

Válasz Dr. Medgyesi György opponensi véleményére

Mindenekelőtt köszönöm Dr. Medgyesi Györgynek, hogy MTA doktori értekezésemet részletesen elbírálta, és hogy azt alkalmasnak tartja a nyilvános vitára.

Kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

A 11D ábrán a C3b –nek H faktor jelenlétében, I faktor által történő hasadását ábrázolták. A H faktor különböző doménjeihez kötődő monoklonális ellenanyagok jelenlétében megjelentek a várható hasadási termékek, azonban az E14 jelű ellenanyag mellett végzett hidrolízis után láthatólag kisebb molekulatömegű termékek jelentek meg. Vizsgálták-e, hogy ez a monoklonális ellenanyag hogyan befolyásolja a C3b –nek H és I faktorról való kölcsönhatását?

A 11D ábrán bemutatott kísérlet célja annak vizsgálata volt, hogy az egyes monoklonális antitestek a H-faktorhoz kötődve gátolják-e annak kofaktor aktivitását, így a C3b I-faktor általi hasítását a folyadék fázisban. A vizsgált antitestek egyike sem gátolta adott körülmények között a kofaktor aktivitást, de az E14 jelű H-faktor ellenes monoklonális antitest jelenlétében – úgy tűnik – inkább fokozódott ez az aktivitás, és a C3b α' -láncra tovább hasadt. Ez az antitest a H-faktornak a felszínhez lekötődött C3b-vel való kölcsönhatását gátolta (mivel ebben az antitest által felismert H-faktor C-terminális molekularész vesz részt). A kofaktor aktivitásban szerepet játszó H-faktor N-terminális rész kölcsönhatását a C3b-vel viszont nem vizsgáltuk; ugyanígy az I-faktorról való kölcsönhatást sem. Utólag azt feltételezem, hogy az antitest a H-faktorhoz kötődve – annak konformáció változását kiváltva – befolyásolja a C3b-vel való kölcsönhatást a folyadék fázisban is. Az egyes monoklonális antitestek között az epitópokban való eltérés magyarázhatja, hogy másképpen befolyásolják a H-faktor kofaktor aktivitását.

A 12D ábrán bemutatott kísérletben hogyan ellenőrizték a PI-PLC γ kezeléssel történő CD55 és CD59 eltávolítás mértékét?

A sejtek PI-PLC γ enzimmel történő kezelése után a sejt felszínen maradt CD55 és CD59 molekulák expresszióját áramlási citométerrel mértük. A kezeltlen sejtekkel összehasonlítva kb. 25%-ra csökkent a két GPI-horgonyzott membránfehérje mennyisége.

A 12B és D ábrán bemutatott kísérletben H-faktor depletált normál humán szérumot alkalmaztak. Hogyan ellenőrizték a depléción mértékét?

A H-faktor eltávolítására Sepharose-gyöngyökhöz konjugált H-faktor specifikus antitest segítségével került sor, amelynek során 2-3 alkalommal inkubáltuk a szérumot a gyöngyökkel. A H-faktor depléción mértékét ELISA-val és Western blotol is ellenőriztük. Teljes mértékű depléción nem került sor, de általában az eredeti H-faktor mennyiség 85-95%-át sikerült így eltávolítani. Többszöri kezeléssel ezen ugyan tudunk javítani, viszont az így depletált szérum komplement aktivitása már nem volt megfelelő.

Autoantitest-pozitív aHUS beteg plazmája birka vörösvérsejtek lízisét idézte elő. Milyen adatok támasztják alá, hogy a BVVS-ek lízise és az autolog sejtek komplement-mediált károsítása között korreláció áll fenn?

A birka vörösvérsejt tesztet három okból választottuk. Egyrészt ez egy régóta használt, széles körben elfogadott egyszerű és olcsó módszer a komplement aktivitás mérésére, amit diagnosztikai laboratóriumokban is rutinszerűen lehet alkalmazni. Másrészt a H-faktorról időközben kiderült, hogy a szialsavat tartalmazó sejtfelszínhez kötődve hozzájárul a sejtfelszíni komplementaktiválódás gátlásához, és a birka vörösvérsejtek esetében ez a humán komplementgátló membránfehérjék hiányában jól vizsgálható. Harmadrészt a sejtekből kiszabaduló hemoglobinnal mérésével könnyen kvantifikálni lehet az eredményeket.

Emberi vörösvérsejtek esetében a helyzet bonyolultabb, mivel ezeken a sejteken már a humán komplementgátló fehérjék közül a CD55 és CD59 is kifejeződik, amelyek miatt nehezebb ezeket a sejteket lizálni, és az expressziós különbségek miatt heterogénebb sejtpopulációt is jelenthet. Ferreira és munkatársai (Ferreira V.P. et al., J. Immunol. 2006;177:6308-16.) összehasonlították a kétféle vörösvérsejtet, és – ahogyan várható volt – azt találták, hogy az emberi vörösvérsejtek is dózisfüggően lizálhatók, bár jóval kisebb mértékben, mint a birka vörösvérsejtek, ha a humán szérumhoz adott rekombináns H-faktor fragmentummal (CCP19-20) kompetitíve gátolják a H-faktor sejtekhez kötődését. Amennyiben a vörösvérsejtekhez adott antitestekkel a CD55 és CD59 molekulák funkcióját is gátolják, az a birka vörösvérsejtekéhez hasonló mértékű lízist eredményez. Ezt később igazolták paroxizmális nokturnális hemoglobinuriás betegek vörösvérsejtjeinek vizsgálatával is, ahol a CD55 és CD59 csökkent expressziója miatt a vörösvérsejtek érzékenyebbek voltak a komplement általi károsító hatásra, ha a H-faktor kötődését az előzőek szerint gátolták (Ferreira és Pangburn, Blood. 2007;110(6):2190-2.). Az aHUS-betegek H-faktor autoantitestjei az előzőekkel analóg módon okozzák szérumban a birka vörösvérsejtek komplement-mediált károsodását. A fentiek miatt azonban mi nem vizsgáltuk direkt módon az autoantitest-pozitív aHUS betegek vérplazma mintáinak humán sejteket károsító hatását a birka vörösvérsejtekkel való összevetésben, és ezt – tudomásom szerint – még mások sem vizsgálták, illetve egyes betegek vonatkozásában sem állnak rendelkezésre ilyen adatok.

Mit jelenthet az autoantitestek specificitása szempontjából, hogy nem mutattak kereszt-reakciót sem FHR-3-mal, sem FHR-4A-val?

Feltételezhető, hogy az autoantitestek a H-faktor ellen alakultak ki, és így a homológ, a C-terminális doménekben a H-faktorról majdnem teljes aminosav szekvencia azonosságot mutató FHR-1 fehérjével is (amennyiben jelen van) keresztreakálhatnak. Az FHR-3 és FHR-4A fehérjék esetében (ahol a homológ doméneknél a H-faktor CCP19 és CCP20 doménjeivel való szekvencia egyezés csak 64, illetve 37%) a keresztreakció hiánya is megerősíti az autoantitestek H-faktor specifikusságát, illetve az autoantitestek kimutatására szolgáló ELISA specifikusságát is (pl. kizárható a rekombináns FHR-1 vagy H-faktor fragmentumok His-tag-je, vagy szennyező fehérje ellenes antitest, hiszen a többi rekombináns FHR fehérje is ugyanígy készült, illetve lett tisztítva).

Egyes esetekben H-faktor- antitest olyan betegekben is megjelent, akik FHR-1-et is termelnek. Van-e különbség az ilyen betegek autoantitestjei és a FHR-1 hiányos betegek autoantitestjeinek epitóp specificitása között?

Alapvető különbséget általában nem találtunk, tehát a H-faktor C-terminális doménjeit ismerték fel elsősorban az ilyen aHUS betegek autoantitestjei is. Néhány esetben a nem FHR-1 hiányos betegek autoantitestjei alig, vagy nem mutattak reakciót az FHR-1-gyel, így feltételezhető különbség az autoantitestek epitóp specificitása között. Ezt megerősítették mutáns H-faktor fehérjékkel végzett vizsgálataink is, ahol 6 ilyen aHUS beteg antitestjeinek vizsgálatakor azt találtuk, hogy az autoantitestek 5 beteg esetében a H-faktor 1203-1215 aminosavait, míg egy esetben – az amúgy az autoantitestek zömére jellemző, aHUS-ban fő autoantitest epitópként azonosított – 1183-1198 aminosavakat ismerték fel (Bhattacharjee et al., J. Biol. Chem. 2015; 290(15):9500-10, és Nozal et al., Mol. Immunol. 2016; 70:47-55.). Mindazonáltal a mintaszámot a jövőben növelni kell, hogy az egyértelmű összefüggést vagy annak hiányát megállapíthassuk.

Egyes irodalmi adatok (pl. Amomsiripanitch et al.: Clin. Cancer Res. 16, 3226-31, 2010 ; Campa et al: Cancer Immunol. Res. 3., 1325-32, 2015) szerint H faktor autoantitestek más betegségben is megjelenhetnek. Van-e adat arra, hogy nem aHUS beteg H faktor autoantitest hordozókban is előfordul FHR-1 hiány?

Az FHR-1 hiánya gyakori a normál populációban (2-5% az europoid/kaukazoid nagyasszban), így előfordulhat más betegeknél is, bár egyes betegségekkel az FHR-1 hiány inverz korrelációt mutat. Szemben az aHUS betegekkkel, a H-faktor autoantitest pozitív C3 glomerulopátiás betegekben nincs pozitív korreláció az FHR-1 hiányával. Tudomásom szerint a H-faktor autoantitestekre pozitív aHUS betegek esetében bizonyított csak a nagyon erős korreláció, más betegségekben ez nem áll fenn, illetve nem vizsgálták az FHR-1 státuszt (pl. a nem-kissejtes tüdőráknál). Egy tanulmány szerint ugyan a H-faktor autoantitest pozitív reumatoid artritiszes és szisztémás lupusz eritematózusos betegek között is gyakoribb az FHR-1 hiány, mint a normál populációban (Foltyn Zadura A. et al., Arthritis. Res. Ther. 2012;14(4):R185.), ez azonban további vizsgálatokat és független megerősítést igényel.

A 49B. ábrán pentraxin 3-mal, ill. zselatinnal fedett mikrotiter lemezen mérhető H-faktor, ill. FHR-5 kötést mutatják be. A kötést anti-humán H faktor ellenanyaggal detektálták. Az alkalmazott ellenanyag ugyanúgy reagált-e H-faktoral, mint a FHR-5-tel? Eltérő reaktivitás esetén a mért értékek nem feltétlenül tükrözik a kötött FHR-5 tényleges mennyiségét.

Az alkalmazott ellenanyag valóban különböző mértékben reagál a H-faktoral, illetve az FHR-5-tel. Az adott kísérletben párhuzamosan, azonos antitest felhasználásával szeretnénk volna detektálni a két molekula kötődését, ehhez a H-faktor ellen előállított poliklonális antitestnek a rokon FHR-5 molekulával való keresztreakcióját használtuk fel. Más kísérletekben azért használtunk FHR-5 specifikus monoklonális antitestet, hogy ezt a keresztreakciót kizárhassuk – amit ellenőriztünk is –, így pontosabb eredményt kaptunk.

Van-e adat a H-faktor és a rokon fehérjék szénhidrát oldalláncainak funkcionális jelentőségére? A rekombináns FHR fehérjék funkcionális viselkedését modulálhatta-e a hiányzó, vagy eltérő glikolizáció?

A H-faktor molekulacsaládba tartozó fehérjék néhány kivétellel tartalmaznak szénhidrát oldalláncokat, azonban ezeknek a funkcionális jelentősége nem ismert, pl. hogy az FHR-2 szérumban megtalálható glikoziláció nélküli és glikozilált formája között van-e ligandumkötésben vagy valamilyen más funkcióban különbség. A H-faktor nyolc glikozilációs helyet tartalmaz (a 9-18. CCP doménekben), ezeknek a szerepét sem vizsgálták még részletesen. Arra van adat, hogy a teljesen deglikozilált H-faktor is képes a komplementszabályozó funkcióra (Jouvin et al., J. Immunol. 1984; 133:3250-4.), amit az is magyarázhat, hogy a fő funkcionális domének nincsenek glikozilálva. Nem zárható ki, hogy az általunk vizsgált rekombináns fehérjék tulajdonságait, aktivitását befolyásolja azoknak a natív molekuláktól esetlegesen eltérő glikozilációja. Ez további vizsgálatokat igényel.

Végezetül még egyszer köszönöm Dr. Medgyesi Györgynek az értekezés részletes bírálatát és pozitív véleményét.

Budapest, 2018. február 2.

Dr. Józsi Mihály