



Dr. Katona István
tudományos tanácsadó, osztályvezető
Lendület Molekuláris Neurobiológiai Kutatócsoport
Magyar Tudományos Akadémia
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

H-1083 Budapest, Szigony u. 43.
Telefon : (+36-1) 210-9982
Fax : (+36-1) 210-9412
E-mail: katona@koki.hu

Bírálat

Alpár Alán: Funkcionális anatómiai változások az Alzheimer kórban

című értekezéséről, amelyet a jelölt benyújtott MTA Doktori Tanácsához elbírálás céljából.

Először is köszönöm szépen a megtiszteltetést, hogy elolvashattam és véleményt mondhatok Dr. Alpár Alán nagydoktori disszertációjáról, amely több mint 10 éves nagyon alapos kutatómunka eredményét foglalja össze. Bírálként sokat tanultam belőle, mert rendkívüli alapossággal egy olyan szakterületet mutat be, amelyet csak felületes olvasóként követek, elmélyült kísérleti munkát nem végeztem a disszertáció témakörében. Ezért kérdéseim és megjegyzéseim inkább általános neurobiológusi kíváncsiságomat tükrözik és céljuk, hogy a jelölt kollégám figyelmét felhívják olyan szempontokra, amelyek későbbi munkájában segíthetik.

Témaválasztás:

Az Alzheimer-kór kutatása sajnos elméleti és gyakorlati szempontból egyaránt kiemelkedő fontosságú öregedő társadalmunkban, ezért a témaválasztás időszerű, nagy jelentőségű és általános orvostudományi problémákra kiterjeszhető. Az időskori demenciával járó betegségek, mint pl. az Alzheimer kór az érintettek életminőségének gyors romlásával járnak, ami természetesen fokozott terheket ró nemcsak a közvetlen környezetükre, hanem a szociális és orvosi ellátórendszerek fokozott terhelésén keresztül a társadalomra is. Az átlagéletkor folyamatos növekedésével ezek a betegségek egyre nagyobb teret hódítanak így a potenciális gyógyítással, illetve a tüneti kezelések javulásával kecsegtető eljárások kidolgozása egyre égetőbbé válik.

A tudományos probléma nehézségét mutatja, hogy az 1950-es évek óta több mint 100,000! közlemény került publikálásra ebben a témában a PubMed szerint, ennek ellenére az Alzheimer kór pontos kórélettani mechanizmusa máig nem tisztázott. Számos versengő hipotézis próbálja a betegség egyes aspektusait megmagyarázni, azonban ezekre a hipotézisekre alapozott gyógyszerfejlesztések sorra kudarcot vallottak az elmúlt évtizedekben.

A **Bevezetésben** részletesen bemutatja a jelölt a témaválasztás jelentőségét. Ezen belül külön tárgyalja az általa megvalósított projektek elméleti háttérét, ami segíti ennek a rendkívül szerteágazó kutatási irányok megértését. A hatalmas szakirodalomban való tájékozódást nagyszámú közlemény hivatkozása segíti, az azonban nem szerencsés, hogy az idézett cikkek több mint 90%-a még 2010 előtt megjelent eredményt mutat be, miközben a kutatási terület felfedezései jelenleg is a vezető idegtudományi folyóiratokban jelennek meg, nagyon népszerű és fontos témáról lévén szó.

A jelölt a **Célkitűzéseket** egymáshoz csak lazán kapcsolódó 6 fő téma köré csoportosította, amelyek a következők:

1. A kérgi principális neuronok morfológiai változásainak nyomon követése Alzheimer-kór kutatásban általánosan használt transzgénikus egértörzsekben.
2. A téli álm (hibernáció) során fellépő, az Alzheimer kór egyik fő tünetére emlékeztető, de azzal szemben reverzibilis tau hiperfoszforilációt kísérő szinaptikus elváltozások detektálása és tanulásra gyakorolt hatása.
3. Az Alzheimer-kór korai, még tünetmentes fázisára jellemző p21H-ras fehérje megemelkedett szintjének neuro-és szinaptomorfológiai hatásvizsgálata overexpressziós, transzgénikus egérmodellben.
4. Az endokannabinoid jelátviteli útvonal enzimeinek és fő receptorának tanulmányozása humán Alzheimer-kóros betegekből származó szövettani mintákon.
5. Egy, új differenciálatlan, a humán szaglőrendszerben előforduló sejtcsoport jellemzése.
6. Az extracelluláris mátrix 3 központi elemének, két chondroitin-szulfát tartalmú molekulának (aggrecán, brevicán), illetve egy fontos strukturális kapcsolófehérjének (Ctrl1)-nek jellemzése az Alzheimer-kórban, illetve lehetséges szinaptoprotektív hatásuk bizonyítása.

A **Módszerek** fejezet részletesen tárgyalja a felhasznált kísérleti eljárásokat, amelyek szükségesek a kitűzött célok eléréséhez. A jelölt az alábbi fő módszerekkel dolgozott:

- Állati, illetve humán agyminták kezelése
- Fixálási és metszési eljárások
- Hisztokémiai és immunhisztokémiai módszerek
- Egyéb antitesteken alapuló eljárások (Western-, dot-blot, ELISA)
- Morfometriai, sztereológiai és statisztikai módszerek

Eredmények és Következtetések:

A fejezet a célkitűzések által előrevetített tematika szerint tagolódik. Általában a fejezet adatai rendkívül precíz anatómiai felkészültségről és pontos munkáról tesznek tanúbizonyságot. Az ábraanyag jól illusztrálja a szövegben megfogalmazott eredményeket. Ilyen hatalmas anyagmennyiségnél elkerülhetetlen néhány apróbb hiba is például néhány esetben az ábrák túl sötétek, ami a kiértékelést nehezíti (pl. 10. és 24. ábrák, az előbbinél a loading kontroll és a mólsúlymarkerek jelölése is hiányzik). Mindent összevetve azonban a disszertáció kiemelkedő erőssége a minden részletre kiterjedő klasszikus anatómiai hagyományokat modern morfometriai módszerekkel kombináló eredmény fejezet. Ami a jövőben azonban megfontolandó az a mintavétel pontosabb megtervezése, főleg annak tükrében, hogy az elmúlt években az agykérgi principális sejtek heterogenitásáról rengeteget tanultunk (lásd Mizuseki et al., 2011, Nature Neuroscience vagy Tasic et al., 2016 Nature Neuroscience, amely csak a látókörégből 19 principális sejtípust különít el!). Egyes kérdések vizsgálatára néha neokortikális, néha hippokampális, míg ritkábban mindkét területen megtalálható piramissejtek leírását végzi el összevontan a szerző, és változatos mintavétel miatt a megfigyelések nem feltétlenül kiterjeszthetőek minden esetben.

A szerző első nagyobb alfejezetben leírta a mutáns (plakkképzésre hajlamosító) amiloid prekursor fehérje túlermelésének hatásait az agykérgi piramissejtek morfológiájára. Megállapította, hogy morfometriai változások az apikális dendritfa szerkezetében történtek (enyhe degeneráció) a bazálisban nem, viszont a dendrittüske sűrűség mindkét szegmensben jelentősen lecsökken. Ezzel szemben az eredeti (nem plakkképző) amiloid prekursor fehérje túlexpresszálatása mindkét dendritfelszín növekedéséhez vezetett.

A következő kísérletek véleményem szerint logikailag nehezen illeszkednek a dolgozat gondolatmenetébe. A szerző egy különböző deprivációs módszert alkalmazott ezekben a szelektív

interneuron-eliminációs kísérletekben (bajuszszőr-eltávolítás). Az érintett területek interneuron-afferenciációját vizsgálva megállapította, hogy a vGluT1+ illetve a VGAT+ képletek száma csak az amiloidplakk képzésére hajlamosító mutáns törzs agykérgében csökkent. Ezután az afferens-deprivációs kísérletekben megmutatta, hogy a plakkképző mutánsban a dendritfelszín fokozott csökkenését figyelték meg a vad típusúhoz képest. A következő kísérletsorozatban az önkéntes mozgásaktivitás morfológiai hatását vizsgálták egy olyan humán APP-t expresszáló törzs hippocampusában, ami csak később hajlamos plakkképződésre. A fizikai aktivitás köztudomásúlag jótékony hatása a neuronális struktúrák plaszticitására itt is beigazolódott, az apikális dendritszakaszok hossza, átmérője és a dendrittüskék száma is szignifikánsan megnövekedett mind a kontroll egerek, mint a mutáns egértörzs esetében.

A második alfejezet nagyon érdekes modellt használ. A szíriai aranyhörcsöggel végzett hibernációs kísérletben, amelyben az Alzheimerhez hasonlító tau foszforilációs jelenség tapasztalható, a szerző a tau foszforiláció hatását tanulmányozta a tanulási képességekre. Mivel a hibernációs élettani folyamatok értelemszerűen reverzibilisek, ezért nem meglepő módon a hibernált, illetve kontroll állatok nem mutattak jelentős különbségeket a tanulási, illetve újratanulási fázis hosszában, bár a hibernáció szignifikánsan magasabb volt az újratanulás során.

A harmadik alfejezet egy neurodegeneratív betegségek patológiájában fontos G-fehérje, a p21H-ras neuromorfológiai hatásait mutatja be egy p21H-ras-t túltermelő egértörzsben. A fehérje megemelkedett szintje a szomatoszenzoros cortex térfogatának növekedését eredményezte, ami feltehetőleg a dendritfák jelentős méretbeli növekedésére vezethető vissza. Ezen kívül a dendrittüskék sűrűsége is jelentősen megnövekedett, morfológiai megoszlása nem változott. A neokortikális afferensek immunhisztokémiai vizsgálata a vGluT2+ képletek sűrűségének szignifikáns növekedését, és a vGluT1+ képletek sűrűségének csökkenését mutatta. Meglepő módon ezek nem a klasszikus thalamocortikális célpontnak számító tüskesejtekkel voltak kapcsolatban, hanem a II-III réteg IV. rétegbe betérő dendritfájával asszociáltan helyezkedtek el. A hippocampus hasonló méretnövekedésen megy át a transzgen expressziójának hatására elsősorban a piramissejtek bazális dendritfa növekedésének köszönhetően. Afferensdeprivációt (bajusz-szőrirtás) követően a barrelek mérete nem változott se a wt, se a transzgenikus állat cortexében. A dendritszegmensek hossza csökken a depriváció hatására, de a transzgenikus állatokban kisebb mértékben. A dendrittüskék sűrűsége viszont nem változott egyik csoportban sem. Önkéntes fizikai aktivitás és a p21H-Ras expresszió pozitív hatása összeadódik a dendritfák összesített felületnövekedés és a dendrittüske sűrűsége nézve is.

A negyedik alfejezetben a szerző az endokannabinoid rendszer receptorainak, illetve metabolikus enzimjeinek mennyiségi változását követte nyomon Western blot, illetve immunhisztokémiai eljárásokkal. A western-blot analízis szerint a CB₁ receptor és a 2-AG lebontó enzimének (Abhd6) szintje nem változott, míg a 2-AG szintetizáló enzimeinek (Dagla, Daglb) és másik fő lebontó enzimének (Magl) mennyisége emelkedett. Immunhisztokémiai festéssel viszont jó látható, hogy az Abhd6 szintje a neuronokban csökken, majd teljesen eltűnik, ez a változás azonban szöveti szinten kompenzálódik a megemelkedett mikroglia-sejtbeli expresszióval. Ez a nagyon szép eredmény is jól mutatja a sejttípus-specifikus mérések erejét a klasszikus populációsztű vizsgálatokkal szemben. Hasonló változás az Magl esetében is megfigyelhető, bár ez az enzim teljesen nem tűnik el még az AT8+ sejtekből sem. Ugyanakkor nem lehet teljesen kizárni, hogy a fehérje jelenléte a mikrogliaokban saját expresszió vagy a fagocitált neuronokból származik (lásd Kérdések). Az anandamid metabolizmus fő szintetizáló enzimének tartott NAPE-PLD, fő lebontó enzimének tartott FAAH, illetve lehetséges alternatív receptorának (TRPV1) a mennyisége nem mutatott változást az Alzheimer-kóros szövetekben. Ez nagyon érdekes megfigyelés. Mivel a 2 fő endokannabinoid

metabolikus rendszere számos ponton összefügghet (lásd pl Tanimura et al 2011, Neuron), ezért izgalmas lenne megtudni, ezeknek a lipideknek a mennyisége hogy változik a kóros szövetmintákban.

Az ötödik alfejezetben a szerző a humán amiloid prekursor proteinnek a sejtproliferációra gyakorolt hatását vizsgálta és leírt egy új differenciálatlan sejtcsoportot a humán szaglórendszerben. Az alfejezet első részében közölt kis süntanrekkel végzett kísérletek mögött álló szakmai racionalitás és a kísérletek jelentősége számomra nem teljesen világos. Közismert, hogy törzsfajlódestandilag minél ősbib egy faj, annál több a felnőttkorban is megmaradó neurogenezisre képes progenitorsejt az agyban. Ezért ezek a kísérletek az alaptétel megerősítésén kívül nem szolgálnak lényegesen új információval és figyelembe véve, hogy a süntanrek nem szokványos kísérleti állatmodell izgalmasabb lett volna olyan szempontok szerint vizsgálni, amelyek új koncepciók kialakítására alkalmasak. Az is szerencsésebb lett volna, ha a humán mintákban leírt sejtcsoport tárgyalása közvetlenül ezután a rész után került volna és csak azután kezdte volna meg a szerző a hAPP proliferációra gyakorolt hatásának ismertetését. Ez utóbbi alfejezetrész azt mutatja be, hogy a hAPP expressziója a postnatális kortextben kismértékben csökkenti az osztódó sejtek számát normál és ingergazdag környezetben is. Jelentős a különbség a túlélésben viszont, akkor amikor a kontrollkörnyezetben tartott egerek BrdU+ sejtjeinek a túlélését nem befolyásolta a hAPP expressziója, az ingergazdag környezetben tartott egerek esetében viszont majdnem 50% túlélési csökkenést okozott. A hosszútávú túlélés esetében viszont okkal merül fel a kérdés, hogy a BrdU-jelölt sejtek elvándorlása figyelembe lett-e véve, ez a módszerek fejezetből nem derül ki. Ez azért fontos, mert elképzelhető hogy az APP expresszió valójában csak migráció ösztönző hatású. Érdekes a megfigyelés, hogy a hAPP expressziója akadályozta az ingergazdag környezet hatására neuronális irányba eltolt differenciáció mainfesztlódását. Az alfejezet utolsó részében kerül leírásra egy a szaglórendszerben felfedezett secretagogint tartalmazó új nagyon érdekes sejtcsoport. Meglepő módon e sejtek száma nem változik az életkorral és nem tartalmaztak AT8+ profilokat még előrehaladott betegségi stádiumban sem. Ehhez kapcsolódóan a masszív plakkképződést mutató APde9 egértörzsben szintén nem változott a secretagoin+ sejtek száma a bulbus olfactoriusban.

Végül az utolsó alfejezetben a szerző megvizsgálta az extracelluláris mátrix szerkezetét különböző agyterületeken és neurontípusokban emberi mintákon. Ez a munka szakmailag az egyik legértékesebb és a szerző utolsó szerzőként vezette a kutatásokat, amelyek egy nagyon rangos folyóiratban jelentek meg. A kutatások során a szomatodendritikus kompartmentet körülvevő hálókat és a periszinaptikus mátrixhüvelyeket vizsgálták. Leírták az extracelluláris mátrix két chondroitin-szulfát proteoglikánjának (aggrecan, brevican), illetve egy fontos kapcsolófehérjének (Ctrl1) az eloszlását a kontroll (thalamusz-CGL, hippocampus) és Alzheimer kóros szövetekben, valamint plakklarakódást mutató transzgénikus egértörzsben. Fény és elektronmikroszkópos kísérletekkel megállapították, hogy a aggrecan-tartalmú periaxonális hálók gátló és serkentő végződéseket is körbevehetnek a CGL-ben, a gátló végződéseket jóval nagyobb arányban. A hippocampusban pontos térképet készítettek ezeknek a molekuláknak a perineurális hálókban és periaxonális hüvelyekben való előfordulásáról. Aggrekán tartalmú hálókat csak interneuronok körül azonosítottak, de megtalálhatók a posztszinaptikus struktúrák körül is. A hálók elsősorban a CA1-3 régióban csoportosultak, DG-ban kisebb a számuk. A Ctrl1 fehérje eloszlás alapján készített térkép hasonló eloszlást mutat, míg a brevican-tartalmú hálók csak elvétve fordulnak elő mindkét helyen. Ezzel szemben a periaxonális hüvelyek nagy számban fordultak elő a humán hippocampusz minden területén, míg Ctrl1-eloszlás a DG-ra korlátozódott. Alzheimer-kóros szövetmintákban a brevican és a Ctrl1 fehérje mennyisége először csökkent, majd mgnőtt. Sejtszinten a periaxonális hüvelyek mennyisége és előfordulása nem változott még az AT8+ sejtek körül se, míg a hálók soha nem fordultak elő AT8+sejttestek körül. Súlyos plakklarakódást mutató transzgénikus egértörzsben a

brevican és Ctrl1 mennyiség változása nagyon hasonlított a humán mintákéhoz (először csökkent aztán nőtt), ezzel szemben az aggrecan szint folyamatosan emelkedett. Hasonlóképpen a humán mintákhoz periaxonális hüvelyek jelen vannak változatlan mennyiségben akár a plakkok közelében.

Megbeszélés:

A dolgozat egyik gyengesége, hogy a Megbeszélés fejezet meglehetősen rövid, tematikájában az Eredményeket követi, hiányoznak az eredményekre alapozott új koncepciók, kísérleti kérdések. Sajnos a fejezet jelentős része inkább az eredmények megismétléséből áll. Néhány kivételes esetben is többnyire csak a disszertáció morfológiai megfigyeléseinek a korábbi anatómiai megfigyelésekkel történő összevetése történik. Érdemes lenne a szerző következő munkáiban, például majd az előadásában hangsúlyosabban törekedni a releváns funkcionális, esetleg kórélettani vonatkozások részletesebb bemutatására, az egyébként értékes anatómiai eredmények szélesebb kontextusba helyezésére.

Kritikai megjegyzéseim összefoglalása:

- A szerző helyenként az eredmények sorából kilógó publikációinak az adatait is belefoglalta dolgozatba kitekintés megjegyzéssel, de ezek logikailag inkább megtörik az olvasást, nehezítik a következő fejezet megértését.
- Hasznos lenne ennek a rendkívül szerteágazó területen folyó munkának az ismertetését egy két összefoglaló ábrával segíteni a Bevezetésben és a Diskusszióban, például majd a védés előadásában.
- A disszertáció kisebb hiányosságának tartom, hogy rövidítésjegyzéket nem tartalmaz. Habár a rövidítések magyarázata az alkalmazás első helyén általában szerepelt, de néha túl távoli szövegrészekben felhasznált azonos betűszavak esetében segítené.
- A felhasznált antitestek bemutató táblázatban viszonylag sok antitest adatai hiányoznak (CB₁, TRPV1, MAGL, DAGL, FAAH, NAPE-PLD) adatai hiányoznak.
- A Megbeszélés fejezetnek sokkal széleskörűbben áttekintőnek kell lennie, fő célja az eredmények kontextusba helyezése, az eredményeken alapuló új tesztelhető hipotézisek felvetése a szakterület számára.

Specifikus kérdéseim a következők:

- A Tg2576-os egérvonalban a szerző megfigyelései alapján komoly változások vannak a vGluT1, VGAT és cholinerg markerek szintjében. Van-e adat arra vonatkozólag, hogy hogyan befolyásolja a serkentés-gátlás általános egyensúlyi állapotát (excitatory-inhibitory balance) a transzgén expressziója?
- Megváltoztatja-e a plakkképződés intenzitását az önkéntes fizikai aktivitás a különböző APP-t túlexpresszáló transzgénikus egérvonalakban, illetve az Alzheimer kórban szenvedőkben (esetleges ikervizsgálatok eredményei)?
- Van-e bizonyíték az Alzheimer kóros mintákban a mikroglia-sejtekben felhalmozódó 2-AG lebontó enzimeknek a valódi mikroglialis expressziójára és funkcionális jelentőségére vagy ezek esetleg csak a fagocitózis passzív termékei? Hogyan vizsgálná ezt a kérdést a szerző?

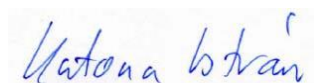
Összefoglalásul megállapíthatom, hogy a disszertáció egy kiemelkedően részletes, a leíró magyar neuroanatómiai hagyományokat követő precíz munka, amely kiegészülve fontos funkcionális megfigyelésekkel számos nagy jelentőségű eredeti tudományos eredményhez vezetett.

A jelölt nemzetközi folyóiratokban megjelent nagyszámú (48) közleménye, magas impakt faktora, (kb.200), jelenleg átlagos (400 feletti), de az elmúlt években folyamatosan emelkedő független idézettsége azt tükrözi, hogy felfelé ívelő pályán lévő kutatóról van szó. Ezt mutatja néhány kiemelkedő elismertséggel rendelkező nemzetközi folyóiratban (Pl.:PNAS, EMBO Journal, Nature Communications) közölt cikk is, amelyek szinte mind a közelmúltban készültek nemzetközi kollaborációkban. Bízom benne, hogy a jelöltben megvan a belső szándék, valamint lesz lehetősége és pályázati támogatása, hogy legújabb eredményeire alapozva itthoni kutatócsoportjában hasonló nemzetközi élvonalba tartozó szinten folytassa kutatásait.

Fontos értéként hangsúlyozni kell azt is, hogy a szerző az utóbbi években több fiatal kutató témavezetését is vállalta, és az iskolateremtő tevékenység alapvető elvárás azoktól a vezető kutatóktól, akik az MTA doktori címre pályáznak.

Összegezve Alpár Alán munkásságát, amellyel hozzájárult az Alzheimer-kór hátterének megértéséhez és a szélesebb értelemben vett szakterület fejlődéséhez rendkívül nagyra értékelem. A tudományos eredmények alapján az értekezést védésre alkalmasnak tartom, annak kitűzését javaslom, és az MTA doktora cím adományozását maximálisan támogatom.

Budapest, 2016 január 20.



Katona István