

Opponensi vélemény

Dr. Krizbai István: „A vér-agy gát fiziológias és patológiás körülmények közötti működésének vizsgálata” című doktori értekezéséről

Dr Krizbai István dolgozata elméleti és klinikai szempontból is fontos, időszerű kérdéseket vizsgál. Eredményei sok-oldalú megközelítésekkel nyert, értékes adatokkal gazdagítják a vér-agy gátról rendelkezésre álló – jelenleg ugyancsak hiányos – ismereteket. A dolgozatban 126 oldalon összefoglalt és megvitatott eredményeket 23 közleményben publikálta, amelyek összesített impakt-pontja 79,592. Állításait több mint 450 irodalmi hivatkozással támasztja alá.

Krizbai István eddigi munkássága során a vér-agy gátat alkotó sejtek sejtbiológiai, molekuláris biológiai sajátosságait és a vér-agy gát működését igen sok oldalról vizsgálta. A dolgozat tematikus tagolása jól tükrözi ezt a sokoldalúságot és segít az olvasónak eligazodni a szerte-ággó kérdések között. Sajnálatos, hogy sok felvetett kérdés megválaszolatlan marad, vizsgálatát a Szerző egy-egy közlemény elkészítésével befejezi. A régebben lezárt munkák esetén – bár az eredmények ma is érdeklődésre tarthatnak számot – a gyorsan fejlődő kísérleti módszertár ma már más megközelítéseket (pl. valós-idejű PCR adatokat vagy óvatosabb farmakológiai kezeléseket) igényelne. Ezen a ponton azt is meg kell említeni, hogy ennyire elágazó kísérleti megközelítések ismertetésekor szerencsésebb lett volna, ha a szerző nem követi a szakcikkeknek megszokott tagolást, miszerint az „eredmények” és azok „megbeszélése” külön fejezetbe kerül. A dolgozatban az eredmények tényszerű tömör bemutatását sok 10 oldallal hátrább követi azok bármiféle értékelése – így az olvasó oda-vissza lapoz. Az egymástól nagyon is eltérő gondolatokon és módszereken alapuló részfejezeteket érdemes lett volna az összefoglaló cikkekben szokásos azonnali értelmezéssel lezárni. Annyit azonban a Szerző biztosan elér ezzel a szerkesztési móddal, hogy az olvasó szinte minden bekezdést többször olvas.

A dolgozat jól érthető és dicséretesen magyar nyelven íródott. Kevés elírás akad benne, de azok (pl. a *dimenzionális elektroforézis*, vagy *mellett 1 t*-vel,) helyenként megmosolyogtatják az olvasót. A bemutatott ábra-anyag logikusan csatlakozik a gondolatokhoz, a minőség azonban nem minden esetben szolgálja a megértést. A terjedelem kötöttsége magyarázhatja, hogy egyes ábrák nagyon kis méretben kerülnek bemutatásra, de a fontos immunitokémiai „igazoló” ábrák megfelelő mérete elengedhetetlen lett volna az információ megfelelő közlésére.

Ugyancsak nehezíti az olvasó/bírálo feladatát, hogy az Eredmények fejezetben a szerző olyannyira tényszerű adat-leírásra szorítkozik, hogy az adatok mellett általában nem szerepel hivatkozás sem saját sem más kutatók eredményeire. Így a bíráló, miután nem támaszkodhat külső szakbírálók avatott véleményére, kénytelen minden adatot mérlegre tenni, és amennyiben a módszer-leírások nem segítenek, bizony sok kérdést a bírálatban feltenni.

A dolgozat egészére vonatkozó szakmai megjegyzés, hogy – bár a Szerző egyértelműen leírja, hogy a vér-agy gát az azt alkotó endotél, asztrocita, pericita sejtek együttese, és sajátosságai nem azonosak az egyedi sejtalkotókéval – nagyon sok helyen az agyi endotél sejteken nyert eredményeket vér-agy gát jellemzőként interpretálja. Bár a dolgozat egészéből nyilvánvaló, hogy Krizbai István nem tesz egyenlőség-jelet egy endotél sejtréteg és a vér-agy gát között, a dolgozatban is érdemes lett volna elkerülni az ilyen megtévesztő megfogalmazásokat.

A továbbiakban, a dolgozat tagolásának megfelelő sorrendben, de az adott témával kapcsolatban a Módszerek, Bevezetés, Eredmények és Megbeszélés fejezetekben szereplő gondolatok összevonásával szeretném a kérdéseket feltenni.

1. Funkcionális fehérjék expressziójának sajátosságai a vér-agy gát sejtjeiben

Occludin-expressziót kimutattak többféle epítél-eredetű sejtben, így neuronokban és asztrocitákban is.

- i) hogyan igazolható, hogy az occludin-expresszáló „neuronok” és asztrociták preparátuma nem tartalmazott más, pl endotél vagy meningeális sejteket? A tenyésztés leírása erre nem nyújt igazi felvilágosítást; a „háttérként” megadott Bauer, Tontsch cikkben sokféle aljzatot és médiumot is kipróbáltak, és nem világos, hogy ezek közül melyik módszerrel tenyésztett sejteken nyerték a bemutatott adatokat. A neuronok és asztrociták jellemzéséről és fenntartásáról alig kapunk eligazítást. Hogyan érték el a „differenciált asztrogliát” állapotot, és hogyan tudtak „segítő sejtektől” mentes, tiszta neuron-készítményt előállítani a Western blot vizsgálatokhoz? Vajon mennyi volt ezekben a tenyészetekben az éretlen asztrogliaprogenitor sejt (amelyek sajátosságai nem azonosak az „érett” gliával, és általában uralják az in vitro osztódó asztrogliatenyészeteket)? Az ugyancsak epítél-kínézetű (!) sejtek occludin festődése, ami a kicsi és sötét 5. ábrán kizárólag felszíni membrán-festődésnek látszik, csak GFAP festéssel együtt bizonyítaná az asztrociták és/vagy asztrocitaprogenitor sejtek occludin-tartalmát.
- ii) Az I és II típusú endotél sejtek közötti különbség, a megfigyelt morfológiai és funkcionális eltérések nem adódhatnak egyszerűen a sejt-sűrűség eltéréseiből? A sejt-mozgás számára rendelkezésre álló tér minden tenyészetben megszabja a sejt-motilitást, ami viszont az ezt segítő molekuláris rendszerek (pl. ECM bontás és produkció) aktiválódásával jár. Az igen kicsi és nem túl jó minőségű (7.) ábrán jelentős különbség az I és II típusú sejtek között nem látszik, de a sejt-sűrűség-eltérés feltételezhető. A fagokinetikus nyomvonal eltéréseit is csak a szövegből lehet nyomon követni, és a nyomvonal statisztikus elemzése teljes egészében hiányzik. Az ECGF-okozta fehérje-termelés változások kapcsán is felvetődik a kérdés: közvetlen sejt-stabilizáló hatásról van szó, vagy a növekedési faktor hatására megnőtt sejt-sűrűség okozza a motilitásban és ehhez kapcsolódó mechanizmusokban látott változásokat?

2. A szignáltranszdukció sajátosságainak vizsgálata agyi endotélsejtekben – a fejezet címe nem fedi az alatta következő szerteágazó tartalmat.

- i) Az ionotróp glutamát-receptorok mRNS-szintű expressziójának igazolása agyi endotél sejtekben a szerző fontos eredménye, amelyet munkatársaival még 1999-ben közölt. (A dolgozatban bemutatott ábrán azonban nem látszik az endotélsejtek NR1, NR2A-C és mGluR expressziója!). Ma ugyanezen eredmények megerősítésére már valós-idejű PCR bizonyítékokra lenne szükség.
 - Kimutathatók-e az NMDA és AMPA receptor alegységek fehérje szinten is?
 - A funkcionális vizsgálatokat, amelyek közvetetten igazolhatják ezen receptorok funkcionális jelenlétét olyan magas glutaminsav-terhelés (2mM) mellett vizsgálták, amely messze meghaladja nemcsak az élettanilag releváns, de a farmakológiai kísérletekben alkalmazott dózisokat is. Van hasonló válasz ennél alacsonyabb Glu-terhelésre is?
- ii) Szerotonin transzport molekuláris hátterének és kinetikájának vizsgálatai ugyancsak értékes szakmai része a dolgozatnak. A külföldi laboratóriumban elért, 2000-ben közölt eredmények alapján ezt a munkát érdemes lett volna folytatni. Mára már élesebben vetődik fel a kérdés: vajon az RBE4 patkány agyi endotél vonalon kapott eredmények kiterjeszthetők-e az agyi

endotél sejtekre, és ha igen, vajon minden agyi régió endotél sejtjeire? Vajon sikerült-e azóta tisztázni a nem-specifikus szerotonin transzport szerepét és jelentőségét?

- iii) A Ca^{2+} -hiány esetén fellépő endotél-morfológia változásait és a Rho-kináz ebben játszott szerepét értékelhető, szép immuncitokémiai és AMF képekkel mutatja be. A Ca-hiányos sejtek alakváltozása nem váratlan (bár tudományos igazolásához az AFM mérések statisztikai elemzésére is szükség lett volna). A jelenséget kísérő sejtfelszíni zonulin-1 és claudin-5 átrendeződés fontos eredmény. A dolgozatban bemutatott módszer- és kísérlettár ismeretében azonban felvetődik a kérdés:

- miért nem vizsgálták a ZO-1 és Claudin-5 intracelluláris „sorsát” az átrendeződések során? Ezek fehérjék a membránból való „kivonódás” során lebomlanak vagy intracellulárisan megőrződnek és a visszarendeződés során újra beépülnek, esetleg fontos közvetítői gyors magi reakcióknak?
- vajon a Rho-kináz szerepének vizsgálatai során miért nem mérték a transzendoteliális elektromos rezisztenciát?

- iv) A ZO-2 szerepe a jeltovábbításban

A magi scaffold-attachement factor (SAF-B) és ZO-2 kölcsönhatása izgalmas eredmény, amit 2003-ban, német kollégákkal közösen értek el. A sejtfelszínről „kiszabaduló” vagy oda beépülni nem tudó junkcionális fehérjék szerepe a génaktivációs folyamatokban egy ma is komolyan kutatott kérdés. A magi ZO-2-t expresszáló sejtekben a bemutatott képek alapján is egyértelmű a Claudin-1 változás. (Ugyanezt az occludin esetén inkább csak a szövegből olvashatjuk; az ábrák az olvasó számára nem „beszédesekek”). Ennek a kérdéskörnek a vizsgálata, számomra, a dolgozat legérdekesebb része. Kérdezném, mit lehet 2013-ban tudni a ZO-2 magi, esetleges gén-aktivációs hatásairól.

3. Az agyi endotélsejtek patológiás körülmények között: extracelluláris stresszfaktorok hatása.

Az endotél-epitél sejtek sajátosságainak vizsgálatai után a dolgozat az endotél sejtekre ható oxidatív stressz, hipovolémiás sokk és ozmotikus stressz sejt-szintű következményeit vizsgálja.

- i) Hipoxia hatásainak vizsgálataival kapcsolatban felvetődik a régi kérdés: milyen eltérések várhatók az anoxia és hipoxia sejtbiológiai következményei között? A vizsgálatok során a sejteket (sajnos nem mindenütt egyértelmű, hogy milyen sejteket) 16 órán át tartották O_2 -mentes gázkörnyezetben. Hogy ezzel anoxiás körülményeket, illetve milyen mértékű hipoxiát értek el, az a leírásból nem ítéhető meg; ehhez tudni kéne az előzetesen normoxiás folyadék és az oxigén-mentes légtér térfogatait. A hosszas O_2 -elvonás, nem meglepő módon, a sejt-kapcsolatok károsodásával jár, hiszen – az ismert élettani tétel szerint – elsőként a specializált sejtfunkciók károsodnak, a sejt integritását fenntartó folyamatok hosszabban ellenállnak. A bemutatott ERK-aktiváció azonban hozzájárulhat a jelenség megértéséhez.

Bár patofiziológiai, de akár laboratóriumi feltételek mellett is nehéz a hipoxiát és reoxigenációt elkülöníteni, a hosszas hipoxiának kitett sejtek fiziológiás állapotát érdemes lett volna alaposabban megvizsgálni.

- Mérték-e a vizsgált paramétereket közvetlenül a hipoxiás kezelés után?

Az LDH toxicitás teszt erre nem a megfelelő módszer: csak akkor jelez, amikor a pusztuló sejtekből már kiszabadulnak citoplazma-komponensek. Az előidézett „patológiás” sejtállapot meghatározására már csak azért is szükség lett volna, mert a hipoxiát reoxigenáció követte, amelyet a Szerző egyértelműen oxidatív stresszként, a bekövetkezett változásokat oxidatív stresszre adott sejtválaszként kezel. Ennek igazolására az előzetes hipoxia-okozta hatásokat mindenképpen figyelembe kellene venni.

- A 30. ábrán a bemutatott junkcionális fehérje csökkenés nehezen igazolható. Ebben az esetben legalább denzitometriás kiértékelés kellene a következtetés alátámasztására.

ii) Az *in vitro* O₂- és tápanyag-ellátottság vizsgálatait jól egészítik ki az *in vivo* vérzéses sokk kísérletek, amelyek a kismolekulájú anyagok szelektív átjutás-növekedésével tovább valószínűsítik, hogy elsőként a vér-agy gát paracelluláris ellenállása károsodik. A bemutatott 35. ábrával kapcsolatban azonban meg kell jegyezni, hogy azon jószerével csak a magyarázó nyilak láthatók. A permeabilitás meghatározás módszerével kapcsolatban kérdezném: a kis-molekulájú fluoreszcens jelző anyag és az EvansBlue-Albumin komplexum feltehetően eltérő mértékben kötődik „nem-specifikus” módon az érfalakhoz. Mennyiben befolyásolhatja ez a nem-specifikus lerakódás a permeabilitás fotometrikus meghatározását, ha az teljes szövet-homogenizátumból történik?

iii) A vér-agy gát gyulladásos folyamatokban : TLR2/6 szerepe

A dolgozatban bemutatott egyik legfontosabb eredmény-csoport a TLR6 jelenlétének és funkciójának igazolása agyi endotél sejteken, a TLR6 és TLR2 aktiváció hatására bekövetkező junkcionális fehérje változások leírása és a változást közvetítő reakció-utak elemzése.

- A 36. ábrán látható, hogy a HuCMEC/D3 endotél sejtvonal expresszál TLR4-t, míg a primér patkány endotél sejtek nem. Vajon a primér human endotélre is jellemző a TLR4?
- A 37. ábrán látható érdekes effektus, hogy metabolikus stressz (dimetil-naftokinon) hatására az összes vizsgált TLR (2,3,4,6) expresszió megnő D3 sejtekben. Miután ezt a jelenséget a Szerző nem diszkutálja, itt teszem fel a kérdést: hogyan vezethet a metabolikus stressz a TLR expresszió növekedésére?
- Ebben a szövegrészben is előfordul, hogy összemosódik az agyi endotél és vér-agy gát fogalom. Az írott szöveg szerint: „...a zymosan jelentősen megnöveli a vér-agy gát permeabilitását”; az ezt illusztráló 38. ábra felirata: „A zymosan hatása agyi endotél tenyészetek permeabilitására”
- A 39. ábra grafikonjáról a szignifikanciát jelző csillagok lemaradtak.
- A 40. és 41. ábra immuncitokémiai képeinek értékelésekor megint csak a szöveg segít: az ábrák minősége nem engedi meg következtetések levonását.

iv) A dohányfüst egyes összetevőinek hatása a vér-agy gátra fejezet fontos és hasznos vizsgálatokat mutat be. Agyi endotél sejtek tenészteteit kezelték 5 – 24 órán át 0,1 – 100 µM-os nikotin vagy 30 µM-os fenantrén oldatokkal. A választott koncentráció gyakran olyan magas, hogy azt cigarettázással ugyancsak nehezen lehetne elérni (30 µM-os fenantrén koncentráció eléréséhez pl. kb. 2 percenként kellene egy erős cigarettát elszívni); szerencsésebb lett volna fejezetnek a nikotin- vagy fenantrén-hatás vizsgálata címet adni.

- A nikotin- és/vagy policiklusos szénhidrogének hatására megváltozó fehérjékről nyert proteomikai eredményeket érdemes lett volna egy táblázatban bemutatni.

v) Az occludin lebontásának mechanizmusa

A vizsgálatok értékes eredménye az occludin „élet-idejének” elemzése, ubiquitinációval történő lebomlásának igazolása, és annak megmutatása, hogy az occludin fél-életideje jelentősen szabályozza az MDCK epitél sejt-réteg permeabilitását. Emellett megmutatták, hogy a claudin-1 lebomlás az occludin-étől alapvetően eltérő útvonalon történik.

- A claudin-1 expresszió legalábbis normál (humán) agyban rendkívül alacsony (Hewitt, *BMC Cancer* 2006, 6:186) Vajon endotél sejtekben a claudin-5 hasonló lebomlási sajátosságokat mutathat? A claudin-20-nál több isoformájának mindegyikére igaz lehet a lassú turnover és a lebontás útvonalai biztosan azonosak fajtól és sejtípustól függetlenül?
- Az occludinhoz kapcsolódó fehérjéket „előzetes élesztő kettős hibrid vizsgálatokkal” választották ki: ki végezte ezeket a vizsgálatokat - a módszer-leírások között nem szerepel
- 48. ábra: miért nem látható a nagy móltömegű occludin-ltch komplexum an anti-occludin immunprecipitáció és immunfestés után (1.sáv)? Mit jelent a HC és LC, minek a nehéz vagy könnyű láncáról van szó?

vi) Az oxidatív stressz által okozott cito- és genotoxikus hatások vizsgálata vér-agy gát sejtekben. Ezt a fejezetet jó lett volna összevonni az 5.3.1. „A hipoxia hatása a junkcionális komplexum működésére” című fejezettel. Igazi genotoxicitási mérés – a leírtak alapján – nem történt, az apoptotikus és nekrotikus sejt-arányok megadása pedig éppenséggel hiányzik az 5.3.1. fejezetből.

- A p53-expresszió növekedése hipoxia/reoxidáció hatására nem meglepő; de a „mikronukleosz” sejtekről jó lett volna legalább egy ábrát mutatni
- Az asztrociták nagy ellenálló képessége hipoxia/oxidatív stressz/éhezés hatásaival szemben szintén ismert. Az azonban nem világos, hogy milyen asztrocita tenyészeteken vizsgálták a hatást és hasonlították össze a sertés agyi endotél sejteken mért hatásokkal. Az Anyag és Módszer fejezet szerint asztrocita tenyészeteket csak egér és patkány agyból készítettek.

vii) Hiperozmotikus mannitol hatása az agyi endotél sejtekre

Az endotélsejtek morfológiai változása ozmótikus stresszre igen érdekes fejezet. Morfológiai és molekuláris biológiai módszerek ötvözésével igazolja, hogy a hiperozmotikus sejt-reakció nem a víz passzív újra-eloszlásáról szól.

Az AFM-mel vizsgált morfológiai változások leírásánál szerepel, hogy (pp.92: „.....a legnagyobb sejtmagasság 2 μm volt”. Itt a Szerző valószínűleg a sejt-szélekre gondolt; az EM képen (61.II a,b,) is látható, hogy a magot is tartalmazó régió, értelemszerűen ennél „magasabb”. Az élő sejteken AFM adatokkal való összevetésnek az a nehézsége, hogy az adatok egy adott „vonal” mentén, adott időpontban mért értékek, amelyek nem tükrözhetik az élő sejtben állandóan zajló mag/citoplazma-mozgás okozta változásokat. A „vonat” a műszer számára „rögzített” pozíciót jelent, az élő sejt vagy az állandóan helyet változtató sejtmag szempontjából azonban nem. A mérésből levont következtetés akkor lenne indokolt, ha statisztikusan igazolták volna, hogy mannitol-kezelés nélkül legalább 10 sejtben mért vonal-menti értékek változása kisebb, mint az ugyanennyi mannitol kezelt sejtben mért eltolódás. A leírásból nem derül ki, hogy hány sejtben mérték a magasság-változásokat és a Young-moduluszt (bár ez utóbbinál szórás-értékek szerepelnek).

Erős hiperozmotikus kezelés hatására a sejt szinte teljes „gépezete” - szabályozó vagy szabályozott minőségben - reagál. Az Axl gyors foszforilációja és hasadása fontos eredmény, és a továbbiakban sokat segíthet abban, hogy eligazodhassunk a válaszreakció-szövevényben.

Az azonban, hogy mi (vagy mik) indítja(k) el – molekuláris értelemben – a hiperozmotizist adott sejtválaszt, úgy tűnik még mindig nem világos. Mi erről a Szerző véleménye?

viii) Melanóma sejtek és agyi endotél sejtek kölcsönhatása.

A melanóma sejtek endotél rétegen való átvándorlásáról (74.ábra) és a hatásukra történő felszíni fehérje-változásokról (77.ábra) készült mikroszkópos képeket nehéz értékelni az ábrák mérete és a 77. ábra esetén a nagyítás mértéke miatt is. Az endotél réteg alá szilárd felületre becsúszó sejtek fény- vagy konfokális mikroszkópos elemzése helyett használhattak volna ún. transzmigrációs kamrákat, ahol az átvándorló sejtek egy nagy pórusú membrán másik oldalán jelennek meg. Ez egy transzsepiteliális elektromos ellenállás-mérésre berendezkedett laborban nem jelenthet komoly nehézséget. Van elvi oka, hogy nem ezt módszert választották?

Rendkívül fontos eredmény, hogy a melanóma sejtekkel való kontaktus hatására az endotél sejtek junkcionális fehérje-tartalma igen erősen csökken. Úgy tűnik, hogy ez a hatás a melanóma sejtek kondicionált médiumával nem váltható ki, és a melanóma sejtek felszínéhez asszociált proteolitikus aktivitásnak van szerepe a folyamatban. A dolgozat leadása óta eltelt időben sikerült közelebb jutni a proteáz-aktivitás természetéhez?

A feltett kérdések sokasága részben abból is adódik, hogy Krizbai István rendkívül sok-féle kérdésre, sok módszerrel kereste a választ, és az egymástól elkülönített fejezetek összefüggései a dolgozathoz nem domborodnak ki.

A fenti megjegyzések nem csökkentik az elért eredmények értékét. A dolgozatban bemutatott eredeti, tudományos eredmények közül legfontosabbként az alábbiakat emelném ki:

1. Több mint 10 évvel ezelőtt megmutatta, hogy az agyi endotél sejtek iontróp glutamát-receptorokkal, glutamát és szerotonin transzporterekkel rendelkeznek;
2. Munkatársaival igazolta, hogy ZO-2 junkcionális fehérje bejuthat a sejtmagba és kapcsolódik a magi SAF-B (scaffold-attachment factor) fehérjével; ezzel felvette a ZO-2 lehetséges szerepét gén-aktivációs folyamatokban
3. Igazolta a TLR6 receptor jelenlétét agyi endotél sejtekben, és bizonyította, hogy a TLR2/6 aktiválása a sejt felszíni junkcionális komplexumok változását idézi elő.
4. Bizonyította, hogy epitél sejtekben az occludin lebomlása ubiquitinációval történik, míg a claudin-1 lebomlás ettől eltérő útvonalon zajlik.
5. Megmutatta, hogy hiperozmotikus kezelés hatására az agyi endotél sejtekben megnő a tirozin-foszforiláció mértéke; ennek következtében központi kináz-enzimek (Axl, P130Cas, FAK-kináz), valamint a sejt kapcsolatok fenntartásában/sejt-proliferációban fontos szerepet játszó β -catenin is foszforilálódik.
6. Leírta, hogy melanóma sejtekkel való kontaktus hatására az endotél sejtek junkcionális fehérje-tartalma igen erősen csökken.

A fentiek alapján Dr. Krizbai István dolgozatát a nyilvános vitára alkalmasnak tartom, és sikeres védelem után, az MTA Doktora cím elnyerését megalapozó munkának ítélem.

Budapest, 2012.december 10.

Dr. Madarász Emília
bíró