

Bírálat

Dr. Csósz Éva

Kvantitatív proteomikai módszerek fejlesztése és alkalmazása komplex biológiai kérdések tanulmányozására és potenciális biomarkerek azonosítására

c. MTA doktori értekezéséről

Dr. Csósz Éva tudományos tevékenységének eddigi eredményeit egy 148 oldalas dolgozatban összesítette, melynek anyagát 11 közlemény alkotja. A Jelölt a közlemények zömében első vagy megosztott első szerző (7 db), a többi 4 közleményben pedig utolsó, ill. megosztott utolsó szerző. Mindez jól tükrözi, hogy ezen publikációk létrejöttében a Jelöltnek meghatározó szerepe volt, illetve iskola és műhelyteremtő tevékenységének eredményei is integrálásra kerültek a dolgozatba.

A mű koherenciáját az a proteomikai metodikai arzenál jelenti, amelynek a Debreceni Egyetemen való kialakításában és magas szinten való működtetésében Dr. Csósz Évának elvülhetetlen érdemei vannak. Az általa kialakított és működtetett infrastruktúra számos, a dolgozatban ismertetésre kerülő, együttműködésben magvalósuló kutatás alapját jelentette. Az együttműködésekben megvalósuló kutatások számos esetben olyan fejlesztéseket igényeltek – elsősorban kvantitatív proteomikai és adatelemző módszereket –, amelyeket Dr. Csósz Éva maga hajtott végre, majd ezeket a fejlesztéseket is integrálva a metodikai arzenálba születtek meg a közös eredmények. Ezt az aspektust, mint a dolgozat egyik nagy pozitívumát szeretném hangsúlyozni bírálatomban.

A dolgozat formai kivitelezése valamelyest eltér az MTA doktori értekezések formájától. Szerző az **Irodalmi áttekintés** nagy részét mindazoknak a metodikáknak szentelte (6-22. oldal), amelyeket meghonosított és használt a kutatásai során, az alkalmazási területeknek – a kutatott témáknak – mindössze 7 oldalt szentelt (23-29. oldal). A röviden és célratorően megfogalmazott **„Célkitűzések”** rész mindössze 1 oldal terjedelmű (30. oldal), míg az kísérletek során alkalmazott módszerek ismertetésére 14 oldalt szánt a Jelölt (31-44. oldal). Az alkalmazott módszereket kellő részletességgel, ugyanakkor mértéktartással írta le (**Anyagok és módszerek**). A kapott eredményeket és azok megbeszélését egyben adta meg a Jelölt, alapvetően 6, egymástól témájában viszonylag távol álló területen végzett vizsgálatait ismerteti (**Eredmények és megbeszélésük**). Ebből három témát – a könnyben, a nyálban, valamint a verejtékben azonosítható biomarkerek azonosítását – nagyon jól és logikusan egy szála tudta fűzni a Jelölt, míg a másik három téma, nevezetesen a *Candida albicans* PPZ1 szerepének proteomikai vizsgálata, a proliferatív vitreoretinopátia tanulmányozása kétdimenziós gélelektroforézissel, valamint a HIV fertőzést követő proteomikai változások vizsgálata viszonylag távol álló témák az előző háromtól. A közös szál a módszertan adja, amelyet Dr. Csósz Éva alkalmazott, mi több ő maga implementálta és számos esetben metodikai fejlesztésekkel tovább is fejlesztette.

Értékelés és észrevételek/kérdések az **Eredmények és megbeszélésük** résszel kapcsolatosan:

- I. A Jelölt által elsőként ismertetett vizsgálati eredményei a ***Candida albicans* PPZ1 fehérje** hiányában kialakult, megváltozott fehérje és foszforilációs mintázatra vonatkoznak. A kapott eredmények analíziséből a Jelölt arra következtet, hogy a PPZ1 fehérje a transzláció szabályozásában játszik szerepet, majd felehetően ezen keresztül a sejtek

oxidatív stresszre adott válaszában, illetve a sejtek morfológiai transzformációjában is. A mennyiségi és/vagy foszforilációs változásokat mutató fehérjék interakcióit a String vizsgálati módszerrel analizálták és számos érdekes fehérje-fehérje interakciót azonosítottak. Fontos, a klinikum számára is releváns megfigyelésük volt, hogy a PPZ1 fehérje szerepet játszik a biofilm képződésben.

Kérdéseim az alfejezettel kapcsolatosan:

1. 47. és 49. oldal 2D elektroforézis képek: Minek tudható be, hogy egyes mólsúly tartományokban gyöngsorszerűen sorakoznak a különböző izoelektromos fókuszú fehérjék, míg bizonyos méret tartományokban teljesen üres a vízszintes sáv?
2. 53. oldal 2. bekezdés: Mit ért a Jelölt különböző proteoformák alatt? A IV. csoportba sorolt fehérjék különböző 2D gélelektroforézis foltokban tapasztalt eltérő viselkedésére adja ezt a magyarázatot a Jelölt.

- II. A **proliferatív vitreoretinopátia (PVP)** pathomechanizmusát egér modellen tanulmányozta a Jelölttel együttműködő kutatócsoport. A Jelölt a PVP során fellépő proteomikai változásokat követte és kimutatta, hogy a legnagyobb mértékű mennyiségi változásokat az ún. krisztallinok mutatják az izolált üvegtestben. Ugyanezen folyamatok transzglutamináz 2 (TG2) KO egerekben való tanulmányozása során arra a felismerésre jutottak, hogy a TG2 protektív szereppel bírhat a PVP pathomechanizmusa során, feltehetően a krisztallinok keresztkötése révén.

Kérdéseim ezzel az alfejezettel kapcsolatosan:

1. A Jelölt a 25. oldalon a PVP pathomechanizmus kulcs aspektusaként a retina epidermális-mezenchimális átalakulási folyamatait nevesíti, az 59. oldalon azonban a folyamatok modellezésére egér szemben dispase kezelést alkalmaztak. Kérem, hogy adjon rövid magyarázatot arra, hogy a dispase kezelés a modell rágcsáló szemében hogyan váltja ki a PVP-re jellemző epidermális-mezenchimális átalakulást! A bőrgyógyászati kutatások során – amelyben én magam otthonosan mozgok - a dispase-t az epidermis és a dermis szétválasztására használjuk.
2. A krisztallinokat a TG2 szubsztrátjaként írja le a Jelölt és a dolgozatban számos krisztallin altípust nevesít. A TG2 ubikviter módon keresztköti a krisztallinokat vagy van valamilyen mértékű specificitása?

- III. A Jelölt a következő alfejezetben a **könnyben azonosítható biomarkerekkel** kapcsolatos eredményeit ismerteti. Leírja, hogy a metódika beállítását sejtenyészetek felülúszójának használatával optimalizálták, majd ezt követően az Alzheimer kórra (AD) jellemző biomarkerek azonosítását végezték el könnyből. Munkájuk fókuszában az antimikrobiális hatású fehérjék, ezen belül pedig a defenzinek álltak. Eredményeik szerint az AD-ban szenvedő betegek nagyobb mennyiségű és emelkedett összfehérje koncentrációjú könnyet termelnek. Ugyanakkor az általuk részletesen elemzett fehérjekomponensek estében az AD könnyminták alacsonyabb koncentrációt mutattak. Ezt az érdekes megfigyelést maga a Jelölt is taglalja a dolgozat 82. oldalán. A könnyben azonosítható biomarkerek vizsgálatát a trabekulektómiát követő sebgyógyulás zavarainak követésére

is kiterjesztette, itt a fókusz az immunregulációban részt vevő fehérjék, ill. a citokinek összetételének és mennyiségi változásainak követésén volt. Megállapították, hogy a sebgyógyulás korai szakaszában megfigyelhető proteomikai eltérések asszociációja a legkifejezettebb a később fellépő komplikációkkal.

Kérdéseim ezzel az alfejezettel kapcsolatosan:

1. Van-e lehetőség a dermcidin fehérje ELISA-val történő mérésére? Jelölt azt írta, hogy a fehérje Western blottal való kvantitálása nem volt lehetséges, mert kifutott a 10%-os akrilamid gélből.
2. A 101. oldalon, a 27. ábrán a trabekulektómiát követő komplikációt mutató csoportban nagyobb gyakorisággal előforduló fehérjéket mutatja be, amelyek az ábra tanúbizonyága szerint azonban nem szerveződnek semmiféle hálózatba. Elvégezték-e a String analízist oly módon is, hogy az azonosított komponensekkel elsődlegesen interakcióban levő egyéb fehérjéket is beemelték, hiszen lehetséges, hogy az azonosított fehérjék másodlagos vagy harmadlagos módon mégis csak interakcióban vannak egymással?

IV. A **nyál proteomikai** vizsgálatával a Jelölt és munkacsoportja annak vizsgálatát célozta meg, hogy a szakirodalomban a szájüregi laphámrák tekintetében a nyálban eddig azonosított fehérje eltérések milyen mértékben lehetnek diagnosztikus értékűek hazánkban, esetleg egy korai fázisban érzékeny szűrés alapját képezheti-e bármelyik fehérje detektálása. Eredményeik szerint az IL-6 és az S100A9 fehérjék kombinációjának detektálása bírhat a hazai populációban diagnosztikus értékkel.

Kérdéseim ezzel az alfejezettel kapcsolatosan:

1. A Jelölt a 120-121. oldalon ismerteti, hogy a tajvani kutatók eredményei szerint szignifikáns eltérést mutató rezisztin fehérje mennyiségi különbségét a hazai populációban nem tudták megerősíteni. Mennyire tartja reálisnak azt a magyarázatot, hogy a szájüreg mikrobiomjának az eltérései – amely a táplálkozási szokások eltérése miatt nagyon komoly populáció specifikus különbségeket mutathat - is hozzájárulhatnak a populáció specifikus eltérés meglétéhez?
2. Összességében mi a Jelölt meglátása a szájüreg mikrobiom és a nyál proteom lehetséges összefüggéseiről?

V. A **verejték proteomja** – a Jelölt által megfogalmazottak szerint – a könny és a nyál proteomjához viszonyítva kevésbé feltérképezett. A verejték proteomjának feltérképezéséhez egészséges önkénteseket vontak be, nagy áteresztő képességű proteomikai méréseket végeztek, majd az azonosított fehérjék funkcionális és interakciós vizsgálatait *in silico* módon végezték el. Megállapították, hogy a verejtékben azonosított fehérjék nagy része a kémiai barrier részét képezik.

Kérdésem ezzel az alfejezettel kapcsolatosan:

1. A Jelölt a bevezető gondolatokban utal arra, hogy a verejték bizonyos paramétereinek mérése számos humán kórképben – cisztás fibrózis, diabétesz – fontos diagnosztikai értékkel bír, saját munkát azonban nem mutat be arra vonatkozóan, hogy az általa végzett alap proteomikai mérések bármely humán kórképben biomarker azonosításhoz alapul szolgáltak volna. Történt-e ezzel kapcsolatosan előrelépés akár a saját munkacsoportjában, vagy más munkacsoport felhasználta-e az általuk mérteket ilyen irányú vizsgálataikban?
- VI. A dolgozat utolsó fejezetében mutatja be a Jelölt a - megítélésem szerint - legkomplexebben vizsgált témában kapott eredményeit. Egy kollaborációs munka keretében a **HIV-1 fertőzést követő proteomikai változásokat** követték sejtenyészetekben. A proteomikai változások kinetikáját is követték, valamint a fehérje-fehérje kölcsönhatások időbeli változásait is. A Jelölt az adattudományban alkalmazott súlyozott hálózat módszert használta adatainak analíziséhez, és elemzéseivel az irodalomban már korábban leírt eredményeket is megerősített, ill. a vírusfertőzés korai fázisára vonatkozó új megfigyeléseket is tett. Eredményeivel jól demonstrálta, hogy az általuk kifejlesztett súlyozott hálózatkészítő és elemző módszer jól használható proteomikai adatok további analízisére, összefüggések feltárására.

Kérdésem ezzel az alfejezettel kapcsolatosan:

1. Bírálatomat 2021. március 4-én, a COVID-19 pandémia harmadik hulláma miatti hazai lezárás bejelentésének napján fejezem be. Adódik a jelen szituációban legaktuálisabb kérdés: van-e tudomása arról a Jelöltnek, esetleg ők maguk részt vettek-e olyan vizsgálatban, amely a SARS-CoV-2 vírus által a megfertőzött gazdasajtban okozott proteomikai változásokat vizsgálta (vizsgálja?), majd azt követően a Jelölt által fejlesztett módszerrel (vagy valamely hasonlóval) analizálta?

Végezetül a Jelölt a dolgozat 147-148. oldalán összegzi munkájának „**Új megállapításait**”. Ezeket a dolgozat átolvasását és értékelését követően elfogadom, nem látom szükségesnek, hogy a bírálóban ismételtelen tételesen ismertessem őket.

A Jelölt, Dr. Csósz Éva a dolgozatban bemutatott eredményekkel, azok szakszerű és mértéktartó diszkutálásával bizonyította, hogy a proteomika területén hazai viszonylatban kiemelkedő, de nemzetközi mércével is mérvadó kutatóműhelyt hozott létre, iskolát teremtett. **A doktori művet nyilvános vitára bocsátásra alkalmasnak találom.**

Szeged, 2021. március 4.

Tisztelettel:

Prof. Dr. Széll Márta

tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA doktora