

**MTA Doktori Értekezés Bírálólat**

Vélemény Dr. Kobolák Julianna Ilona „Össejtek *in vitro* felhasználási lehetőségei az állatbiotechnológia, a betegség modellezés és toxikológia területén” című doktori értekezésről.

dr. Kobolák Julianna Ilona magyar nyelven írt doktori értekezése 106 oldal irodalomjegyzék nélkül, melyben a következő fejezetek szerepelnek: 30 oldal bevezetés, ami magában foglalja a célkitűzéseket, ezt követi a részletes módszertani ismertetés 12 oldalon, amit 5 táblázat külön mellékletként támogat. A 30 oldal eredményeket 18 oldal megbeszélés követi és 25 oldal irodalom szerepel a dolgozat végén.

Bevezetesként megállapíthatom, hogy a benyújtott dolgozat szerkezeti, tartalmi szempontból megfelel az MTA doktori értekezés követelményének. A dolgozat kivitelezése igényes. A doktori mű 30 ábrát tartalmaz, melyek többsége összetett, többszörös immunfluoreszcens festéssel jelölt sejtenyészetek képét mutatja számos alábrával. Kiemelendő a szerző rendkívül jártassága az össejtek tenyésztésében és genetikai analizisében. A közel 400 irodalmi hivatkozás száma a jelölt alapos irodalmi tájékozottságát bizonyítja, mindössze annyi észrevételem van, hogy az össejtkutatás robbánsszerű fejlődése és ezen a területen dolgozó kutatókat foglalkoztató aktuális kérdések tükrében a legfrissebb irodalmi hivatkozások száma lehetett volna több.

Az össejteket célzó alap-, és alkalmazott kutatások az utóbbi évek legizgalmasabb kutatási területét jelentik. A disszertáció témaválasztása messzemenően aktuális, hiszen napjainkban az össejtkutatás egyik fő célpontja a transzplantációra, szöveti regenerációra alkalmas össejtek azonosítása, izolálása, programozott *in vivo* és *in vitro* differenciáltatása, valamint veleszületett és szerzett rendellenesség sejt, szövet és molekuláris szintű modellezése. Az össejtek feltárását célzó kutatások a regeneratív medicina szempontjából kiemelt jelentőséggel bírnak; az alapkutatásból nyert eredmények transzlációja sikeres szöveti regenerációt kiváltó össejtterápiák kidolgozását teheti lehetővé. Mindehhez fontos hozzátenni, hogy a betegekből származó sejtek célzott programozása, hosszútávú reprodukálható fenntartása, hatékony személyre szabott gyógyszeres terápiák kifejlesztését alapozhatják meg, ezért egyáltalán nem közömbös, hogy az össejt miként fejlődik és hogyan reagál a farmakonokra.

Az MTA doktorjelölt össejtes kutatómunkája több mint 2 évtizeddel ezelőtt indult, amikor még nagyon limitált lehetőségek álltak az össejtenyésztek számára. Ahogy az *in vitro* technológia fejlődött egyre több módszert, naprakész technikát vezetett be a kísérleteibe. Tudományos munkájának kiemelt kutatási célja (az értekezéshez felhasznált előszerzős cikkek is ezt támasztják alá) a pluripotens össejtek létrehozásának tökéletesítése, a pluripotenciáért felelős POU5F1 transzkripciós faktor jellemzése nyúl modellben, az indukált pluripotens össejtek alkalmazása idegrendszeri betegségek modellezésére, valamint *in vitro* farmakológiai vizsgálatokra történő felhasználása. A disszertáció 6 első-, és egy társszerzős cikkben publikált 10 éves labormunka eredményét foglalja össze.

Formai megjegyzések:

A doktori értekezés **Irodalmi bevezetés** fejezetében jól áttekinthető formában foglalja össze az össejtek *in vivo* tulajdonságait, típusait, besorolását, a pluripotencia genetikai háttérét, *in vitro* létrehozását, az össejtek genetikai újraprogramozásának módjait, különösen kiemelve a disszertációt témáját képező össejtelapú betegségmodellezést. A logikus felépítésű bevezetésben először a pluripotens sejteket mutatja be, ezután lépésről-lépésre vezet végig a pluripotencia



1094 Budapest, IX., Tűzoltó u. 58.
Levélcím: 1085 Budapest, Üllői út 26.
Tel.: 218-2101, Fax: 215-3064

molekuláris szabályozásán, majd a genetikai újraprogramozás és azzal előállított őssejtek alkalmazási lehetőségeit foglalja össze. Az őssejtek leírása mellett, a korai embryotenyésztés teljes metodológiai spektrumát is bemutatja és teszi ezt világos, érthető, magasszintű magyar szaknyelven, ami nemcsak a szakember számára hasznos szintézis, hanem a témával ismerkedő TDK, PhD hallgatók számára is bátran közreadható. Az irodalmi áttekintés utolsó részében bemutatásra kerülnek az iPSC őssejtalapú betegségmodellezés (MPS II lizoszómális tárolási rendellenesség) és az őssejtek toxikológiai vizsgálatokban való alkalmazása, ami a jelölt kiemelt kutatási területét is képezi.

Az Anyag és Módszer fejezetből kitűnik, hogy a jelölt a kísérleteihez sejtes és molekuláris labortechnikák széles skáláját (egér és humán iPSC sejtenyésztés, őssejtek izolálása blasztula embryokból, kettős-, hármass-immunfluoreszcens festés, fluoreszcens áramlási citometria, RT-PCR, cDNS microarray, komparatív genomikai vizsgálatok, célzott neurális sejt differenciáltatás, neuroszferoidok létrehozása), illetve elektronmikroszkópiát használt, s ez a metodikai háttér teljesen megfelel a kitűzött célok megvalósításához. A felhasznált ellenanyagok, vegyületek, primerek külön táblázatokban feltüntetve szerepelnek, katalógus számokkal feltüntetve, ami szintén rendkívül hasznos lehet több hazai kutató számára. A kísérleti eredmények leírása és megbeszélése világos és érthető. Az eredmények elbírálásakor rögtön feltűnt, hogy a bemutatott ábrák a jelölt által első- és társzerzőként jegyzett, elismert folyóiratokban elhelyezett közleményeiből származnak, így korábban ezek már alaposan elbíraltak. A Következtetés fejezetnek kiemelten izgalmas részei a Kitekintés című alfejezetek voltak (kár, hogy az 5.4 és 5.5 részek után ez hiányzott), ahol a szerző a lezárt kutatási eredmények továbbgondolását, a tudományterületre gyakorolt hatását írta le és a újabb kérdéseket fogalmazott meg.

Kérdések, megjegyzések:

10. oldal. Az 1. ábrához hasonlóan jó lett volna, ha van egy olyan sémás rajz is, ahol az ERSE és APE sejtek is illusztrálva vannak. Van-e arra adat, hogy humán embryóban is pluripotens tulajdonság jellemzi az epiblaszt sejtréteget?

Etikai szempontból, Magyarországon meddig engedélyezett humán embryot tenyésztben fenntartani?

11. oldal: hányszor lehetet (vagy lehetett?) az embryodarabolást megismételni ugyanazon a vonalon, úgy hogy még teljes értékű embryok jöjjenek létre? Mikor merül ki a pluripotencia a darabolt blasztomerekben?

Az ESC sejt vonalakat rendszerint blasztula ICM-ből alapítják. Lehet morulából vagy csak egy blasztomerből pluripotens sejt vonalat létrehozni?

Lehet-e alacsonyabb rendű gerincesekben (hüllő, kételtű) is létrehozni pluripotens őssejt vonalat?

25. oldal: az 5. ábra a 10 évvel ezelőtti állapotot foglalja össze. Izgalmas lett volna olvasni, hogy a szakember szerint mi a helyzet a 2023-24-es években. Hol tart ma az iPSC sejtek előállítása és felhasználási potenciálja? Mi a legfigyelemre méltóbb felfedezés, ami az elmúlt egy évizedben történt ezeknek a sejteknek a klinikai alkalmazásában?

Van-e olyan marker/ellenanyag, ami a hosszú ideig fenntartott pluripotens őssejtklonokban kizárólag a differenciálatlan alakokat jelöli és ezzel ellenőrizni lehet a pluripotens sejt vonal állapotát?



1094 Budapest, IX., Tűzoltó u. 58.
Levélcím: 1085 Budapest, Üllői út 26.
Tel.: 218-2101, Fax: 215-3064

A microarray génexpressziós vizsgálatok a genomnak csak töredékét vizsgálja. Végeztek-e ennél mélyebb szintű (pl. RNAseq, ATACseq) genetikai analíziseket a sejtmagtranszplantált eredetű embryok őssejtjein?

-75. oldal: milyen LAMP2+ struktúrákra (vakuolumokra) gondol? Van-e saját elektronmikroszkópos eredmény arra vonatkozóan, hogy nagy számú lizoszóma van az NPC és TD35 sejtekben?

-milyen szerepet töltenek be a lizoszómális fehérjék az idegi sejtekben?

-Milyen kritériumok alapján lehet teljes biztonsággal megállapítani, hogy az iPSC sejtekből programozással differenciált neuronokat hoztunk létre? Milyen a neurális differenciáció %-os hatékonysága?

Csak elvétele találtam gépelési hibát: 28. oldal: ebroidok; a fogpép helyett a fogpulpa javasolt"

A munka legfontosabb eredményeinek tartom az alábbiakat:

1. az ún. *zona pellucida*-mentes sejtmagátültetési genetikai újraprogramozással egér embryokból embryonális őssejtvonalakat állított elő, kidolgozta az *in vitro* módszertanát és karakterizálta.
2. igazolta, hogy a sejtmagátültetési újraprogramozással létrehozott embryokból előállított embrionális őssejtvonalak (ntESC) pluripotenciájuk és gének expressziós mintázatuk szerint nem mutatnak jelentős eltérést a hagyományos, megtermékenyítéssel előállított embriókból létrehozott embrionális őssejtekhez képest.
3. elsőnek írta le a POU5F1, mint fő pluripotencia szabályozó gén regulátor régiójának expresszióját nyúl embryo trophoblast sejtekben.
4. több állatfaj (egér, szarvasmarha, sertés) embryoinak és őssejttenyészetekének komparatív analízise során új pluripotencia markergének expressziójának leírásában vett részt.
4. az MPS II lizoszómális tárolási betegségben szenvedő páciensek vérsejtjeiből alapított indukált pluripotens őssejtek neurális szöveti irányú differenciáltatásával igazolta, hogy a patológiai kórkép a betegséget kódoló mutációt hordozó idegsejtekben a lizoszómális útvonal zavara miatt következik be.
5. 3D neurális tenyészeteket hozott létre iPSC sejtekből, és bizonyította, hogy az őssejt alapú *in vitro* 3D neurospherek alkalmas tesztrendszer jelentenek toxikológiai és gyógyszerjelölt-vegyületek vizsgálatához.

Összefoglalva, dr Kobolák Julianna Ilona pluripotens őssejtek, izolálásának, differenciálódásának és manipulációjának alapvető kísérletes és molekuláris mechanizmusait tisztázta. Munkájának eredményei hitelesek, mind minőségileg, mind mennyiségileg kiemelkedőek. A jelölt a disszertációjában bemutatott tudományos munkássága alapján messzemenően megfelel az „MTA Doktora” cím követelményeinek.

A doktori művet nyilvános vitára alkalmasnak tartom.

Budapest, 2025. május 23.

Dr. Nagy Nándor
egyetemi tanár, MTA doktora