

Válasz Prof. Dr. Bagdy György opponens
Dr. Molnár Mária Judit „Új eredmények a neuromuscularis betegségek molekuláris diagnosztikája és terápiája területén” című MTA doktori értekezésének bírálatára

Hálasan köszönöm Dr. Bagdy Györgynek a rendkívül részletes bírálatot, az elismerő és kritikus megjegyzéseket és a kérdéseket.

Válaszomban először a megjegyzésekre majd a konkrét kérdésekre válaszolok.

Válaszok a megjegyzésekre:

Sajnálom, hogy a nevezéktani, rövidítésbeli formai hibák zavarták a bírálót munkájában. A kifogásolt MERRF rövidítésnél a „ragged red” kifejezést azért nem fordítottam magyarra, mert a „rongyos vörös” fordítás használata nehezebben felismerhetővé tette volna a „ragged red” rostot, hiszen a világ minden országában így hívják ezt rosttípust. „Rongyos vörös rost”-ként említése számomra idegenül hatott. A myoclonus és az epilepsia kifejezések pedig fordítást nem igényelnek.

A 2.1 táblázatban, melynek címe „Patogén pontmutációk megoszlása a mitochondriális genomban” nem az eddig leírt pontmutációkat szerettem volna bemutatni, hanem a mitochondriális genom által kódolt tRNS-ek mutációs frekvenciáit szemléltetni, azzal a céllal, hogy az olvasó érzékelhesse, mely tRNS-ek génjei közül melyek azok, amelyek az egyes betegségekben a patogén mutációk forró pontjai. A www.mitomap.org honlap volt a mutációs frekvencia statisztikájának az alapja, a táblázatot ennek az adatbázisnak a segítségével állítottam össze és ott található meg maguk a mutációk.

Mivel az alkalmazott metodikák nagyon szerteágazó voltak és számos eredmény született, csak a diszkusszió szempontjából releváns eredményeket mutattam be a disszertációban. A táblázatok összeállítása során arra törekedtem, hogy egymással összevethető adatokat mutassak csak be, ezért van az, hogy a 4.4. táblázat csak a betegek vérében talált heteroplasmia arányokat tartalmazza. Azoknál a betegeknél, ahol rendelkezünk izommintával és izom heteroplasmia arányát is meghatároztuk, a vizsgálat eredményét az eredmények fejezetben a szöveges részben írtam le (pl. 4.1.2 a. és b. eset).

A helyes honlap cím: www.mitomap.org

A 26. oldalon a helyes mondat: “A 7. exon homozygota C-T tranzíciója (R148X) roma alapító mutációk^{ént} ismert a Lom típusú neuropathia hátterében”

Az opponens hiányolja, hogy a mitochondrialis betegségek molekuláris genetikai diagnosztikai lehetőségei c. fejezetben annak az említését, hogy a DNS szintű diagnosztikai analízis legtöbbször nem lehetséges perifériás vérből, hanem csak a célszervekből. Ezt az információt a 114. oldalon a diszkusszióban említettem meg, ahol az epidemiológiai vizsgálatokat befolyásoló tényezőket elemeztem.

A „Genetikai tanácsadás, prenatalis diagnosztika a mitochondriális betegségekben” c. fejezetben, a random genetikai sodródást jelentő genetikai drift, helyett elütés eredményeként draft szerepel, ami nehezítette a bíráló dolgát ui. a genetikai draft is a populációs genetika egyik alapfogalma. Az „üvegnyak hatás” bemutatásánál az értekezésben egy irodalomra hivatkoztam.

A bíráló rákérdez a hereditær sensomotoros neuropathiák jelenleg használt klasszifikációjára: A disszertációban említett Boerker et al. (2002) klasszifikáció ma is megállja a helyét, azaz a hereditær neuropathiák az alábbi csoportokra oszthatók: Charcot-Marie-Tooth betegség (CMT); Hereditær kompressziós paresisekre hajlamosító neuropathia (hereditær neuropathia with liability to pressure palsies – HNPP); Dejerine- Sottas neuropathia; Congenitalis hypomyelinizációs neuropathia; Roussy-Levi Szindróma. Ezeken a csoportokon belül lehet további alcsoportokat képezni: a CMT-belül 1, 2, 3, 4, 5, X., a CMT1-en belül A, B, C, D, E, F; a CMT2-n belül A, B, B1, B2, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, a CMT4-n belül A, B1, B2, C, D, E, F, H, I, J és a CMTX-en belül X1, X2, X3, X4, X5. Ezeknek az alcsoportoknak a bemutatásától a disszertáció terjedelme miatt tekintettem el.

LITAF gén korábbi neve volt SIMPLE.

Nehezen volt értelmezhető az opponens számára a következő mondat: „A klinikai gyakorlatban arra kell odafigyelnünk, hogy amennyiben az immunológiai eredetűnek vélt CMT1 fenotípus nem javul az immunszuppresszív kezelés hatására a genetikai eredetű neuropathia minden esetben kizárandó.” A mondattal arra utaltam, hogy amennyiben egy sporadikus progresszív neuropathiában szenvedő immunszerológiai eltérésekkel rendelkező beteg nem javul az immunszuppresszív kezelés hatására, a betegség hátterében gondolnunk kell genetikai tényezők szerepére is. Ez a következtetés a PMP22 mutáció és vasculitis együttes jelenlétét mutató család esetének diszkussziója során olvasható.

A Molekuláris biológiai metodikák során több formai kifogást említ meg a bíráló. Az első mondat „Mitochondriális betegségek vizsgálata során alkalmazott módszerek” mondat a szerkesztés során tévesen félkövér betűkkel íródott és ez megtévesztővé tette a fejezet szerkezetét, ugyanis tényleg úgy tűnik, mintha valamennyi alkalmazott molekuláris biológiai metodika csak a mitochondriális betegek vizsgálata során került volna alkalmazásra.

A fejezetben az SI mértékegységeket használtam.

A szekvenáló reakciót az illető régióra specifikus forward és reverz primerekkel végeztük el, a forward szó kimaradt a mondatból.

A génterápiás vizsgálatok közül az electroporációs kísérleteket a Montreal Neurological Institute-ban a McGill Egyetemen, a sonoporációs vizsgálatokat az Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézetben végeztem.

A 4.11. ábra aláírásában az A és B szöveg felcserélődött.

Sajnálom, hogy nehezen érthető a 4.1.7. ábra. egy gépelési hiba miatt. A táblázat az eredeti közleményben is szerepel. A fejlécében szerepel helyesen a 4. band, az ábra aláírásban van az elírás.

A 4.24. ábra szövege az ábra alatt olvasható, viszont nem jelöltem a sávokat az ábra C részén és a dystrophin hiányra mutató nyíl lemaradt.

A 4.36. ábra aláírásában az x. jelentése c.863+389. Mivel nem mitochondriális betegségről van szó a homoplasmikus helyett a homozigóta a helyes kifejezés.

Válaszok a konkrét kérdésekre

A dystrophin deficienciához társuló szekunder calpain deficiencia kapcsán a proband testvérének csak CK emelkedése volt, klinikai tünetei nem voltak. A bíráló kérdése, hogy nevezhetjük-e betegnek az ilyen egyéneket? Az elnevezés tényleg nem pontos, ugyan az egyén izmaiban zajlanak patológiás folyamatok, de számára ez nem okoz kellemetlenséget.

Mi magyarázza a következtetést, miszerint a dystrophinopathia azért okozott enyhe klinikai tüneteket, mert az egyidejűleg jelenlevő calpain deficiencia védelmet jelentett az izomsejtek számára és nem arról van szó, hogy a dystrophin mutáció typusa felelős az enyhe klinikai tünetekért?

Következtetésünket arra a megfigyelésre alapoztuk, hogy calpain inhibíciója az utrophin expresszióját fokozza (Tidball 2002, Waheed 2003), az utrophin pedig a dystrophin természetes helyettes molekulája. Esetünkben immunhisztokémiai vizsgálat igazolta az utrophin expresszió fokozódását és a calpain expresszió csökkenését az izomban. Természetesen nem zárható ki az sem, hogy a 22. exon c2836-2838 GAG deléciója következtében kieső Glu hiány a dystrophin funkciója szempontjából nem jelentős változást eredményez és így ennek köszönhető a családban leírt enyhe fenotípus és nem az általunk feltételezett gén-gén interakció eredménye az. Ezt a lehetőséget a diszkusszió tartalmazza. Érdekességgént megemlíteném, hogy a napokban jelent meg egy közlemény, miszerint az osteopontin gén promoterének polymorfizmusa (Pegoraro et al 2011) is befolyásolja a dystrophinopathia progresszióját és glucocorticoidra adott válaszkésztségét. Úgy gondolom, hogy nem sokat kell várnunk arra, hogy a monogén betegségekben a fenotípust befolyásoló gén-gén interakciókról egyre többet megtudjunk.

Ismert-e a perifériás neuropathia társulása mitochondriális genom defektusával?

Igen, a legtöbb mitochondriális betegségben elsősorban az mtDNS betegségekben, de a nuclearis genom károsodása következtében kialakuló OXPHOS betegségekben is gyakran találunk perifériás neuropathiát. Ez sok esetben subklinikus marad, de ENG-vel csaknem mindig lehet igazolni azt, de vannak olyan kórformák, melyekben a súlyos perifériás neuropathia a betegség vezető manifesztációja (ld. 2. mitochondriális esetismertetés).

IBM-ben leírtak-e társult neuropathiát? Történt-e genetikai analízis, amely igazolta az IBM diagnózist? Mennyire volt heterogén a betegcsoport?

Az IBM-ben a n. suralis vizsgálata egyértelműen igazolták a neuropathia fennállását és a betegek electrophysiológiai vizsgálata is a mitochondriális betegekhez hasonlóan igazolt perifériás ideg lesiót. A vizsgált IBM kohort relatíve homogen volt, csak 1 fiatal beteget tartalmazott. Az ő esetében felvetődött az IBM hereditér formája (hIBM), de akkor, amikor a vizsgálatok készültek még nem ismertük a hIBM-t okozó gént (GNE), így nem is vizsgáltuk azt.

A dolgozatban szereplő preimplantációs genetikai diagnosztika alkalmazása esetén milyen heteroplasmia arány az elfogadható? Mennyi a tisztán vad típusú mtDNS-t hordozó sejtek tapasztalati aránya? Hány petesejtet kell vajon ehhez produkálni az emberben?

Csak a 100%-ban vad típusú mtDNS-eket hordozó embriók implantációja az elfogadott. Az általunk vizsgálat egerekben 1 és 77% között mozgott a heteroplasmia aránya az oocytákban és blastomerekben, míg az egerek farok biopsziájában az 17 és 67% között volt (egy egérnek általában 4-5 oocytáját vagy embrióját tudtuk megvizsgálni). Azt nem tudom megbecsülni, hogy hány petesejtet kell nyerni ahhoz, hogy biztosan legyen köztük olyan, amely csak vad

typusú mtDNS-t tartalmaz, az üvegnyakhatás miatt nagyon eltérhet az oocyták heteroplasmia aránya a mater postmitotikus szövetének heteroplasmia arányától. Egy invitro fertilizáció során átlagosan 10-12 oocytát sikerül nyerni. Az eddig közölt esetekben mindig találtak legalább 1 olyan embryot, amelyik implantációra alkalmas volt, azaz mutáns mtDNS tartalma 0% volt.

A PTC 124 első klinikai vizsgálatai DMD-ben és cystás fibrózisban is lezárultak 2010-ben. Az első DMD vizsgálat negatív eredménnyel zárult, cystás fibrózisban hatásos volt. Hogy látja a jelölt, mi a magyarázata ennek?

Az Ataluren (PTC1,2,4) első klinikai vizsgálata valóban negatív eredménnyel zárult 80mg/nap dózis alkalmazása mellett, míg ugyanez a gyógyszer az egyidejűleg végzett cystás fibrosis klinikai vizsgálatban pozitív eredményt hozott. Azóta lezártak egy következő Ataluren vizsgálatot is a DMD-ben. Ez egy 3 karú vizsgálat volt (két különböző dózissal 40mg/nap és 80mg/nap illetve placebo kontrollal), Ennek eredménye azt mutatta, hogy a 6 percjáros távolsága az alacsonyabb dózist kapó csoportnak 29.7 m-rel nőtt a placebo csoporthoz viszonyítva, amit szignifikáns javulásnak minősítettek, míg a magasabb dózisban részesülők állapota nem különbözött a placebo csoporthoz képest. Az első vizsgálat negativitása több okkal is magyarázható, ezek közül néhány nem megfelelő dózisválasztás illetve a betegség progresszióját meghatározó egyéb genetikai faktorok (ld. korábban osteopontin stb.) figyelmen kívül hagyása.

Ma 2011-ben hány gént és lokuszt ismerünk a hereditár perifériás neuropathiák hátterében? 2011 év elején 29 gént és 40 lokuszt ismerünk az örökletes neuropathiákban. Az értekezés megírása óta azonosított új gén (SH3TC2) felismerését az új generációs sequenálással végzett teljes exom sequenálása tette lehetővé (Lupski et al. 2010).

A 32. közlemény 5 megye 631 betegében elemzi az A3243G mutáció előfordulási gyakoriságát. Találtak-e a szerzők említésre méltó eltérést a földrajzi szempontból egymástól jelentős távolságra lévő megyék – mint pl. Baranya, Borsod-Abaúj-Zemplén és Budapest – adatainak összehasonlítása esetén? Mi a helyzet a többi vizsgált mutáció esetén?

Válaszomat összevonnám egy későbbi kérdéssel, amely arra kérdez rá, hogy a fent említett mutációt hány családban találtuk meg. Az A3243G mutáció összesen 14 esetben igazolódott (6 proband és 8 családtag). A 8 családtag 3 családból tevődött össze.

Az A3243G mutációt hordozók megyénkénti megoszlása:

Baranya megye: 4; Budapestről és Pest megye: 3; Hajdú Bihar megye: 4.

Az A8344G mutációt hordozók megyénkénti megoszlása: Borsod-Abaúj-Zemplén megye: 4; Budapest és Pest Megye: 10; Hajdú-Bihar megye: 1.

Az „Új mtDNS rendellenességek, új mtDNS betegségek leírása” c. fejezetben a 3. esetben talált mutációk közül az 3268, 3261 és 3259 pozícióban tapasztalt nukleotid cserék is patogénnek bizonyultak-e vagy csak a A3266G báziscsere? Ellenőrizték-e a mitochondriális genom SNP adatbázisában ill. konzervált szakaszokat érintettek-e? Ugyanez a kérdés az A8332G mutáció vonatkozásában is.

Az infantilis myopathiás gyermek esetében az A3266G szubsztitúciót gondoltuk patogénnek, az A3261G az M2 haplocsoportra jellegzetes, az A3259G-t a mitomap.org adatbázis pontmutációnak jelzi, további információt nem találtunk róla. A régió konzerváltságát ezzel az ábrával szemléltetném, melyből látható, hogy a 3266. nukleotid és a környező 5 nukleotid erősen konzervált.

Beteg						TCGAG	CTTGAG								
Homo sapiens	GTTAAGA	TG	GCA	AGCCCGGTAA	TCGC	A	TAAAA	CTTAAAA	CTTTA	CAGTC	AGAGG	TTCAATT	CCTCT	TCTTAAC	A
Gorilla gorilla	GTTAAGA	TG	GCA	AGCCCGGTAA	TCGC	A	TAAAA	CTTAAAA	CTTTA	TAGTC	AGAGG	TTCAATT	CCTCT	TCTTAAC	A
Ursus americanus	GTTAGGG	TG	GCA	AGCCCGGC	TTGC	A	TAAAA	CTTAAAC	CTTTA	TACCC	AGAGG	TTCAAAT	CCTCT	CCCTAAC	A
Equus caballus	GTTAGGG	TG	GCA	AGCCCGGAA	TTGC	A	TAAAA	CTTAAAC	CTTTA	CACTC	AGAGG	TTCAACT	CCTCT	CCCTAAC	A
Felis catus	GTTAGGG	TG	GCA	AGCCCGGTAA	CTGC	A	TAAAA	CTTAAAG	TTTTA	TTATC	AGAGG	TTCAATT	CCTCT	CCTTAAC	A
Mus musculus	ATTAGGG	TG	GCA	AGCCAGGAA	TTGC	G	TAAAG	CTTAAAA	CCCTTG	TTCCG	AGAGG	TTCAAAT	CCTCT	CCCTAAT	A
Ornithorhynchus anatinus	ATTAAGG	TG	ACA	AGACCGGTAA	TTGT	G	TAAAA	CTTAAGC	TTTTA	TAGTC	AGAGG	TTCAAAT	CCTCT	CCCTAAT	A

Beteg									GTTAG						
<i>Homo sapiens</i>	CACTGTA	AA	GCTA	ACT	TAGC	A	TAAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGATT	AAGAG	AACCAACAC	CTCTT	TACAGTG	A
<i>Gorilla gorilla</i>	CACTGTA	AA	GCTA	ACC	TAGC	G	TAAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGATT	AAGAG	TATCGGCAC	CTCTT	TGCAGTG	A
<i>Ursus americanus</i>	CATTAAG	AA	GCTA	ATA	TAGC	G	TAAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGACT	GAGAA	TGCAAAC	TTCTC	CTTAATG	A
<i>Equus caballus</i>	CACTAAG	AA	GCTA	TTA	TAGC	A	TAAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGATT	GAGGG	TTCAACC	CCCTC	CCTAGTG	A
<i>Felis catus</i>	CATTAAG	AA	GCTA	AAT	AAGC	A	TAAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGACT	GGGAG	TTTAAAT	CTCCC	CTTAATG	A
<i>Mus musculus</i>	CACTATG	AA	GCTA	A	GAGC	G	TAAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGTTA	GAGAC	CTTAA	ATCTC	CATAGTG	A
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	CATAAAG	AA	GCTA	TTG	CAGC	A	GTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGATT	GAGAT	ACACT	TTCTC	CTTATG	A

Az édesanya vérből izolált mtDNS vizsgálata során 30%-os heteroplasmia arányt találtunk.

A neurológiai és pszichiátriai tünetek és a genotípus összefüggéseinek elemzése mitochondriális betegségekben fejezet érdekes fejtegetést, és emellett néhány ellentmondást tartalmaz. A bíráló véleménye szerint a 4.4 táblázat adatai csak trend szinten erősítik meg a depresszió és az mtDNS heteroplasmia arány korrelációját. Kérdése arra irányul, hogy vajon a depresszió nem a fizikai tünetek talaján alakul-e ki. Emellett kérdés, hogy a depresszió mely tünetei jelentkeztek a magas heteroplasmia arány mellett és időben együtt jártak-e a fizikai tünetek megjelenésével? Az egyes betegeknél feltüntetett szorongásra, pánikra mennyire vonatkozik az időbeni egybeesés a fizikai tünetekkel?

typusú izomgyengeséggel, de nem volt hypacusisa, és törzsataxiája csak minimális volt. Epizódikusan jelentkező pszichiátriai tünetei elsősorban a depresszív hangulat mellett kifejezett szorongásból, micromániás gondolatokból, örömtelenségből, alvászavarból tevődtek össze, mely miatt alkoholistává vált. A 2. iker fiúnak nem voltak neurológiai tünetei, ő 20 éves kora előtt került pszichiátriai osztályra szorongás, iniciatíva szegénység, anhedonia és phobiás tünetek miatt. A pszichiátriai tünetek évekkal megelőzték a neurológiai tüneteket minden betegnél, a mater esetében 3 évtizeddel.

Jogos a bíráló felvetése, hogy vajon nem a somatikus tünetek okozta hátrány következtében alakul-e ki ez a tünetcsoport az időnként mozgásában súlyosan korlátozott betegekben. Ennek vizsgálatára az értekezés benyújtása óta saját kutatást végeztünk. Genetikailag igazolt mtDNS mutációval rendelkező betegekben (13 családból 18 beteg) vizsgáltuk az egyes pszichiátriai tünetek előfordulási gyakoriságát. A kontroll csoportot tíz PMP22 géndefektussal rendelkező örökletes neuropathiában szenvedő beteg alkotta, akik kifejezett somatikus tünetekkel rendelkeztek, de központi idegrendszeri érintettségük nem volt. Eredményeink alapján a mitochondriális csoportban a depresszió szignifikánsan gyakrabban fordult elő (Inczédy Farkas G. és mtsi. közlés folyamatban). Saját megfigyelésünk mellett irodalmi adatok is arra utalnak, hogy a mitochondriális funkciózavar szerepet játszhat a leggyakrabban polygénés és multifaktoriális okokra visszavezethető depresszió hátterében (*Gardner A , Boles RG: Beyond the serotonin hypothesis: Mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. Progr Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiatry 2010, doi:10.1016 pnppb 2010.07.030*).

Szintén a fenti témához kapcsolódik a kérdés: A vérben és agyban mért heteroplasmia arány jelentősen eltér. Mennyire jár együtt a neuronokban mért heteroplasmia arány a központi idegrendszeri szimptómákkal?

A betegeink agyi heteroplasmia arányáról sajnos nincs adatunk. Az mtDNS betegségekből irodalmi adatok szerint az egyes neuronok, agyrégiók heteroplasmia aránya is más és más lehet, hasonlóan az izomhoz. A központi idegrendszeri tünetek kialakulásában nem csak a relatíve stabil heteroplasmia arány, hanem a neuronok dinamikus változó metabolizmusa és a cerebrális vérátáramlás is meghatározó. Pl. MELAS szindrómában, Leigh betegségben MRI spektroszkópiával követve a beteg állapotát az egyes agy régiókban mért pH értékek és laktát szint jól követi a klinikai tüneteket, ezzel szemben az agysejtek heteroplasmia aránya a klinikai tünetek alakulásával egyidejűleg nem tud változni.

Ismételten köszönöm Dr. Bagdy Györgynek, nagyon érdekes problémákat felvető bírálatát és az akadémiai doktori értekezésemben leírt tudományos eredményeim elismerését.

Budapest, 2011. 01. 22.

Dr. Molnár Mária Judit

