

Bírálati vélemény

Krenács Tibor: Connexinek és sejt-kommunikációs csatornáik tanulmányozása csontvelőben, nyirokszervekben, szövetregenerációban és daganatokban c. MTA doktori értekezéséről

A „gap junctionok” (szintén használt további elnevezésük részkapcsolat vagy **nexus**, a továbbiakban az egyszerűség kedvéért ez utóbbi elnevezést fogom használni) nélkülözhetetlenül fontosak a szöveti morfogenezisben, sejt-kötések funkcióinak összehangolásában, közös szabályozásában, bizonyos sejttípusok specifikus funkcióiban, és elektromos jelek továbbításában (a nexus mint elektromos szinapszis). Jelen disszertáció szerzője korán felismerte a nexusok és az azokat felépítő connexinek jelentőségét, és úttörőként elsőként írt le különböző connexin izotípusokat különböző szövetekben és sejtekben, valamint vizsgálta a connexinek és az általuk kialakított nexusok, membránplakkok morfológiai jellemzőit, lehetséges funkcióit, patológiai jelentőségüket. A jelen értekezés a szerző ezirányú két évtizedes munkájának eredményeit foglalja össze egységes anyag formájában.

A 155 oldalra terjedő disszertációból 111 oldal maga a disszertációs munka, 28 oldal a 402 tételből álló irodalomjegyzék, valamint 3 oldal a disszertáció alapját képező 24 közlemény terjedelme (ezek össz faktora 57,279). További fontosabb közleményeinek száma 50.

A **disszertáció szerkezete** kissé eltér a megszokottól, mert az általános Bevezetés, Célkitűzések, és Módszerek után egyenként veszi sorra a különböző szövettípusokon végzett munkáját, mindegyiket külön ellátva Bevezetés, Anyag és Módszer, Eredmények, Megbeszélés és Összefoglalás alfejezettel. Az általános Bevezetés jó áttekintést ad a connexinek, connexonok felépítéséről, szabályozásukról és szerepükről. A Célkitűzések fejezetben az előzmények rövid ismertetése után a disszertáció céljaként a connexinek, nexusok előfordulásának és szerepének vizsgálatát tűzi ki különböző szövetféléseken. A Módszerek fejezetben az ismételődő, általános technikákat, módszereket írja le. A következő 6 fejezetben a csontvelő, másodlagos nyirokszervek, cornea-regeneráció, harántcsikolt izom differenciációja, óriássejtes csonttumor, valamint emlő és emlőcarcinoma során végzett munkáját és eredményeit ismerteti, mindegyik végén az eredmények főbb pontjait, újszerűségét összefoglalva. Az értekezést általános összefoglaló zárja.

A **doktori értekezés érdemeit értékelve** kijelenthetem, hogy a szerző világviszonylatban azok közé tartozik, akik a nexusok, connexinek kutatásának a frontvonalában dolgoztak, és ott újszerű, fontos megállapításokat tettek. A szerző több szövettípusban elsőként azonosított még ott le nem írt connexin izotípusokat. Jelentősnek tartom a myelo-lymphatikus rendszerben feltárt, nexusok által közvetített sejt-sejt kapcsolatokat, amelyeknek nagy szerepük van éppen ezekben a szövetekben. Kiemelendő, hogy a csontvelőben a strómasejtek, a szekunder nyiroktüszőkben a dendritikus sejtek képeznek olyan nexusokkal kapcsolt, szinciciumszerű hálózatot, amelyek biztosítják a vérképző sejtek, ill. a B-lymphocyták számára a megfelelő mikrokörnyezetet és sejtes kölcsönhatásokat. Maguk a szekunder tüszők sem tudnak szerveződni a nexusok közreműködése nélkül. Összehasonlítva fejlődő ill. regenerálódó szöveteket (csontvelőben, nyirokcsomóban, izomrost és corneahám regenerációban) a nyugvó sejtekkel világossá vált, hogy az aktivált sejtek lényegesen fejlettebb nexus-rendszerrel rendelkeznek. Kiemelem a szerző törekvését, hogy a normál sejteken nyert ismeretanyagot patológiai szituációkra, elsősorban daganatokra alkalmazza. A különböző connexinek expresszióját nagy emlőkarcinómás beteganyagon vizsgálva sikerült egyes connexin-koncentrációk

változásait prognosztikus faktorként értelmezni. Kiemelendőnek tartom még a téma korszerű és sokoldalú metodikai megközelítését : így az immuncitokémia (kombinálva a lézer konfokális pásztázó mikroszkópiával és szöveti multiblokk módszerrel), mint domináns módszer mellett a szerző bevonta módszertani fegyvertárába az elektronmikroszkópiát, sejtenyésztest, a digitális képanalízist, a festék-transzfert, a génkonstrukciós transzfekciót, Western és Northern blotot, FISH-t, PCR-t, kvantitatív és statisztikai analíziseket, eredményeit pedig összevetette klinikopatológiai leletekkel.

A leírt eredményekkel kapcsolatban a következőkben **néhány kérdést, kritikai megjegyzést** szeretnék tenni, opponensként ezeket kissé részletesebben ismertetve.

Rövidítéslista. A disszertáció rendkívül sok rövidítést tartalmaz, ezek emlékezetben tartása szinte lehetetlen, ezáltal a szövegben való tájékozódás, annak megértése nagy feladatot jelentett. Jelentős könnyebbéget okozott volna az olvasónak, ha (hasonlóan a legtöbb értekezéshez) a szerző magyarázatokkal ellátott részletes rövidítéslistát csatolt volna a disszertációhoz.

A disszertáció **képdokumentációs anyaga** jól kiemeli a szerzőnek a preparatív módszerekben való jártasságát, a szerző minden lényeges megállapításához ad megfelelő képi dokumentációt. Sajnos több esetben (pl. 14 e,f, j, i, 17 d,e,f és betétek, 18 b-h, 23 h) az ábrakon való eligazodás nem volt könnyű a képek szokatlanul kis nagyítása miatt, ami lupe használatát tette szükségessé. Ennél a nagyításnál a finomabb részletek tanulmányozása a nyomtató rasztermintázatának megjelenése miatt válik zavaróvá, több esetben lehetetlenné, ezáltal a képek bizonyító ereje gyengül. Volt -e valamilyen különleges oka az ilyen szokatlanul miniatűr nagyításoknak?

A nexusok hozzárendelése sejtekhez. A nexusok morfológiai vizsgálatának klasszikus eszköze kezdetben az elektronmikroszkóp volt (rutin EM és fagyasztva-törés), mely óriási idő- és munkabefektetéssel jár, és sok kérdés megválaszolására kevésbé alkalmas. A szerző felismerte, hogy a nexusokat felépítő connexinek immuncitokémiai kimutatásával lényegesen gyorsabban és hatékonyabban célt érhet, ezért módszertani megközelítésének a vezérmotívuma ez lett. Disszertáns az immuncitokémiai módszert biztos kézzel, eredményesen alkalmazta, amint azt a közölt képek bizonyítják. A szerző nem könnyű célt tűzött ki maga elé, mikor az immuncitokémiailag kimutatott nexusokat fénymikroszkóposan a megfelelő két szomszédos sejthez hozzárendelni igyekezett. Az egyik nehézséget az jelenti, hogy a két sejtet biztosan azonosítani kell ahhoz, hogy ebből a kontaktusból megbízható funkcionális következtetést lehessen levonni. Bizonyos ábrakon (pl. 2., 4. 8. ábra egyes képei) számomra ez kevésbé meggyőzően sikerült. A sejtípusok biztosabb morfológiai felismeréséhez véleményem szerint célszerű lett volna minden esetben ugyanazon területről DIC vagy fáziskontraszt felvételt is készíteni, méghozzá a lehető legnagyobb nagyításban. Természetesen valamilyen sejtre specifikus marker immuncitokémiai kimutatása még biztosabb azonosítást tesz lehetővé, és a szerző több helyen valóban élt is ezzel a lehetőséggel. A másik nehézség a fénymikroszkópia természetéből adódik: problémát jelenthet ugyanis, ha két sejt közé egy harmadik sejt (pl. strómasejt) vékony, lemezszerű nyúlványa iktatódik, amelyet a mikroszkópos feloldás nem tud biztosan feltüntetni. Ilyenkor az itt immuncitokémiailag kimutatott nexus esetleg nem a két feltételezett sejt, hanem az egyik sejt és a harmadik sejt vékony nyúlványa között van jelen, ami félrevezető következtetésekhez vezethet.

FélcSATORNÁK. A disszertáció ábráin sok helyen látható (mások által is megfigyelt) connexon (félcSATORNA) plakkok (lényegében fél nexusok) szabadon álló sejtek sejtmembránjában is

előfordulhatnak, partner connexonok nélkül. Ezek a csatornák tehát a sejt citoplazmája és az extracelluláris tér között jelenthetnek átjárást. Felmerül a kérdés: mi lehet ezeknek a specifikus élettani funkciója? Bár néhány adat található erre vonatkozólag az irodalomban (amint a szerző is megemlíti), mintha a téma az utóbbi időben kikerült volna az érdeklődés köréből. Pedig az ilyen, a citoplazma és az extracelluláris tér közötti átjárást lehetővé tevő csatornáknak vitális szerepük kell, hogy legyen a sejt számára. Véleményem szerint ezeknek a csatornáknak akkor van értelme, ha specifikus áteresztőképességgel és valamilyen szabályozó mechanizmussal rendelkeznek, amely viszont specifikus jelekre kellene, hogy reagáljon. A lehetőség izgalmas, és a téma véleményem szerint a biokémiában, sejtélettanban nem kapott elég teret. Kérdésem a szerzőhöz, hogy tud-e újabb adatokról ezen a téren, és a saját munkájában talált „árva” connexonok szerepéről mi a véleménye? Ez a téma előkerül az értekezésben a myoblastokkal kapcsolatban is (77. o.), ahol a szerző a Ca^{2+} -nak a connexonokon történő beáramlását az izomdifferenciációval hozza összefüggésbe. Korai adatok szerint viszont a Ca^{2+} bezárja a connexon csatornát, ez egyben védekezés a külső hatások ellen a hámréteg összekapcsolt sejtjeinél, ahol ha valamelyik sejt elpusztul, a beáramló Ca^{2+} a bezáródó nexusokon nem terjed tovább a többi sejt felé, ezzel megmentve a többi sejtet a magas Ca^{2+} koncentrációtól és egyéb anyagok káros hatásaitól. Kérdésem: mi ismeretes jelenleg a Ca^{2+} -nak a connexonok funkcionális állapotára kifejtett hatásáról?

A connexinek finomabb, sejtes lokalizációja. A connexinek integráns membránfehérjék, melyek a sejtmembránba kijutva ott connexonokat, majd nexusokat alkotnak. Ennek megfelelően a connexonok, nexusok jellegzetes lokalizációja a sejtmembrán, és connexinek (kisebb mértékben) az utánpótlási útvonalnak megfelelően a dER-ben, Golgi-készülékben vagy transzport vezikulákban fordulhatnak elő. Ezzel szemben az értekezés bizonyos ábráin (pl. 5d, 23c ábra) feltűnt, hogy az immuncitokémiaiilag kimutatott connexin homogén módon teljesen kitölti a citoplazmát. Kérdésem: hogyan magyarázza ezt a szerző?

Több különböző sejtípus összekapcsolása egy szövetben. A szerző a csontvelőn és nyirokszerveken végzett kutatómunkájának eredményeit vázlatos ábrában foglalja össze (15. ábra), amelyen feltűnteti a különböző sejtípusok nexusokkal való összekapcsolódását. Feltűnik, hogy pl. a csontvelőben a stromasejtek sínusendothel sejtekkel, csontvelői őssejtekkel, vérképző őssejtekkel, zsírsejtekkel, megakaryocytákkal, osteoblastokkal tartanak fenn kapcsolatot nexusok révén. Ez az olvasót kissé zavarba ejti, és felvetődik a kérdés, hogy az így egységes kommunikációs rendszerbe összekapcsolt sejtek hogyan teljesítik specifikus feladataikat, hogyan szabályozódnak külön-külön? Vagy lehetséges, hogy időben nem minden kapcsolat áll fenn egyszerre? Ebben az esetben mi szabályozhatja a sejtek szétválását vagy nexusokkal való összekapcsolódását?

Néhány kisebb megjegyzés. A szerző több helyen (pl. 49. o.) arról számol be, hogy milyen sejteken talált connexineket. Mivel azonban a connexinekből felépülő connexonok csatornák, melyek általában két sejt citoplazmája között létesítenek átmenő kapcsolatot, itt *a leírásban hiányzik a másik sejt megemlítése*. A leírásnak éppen az adna biológiai jelentőséget, hogy a connexonok milyen két sejt között biztosítják a kommunikációt.

A connexin plakkok méretét illetőleg: milyen célzattal történt a mérés? Mennyiben megbízhatóak a mért értékek ebben a mérettartományban ($\leq 1 \mu\text{m}$), mennyiben függnek a leképező optikai rendszer beállításaitól, és milyen fontosabb információt adnak?

7. a ábrán (fagyasztva-töréses kép): Mivel bizonyítható, hogy a képen B-LY-vel jelölt sejtmembrán B-lymphocytához és nem egy másik dendritikus sejthez tartozik?

51. o.: Hogyan lehet a corneát szűrőpapírral eltávolítani?

17 f ábra, betét (*): Az „aktivált stromasejt” állítást a gyenge EM kép nem engedi meg.

57. o.: Miben különbözik a Cx 43 és Cx26 szelektív permeabilitása és hogyan „kínálnának ezek alternatív útvonalakat a kompartmentális funkciók koordinálására”?

109. o. „...fehérje szintű tumorok túlélése” és 111. o. felül: „... ER pozitív emlőkarcinómák differenciáltabb fenotípusához és kedvezőbb túléléséhez ...”. Nem világos, hogy a túlélés fogalma mire vonatkozik? Kedvezőbb a tumor vagy a beteg számára?

A promoter és tumor szuppresszor elnevezés több helyen is előfordul, de mint kiderül, általános értelemben (elősegítő ill. gátló). Kissé zavaró, mert ezek a fogalmak a molekuláris genetikában és onkológiában határozott molekuláris struktúrákra vannak fenntartva.

Az új eredmények összefoglalása.

A szerző úttörő szerepet játszott új connexin izotípusoknak több különböző szövetben történő felfedezésében.

Megállapította, hogy a csontvelőben nexusok kötik össze a stromasejteket egymással és több eltérő sejtípussal, többek között a vérképző sejtekkel. Utóbbi kapcsolat csatornafunkcióját igazolta tenyésztett sejteken festéktranszfer segítségével.

Másodlagos nyirokszervek vizsgálata során bizonyította a follikuláris dendritikus sejtek egymás közti és B-sejtekkel való kapcsolatát, valamint ennek szerepét a csíracentrumok létrejöttében és a B-sejtek túlélésében.

Szaruhártyában a Cx43 mellett Cx26 jelenlétét és finomabb lokalizációját írta le a cornealis hám bazális rétegében, valamint ezeknek a hám regenerációjakor történő kiterjedését a hám többi rétegére.

In vivo és *in vitro* izomregenerációs modellben megállapította, hogy a korai myogen sejtekben átmenetileg nagyszámú nexus jelenik meg, melyek a sejtfüzió után gyorsan eltűnnek. A nexusok elősegítik a sejtfüziót és a myotubulusok kialakulását, gátlásuk fokozott myoblast proliferációt és a myotubulusok kialakulásának késleltetését okozza.

Megállapította, hogy óriássejtes csonttumorban a connexint termelő stromasejtek connexin expressziója csökken, hiányosan foszforilálódnak, ami áteresztőképességük csökkenéséhez vezet. Ennek a változásnak a mértéke összefügg a tumor agresszivitásával.

Humán emlőmirigyben több, eddig nem említett connexin típust fedezett fel és lokalizált. Vizsgálta a connexinek expressziójának mértékét a különböző emlőkarcinómákban, főként azzal a céllal, hogy azt prognosztikus faktorként lehessen felhasználni. Neoadjuvánsan kezelt emlőcarcinómákban a csökkent Cx26 ill. az emelkedett Cx46 szint kedvezőbb prognózisú csoportokat jelentett bizonyos alcsoportokban.

A disszertáció eredményeit összegezve megállapítható, hogy nagy volumenű, munkaigényes kutatómunkára alapszól, amelynek a gerincét a connexinek expressziójának morfológiai analízise képezi több kiválasztott szövettípuson, daganaton és regenerációban. Ezt a főirányt logikusan egészítik ki funkcionális, sejt- és molekuláris biológiai megközelítések, mindig szem előtt tartva a téma patológiai és esetleges klinikai vonatkozásait. A szerző lényegesen járult hozzá a nexusokról, connexinekről alkotott tudásunkhoz, és az e tárgyban megjelentetett kutatási eredményei (24 közlemény!) a cikkek megjelenési idejében újak és eredetiek voltak.

Mindezek alapján megállapítom, hogy a doktori mű teljesíti az MTA Doktora cím odaítélésének feltételeit, ezért az értekezést nyilvános vitára alkalmasnak tartom, és elfogadását támogatom.

2016 július 30

Dr. Röhlich Pál

professor emeritus, az MTA doktora