

Opponensi vélemény dr. Wikonkal Norbert: „A keratinociták fiziológiás és patológiás változásai környezeti hatásokra és ezek szerepe bőrtumorok kialakulásában” c. MTA doktori értekezéséről

A jelölt témaválasztása klinikailag és sejtbiológiailag igen fontos: a környezeti UV expozíció bőrhámra gyakorolt hatásainak elemzése abból a célból hogy ennek révén a nem-melanoma típusú bőrdaganatok carcinogenezisének mechanizmusát jobban megértsük. A kérdésfeltevés illetve a forrongó kérdések körének változása a disszertációban jól nyomon követhető, hiszen az egyik felének középpontjában az UV-indukált p53 szerepét tanulmányozta, míg a későbbi kutatások egy részében már a PTCH gén szerepe került előtérbe, ahogy a kutatások egyre inkább igazolták, hogy emberi viszonyok között a soklépcsős karcinogenezisben csak az egyik genetikai hiba a sok közül a p53 mutáció, de úgy tűnik hogy a basalioma keletkezésében az un. sonic hedgehog jelpálya a kulcsszereplő, hiszen ennek genetikai hibája gyakori.

Az értekezés 130 oldal terjedelmű melyet 365 irodalmi hivatkozás követ. Ezen hivatkozások kevesebb mint 10%-ban található a beadást megelőző 3 év referenciái.... A disszertáció 40 oldal bevezetéssel kezdődik, melyet a Célkitűzések, majd egy 13 oldalas Anyag és Módszer fejezet követ, melyben számos korszerű in vitro és in vivo módszer található melyekkel keratinociták (egér és ember) viselkedését és biológiáját tanulmányozta a szerző. Igen részletes a molekuláris genetikai metodikai tárház, melyben p53 exon 8 mutáció vizsgálatról E2F1 transzfekción át piroszekvenáláson és DNS microarray elemzéseikig sok minden megtalálható reprodukálható módon. Fontos és érdekes az Xpa^{-/-} és Csb^{-/-} valamint a p53^{-/-} és a E2F1 ^{-/-} knockout egerekkel kapcsolatos metodika bár ezeket nem a jelölt állította elő. Ugyanakkor originális az un. Sunburn sejtek elemzésére vonatkozó metodika. A bioaktív lipidek sejtdifferenciációt befolyásoló hatásainak vizsgálata során elemezte ezek génexpressziót befolyásoló szerepét melynek kapcsán promoter extrakciós bioinformatikai elemzéseket is végzett a disszertáció szerint.

A leírt módszerek részletes ismertetése hitelessé teszi azok eredményeinek felhasználását azonban az ezek mögött lévő közlemények szerzői között elfoglalt helye kérdéseket gerjeszt miután 4 alapvető dolgozatban a jelölt többedik társzerző (a PTCH génre vonatkozó, a HIF1a expresszióra vonatkozó, a szfingolipidekre vonatkozó és a keratinocyta differenciációra vonatkozóakban), így nyilvánvaló hogy ezen munkákban nem meghatározó volt szerepe

azonban a disszertációból nem derül ki hogy a kísérletek mely részéhez járult hozzá tevőlegesen illetve hogy a publikációkban milyen szerepet játszott a jelölt?

A jelölt elemezte a DNS excíziós repair folyamatainak szerepét az UV indukált keratinocita apoptosis indukcióban a Sunburn sejtek megjelenésében. Igazolta hogy a transzkripcióhoz társuló hibajavítás károsodásakor fokozódik a Sunburn sejtek keletkezése és ezekben a p53 expresszió, míg a globális genomrepair károsodásakor nem. Azt is igazolta, hogy a p53 expresszió mellett az MDM2 fehérje expressziója lecsökken a fenti genetikai konstelláció esetén. A jelölt feltevése szerint a globális genomrepair genetikai károsodott egyénekben (XPC mutánsok) UV hatására fokozott bőrdaganatképződés oka az, hogy egyidejűleg nem fokozott az apoptosis készség, így a genetikai hibák felhalmozódásának nincsen gátja. A továbbiakban elemezte a Sunburn sejtek keletkezése, mint az UV expozíció markere, p53-szabályozási útvonalát. Nem publikált eredményei szerint több CDKI (p21,p27) nem fontos eleme a p53-indukált apoptosishoz. Ezért az E2F1 transzkripciós faktor szerepére fordítottak figyelmet mivel E2F1KO egerek álltak rendelkezésre. A várakozásokkal ellentétben az ilyen állatokban az UV indukálta hámsejt apoptosis készség fokozódott, ennek kontrollja az E2F1 knock-in egerekben meg csökkent volt. A továbbiakban a p53/E2F1 hierarchiát kettős knock-out állatokban elemezte és bizonyította, hogy a p53 az apoptosis szabályozásban upstream-pozícióban van az E2F1-hez képest. Rákbiológiai szempontból izgalmas az, hogy a p53 elvesztésével megnövekedett spontán daganatkeletkezést az E2F1 vesztés felül képes írni, így a jelölt munkacsoportja felvetette hogy a p53-hiányos daganatok esetében a kemoterápiás érzékenység fokozásához az E2F1 útvonal célzott modulációja hasznos lehet.

Igen érdekes és originális az a vizsgálata amelyben az UV indukált p53 mutáns bőrhámsejt klónok dinamikáját elemezte in vivo epidermális lemez-módszerrel. Igazolta a field-carcinogenezis elméletet ebben a rendszerben is, azaz a többszörös klónkeletkezés tényét, de új az hogy a bőr esetében ennek sajátos progresszióját figyelte meg ami az epidermális proliferációs egységenkénti sajátos klonális expanziót jelent. Ugyanakkor azt is kimutatta hogy a folyamatot a folyamatos UVB expozíció gyorsítja. RAG1-Ko B és T sejt immunhiányos egerekben az UV indukált p53 mutált hámsejtklónok azonos számban keletkeztek ami arra utalt, hogy a carcinogenezis ezen korai szakaszában az immunrendszer eliminációs szerepe nem számottevő. *Ezzel kapcsolatban kérdésem az, hogy ezek a p53+ klónok a hám mely rétegében helyezkednek el? Van-e esélyük az immunrendszer effektor sejteivel kapcsolatba kerülni?*

A fenti vizsgálatok eredményei 4 igen nagy presztizsű folyóiratban jelentek meg, mely közleményekben a jelölt első vagy utolsó szerző.

Elsőként tanulmányozta munkatársaival a keratocytákban a HIF1a protein szintű expressziójának változását UVB hatására. Meglepő módon in vitro normoxiás körülmények között UVB hatására a HIF1a protein több órára lecsökkent és ezzel párhuzamosan mRNS-e is csökkent szinten van. Ugyanakkor 12-24 óra múlva egy PI3K-AKT aktiválódás miatt a HIF1a fehérje jelentősen emelkedett és az általa szabályozott gének közül a VEGF szint is emelkedést mutatott. Bár a 12-24 órás hatások bele illenek abba képbe ahogyan ma elképzeljük a HIF1a szabályozását, az UVB korai hatásai a HIF1a mRNS és protein szintekre számomra megmagyarázhatatlanok. *Tud-e a jelölt újabb saját vagy irodalmi adatokat ezen meglepő megfigyelésük magyarázatára?*

Érdekes vizsgálatokat folytatott több kutatócsoportban a keratocyták differenciálódásának genetikai alapjainak megismerésére és modulálására. In vitro tenyésztett emberi keratocyták differenciálódását konfluencia indukálja amely 4 napot vesz igénybe. Microarray elemzésekkel kimutatták, hogy a 4 közöséges differenciációs markergénen kívül az ismert 150 differenciációs gén közül 53 expressziója szintén fokozott volt a modellben. Ezeket mint markergéneket használva 3 szfingolipid derivátumot találtak melyek fokozni voltak képesek a folyamatot még a D3 vitaminhoz képest is fokozottabb mértékben: SO-C6, PS-SLC és az SO-SLC, ugyanakkor egy differenciációt gátló vegyületet is találtak a CL-SLC-t. Érdekes hogy ezek jelentős része szalicilát származék. További elemzésekkel a differenciációt indukáló vegyületek transzkripció-szabályozó hatásait elemezték és a GR, PAX8, TCF12 és FOS transzkripciós faktorok expressziójának fokozódását mutatták ki az NFkB, GATA3/6, ETS2 és SOX9 mellett. A továbbiakban ezen in vitro modellt felhasználva több differenciációt szabályozó gént azonosított egy expressziós mintázatból amelyben több mint 30 erősen felszabályozott és 21 erősen leszabályozott gén volt található. Ezek közül 15-öt elemzett qPCR-rel egy Ca indukálta differenciációs tesztben. Ezek közül 4 esetben immunhisztokémiával igyekeztek a fehérje szintű eltéréseket is kimutatni: HMOX1, GLRX1, FOXQ1 és PKP3 normál és gyulladásos emberi bőrmintákon. *Ezekben az elemzésekben hiányolom a morfometriai és statisztikai analízist, -így csak azt látom bizonyítottnak, hogy ezen fehérjék expresszálódnak emberi bőrhámában.*

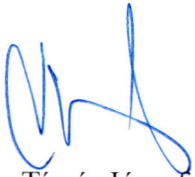
Legvégül kutatásokat folytatott a basaliomas illetve bőr-laphámrákos betegeken a PTCH gén 27-es exon 1315 kodonjának polimorfizmusára vonatkozóan egy nemzetközi

kutatócsoport tagjaként. Kimutatták, hogy a bőr és hajszin halványodásával párhuzamosan a Pro/Pro allél-variáns aránya lecsökkent. Bár a Leu allél gyakorisága fokozódott az nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket. 180 nem-melanomás beteg és egészséges véradók összehasonlításakor a PTCH 1315 kodon polimorfizmusa nem függött össze a daganatkezeléssel. Hasonlóan nem lehetett igazolni a PTCH LOH szerepét sem a nem-melanoma bőrtumorok kialakulásában.

A jelölt által felsorolt új tudományos eredmények közül az első 4-et tudom a magam részéről elfogadni mint olyat melyek originalitása megkérdőjelezhetetlen és azok elérésében egyértelmű a jelölt meghatározó szerepe. Az új eredmények második 4-es csoportja (a HIF1a-ra, keratocita differenciálódásra és PTCH-ra vonatkozó vizsgálatok eredményei) is érdekes új tudományos eredmények, azonban a jelöltnek tisztáznia kell ezek elérésében játszott szerepét.

Fentiek figyelembe vételével a disszertáció nyilvános vitára bocsájtását javaslom.

Budapest, 2012. szeptember 13.



dr. Tímár József

az MTA doktora