

Bírálat
Dr. Berki Tímea:
A glükokortikoid hormon indukálta jelátviteli mechanizmusok vizsgálata
T-sejt alcsoportokon
c. MTA doktora értekezéséről

Dr. Berki Tímea, a Jelölt 151 oldalas dolgozatban foglalta össze a 90-es évek derekától, közel 20 éve kutatott témájának eredményeit. A dolgozatban bemutatott eredmények mind egy szárra fűzhetőek fel: a Jelölt munkássága az elmúlt időszakban a glükokortikoidok T-sejtekre való hatásának átfogó vizsgálatára összpontosít. A téma klinikai relevanciája elvitathatatlan, a dolgozatban bemutatott eredmények joggal tarthatnak számot a humán gyógyászatban való későbbi hasznosításra. Kiemelném továbbá, hogy Dr. Berki Tímea ennek a témának a mélyreható művelésével iskolateremtő szerepet is játszott, amelyet jól példáznak azok a Ph.D. disszertációk, amelyek Dr. Berki Tímea vezetésével a témában születtek.

A dolgozat kiállítása olyan igényes, mintha szakkönyvet vagy tankönyvet olvasnánk. A kétoldalas nyomtatás rendhagyó megoldás, de környezetvédelmi szempontból abszolút üdvözlendő. A dolgozat formai szempontból kifogástalan. Nyilván a nagy terjedelemnek köszönhető, hogy jó néhány gépelési hiba található a dolgozatban, erről készítettem egy csatolt listát.

A **Tartalomjegyzék** és a **Rövidítések jegyzéke** példás precizitással és áttekinthető módon került megszerkesztésre.

A **Bevezetés** 33 oldalas, két nagyobb részre tagolódik: az elsőben a glükokortikoidokról és azok receptorairól, míg a másodikban a T-sejtek érési folyamatairól értekezik a Jelölt, ezzel nagyon jó, részletes háttérrel ad a saját munkája megértéséhez. Nagyon igényesen, tankönyvi alaposággal összeállított rész. Tizenkilenc ábrát is beépített a Jelölt a Bevezetés részbe, ezek forrásait korrekt módon citálta. Az ábrák nagy része nagyon igényes, mindössze 1-2 olyan ábra van, amelyek minősége valamelyest kifogásolható, valamint sajnos nem egységesek abból a szempontból, hogy magyar és angol nyelvű feliratozás egyaránt megtalálható rajtuk.

Néhány észrevétel a Bevezetés rész ábráival kapcsolatosan:

A 3. ábrán nem találtam indokoltnak bemutatni a többi receptort, mert nincs róluk szó a továbbiakban.

A 33. oldalon található 13. ábra aláírása. A Th9 sejtek differenciálódásának transzkripciós faktorát 2009-es cikkre hivatkozva ismeretlennek írja a Jelölt. Bollig *et al* egy 2012-es PNAS cikkben leírták az IRF4 transzkripciós faktort, mint a Th9 differenciálódás meghatározó faktorát.

A 36. oldal 15. ábrájának nem esztétikus az Y tengely megoldása.

40. oldal 17. ábra nagyon rossz minőségű: zavaróan halványak a feliratok és a kiemelő piros karikák teljesen elcsúsztak.

A Bevezetés citációi nem túl frissek, zömében a 2000-es évekből való. *A 23. oldalon például egy 2009-es cikkre történik hivatkozás, miszerint „újabb adatok szerint” a GR a mitokondriális genommal is kölcsönhatásba kerülhet. Van erre vonatkozóan valóban újabb adat az elmúlt 8 évből?*

A **Célkitűzések** fejezet nagyon világosan, egyértelműen került összeállításra: négy fő célkitűzést, és azokon belül 4-4 vizsgálati célt tűzött ki a Jelölt. Világos, koherens gondolkodást tükröz a vizsgálandó kérdések ilyen jó megfogalmazása.

Anyagok és módszerek. A vizsgálatokat egér modellen végezték, illetve számos egér, patkány és humán sejt vonalat is használtak. A Jelölt és az irányítása alatt álló munkacsoport tagjai rendkívül sokféle módszert használtak a vizsgálataikhoz, ezek zöme klasszikus immunológiai metodika. A módszereket 19 alfejezetbe csoportosítva, kellő részletességgel ismertette a Jelölt.

Egy kisebb javaslat: a 4.18 alfejezet címeként lehetett volna magyarul is írni a módszer nevét: Valós idejű PCR, ezt a kifejezést széls körben elterjedten használja a magyar szakirodalom

A 20. oldalon ismertetett Dexamethasone-Actinomycin antagonisztikus hatás felismerése a klinikumban is beépült a gyakorlatba? Gyógyszer kölcsönhatásként leírásra kerül, amikor egyik vagy másik hatóanyag alkalmazására sor kerül?

Eredmények:

Rendkívüli körültekintéssel, nagy precizitással összeállított rész, amelyben a Jelölt minden apró részletre kiterjedően mutatja be és írja le azokat az eredményeket, amelyeket az elmúlt közel 20 évben kaptak a téma kutatása során. Egyetlen apró formai észrevételem fejezettel kapcsolatosan, hogy a Jelölt nem volt következetes abból a szempontból, hogy a bemutatott ábrák aláírásában van, hogy feltünteti, vagy hogy nem tünteti fel azt az eredeti közleményt, amelynek részét képezte az ábra az eredmény eredeti közlésekor.

Alfejezetenként fogalmaztam meg észrevételeimet és kérdéseimet.

I. Célkitűzés és Eredmények alfejezet

A 60. oldalon azt írja a Jelölt, hogy a CD8+ sejtek ellenállóbbak voltak a DX kezeléssel szemben. *Mi lehet ennek az oka? A 2000-es évek elején végzett vizsgálatokat követően történtek-e saját vizsgálatok ennek a magyarázatára, vagy a szakirodalomból ismerte-e erre nézve újabb adatok?*

Összefüggésbe tudja-e hozni ezt a megfigyelést a 71. oldalon ismertetett eredménnyel, miszerint a munkacsoport által előállított GR-ellenes ellenanyaggal az érett CD4 SP sejtek

mérsékelt kevesebb GR-t expresszálnak, mint a CD8 SP sejtek? Van-e ennek a megfigyelésnek klinikai relevanciája szisztémás szteroid kezelés esetén?

A 66. oldalon bemutatott 28. ábrán nem került feltüntetésre, hogy hány kísérlet átlagát mutatták be. Feltételezem, hogy a 64. oldalon bemutatott 25. ábrán bemutatott vizsgálattal megegyezően 3 kísérlet átlagát ábrázolták.

A 67. oldal-on használt PCC rövidítés kimaradt a Rövidítések jegyzékéből

A 67. oldalon, a 29. ábrán bemutatott apoptózis vizsgálati eredmények kapcsán felmerült bennem, hogy *végeztek-e PI festést is? Nem tartották volna érdekesnek az apoptózis különböző stádiumainak eltolódását vizsgálni a kezelések hatására? Vagy ezt váltották ki a mitokondriumok funkciójában bekövetkezett irreverzibilis változásokat detektáló CMX-Ros festéssel?*

II. Célkitűzés és Eredmények alfejezet

Az alfejezet elején bemutatott mikroszkópos képek nagyon informatívak, az azokon látható változások jól értelmezhetők, kiválóan követhetők a DX kezelés hatására bekövetkező intracelluláris változások. A Jelölt és munkatársai egyértelműen bizonyították a GR mitokondriális transzlokációját.

A 79. oldal tetején olvasható mondatrészt „...kolokalizált pixeleket meghatároztuk az ImageJ szoftvercsomag pluginje segítségével.” nem lehetett volna valahogy magyarosabban megfogalmazni? Ez így nagyon bántja a fület.

A Jelölt a 41. ábrán bemutatja, hogy a különböző timocita alpopulációk szignifikáns mértékben festődnek a mitokondriumok számát jelző CMX-Ros festékkel. *Feltételezhető ezek alapján, hogy a különböző timocita alpopulációk között komoly metabolikus aktivitásbeli különbségek lennének?* Ezt követően a 42. ábrán a Jelölt bemutatja, hogy DX kezelés hatására csökken a DP sejtekben a CMX-Ros festődés mértéke. *Elvégezték-e ugyanezt a mérést a többi alpopuláción? Mutattak-e számottevő változást, esetleg a változás mértékének különbségét összevetve a DP sejteken tapasztaltakkal?*

Ennek a fejezetnek a legérdekesebb megfigyelésének azt tartom, hogy DP sejtekben a GR DX-kezelés hatására kizárólag a mitokondriumba transzlokálódik, sejtmagi transzlokációja nem figyelhető meg, Továbbá egyértelmű bizonyítást nyert mind az intrinsic, mind az extrinsic apoptózis útvonalak DX általi indukciója, ill. a GR és egyes mitokondriális fehérjék direkt fizikális interakciója.

III. Célkitűzés és Eredmények alfejezet

Nagyon érdekes alfejezet, amely a timocita jelátviteli utak vizsgálatáról szól. A fejezet első kísérletei még primér timocitákon kerültek végrehajtásra, a további vizsgálatokat azonban Jurkat T-sejtvonalon végezték. *Felmerült-e esetleg annak a lehetősége, hogy a Jurkat-sejteken kapott eredményeket a timocita alpopulációk esetében is validálják, megvizsgálják,*

hogy a sejtvonalon kapott eredmények milyen mértékben képezik le a primér timociták jelátviteli folyamatait?

A 89. oldalon a Jelölt utal egy Löwenberg által leírt interakcióra, de nem idézi az irodalmat. Szintén nem értem a 91. oldalon a bekezdés végén az „(ábra Bartis et al. 2006).” kiírást. *Ezeket az ábrákat szerette volna bemutatni a Jelölt, de valamiért kimaradtak a dolgozatból?* A csatolt közleményben természetesen megleltem az idézett ábrákat.

A Jelölt és munkatársai egyértelmű bizonyítékokat szolgáltatottak arra nézve, hogy a ZAP-70 molekula foszforilációja elengedhetetlen a TcR-CD3 komplexből induló jelátviteli folyamatokhoz, valamint a GC ezen folyamatokra kifejtett hatását is bemutatták. Azonosították azokat a tirozin maradékokat, amelyek foszforilációja elengedhetetlen a jelátvitel szempontjából. *Az általuk azonosított és vizsgált ZAP-70 tirozin maradékok mutációja összefüggésbe hozható-e bármely ismert humán primér immundeficienciával?*

IV. Célkitűzés és Eredmények alfejezet

A Treg alpopulációk elkülönítésére a Helios transzkripció faktor expresszióját is használta a Jelölt és munkacsoportja. A „Bevezetésben” egy 2011-ben megjelent cikk alapján a Jelölt maga is részben megkérdőjelezi ennek a faktornak a használatát a Treg-ek elkülönítésére. *Mi a jelenlegi, legfrissebb álláspont ezzel kapcsolatosan?*

Nagyon érdekesnek találtam a 103. oldalon leírt megfigyelést, miszerint a lépben és a tímuszban eltér a Treg sejtek FoxP3 és GR expressziója DX kezelés hatására. *Hogy véli a Jelölt, lehet-e ezeknek az eltéréseknek jelentősége szisztémás szteroid kezelés során?*

A 106. oldalon a Jelölt kilátásba helyezi, hogy a GR és FoxP3 ko-lokalizáció funkcionális (szinergista) hatását érdemesnek találják tovább vizsgálni. *Milyen megközelítéssel?*

Összefoglalás és megbeszélés

A Jelölt ebben a fejezetben is követte a négyes tematikai bontást. Mielőtt azonban összegezte volna az eredményeit, egy féloldalnyi terjedelemben ismertette a témához kapcsolódó klinikai jellegű megfigyeléseiket, ill. a GR ellenes monoklonális ellenanyag előállításával kapcsolatos eredményeiket. Ezek a eredmények zömmel megelőzték a dolgozat tárgyát képező munkákat, ezért szerintem jobban illettek volna a „Bevezetés” részbe, mint olyan előzetes megfigyelések, amelyek a téma felé fordították a Jelölt és munkacsoportja figyelmét. *Érdeklődéssel olvastam volna például egy 2-3 mondatos összegzést arról, hogy milyen eredményre vezettek azok a kollaborációs munkák, melynek keretében a horvát kollégákkal együtt vizsgálták a poszt-traumás stressz hatásait a szerb-horvát háborút megjárt katonák limfocitáinak GR expressziójára.*

A 113-15. oldal annak az összegzése, hogy a timocita alpopulációk GC érzékenysége milyen különbségeket mutat, és ez hogyan korrelál GC érzékenységükkel. A Jelölt rendkívül koherensen foglalta össze saját eredményeiket, ugyanakkor maga a diszkusszió az eredmények megjelenéskor, illetve a jelenkori irodalmi háttér ismeretében történő

megvitatása nem történt meg. A jelölt mindössze egy darab 2006-ban megjelent cikket idéz ebben az alfejezetben.

A következő alfejezetben (115-117. oldal) a DP timociták mitokondriális GR jelátviteli útvonaláról és az apoptózis mechanizmusáról tett megfigyeléseiket összegzi a Jelölt, ismét nagyon jó, koherens összefoglalását adja a saját munkáknak. Ebben az alfejezetben több utalást, citációt ad más szerzők vonatkozó munkáira, ugyanakkor ezek sem naprakészek, hanem feltehetően a saját eredmények megjelenésekor aktuális irodalmi háttérre tükrözik. *Az alfejezet olvasása során merült fel bennem a kérdés, hogy vajon ismertek-e akár a GR, akár a Hsp90-et kódoló géneken olyan ritka mutációk vagy gyakori polimorfizmusok, amelyek a GC választ befolyásolják, esetleg humán betegségek pathogenezisével kapcsolatba hozhatók?*

A III. alfejezetben a GC nem-genomikus hatásainak vizsgálatával kapcsolatos és a TcR jelátviteli utakra vonatkozó eredményeit összegzi a Jelölt. Hasonlóan az előző alfejezetekhez, itt is rendkívül jól értelmezhető, pontos összefoglalást ad a saját eredményekről, ugyanakkor az irodalmi háttérrel való összevetésben a 2000-es évek közleményei dominálnak és nem kapunk arról képet, hogy napjainkban mi az aktuális ismeretünk erről a nagyon érdekes témáról. Az alfejezet értékes részének tartom a 120. oldalon bemutatott magyarázó ábrát a nem-genomikus GC hatások feltételezett mechanizmusairól.

Végezetül a IV. alfejezetben a GC hormon Treg sejtek differenciálódására és funkcióira gyakorolt hatásainak vizsgálatával kapcsolatos eredményeit összegzi a Jelölt. A fejezet értékes része olvasható a 122. oldalon, ahol a Jelölt a timocita alpopulációk eltérő GC érzékenységének összefüggését taglalja a GR expresszióval összefüggésben. Ez a kérdéskör többször előkerül a dolgozat folyamán, itt kapjuk a legösszefogottabb képet erről nagyon érdekes témáról.

Új tudományos eredményként fogadom el a Jelölt következő megállapításait:

1. A timocita alpopulációk eltérő GC érzékenységgel rendelkeznek és ez a GC érzékenység összefüggést mutat GR expressziójukkal.
2. DP timociták esetében bizonyították, hogy a sejtek korai apoptotikus folyamataikhoz nem szükséges, de a késői apoptotikus folyamatok lezajlásához elengedhetetlen a GR nukleáris transzlokációja.
3. Elsőként mutatták ki, hogy DP timocitákban a ligandkötést követően a GR a mitokondriumba transzlokádik és ott a Bcl-2 család tagjaival lép direkt interakcióba.
4. A timocita szelekció során a GR és a TcR indukálta jelátviteli utak összekapcsolódnak és gátló hatásúak a korai apoptotikus folyamatokra.
5. Bizonyították a GR-ZAP-70 molekulák asszociációját nagy dózisú GC indukció hatására, és ezzel egyidejűleg a ZAP-70-CD3 kapcsolódás gátlását. Azonosították a ZAP-70 azon aminosav maradékait, amelyek részt vesznek a nem-genomikus GC hatások közvetítésében.

6. Kimutatták, hogy a centrális és perifériás Treg sejtek GC érzékenysége eltér, és ezt az eltérést feltehetően a kétfajta Treg sejt egymástól különböző mértékű citokin termelése, ill. FoxP3 expressziója okozza. Bizonyítékot szolgáltatottak a GR és a FoxP3 transzkripciós faktorok fizikai kölcsönhatást feltételező ko-lokalizációjára is Treg sejtekben.

Összefoglalva megállapítom, hogy a Jelölt, Dr. Berki Tímea egy klinikailag is releváns, fontos témában folytatott kutatómunkájának eredményeit összegezte dolgozatában. A dolgozat koherens, példásan jól szerkesztett, a Jelölt áttekinthető műben mutatta be az eredményeket. Új eredményeivel olyan alapmechanizmusokat tárt fel, amelyek segítenek megérteni a glükokortikoid kezelések T-sejtekre gyakorolt hatásait. A doktori művet nyilvános vitára alkalmasnak találom.

Szeged, 2017. július 10.

Tisztelettel:

Dr. Széll Márta
az MTA doktora

Elírások:

számos helyen felbukkan a dolgozatban: Tímocita vagy timocita?

19. oldal: transzpresszió helyett transzexpresszió

26. oldal: stormaelemek helyett stromaelemek

35. oldal. Létejöttüknek helyett létrejöttüknek; ugyanitt activitást helyett aktivitást

36. oldal: szuppressziós helyett szuppressziós; ugyanitt transzendocítózissal helyett transzendocitózissal

40. oldal: autokrinmechanizmusok helyett autokrin mechanizmusok

46. oldal. anatgozálni helyett antagonizálni; ugyanitt legelacsonyabb helyett legalacsonyabb; ugyanitt programmot helyett programot

50. oldal: hígításához helyett hígításához

52. oldal: kontrol helyett kontroll; ugyanez az 58. oldalon is

55. oldal: pelleted helyett pelletet; ugyanitt mitákat helyett mintákat

57. oldal: tráfolyadékban helyett tápfolyadékban

63. oldal (ábraalírás): eredményit helyett eredményeit

64. oldal: vizgáltuk helyett vizsgáltuk

65. oldal: detektálásra helyett detektálására; ugyanitt Ilymódon helyett Ily módon

66. oldal: kontrol helyett kontroll

70. oldat: nőt helyett nőtt

71. oldal: receptorben helyett receptorban; ugyanitt a táblázatban Wetern blot helyett Western blott

73. oldal: dózis-függő helyett dóziszfüggő

82. oldal: aszociációja helyett asszociációja; ugyanitt abrazoltuk helyett ábrázoltuk; ugyanitt koloklaizáció helyett kolokalizáció; ugyanitt ellenőriztük helyett ellenőriztük; ugyanitt analizisével helyett analízisével; ugyanitt egyránt helyett egyaránt

84. oldal: figyelhető helyett figyelhető

86. oldal: aktívált helyett aktivált; ugyanitt nem-fakcionált helyett nem frakcionált; ugyanitt ellenőriztük helyett ellenőriztük

87. oldal: Aktiv helyett Aktív; ugyanitt kotrollal helyett kontrollal; ugyanitt control helyett kontroll

88. oldal modeleztük helyett modelleztük

89. oldal: model helyett modell; ugyanitt 34 és 70KD helyett 34 és 70 kDa

92. oldal: kontrol helyett kontroll

101. oldal: fluoreszcens helyett floureszcens; ugyanitt citkin helyett citokin; ugyanitt relativ helyett relatív

102. oldal: ábraalírás: experszió helyett expresszió

103. oldal: színje helyett szintje; ugyanitt Teg helyett Treg

107. oldal: ellenőriztük helett ellenőriztük

108. oldal: szupresszor helyett szuppresszor

110. oldal: differnciáltathatók helyett differenciáltathatók

111. oldal intarcelluláris helyett intercelluláris

113. oldal: altcsoport helyett alcsoport

123. oldal: menets helyett mentes; ugyanitt mikorszóp helyett mikroszkóp; ugyanitt
aztívást helyett aktivitást

124. oldal: agy helyett egy