

Bírálati vélemény

Józsi Mihály: „A H-faktor molekulacsalád tagjainak élettani funkciója és szerepük komplement-közvetítette betegségekben”

című MTA doktori értekezéséről

Józsi Mihály MTA doktori értekezésében a komplementrendszer aktiválódásának szabályozásában kulcsszerepet játszó H-faktor és a H-faktorral rokon (FHR) fehérjék kutatása terén az utóbbi csaknem másfél évtizedben elért legjelentősebb eredményeit ismerteti. Jelölt a dolgozatban tárgyalt kutatásokat részben külföldön, a jénai Hans Knöll Intézetben, részben pedig itthon az ELTE Immunológia Tanszékén, mint Lendület Pályázat nyertes csoportvezető végezte. A komplementrendszer kutatása, mint az a dolgozat bevezetésében is olvasható, napjainkban reneszánszát éli. A kétezres évek eleje óta a publikációk száma ebben a témában meredeken emelkedő tendenciát mutat. Ennek oka egyrészt az, hogy számos betegségről derült ki, hogy kialakulásában és lefolyásában a komplementrendszer rendellenes, kontroll nélküli aktiválódása fontos szerepet játszik. Számos olyan betegség van, amelynek súlyosságát nagymértékben lehetne enyhíteni azzal, ha a komplementrendszer normális működését helyreállítanánk. Nem meglepő, hogy a világ nagy gyógyszergyárai sorra indítanak olyan projekteket, amelyek célja a komplementrendszert gátló gyógyszerek előállítása. A kutatások felfutásának másik oka az, hogy megjelentek olyan modern szerkezetvizsgálati, molekuláris biológiai, molekuláris genetikai módszerek, amelyek a múlt század utolsó évtizedeiben még nem voltak elérhetőek.

Józsi Mihály témaválasztása rendkívül szerencsésnek bizonyult, hiszen a H-faktor a komplementrendszer egyik legfőbb szabályozó fehérjéje. A H-faktor elsődleges funkciója a komplementrendszer alternatív aktiválódási útjának gátlása. Ez azért különösen jelentős, mert bármilyen úton induljon is el a komplementaktiváció, a C3 komponens hasítása után az alternatív út válik dominánssá egy pozitív visszacsatolási mechanizmus következtében. Egyes szerzők szerint, a nettó komplement aktiváció mintegy 80-90%-a az alternatív út következménye. Az élettani, orvosi vonatkozásokon kívül a téma rendkívüli szépségeket rejt magában egy fehérjekutatató számára is. Számomra lenyűgöző, hogy egy viszonylag kicsi (kb. 60 aminosavból álló) fehérjemodul, a CCP (másnéven SCR vagy sushi) domén, milyen változatos funkciókat képes betölteni, a sejtfelszínre való kötődésen keresztül enzimreakciók modulálásáig.

Józsi Mihály jelentős eredményeket ért el a H-faktor és rokon fehérjék kutatása terén, amelyet publikációinak száma és minősége is bizonyít. A dolgozat megírásához 20, magas impaktfaktorú nemzetközi folyóiratban megjelent publikációt használt fel. Ezek többségében terminális és/vagy levelező szerző. A bírálat elkészítésének az idején jelöltnek csaknem 2000 független hivatkozása és 29-es Hirsch-indexe volt. Mindezek alapján elmondható, hogy Józsi Mihály szakterületének nemzetközi szinten elismert szaktekintélye; közleményeinek szcientometriai mutatói messze felülmúlják az MTA által támasztott követelményeknek.

A dolgozat csaknem 100 oldal terjedelmű, logikus felépítésű, szép kivitelezésű. A rövid (1 oldalas) „Bevezetést” követi a „Tudományos háttér”-nek nevezett irodalmi összefoglaló (14 oldal). A tömör (1 oldal) „Célkitűzések” után egy szintén rövid (4 oldal) „Anyagok és alkalmazott módszerek” fejezet következik. Jelölt itt csak a használt módszerek nagyvonalú áttekintését adja, a részletes kísérleti leírásokat a dolgozat alapjául szolgáló, a dolgozathoz csatolt cikkekben találhatjuk meg. Az „Eredmények és megbeszélésük” fejezetben főként a publikációkból átemelt, részben módosított, ábrák dominálnak. A részletesebb leírásokért ebben az esetben is a csatolt publikációkhoz kell fordulnunk. Mindenképpen megjegyzésre méltó, hogy jelölt igen nagy terjedelmű tudományos anyagot sűrített bele ebbe a 60 oldalba. Az itt szereplő kísérletek megtervezésében, gyakran kivitelezésében és az eredmények értelmezésében, Józsi Mihálynak döntő szerepe volt. A kísérletek gondosan tervezettek, sokféle korszerű módszert használnak, az eredmények értelmezése logikus, jól követhető. Elmondhatjuk, hogy jelölt alapvető felfedezéseket tett a H-faktorral és az FHR fehérjékkel kapcsolatban, amelyek meghatározó módon járultak hozzá a szakterület fejlődéséhez. Ha nem ismerném jelöltet már több mint 15 éve, akkor is meggyőzne ez a fejezet arról, hogy Józsi Mihály szakterületének egyik vezető kutatója. Az „Összefoglalás és kitekintés” fejezet (3 oldal) után egy kb. 100 közleményt felvonultató hivatkozás lista következik. Mindezek alapján elmondható, hogy a disszertáció megfelel a formai és tartalmi követelményeknek, szépen kivitelezett, jól dokumentált munka. A mű hiteles adatokat tartalmaz.

Az értekezés legfontosabb eredményeit az alábbiakban foglalom össze:

- 1.) Kimutatták, hogy a H-faktor C-terminális (CCP19-20) doménjei felelősek a molekula endotélsejtekhez való kötődéséért. A sejtek felszínére kötődő H-faktornak lényeges szerepe van a sejt felszíni komplementaktiváció gátlásában. A C-terminális doméneket érintő, aHUS betegséget okozó mutációk a H-faktor endotélsejtekhez való kötésének csökkenését vagy elmaradását eredményezik.
- 2.) Kimutatták, hogy az aHUS betegek H-faktor ellenes autoantitestjei főként a H-faktor C-terminális doménjeihez kötődnek, csökkentve ezzel a sejtek védelmét a komplementaktivációval szemben.
- 3.) Megállapították, hogy az FHR-1 fehérje hiánya hajlamosít H-faktor ellenes autoantitestek képződésére.
- 4.) Megmutatták, hogy az aHUS-t kiváltó H-faktor ellenes autoantitestek nagy része keresztreakál az FHR-1 molekulával; ezáltal az FHR-1 elvonja az antitesteket a H-faktortól, viszont fiziológiai körülmények között nem gátolja a H-faktor sejtekhez kötődését.

- 5.) Eredményeik és irodalmi adatok alapján egy új modellt állítottak fel az FHR-1 hiányának szerepére vonatkozóan a H-faktor ellenes autoantitestek létrejöttében az aHUS betegekben.
- 6.) Kimutatták, hogy az aHUS asszociált anti H-faktor autoantitestek biológiai jellemzői nem változnak lényegesen a kezelések és a követés során.
- 7.) Felfedezték és klónozták az FHR-4A molekulát. Jellemezték az FHR-4 és a CRP közötti kölcsönhatást. Kimutatták, hogy az FHR-4 aktiválhatja az alternatív utat.
- 8.) Az FHR-1 molekula ligandumaként leírták a PTX3-at, és azonosították az FHR-1 C-terminális doménjeiben a PTX3 kötésben részt vevő aminosavakat. Cáfolták az FHR-1 terminális komplementutat gátló hatását.
- 9.) Kimutatták, hogy az FHR-5 kötődik a monomer CRP-hez, a PTX3-hoz és az extracelluláris mátrixhoz is. Felfedezték, hogy az FHR-5 indirekt és direkt módon is képes fokozni az alternatív út aktivációját.
- 10.) Létrehoztak egy mesterséges, 6 CCP doménből álló, mini H-faktor molekulát. A mini H-faktor a natív molekulánál hatékonyabban gátolja a komplementaktivációt.

Kérdések és megjegyzések az értekezéssel kapcsolatban:

- 1.) A dolgozat egészéből hiányolom a kvantitatív szemléletmódot. Teljesen egyetértek jelölt azon következtetésével, hogy „A H-faktor és az FHR fehérjék mennyiségi viszonyai, valamint affinitásuk különböző ligandumokhoz együttesen képesek a komplementaktiváció, ezáltal az opszonizáció és gyulladásoz folyamatok finomszabályozására” (84 oldal). A dolgozatban viszont a kötések erősségéről csak kvalitatív megállapítások találhatók (pl. „a H-faktor viszonylag gyengén kötődik”, „az FHR-1 nem olyan erősen kötődik a sejtfelszínnek, mint a H-faktor”, stb.). Egyetlen kivétel a 67. oldalon a PTX3-FHR-5 kölcsönhatásra meghatározott konkrét K_d érték. A H-faktor molekulacsalád tagjainak fiziológiás koncentrációja szintén nagyon hiányzik a dolgozattól. Jó lett volna ezt a bevezetésben egy táblázatban összefoglalni. Igaz, a X. publikációban (Trends in Immunology review 2008) még arról olvashatunk, hogy az FHR fehérjék koncentrációjának a meghatározása különböző testfolyadékokban nehézségekbe ütközik az antitestek keresztreakciója miatt. A közlemény megjelenése óta eltelt 10 év. Kérem a jelöltet, hogy röviden foglalja össze, a jelenleg ismert koncentráció adatokat.
- 2.) A 7. ábra C paneljén az látható, hogy a HUVEC sejtekhez a H-faktor és az FHR-1 mellett jól kötődik az FHL-1 is. Hogyan lehetséges ez, hiszen az FHL-1-ből hiányoznak a kötéshez szükséges C-terminális (19-20) domének?

3.) A 10. ábra A panelje alapján elmondhatjuk, hogy a H-faktor kötődése a HUVEC sejtekhez függ az ionerősségtől. Nagyobb ionerősségű pufferben gyengébb a kötés. Ez arra utalhat, hogy a kötés elsősorban ionos jellegű. A pH változás jelentősen megváltoztathatja egy fehérje felszíni töltését. Ez azért különösen fontos, mert az alternatív utat gyakran a szérum savanyításával indítják be. Ez történt pl. a 67. ábrán látható kísérletben is, amikor a különböző mini H-faktor molekulák hatékonyságát vizsgálták PNH-vörösvérsejtek lízisének gátlásában. Vizsgálta valaki a H-faktor sejtekhez kötődésének pH függését? Lehetséges, hogy a szérum savanyítására azért indul be az alternatív út a sejtek felszínén, mert a H-faktor gyengébben kötődik?

4.) A 11. ábra D panelje alapján egyik vizsgált antitest sem gátolta a H-faktor kofaktor aktivitását a C3b I-faktor általi hasításánál folyadék fázisban. Ez a C-terminálshoz kötődő antitestek esetében várható is volt; azonban az E22 antitest sem gátol, ami pedig a kofaktor aktivitáshoz szükséges 1-4 domén régióhoz kötődik. Mi a gátlás elmaradásának magyarázata ennél az antitestnél? Mi a magyarázata az E14 antitest esetében látható, a többitől eltérő hasítási képnek?

5.) Jelölt elegáns modellt dolgozott ki az FHR-1 hiányának a H-faktor ellenes autoantitestek kialakulásában játszott szerepére vonatkozóan (48. oldal). E-szerint a bakteriális H-faktor-kötő fehérjék olyan konformáció változást indukálnak a CCP20 doménben, amely az FHR-1 CCP5 doménjéhez teszi azt hasonlatossá. A VIII. publikációban konkrét példaként említik a borrelia OspE fehérjét, mint ami ilyen konformációváltozást képes kiváltani. A CCP19-20:OspE komplex röntgenszerkezetének (Bhattacharjee és mtsai. 2013 J Biol Chem 288, 18685) vizsgálata alapján azonban úgy tűnik a bírálónak, hogy rigid fehérje-fehérje kölcsönhatással állunk szemben: a komplexben lévő CCP19-20 szerkezete gyakorlatilag megkülönböztethetetlen a szabad CCP19-20 szerkezetétől. Nem vonom kétségbe, hogy lehetnek olyan patogén fehérjék, amelyek kiváltják az említett konformáció változást, de az OspE szerintem nem ilyen. További kérdés a modellel kapcsolatban az, hogy a fertőzés elmúltával, amikor már nincs jelen a konformációváltozást indukáló bakteriális fehérje, miért tudnak mégis a neoepitóp elleni autoantitestek hatékonyan kötődni a H-faktorhoz (erősebben, mint az FHR-1-hez, amin pedig az epitópot tartalmazó hurok állandóan exponálva van)?

6.) Jelölt és mások eredményei szerint bizonyos FHR molekulák (pl. FHR-4), a H-faktoral ellentétben, nem gátolják, hanem éppenséggel fokozzák a komplementaktivációt. Ez hasznos tulajdonság lehet bakteriális fertőzés esetén, amikor a H-faktort kötő mikroorganizmusok felületén komplementaktivációt okoznak. Az FHR-ek azonban saját sejtjeinkhez is kötődhetnek. Mi lehet a funkciója ebben az esetben a fokozott komplementaktivációnak?

7.) Az 59. ábra a mini H-faktor C3b-vel képzett komplexét mutatja saját sejt felszínén. A sematikus ábra irodalmi adatok (C3b:CCP1-4 és C3b:CCP19-20 komplexek kristályszerkezete) alapján készült. Nemrég jelent meg egy publikáció (Xue és mtsai. 2017 Nat. Struct. Mol. Biol. 24,643) amely a C3b:mini H-faktor, illetve a C3b:mini H-faktor:I-faktor komplex szerkezetét

ismerteti. Ezen legújabb szerkezetek mennyiben támasztják alá a dolgozatban szereplő modellt?

Bírálatomat összefoglalva elmondhatom, hogy Józsi Mihály alapvető eredményekkel járult hozzá a H-faktor és a rokon molekulák komplement szabályozásban és betegségekben betöltött szerepének megismeréséhez. Tudományos teljesítménye messze eleget tesz az MTA doktori fokozathoz elvárt követelményeknek, ezért **javaslom az értekezés nyilvános védésre való kitűzését.**

2017. december 15.

Gál Péter
tudományos tanácsadó
az MTA doktora