

**Opponensi vélemény Gócza Elen: Össejt specifikus markerek és mikro RNS-ek
expressziójának vizsgálata egér és nyúl embriókban, embrionális össejtekben – című
doktori értekezéséről**

Formai vonatkozások:

Góza Elen az MTA doktori cím megszerzése érdekében egy 96 oldalt magába foglaló disszertációt és ahhoz csatlakozóan egy 14 oldalas téziszfüzetet nyújtott be az MTA Agrár Osztályára. A két mű formai követelményei megfelelnek a doktori cím elnyerése érdekében előírt formai követelményeknek. Az ilyen jellegű munkák megszokott részeit (bevezetés, irodalmi áttekintés, célkitűzés, anyag és módszer, eredmények és azok megvitatása, valamint következtetések és javaslatok) megfelelő arányban tartalmazza, ezek mellett jól szerkesztett irodalomjegyzék, tartalomjegyzék és a szöveges részben használt rövidítések jegyzéke tartozik. Annak ellenére, hogy a jelölt szerteágazó és jelentős számú kísérlet eredményeit foglalja össze disszertációjában, az oldalterjedelem dicséretes módon megfelelő korlátok között maradt, ami a dolgozat szerkesztésének egyik kiemelkedő érdeme. Furcsának tűnik ugyanakkor az, hogy a dolgozat szerkesztésének egyik kiemelkedő érdeme. Furcsának tűnik ugyanakkor az, hogy a dolgozat az ilyen munkákban általában megtalálható rövid (1-2 oldalas) összefoglalót nem tartalmazza. A jelölt által szerkesztett „Következtetések és javaslatok „- című rész viszont ennek az összefoglalásnak a szellemében készült, így helyesebb lett volna annak az „Összefoglalás” – címet adni.

A szöveges rész szerkezete, nyelvi stílusa jó, az átlagos olvasó számára is megkönnyíti az egyébként bonyolult tudományos részek és összefüggések megértését. A fogalmazást illetően néhány ismétlődő hibára hívnám fel a jelölt figyelmét a következők szerint:

- Az igényesen szerkesztett magyar szövegben nem kívánatos a számmal illetve a rövidítéssel kezdődő mondat (több helyen előfordul a disszertációban).
- A mondatokból néhol hiányzik az állítmány (pl. 45. oldal első bekezdésének két utolsó mondatában, és a 46. oldal első bekezdésének utolsó előtti mondatában).
- Az „Anyag és módszer” című részben a jelen és a múlt idő vegyes alkalmazása nem szerencsés.
- A ló, a szarvasmarha fajok esetében furcsa szó a nőtény használata a nőivar helyett (11. oldal).

- Egy magyar szövegszerkesztő programmal írt szövegben egy magyar szerző nevét helyesebbnek tartanám magyarosan írni (11. oldal: Bosze helyett Bösze).
- Az irodalmi hivatkozások esetében a szöveges részben használt mtsai, vagy munkatársai megjelölés mellett a zárójelben alkalmazott forma alkalmazása esetén is használható a magyaros forma.
- Az új tudományos eredmények 1. pontjában megfogalmazott „A PhD munkám során kidolgozott...” szövegrész helyett javasolom: „A PhD munkámat követően kidolgozott...” szövegrész cseréjét.

A szöveges rész között a jelölt 32 jól szerkesztett ábrát használ az eredmények bemutatására. Ezekből 5 (3., 4., 5., 8. és a 11.) inkább táblázat és ennek megfelelően lenne helyesebb címezni a disszertációban. Az ábrák az mellett, hogy színesebbé teszik az értekezéséhez nagyon jó segítséget nyújtanak a jelölt által végzett kísérletek eredményeinek értelmezésére és megértéséhez. Az ábrákhoz szerkesztett kitűnő ábramagyarázatok ezt jelentősen megkönnyítik. Zavaró ugyanakkor az, hogy néhol az ábrák figurális részétől a magyarázó szöveges rész elszakad, mert az a következő oldalra került.

Tartalmi vonatkozások

1. A témaválasztás korszerűsége és tudományos jellege

Az embrionális őssejt (ES) kutatás nem tekint vissza hosszú múltra. A Magyar Biotechnológiai Kutatóközpont (Gödöllő) a tudományterület művelése szempontjából olyan úttörő jellegű tudományos intézetnek számít, amely nemzetközi mércével mérten is jelentős mértékben hozzájárult e terület megalapozásához és annak kibontakozásához. Gócza Elen az Intézetben működő kutatócsoport tagjaként jelentős eredményeket tudhat magáénak az embrionális őssejt kutatás témakörében. Munkája eredményeként egér kimérákat előállítva világosabbá váltak a gazda-embrió és az embrionális őssejtek kölcsönhatása során működő folyamatok. Ezeket a kutatásokat tovább fejlesztve a jelölt a nyúl korai embrionális fejlődését, illetve a kiméra embrió beágyazódását irányító faktorok jobb megismerését tanulmányozta. Ezek a vizsgálatok megeremthetik az alapjait annak, hogy pluripotens sejteket tartalmazó nyúl őssejtvonalakat hozzunk létre. Az utóbbi tanulmányok létjogosultságát az a tény emeli ki, hogy az egér embrionális fejlődése során lejátszódó folyamatok nem modellezik más emlős embriók fejlődését, így a nyúl, mint modell állat hasznos új információkat adhat a

fejlődésbiológiai kutatásokhoz. Ez utóbbi az állattenyésztés modern szaporodásbiológiai technikáinak kialakításához is hasznos alapként szolgálhat.

2. Célkitűzés

A disszertáció alapját képező kutatások célkitűzései három pont köré csoportosulnak, amelyek világosan megfogalmazzák, hogy a jelölt milyen kérdésekre keresi a választ. Ezek közül legérdekesebbnek tűnik és legértékesebb tudományos eredmények megalapozását szolgálhatja az a célkitűzés, mely szerint a jelölt azt kívánja vizsgálni, hogy milyen faktorok irányítják az egér embrióhoz viszonyítva a nyúl embrió fejlődését, ezen keresztül az őssejtek pluripotenciáljának megtartását?

Tudományos szempontból érdekes eredményeket kínál annak a kérdésnek a megválaszolása is, hogy a nyúl embrionális őssejtjei (ES) esetében a pluripotencia megtartásában szerepet játszó klaszterek közül melyik mutatható ki; a nyúl *miRNS* mintázat a humán vagy inkább az egér *miRNS* mintázatához áll közelebb?

3. Irodalmi áttekintés

A dolgozat e része 74, közöttük 8 magyar szerzőkkel által publikált irodalom citálásával mutatja be a témához kapcsolódó legújabb vizsgálatok eredményeit. A fejezet tömörsége mellett kitűnő útmutatást nyújt az olvasó számára ahhoz, hogy a vizsgálatokat érintő tudományterületeken könnyebben eligazodjon. A szövegben, az ábramagyarázatokban és az irodalomjegyzékben történő hivatkozások módszere az MTA által elfogadott formában és pontosan történt.

4. Anyag és módszer

Jelölt a célkitűzésben megfogalmazott kérdések megválaszolása érdekében jól megtervezett laboratóriumi állatkísérleteket állított be egerekkel és nyulakkal. A kísérleti állatok szaporítása, tartása és a kísérleti minták gyűjtéséhez használt módszerek sebészeti technikák megfelelőek. Az embrionális sejtek manipulálására használt laboratóriumi módszerek, azok műszeres háttere kiváló vizsgálati lehetőségeket biztosított a jelölt számára. Az alkalmazott biotechnológiai eljárások közül a legtöbb kiemelkedő színvonalú, az adott tudományterület módszereinek csúcstechnológiáját alkalmazó vizsgálati eljárás.

Az Anyag és módszer című részhez a következő észrevételeket, illetve kérdéseket teszem a jelölthöz:

- Az egerek párzását követően, a feltételezett megtermékenyülést követően, az állatok kiirtása, majd az embriómosás kb. mennyi idő múlva következett be? Ennek ellenőrzésére végeztek-e vizsgálatot? Hogy ellenőrizték azt, hogy a tetraploid embriók előállításához használt CD1 embriók kora a termékenyüléstől számítottan éppen 39 óra volt? (33. oldal)
- A kiméra blasztociszták kihordására használt álvemhes nőivarú egéregyedet milyen módszerrel állították elő? Egy nőivarú egyedbe hány blasztocisztát ültettek be? (35. oldal)
- Az embriókinyeréséhez használt nyulak korának, esetleg súlyának, tartási körülményeinek leírása hiányzik. A kísérleti állatok még nem ellett, de ivarérett állatok voltak, hogyan győződtek meg az állatok előzetes petefészek működésének állapotáról? (35-36. oldalak)
- A kromoszóma analízist a jelölt nyulak esetében perifériás vér limfocitákból végezte. Honnan (melyik érből) gyűjtött vért a vizsgálathoz? A vérből a limfocitákat hogyan izolálta és készítette elő a vizsgálathoz? (43. oldal)
- A nyúl esetében a *cDNS* (reverz transzkripcióval *mRNS*-ről átírt *DNS* szál) meghatározásához használt reagens (vegyszer) keveréket gyártó cég nevét a jelölt megfelelő módon közli. Nem tudom ugyanakkor az itt közölt „*Supplementary Table 7*” piros színnel közölt megjegyzést értelmezni. (45. oldal, 2. sor)
- A statisztikai analízis leírásakor a jelölt azt említi, hogy a kísérleteket legkevesebb 3 párhuzamos sorozatban végezte. Hogyan ítéli meg a vizsgálatok megbízhatóságát ilyen elemszámok alkalmazása mellett az Ön által végzett kísérletekben? (46. oldal)
- A kísérleti módszereit jóváhagyó állatvédelmi engedélyei a 2002-es, illetve a 2008-as évekből származnak. A ma érvényben levő „Alaptörvény” értelmében miként ítéli meg vizsgálatait etikai vonatkozásait?

5. Eredmények és megvitatásuk

A dolgozat 6.1.1. számozású fejezetében a jelölt egérkimérák előállítását célzó vizsgálataiban figyelemre méltó eredményeket kapott, amikor egy XY genotípusú blasztomert XX típusú

gazdaembrióval aggregáltatott. A megszületett 22 embrió közül 12 kiméra lett, ezek közül 11 (85,7%) hímivarú volt, amelyek utódaikban is örökítették az EGFP transzgént, amely azt bizonyítja, hogy egyetlen XY genotípusú embrióból származó blasztomer képes átfordítani az XX gazdaembrióval aggregáltatva létrehozott kiméra ivarát. Ezen vizsgálatai során, bár az egyetlen nőivarú egyed fertilis volt, de nem örökölte a transzgenetikus tulajdonságokat. Kérem, fejtse ki bővebben, hogy mivel magyarázható ez az eredmény, és ebből milyen általános következtetések vonhatók le!

A jelölt ugyancsak egerekkel végzett egy másik kísérletében (6.1.2. fejezet) tetraploid komplementációs módszer alkalmazásával sikeresen állított elő meghatározott ivarral rendelkező, genetikailag azonos (identikus) egereket. Ezen egyedek azonosságát mikroszatellit vizsgálatok segítségével bizonyította. Az általa kidolgozott és eredményesen alkalmazott tetraploid komplementációs rendszerrel olyan kettes- és hármas ikrek hozhatók létre, amelyek a genetikai azonosságuk eredményeként nagyon jól alkalmazhatóak különböző laboratóriumi vizsgálatokban, akár farmökológiai, akár toxikológiai, vagy más nagy pontosságot igénylő kísérletek végzésére.

Góza Elen a nyulakkal végzett kísérleteinek első részében (6.2.1. fejezet) a korai embrionális fejlődést befolyásoló transzkripció faktorok expressziójának vizsgálatát végezte. Négy illetve 6 napos embrió szerkezetét tanulmányozva jelentős különbségeket írt le az egérembrió már ismert sejtszerkezetéhez viszonyítva. Az általa alkalmazott specifikus elsődleges ellenanyag markerek segítségével kitűnően mutatta be 4 szemléletes ábrán (16A-D ábrák) keresztül a hatnapos nyúl blasztociszta trofoblaszt és embrioblaszt sejteinek fejlődését. Ezek hasznosak lehetnek a nyúl, vagy akár más háziállatfaj pluripotens őssejtjeinek jobb megismerése érdekében folytatandó tanulmányokhoz.

A nyúl embrionális őssejtjeinek (ES) tulajdonságait vizsgálva, a jelölt kísérleteket végzett annak érdekében, hogy a leukémia inhibitor faktor (LIF) milyen hatással van a nyúl ES sejtek alapítása során. Mint ahogy azt Góza Elen is megjegyzi, a LIF és receptora (LIFR) olyan citokinek, amelyek a korábbi egerekkel és humán pluripotens őssejtekkel végzett vizsgálatokban bizonyítottan nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a blasztociszták beágyazódása során. A jelöltnek *in situ* hibridizációs metodikát alkalmazva sikerült igazolni, hogy a nyúl LIF receptor gén a 11-es kromoszóma egy régiójában, (OCU11p11.1) található. A nyúlkísérletekben a disszertáns által előállított ES sejtekből olyan embrionális testecskéket (EB) tartalmazó kolóniákat sikerült kifejleszteni, amelyekből differenciálódó sejtek vándoroltak ki. Ezekből a nyúl EB csomókból pulzáló szívizom sejteket lehetett megfigyelni,

ami azt igazolja, hogy az *in vitro* tenyésztésben, a jelölt által kidolgozott körülmények között tartott nyúl ES sejtek pluripotens sejteket tartalmaznak.

Gócza Elennek és kutatócsoportjának közel 10 éves erőfeszítéseinek eredményeként sikerült előállítani olyan transzgenikus nyúl utódokat, amelyek ivarsejtjeiben is ki lehetett mutatni a transzgenikus markerként használt EGFP expresszióját. Az ide vonatkozó vizsgálati eredményeit mutatja be a jelölt a disszertáció 6.3. fejezetében. A többéves kísérletek során, módszertani fejlesztések eredményeként, a *Venus* transzgént örökítő nyúlegyedeket sikerült létrehozni, amelyek embrióiban is kimutatható volt a *Venus fehérje* expressziója. Ezen kutatásokhoz kapcsolódó fontos megállapítása a jelöltnek az, hogy a transzgenikus embriók mikro injektálással történő manipulációja nem rontja az embriók születési esélyeit. Az előzőekben felvázolt kutatások eredményeit szemléltető 20. ábra alsó sorában bemutatott, egymás után következő 2. és 3. kép mindegyike ES kiméra embriókat mutat be. Megkérdezem a jelöltet, hogy a két azonos című kép miben különbözik egymástól?

Az eredmények és megvitatásuk című rész utolsó fejezetében (6.4. fejezet) a disszertáns olyan kísérleteket közöl, amelyekben a *mikro RNS*-ek egér és nyúl embrionális őssejtjeinek pluripotenciáljára gyakorolt hatásait vizsgálta. Az alkalmazott briliáns technikák kidolgozásán felül ezen kutatások talán legfőbb eredményét a 30. ábra összegzi. Ez szerint az *mR-290-295* jelzésű klaszter *mikro RNS*-ei közvetlenül gátolják a sejtciklus egyes negatív szabályozóit. A sejtciklus ezáltal könnyebben átjut az ellenőrző pontokon (G1/S vagy G2/M), így a sejtciklus és a sejtek proliferációs ideje felgyorsul.

Az egér és a nyúl őssejt specifikus *mikro RNS*-ek összehasonlításával a jelölt hasznos adatokat szolgáltat az embrionális eredetű őssejtek genetikai tulajdonságainak feltérképezéséhez. Mérései alapján megadhatók azok a *mikro RNS*-ek, amelyek a korai embriókra, illetve a nyúl ES sejtjeire jellemző expressziót mutatják. Fontos megállapítása, hogy a *mikro-R-290-5p* jelű klaszter tagjai mutatnak magasabb expressziós szintet a nyúl ES sejtekben, és hogy a *mikro-R290* klaszter tagjai feltételezhetően a korai embrionális fejlődés során játszanak fontos szerepet.

6. Következtetések és javaslatok

Ez a rész inkább a jelölt kutatási eredményeinek tömör összefoglalását tartalmazza, mintsem a kutatási eredmények értékelésének nyomán levonható következtetéseket. Ennek megfelelően, mint ahogy azt a korábbiakban már észrevételeztem, jól helyettesít egy olyan összefoglaló

egységet, amely általában része az ilyen jellegű disszertációknak, de ezen a címen az Gócza Elen disszertációjából hiányzik.

A jelölt disszertációja végén felsorolja azokat a publikációkat, amelyek az értekezésének elkészítéséhez alapokat szolgáltattak. Ezek közül 6 jó impakt faktorral rendelkező angol nyelvű folyóiratban lett közölve, melyek közül 3-ban első vagy utolsó szerzőként szerepel. Ezen nemzetközi folyóiratokban közölt publikációk azt jelzik, hogy Gócza Elen kutatásainak eredményeit az érintett szakma képviselői is minősítették és elfogadták. Különös értéke publikációs tevékenységének az is, hogy eredményeit a hazai állattenyésztők legolvasottabb szakmai folyóiratában is közölte, amely lehetőséget nyújt a gyakorlati állattenyésztők számára is a tudomány e részegységének tárgyilagos megismeréséhez.

Összegezve véleményemet: Gócza Elen: „Össejt specifikus markerek és mikro RNS-ek expressziójának vizsgálata egér és nyúl embriókban, embrionális össejtekben” – című értekezése értékes tudományos munkát tartalmaz. A mű beleértve a disszertációhoz csatolt téziseket is, a jelölt kutatásainak hiteles eredményeit tartalmazza. A bírálatomban korábban említett, főként stilisztikai és formai kifogásaim a munka tartalmi és szakmai értékeit alapvetően nem befolyásolják. Az értekezés áttanulmányozása során meggyőződtem arról, hogy Gócza Elen kutatásai, a korábbi tudományos fokozat megszerzését követően, jelentős eredeti tudományos eredményekkel gyarapította az általa művelt tudományterületet, és ezzel hozzájárult a tudomány továbbfejlődéséhez.

Előzőekben megfogalmazottak alapján **az értekezés elfogadását és a nyilvános vita kitűzését**, valamint eredményes megvédése esetében **az MTA Doktora – cím odaítélését javasolom.**

Keszthely, 2014. január 3.

Dr. Husvéth Ferenc
egyetemi tanár, az MTA doktora