

Bírálati vélemény Dr. Berki Tímea „A glukokortikoid hormon indukálta jelátviteli mechanizmusok vizsgálata T-sejt alcsoportokon” c. MTA doktori értekezéséről.

Berki Tímea tudományos témaválasztása igen jónak mondható, hiszen a mai rendszerbiológiai megközelítések egyi sarkalatos pontja az (orvosi)biológiában a neuro-immun-endokrin háromszög hálózatainak feltérképezése az OMICS (GENOMICS, PROTEOMICS, LIPIDOMICS, GLYCOMICS, ...) különböző szintjein. Szerző a „CELLOMICS” felé mutató megközelítést választotta, azaz azt a fontos kérdést vizsgálta a T-sejtek különféle alpopulációin, hogy a glukokortikoid hormonok milyen módon, milyen jelátviteli rendszereken keresztül képesek szabályozni a limfociták homeosztázisát ill. effektor funkcióit. Ez egy igen fontos kérdés a „stressz és az immunválasz közötti összefüggések” felderítése terén.

A dolgozat 126 oldalban foglalja össze a kutatások háttérét képező információkat, a saját eredményeket és azok diszkusszív elhelyezését a nemzetközi szakirodalomban. A doktori disszertáció formailag teljesen megfelel az MTA által támasztott követelményeknek. A dolgozat tartalmazza a disszertáció alapjául szolgáló közleményeket eredeti formájukban is, bekötve.

A dolgozat eredményei jelentős nemzetközi immunológiai és sejbiológiai szakfolyóiratokban kerültek publikálásra. A dolgozat alapjául, a beadás dátumát tekintve, szigorúan véve, 14 közlemény szolgál, melyekben csaknem minden esetben jelölt a meghatározó szerző. (Ezek összesített impakt faktora: 35.25). A disszertációhoz szorosan nem, de a témához jelentős mértékben kapcsolódóan további 10 közleményt publikált, melyekkel együtt az összesített impakt faktor 70.177. Szerző utolsó 10 évben mutatott tudományos aktivitása jelentősen emelkedő tendenciát mutat, amit a több mint 1200 független hivatkozás is tükröz. Külön kiemelendő, hogy szerző és mtsai. fejlesztették ki az első *glukokortikoid receptor (GR) ellenes antitestet*, melyet valamennyi vizsgálatukban azután sikeresen alkalmaztak is.

A disszertáció igen jó, olvasmányos stílusban íródott. A demonstráló ábrák minősége is kiváló. Az 59. oldalig a többi rész is teljesen elfogadható. Ott, az 5. fejezetben az eredmények tárgyalása kapcsán viszont egy kicsit szokatlan számomra az eredmények csoportosítása. A célkitűzések alapján várható logikai sorrend helyett szerző szinte „felsorolja” eredményeit, ráadásul hiányzanak az egyes alfejezetek közötti átvezető, értékelő, továbbvezető paragrafusok.

Emellett az elért eredményeket persze igen jelentősnek tartom az immunrendszer adaptív ágában valamennyi T limfocita alpopuláció összességére nézve a stressz-hormon szabályozást illetően. Mivel nem kifejezetten immunológiai jelenségekre irányulnak, így a különféle szakterületi folyóiratokban közölt közlemények összesített impaktja is jónak mondható.

Ugyancsak kiemelném, hogy amellet, hogy részletesen, alpopuláció szinten megvizsgálták a GC szabályozó hatását a T-sejtes effektor funkciókra ill. sejthomeosztázisra (sejthalál/túlélés egyensúly), hangsúlyozottan foglalkoztak a „lökéshatás” szerű stressz hatásra megemelkedő GC szint immunregulációs hatásaival is, amivel eddig igen kevesen foglalkoztak. A 113-124 oldalakon szerző összefoglalja és megbeszéli eredményeit, melyek egyértelműen rávilágítanak arra, hogy milyen jelentős immunszabályozó hatása lehet a stressz-szignáloknak, beleértve a glukokortikoid stimulusokat is. Összességében tehát szerző és mtsai. mind alapkutatási mind orvosbiológiai szempontból jelentős eredményeket értek el kutatásaik során. Szabad legyen itt megemlítenem, hogy „történelmi koromnál” fogva 4 olyan PhD értekezés bírálója is lehettem e projekt lefolyása során, melyek ezen eredmények nagy

részét képezik és négy igen kiváló fiatal kutatót ismertem meg, akik részben azóta már meghatározó, vezető kutató személyek az Intézetben vagy máshol.

Az értekezés alapvetően új és jelentős tudományos eredményeinek részéről a következőket tekintem:

- 1.) *Jellemezték a BALB/C és AND-TcR transzgenikus egértörzsek timocita sejtcsoportjainak összetételét és eltérő GC-érzékenységet. Rámutattak a természetes és transzgen egerek T sejt állományában és azok érzékenységében rejlő különbségekre is.*
- 2.) *Kimutatták, hogy a DP populációban legalacsonyabb a GR expresszió és hogy ezen sejtek korai apoptózis fázisában nem, de a késői apoptózisban szükséges feltétel a GR nukleáris transzlokációja.*
- 3.) *Elsőként mutatták ki, hogy a ligandkötés(GC) hatására a GR a DP timocitákban inkább a mitokondriumba transzlokálódik, mintsem a sejtmagba. Ezt megerősítették azon eredményeik is, melyek kimutatták a GR asszociációját a Bcl-2 család tagjaival. Továbbá kimutatták ennek szerepét a mitokondriális sejthalál útvonal aktiválódásában is DP timocitákban.*
- 4.) *Eredményeik közvetlenül megerősítették azt a nézetet, miszerint a GR és TCR együttes stimulációja növeli a DP timocita túlélést, főként a korai apoptózis gátlásának köszönhetően. Továbbá megerősítették a korábbi, meglehetősen ellentmondásos tényeken alapuló „közös antagonizmus” modellt is.*
- 5.) *Bemutatták és igazolták, hogy a GR-ZAP70 asszociáció kialakulhat rövid, nagy dózisú GC hatásra, mely egyben gátolja a ZAP70-TCR kölcsönhatást. Molekuláris szinten azt is leírták, hogy a ZAP-70 specifikus tirozin motívumai (Y315, Y492) közvetítik a nem-genomiális hatásokat az SPL-76 és a Cbl molekulák közvetítésével.*
- 6.) *Kimutatták a Treg sejtek GC rezisztenciáját és GC hatásra fokozódó IL-10 és TGFβ citokintermelését. A perifériás Treg sejtekben kimutatták, hogy azok érzékenyek GC-indukált apoptózisra, de a túlélő sejtekben indukálható FoxP3 expresszió és citokintermelés, ami ezen sejtek erős plazticitására utal. Megfigyelték a GR és a FoxP3 kolokalizációját is ezen sejtek magjában, ami a két transzkripciós faktor funkcionális hasonlóságára utal.*

Bár valamennyi közlemény átesett egy szigorú bírálati procedúrán, továbbá a „bíró is átesett már 4 PhD bírálaton” a témakörben, azért néhány, talán most már általánosabb kérdés (és persze néhány technikai kérdés is) még mindig megmaradt bennem:

Néhány technikai megjegyzés, kritika:

- 1.) Általában a dolgozatban az igen szép kivitel mellett meg kell említeni az elég sok elütési hibát (amit ki lehetett volna küszöbölni pl. helyesíráellenőrzővel). Gyakran megfigyelhető az angol elnevezések használata is magyar helyett (pl. 5. táblázat címében: „total” vs. összes, stb.)

- 2.) A Metodikai leírásban (4.10. fejezet, 55 old.) a kolokalizáció kvantitatív analizisére vonatkozó részt nem igazán értem. Mit jelent pl. „a fehér pontokat megszámloltuk, majd ábrázoltuk” kifejezés? Tudomásom szerint az IMAGE J szoftver ezen plugin-je csak mutatja a képen a kolokalizációs pixeleket, de a korreláció számítására (kvantitatíven) nem ad lehetőséget. Tehát felteszem a kérdést, hogy akkor hogyan is lett a kolokalizáció kvantitatíven jellemezve? Nyilván jól, csak itt vsz. a leírásban nem lett megfelelően részletezve.
- 3.) Az 5.2. fejezet címe nem túl szerencsés: „BALB/C egér tímusának sejtes összetétele DX kezelés hatására”. Szerintem a sejtes összetételt a természet és az állat állapota határozza meg, így itt legfeljebb annak „megváltozásáról beszélhetünk”.
- 4.) A 24. ábránál szerző említi, hogy 3 párhuzamos mérésből egy reprezentatív mérést mutatnak be az ábrán. Nem igazán értem, hogy ebben a szituációban ez miért jó. Hiszen ha mindhárom mérés átlagát és szórását mutatják be, akkor még a variancia is jobban megítélhető lenne.
- 5.) A 69. oldalon található 30. ábrán a $*:p < 0.5$ valószínűleg elírás és az 0.05. Ugyanezen ábra kapcsán megkérdezném, hogy a galamb citokróm C (PCC) antigénnel való „kezelés” valójában mit takar a kísérletben, mert ez nem igazán derül ki másutt sem. Ugyanakkor hatásait kvantitatíven mutatják be ezen és más ábrákon is.

Fontosabb szakmai kérdések, megjegyzések:

- 1.) Szép és meggyőző, *in vivo* adatokkal alátámasztott, kísérletekkel mutatják meg, hogy a CD8+ T sejteknek szignifikánsan magasabb a GC analóg dexamethasonnal (DX) szembeni rezisztenciája, mint a CD4+ helper T sejteknek. Kérdezném, hogy van-e elképzelésük arra nézve, hogy milyen génmintázatbeli, ill. fehérjeexpressziós mintázatbeli különbségek vagy akár kritikus molekulák/jelátviteli pályák állhatnak ezen különbség mögött? Ez ugyanis az adaptív immunrendszer stressz-érzékenysége szempontjából egy igen fontos kérdés.
- 2.) A 26. ábrát tekintve: Kicsit furcsa nekem, hogy az endogén GC hiánya (amit Methyrapon kezeléssel idéztek elő) ugyanazt a jelentős sejtszámcsökkenést váltja ki, mint a GC-analóg dexamethason (DX) jelenléte. Hogyan lehet ezt a látszólagosan ellentmondásosnak tűnő tényt feloldani?
- 3.) A ZAP-70 itt leírt centrális jelátviteli szerepe elfogadható és kísérleti adatokkal kellően alátámasztott. Megkérdezném azonban azt, hogy a ZAP-70 knock-out és knock-down állatokban tapasztalt, feltehetően az evolúció során kialakult „redundáns ZAP/Syk helyettesítés” hogyan hozható összefüggésbe a tapasztalt eredményekkel a GC hatás tekintetében?
- 4.) Lehet hogy a témában való közvetlen járatlanságomnak köszönhetően, de az 56. ábra fő üzenetét nem igazán értem. Az ábra az össz timocitaszám változása (csökkenése) és a tímikus T_{reg} sejtek arányának növekedése között állapít meg szoros összefüggést. A két tendencia kétségtelenül átfed a bemutatott időskálán, de ez még nem igazán bizonyító erejű az összefüggés vonatkozásában.

Összefoglalva, Berki Tímea MTA doktori értekezése egyértelműen mutatja szerző kiváló kutatási kvalitásait, csakúgy mint témavezetői/iskolateremtő képességét. Ez utóbbit az itt bemutatott eredményekből készült négy PhD értekezés és számos TDK dolgozat valamint diplomamunka is tükrözi.

Így részemről a disszertáció téziseinek nyilvános vitára bocsátását és sikeres védés esetén az MTA doktori cím odaítélését messzemenően támogatom.

Budapest, 2017-06-08

Dr. Matkó János
Biológiai Tudományok (MTA) doktora