



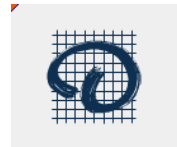
**Vélemény Dr. Pál Balázs *“Ioncsatornákon és gliasejteken keresztül érvényesülő neuromodulációs mechanizmusok hatása az idegrendszeri excitabilitásra”* című MTA doktori értekezéséről**

Az értekezés a szaglóhám, az agytörzsi hallópálya és a retikuláris aktivációs rendszer neuromodulációs folyamataival foglalkozik. A jelölt kiemelten vizsgálta az agytörzs működését, és ezen belül különféle ioncsatornák és az asztrocita sejtek modulációs szerepét.

A dolgozat felépítése logikus, nyelvezete érthető. Formai szempontból megfelel a doktori művel kapcsolatos elvárásoknak. Az értekezés alapját 14 megjelent és egy további, a benyújtáskor bírálat alatt álló közlemény képezi, amely azóta elfogadásra került. Kiemelendő, hogy a 11 utolsó szerzős cikk közül számos publikáció a gliális neuromodulátoros hatásokkal, specifikusan az asztrociták szerepével foglalkozik. Ez tartalmi szempontból jól láthatóan elkülöníti a jelölt saját kutatási témáját a korábbi munkáktól és jelzi a témaválasztás sikerességét is.

A bevezetés érthető, jól felépített összefoglalót ad a vizsgált struktúrák (szaglóhám, agytörzsi hallópálya, retikuláris aktivációs rendszer, raphe magvak) szerkezetéről és működéséről. Ezt követően kerül sor a vizsgált ioncsatornák, neurofiziológiai paraméterek, asztrociták és neuromodulációs hatások bemutatására. A sokrétű háttérinformáció ellenére a fejezetek logikusak, követhetők, amit a néhány apró elírás és fogalmazási pontatlanság nem befolyásol érdemben. Az ábraanyag is megfelelő, esetleg az asztrociták által szabályozott neuronális extraszínaptikus áramokról szóló fejezetben egy ábra segíthette volna még a leírtak megértését.

Az alkalmazott módszerek leírása részletes, követhető. Fontos kiemelni, hogy a jelölt a konvencionális szeletfiziológiai technikák mellett számos modern módszert (kemogenetika, optogenetika, flash fotolízis, virális pályajelölés, neuronális kalcium mérések) is használt,

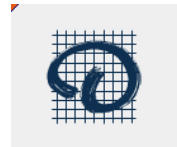


illetve bevezetett a laboratóriumában. Hasznosnak ítélem az alkalmazott vírus konstrukciók felhasználását bemutató táblázatos összefoglalást és az elektrofiziológiai mérések megértését segítő ábrákat is. Kicsit hiányoltam az alkalmazott hisztológiai technikák, mikroszkópia és az egyes kísérleti protokollok részletesebb leírását, amely részletekre a jelölt később, az eredmények leírásakor változó mélységben kitér.

Az eredmények fejezetben az egyes kutatási projektek bemutatása zömmel követi a jelölt pályafutását a posztdoktori munkáktól kezdve saját kutatócsoportjának eredményeivel bezárólag. Az egyes közleményekben megjelent kísérletek leírása végig jól követhető, a közölt eredmények számos értékes megfigyelésről és jól megtervezett kísérletről adnak számot. Érezhető, hogy a korábban készült munkák eredményei nem épülnek egymásra szorosán, ezért ezek háttere és tartalma is szerteágazó. Ugyanakkor figyelemreméltó, hogy a jelölt saját kutatócsoportjának felépítését követően egyre jobban megtalálta a „saját hangját” és azt a kutatási irányvonalat, amely egyre koherensebb vizsgálatok kivitelezését tette lehetővé. A közölt eredmények hátterében a jól beállított módszertan és a kutatási témák átfogó ismerete is érezhető. Emellett a jelölt jól láthatóan figyelt a részletekre az egyes projektek során és számos kontroll vizsgálatot elvégzett, amelyek bár időigényesek, nagyban támogatják az egyes kísérleti mérések hitelességét. Ilyen például, hogy az elvégzett elektrofiziológiai mérések mellett ChAT-tdTomato egerekben ChAT immunhisztokémiával is megvizsgálták, hogy a riporter fehérjék kifejező sejtek valóban kolinerg neuronok-e.

Mechanisztikus szempontból az egyik legérdekesebb vizsgálatsorozat az optogenetikus asztrocita aktiváció neuromodulációs hatásainak vizsgálata, amely több jól kontrollált kísérletet is felvonultat. Itt esetleg érdemes lett volna a korrelatív méréseken túl további vizsgálatokat végezni a pontos celluláris mechanizmusok azonosítására, például a slow inward current (SIC) vagy a CB1-mediálta hatások esetén, a különböző neurokémiai fenotípust mutató idegsejtek azonosítása mellett. Értékesnek tartom a humán neocorticalis szeleteken végzett kísérleteket is, amelyek közül a kemogenetikus asztrocita moduláció hatásait vizsgáló méréseknek - beleértve a SIC életkorral összefüggő változásainak vizsgálatát - számottevő transzlációs jelentősége is lehet. Nagyon izgalmas lenne hasonló vizsgálatokat egér modellen in vivo is lefolytatni.

Az eredmények megvitatása fejezet érthető, követhető. Kissé itt is érződik az eléggé eltérő projektek kollektív megvitatásának nehézsége, amit a jelölt az egyes projektek fejezetekre



tagolásával megfelelően orvosol. Az elvégzett mérések kontextusba helyezése, más kutatócsoportok által végzett mérések eredményeivel történő összehasonlítása, és az eredmények potenciális jelentősége, felhasználhatósága kellő részletességgel lett tárgyalva. Ebben a fejezetben is érezhető, hogy az asztrociták által közvetített neuromodulációs hatások értelmezése a leginkább koherens, előremutató, amely területet a jelölt számos érdemi eredménnyel gazdagította. Ezt erősíti, hogy a dolgozat végén közölt távlati célok láthatóan az asztrociták élettani szerepének megértésére építenek és az *ex vivo* szeletfiziológiai vizsgálatok mellett megjelennek az *in vivo* kísérletek tervei is.

Összefoglalva megállapítható, hogy a dolgozat igényes leírást ad a jelölt által nagy figyelemmel végzett, sok éves kutatómunka főbb állomásairól, eredményeiről, és ez a kutatómunka mind hazai, mind nemzetközi összehasonlításban értékes. A jelölt izgalmas megfigyelésekkel gazdagította a gliális neuromoduláció tudományterületét, amely terület történetileg alulreprezentált, és a közelmúltban kialakult intenzív érdeklődés ellenére is lemaradásban van. Pál Balázs munkája várhatóan további eredményekkel gazdagítja majd ezt a tudományterületet. Részére sikeres védés esetén az MTA Doktora cím megítélését támogatom.

Az értekezésben leírt legfontosabb tudományos eredmények összefoglalása:

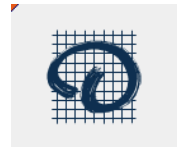
1. Megállapította, hogy a kalciumaktivált kloridcsatornák nélkülözhetőek a szaglópám neuronok aktivációjában.
2. A muszkarinos kolinerg neuromoduláció összetett hatásai közül a posztszinaptikus hatások egy részéért az ún. M-áram a felelős, amely modulálja a sejtek tüzelési sajátságait és a szomszédos neuronok szinkronizációját. Kísérleteiben igazolta az M áram szerepét a nucleus pedunculo pontinus (PPN) kolinerg neuronjaiban, a hallópálya működésében és a raphe medialis és dorsalis szerotonerg neuronjainak alcsoportjaiban is.
3. Feltárta a KCNQ4 alegység régióspecifikus hatásait az agytörzsben, amelyek részt vesznek a cirkadián ritmus szabályozásában és a startle reflexben.



4. Megállapította az asztrociták szerepét a PPN-en érvényesülő neuromodulációs hatások kialakulásában, ahol ez a glia populáció közreműködik tónusos excitabilitás-változások és fázisos aktiváció folyamataiban.
5. Feltárta a fázisos asztrocita-függő aktiváció szerepét a szinaptikus plaszticitásban és ennek életkorral kapcsolatos változásait.

#### Kérdések:

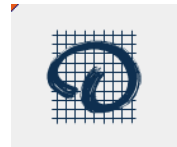
1. A jelölt a bevezetésben említi, hogy a Gq kapcsolt muszkarinos acetilkolin receptorok aktivációja mellett más G protein kapcsolt receptorok (mint a P2Y purinerg, a GPR55 kannabinoid, az 5HTC2 szerotoninerg, az 1-es típusú angiotenzin vagy a 2-es típusú bradikinin receptorok) is képesek az M-áramot gátolni. Az agyi parenchymában a P2Y12 és P2Y13 receptorok kifejezetten a mikroglia sejteken fejeződnek ki. Elképzelhető, hogy a mikroglia, amely modulálja a neuronális excitabilitást szerepet játszhat az M-áram szabályozásában is? Amennyiben ezt korábban nem vizsgálták agyszeleteken vagy in vivo, érdemes lenne ilyen témájú kísérleteket végezni.
2. A bevezetésben szó esik az asztrociták által szabályozott fázisos és tónusos áramokról, amelyek számos agyterületen megfigyelhetők. Az idézett irodalom jelentős része ugyanakkor jóval a modern kemogenetikus / optogenetikus módszerek és kondicionális KO egér modellek elterjedése előtti kutatásokból származik, miközben még jelenleg is komoly kihívást okoz az asztrociták élettani folyamatainak szelektív farmakológiai modulációja. Érdekelne a jelölt véleménye, hogy a korábban alkalmazott módszerek közül melyek voltak alkalmasak asztrocita-specifikus hatások igazolására és mennyiben módosult a korábbi szemlélet a fent említett új módszerek megjelenését követően.
3. Az elvégzett kemogenetikai kísérletek során az hM3D receptort clozapine N-oxid (CNO) segítségével aktiválták. Ismert, hogy a CNO spontán hidrolízise miatt beadását clozapine felszabadulás kíséri, amely a megfigyelések szerint zavarhatja mind az in vivo, mind az in vitro kísérletek értelmezését. A jelölt a kolinerg rendszert kiemelten vizsgálta, mely esetben ez a probléma mindenképpen komoly megfontolást igényel. Tapasztaltak CNO



hatást a kontroll mérések során hM3D receptort nem kifejező sejtekben? Próbáltak esetleg más, kevésbé bomlékony hM3D agonistákat a CNO mellett?

4. Az M-áramról a jelölt leírja, hogy a kolinerg sejtek jellemzője és GABAerg neuronokban nem fordul elő, miközben a glutamaterg sejteknek csak kis százalékában figyelhető meg. Az M-áram gátlószerének, az XE991-nek hatására a kolinerg neuronok tüzelési frekvenciája megnövekedett. Emellett, a magas küszöbű membránpotenciál-oszcilláció is kolinerg neuronokban fordult elő, és glutamaterg sejtekben csak egy, acetilkolin kotranszmitterrel rendelkező kis alpopulációban figyelték meg. Ezen összehasonlítások háttérében alapvetően a különböző sejtpopulációk eltérő ioncsatornáit, morfológiai jellemzőit és számos sejtelettani különbség is sejthető. Vannak funkcionális vizsgálatok arra, hogy az M-áram kialakulása és a magas küszöbű membránpotenciál-oszcilláció mennyiben igényli az acetilkolin jelenlétét, vagy meghatározó szerepét a kolinerg sejtek fenotípusának kialakításában? Vizsgálták esetleg, hogy kolin acetiltranszferáz (ChAT) KO egerekben hogyan változik meg a KCNQ alegységek eloszlása és a csatorna működése?
5. Az asztrocita modulációs hatások vizsgálata során a jelölt megállapította, hogy a PPN neuronok membránpotenciáljára gyakorolt kannabinoid hatás asztrocita aktiváció következménye. Itt ugyanakkor számos vizsgálat korrelatív marad, miközben az asztrocita-specifikus optogenetikai stimulációs kísérletekből nem világos, mi pontosan a CB1 hatás helye. Támogató megfigyelés, hogy a CB1 knockout egér asztrocitáin a kalcium hullámok frekvencianövekedése elmarad, de ebben a modellben nem különül el az asztrocita CB1 hatás a neuronális CB1 hatásoktól. Lenne esetleg értelme egy GFAP-ChR2 / CB1 KO egérvonal, vagy egy asztrocita-specifikus (kondicionális) CB1 KO egér létrehozásának további funkcionális vizsgálatok elvégzése érdekében?
6. A jelölt felveti, hogy a humán szeletpreparátumokon végzett mérések során a slow inward current (SIC) kisebb amplitúdójához hozzájárulhattak a minta szállítási körülményei, mert a hasonlóan szállított egér minták esetében közel szignifikáns amplitúdó csökkenés volt látható. Van információ arra, hogy milyen időfüggő változásokat mutatnak az asztrociták (morfológia, membránpotenciál, réskapcsolatok működése, stb) a szeletpreparátumokban az idő előrehaladtával és milyen postmortem és inkubációs időn belül tekinthető megfelelőnek az asztrociták állapota a mérések kivitelezéséhez? Ezen felül a mikroglia sejtekről ismert, hogy érzékenyen reagálnak a szeletpreparáció okozta szöveti sérülésre és már rövid időn belül nagymértékű fenotípus változáson mennek át. Szerepet játszhat az

Ádám Dénes  
Laboratory of Neuroimmunology  
HUN-REN Institute of Experimental Medicine  
1083 Budapest, Szigony u. 43.  
Hungary



asztrocita-mikroglia interakciók révén a mikroglialis transzformáció az asztrocita hatások időfüggő változásaiban a szeletek inkubációja során?

**Dr. Dénes Ádám**

Budapest, 2024.06.24