

## OPPONENSI VÉLEMÉNY

Dénes Ádám: “Role of microglia in neuronal health, inflammation and brain injury”  
című  
MTA doktori értekezéséről

Dénes Ádám MTA doktori értekezése alapvetően a mikroglia szerepét tárgyalja három különböző fejezetben. Az első fejezet a mikroglia szerepével foglalkozik a gyulladással kapcsolatos agysérülésekben. A második fejezet a szisztémás gyulladás mikroglia funkcióira és az agyi károsodásra gyakorolt hatását tárgyalja. A harmadik fejezet a mikroglia-neuron interakció olyan mechanizmusait elemzi, melyek alapvetőek a fiziológiás neuron működésben és a neuronkárosodásban is.

### Általános megjegyzések:

A tézis ”short dissertation” formátumban, angol nyelven íródott. A tézis terjedelme irodalomjegyzékkel együtt 68 oldal. A disszertáció 5 ábrát tartalmaz, és 216 közleményt citál. A 14 oldalas bevezetés után a kutatás célok rövid, egyoldalas összefoglalása, majd az eredmények bemutatása következik 10 oldalon. Ezt követi a konklúzió, a kihívások és kitekintés megfogalmazása 9 oldalon.

A tézis értékelését nagyban segíti, hogy a publikációkat nem csak a disszertáció végén, hanem minden fejezet elején is összefoglalja, megadva a közleményekben elfoglalt pozíciót is (első/utolsó, megosztott első/utolsó, és levelező szerző). Ennek alapján, a jelölt az első fejezet valamennyi eredeti 8 közleményében, a második fejezet összes eredeti 9 közleményében, és a harmadik fejezet mind a 6 eredeti közleményében a fenti, kiemelt pozíciókban foglal helyet.

A közlemények a 2007-2022-ig terjedő időszakot ölelik át, így kiváló képet nyújtanak a szerző magas színvonalú, és egységes ívet alkotó tudományos munkásságáról.

A tézis megírásakor az első fejezet teljes citációja 778, impakt faktora 46,5. A második fejezet teljes citációja 643, impakt faktora 57,3. A harmadik fejezet teljes citációja 649, impakt faktora 104,3. Ennek megfelelően, a tézis 23 közleményének teljes citációja 2070, impakt faktora 208. Kiemelendő, hogy a tézisben megjelölt és az utolsó 4 évben megjelent 7 közlemény citációja 285. Öt közlemény impakt faktora 10 felett van, és ezek között szerepel utolsó szerzős Science, J Exp Med, Nat Commun, PNAS, Acta Neuropathol.

Mindezek alapján, a szerző munkássága nemzetközi kitekintésben is az élvonalban van. Külön kiemelendő, hogy az utóbbi évek magas színvonalú közleményei az általa vezetett hazai műhelyből kerültek ki.

### Formai észrevételek:

Az angol nyelven írt tézis nyelvezete kiváló. Gépelési hiba gyakorlatilag nem fordul elő. A tézis igényesen megírt, rendkívül jól szerkesztett munka. A tömör összefoglalás ellenére jól érthető, jól követhető, sőt, kifejezetten élvezetes olvasmány is. Ennek egyik kulcsa, hogy számos alkalommal kérdéseket vet fel, majd ezt válaszolja meg, azaz a klasszikus disszertációk



hagyományát követi modern megközelítésben, ezzel fenntartva az olvasó folyamatos figyelmét is.

A Bevezetés nemcsak kiválóan, de izgalmasan foglalja össze a munka jelentőségét: a neuronális aktivitást szabályozó sejtes interakciókat fiziológias és patológias körülmények között; a mikroglia fejlődését, szerepét immun és non-immun folyamatokban, a központi idegrendszer fejlődésében; a mikroglia interakcióját, fenotípusait; a mikroglia szabályozó szerepét a központi idegrendszeri környezetre és betegségekhez társuló patológiáját; a mikroglia funkciók kísérletes manipulációját történeti ívben; végül a szisztémás gyulladás hatását a központi idegrendszeri környezetre és specifikusan a mikrogliaira. E bevezető összefoglaló két ábrát tartalmaz stroke vonatkozásban.

A Célok megfogalmazása lényegretörő.

Az Eredmények ismertetése tömör, de jól érthető, és a saját citációkra épülő munka.

A Konklúzió röviden ismét kiemeli az eredmények jelentőségét, és külön a stroke témában elért munkásságot, majd 3 alfejezetben, részben klinikai kitekintéssel von le következtetéseket a mikroglia integráló, és neuron aktivitást is szabályozó központi szerepéről.

A formai szerkesztéssel kapcsolatban két kritikai megjegyzésem van. Az eredmények fejezetben néhány alapvető ábra vagy táblázat beillesztése a korábbi munkákból még tovább emelte volna a munka amúgyis kiemelkedő értékét. Érthetően, ez a tézis rövid formátumával és a színvonalas és komplex közlemények magas számával függ össze, de talán éppen emiatt még inkább fókuszálta volna az olvasó figyelmét. A Konklúzió fejezetben kiváló összefoglaló ábrák részben tartalmaznak adatokat is, és a tézis legfontosabb megállapításait tükrözve a megértést nagyban segítik. Ugyancsak érdemes lett volna a legfontosabb új megállapításokat tényszerűen, néhány pontban összefoglalni.

#### **Tartalmi észrevételek, kérdések:**

A bemutatott munka összességében rávilágít, hogy a szerző nemzetközi szinten kiemelt és elismert kutató. Opponensként az eredmények méltatásán túl néhány kérdésem van, melyek a munka tágabb értelmezését segíthetik, de az eredmények értékét semmiképp nem befolyásolják. A feltett kérdések az elért eredmények jelentőségét nem teszik kérdésessé, a várt válaszok a bemutatott munka háttérének jobb megismerését segíthetik.

1/ Bevezetés, 9. oldal: A CSF1R KO egér és patkány modell ismertetésénél kitér arra, hogy a manipuláció a szöveti makrofágokat is érinti, és a felnőtt kori túlélés korlátozott. Van-e adat kondicionált és indukált KO modellel kapcsolatban (floxed, Cre modell), ahol a CSF1R csak a mikroglia populációt érinti indukált módon, azaz a túlélést a felnőttkorba nem befolyásolja?

2/ Bevezetés, 10. oldal: Ismerteti a FIRE-deficiens (*Csfr1* locus superenhancer) modellt, ahol a neuronális, asztrocita és oligodendrocita transcriptome nem változik. Míg a CSF1R-KO egérben e populációk érintettek. Mi okozza ezt a különbséget a két modell között?

3/ Ismerteti a koraszülöttek fejlődési deficitje és a mikroglia aktiváció korrelációját, valamint a mikroglia proliferációt (10. oldal). Van-e adat arra, hogy milyen e mikroglia populáció



fenotípusa koraszülöttek fejlődési deficitjében, illetve van-e adat CSF1R túlexpresszió hatására mikrogliaiban?

4/ A diszsertáció egyik fontos témája a szisztémás sérülés hatása a mikrogliaira, amelyet a bevezetésben is ismertet (12. oldal). Vizsgálták-e, hogy különböző szisztémás hatások (infekció, trauma, metabolikus zavar, gyulladás) azonos vagy különböző mikroglia fenotípust eredményeznek (pl. transcriptome, proteome, metabolome, epigenetika)? Az LPS modellt specifikusan említi – de eltérő hatása lehet-e olyan szisztémás változásoknak, melyek a vérágygát működését nem befolyásolják?

5/ A TGF $\beta$  szerepét viszonylag részletesen taglalja, és említi a Tgfr2 deléció hatását a az agyi homeostasisra és a mikroglia primingra (13. oldal). Sclerosis multiplex agyi léziókban a *tgfr* és a *Tgfr2* expresszió a remyelinizációval asszociálódik, és elsősorban asztrocitára jellemző, így a mikroglia indirekt módon is érintett lehet. Tud-e kondicionált, mikroglia-specifikus Tgfr2 modellről, illetve asztrocita-mikroglia interakciókról e vonatkozásban?

6/ Kimutatja, hogy emberből generált iPSC-mikroglia transzplantációja integrálódik az egér kimerá agyba, és megtartja az identitását (19. oldal). Megváltoztatja-e a transzplantált humán mikroglia az egér neuronok aktivitását és funkcióját, és történik-e interakció purinerg junkcióban a humán mikroglia és az egér neuron között?

7/ Említi, hogy egyetlen, akut szisztémás gyulladásos stimulus megváltoztatja a mikroglia epigenetikai programját (20. oldal). Vizsgálták-e a szisztémás stimulus hatását egyes sejt szinten: azaz generál-e s szisztémás stimulus specifikus, erre jellemző mikroglia alcsoportot vagy alcsoportokat (cluster) speciális transcriptome mintázattal, azaz fenotípussal?

8/ Vizsgálták a mikroglia változását akut stroke kapcsán, ami megelőzi a makrofágok invázióját mind a primer sérülés és a peri-infarktus szövetben is (25. oldal). Eltérő-e a szimultán mikroglia fenotípus e két helyen (primer sérülés vs peri-infarktus szövet)?

9/ Milyen mechanizmus okozza a mikroglia észlelt pusztulását a a stroke akut fázisában (25. oldal)?

10/ Elemzi, hogy a DAMPs a priming stimulus nélkül is gyulladásos választ general mikrogliaiban IL-6 és CXCL1 termeléssel (26. oldal). Ismert, hogy a CXCL1 szint egér liquorban korrelál a polymorphonuclearis myeloid-eredetű szuppresszor sejtek (PMN-MDSCs) megjelenésével az EAE konvaleszcens fázisában (*Knier, Nat Immunol 2018*). Van-e adat stroke-ban e sejtek szerepére, és vajon szerepet játszhat-e mikroglia által termelt CXCL1 e folyamatban?

11/ A donor leukocyták meningealis infiltrációját észlelték stroke után 24 órával (27. oldal). Bár vér-eredetűnek említi, de lehetséges-e, hogy a calvaria csontvelőből származtak? Újabb adatok felvetik, hogy a calvaria csontvelői sejtek fenotípusa specifikus lehet, és stroke-ban szerepük lehet (*Kolabas et al, 2021 December 25, <https://doi.org/10.1101/2021.12.24.473988>*).

12/ Kísérleteiben az NLRC4 és AIM2 inflammaszoma deficiencia javította a neurológiai végpontokat, de NLRP3 deficiencia nem (27. oldal). Mi lehet ennek az oka? NLRP3 az egyik legfontosabb gyulladásoz inflammaszoma, DAMP és endoszomális TLR is aktiválja az NF- $\kappa$ B útvonalon keresztül, és fontos szerepet játszik az IL-1 és IL-18 termelésben a caspase-1 aktivitáson keresztül.

13/ IL-1 receptor antagonist (Anakinra) a SCIL-STROKE tanulmányban csökkentette az IL-6 szintet, de növelte a rosszabb funkcionális végpont esélyét 3 hónapnál. Ezt érdemes lett volna diszkutálni.

14/ Említi az NLRC4-ligand bakteriális flagellin és a bél mikrobiota részvételét az akut agyi sérülésben. Hogyan képzelhető el a bél mikrobiota ilyen gyors hatása, és milyen útvonalakon keresztül? Flagellin direkt hatása a központi idegrendszerben? Flagellin perifériás hatása? Bakteriális proteinek, metabolitok, transzkriptok kimutathatók az agyban.

15/ Az IL-1R1<sup>fl/fl</sup>  $\Delta$  S1co1e1 egérben (28. oldal) csak a cerebrovascularis endothel érintett?

16/ Vizsgálták-e a NETs-re adott mikroglia reakciót (28. oldal)? Lehetséges-e, hogy a több alkalommal említett mikroglia pusztulás stroke kapcsán a NETs-re adott válasszal, vagy a neutrophil fagocitózissal függhet össze?

17/ Megállapítja, hogy a migráló neutrofilek neurotoxicitása proteáz termeléssel függött össze (28. oldal). Ugyanakkor csak inhibitor koktél védett a neurotoxicitás ellen, az egyes inhibitorok nem. Mi ennek az oka? Lehetséges-e, hogy specifikus neutrofil fenotípusok eltérő proteáz termeléssel rendelkeznek (*Rubio-Pnce, Curr Opin Immunol 2021 68:41*)?

18/ Polymorphonuclearis neutrophilok (PMNs) részt vesznek a post-ischemiás remodelingben is (jótékony hatás), és randomizált klinikai tanulmányokban migrációs molekulák (ICAM1, CD11/CD18 integrin, VLA4) gátlása a stroke kimenetelt nem, vagy inverz módon befolyásolták. Ezt érdemes lett volna elemezni.

19/ A szisztémás gyulladás szerepét két rendszerben is vizsgálta: LPS és anaphylaxia során (31. oldal). Mindkettő a vér-agyagat sérülését okozza. Lehetséges-e olyan szisztémás gyulladás hatásának vizsgálata, mely nem jár a vér-agyagat sérülésével?

20/ Említi, hogy kísérletes stroke emelkedett T sejt számmal járt a csontvelőben (33. oldal). Vizsgálták a T sejtek fenotípusát (pl. Th, Tc, Treg, stb.)?

21/ HMPAO- és 99mTc-DTPA-SPECT kísérletes stroke-ban a tüdő és a bél perfúziós változását mutatta órákon belül (34. oldal). Történt-e hasonló megfigyelés human stroke-ban, és érdemes lenne-e ennek vizsgálata a stroke klinikai végpontokkal összefüggésben?



22/ Transzfer kísérleteikben CRPS (komplex regionális fájdalom szindróma) betegektől nyert IgG kísérletes modellben (talp sértés) fokozta a mikroglia IL-1 $\beta$  termelését a gerincvelőben, és tartós hyperalgesiát eredményezett (34. oldal). Mi ennek a mechanisztikus magyarázata, okozott az IgG transzfer mikroglia aktivációt kontroll egérben is illetve egyéb kísérletes modellben? Azaz specifikus-e a krónikus fájdalom szindrómás betegektől izolált IgG hatása a fájdalom modellben? Ha igen, miért? Hogyan jut be a peritonealisan adagolt IgG a központi idegrendszerbe, tekintve hogy az ellenanyagok <1%-a lép át az intakt vér-agyáton?

23/ A szerző csoportja írta le a szomatikus purinerg junkciót, a mikroglia P2Y<sub>12</sub> dúsulását a neuron membrán Kv2.1 clusterével szemben, mely alapvető a neuronális aktivitás, mitokondriális funkció és sérülés felismerésében és a neuronsérülés limitálásában (37-38. oldal). Sclerosis mutiplex agyi léziókban a Kv2.1 és Kv2.2 expresszió krónikus aktív léziókban fokozott (*Boscia et al, 2021*), és oligodendrociták is expresszálják (*Marques et al., 2016*). Vajon elképzelhető-e, hogy szomatikus purinerg junkció létrejön mikroglia és oligodendrocita között is? Továbbá, a szürkeállományban vizsgált purinerg junkció szerepet játszhat-e a fehérállományi neuron aktivitás és funkció modulálásában is? Ezek interneuronok, amelyek a neurovascularis unit részeként a vaszkuláris tónus szabályozásában vesznek részt, azaz ugyanazon mechanizmus a szürke- és fehérállományban más szabályozásban játszhat szerepet. Ilyen vonatkozásban különösen érdekes az 5. ábrán jelzett felismerés is, ahol a mikroglia szimultán lép kapcsolatba a neuronokkal és a mikroerekkel a kéregben. Hasonló kapcsolat a fehérállományi interneuronok interakciójával más módon is szabályozná a perfúziót a fehérállományban (és a kéregben), melynek diszfunkciója számos agyi betegséggel asszociálódik.

24/ A neuron-mikroglia interakció szabályozása megváltozik-e, ha nem primer neuron sérülés (pl. stroke, trauma, migraine), hanem primeren gyulladásos mikroglia aktiváció van? Vizsgálható-e ez *in vitro* modellben pl. LPS mikroglia aktivációt követően vagy IL-1 KO modellekben?

25/ Ahogy említi, a mikroglia a komplement rendszeren keresztül is részt vesz a neuron modulációban. Független ez a szomatikus purinerg junkció aktivitástól?

26/ A Kihívásoknál és a terápiás kitekintésnél esetleg érdemes lett volna megemlíteni, hogy a központi idegrendszeri betegségek kezelésének egyik lehetősége a kombináció, azaz a gyulladás és a degeneratív folyamatok egyidejű gátlása, valamint a regeneráció szimultán elősegítése. A lokális ősi immunválasz és a szöveti rezidens T és B sejtek befolyásolása további terápiás kihívást jelent a penetráció alacsony szintje miatt pl. monoklonális ellenanyag terápiák esetében, így az IL-1 antagonizálás során is. Egy másik lehetőség olyan kis molekulák alkalmazása, melyek penetrálnak a központi idegrendszerbe, és a szisztémás valamint a lokális adaptív és ősi immunválaszra is hatnak, így a mikroglia funkcióra is. Ilyen potenciális terápiás lehetőség lehet a BTK inhibitorok alkalmazása.

Összefoglalva, a tézis kiemelkedő színvonalú, és úttörő munkákon alapul. A szerző munkája a nemzetközi élvonalban van.

A tézis alapjául szolgáló munkák a mikroglia alapvető modulációs szerepét tárták fel központi idegrendszeri és szisztémás gyulladásos folyamatokban, valamint a neuronális aktivitás szabályozásában fiziológias és patológias körülmények között.

Kimutatta, hogy a mikroglia aktiváció a stroke-ot követő néhány órán belül megtörténik, és megelőzi a makrofág inváziót. A neutrophil granulocyták mikroglialis fagocitózisa a stroke-ot követő ártalmas gyulladásos folyamatok gátlásával az egyik első védelem. Ugyanakkor a mikroglialis IL-1 termelés a stroke patofiziológiájának egyik fontos eleme, és részt vesz a neutrophil granulocytá invázió mediálásában a CXCL1 kemokinon keresztül. Ebben a DAMPs akár priming stimulus nélkül is részt vesznek, és a szérum amyloid A az LPS-hez hasonló priming stimulus lehet. A mikroglia reaktivitásában és IL-1b termelésében a mikroglia által expresszált NKCC1 kulcsszerepet játszik.

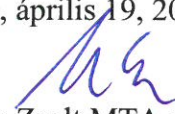
Szintén kimutatta, hogy szisztémás gyulladás (pl. krónikus infekció, intraperitonealis LPS vagy anaphylaxia) rontja a kísérletes stroke kimenetelét, és ebben a mikroglia aktiváció és következményes IL-1 termelés játszik szerepet. Atherogén diéta és elhízás szintén mikroglia aktivációt eredményezett egérmodellben, míg klinikai kísérletekben TSPO-PET jelezte a a mikroglia aktivációt többszörös stroke rizikófaktorok jelenlétében. Ugyanakkor a központi idegrendszeri stroke a szisztémás immunválaszra is hatással van, fokozza a a csontvelői T sejt számot és a granulocytá kiáramlását. E folyamatok háttérében a mikrobiota és az autonóm idegrendszeri változások állhatnak. A perifériás gyulladás központi idegrendszeri hatását és specifikusan a mikroglia fenotípus változását komplex regionális fájdalom szindrómában is kimutatta transzlációs kísérletekben.

A tézis és a munkák kiemelkedően úttörő része a mikroglia-neuron és mikroglia-neurovascularis interakciók újszerű feltérképezése, és új modulációs kapcsolatok leírása. Új CSF1R inhibitorok alkalmazásával kimutatta, hogy a mikroglia eliminációja a neuronális aktivitás diszregulációját eredményezi, mely a kísérletes stroke rosszabbodásával járt. Ez a neuroprotektív funkció a neuronális szoma és a mikroglia kontaktusával jön létre a szerző munkacsoportja által leírt szomatikus purinerg jukciókban. A neuronális kontakton kívül a mikroglia P2Y12 receptorok az endothellel is kontaktusba lépnek, és befolyásolják a neurovascularis coupling, az agyi vazodilatáció és vaszkuláris adaptáció folyamatát.

Mindezek alapján a disszertációban összegyűjtött eredményeket új és jelentős tudományos eredményeknek tartom, és az MTA doktora fokozat cím megszerzéséhez messzemenően elegendőnek tartom.

A nyilvános védelem kitézését és az MTA doktora fokozat odaítélését javaslom.

Odense, április 19, 2023.

  
Dr. Illés Zsolt MTA doktora  
egyetemi tanár, professzor

Odense University Hospital, Department of Neurology  
University of Southern Denmark, Department of Clinical Research, Department of Molecular  
Medicine, and BRIDGE – Brain Research Interdisciplinary Guided Excellence