

Bírálat

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

A dolgozat témája kétségtelenül időszerű és hasznos, különösen a jelenlegi tudományos környezetben, ahol az állatkísérletek számának csökkentése és a humán transzláció növelése egyre nagyobb hangsúlyt kap. Az állatkísérletek során elért fontos eredmények mellett fontos kiemelni, hogy az *in vitro* kísérletek jelentősége folyamatosan nő, gyakran kiegészítve, sőt néha már fel is váltva az *in vivo* modelleket. A dolgozat pluripotens, *in vitro* modellek létrehozását mutatja be nukleáris transzfer és visszaprogramozás módszereivel, illetve konkrét példákkal illusztrálja a pluripotens össejtek gyakorlati felhasználását, ami különösen értékes hozzájárulást nyújt a terület fejlődéséhez. A munka egyik kiemelkedő erőssége, hogy több állatfajt és emberi sejteket is bemutat, lehetővé téve a fajok közötti összehasonlítást, ami rendkívül tanulságos.

Az MTA doktori értekezés hivatalos bírálója viszonylag könnyű helyzetben van a mű tudományos újdonsága, értéke, illetve a bemutatott eredmények hitelessége megítélésének kérdésében, mivel ezt a tudományos közvélemény objektív, mérhető módon már megtette helyette. Dr. Kobolák Julianna Ilona értekezése 7 elismert nemzetközi közleményen alapul, amelyek mindegyike eredeti kutatás. A közlemények közül hatban első és egyben társszerző mutatva, hogy a létrejöttükben meghatározó szerepet játszott és a jelölt saját munkájának tekinthetőek. A dolgozat végén, további 8 társszerzős, a doktori mű témájához kapcsolódó közlemény is említésre kerül, ami a jelölt a tématerületen való beágyazottságát jelzi. A közlemények átlag impakt faktora ugyan nem magas, de az eredmények tudományos fontosságának megítéléséhez figyelembe kell venni, hogy a terület kifejezetten úttörő, és alapkutatás jellegű. Ennek

megfelelően, a PhD utáni közleményekre érkezett összesen 1469 független hivatkozás, amely magasan teljesíti a doktori szint minimális elvárását, jónak mondható.

Az értekezés követi a tudományos cikkek hagyományos szerkezeti felépítését. Jól szerkesztett, alig található benne elütés vagy helyesírási hiba (kivétel pl. 1 táblázat címe vagy a 4. ábrán bent maradt angol felirat). A stílus tudományos, időnként túl részletes, ami a téma mélységének bemutatásához hozzájárul ugyan, de a gondolatmenetek követését megnehezíti. Terjedelme, a rövidítések jegyzékével és az kiegészítő összefoglaló táblázatokkal 142 oldal, amelyet 39 ábra és 20 táblázat tesz szemléletessé. Megállapítható, hogy terjedelmében és felépítésében az értekezés kielégíti az MTA doktori értekezésekkel szemben támasztott formai követelményeket, a jelölt tudományos teljesítményének megítélésére alkalmas önálló tudományos mű. A bevezetés arányaiban és mélységében is megfelelő. A témában kevésbé járatos olvasó számára is érthetően megvilágítja a téma tudományos hátterét. A célkitűzések világosan megfogalmazottak, amelyre mintegy válaszul a tudományos eredményeket felsorolja az értekezés végén.

A kísérleti módszerek fejezet elegendő információt tartalmaz az alkalmazott módszerek elvének, valamint azok megfelelő használatának megállapítására. Az alkalmazott technikák, legalábbis a kísérletek elvégzésének idején, többnyire a tudományterület csúcstechnológiáját képviselték, valamint tanúbizonyságot adnak a szerző széles metodikai jártasságáról.

Az eredmények jól ilusztráltak, jól dokumentáltak. Az ábraalírások többnyire elég informatívak. A több száz hivatkozás széles tájékozottságról tesz tanúbizonyságot és megfelelő helyen idézett.

Az értekezés Dr Kobolák Julianna Ilona nevéhez köthető új tudományos eredményeinek az alábbiakat tartom:

1. A kutatásai során kidolgozta a zona pellucida-mentes sejtmagátültetési módszert egér embrionális őssejtvonalak előállítására, különböző sejtmagdonor sejttypusok felhasználásával, és széleskörűen jellemeztem az előállított ntESC sejtvonalakat.
2. Bizonyította, hogy az ntESC sejtvonalak pluripotenciája és génexpressziója nem mutat jelentős eltérést a hagyományos, megtermékenyítéssel előállított embrionális őssejtektől.
3. A POU5F1 gén regulációjának nyúl embrióban való elemzése során megállapította, hogy a gén regulációja fajspecifikus, és elsőként írta le annak trofoblaszt-specifikus expresszióját. Továbbá, több állatfaj (egér, szarvasmarha, sertés) embrióinak és

őssejttenyésztéseinek összehasonlítása során új pluripotencia markergének expresszióját is leírta.

4. A kutatás során kimutatta, hogy genetikai eredetű betegségek in vitro modellezése lehetséges indukált pluripotens őssejtek megfelelő differenciálásával, például az MPSII neurológiai fenotípusának vizsgálatával.

5. Végül, 3D szövettényesztési módszer alkalmazásával neurális tenyészeteket differenciáltatott iPSC sejtekből, bizonyítva, hogy ezek az őssejt alapú in vitro 3D neurális szövettényeszetek alkalmas tesztrendszer nyújtanak toxikológiai és gyógyszerjelölt-vegyületek vizsgálatához.

Mindamellet, hogy a dolgozatot igényesen összeállított műnek tartom, az alábbiakban szeretném felhívni a figyelmet néhány hiányosságra és pontatlanságra.

- A 18. oldalon írja” A nyúl esetén az iPSC előállítás, habár sikeres, primed állapotú sejteket eredményezett, amelyet részben a médium összetétel módosításával lehetett részben módosítani (Honda et al., 2010; Honda et al., 2013). “ Értelmezné, hogy pontosan mi is történt ezekben a kísérletekben?
- A 23. oldalon írja, hogy a “létrehozott iPSC sejtek a sejtmorfológia, a génexpressziós profil s a teratoma képzés alapján megkülönböztethetetlenek az embrionális őssejtektől. “ Ezt elég elnagyolt megfogalmazásnak tartom, mivel a dolgozatban szerepel, hogy a különböző pluripotens állapotok és a különböző módszerrel létrehozott őssejtek különböző génexpressziós mintázattal rendelkeznek. Pontosítaná a kijelentést?
- Szintén a 23. oldalon írja, hogy az újraprogramozó faktorok “rövid ideig kell, hogy aktívak legyenek”, ugyanakkor nem tesz említést a transzpozon alapú újraprogramozásról, ami lehetővé tette ennek a ténynek a felismerését. Röviden ismertetné, a transzpozon alapú génbevitelt is, különös tekintettel erre az áttörést hozó kísérletre?
- 4.1.1. és 4.1.2. fejezetekben jó lett volna tisztázni, hogy milyen sejtmagdonort használtak, illetve a bevezetésben néhány szót ejteni a PGA módszerről a jobb érthetőség kedvéért.
- 14. táblázat SSEA1 expresszió megfelel a pluripotencia kritériumoknak? Tudomásom szerint az általánosan elfogadott kritérium az, hogy 90% fölött legyen. Bemutatna reprezentatív FACS méréseket, hogy az eloszlást is meg

lehessen ítélni? Egy széthúzott populáció vagy esetleg több populációt mutatnak a görbék?

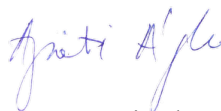
- 15. táblázat Megmagyarázná, hogy hogy lehet a kettős pozitív sejtek aránya nagyobb, mint külön-külön (pl. POU5F1-SOX2)?
- A következő megállapítást is pontatlannak tartom „Tanulmányom volt az első, amely bizonyította, hogy a szomatikus és embrionális egér sejtek sejtmagjából *zona pellucida*-mentes sejtmagátültetési (ZF-NT) technikával pluripotens ntESC sejtvonalak nyerhetők.”- A kumulusz, az mESC és a MEF sejtek közül melyik nem embrionális?
- Végül szeretném megjegyezni, hogy a dolgozat magas szakmai szintű igényessége megkívánta volna a statisztikai módszerek megemlítését. Néhány helyen teljesen hiányzik (9, 11, 21, 23 ábrák), ahol szerepel szignifikancia érték, ott pedig, az ATP-életképesség mérés kivételével, nincs feltüntetve a statisztikai módszer.

A doktori művel kapcsolatban a következő kérdéseket teszem fel a jelöltnek:

1. A bevezetőben az írja, hogy a SOX2 és a KLF4 transzkripciós faktorok „nem elhagyható/helyettesíthető”-k az újraprogramozás során. Pontosan hogyan érti ezt? Nem maradhat ki az újraprogramozási gének közül vagy a hiányukban nem megy végbe az újraprogramozás? Tudna olyan példákat említeni, amikor e két faktor bevitel nélkül programoztak vissza szomatikus sejteket? Véleménye szerint lehetséges-e a Yamanaka faktorok használata nélkül újraprogramozni?
2. Egy alfejezet foglalkozik a pluripotencia különböző formáival (naív, rozetta, primed). Azon kívül, hogy a fejlődés megismerése szempontjából nagyon fontos e stádiumok jellemzése van-e gyakorlati következménye annak, hogyha különböző állapotú őssejtekkel végzünk differenciációs vagy kiméra képzési kísérleteket?
3. A 19.oldalon írja, hogy “újraprogramozási eljárások az egyedfejlődési program „leradírozására” törekednek, “. Mi a véleménye és tapasztalata arról, hogy az indukált pluripotens őssejtvonalakban mennyire igaz, hogy az epigenetikai jelek teljesen leradírozódnak?
4. Toxikológiai kísérleteikben neuroszferoidokat használtak, amelyeket iPSC-kből differenciáltattak. Ebben az esetben mi a különbség a neuroszferoid és az organoid között?

Összegezve, Dr Kobolák Julianna Ilona jelentős tudományos eredményekkel járult hozzá egy egyenlőre kevésbé felderített terület tudásanyagának bővítéséhez. MTA doktori értekezése mind tartalmi, mind formai szempontból megfelel az elvárásoknak, ezért javaslom értekezésének nyilvános vitára bocsátását, és sikeres védelem esetén számára az MTA Doktora cím megadását.

Budapest, 2025. 03. 28.



Ágota Apáti, Ph.D. , DSc.

Laboratory of Human Pluripotent Stem Cells
Institute of Molecular Life Sciences
Research Centre for Natural Sciences
Magyar tudósok körútja 2.
1117 Budapest, Hungary

Phone: +36-1+382-6607

E-mail: apati.agota@ttk.hu