

Bírálat

Sótonyi Péter "A hypothalamicus szabályozás egyes funkcióinak vizsgálata" című
MTA doktori pályázatáról

Sótonyi Péter MTA doktori disszertációját értekezés formában nyújtotta be. A mű 117 oldalas, a formai követelményeknek eleget tesz. Az értekezés témakörében megjelent közlemények listája 9 eredeti és 1 összefoglaló cikket tartalmaz. A cikkek közül a jelölt kettőben szerepel utolsó szerzőként, ezek azonban nem hypothalamikus témájúak, hanem a thalamus-látókéreg kapcsolattal foglalkoznak, ezzel összhangban tartalmuk az értekezés eredményleíró részében nem is kerül bemutatásra, csupán a 79. oldalon a megbeszélés fejezetében történik rájuk hivatkozás. Ezért a két közlemény szerepeltetése az értekezés témakörében megjelent közlemények között nem indokolt, azokat a tudományos munkásságot meghatározó egyéb közlemények között kellett volna megadni. Ennek alapján az értekezésben tárgyalt eredmények 8 közleményen alapulnak, melyek összesített impakt faktora 44,15. Ezek közül a jelölt 2, a benyújtás időpontjában megjelenés alatt álló közleményben első szerzőként, további 6-ban pedig társzerzőként szerepel.

Az értekezés különböző hypothalamikus struktúrák ill. funkciók vizsgálatával foglalkozik, ideértve a n. suprachiasmaticus szexuális dimorfizmusának és neurokémiai jellemzésének egyes kérdéseit; a táplálékfelvétel szabályozás orexin/hypocretin, ill. ghrelin mediált mechanizmusait; a n. arcuatus POMC idegsejtjeinek működését a szexuális funkciók ill. a metabolizmus szabályozása során; továbbá az NTPDáz-3 hypothalamikus szerveződésének és expressziójának ösztrogén-mediált változásait. Az értekezésben tárgyalt munkák közötti kapcsolat leginkább arra szorítkozik, hogy mindegyik munka hypothalamikus sejtcsoportokat vizsgál. A táplálkozás ill. a reprodukció hypothalamikus szabályozásának megértésére irányuló törekvések külön-külön is hatalmas kutatási területeket fednek le, ezért az értekezésnek előnyére vált volna egy markánsabb vezérfonal mentén haladó, koherensebb és fókuszáltabb megközelítés.

Az értekezést átfogó irodalmi áttekintés vezeti be, melyet a célkitűzések részletes ismertetése követ. A „Felhasznált anyagok és módszerek” c. fejezet részletesen ismerteti a patkányban, egérben ill. majomban végzett kezelések ill. a különböző fény és elektronmikroszkópos vizsgálatok metodikai részleteit, azonban más vizsgálati megközelítések (elektrofiziológia, RT-PCR) módszertani leírása teljes egészében hiányzik, a Western blot-té pedig hiányos. Az eredmények bemutatása a célkitűzéseknek megfelelő tagolásban történt, az eredmények több

helyen (ld. pl. a 74. oldal) inkább a megbeszélésbe tartozó részeket is tartalmazznak. Hasznos lett volna ez egyes eredmény alfejezetek elején jelezni, hogy az adott rész mely saját közlemények adatain alapul.

Kérdéseim és megjegyzéseim az alábbiak:

1. A 13. oldalon szerepel, hogy "Szinte alig van információnk arról, hogy a GnRH expresszáló sejteknek mely egyéb agyterületekkel van kapcsolata, ha egyáltalán létezik ilyen". Ezzel ellentétben közlésre kerültek adatok e kapcsolatot illetően, pl. megállapítást nyert, hogy mintegy 800 GnRH neuron közel 50 ezer idegsejttel kommunikál 53, eltérő funkciójú agyterületen (ld. pl. Boehm et al. Cell 2005 ;123(4):683-95). Ez nem vonja kétségbe a GnRH-POMC kapcsolat vizsgálatának értelmét, de felhívja a figyelmet a kérdésfelvetések megfelelő irodalmi kontextusba történő helyezésének szükségességére.

2. A 20. oldalon a célkitűzésekben ez szerepel: "... az NTPDáz-3 ... rágcsgáló agyban kizárólag a hypothalamus n. laterális és n. arcuatus területén található idegsejtekben termelődik." A 17 . oldalon azonban ez olvasható: " Az NTPDáz-3 immunreaktivitást kizárólag idegsejtek mutatnak és a legtöbb immunreaktivitás axonra emlékeztető képletekben volt, elsősorban a hypothalamus, a thalamus és a középagy struktúrák területén. Immunreaktív sejttesteket kizárólag a hypothalamus n. lateralis és n. arcuatus területén lokalizáltak."

Ennek alapján tehát nem hypothalamus-specifikus expresszióról van szó, hanem arról, hogy az NTPDáz-3 intracelluláris megoszlása, az egyes kompartmentumokban található NTPDáz-3 mennyiség eltérő. *Ismertek-e adatok arról, hogy az NTPDáz-3 eltérő szerepet játszhat a sejttestben ill. az axonban?* Ez megerősítené a célkitűzés háttérében álló feltételezést, miszerint az NTPDáz-3 speciális szerepet tölthet be az említett hypothalamikus területeken.

A 17. oldalon hivatkozott, az NTPDáz-3 immunreaktivitás megoszlását több agyterületen leíró festések kolchicin felhasználásával vagy anélkül készültek? Nem kizárt ugyanis, hogy kolchicin kezelés hatására más agyterületeken is kimutatható lenne az NTPDáz-3 a sejttestben, illetve *in situ* hibridizáció alkalmazása lenne alkalmas annak eldöntésére, hogy pontosan hol található az enzimet termelő sejttestek.

3. A 21. oldalon olvasható, hogy a jelölt által a hypocretin/orexin kísérletekhez felhasznált majmok egy másik, a jelölt kísérleteitől „független vizsgálat során petefészek-eltávolításon estek

át”. Kérdésem, hogy az állatok kaptak-e ösztrogén-kiegészítést az éheztetéses kísérletek előtt? (Erre nem találtam utalást sem az értekezésben, sem a cikkben). Amennyiben nem volt kiegészítés, akkor véleménye szerint ez nem befolyásolhatta-e az orexin sejtek éheztetés után észlelt aktivációját? Ismert ugyanis, hogy az ösztrogén befolyásolja a táplálékfelvételt és azt is leírták, hogy az ösztrogén erőteljesen növeli a serkentő bemenetek számát a n. arcuatus POMC sejteiben (ld. Gao és mtsai Nat Med. 2007 13(1):89-94), ill. az értekezés 2. közleménye is rámutat, hogy az ösztrogén parvalbumin expressziót indukál POMC neuronokban.

4. Ami a ghrelin mRNS kimutatását illeti, (48. old), a bemutatott gél nem tartalmaz negatív kontrollt. Az RT-PCR leírása egyáltalán nem szerepel a módszerek leírásánál, így az sincs megadva, hogy intron-áthidaló oligonukleotidákat használtak-e, bár az ampikon mérete és a ghrelin mRNS mérete miatt ezt valószínűsíti. Hogyan értékeli, hogy ghrelin mRNS-t in situ hibridizációval eddig még nem sikerült kimutatni az agyban?

5. A 60. oldalon olvasható, hogy „... A POMC jelölt sejttestek közvetlen kapcsolatban voltak GnRH-immunjelölt boutonokkal. Az 5 állatban megvizsgált 100 bouton közül 25 POMC immunreaktív sejttest és/vagy proximális dendrit alakított ki közvetlen kapcsolatot GnRH-pozitív axonnal.”

Ezzel szemben az e rész alapjául szolgáló (111. old 1.) cikkben ez olvasható: „Of the 100 POMC neurons detected in 5 animals, 25 POMC immunoreactive cell bodies and/or proximal dendrites were found to be contacted by GnRH-labeled axons.”

Melyik állítás helyes? 100 GnRH bouton megvizsgálása esetén lehetett találni 25 POMC pozitív sejtet, mely kapcsolatban volt az axonokkal, vagy 100 POMC sejt közül 25 esetén volt közvetlen kapcsolat GnRH axonnal? Tekintettel a GnRH sejtek viszonylag alacsony számára, a két állítás jelentős különbséget takarhat: előbbi esetben csekély, utóbbiban viszont jelentősnek tekinthető a kapcsolatok százalékos előfordulása.

Megállapították továbbá, hogy a GnRH és a POMC neuronok között nem volt kimutatható szinapszis. Az elektronmikroszkópos vizsgálat hány sejt felhasználásával történt?

6. Az NTPDáz-3 fehérje Western blot-tal történő kimutatásáról a 86. oldalon olvasható, hogy "a 85 kDa sáv az enzim teljesen glikolizált formáját tükrözi, míg a 160-170 kDa és a 60 kDa sávok az enzim dimer formájára utalnak, ill. a központi ('core') proteint detektálják." Megjegyzendő, hogy nem történt irodalmi hivatkozás az enzim glikolizációját ill. dimerizációját leíró közleményekre. Fontos kiemelni, hogy a blotokon mintánként mintegy 8 különböző - a mediális és laterális

hypothalamus minták esetén részben eltérő méretű - csík látható. A 60 kDa-os csík önmagában is doublet, alatta 55 kDa körül egy nagyon markáns csík látható (a mediális mintában ez alatt is van meg egy), és mindkét mintában egy további erős 37 kDa-os csík van jelen. *Mik lehetnek ezek a csíkok?* Mivel a natív NTPDáz-3 számított molekula súlya 59 kDa, ezek a kisebb csíkok aggályokat ébresztenek a szérum specificitását illetően. Ez elsősorban nem is a Western blot, hanem a festések esetén jelenthet problémát. Fontos lenne, amennyiben elérhető válik, az NTPDáz-3 knock-out állatot felhasználni a validáláshoz.

7. Célszerű lett volna az ösztrogén kezelés NTPDáz-3-ra gyakorolt hatását nemcsak grafikonon, hanem blot formájában is bemutatni, legalább a fontosabb időpontokat illetően (0, 4, 26 h a laterális, továbbá 0, 10, 26 h a mediális hypothalamus esetén). *Milyen mechanizmusok lehetnek felelősek az ösztrogénnek az NTPDáz-3-ra gyakorolt hatásáért? Pl. az NTPDáz-3 ko-expresszáldik-e az ösztrogén receptorral, ill. az NTPDáz-3 génjének 5' határoló régiójában található-e ERE? Vannak adatok arra vonatkozóan, hogy az NTPDáz-3 aktivitása megnő ösztrogén kezelés hatására?*

Formai észrevételek:

1. Számos helyen a Western blot eredmények tárgyalásánál a „band” nem csíkként, hanem sávként kerül említésre
2. 13. old. "GnRH expresszáló sejtek" : GnRH-t expresszáló helyett
3. 24. old.: „tisztított chemilumineszcens röntgenfilm”. A „tisztított” itt nem értelmezhető
4. 34. old. 3. bekezdés: elírás "asztorcytáiban"
5. 66. old.: hiányos cím: nucleusból helyett n. arcuatusban
6. A 4.6.5. ábra képaláírásában hiányzik a statisztika jelmagyarázata.

Az értekezésben bemutatott, rágszálókban és majomban nyert adatok fontos hozzájárulást jelentenek a táplálkozás ill. a reprodukció hypothalamikus szabályozásának jobb megértéséhez. A nyilvános vita kitűzését javaslom.

2011. május 18.

Dr. Gereben Balázs
tudományos tanácsadó