

BÍRÁLAT DR. KVELL KRISZTIÁN „A tímusz életciklusát befolyásoló molekuláris célpontok azonosítása, gyógyszerészi biotechnológiai alkalmazás fejlesztése” CÍMŰ MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉSÉRŐL

Kvell Krisztián a Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Karának Gyógyszerészi Biotechnológiai Intézetéből nyújtotta be MTA doktori munkáját. Kutatásaiban a csecsemőmirigyre, mint fontos primér immunszervre fókuszál. A tímusz felelős a natív T-sejtek képzéséért, a sejtes immunválasz létrejöttéért. Ebben a folyamatban kevésbé volt tanulmányozott a limfoid sejteket - mint niche - körülvevő tímusz epitél szerepe. A tímusz epitélsejtek sejtfelszíni molekulák, szolubilis faktorok és extracelluláris vezikulák révén kommunikálnak a timocitákkal, amelyek fejlődéséhez, funkcióképes naív T-sejtekké éréséhez, differenciálódásához szükségesek. Tekintve, hogy a tímusz korai öregedést mutató szerv, zsíros involúciója az immunosenescensz egyik központi lépése, ami fokozott hajlamot teremt fertőzések és daganatok kialakulására. A tímusz otogenezisében és öregedésében résztvevő kulcsfontosságú molekuláris események megismerése lehetőséget teremt a folyamatok lassítását vagy gyorsítását befolyásoló célzott gyógyszerészi biotechnológiai módszerek alkalmazására, a célpontokra ható molekulák azonosítására, formulálására és szelektív célba juttatására. Ennek komoly népegészségügyi jelentősége van a tímusz daganatok progressziójának megfékezésével, valamint a fertőző és daganatos betegségek incidenciájának mérséklése révén. Ennek értelmében a doktori munka témaválasztása aktuális, szakmai és egészséggazdasági szempontból is fontos.

Formai értékelés:

A doktori mű formailag megfelel a támasztott követelményeknek. Összesen 204 oldal, érdemi része 81 oldal terjedelmű. Főbb fejezetei, mint Bevezetés, Anyag, módszer, Célkitűzések szokványosak. Szokatlan, hogy a Bevezetésben a téma felvetés szerepel és ettől külön fejezetben ismerteti a főbb irodalmi előzményeket. Ez a két fejezet azonban megfelelően alátámasztja a téma jelentőségét és rávilágít a még tisztázatlan kérdésekre. Ezek közül jelöli ki jelenlegi munkájának célkitűzéseit, melyek Elméleti és Módszertani fejezetre tagolódnak. A kutatási célok megfogalmazása világos. Az alkalmazott Módszerek ismertetése megfelelően tagolt, kellően részletes. Nem szokványos az Eredmények és a Megbeszélés fejezetek összevonása, melyben a saját kutatási eredmények és az irodalmi ismeretek vegyülnek, kétségkívül egyértelműen feltüntetve, hogy mi a saját megfigyelés és mi nem. Bíráló és vélhetően a többi olvasó számára is könnyebbséget jelent a kapott eredmények beágyazottsága és a már ismert megfigyelések contextusában történő ismertetése. Az Eredmények bemutatása világos és érthető. Ezzel a fejezettel kapcsolatban Bírálónak néhány további észrevétele van. 1. Az eredmények néhol valójában az eredmények sommás összefoglalásának felelnek meg. Tekintve, hogy az értekezés alapját képező 25 közlemény, pontosabban azok első lapja a doktori műben a 125. és 177. oldal között csatolva megtalálható, így az eredeti közlemények kikereshetők, ahol az eredmények ismertetése a megszokott módon és kellő részletességgel történik. 2. Az eredmények bemutatása kapcsán nem válnak szét olyan didaktikus módon az elméleti és a módszertani célkitűzések megvalósítását igazoló eredmények, mint ahogyan az a célkitűzések között megfogalmazásra kerültek. Kétségtelen ugyan, hogy ezek sok esetben egymásra épülnek, ezért nem is választhatók szét. 3. Érdemi észrevétel azonban a kapott eredményeket szemléltető, azok megértést segítő – zömében az eredeti közleményekből változatlan formában bemásolt - 45

kiváló ábra kapcsán az, hogy a dolgozatban alkalmazott ábramagyarázatok jelen formájukban nem kellően részletesek és nem kellően informatívak szemben az eredeti közleményekben publikáltakal. Ebben a formában nem felelnek meg annak az elvárásnak, hogy 1-1 ábrának és magyarázatának önállóan is pontosan érthetőnek kell lennie. A doktori mű végső formájában javaslom az eredeti ábramagyarázatok megjelenítését akár magyarnyelvre való fordítás nélkül változatlanul. Az Eredmények interpretálása objektív. A Megbeszélésben szolgált magyarázatot a kapott eredmények jelentőségére. Összeveti saját eredményeit a nemzetközi irodalmi adatokkal rámutatva, hogy a jelen kutatás hol tudott a korábbiakhoz képest új információval szolgálni. Az Összefoglalásban (69-76.oldalakon) Jelölt még egyszer kiemeli a kutatás főbb pontjait és megállapításait, azok gyakorlati jelentőségét. Jövőbeni tervei egyenesen következnek a jelen munkában felvetett és még megválaszolatlan kérdésekből. Végül megállapításait, Téziseit pontokba szedve világosan fogalmazza meg.

A dolgozat nyelvezete világos, érthető, szakszerű, olvasmányos és élvezetes. A magyar és idegen szavak írásmódja következetes és helyesen alkalmazott. Nyelvhelyességi és szerkesztési hibák csak elvétve lelhetők fel, melyek a bíráló elektronikus verziójában korrektúrában megjelölésre kerültek.

Kutatási eredményeit nemzetközi, magas színvonalú, lektorált folyóiratokban publikálta. A doktori munka alapjául 25 közlemény és 3 könyvfejezet szolgál. A közleményekből 20 db Q1-es és egy D1-es besorolású, 8-ban első szerző (ebből 1 megosztott első szerzőség), 7 közleményben utolsó szerzőként szerepel. Ezen publikációk impakt faktora: 101,409.

Tudományos és oktatási közleményeinek száma összesen 53, ezek idézettsége 905, ebből független idéző 733. Hirsch index 19, g-index 29.

A Bíráló által látott anyagból nem ítéhető meg, hogy hány közlemény született a fokozatszerzésig és mennyi azt követően.

Kutatómunkája során hat alkalommal nyílt lehetősége tapasztalatot szerezni külföldi tanulmányúton. Kutatásaiban 16 nyertes pályázat nyújtott segítséget összesen több, mint 100 M Ft értékben.

Kutatási tapasztalataiból 5 egyetemi szabadalom született.

A Pécsi Tudományegyetem nemzetközileg is elismert, neves kutatói támogatták tudományos munkájában. Nagy múlttal rendelkező munkacsoportokban dolgozhatott. A Jelölt iskolateremtő munkája is mestereihez hasonlóan kiemelkedő, 5 PhD munka született vezetésével.

Tartalmi értékelés:

Doktori munkákában új módszert dolgozott ki a tímusz funkcionális kormeghatározására. Tanulmányozta az organogenezis molekuláris és a tímusz öregedésének jelátviteli tényezőit. Vizsgálta és jellemezte az endogén zsíros involúció folyamatát, valamint a zsírszövet eredetét, melyről megállapította, hogy az epitélsejtek traszdifferenciálódásával jön létre. Azonosította a zsírszövet jellemzőit és több módszerrel is megállapította, hogy a zsíros involúció 'beige' zsírszövetet eredményez. Tanulmányozta a zsíros involúció sebességét befolyásoló tényezőket, az életmód hatását a tímusz öregedésére. Elemezte malignus tímusz daganatokban a Wnt4 autokrin hurok jelenlétét és szerepét. Vizsgálta a PPARgamma útvonal hatását a szövetkörnyezet függvényében. A tímusz életciklusát befolyásoló faktorok szöveti

szelektivitásának elérésére génmódosított vezikulákat, szilika nano-gyöngyöt és más arra alkalmas formulákat alkalmazott. Tímusz-szelektív, regenerogén exoszómák termelését valósította meg bioreaktorban.

Doktori munkája során széles metodikai jártasságról tett bizonyosságot. Kísérteleiben in vitro, ex vivo és in vivo rendszereket alkalmazott. A célkitűzések tanulmányozására lehetőséget teremtő kísérleti állatokat választott ki, tenyésztett és kezelt különböző módokon. Szöveti, sejt és molekuláris szintű vizsgálatokat végzett, sejtenyészeteket tartott fenn és kezelt, transzfektálta lentivirális vektorokkal. Transzgénikus egereket hozott létre. Egér és humán eredetű szövetmetszeteket készített, exoszómákat szeparált, ezek tartalmát és következményes funkcióját azonosította. Innovatív módosítást hajtott végre a TREC mérésére szolgáló PCR metodikában. Experimentális modellt hozott létre a tímusz öregedését lassító és gyorsító folyamatok, anyagok tanulmányozására, azok patofiziológiai jelentőségének elemzésére különböző szövetekben, eltérő lokális milliőben. Kifejezett előnye a munkának, hogy felhívta a figyelmet arra, hogy pl ugyanaz a transzkripció faktor a tímusz életciklusának különböző periódusaiban eltérő hatást fejthet ki, valamint arra, hogy ugyan az a jelpálya, annak aktivitása vagy gátlása más környezetben más, akár fiziológiás és patológiás következménnyel járhat. Így pl. porcsejteken végzett kísérletekben a PPRgamma jelpálya aktivitását vizsgálta osteoarthritisben. Innovatív gyógyszerformulákat (természetes, exoszoma alapú és mesterséges, nanogyöngy technológiát dolgozott ki a tímusz szempontjából regenerogén és progerogén anyagok szelektív célbajuttatására. Tudományos igényességgel jellemezte a rendszeres testmozgás immunológiai, betegségmegelőző hatását. Mesterséges intelligenciát hívott segítségül az adatok elemzéséhez, illetve korszerű neuronhálózatos vizsgálatot alkalmazott.

Új megállapításokként a következőket fogadom el:

I. Elméleti megállapítások:

1. Bizonyította, hogy az egér és az emberi embrionális tímusz organogenezise molekulárisan megegyezik, és erősen függ a Wnt jelpálya aktivitásától.
2. Igazolta a tímusz öregedése, zsíros involúciója során a tímusz epitelsejtek jelátviteli folyamatainak átszerveződését, továbbá azonosította a tímusz epitelsejtek identitásának hanyatlásáért és indirekt adipogén transz-differenciációjáért felelős molekulákat.
3. Ultra-strukturális, molekuláris, sejt, szöveti és anyagcsere vizsgálatokkal bizonyította, hogy az öregedés során a tímusz helyén megjelenő zsírszövet 'beige' zsírszövet, melynek forrását a tímusz epitelsejtek képezik.
4. Igazolta, hogy a TBX-1 transzkripció faktor embrionális korban organogén, míg felnőttkorban adipogén szerepet tölt be egérben és emberben egyaránt.
5. Bizonyította, hogy ha genetikai okból elmarad a tímusz zsíros degenerációja, a tímusz működése megtartott marad, melyet magas TREC érték, valamint a vakcinálás hatékonysága és megtartott orális tolerancia jeleznek.
6. Elsőként írta le (egérben), hogy már egyszeri szteroid kezelés hatására is a tímusz epitél állománya tartósan károsodik molekuláris és szövettani szinten egyaránt.
7. Elsőként igazolta, hogy mesterséges eredetű toxikus vegyület (cuprizon) hatására a tímusz epitél állománya apoptózis révén károsodik, míg egyes természetes eredetű toxikus vegyületek (Bg és Da kigyómérgek) piroptózis révén fejtik ki a tímusz epitelt károsító hatásukat.

8. A rendszeres testmozgás tímuszra kifejtett hatását tanulmányozva emberen igazolta annak regeneratív hatását (magas hTREC érték), mely mesterséges neuronhálózatos vizsgálat alapján egy domináns fiziológiai paraméter. Azonosította továbbá a rendszeres testmozgás hatására legnagyobb eltérést mutató miRNS fajokat, rámutatva a sport betegség-megelőző hatásának új aspektusára.

9. Bizonyította emberi tímusz daganatok esetében, hogy a malignitás mértékével arányosan Wnt4 autokrin hurok révén tartják fenn fokozott osztódásukat a daganatos sejtek.

10. Elsőként számolt be tímusz epitelsejtekből származó exoszómák 'homing' jelenségéről, miszerint ezen exoszómák erős kötődést mutatnak tímusz szövettani metszeten, illetve egér tímuszban *in vivo* fokozottan dúsulnak.

11. Igazolta ectopias humán Wnt4 over-expressziót mutató transzgenikus egér tímusz epitelsejtekből származó exoszómákban a Wnt4 fehérje fokozott jelenlétét és aktivitását, emellett a természetes módon bedúsuló és szintén PPARgamma antagonistá hatású miR27b jelenlétét.

II. Metodikai újítások:

1. Adaptálta a tímusz funkcionális korának meghatározására alkalmas hTREC mérést egy egyszerre érzékeny és precíz 3D qPCR platformra, valamint azt, hogy a mérés szűrőpapírra beszárított vércseppből is (DBS) kivitelezhető legyen. Ez lehetővé teszi költséghatékony regionális szűrőközpont működtetését (pl. SCID mutációk újszülött-kori szűrővizsgálatára).

2. Kidolgozott *in vitro* rendszert egér (TEP1) és emberi (1889c) sejtekkel a tímusz epitél öregedésének modellezésére, progerogén (szteroid) és regenerogén (Wnt4) kontrollal és adaptált egy nagy áteresztőképességű (HTS) rendszert a tímusz epitél öregedését befolyásoló molekulák hatásának kimutatására (LipidTox festés).

3. Természetes (Wnt4 exoszóma-alapú), a tímusz epitél sejtek öregedését lassító, *in vitro* és *in vivo* is alkalmazható regenerogén kezelést, valamint mesterséges (szteroid szilika nanogyöngy-alapú) tímusz epitél sejtek öregedését gyorsító, *in vitro* és *in vivo* alkalmazható progerogén kezelést dolgozott ki és mindkettővel kapcsolatban megkezdte a szabadalomkutatótást

4. A természetes regenerogén kezeléshez pilot léptékű bioreaktoros (3D flow bioreaktor) termelési protokollt (3×10¹² exoszóma / 100 mL médium / hónap) dolgozott ki.

A doktori munkával kapcsolatban a Bírálóban felmerülő kérdések, észrevételek:

1. Több helyen említi (pl. 9., 36. o.) a tímusz öregedésével és funkciócsökkenésével járó immunpatológiák között az autoimmun betegségeket. Ezzel kapcsolatban Bíráló megjegyzése, észrevétele az, hogy közzismert a myasthenia gravis, mint idegrendszert érintő autoimmun megbetegedés és a thymus persistens közötti kapcsolat. Ezen túl több közlemény foglalkozik pl. az SLE és a thymoma vagy thymus persistens közötti asszociációval. A tímusznak tehát nem a hiányos működésére vezethetők vissza ezek az autoimmun betegségek, bár kialakulásuk és a tímusz működésének változása között van összefüggés, csak ellenkező irányú. Az is emellett szól például, hogy a lupus fiatal felnőttkorban (a 20-as, 30-as életévekben) indul, amikor még a tímusz teljes zsíros involúciója vélhetően nem következett be, azaz működésének jelentős hiánya nem áll fenn. Kérdés: Van-e arra utaló irodalmi adat, hogy az SLE juvenilis, azaz 16 év alatt kezdődő formájában volnának a tímusz korai involúciójára utaló adatok, vagy pl. vizsgáltak-e TREC-et és az igazolta-e a tímusz csökkent működését?

A 37. oldalon hivatkozott 103-as referenciában a következő olvasható: "TREC content has also been studied in a group of patients with rheumatoid arthritis and found to be decreased. This observation led the authors to speculate that rheumatoid arthritis patients have reduced thymic function, which might play a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis" Vagyis a szerzők is csak spekuláltak ezen, de nincs direkt bizonyíték az asszociációra. Az RA eleve idősebb korban indul, amikor a tímusz involúciója már bekövetkezett. Ezek alapján a tímusz működése, involúciója és az autoimmun betegségek közötti kapcsolat valószínű sokkal árnyaltabb.

2. A 22. oldalon azt olvassuk a cuprizon kezeléssel kapcsolatban, hogy a kísérleti állatok tetszőleges mennyiséget vettek magukhoz konstans arányú cuprizont tartalmazó tápból. Ez azt jelenti, hogy egyedenként a felvett cuprizon mennyisége eltérő volt. Nem befolyásolta ez a kísérlet eredményét?

3. A 22. oldalon a humán tímusz mintákkal kapcsolatban kérdés: Milyen személyektől származtak a normál tímusz minták?

4. A 28. oldalon az emberi porcsejtes kísérletek kapcsán kérdés, hogy milyen egyénektől nyertek femorális kondilust? Egyébként is megtörtént volna a beavatkozás (biopszia/explantátum nyelés) vagy ez volt a fő indikáció? Voltak-e tájékoztatva a donorok arról, hogy kísérletben használják fel a tőlük nyert mintát és ha igen, adtak-e beleegyező nyilatkozatot? Volt erre is etikai engedély?

Van-e más módszer is a humán porcsejtek apoptózisának vizsgálatára, mint a festékkizárásos módszer és ha igen, miért emellett döntöttek?

5. A 39. oldalon Az organogenezis molekuláris tényezői fejezetben mennyire volt jó választás genetikai defektus miatt indikált terhességmegszakításból nyert humán magzatban vizsgálni a tímuszt? Biztos-e, hogy az adott genetikai hiba nincs hatással a tímusz organogenezisére vagy nincs kapcsolatban azzal? Nem lett volna-e szerencsésebb nem kívánt terhesség megszakításából nyert magzati tímusz feldolgozása?

6. A 45. oldalon sem a szövegből, sem a 14. ábrából nem derül ki, hogy az 1 hónapos és 1 éves korban egérben történt mérési eredmények közötti különbség statisztikailag értékelésre került-e és ha igen, az szignifikánsnak tekinthető-e. (Wnt4, FoxN1, LAP2alfa, lamin1, PPRgamma, ADRP, E-cadherin, N-cadherin mRNA expresszió).

7. A 48. oldalon a kép alatti szövegrészben a 15. ábrára hivatkozik, ami valószínű elírás és a 19. ábra baloldali részére hivatkozik valójában.

8. Az 50. oldalon a 22. ábrán bemutatott TREC mérések PPARgamma KO egérben mennyi idősen történtek?

9. Az 51. oldalon a 24. ábrán A szteroid-kezelés (DX) tímusz epitélre kifejtett hatása került bemutatásra molekuláris (mRNA expresszió) és szöveti szinten (immunfloreszcens festés) egér modellben, akut kezelés (bal, 24 h) és krónikus kezelés után (jobb, 3 hónap). Akut szteroid kezelésre a PPRgamma mRNA expresszió nő, míg krónikus kezelés hatására csökken. Hogyan értelmezhető ez? Az ábra A részének baloldalán FOXN1 és Wnt4 expresszió változása van feltüntetve. Mely időpontokat jelöl a 3-3 pár oszlopgrafikon?

10. Az 52. oldalon olvashatjuk: „Kutatásainkat nemzetközi kollaborációban folytatva és a fókuszot tágítva állati toxinok (pl. kígyómérgek) hatását is teszteltük az immunrendszer limfoid (pl. makrofág) és mesenchymális (pl. tímusz epitél) elemein egyaránt. Bíráló megjegyzése, hogy a monociták/makrofágok NEM limfoid elemek, hanem mieloid progenitorokból differenciálódnak.

11. A 62. oldalon a 40. ábrából nem derül ki, hogy a bemutatott sejt daganatos vagy egészséges tüdőepitéljét mutat-e, vagy hogy mi a különbség a kettő esetében az exoszómák tulajdonságait

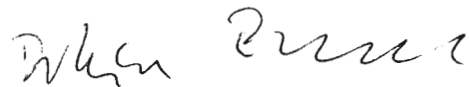
illetően. Az ábrán a sejten belül a, b, c-vel jelölt folyamatokat magyarázni szükséges az ábrafeliratban. Minden ábrának önmagában is értelmezhetőnek kell lennie! A formai részben tett észrevétel sok ábra esetében tartalmi észrevételként is említhető.

12. A 69. oldalon az Összefoglalásban olvashatjuk, hogy a hagyományos qPCR alapú módszert adaptálta 3. generációs digitális PCR platformra, melynek előnye a korábbi platformhoz képest, hogy egyszerre fokozottan érzékeny és precíz, de sem itt, sem az Eredmények fejezetben nem szerepel direkt összehasonlító vizsgálat a szenzitivitás és specificitás jellemzésére a két módszer kapcsán.

Mindezek a kérdések a dolgozat lényegét nem érintik, mindössze a Bíráló érdeklődését tükrözik, melyek a doktori pályázat olvasása kapcsán felkeltették e témakör iránti szakmai lelkesedését.

Kvell Krisztián MTA doktori pályázata az alap- és a transzlációs kutatás határterületén új eredményekkel gazdagítja az immunológia, a molekuláris biológia és a gyógyszerészeti ismereteket, tudományterületeket. Megfigyeléseinek elméleti és gyakorlati jelentőségük van. **A doktori mű messzemenően megfelel az MTA doktora fokozat elnyerésével szemben támasztott követelményeknek.** Egy kiváló munka, amely alapján **javaslom a munka nyilvános vitára bocsájtását és sikeres védelem esetén a fokozat odaítélését.**

Budapest, 2024. július 16.



Prof. Dr. Kiss Emese

egyetemi tanár, az MTA doktora