

Válasz Dr. Seress László bírálatára

Szeretném megköszönni Dr. Seress László emeritusz professzor úrnak, hogy elvállalta doktori értekezésem bírálatát. Nagyon hálás vagyok a rendkívül alapos és részletes bírálatáért, kritikai észrevételeiért és kérdéseierért. Külön köszönöm a dolgozatban bemutatott elektronmikroszkópos munkámmal kapcsolatos támogató gondolatait és kritikus megjegyzéseit. Nagy örömmre szolgál, hogy a doktori művet tudományos szempontból alkalmasnak tartja a nyilvános vitára.

Bírálóm rendkívüli alapossága az értekezés mind formai, mind pedig tartalmi aspektusain tetten érhető. Válaszom első részében az értekezés formai kritikájára térnék ki, majd a felmerült kérdéseket válaszolom meg.

Örömmel olvastam a dolgozat szerkesztésére vonatkozó megjegyzését, miszerint a felépítése szokatlan ugyan, de szerkezete az opponens munkáját megkönnyíti. Megpróbáltam az egyes nagy témákat annak megfelelően csoportosítani és prezentálni, hogy ne legyen túlságosan nehezen átlátható az adott fejezet, és ezt az elvet már a bevezető részben is érvényesítettem. Ez valóban a megszokottól eltérő megközelítés, örülök, hogy a bírálatot is megkönnyítette.

Az ábrákkal kapcsolatos bírálói megjegyzésekre adott válaszaim:

Az ábrák egy része valóban angol nyelven került az értekezésbe, amely mindenképpen megzavarja magyar nyelvű szöveggel az összhangot. Ezért bírálóm elnézését kérem. Ugyanakkor meg kell jegyeztem, hogy a magyarítás az ábrák esetében gyakran olyan jellegű grafikai, informatikai és szerzői jogi megoldásokat igényeltek volna, amelyekben - bevallom - nem feltétlenül vagyok járatos, továbbá jelentősen késleltette volna az értekezés elkészültét. Mindazonáltal az ábrák aláírásban minden esetben igyekeztem feltüntetni az angol szavak/rövidítések magyar verzióját, és a rövidítések feloldását.

Ahogy az a bírálatban is szerepel 50 darab ábra segítségével illusztráltam a szöveges részben bemutatott eredményeket. Sajnos valóban előfordult, hogy a szerkesztés során áthelyezett vagy más számozást kapott kép (sor)száma a szövegben nem került módosításra. Ezért a figyelmetlenségért ismét elnézését kérem bírálómnak. Az 1C ábra többször is előkerül, mint nem létező. Az ábra valójában szerepel a dolgozat megfelelő helyén, de számomra is bírálat olvasásakor vált egyéltelművé, hogy az ominózus ábra felső paneljén a fekete 'C' jelölés beleolvad az elektronmikroszkópos felvételbe, így alig látható. Ez sajnos a képernyőn nem volt ennyire feltűnő, de nyomtatásban valóban nehezen észlelhető. Hasonlóan problémásnak jelezte a megjelenését a 40. ábra J paneljén, amely valóban elmosódottnak tűnik, illetve ugyanezen ábrán helyesírási hibás a *stratum orientis* nevének feltüntetése is. Mindkét felvetés jogos és helytálló. Bírálóm kérdésének megfelelően ezen ábrák esetében az előadás során történő bemutatásuk során külön figyelmet fogok szentelni. Továbbá valóban félreértésre ad alapot az, hogy a *Táplálékbevitel okozta szinaptikus változások* fejezetben hivatkozott ábra (4C?) az adott fejezetben nem található meg. Ez a hivatkozott 4. ábra tényleg sokkal korábban, az *Anyag és Módszer* fejezetben kapott helyet, ahol az ott bemutatott módszer leírásának illusztrálásához használtam fel. Kétségtelen, hogy nem szerencsés negyvennel korábbi ábrára hivatkozni, de nem szerettem volna kétszer szerepeltetni ugyanazt a képet.

Két ábra esetében további, tartalmi megjegyzést is kaptam:

„az axodendritikus aszimmetrikus szinapszisoknál legalább 1 nagyobb nagyítású kép kellene! Honnan derül ki (42. ábra C panel), hogy ezek tüskés szinapszisok voltak, mivel a négy közül egy képen (a jobb felsőn) látszik egy tüske? A szimmetrikus axo-dendritikus szinapszis a pyramissejteken ritka, ott inkább gátló szinapszisok vannak”

Bírálom észrevétele teljességgel megalapozott és valóban csupán ritkábban lehet serkentő, aszimmetrikus szinaptikus bemenetet találni közvetlenül a pyramissejtek apikális dendritjein; a mi kontroll frontális kérgi mintáinkban mindössze az aszimmetrikus szinapszisok 2,5%-a volt axo-dendritikus. A túlnyomó többsége ezeknek a glutamáterg axon-terminálisok jellemzően dendrittüskéken végződtek. Ebben az esetben azonban egy paradox helyzettel találtuk szemben magunkat: az Arp2/3 komplex eltűnése a dendrittüskék elvesztésével járt együtt, amely azt sugallta, hogy ezzel párhuzamosan a neuronok kevésbé „gerjeszthetők” a csökkent glutamáterg bemenet miatt. Ennek ellenére fokozott aktivitás alakult ki ezekben a sejtekben. Az Arp2/3 mutáns egerek agykérgi pyramissejtjeinek elektronmikroszkópos vizsgálata azonban azt mutatta, hogy a tüskészinapszisok jelentős (~40%-os) csökkenése mellett a pyramissejtek dendrit-törzsére érkező serkentő, aszimmetrikus, glutamáterg szinapszisok mennyisége jelentősen, közel hatszorosára nőtt (~14% axodendritikus szinapszis). Annak eldöntése, hogy ezek az axodendritikus szinapszisok korábban meglévő tüskék helyén alakulnak ki, vagy a tüskék eltűnésével új axodendritikus szinapszisok alakulnak ki meglehetősen nehéz. Mindenesetre a jelentős mértékben megemelkedett axodendritikus serkentő jellegű szinaptikus kapcsolat magyarázhatja a prefrontális kéreg „tüske-csökkenet” pyramissejtjeinek fokozott aktivitását, amely közvetlen serkentő bemenetet küld a striatum dopaminerg sejteinek, így fokozott működésük emelkedett striatális dopamin szinttel jár.

„43. ábra. Hogy lehetett szinaptikus sűrűséget kvantifikálni, amikor 1 aszimmetrikus szinapszis sem látszik az ábrán? Kérem a szóbeli előadásban ezt korrigálni”

Köszönöm az észrevételt, az említett ábra felbontása és nagyítása nem feltétlenül alkalmas a szinaptikus kapcsolatok kvantifikálására. Valójában ebben az esetben a preembedding GABA jelölést, vagyis a gátló GABA neurotranszmittert tartalmazó profilok mennyiségbeli különbségét szerettem volna csupán bemutatni reprezentatív elektronmikroszkópos képeken a kontroll és Arp2/3 hiányos egerek frontális kérgéből származó mintákon. A szinapszisok kvantitatív analízise természetesen nagyobb nagyítású felvételek felhasználásával történt, ahol ezek a kapcsolatok megfelelően beazonosíthatóak voltak. Mindenesetre teljesen jogos az észrevétel és az előadásban korrigálni fogom megfelelő felbontású képek bemutatásával.

A tartalmi részekre vonatkozó válaszaim:

„Miért nem említi, hogy vannak a tüske nyakán gátló szinapszisok, míg a serkentő szinapszisok többsége a fejen van (6. oldal)”

Köszönöm bírálóm megjegyzését a dendrittüskék nyakát célzó (gátló) szinapszisokkal kapcsolatban. Ezekről valóban nem teszek említést, amelynek oka abban keresendő, hogy az általam vizsgált

agyterületeken és az alkalmazott módszerekkel szinte soha nem látunk ilyen típusú szinapszist. Sorozatmetszetekről rekonstruált vagy „térfogat (*volume*-) elektronmikroszkópiával” vizsgált neuropilt tartalmazó, patkány szomatoszenzoros kéregből származó idegszövetben kvantifikálták ezek mennyiségét, és azt találták, hogy az aszimmetrikus szinapszisok átlagosan 1,64%-a, míg a szimmetrikus, gátló szinapszisok mindössze 0,69%-a található a tüskék nyakán (Santuy *et al.*, 2018). Vagyis a tüskenyak-szinapszisok valóban jelen vannak, de elenyésző mennyiségben. Természetesen egyetértek bírálómmal, hogy legalább meg kellett volna említeni őket, azonban az értekezésben bemutatott munkám nem foglalkozik ezekkel a szinapszis fajtákkal, így átsiklottam felettük.

„A tüskeszámra vonatkozó megjegyzés (7. oldal)”

Bírálóm megjegyzését és akkurátus leírását a tüskék számáról a hippokampális idegsejtek dendritjeinek felszínén messzemenőig elfogadom és azzal természetesen egyetértek. Abban is igazat kell adjak, hogy rendkívül visszafogottan hivatkoztam a tüske-denzitásra, amikor csupán „több ezer” darabot írtam, a több tízezer vagy akár százezer helyett. Így az olvasóban az a benyomás alakulhat ki, hogy lényegesen kevesebb szinaptikus kapcsolat található ezeken az idegsejteken. Az előadásomban törekedni fogok ezen nagyságrendi különbség megfelelő kihangsúlyozására, a bírálatban adott leírást pedig hálásan köszönöm.

„Több helyen előfordul az adott témakör bevezetésében adatismertetés és célkitűzés, esetenként eredmények olvashatóak (11-14. oldal endocytotikus zóna, 19-20. oldal cofilin, ill. 23. oldal Arp2/3 komplex)”

Az adott témakör bevezetésénél legtöbbször törekedtem az irodalmi háttér és az adott területre vonatkozó ismeretek kifejtésére úgy, hogy az logikusan elvezessen az általunk megfogalmazott kérdés felvetéséhez és a kísérletek során megválaszolendő probléma bemutatására. A doktori értekezés összeállításakor természetesen nagyban hagyatkoztam az adott témában megjelent publikációimra, amelyek szerkezete az adott folyóirat formai kívánalmainak megfelelően változatos volt. Így fordult elő, hogy nem minden esetben sikerült teljesen elkülönítenem a bevezetéshez tartozó témákat azoktól, amelyek logikusan a célokhoz és/vagy az eredményekhez tartoznak. Mentségemre szolgáljon, hogy publikációimban gyakran használom a bevezető részben azt a megközelítést, hogy a fejezet végén 1-1 mondatral utalok nemcsak a konkrét célokra, de a kapott eredmények rövid, maximum egy-két mondatos összegzését is leírom. Ez valóban szokatlannak tűnik a doktori értekezésben, és teljesen jogosnak találom ezzel kapcsolatos kritikái megjegyzéseit bírálómnak.

„Nagyon jónak tartom az egyes betegségekre vonatkozó vizsgálatok összefoglalóját, mert örök kérdés, hogy a mentális betegségek strukturális vagy biokémiai elváltozások eredménye-e? Véleményem szerint mindkettő, de a morfológiai változások kimutatása nagyon fontos.”

Köszönöm bírálóm dicsérő szavait és kérdésfelvetését. A tüskék szerkezeti elváltozását valóban szinte minden ismertebb mentális betegség és kórkép esetén kimutatták, a morfológiájukban bekövetkező „patológiás” megjelenés pedig az elmúlt évtizedekben számos – jórészt megalapozott – spekulációra adott okot az adott betegség kialakulásában betöltött szerepükről. Tipikusan egy „tyúk

vagy tojás” problémakörrel állunk szemben. Azonban az idegtudományban alkalmazott modern technikák ennek a látszólag feloldhatatlannak tűnő kérdésnek a megválaszolásában is segítségünkre siet. Az értekezésemben bemutatott kísérletek során gyakran olyan génmanipulált/génkiütött egerekkel dolgoztunk, ahol a vizsgált fehérje szelektíven hiányzott (pl. WAVE-1 KO, CNTNAP-2 KO), vagy éppen szelektíven, posztnatálisan, indukáltan tűnt el egy bizonyos sejtíusból, vagy esik ki a működése (Arp3C cKO). Így modellezni tudjuk, hogy mi történik, ha pl. egy biokémiai kaszkád csupán egyetlen eleme tűnik el, vagy hibásodik meg. Számos ilyen manipuláció egyértelműen kóros tüske-morfológiát eredményez, különösen azok a mutációk okozhatnak ilyen elváltozást a posztszinaptikus dendrittüskék alakjában, amelyek a bennük található aktin alapú sejtváza „irányításáért” felelősek. A tüskék morfológiáját és így funkcionalitását dinamikusan átalakító aktin fonalakat egy bonyolult, sok tagból álló biokémiai kaszkád szabályozza. Számos humán genetikai vizsgálat rámutatott, hogy a neuropszichiátriai és idegrendszeri fejlődési zavarok multigenetikus természetűek. Az egyik jelátviteli útvonal, amelyek esetében a pszichiátriai rendellenességek hátterében feltételezett gének meglehetősen gyakran érintettek, az aktin citoszkeleton felé történő jelátvitel szabályozói közé tartoznak. A legújabb kísérleti eredmények – többek között az értekezésben bemutatott eredmények is - alátámasztják azokat a genetikai bizonyítékokat is, amelyek a szinaptikus citoszkeleton és az olyan mentális rendellenességek, mint a skizofrénia és az autizmus spektrumzavarok közötti kapcsolatot igazolják (Yan *et al.*, 2016). Összefoglalva tehát, a molekuláris szabályozásban kialakult hiba a szinapszis morfológiáját is megváltoztatja, amely megváltozott alak már nem képes megfelelően funkcionálni a továbbiakban és idegrendszeri kórképekben manifesztálódik. Így a tüskék kóros alakja valójában közvetlenül az okozója a problémának, de ennek hátterében hibás molekuláris jelátvitel ill. genetika áll. Van még teendőnk ezen a téren, úgy gondolom.

„Skizofrénia modellben a tüskék alakváltozása és az aktin szerkezetváltozása eltúlzott jelentőséget kap, mert sejtestre és a dendritekre érkező szinaptikus változás (gátló bemenet) is jelentős lehet. (28. oldal)”

Bírálom felvetésével részben egyetértek, a gátló bemenetek potenciális jelentőségét természetesen nem vitatom, különösen azért, mert ez esetben azokat nem vizsgáltuk. Ami viszont az általunk itt prezentált skizofrénia modell esetében figyelemre méltó az az, hogy az aktin-jelátviteli útvonal kizárólag a (pre-)frontális kéreg azon pyramissejtjeiben került szelektíven kiiktatásra, amelyek közvetlenül kapcsolódtak a dopaminerg sejtekkel. Csupán egyetlen fehérje alegység (ArpC3) hibája a hálózat kiinduló elemében, a skizofrénia során leggyakrabban megfigyelt összes jellemző tünetet egyszerre képes volt előidézni az állatban (tüskevesztés a kéregben, pyramissejtek autonóm aktivitásnövekedése, emelkedett striatalis dopamin-szint és lokomotoros hyperaktivitás, ami jól reagált anti-pszichotikumokra.) Ugyan egy ilyen komplex kórkép, mint a skizofrénia esetében nyilvánvalóan nem lehetséges kizárólag a tüskeszinapszisok morfológiájában bekövetkező változásokat megjelölni okként, de a kapott, rendkívül újszerű eredményeink tükrében szakmai lelkesedésünk az aktin-szerkezetváltozás esetlegesen eltúlzónak ható magyarázatában talán érthető.

Septin a tüskenyakban. Filopodiumok után növekszik a dendritben a tüskenyak alatt. A filopodiumok szerepéről és morfológiai változásáról kevés szó esik, ennek bemutatása bővebb lehetne, beleértve actin szerkezetük változását a tüskévé válás során.

Bírálom megjegyzése és hiányérzete jogos, valóban visszafogottan mutattam be az értekezésben a filopodium → érett tüske átmenetet és ennek során bekövetkező aktin-citoszkeleton átrendeződését. Ennek egyik oka, hogy a konkrét érési folyamattal nem foglalkoztam közvetlenül kutatómunkám során, így csupán a témában megjelent irodalom ismertetésére szorítkoztam röviden. Mindenesetre a szóbeli előadás során ezt a folyamatot is érinteni fogom, ahogyan azt más esetben is kérte bírálatában.

„[A WAVE-1 KO bemutatása során] nem tér ki sem itt, sem másutt a változások kapcsán azok funkcionális következményeire. Ilyen jelentős változások után a CA1 pyramissejtek úgy működnek, mint kontrollban, pl. place sejt funkció, téri tájékozódás változik-e (81. oldal)?”

Köszönöm bírálóm felvetését a WAVE-1 és a hippocampális funkciók, különösen a téri tájékozódás esetleges kapcsolatáról. Itt adott válaszom a bírálatban összegző részében feltett, WAVE-1-el kapcsolatos kérdésre is vonatkozik. Ugyan a megvitatás fejezetben röviden érintem a WAVE-1 hiány funkcionális következményeit (116-117. oldal), azt mindenféleképpen hangsúlyozni szeretném, hogy az ultrastrukturális vizsgálataink egyik motivációja pont az volt, hogy ezekben mutáns és/vagy géntörött egerekben korábban jelentős és meglehetősen sajátos kognitív és memóriazavarokat írtak le (Soderling *et al.*, 2007). Ezen kísérletek során például a hippocampus-függő térbeli tanulás és memória vizsgálatát Morris-féle vízlabyrinthussal (*water-maze*) tesztelték. Azt találták, hogy a kontroll és WAVE-1 mutáns egerek egyformán jól teljesítettek a rejtett platform megtalálásában és nem voltak különbségek az úszási sebességben sem. Ez, és fiziológiai vizsgálatok is arra utalnak, hogy a térbeli tájékozódásban nem feltétlenül játszik szerepet a WAVE-1. Azonban a későbbi tesztelés során, amikor a rejtett platformot eltávolították, és a térbeli emlékezet megtartását vizsgálták azt találták, hogy vad típusú egerek mindig előnyben részesítették a célkvadránsban történő keresést, ezzel szemben a mutáns egerek nem töltöttek szignifikánsan több időt kereséssel a célkvadránsban. Megállapítható tehát, hogy a WAVE-1-hiba vagy hiány során a memória-megtartás károsodik elsősorban. Az ultrastrukturális változásokat látva azonban elgondolkodtató, hogy ilyen jelentős szerkezeti változás miért csak ilyen visszafogott funkcionális károsodáshoz vezet.

„A „distális apikális” dendritágain meglehetősen zavarbaejtő kifejezés... (97. oldal)”

A kifejezés valóban szerencsétlen és félreérthető, helyesen az „apikális dendritek distális részén” kifejezés lett volna a megfelelő, köszönöm, hogy erre felhívta a figyelmemet.

„Ugyanez a kérdés a CNTNAP2 elvesztésére, ha ez alapvetően befolyásolja a serkentő és gátló neuronok kapcsolatát. Jelenti ez a feed-back vagy feed-forward gátlás elvesztését?”

A felvetett kérdés rendkívül izgalmas és érdekes. A neuronális serkentés és gátlás felborult egyensúlyát gyakran figyelték meg autizmus esetében és a betegség hátterében álló egyik lehetséges okként is ezt feltételezik. Ilyen felborult serkentés-gátlás egyensúlyra vonatkozó következtetéseket

mind anatómiai, mind pedig genetikai, fiziológiai és viselkedési vizsgálatok esetében találunk az irodalomban, akár humánban, akár rágcsálókön végzett kísérletek esetében. Az érzékeny egyensúly felbomlását alátámasztják többek között a postmortem emberi agyszövetben a mediális prefrontális kéregben (mPFC) található parvalbumin (PV) neuronok számának csökkenése (Hashemi *et al.*, 2017), a gátló neurotranszmitter γ -aminovajsav (GABA) receptorait kódoló mRNS csökkent expressziója (Fatemi *et al.*, 2010), a GABA és a glutamát arányának csökkenése (Harada *et al.*, 2011), a frontális kéreg megnövekedett nyugalmi aktivitása (Dichter *et al.*, 2009), valamint viselkedésbeli változások, amelyek a sejtek fokozott ingerlékenységre utalnak, ideértve az érzékszervi ingerekre való túlérzékenységet és az epilepsziával való társbetegséget. Az emberekben autizmust okozó ismert mutációkat hordozó egérmmodellek szintén az agykérgi gátló interneuronok (különösen a PV tartalmú neuronok) csökkent mennyiségére és csökkent GABAerg transzmisszióra utalnak (Chen *et al.*, 2015). Kísérletesen, optogenetikai módszerekkel bizonyították is, hogy a mPFC gátlás-serkentés egyensúlyának akut és reverzibilis csökkentése felnőtt egerekben, akár a PV neuronok ingerlékenységének növelésével, akár a pyramissejtek ingerlékenységének csökkentésével, visszaállította a szociális viselkedés hiányosságait a CNTNAP2 KO egérmmodellben. Mivel a gyorsan tüzelő PV neuronok jellemzően a pyramissejtek sejttestén (vagy annak közelében) szinaptizálnak, biztosítva többek között a *feedforward* és *feedback* (előrecsatolásos és visszacsatolásos) gátlást, kijelenthető, hogy a pyramissejtek tüskéinek és szinaptikus kapcsolatainak általunk leírt megváltozása mellett, ezen interneuronok által közvetített gátlás hatékonyságának csökkenése is hozzájárul az autizmus során tapasztalt jellemző tünetek kialakulásához.

Végezetül ismételten megköszönöm Opponensemnek a bírálat elkészítésébe fektetett gondos munkáját, és hogy az értekezés bírálata során méltatta a kutatási téma fontosságát. Bízom abban, hogy elfogadja válaszaimat s továbbra is támogatja a nyilvános vitára bocsátást és sikeres védés esetén az MTA doktora cím odaítélését.



Kelt: Budapest, 2024. január 09.

A válaszban hivatkozott publikációk listája

- Chen, J.A., Penagarikano, O., Belgard, T.G., Swarup, V. & Geschwind, D.H. (2015) The emerging picture of autism spectrum disorder: genetics and pathology. *Annual review of pathology*, **10**, 111-144.
- Dichter, G.S., Felder, J.N. & Bodfish, J.W. (2009) Autism is characterized by dorsal anterior cingulate hyperactivation during social target detection. *Social cognitive and affective neuroscience*, **4**, 215-226.
- Fatemi, S.H., Reutiman, T.J., Folsom, T.D., Rooney, R.J., Patel, D.H. & Thuras, P.D. (2010) mRNA and protein levels for GABAAalpha4, alpha5, beta1 and GABABR1 receptors are altered in brains from subjects with autism. *Journal of autism and developmental disorders*, **40**, 743-750.
- Harada, M., Taki, M.M., Nose, A., Kubo, H., Mori, K., Nishitani, H. & Matsuda, T. (2011) Non-invasive evaluation of the GABAergic/glutamatergic system in autistic patients observed by MEGA-editing

proton MR spectroscopy using a clinical 3 tesla instrument. *Journal of autism and developmental disorders*, **41**, 447-454.

Hashemi, E., Ariza, J., Rogers, H., Noctor, S.C. & Martínez-Cerdeño, V. (2017) The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Medial Prefrontal Cortex in Autism. *Cerebral Cortex*, **27**, 1931-1943.

Santuy, A., Rodriguez, J.R., DeFelipe, J. & Merchan-Perez, A. (2018) Volume electron microscopy of the distribution of synapses in the neuropil of the juvenile rat somatosensory cortex. *Brain Struct Funct*, **223**, 77-90.

Soderling, S.H., Guire, E.S., Kaeck, S., White, J., Zhang, F., Schutz, K., Langeberg, L.K., Banker, G., Raber, J. & Scott, J.D. (2007) A WAVE-1 and WRP signaling complex regulates spine density, synaptic plasticity, and memory. *J Neurosci*, **27**, 355-365.

Yan, Z., Kim, E., Datta, D., Lewis, D.A. & Soderling, S.H. (2016) Synaptic Actin Dysregulation, a Convergent Mechanism of Mental Disorders? *J Neurosci*, **36**, 11411-11417.