

Bírálat dr. Balogh Péter “Az egér perifériás nyirokszervek vaszkuláris-stromális elemeinek differenciálódása és szerepe a limfoid sejtek homeosztázisában” című MTA doktori értekezéséről

Dr. Balogh Péter MTA doktori értekezését a Mellékletek nélkül, az Irodalomjegyzékkel együtt 181 oldal terjedelemben készítette el. A disszertáció igen gazdagon illusztrált, 79 ábrát tartalmaz (ezek zöme nagyszámú részábrából álló multipanel ábra), emellett 6 táblázat is szerepel az értekezésben.

A disszertáció fő fejezetei a következők: „Előszó” (két oldal), „Rövidítések jegyzéke” (két és fél oldal), „Bevezetés” (11 és fél oldal), „Célkitűzések” (másfél oldal), „Fontosabb módszerek” (~ két oldal), „Eredmények” (27-151 oldal), „Összefoglalás és Megbeszélés” (~ négy oldal), „Új eredmények összefoglalása” (két oldal), „A dolgozat alapját adó publikációk felsorolása” és „A témában megjelent további közlemények”. Végül pedig a „Tudománymetriai adatok” és „Köszönetnyilvánítás” fejezeteket találjuk az értekezésben. Az értekezéshez 336 hivatkozást tartalmazó „Irodalomjegyzék” fejezet kapcsolódik.

Dr. Balogh Péter hosszú éveken keresztül, tiszteletet parancsoló következetességgel vizsgálta az egér limfoid szervek szerkezetét és ontogenezisét, és tett szert egyre elmélyültebb tudásra ezen a szakterületen. Az MTA Doktori Értekezés meggyőző bizonyítékokat szolgáltat arra vonatkozóan, hogy a patkányban termelt, egér limfoid szöveti komponensekkel reagáló monoklonális ellenanyagpanel létrehozásától és karakterizálásától, az elsősorban konfokális mikroszkópos és áramlási citometriás vizsgálatokkal kezdve, mind több és több funkcionális vizsgálatot végzett, és nagyszámú transzgenikus egértörzset vizsgálva fókuszált mind komplexebb kísérleti rendszerekben a limfoid szerveződés molekuláris szereplőinek a funkciójára nem csak egérben, hanem humán rendszerben is.

Munkája elvezetett új limfoid struktúrák felfedezéséig egérben, és dr. Balogh Pétert mára a limfoid szerkezet és ontogeneziskutatás, valamint az Nkx2-3 transzkripciós faktor kutatás nemzetközileg elismert szaktekintélyévé tette, akinek úttörő munkája előtt a bíráló is elismeréssel adózik.

A disszertáció rendkívül igényes munka, elütést alig tartalmaz, magyarosságával és nyelvhelyességével kapcsolatban szinte egyáltalán nem vetődhet fel kifogás. A disszertáció nagyszámú immunfluoreszcens ábrája jó minőségű, feliratokkal megfelelően ellátott.

Külön kiemelendőnek tartom, hogy az értekezés alapjául szolgáló publikációk közül dr. Balogh Péter 16 közleményben szerepel első vagy utolsó szerzőként, tehát egyéni szerepe a fenti munkákban nem is lehet kétséges.

Dr. Balogh Péter teljesíti az MTA doktora fokozatszerzéshez szükséges tudománymetriai követelményeket. Összes impakt faktora 92,51, összes hivatkozások száma 770, független hivatkozások száma 567.

H indexe 15

Néhány kritikai megjegyzés az értekezéssel kapcsolatban

1. Ami a disszertáció arányait illeti, a mintegy 180 oldalas értekezés esetében az alig több, mint két oldalas összefoglaló az alkalmazott fontosabb módszerekről igen rövidnek tűnik, bár kétségkívül bravúros rövid összefoglalása az alkalmazott módszereknek. A szokatlan tömörség miatt azonban például nem áll rendelkezésünkre információ arról, hogy a nagyszámú alkalmazott transzgenikus egértörzs honnan származott, mint ahogyan arra sem kapunk választ, hogy pl. a Tg egerek esetében F2 generációból, azonos alomból származó ko és wt egereket használtak-e a vizsgálatokhoz. Hasonlóképpen nem derül ki, hogy pl. a LtβR-Ig fúziós fehérjét maguk állították-e elő. Nem kerül említésre, hogy milyen statisztikai elemzéseket végeztek.

Az Eredmények (124 oldal) és a Megbeszélés fejezet (4 oldal) aránya valamelyest szintén szokatlannak tűnik. Az értekezés Eredmények fejezetében kétségkívül számos módszertanra vonatkozó adat is olvasható, sőt ez a fejezet bizonyos fokig diszkutálja is az egyes eredményeket, és így valamelyest kárpótolja az olvasót az összefüggő módszertani fejezet és a megbeszélés fejezet viszonylagos szűkszavúságáért, de ezzel együtt a fejezetek arányai némileg szokatlanok. Tekintettel arra, hogy az eredményeket taglaló fejezet rendkívül sok adatot és részletet tartalmaz, talán érdemes lett volna valamelyest önkorlátozó módon csak a legfontosabbnak ítélt eredményeket kiemelni.

2. A táblázatoknak csak sorszáma van, de címük nincs.
3. Az ábrák egy része estén nem került feltüntetésre a vizsgált állatok száma (pl. 6.1 ábra, 6.2 ábra, 6.3, 6.4 ábrák).
4. A 6.10 ábrán úgy kerül feltüntetésre az Nkx2-3-/- egérből származó metszet, hogy a szövegben még egyáltalán nem esik szó az Nkx2-3-ról. Az értekezés további részében természetesen bőven esik szó erről a genetikailag módosított egértörzsről.
5. A 6.22 ábrán az Y tengely jelöléséhez szerencsésebb lett volna a biotin mellett/helyett a Streptavidin PE-t mint fluoreszcens jelölést is feltüntetni
6. 103. oldal: „GFP-jelölt limfociták” helyett talán helyesebb lett volna a GFP-pozitív limfociták kifejezés, hiszen itt nem jelölt, hanem GFP-t expresszáló Tg egér sejteiről van szó
7. A 108. oldalon „szuszeptibilitási hely” szerepel, a szuszeptibilitási lókuszt vagy allél kifejezés használata ebben az esetben pontosabb lett volna
8. Néhány ábra esetében angol felirat szerepel (pl. a 110. oldalon a 6.44 és 6.45 ábrák esetében)
9. 122. oldalon olvasható CD45+C3CD19CD90+RORγt+ fenotípus helyesen CD45+CD3CD19CD90+RORγt+

Kérdéseim a következők:

1. A szövetfragmentumokkal történő immunizálás során vélhetőleg óhatatlanul nekrotikus sejtmarmadványok is beoltásra kerültek. A szövet-fragmentumokkal immunizált patkányokban milyen volt a sejtfelszíni és az intracelluláris antigénnel reagáló klónok aránya? Tesztelték-e a klónokat nem limfoid szöveteken is?

2. Vannak-e az irodalomban „single cell” adatok a lép stroma heterogenitására vonatkozóan?
3. Jólismert tény, hogy a B sejt epitópok azonosítása mennyire nehéz. Az is nyilvánvaló, hogy a patkány monoklonális antitestek előállítására sok évvel ezelőtt történt. A monoklonális antitest panel létrehozása óta eltelt időszakban ismertté vált-e olyan új módszer, amelyet - amennyiben ez lenne a cél – hatékonyan lehetne alkalmazni a létrehozott nagyszámú monoklonális antitest antigénjének és epitópjának azonosítására?
4. Használják-e más kutatócsoportok az előállított monoklonális antitesteket?
5. Végeztek-e funkcionális vizsgálatokat a saját monoklonális antitestekkel (pl. *in vivo* blokkolás)?
6. A follikuláris dendritikus sejtek iccosomáit az 59. oldalon mint komplement-fragmentumokkal fedett komplexeket (iccosoma) említi a Jelölt. A szakirodalom immunkomplexekkel fedett testecskékként is említi az iccosomákat. Van-e az iccosomáknak membrán komponense? Lehetséges-e, hogy az iccosomák az FDC felszínéhez tapadt extracelluláris vezikulák, melyeket immunkomplexek és komplement molekulák borítanak?
7. Létezik-e MARCO hiányos egér, ha igen, mi volt az oka, hogy nem vizsgálták? Milyen fenotípussal rendelkezik a MARCO KO egér?
8. A 62. oldalon szerepel, hogy a lép nyiroktüszőkben a MARCO az DFDC felületén fibrilláris kötegekbe rendezett granulált képleteket alkot. Mik ezek a granuláris képletek? A kérdésem az, hogy lehetséges-e, hogy a MARCO extracelluláris vezikula felszínén van jelen, mely az FDC membránjához tapad?
9. Ismert-e lényeges különbség az egyes vad típusú beltenyésztett egértörzsek limfoid szerveinek vaszkuláris és stromális szerveződésében?
10. Evolúciósan mikor jelennek meg a Pbx1, Nkx2-3/Bapx1, a Tlx1/HOX11 és a Nkx2-5 transzkripciós faktorok?
11. A PNAd addresszinek vázfehérjéje esetében poszttranszlációs módosításokat végző enzimek (pl. szulfotranszferázok és fukoziltranszferációk) génexpresszió szabályozásával kapcsolatban kérdezem, hogy a fenti enzimek génjei milyen transzkripciós faktor kötőhelyeket hordoznak? Van-e pl. Nkx2-3 kötőhely a szulfotranszferáz génekben? A fenti PNAd adresszin vázfehérjék mellett milyen más szubsztrátokat módosíthatnak egyidejűleg?
12. Milyen pozitív regulátorai vannak a GlyCAM-1 gén expressziójának?
13. A Nkx2-3 ko egér lépében csökkent E. Coli megtapadás figyelhető meg. Mennyire általános ez? Vizsgált-e más baktériumot?
14. Mi a gyakorisága és biológiai jelentősége/szerepe a vörös pulpában a megakaryocytáknak?
15. Van-e oka, hogy a vizsgálatok során jellemzően nem végeztek 3D rekonstrukciót. Milyen esetben adhatot volna többletinformációt?
16. Hogyan látja az *in situ* intratumorális HEV indukción alapuló tumor terápiás megközelítést?
17. Milyen mechanizmust feltételez az Nkx2-3 hiányában megfigyelt DSS-szel szembeni protektív hatás mechanizmusára a tunica muscularis mucosae-ban elhelyezkedő VAP-1 pozitív nem haematopoietikus sejtek révén?
18. Jelen vannak-e FLAg képletek más savós hártóval határolt üregekben is (pl. pericardium)?
19. Mi lehet a FLAg képletek fiziológias szerepe?

20. Intraperitoneális immunizálást (Ag+adjuváns) követően megfigyelhető-e változás a FLaG-ekben?
21. A 140. oldalon a 6.69 A (hasfalon keresztüli) és B (a hasüreg felnyitása utáni) fluorescens jel eloszlás igen eltérő. Mi lehet ennek az oka?
22. A 142. 6.71 ábra címe: „Szerozális limfoid organoidok megjelenési formái”. Mi alapján definiálja organoidként a FALC, protrusion és FLaG képleteket? Ismer-e más *in vivo* organoid megjelenési formát?

Dr. Balogh Péter MTA doktori értekezésében összefoglalt legfontosabb saját tudományos eredmények közül az alábbiakat emelem ki:

1. Számos fontos megfigyelést tett az egér lép endothel és stroma összetételével kapcsolatban
2. Jellemezte az egér lép FDC posztnatális fenotípus-változását és az azzal összefüggő IC kötő képesség változását
3. Kimutatta, hogy a MARCO scavenger receptor a lép marginális zóna (MZ) és a limfoid folliculusok között az FDC-asszociált kondukt hálózatba kerül érett MZ makrofágok és FDC-indukcióra képes CXCR5+ folliculáris B sejtek közreműködésével
4. Igazolta az egyes lép régiók érpálya-fejlődésében a limfotoxin β receptor (LT β R) szignalizáció és az Nkx2-3 szerepét
5. Igazolta, hogy az Nkx2-3 hiányában a lép érpálya szerkezetében a nyirokcsomóra jellemző mintázatváltozás következik be HEV-ek és nyiroktasakok megjelenésével. Hasonló PNAd indukciót írt le a Peyer-plakkok HEV endothel sejtjein is Nkx2-3 hiányában. Mindemellett igazolta, hogy a bél indukált nyirokszövet fejlődése is károsodik a fenti transzkripciós faktor hiányában.
6. Igazolta az Nkx2-3 deficiens egerekben a *Madcam1* $-/-$ transzkripcionális hiányát, mely eltérően befolyásolta a különböző bélszakaszok ILC3 sejt összetételét
7. Egy spontán B sejtjes egér limfóma vizsgálatával elsőként figyelte meg a foliate lymphoid aggregate-nak (FLaG)-nek nevezett struktúrákat, melyekhez való limfocita kapcsolódásban (a limfóma és normál B sejtek esetén is) a LYVE-1 pozitív makrofágok illetőleg L szelektin-függő PNAd erek játszanak szerepet.

Mindezek alapján dr. Balogh Péter értekezésben foglalt munkája alapján számára az MTA doktora fokozat odaítélését a legmesszebbmenően támogatom.

Budapest, 2021. január 7.

Dr. Buzás Edit
az MTA levelező tagja