

Opponensi vélemény

Gócza Elen:

„Őssejt specifikus markerek és mikroRNS-ek expressziójának vizsgálata egér és nyúl embriókban, embrionális őssejtekben”

című MTA doktori értekezéséről

A Magyar Tudományos Akadémia Doktori Tanácsa döntése értelmében a DT titkársága DT.50.220/12/04. iktatószámú levelében fölkért Gócza Elen fenti címen benyújtott doktori munkájának hivatalos bírálata. A felkérés alapján a disszertációt átnéztem és arról a következő hivatalos bírálói véleményt terjesztem elő.

Ismeretes, hogy a vezető tudományos szaklapok szinte hetente számolnak be új fejleményekről az őssejt-kutatásban, az őssejtek jövőbeni felhasználásának ígéretes lehetőségeiről. Számos közlemény jelent meg arról, hogy az őssejtek laboratóriumi körülmények között pl. inzulintermelő szigetsejtekkel képesek átalakulni, szívinfarktuson átesetteknél pedig őssejteket juttatva a károsodott szívizomzatba, azok szívizomsejteket tudtak létrehozni és ezzel a szövet regenerálódását elősegíteni. A biotechnológiai ipar célja pedig olyan szervek és szövetek előállítása őssejtekből, melyek segítségével akár szívbillentyűk, ízületek, porckorongok hozhatók létre („tissue engineering”). Ezek azután a szervezetbe ültetve átvehetik a működési zavarban szenvedő beteg szövetek és szervek funkcióját.

Ugyanakkor a nagy remények mellett az is közismert, milyen sok áltudományos eredmény lát napvilágot és hányszor élnek vissza az utolsó reménysugarba kapaszkodó terminális betegek hiszékenységével. Mindezek miatt az őssejt-kutatás nemcsak rendkívül aktuális, hanem ugyanakkor nagyon kényes és érzékeny kérdés is, amihez csak óvatosan és nagy empátiával szabad hozzájárulni.

A szerző 96 oldal terjedelmű értekezése tehát nagyon időszerű témát, az embrionális őssejtek kutatásával kapcsolatos eredményeket taglalja. Megteheti, hiszen eddigi tudományos munkásságának jelentős része is e témakörhöz kapcsolódik.

A most benyújtott disszertáció világos és jól szerkesztett munka, felépítése és az egyes fejezetek egymáshoz való viszonya arányos. A kívülálló számára nehéz

témát igyekszik közérthetően elmagyarázni, didaktikus ábrákkal és jó minőségű fotókkal elősegítve a megértést. Számos előnyük mellett ismerve az Apple programok inkompatibilitását a Windows alapú programokkal, talán ezzel magyarázható, hogy a helyesírás-ellenőrzőnek nem mindenütt sikerült az elütéseket korrigálnia a szövegben, ám ez sehol nem megy a megértés rovására.

A dolgozat a jobb megértéshez elengedhetetlenül szükséges *Rövidítés-jegyzékkel* kezdődik, amely után egy tömör *Bevezetés* következik, majd 21 oldalas *Irodalmi áttekintés* foglalja össze az egerek és nyulak embrionális fejlődését általánosságban, illetve a kimérák szerepét a kutatásokban, továbbá az előbbieknél részletesebben az embrionális őssejtek alapvető tulajdonságait. Külön alfejezet foglalkozik a pluripotencia fogalmával, az emberi- és eger őssejtekkel, a Leukémia Inhibitor Factorral. Ezt követően jut el a miRNS-ek szerepéhez, amelyen belül ismerteti a történetüket, biogenezisüket, valamint a miRNS-ek kapcsolatát az embrionális őssejtekkel.

A 3.5. fejezet a genetikailag módosított szervezetek (GMO) előállítására ma alkalmazott legfontosabb módszereket tárgyalja, első helyre sorolva a „hagyományos” DNS mikroinjektálást, a knock in és knock out állatok létrehozását, az ennél újabban elterjedtebb klónozásos génmódosítást, illetve idáig eljutván a transzgenikus nyulak alkalmazási lehetőségeit.

A következő fejezet (*Célkitűzések*) mindössze egyetlen oldal, amelyben a szerző az alábbi 3 pontban foglalja össze munkája célkitűzéseit.

1. Olyan módszer kidolgozása, amellyel hatékonyan hozhatók létre kiméra egerek és nyulak. A kiméra embriók fejlődésének vizsgálata az ivari determináció, illetve a sejtek elköteleződése során zajló molekuláris folyamatok jobb megismerése érdekében. Ez teszi lehetővé a választ továbbá arra, vajon képes-e egyetlen XY genotípusú blasztomer átfordítani az XX genotípusú diploid gazda-embriók ivarát. Lehetséges-e tetraploid komplementációs rendszert alkalmazva identikus iker egereket létrehozni úgy, hogy azonos embrióból származó egy-egy blasztomert aggregáltatnak egy-egy tetraploid gazda embrióval?

2. Pluripotens eger és nyúl sejtenyészetekben, illetve a nyúlembriók fejlődése során, a fejlődés-specifikus gének expressziós mintázatának feltérképezésével pontosabb képet kívánt kapni arról, milyen faktorok irányítják az eger- és nyúlembriók fejlődését, ezen belül az őssejtek pluripotenciájának megőrzését. A transzkripciós faktorok szerepének vizsgálata mellett igazolni akarta, hogy a Leukémia Inhibitor Faktor (LIF) nemcsak az eger ES sejtvonalak esetében

szükséges komponense a sejtenyésztő médiumnak, hanem a nyúl ES sejtek pluripotenciájának fenntartásában is fontos szerepet játszik.

3. Választ akart kapni, vajon milyen hatással van az egér őssejt-specifikus miR-290-295 klaszter túltermeltetése az egér embrionális őssejtek pluripotenciájának megőrzésben, és megnevezhető-e egy olyan fő biológiai mechanizmus, aminek a szabályozásával a miR-290-295 klaszter az egér ES sejtekben kifejti hatását. Egér ES sejtek esetében ugyanis a miR-290-295-ös klaszter játszik meghatározó szerepet, humán ES sejtek esetében viszont a miR-371-373 klaszter. Kísérletei során a jelölt tisztázni kívánta, hogy az miRNS mintázat nyúl ES sejtek esetében a humán, vagy inkább az egér miRNS mintázatához hasonlít.

A célkitűzések meghatározását követően a *Saját vizsgálatok* ismertetésére kerül sor, mégpedig a szokásos tagolásban. Az *Anyag és Módszer* fejezetben belül szétválasztva ismerteti az egereken végzett kísérleteket, azaz embriókinyerést, in vitro tenyésztést, kimérák létrehozását és az embriók visszaültetését álvemhes recipiens anyákba. Ettől elkülönítve tárgyalja a nyúlembriók kinyerését, ezek laboratóriumi tenyésztését, kiméra nyúlembriók létrehozását és visszaültetésüket. A diploid blasztomerekből létrehozott kimérákon túl a munka kiemelten foglalkozik a szerző és munkatársai által évekkorábban kidolgozott tetraploid kimérákkal, amelyet munkacsoportjuk régóta kedvező eredménnyel alkalmaz.

A következő két részben ismét állatfajok szerinti bontásban (egér: 5.3 fejezet, és nyúl: 5.4 fejezet) taglalja az ES sejtek tenyésztését, jellemzését és in vitro differenciáltatásukat, továbbá a vizsgálatukhoz alkalmazott speciális technikákat, mint pl. az immunfluoreszcencia, a sejtciklus analízis, a kolónia esszé, az alkalikus foszfatáz festés, a kromoszóma analízis és a FISH technika. Ennél a résznél kerül megbeszélésre az idegen DNS sejtbe juttatásának elektroporációs technikája is.

Az 5.5 fejezetnél a használt molekuláris genetikai vizsgálatok ismertetése következik, ide sorolva a felhasznált vektorok és klónozások, az RNS izolálás, az alkalmazott RT-PCR módszer, a génexpressziós esszék, a TLDA (TaqMan Low Density Array), a SOLID szekvenálás, az RNS analízis és végül a statisztikai értékelési módszerek tárgyalását.

Ezt követi a kapott *Eredmények ismertetése és megbeszélése* (6. fejezet), amelyben – az eddigiekhez hasonlóan – külön-külön kerülnek megtárgyalásra a kiméra egerek vizsgálata során nyert eredmények az ivari elköteleződés szempontjából, az identikus iker egerek létrehozása, majd a nyúl ES sejtvonalak létrehozását befolyásoló tényezők. Az egér és nyúl ES sejtvonalak alapításának

összehasonlítása során a jelölt értékeli a transzkripciós faktorok expresszióját, a LIF hatását és a nyúl ES sejtek in vitro differenciálódását. A kapott eredmények alapján optimalizálja a kiméra nyúlembriók létrehozásnak módszerét.

A *Saját Vizsgálatok* utolsó részében a jelölt az egér és nyúl ES sejtek pluripotenciáját befolyásoló mikroRNS-ekkel, először a túltermeltetett miR 290-es klaszternek az egér ES sejtek pluripotenciájára gyakorolt hatásával foglalkozik, ezt követően az egér- és nyúl őssejtek specifikus miRNS-eit hasonlítja össze, végül a pluripotenciát befolyásoló mikroRNS-ek hatását vizsgálja egér és nyúl ES sejteken.

A disszertáció végén a szerző 3 pontban sorolja föl az általa elért új tudományos eredményeket, majd a szöveges részt egyetlen oldalban összefoglalt *Következtetések és javaslatok*-kal zárja.

A 9. fejezet a jelöltnek a doktori értekezés alapjául szolgáló angol és magyar nyelvű közleményeit, valamint a témában megjelent könyvfejezeteit és ismeretterjesztő cikkeit sorolja föl, amelyeket ettől elválasztva az egyéb saját közlemények listája követ (10. fejezet). A munkát köszönetnyilvánítás és 8 oldalas, jól összeválogatott, részletes *Irodalomjegyzék* zárja (12. fejezet).

Egy őssejtekkel foglalkozó dolgozatot olvasván a bírálóban fölmerül a kérdés, hogy (teljes mértékig elfogadva és elismerve a téma tudományos jelentőségét) vajon miként vélekedik a jelölt a nem régen fölfedezett indukált pluripotens őssejtek jövőbeni szerepéről a biotechnológiai ipar és a humán gyógyászat területén, különös tekintettel az embrionális eredetű őssejtek terápiás felhasználását kísérő etikai aggályokra?

A jelölt több mint két évtizedes szakmai jártasságára és széles körű tapasztalataira támaszkodva állította össze MTA doktori értekezését, amelynek a dolgozatban felhasznált anyaga csak a PhD értekezés óta eltelt időszakból származik. Ezzel sikeresen elkerülte azt a gyakori csapdát, hogy minden eddigi saját eredményt fel akarjon tüntetni a dolgozatban, holott szakirodalmi munkásságát tekintve erre bőven lett volna lehetősége. Így a bírálónak nem volt nehéz dolga, hogy a doktori műben dícséretes mértéktartással felsorolt alábbi új tudományos eredményeket a szerző saját eredményeinek tekintse és valamennyit elfogadja.

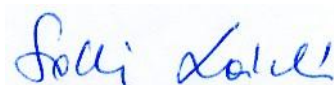
1. A PhD munkája során korábban kidolgozott tetraploid komplementációs technikát ötvözve, sikerült előre meghatározott nemű kettes és hármas iker egereket létrehozni.

2. Meggyőzően igazolta, hogy a LIF és LIFR fontos szerepet játszik a nyúl korai embrionális fejlődésében és a pluripotens embrionális eredetű nyúl őssejtek pluripotenciájának fenntartásában.

3. Igazolta, hogy míg az egér miR-290 mikroRNS klaszter elemei elősegítik az egér ES sejtek pluripotenciájának megőrzését a sejtciklus szabályozásán és a korai differenciálódás gátlásán keresztül, addig a nyúl miR-290 klaszter elemei inkább a nyúl korai embrionális fejlődésében játszanak fontos szerepet.

Mindezen saját tudományos eredmények alapján a bíráló megállapítja és bizonyítottanak látja, hogy a kérelmező korábbi tudományos fokozatának megszerzését követően jelentős eredeti tudományos eredménnyel gyarapítva tudományágát, hozzájárult annak fejlődéséhez. A doktori értekezésben felsorolt tudományos eredményeket elegendőnek tartja az MTA doktori cím megszerzéséhez, ennek értelmében egyértelműen javasolja a mű elfogadását és nyilvános vitára tűzését.

Budapest, 2013. február 1.



Solti László
az MTA r. tagja
hivatalos bíráló