

Vélemény

Dr. Rácz Bence

„A tüskeszínapszisok szerkezete” című
MTA Doktori értekezéséről

Rácz Bence MTA doktori dolgozata a színapszisok szerkezetének jobb megértése érdekében végzett kutatómunkáját foglalja össze. A kémiai színapszisok a neuronális kommunikáció legfontosabb elemei közé tartoznak, ezért működésük megértése nyilvánvalóan a legalapvetőbb neurobiológiai kérdések közé tartozik. A színapszisok szerkezetében bekövetkező változások, a színaptikus plaszticitás, kitüntetett szerepet játszik többek között a tanulási és memória folyamatokban, és a környezeti tényezőkhöz való alkalmazkodásban. Mindezek alapján nem meglepő, hogy számos kognitív betegség és egyéb neurológiai kórkép esetében is kimutatható a színapszisok abnormális működése és/vagy szerkezete, tehát megállapíthatjuk, hogy az értekezés egy orvosbiológiai szempontból is rendkívül fontos kutatási területet érint.

A pályázó tudományos hitvallása, az évtizedek óta elismert magyar neuroanatómus iskola legjobb hagyományaira támaszkodva az, hogy számos nyitott kérdést anatómiai módszerekkel is meg lehet válaszolni. A dolgozatban bemutatott kísérletek többsége elektronmikroszkópos módszerekre alapuló anatómiai/sejtbiológiai vizsgálat, amelyek célja a színapszisok általános szerkezetének leírása, és a színapszisokban specifikusan felhalmozódó fehérjék eloszlásának megállapítása. A munka értékét jelentősen növeli, hogy a legtöbb vizsgálatot intakt agyból származó szövetminták mikroszkópos vizsgálatával végezték, elkerülve ily módon a szövetkultúras megközelítések esetleges torzító hatásait és a lényegesen különböző modellrendszerekből származó eredmények összevethetőségének a problémáját. Nyilvánvaló, hogy a hagyományosnak nevezhető transzmissziós elektronmikroszkópos módszerek mellett az elmúlt két évtizedben számos nagyfelbontású képalkotó módszert fejlesztettek ki vagy tökéletesítettek (gondoljunk például a fluoreszcens mikroszkópia alapú nanoszkopóriákra vagy az elektrontomográfia különböző ágaira), ennek ellenére úgy gondolom a pályázó klasszikusnak minősíthető módszertani megközelítésének továbbra is fontos helye van a neuroanatómusok repertoárjában, és amikor ő több mint 20 éve elkezdte a vizsgálatait, akkor még nem is léteztek igazi alternatívák. A dolgozat kitűnően szemléltette, hogy Rácz Bence nemzetközi szintű specialista a TEM-nak és az immunogold festési technikáknak, amelyeket sikerrel használt a tüskeszínapszisok architektúrájának felderítésére vad típusú és betegségmodellként használt mutáns állatok agyszövetének esetében is. Ezek az eredmények jelentősen hozzájárultak a szakterület fejlődéséhez, és figyelemre méltónak találok, hogy a közel 15-20 éve leírt, nagyhatású cikkekben publikált modelljeik többsége kiállta az idők próbáját és ma is elfogadottnak tekintik a szakértők.

A doktori értekezés 16 eredeti tudományos közleményre alapul és közel 20 év kutatómunkáját foglalja össze. A jelölt a fenti 16 publikáció közül 6-nak első, 3-nak utolsó szerzője, ami jelzi a kutatómunka végrehajtásában játszott meghatározó szerepét. Ezekben a publikációkon kívül a pályázó 27 további közleménynek is szerzője (több esetben meghatározó szerzője). A közlemények összesített impakt faktora 262, az ezekre kapott független idézetek száma 1411, ami a cikkek nagyon jó nemzetközi visszhangját tükrözi, és egyben megmutatja, hogy a jelölt messze túlteljesítette az osztály által meghatározott minimum követelményeket.

Az értekezés tartalmi áttekintése

A dolgozatban összefoglalt kísérletek célja a serkentő, glutamátregg tüskeszínapszisok ultrastruktúrájának jobb megértése volt. Vizsgálataik központjában az endocitózis és az aktin

sejtváz szabályozásában résztvevő fehérjék álltak. Eredményeik rávilágítottak a PSD és az endocitotikus zóna szerveződésére, és feltárták, hogy az aktin-alapú tüskeváz mikrodoménekre tagolódik, ahol specifikus funkciójú aktin-kötő fehérjék halmozódnak fel. Mutáns állatmodellek segítségével megállapították, hogy az idegsejtekben található aktin sejtváz szabályozási útvonalakban bekövetkező hibák és a skizofrénia, illetve az ASD kórképek között közvetlen kapcsolat lehet. Eredményeik arra utalnak, hogy a tüskékben található aktin citoszkeletonra ill. a szinapszis-morfológiára hatást gyakorló fehérjék hibás szabályozása számos idegrendszeri és pszichiátriai kórkép kialakulásáért felelős. Mindezekon kívül azt is kimutatták, hogy a hippocampusz szinapszisai érzékenyen reagálnak az energiaegyensúly változásaira is, ami alátámasztja a metabolikus egyensúly és a hippocampusz funkciók közötti kapcsolatot.

Az értekezésben bemutatott tézisek közül a következőket ismerem el új tudományos eredménynek:

1. A szinaptikus tüskékben található endocitotikus fehérjék a szinapszistól laterálisan koncentrálnak, és együttesen egy endocitotikus zónát hoznak létre a PSD körül, a PSD tangenciális irányba eső perifériális részén.
2. Az aktin sejtváz szabályozó fehérjék mikrodoménekbe szerveződnek a poszt-szinaptikus kompartmentumban. A tüskeváz perifériás részére a nagyfokú aktin dinamika, míg a centrális vázelemekre a stabilitás jellemző.
3. A septinek szerepet játszanak a dendrittüskék nyaki görbületének a kialakításában és stabilitásában.
4. A WAVE-1 KO egerekben a normálistól eltérő, lapított alakú dendrittüske fejek mutathatók ki, amelyek hosszabb PSD-t és jóval több endoszómát tartalmaznak, mint a vad típusú kontrol szinapszisok. Ezek a poszt-szinaptikus változások szerkezeti alapot szolgáltatnak a WAVE-1 mutánsokban megfigyelhető kognitív hiányosságokra, és alátámasztják a WAVE-1 alapvető szerepét a szinaptikus plaszticitás szabályozásában.
5. Az Arp2/3 KO egereken végzett kísérletek bizonyították, hogy ennek az aktin nukleáló faktornak a hiányában jelentősen csökken a dendrittüskék száma a cortex és a hippocampusz idegsejtjeiben is. Vizsgálataik azt a meglepő felfedezést eredményezték, hogy a tüskék elvesztése inkább fokozott neuronális gerjesztéshez, mint csökkent aktivációhoz vezet. Az abnormalis szinaptikus szerkezetre vonatkozó eredményeik potenciális magyarázatot adnak a skizofrénia néhány ismert jellegzetességére, úgy mint a kérgi tüskeszinapszisok kóros eltűnése, a kérgi serkentő neuronok fokozott aktivitása és a megváltozott striatális kimenet.
6. A CNTNAP2 fehérje hiányában egerek agykérgében csökken a serkentő szinapszisok száma az L2/3 mPFC piramissejtjeiben. Ez a változás együtt jár a multiszinaptikus boutonok számának csökkenésével és a perforált PSD-k növekedésével. Az eredmények együttesen arra utalnak, hogy a CNTNAP2 elvesztése pre- és poszt-szinaptikus mechanizmusokon keresztül is hozzájárul a szinaptikus plaszticitás szabályozásához.
7. A rövid távú táplálék-bevitel korlátozás nem változtatja meg a hippocampusz CA1 stratum radiatumában a tüskék méretét vagy sűrűségét, de növeli a szinapszisok hosszát és összetettségét, és a perforált PSD-jű szinapszisok számát. Tekintve, hogy ebben az esetben a szinaptikus PSD mérete a tüske méretétől függetlenül nő, ez a megfigyelés arra utal, hogy a táplálék-bevitel korlátozás a klasszikus hippocampális LTP-től különböző mechanizmussal segíti elő a szinaptikus hatékonyság növekedését.

Formai megjegyzések

A dolgozat a hagyományos szerkezeti tagolást követi 144 oldal terjedelemben, 50 ábrával és néhány táblázattal illusztrálva. A szöveg alapvetően jól szerkesztett és jó

nyelvhelyességgel íródott, lényegre törő, tömör stílusban. Felépítése mindvégig logikus, a gondolatmenet jól követhető. Egyetlen bekezdéssel volt problémám a 15. oldalon, ahol a jelölt megpróbált egy rövid, általános áttekintést adni az aktin sejtvázas szabályozásról. Véleményem szerint azonban itt zavaró tévedések is kerültek a szövegbe, hiszen a cofilin fehérje és az Arp2/3 komplex a klasszikus értelemben nem nevezhető enzimnek, és olyan enzimeket sem ismerünk, amelyek az aktin monomereket szállítják, és nem állja meg a helyét az a megállapítás sem, hogy a G-aktin önállóan nem képes polimerizálódni, hiszen ATP és Mg^{2+} ion jelenlétében nagyon is képes. A 17. oldalon a taposómalom egyensúly (treadmilling) kifejezés helyett a jelölt a „mozgólépcsőzés” szót használja, ami ebben a kontextusban egyáltalán nem használatos a magyar szaknyelvben. A 28. oldalon a jelölt azt írja: „az Arp2/3 komplex feltételes mutagenézisével teszteltük, hogy tisztázzuk a kapcsolatot a *de novo* aktin-polimerizációs útvonalak és a pszichiátriai rendellenességek szempontjából releváns fenotípusok között”. Ez a mondat két okból is zavaró, egyrészt a kondicionális mutációt nem szokás „feltételes mutációnak” nevezni, másrészt az Arp2/3 komplex nem *de novo* aktin nukleációs vagy polimerizációs faktor, hiszen csak egy meglévő filamentum jelenlétében, annak az oldalához kötődve képes nukleálni. Ezekon túl elütések és apróbb hibák is szép számban találhatóak a szövegben, ezek kiküszöbölhetőek lettek volna egy gondosabb átnézéssel, amire talán az időhiány miatt már nem került sor. Az ábrák esztétikusak és a megértést is jól segítik. A sok esetben igen részletes és hosszú ábra aláírások magyarul kerültek a szövegbe, de az ábrákon maradtak az angol feliratok, ami ilyen nagy mennyiségű ábra esetén érhető és elfogadható. A 40. ábra meglehetősen komplex, a hozzá kapcsolódó aláírás pedig nagyon hosszú, itt szerencsésebb lett volna több ábrára bontani az eredeti cikkábrát. Ezek a kisebb formai problémák a dolgozat érthetőségét nem befolyásolták érdemben, összegzésében az értekezés formailag tökéletesen megfelel a követelményeknek.

Megjegyzéseim, kérdéseim az értekezés szakmai részével kapcsolatban

1. A jelölt azt írja, hogy méréseik alapján „a dynamin-3 324 ± 32 nm átlagos távolságra található a PSD-től, majd alább azt konkludálja, hogy „Tehát a dynamin-3 megfelelő szubcelluláris elhelyezkedéssel rendelkezik ahhoz, hogy a PSD-t és az EZ-t összekapcsolja.”. Az említett 324 nm-es távolság azonban jóval nagyobb egy fehérje átlagos méreténél. Hogyan képzeljük el ezt az összekötő funkciót? Ez a feltételezett linker funkció hogyan viszonyul a Dynamin fehérje család membrán lefűződésekhez kötött jól ismert funkciójához?

2. A Cortactin fehérje szinaptikus eloszlásának vizsgálata azzal a konklúzióval zárult, hogy a hippokampális dendrit tüskékben a tüske centrális részében halmózódik fel, míg a kisagy Purkinje sejtekben inkább a tüske „héjban”, egy jóval kortikálisabb területen. Mi lehet ennek a különbségnek a hátterében? A Cortactin, ahogy neve is mutatja, a nem-neuronális sejtekben főleg a sejtmembrán közeli területeken halmozódik fel, ami többé-kevésbé egybevág a PC sejtekben kapott eredményekkel. Van-e Cortactin lokalizációs adat egyéb idegsejtekben is? Meg van-e erősítve független módszerekkel, pl. szuperrezolúciós mikroszkópiával a Cortactin lokalizációja a hippokampális dendrit tüskékben?

3. A Cortactin fehérjénél maradván, ismert, hogy ez a fehérje az Arp2/3 komplex egyik fontos aktivátora. Meglepő módon a hippokampális dendrit tüskékben a Cortactin és az ARPC2 fehérje lokalizációja szignifikánsan eltér egymástól. Mi ennek a magyarázata? Elképzelhető, hogy a centrálisan felhalmozódó Cortactin nem járul hozzá az Arp2/3 aktivációhoz a tüskékben?

4. Az Arp2/3 nukleációs faktor valójában egy 7 alegységből álló fehérje komplex. A jelölt a komplex egyetlen alegységére mutatott be fehérje lokalizációs adatokat, de felmerül a kérdés,

hogy ismertté vált-e azóta a komplex többi tagjának a szinaptikus lokalizációja, és ha igen, összhangban vannak-e az új adatok az ARPC2-es adatokkal?

5. A WAVE-1 KO egerek idegsejtjeiben a vad típustól jelentősen eltérő morfológiát mutatnak a tüskék, ami az aktin sejtvázas szabályozás hibájára vezethető vissza. Vizsgálták-e az aktin sejtvázas szerveződését ezekben a KO mutánsokban? Detektálható-e érdemi változás pl. a fentebb is említett szuperrezolúciós módszerekkel?

6. Az előző kérdéshez kapcsolódva, mi a tudomány jelenlegi álláspontja az aktin sejtvázas szerveződéséről és funkcionális doménjeiről a tüskeszinapszisokban? Változott-e, finomodott-e esetleg ez a kép a manapság divatos nagyfelbontású képalkotó módszereknek köszönhetően a dolgozatban bemutatott eredmények publikálása, illetve a dolgozat megírása óta?

A pályázat egészét összefoglalva, Rácz Bence munkáját és eddig elért eredményeit minden szempontból kitűnőnek tartom. A doktori értekezés formai és tartalmi vonatkozásokban is tökéletesen megfelel az MTA doktora fokozat megszerzéséhez szükséges feltételeknek, ezért a nyilvános vita kitűzését és sikeres nyilvános vita után az MTA doktora cím odaítélését feltétlenül javaslom.

2023. november 17.



Dr. Mihály József
tudományos tanácsadó
az MTA doktora