.

34. oldal. Sajnos emberi betegségekben még igen keveset tudunk a Treg sejtek szerepéről. Némi ismerettel rendelkezünk néhány autoimmun betegségben – az IPEX-en túlmenően –, jelesen a szisztémás lupus erythematosusban (SLE-ben) és rheumatoid arthritisben (RA-ban), néhány más autoimmun betegségben, valamint a terhességben és transzplantációs toleranciában kifejtett hatásaikról. S bár lupusban nagyon sok közlemény jelent már meg a Treg sejtek hatásairól, túl sok az ellentmondás, és valóban a terápiában egyelőre nagyobb előrelépés ezen a téren nincs is. Nagyon érdekes és legalább ennyire izgalmas a reguláló B sejtek szerepe is, amiről talán még ennél is kevesebbet tudunk, pedig szabályozó szerepük legalább annyira fontosnak tűnik, mint Treg sejteké.

A csatolt közleményekkel kapcsolatban nincsenek kritikai észrevételeim, hiszen azokat nálam minden bizonnyal a tudományban jártasabb szakemberek lektorálták.

Itt-ott előfordulnak gépelési hibák is, ezeket itt nem részletezem.

Új eredmények:

Az új eredményeket nem a szöveges rész, hanem a 12 csatolt, angol nyelvű, lektorált közlemény alapján vizsgáltam. Elsősorban arra voltam kíváncsi, hogy az 'új eredmények' konkrétan mely közleményekben találhatóak, és ezek milyen hatást fejthettek ki (az idézetek számával becsülve – természetesen abban a tudatban, hogy a legfrissebb adatok idézettége a legkisebb).

A disszertáció eredményei két nagyobb téma köré csoportosíthatók:

1. T sejtek glukokortikoid érzékenysége és a glukokortikoid-okozta apoptózis jellemzése.
2. Treg sejtek glukokortikoid receptorának jelátvittele, és glukokortikoidok hatása T sejt funkciókra.

Az új eredmények tételelesen:

1. Balb/C és AND-Tcr transzgénikus egerekben leírták a timocita alcsoportok összetételét és azok eltérő glukokortikoid receptor (GR) kifejeződését (expresszióját) és érzékenységét, valamint a glukokortikoidok timocita érést befolyásoló hatását. (*Intl Immunol*, 2002; *Immunol Letters*, 2003 – összesen 80 hivatkozással).
2. Kimutatták, hogy Balb/c egerekben a kettősen pozitív (CD4+/CD8+, DP) timocitákban a dexametazon genomikus és nemgenomikus módon váltja ki a sejtek apoptózisát. *In vitro* dexametazon hatására a glukokortikoid receptorok nem a magba,

hanem a mitokondriumba transzlokálódnak. (*Immunobiology, 2006; Int Immunol, 2009, Immunobiology, 2010 – összesen 66 hivatkozással*).

3. Jurkat (T) sejtekben leírták, hogy rövid idejű nagy dózisú dexametazon kezelés hatására glukokortikoid-receptor-mediált tirozin foszforiláció következik be (a GR-ZAP-70 kapcsolódásán keresztül), eközben módosul a sejt aktiváció a T sejt receptoron keresztül (gátlódik a ZAP-70 - CD3 kapcsolódás) (*J Steroid Biochem, 2006; Biochem Biophys Res Commun, 2007, Immunobiology, 2010 – összesen 68 hivatkozás*).
4. A ZAP-70 [= zéta-lánc asszociált protein kináz] szerkezeti vizsgálatával bizonyították, hogy a ZAP-70 Y315 és Y492 foszforilációs helyei vesznek részt a nem-genomikus glukokortikoid hatásokban, amelyet az SLP-76 és a Cbl [molekulák közvetítenek, nem a LAT [= linker for activation of T cells]] (*Int Immunol, 2012; Mol Immunol, 2013 – összesen 10 hivatkozás*).
5. Egér timociták apoptózisát vizsgálva kimutatták a mitokondriális glukokortikoid receptor asszociációját és direkt kapcsolódását az apoptózist szabályozó Bcl-2 család tagjaival (úgy mint Bak, Bim és Bcl-x_L proteinekkel) (*Apoptosis, 2017 – most jelent meg, még nincs hivatkozás*).
6. A glukokortikoid receptor és T-sejt receptor (GR és TcR) – egyébként apoptotikus – stimuláció együtt magasabb arányú DP timocita túlélést okoz. Ez a korai apoptotikus folyamatok gátlásának köszönhető és a két jelátviteli út összekapcsolódását valamint a kölcsönös antagonizmus modellt támasztja alá a timocita szelekció során (*Immunobiology, 2008 – 12 hivatkozás*).

Vizsgálták továbbá a szabályozó T sejtek (Treg sejtek) glukokortikoid érzékenységét, apoptózisát, de ezek az eredmények egyelőre csak a hazai Immunológiai Szemle c. folyóiratban jelentek meg, nemzetközi publikációt sem a disszertációban sem a PubMed-ben nem találtam. Habár ezek az eredmények figyelemreméltóak – és a klinikus számára sokkal izgalmasabbak, mint a timociták glukokortikoidok érzékenysége –, nemzetközi publikáció nélkül nem fogadhatók el új eredménynek.

A disszertációt elolvasva számtalan kérdés vetődik fel. Ezek nem kritikai megjegyzések, csupán azért teszem fel őket, mert vélem, hogy a disszertáns választ tud rájuk adni.

Kérdések:

1. Mit jelent a nagy glukokortikoid dózis? Valószínű, hogy az egyszeri 250 mg metiprednizolon intravénásan adva kivált nem-genomikus hatásokat is. Ismeretes-e vajon hány mg/ttkg lehet az alsó határa a nem-genomikus hatások kiváltásához szükséges adagnak emberekben (prednizolon ekvivalensben számolva)?
2. Mennyiben specifikus a glukokortikoid receptor a glukokortikoidokra? *Engler és mtsai (2017)* vizsgálták a progeszteron hatását Treg sejtekre terhességben és a progeszteron kötődik a T sejtek glukokortikoid receptorára és ennek hatására a Treg sejtek száma megnő. Vizsgálta-e a disszertáns más (nem glukokortikoid) szteroidok hatását a timociták vagy Jurkat sejtek vagy más T sejtek glukokortikoid receptorára?
3. Az utóbbi időben több olyan közlemény is olvasható, melyek szerint a Treg sejteken található receptor, a GITR [= glukokortikoid-indukált tumor nekózis faktor receptor] (más néven: TNFSFR18, CD357), vagy liganduma, a B sejteken, makrofágokon, dendritikus sejteken található GITRL – esetleg a klinikumban, pl. autoimmun betegségekben, daganatokban, HIV-ben, stb.) is felhasználható. Már vannak olyan klinikai vizsgálatok (<https://clinicaltrials.gov>), amelyekben monoklonális GITR antitesteket adnak daganatos betegeknek. Vannak-e a GITR-ral kapcsolatos vizsgálataik?

4. Szándékukban áll-e a Treg sejtekkel kapcsolatos eredményeket nemzetközi folyóiratban is közölni, illetve van-e jelenleg közlés alatt álló publikációjuk?
5. Vizsgálták-e vagy szándékukban áll-e vizsgálni a Breg sejtek glukortikoid érzékenységét?

Összegezve, a disszertáció mind formai, mind tartalmi szempontból megfelel a követelményeknek. A kifogások a disszertáció értékeit nem érintik, nem kisebbítik. A fentebb felsorolt eredményeket új tudományos eredményeknek ítélem meg, és a doktori értekezést alkalmasnak tartom nyilvános vitára.

Budapest, 2017 május 2

Dr Gergely Péter
egyetemi tanár
az MTA doktora