

Opponensi vélemény Pongrácz Judit Erzsébet „**Szöveti fejlődést, regenerációt, öregedést és patológiás elváltozásokat szabályozó intra- és intercelluláris jelátviteli folyamatok vizsgálata egér és humán immunszöveti modellekben**” c. MTA doktori értekezéséről.

A doktori értekezésben leírt munkák egy újszerű megközelítéson alapulnak, melynek filozófiájával teljes mértékben egyetértek. Ez azt jelenti, hogy az immunválaszban kulcsszerepet játszó sejtek működését valóban nehezen fogjuk pontosan megérteni, ha azokat csak sejtvonalakon ill. mikrokörnyezetükből kiszakított izolált sejteken vizsgáljuk. Ezen „jelátviteli szemüveg” minden bizonnyal erősen torzít, így maximálisan egyet tudok érteni a dolgozat azon célkitűzéseivel, hogy az immunrendszer működését és az ezzel kapcsolatos jelenségeket (pl. öregedés) egy többsejtes vagy szöveti modell rendszer jelátviteli és génszabályozási hálózatainak megismerésén keresztül próbálja megközelíteni és feltárni. Tehát a dolgozat témaválasztását aktuálisnak, korszerűnek és jelentősnek tartom, melynek eredményei egyszerre több oldalát világíthatják meg pl. az elsődlegesen vizsgált tímusznak, amely a celluláris immunválaszt koordináló és végrehajtó T sejtek érésének helyszíne. Emellett az ilyen modellrendszereken nyert tanulságok egyéb szervek modelljeinek megalkotását is elősegíthetik. Mindezek nagy és jelentős lépések lehetnek az *in vivo* jelenségek pontosabb megismerése irányában. Jelölt ezirányú kutatásai a tudományterület egyik igen színvonalas és meghatározó angol laboratóriumában kezdődtek, majd Pécsen az Ő irányításával fejeződtek be, kijelölve egy új kutatási irányvonal és posztgraduális iskola útját.

A disszertáció 116 oldal terjedelmű, felépítése arányos. Formailag minden szempontból megfelel az előírt követelményeknek, egy-két apróbb elírástól (pl. 73. old.: „fumosin” fumonisin helyett) eltekintve. Ezt követi 8 oldalon át a tudományos munkásság adatainak ismertetése, majd 154 oldalon át a **14** kísérletes ill. **4** összefoglaló közlemény bekötve, melyek az értekezés alapjául szolgáltak. Ezen publikációk összesített impakt faktora **74.286**, és a jelölt 12-ben meghatározó (első vagy utolsó) szerző. Ezen kívül jelölt további 18 közlemény szerzője ill. társszerzője. Teljes életművének összesített impakt faktora **111.493**, munkáira eddig **994** független idézet érkezett, Hirsch indexe: **18**. Emellett több angol nyelvű tankönyv (**1**), tankönyvfejezet (**4**) és szakkönyvfejezet (**2**) is jelzi publikációs aktivitását. Mindezen jellemzők elérik, sőt jelentősen meghaladják az MTA doktori fokozattal szemben támasztott követelményeket.

Véleményem szerint az alábbiak tekinthetők jelentős, új, a tudományterületet meghatározó módon befolyásoló eredménynek:

- 1.) *Megállapították, hogy a protein kináz C fehérjecsald tagjainak célzott molekuláris modulálása nem célravezető út a terápiás eljárások során, mert az egyedi PKC molekulák közötti hasonlóság és redundancia ezt nem teszi lehetővé. Azt is megmutatták, hogy az egyedi PKC molekulák több, akár ellentétes „előjelű” jelátviteli pályában is részt vehetnek párhuzamosan.*

- 2.) Kimutatták, hogy a Notch és Wnt jelátviteli hálózatok és ezek párbeszéde meghatározó jelentőségű a tímusz sejtes mikrokörnyezetének kialakításában valamint a T sejtek érésének szabályozásában egyaránt.
- 3.) Kimutatták, hogy fejlődő timocitákban a TCR és MHC-függő szelekciós jelek, koreceptor és intracelluláris jelpályák együttesen határozzák meg a különböző T sejt klónok túlélési esélyeit. Ezen kérdés vizsgálata kapcsán új módszert dolgoztak ki a tímusz epitélium sejtfelszíni molekula-készletének módosítására, rekombináns retro- és adenovírusok alkalmazásával. Rámutattak a környezeti tényezők TCR-aviditást finomhangoló hatására is.
- 4.) Sikerült kimutatniuk, hogy a tímusz adipoid atrófiáját -korábbi nézetekkel ellentétben- nem az epitel sejtek apoptózisa és az azok helyére történő zsírsejt migráció okozza, hanem egy molekuláris szinten jól szabályozott tímusz epitélium de-differenciáció (epiteliális-mezenhimális tranzíció), mely zsírsejteké alakulásban nyilvánul meg. Ebben kritikus szerepet játszik a Wnt expresszió és jelátvitel, melynek felszabályozásával akár gátolhatók is a tímusz involúciót megindító molekuláris változások.

Bár a dolgozatban bemutatott eredmények rendre nívós nemzetközi folyóiratokban kerültek publikálásra, mint pl. J. Immunol, Eur. J. Immunol, PlosOne, Mech. Ageing Dev, Immunol Rev, Apoptosis, stb., természetesen néhány kritikai észrevétel ill. kérdés felmerült a bírálóban, főként kíváncsiságot kielégítendő. Ezek a következők:

- 1.) Lehet hogy csak a kinyomtatott ábra csalóka a szemnek, de a 15. és 19. Western blot ábrákon én nem látok olyan drasztikus különbségeket, melyek összhangban állnának a helyenként erre alapozott eléggé sarkos szövegbeli értelmezéssel (konklúzió), mint pl. az 54. oldalon: „az fMLP kezelés leginkább PKC α és PKC β II aktivációjához vezet, amely leginkább a TPA indukált izoenzim transzlokációs mintázathoz hasonlított”. Nem tudom történt-e itt a transzlokációt mutató, esetenként igen kicsiny mennyiségi változásokra nézve kvantitatív géldenzitometrálas?
- 2.) Hasonlóan, az 58. oldalon bemutatott 24. fluoreszcens mikroszkópos ábrán látható képek szerintem nincsenek teljesen összhangban azzal az erős kijelentéssel, hogy neutrofilekben „az apoptózis során a PKC δ a sejtmagban lokalizálódik”. Történt-e itt valamilyen kvantitatív statisztikai elemzés az intenzitáseloszlásra/kolokalizációra vonatkozóan? Célszerű lett volna ezen statisztikát és egy nagyobb nagyítású képet is bemutatni a fenti állítás alátámasztására. Megjegyzem ehhez kapcsolódóan, hogy az ezen eredményeket bemutató JBC cikk 205. oldalon található 6. ábráján helytelenül szerepel a „yellow pseudocolor” szakkifejezés. (A pseudocolor

kifejezést technikailag más célból használják, itt a sárga helyesen a „*composite color*” kifejezéssel lenne illethető)

- 3.) A 63. oldalon bemutatott 27. ábra címével nem tudok egyetérteni, ugyanis az ábra nem az aktin polimerizációt hanem a sejtkonjugátumok gyakoriságát mutatja be. Továbbá a citoszolikus Ca^{2+} koncentráció lokális növekedése sem az aktin polimerizációjával, hanem inkább annak lebomlásával hozható kapcsolatba. A kortikális aktin átrendeződéséhez (amelynek már csak a végeredménye látszik az A. ábrapanelen) ugyanis előbb „lebomlás” majd másutt „újrafelépülés” szükséges. Az alacsony kalcium szintű intracelluláris mikrodomének kedveznek az aktin polimerizációnak. Ez utóbbit kvantitatív adatokkal (pl. celluláris F-aktin szint mérések ill. korrelált kalcium és F-actin time-lapse movie) B és T limfocitákon egyaránt kimutatták (pl. Lin et al, 2008. Immunity 28: 75-87; Feske 2007. Nat Rev Immunol. 7: 690-702; Maus et al, 2013. J Leukocyte Biol. 93: ePub ahead). Tehát itt nem a bemutatott adatokat, csak az ábra címét és az adatok szöveges értelmezését kifogásolom.
- 4.) Egy újabb kijelentéssel találkozhatunk a 66. oldalon, mely a hivatkozott 31. ábrával koránt sincs meggyőzően alátámasztva. A kijelentés: „Noha számos molekula koncentráldott az epitélium-timocita kapcsolat pontjára, ez a folyamat mégis függetlennek bizonyult a „lipid raftok” avagy „lipid tutajok” jelenlététől. A 31. ábrán bemutatott tények, miszerint a GM1 expresszió alacsonyabb timocitákban mint érett perifériás T sejtekben, és egy TEC-Timocita sejtpár képe (ahol nem látható raft polarizáció) alapján nem mondhatjuk ki, hogy nem léteznek lipid raftok az adott sejteken. Annál is inkább nem, mivel az alacsonyabb GM1 tartalom ellenére több oldalról is alátámasztott szerepük van a lipid raftoknak pl. már a pre-TCR jelátvitelben és később is. Lehet hogy egyéb adatok is vannak szerző birtokában ezen állítás megerősítésére?
- 5.) A 32. ábra címe „CD80 expresszióra kényszerített tímusz epitélium megindítja a lipid raftok kialakulását és csökkenti a pozitív szelekciót” újabb kérdéseket vet fel. Az első: Mit ért szerző „a lipid raftok kialakulásának megindításán”? A második: Nem arról van-e itt szó, hogy egy mesterséges helyzet, a CD80 overexpressziója indít el egy raft-aggregációt, amely a CD80-al együtt koncentráldó MHC molekulákkal együtt egy negatív szelekciós küszöböt meghaladó erős szignált generál és az emiatt megnövekedett sejthalál miatt van a pozitív szelekcióban látszólagos csökkenés?
- 6.) A T sejt receptor közvetített apoptózisban leginkább a Bim proapoptotikus fehérje érintett közvetlenül. Az adott modellrendszerben célszerűnek látszott volna ennek a vizsgálata, de csak a Bad-re vonatkozó adatokat mutatnak be. Volt-e esetleg a Bim-re irányuló vizsgálat és ha igen, milyen eredménnyel zárult?

- 7.) Egy a témához csak részben kapcsolódó, de fontos kérdés. Jelenlegi ismereteink szerint az NKT sejtpopuláció tímuszbeli szelekciójában a fő „szelektáló sejtek” a CD4+CD8+ timociták maguk. Az $\alpha\beta$ T sejteknél a szelekciós folyamatok során a TEC-től kapott Notch szignálok szabályozó hatása már elég jól ismert. A 75. oldalon bemutatott expressziós profil alapján megkérdezném, hogy akkor a szelekcióra kerülő NKT sejtek ezek szerint csak a TEC-től kaphatnak ilyen jellegű Notch szignált?
- 8.) Nagyon szép és ötletes a 81. oldalon leírt modell-rendszer/kísérlet. Az ezzel kapott, Wnt szignálra vonatkozó fontos felismerések mellett igen érdekesnek tartom azt, hogy ugyanazon BMP-BMPR jelátvitel képes a timociták és a TE fejlődését is szabályozni. Ismert-e hogy a timocitától TEC irányba menő jel milyen epitél-funkciókat képes szabályozni? Vajon ez a reverz szignál csak az epitélium funkció „puszta fenntartásának” biztosítását szolgálja?
- 9.) Igen érdekes újdonság az a megfigyelés, hogy a TEC nem apoptózis hanem E-M tranzíció és adipoid de-differenciálódás révén „tűnik el” a tímusz atrófia során. Az 51. ábra szépen mutatja is ezt a tendenciát. Itt megkérdezném hogy az alkalmazott markerek mellett a Hassal féle testek milyen festődést mutatnának? A GR expressziót mutató 55. ábra B panelje viszont nem igazán erősíti meg a TEC GR expressziójára vonatkozó állítást. A nagyítást és ennek megfelelően a sejtmagmintázatot figyelembe véve az EpCAM1+ régiók nem mutatnak celluláris strukturáltságot (inkább „összefolyó festődést”) és pláne nem túl magas kolokalizáltságot a GR festéssel. Mennyire tekinthető reprezentatívnak ez a kép? Történt-e kvantitatív kolokalizáció analízis?

Észrevételeim, kérdéseim a dolgozat lényegi tartalmát nem érintik, inkább segítő jellegű kritikaként tekinthetők. Összefoglalva, véleményem szerint Pongrácz Judit Erzsébet MTA doktori értekezése egy jelentős új eredményeket bemutató, igényesen kivitelezett munka, mely tartalmilag és formailag is megfelel az MTA követelményrendszerének.

Az értekezés (mű) nyilvános vitára bocsátását és elfogadását feltétlenül javaslom.

Sikeres védelem esetén az MTA doktora cím odaitélését is támogatom.

Budapest, 2013-02-28

Matkó János
a biológiai tudomány doktora