

## Válaszok Prof. Reglódi Dóra bírálata

Köszönöm, hogy Professzor asszony elvállalta doktori értekezésem bírálata, örülök, hogy azt kiemelkedő színvonalú munkának itéli. Válaszaim megjegyzéseinek, kérdéseinek sorrendjében sorolom.

### 1. Tartalmi megjegyzések

*„A bevezetésben a szaglórendszerrel kapcsolatos téma nincs megemlítve.”*

A bevezetés fejezetben csak a súlyponti témákra tértem ki, így többek között az amiloid fehérje, a tau fehérje kóros foszforilációjával kapcsolatos legfontosabb ismeretek, vagy a központi idegrendszeri extracelluláris mátrixszal kapcsolatos főbb tudnivalók bemutatására. A szaglórészert értekezésemben a humán mintákkal kapcsolatban érintettem, ahol egy új neuron populációt azonosítottam az eddig gyakorlatilag neuronmentesnek tartott tractus olfactoriusban. Ezek száma Alzheimer-kórban elhunytak mintáin alacsonyabb volt. A Newcastle Agybankból szerzett mintákon nem állt rendelkezésre adat arra nézve, hogy a betegek szenvedtek-e anosmiában, így feltevés szintjén említettem meg, hogy az azonosított secretagogin-immunoreaktív sejtcsoport a betegségben sérülékenyebb lehet. A szaglórészerttel kapcsolatosan nem végeztem ehhez kapcsolódó vizsgálatokat, így mint neurobiológiai rendszer ismertetését a bevezetőben túlzónak találtam volna, az ezzel kapcsolatos megállapításokat, feltevéseket a Megbeszélés fejezetre korlátoztam.

### 2. Formai észrevételek

Bíráló az irodalmi hivatkozásokkal kapcsolatos esetleges pontatlanságot említi. A referencia adatbázist az Endnote számítógépes programmal végeztem, az a közleményeik adatait az NCBI PubMed portálról automatikus rendezte, a szövegbe való beillesztést és formattálást a program automatikusan végezte. Az előforduló hibák mindezek ellenére történtek, azokat manuálisan egyenként valóban nem korrigáltam.

### 3. Kérdések

A) *„Az értekezésben egy fejezet a hibernációról szól, és annak során megfigyelhető reverzibilis dendrit átépülésről. Mit gondol a jelölt a tartós hypometabolizmus és a szinaptikus plaszticitás kapcsolatáról? Mi történik, hogyha ez az állapot egy bizonyos idő elmúltával nem ér véget, mint a hibernáció során, akkor a leépülés is irreverzibilissé válik?”*

Nem állnak rendelkezésre adatok ennek a kérdésnek megnyugtató megválaszolására, a kérdést úgy tudnánk vizsgálni, ha az állatokat nem engednénk álmukból felébredni. A téli álmat alvó emlősök a hibernáció folyamán rövid időre rendszeresen felébrednek, ezekről a fázisokról tudjuk, hogy szinapszisaik ekkor regenerálódnak. Erre alapozva feltételezzük, hogy a károsodás egy kritikus időtartamon túl valószínűleg irreverzibilissé válna.

B) *„Ugyanebbez a témához kapcsolatos kérdés: ismer-e a jelölt adatot arról, hogy másfajta átmeneti hypometabolizmus idején, tehát ami nem a hideg miatt, hanem pl. szárazság, vagy éhezés miatt következik be, is hasonló átépülés figyelhető meg?”*

Egérben éhség indukálta lehűlés okozta szinapszisszám csökkenésről nem ismerünk adatot. Arra ugyanakkor van adat, hogy a hibernációra nem képes egérben mesterségesen előidézett hipotermia szinapszisszám csökkenést okoz (Peretti és mtsai, Nature 518:236, 2015). A folyamatban egy RBM3 hideg-sokk protein indukálta védekező mechanizmus

kulcsfontosságú, mert a fehérje hiánya esetén nem jön létre szinaptikus regeneráció egy következő eutermiás fázisban. Transzgenikus neurodegeneratív (5XFAD Alzheimer-típusú) egérmodellen ezen RBM3 fehérjének elégtelen működése (indukciója) okozza a regenerációs képességet. A szárazság valóban okozhat hasonló reverzibilis szinaptikus csökkenést, de ez is a hypothermián keresztül valósul meg, ahogyan azt egy főemlősben, a Madagaszkárban élő gyűrűsfarkú makiban (*Microcebus griseorufus*) észlelték (Kobbe és Dausmann, *Naturwissenschaften* 96:1221, 2009). Ezek az állatok a száraz évszakban folyamatosan hibernálják magukat.

- C) „A 31. oldalon szerepel 300%-os zsugorodás, ami nehezen értelmezhető, a többi helyen szereplő 10%-os zsugorodás mellett. Fejtse ki részletesebben, hogy ezt hogyan érti, vagy mi az oka ennek a különbségnek.”

Az adat egy módszertani műtermék korrekciójára vonatkozik. Metszeteink vastagságát ismertük (a metszés folyamán mi állítottuk be). A hisztokémiai feldolgozás, tárgylemezre való felhúzás, víztelenítés, lefedés után a Z tengelyben azt újból megmértük, és 300%-os zsugorodást tapasztaltunk. Az X és Y tengely mentén létrejött zsugorodás alatt azt értjük, hogy a metszet tárgylemezi felszínén és fedőlemez borította felszínén 10%-os hosszkülönbséget mértünk a lateromedialis ill. dorsoventralis szélek között.

- D) „A 41. oldalon szereplő Western blot igen gyenge minőségű, a kérdés, hogy vajon az antitestek gyenge volta okozhatta-e ezt a minőséget, hiszen csak óriási háttér mellett látható jelölődés? Ha igen, akkor mennyire megbízhatóak ezek az eredmények?”

Az említett Western blotról készült felvételen az endogén (22C11 antitest által felismert) és humán (6E10 antitest által felismert) amiloid prékurzor fehérje csíkjai valóban magasabb háttér mellett láthatóak, meglátásunk szerint ugyanakkor specifikusak. Az ábrán ugyanakkor meggyőzőnek ítéljük annak fő üzenetét, hogy a humán amiloid prékurzor fehérje csak a transzgenikus egérből vett mintában detektálható mind a szolubilis, mind a membránkötött frakcióban.

- E) „A jelölt leírt számos extracelluláris mátrixot érintő változást. Ismert-e olyan adat, mely Alzheimer kórban a membrana basalis asszociált extracelluláris matrix komponensek változásait írja le?”

A membrana basalis kapcsolatos változások az amiloid angiopathiával kapcsolatban hordoznak klinikai relevanciát. A hiperkoleszterinémia az Alzheimer-kór kialakulásának kockázati tényezője, mely – ahogyan azt kísérletes állatmodellben is bizonyították (pl. Hawked és mtsai, *J Pathol* 235:619, 2015) – a membrana basalisban a IV-es típusú kollagén, a fibronectin és az apolipoprotein E mennyiségének csökkenéséhez, a periciták pusztulásához vezet az agyi neurovaszkuláris egységben. A kétfázisos/támadóhelyes elmélet (double-hit hypothesis) alapján az apolipoprotein E 4-es alléljának (apoE4) expressziója különösen hajlamosít a bazális membrán elfajulására, a gén előfodulása emberben 4-15-szeresére növeli a betegség kialakulásának kockázatát és annak korábbi fellépését is (Zlokovic, *Clin Impl Basic Neurosci Res* 70:440, 2013).

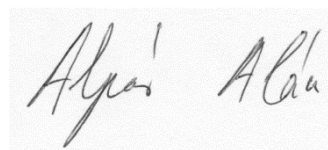
- F) „Ugyancsak ezzel kapcsolatos kérdés, hogy a matrix lipidkomponenseinek a változásáról mit lehet tudni Alzheimer kórban?”

A központi idegrendszeri extracelluláris mátrix komponensei jellegzetesen glikoproteinek és proteoglikánok, lipidek minimális mennyiségben fordulnak elő. Lipidek membránkötött formában, gangliozid vagy galaktozilceramid típusú glikánokként fordulnak elő, a többi szövethez képest nagy mennyiségben. Epilepsziában, neurodegeneratív betegségekben (így Alzheimer-kórban is) az ezeken előforduló poliszálsav mennyiségének növekedését figyelték meg a gyrus dentatusban (Mikkonen és mtsai, Eur J Neurosci 11:1754, 1999). Kimutatták, hogy Alzheimer-kórban a szürkeállomány lipid összetétele változik, de ez elsősorban intracelluláris átrendeződést vagy a sejtmembrán lipid-raftok összetételének megváltozását jelenti. Példa erre a dokozahexaénsav (DHA)-foszfolipidek mennyiségének radikális csökkenése, mely a szinaptikus membránkapcsolt proteinek működészavarához vezet (Yuki és mtsai, Sci Rep 4:7130, 2014), vagy az a jelenség, amikor a betegség korai stádiumában a kérgi neuron sejtmembránjainak viszkozitása növekszik, és ez elősegíti az amiloid prékurzor fehérje/ $\beta$ -szekretáz 1 (BACE1) interakció kialakulását (Fabelo és mtsai, Neurobiol Aging 35:1801, 2014). A kérdés ugyanakkor egy fontos klinikai kezelési lehetőséget is feszeget, hiszen liposzómális mátrixba burkolt anyagok segítségével immunterápiás kezelés lehetősége nyílik meg (pl. EB101 vakcina segítségével APP/PS1 állatban a  $\beta$ -amiloid lerakódás és a következményes amiloidózis-indukálta gyulladás gátolható, Carrera és mtsai, Biomed Res Int 2015:807146, 2015).

G) „*Ismer-e olyan adatot, miszerint a nem amiloidogén fehérje védő hatása esetleg más korról összefüggő degeneratív folyamatban is?*”

Közvetett bizonyítékokat ismerek arra nézve, hogy az amiloid prékurzor fehérje nem amiloidogén expressziója védő hatású lehet más korról összefüggő degeneratív folyamatban. A közös kapocs a megváltozott tau fehérje funkciócsökkenésében keresendő. Az amiloid prékurzor fehérje ferroxidáz aktivitással rendelkezik - a vas exportját segíti -, a tau fehérje pedig a fehérje sejtfelszíni mozgását, forgalmát (trafficking) mozditja elő. A tau-hypofunkció következményes vasfelhalmozódást okoz az idegsejtekben, melyet az Alzheimer-kóron kívül Parkinson-kórban és más taupathiákban is megfigyeltek (Iqbal és mtsai, Nat Rev Neurol 12.15, 2016). Tau-génkiütött állatokban bizonyították, hogy a substantia neuronok pusztulását a vas intraneuronális felhalmozódása okozza, mely vas-kelátor orális adagolásával (clioquinol) megelőzhető (Lei és mtsai, Nat Med 18:291, 2012). Utóbbi kísérlet emberben akár terápiás lehetőséggel is kecsegtet, de átütő klinikai eredményeket ezzel kapcsolatban nem ismerek.

Kelt Budapesten, 2016. február 1-én.



Alpár Alán