

Válasz Prof. Dr. Faludi Gábor opponens
Dr. Molnár Mária Judit „Új eredmények a Neuromuscularis Betegségek Molekuláris
Diagnosztikája és Terápiája területén” című MTA doktori értekezés bírálatára

Nagyon köszönöm Dr. Faludi Gábor opponensnek akadémiai doktori értekezésem igen körültekintő, gondos bírálatát, valamint a bírálatában megfogalmazott kritikus és méltató véleményét. A feltett kérdésekre válaszaim az alábbiak:

Milyen eredményekről tud beszámolni a NEPSYBANK alapítását illetően?

A NEPSYBANK létrehozását a Magyar Klinikai Neurogenetikai Társaság elnökeként kezdeményeztem 2005-ben. Eleinte csak a mitochondriális és neuromuscularis betegek, valamint egészséges kontrollok biológiai mintáit és a hozzátartozó adatbázisokat gyűjtöttük, később a stroke, Parkinson kór, Huntington kór, demenciák is a célpontba kerültek. Jelenleg kb. 5000 minta (DNS, RNS, plasma, izom, n. suralis, fibroblaszt) van a biobankban. A NEPSYBANK tapasztalatait kamatoztattuk a SCHIZO08 Konzorcium SCHIZOBANK –jának létrehozásakor. A NEPSYBANK azért került a bevezetésben említésre, mert a biobank építés egy nagyon fontos innovatív folyamat, hiszen a keletkező kutatási infrastruktúra minősége alapvetően determinálja a kutató munka eredményét, és nem csak közvetlenül a neuromuscularis betegségek diagnosztikáját és terápiáját szolgálja. Az értekezésben a mitochondriális betegségekre vonatkozó vizsgálatokban támaszkodtam a NEPSYBANK kínálta lehetőségekre.

A Módszerek fejezetből **hiányolja a bíráló a mitochondriális epidemiológiai vizsgálatban résztvevő betegek klinikai adatainak ismertetését.** Az A3243G mutáció elemzéséhez használt 631 beteg beválasztásának kritériumai a 30. oldalon olvashatóak. Az A8344G mutáció előfordulási gyakoriságának elemzéséhez használt betegek a 631 beteg közül kerültek ki, de nem kerültek beválasztásra azok a betegek, akik sensoneurialis nagyothallásuk vagy diabetes mellitusuk miatt kerültek be az előző kohortba. A 30. oldalon azt is felsoroltam, hogy az ország mely megyéiből történt a betegek beválasztása.

A bíráló rákérdez a Fázis I vizsgálatban résztvevő egyének esetleges nem felismert betegségeire.

A sonoporációs vizsgálatnál egészséges önkénteseket vizsgáltunk, akik kérdőívet töltöttek ki, arról, hogy van-e betegségük. A sonoporációt megelőző fizikális vizsgálatuk kiterjedt általános belgyógyászati állapotukra is a neurológiai status mellett és ellenőriztük általános laboratóriumi paramétereiket is. A vizsgálatok során eltéréseket nem találtunk.

Az egér oocytákkal végzett kísérlet sorozat hol történt? A jelölt milyen munkafolyamatban vett részt?

A munka az Eötvös Ösztöndíj támogatásával történt a Montreal Neurological Institute-ban. Ez volt az első önálló kutatási témám a McGill Egyetemen. Az téma kutatása kezdeményezésemre indult, az egér oocyta kísérleteket (ovarium stimuláció, oocyta izolálás, embryo tenyésztés, blasztomer biopszia, molekuláris genetikai vizsgálatok) saját kezűleg végeztem a házigazda Eric Shoubridge-el és az MNI Szülészeti-Nőgyógyászati Klinika *in vitro* fertilizációs munkacsoportjával konzultálva.

Metodikailag hogyan oldható meg a heteroplasmia mérése?

Az mtDNS heteroplasmia arányát PCR-t követően restrikciós fragment length polymorfizmussal határoztuk meg. A PCR terméket restrikciós enzimmel hasítottuk, mely vagy csak a mutáns, vagy csak a vad típusú mtDNS-t hasította. Electrophoresist követően a

hasított és hasítatlan DNS molekulák arányából számítottuk a heteroplasmia arányát Montrealban P₃₂ izotóp detekciót követően Storm Phosphorimagerrel, Magyarországon a Quantity One software segítségével.

A roma populációban végzett vizsgálatok esetén hogyan igazolták a roma származást? Történt-e genetikai vizsgálat a roma származás validálására?

A roma populációban végzett vizsgálatok során a betegtől megkérdeztük a származását és abban az esetben kerestük csak a hereditér neuropathiákért felelős roma „alapító” mutációkat, ha a beteg romának vallotta magát. Mivel mind a Lom, mind a CCFDN háttérében „alapító” roma mutáció áll, külön vizsgálatot nem végeztünk a származás igazolására.

Kijelenthető-e egyértelműen az első 2 eset ismertetése kapcsán, hogy az azonosított mutációk és a phenotypus között direkt összefüggés áll fenn? Milyen további vizsgálatokkal lehetne megerősíteni ezt az összefüggést?

Egyértelműen a mitochondriális betegség következményének gondoltuk mind a bemutatott Kearns – Sayre Syndroma, mind a mitochondriális neuropathia esetét, melyhez myopathia is társult. Véleményüket a szövettani leletek és a genetikai vizsgálatok eredményei támasztják alá. A már 20 éves korban súlyos progresszív ophthalmoplegia externa és szívritmuszavar tüneteit mutató fiatal hölgy esetében nem volt meglepő az izmokban talált myopathológiai eltérés. A genetikai eredmény annyiban volt szokatlan, hogy nem a klasszikus helyen és nagyságban találtuk meg az ún. „common deléciót”, hanem az mtDNS egy másik régiója károsodott. A 61 éves férfi esetében az izombiopsziában talált kifejezett mitochondriális eltérések segítettek a diagnosztikában. Amennyiben csak önmagában az öregedésnek nyilvánítanánk a mitochondriális elváltozásokat, azoknak a rostok kevesebb, mint 5%-ban kellene csak jelen lenniük, azonban itt nem ez volt a helyzet. A morfológiai kép nagyon súlyos elváltozásokat igazolt. Normális öregedés kapcsán eddig az izomban nem írtak le egyes nagy mtDNS deléciót. Izombiopsziát, vagy a beteg fibroblast tenyésztésének légzési lánc komplexének aktivitásának mérésével lehetne hasonló esetekben megerősíteni a mitochondriális funkciózavar tényét.

A 3. esetben hogyan lehetséges az, hogy az izomból izolált mtDNS mutációja a vérből izolált mtDNS-ben nem volt kimutatható?

Az izom postmitotikus szövet, így a mutáció nem mosódhat ki, a vér alakos elemei fokozatosan megújulnak így azt, hogy a mutáció kimutatható vagy sem, az határozza meg, hogy a haemopoiesis aktuálisan a mutációt tartalmazó, vagy nem tartalmazó sejtvonalból indul.

A 4. eset vizsgálata kiterjedt a mitochondriális haplocsoport elemzésre is. Mi ezeknek a vizsgálatoknak a jelentősége? Hogyan illeszthetők ezek az eredmények a diszkusszióba?

Az A8332G mutációval rendelkező családban azért történt haplocsoport elemzés, mert az mtDNS vizsgálata során egy kelet-ázsiai populációra jellegzetes 9 bp-os antropológiai markert is találtunk. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a magyar történelemmel magyarázható-e ennek a deléciónak a jelenléte, vagy esetleg az új patogén mutáció melletti régióban újonnan ismét kialakult egy olyan polymorfizmus, amely 50.000 évvel ezelőtt Kelet-Ázsiában is már kialakult. A család haplocsoportja kelet-ázsira jellegzetes B haplocsoportnak bizonyult, de 27 honfoglaláskori minták közül Raskó István és mtsi csak 1 esetben találták meg ezt a haplocsoportot (Tömöry et al. 2007). Ennek a honfoglaláskori mintának a sequencia mintázata azonban eltért az általunk talált sequencia mintázattól. Ez alapján kicsi a valószínűsége annak, hogy az általunk vizsgálat család ősei a honfoglaláskori magyarok közül kerültek volna ki.

A bíráló hiányolta annak felvetését, hogy az mtDNS mutációval rendelkező családban a depresszió komorbiditás lett volna, vagy esetleg a családi mintázatot alkotva tanulás útján, vagy psychogen módon a súlyos somatikus betegség következtében keletkezett volna. Rákérdez, hogy történt-e komorbiditási vizsgálat ill. milyen volt az alkalmazott gyógyszerek hatása.

Komorbiditási tényezőkre történt vizsgálat, a betegeket belgyógyászati, neurológiai és pszichiátriai szempontból is megvizsgáltuk. Logikus a felvetés, hogy a depresszió hátterében egyéb okok is meghúzódhatnak, azért véltük mégis az mtDNS direkt hatásának a pszichiátriai tünet együttest, mert a mutációt nem öröklő szintén a családban élő lánytestvérnek semmiféle pszichiátriai tünete nem alakult ki. Ezzel szemben a legnagyobb heteroplasmia aránnyal rendelkező édesanya depressziója volt a legsúlyosabb, annak ellenére, hogy nem az ő somatikus tünetei voltak a legkifejezettebbek. Az eset kapcsán egy szisztematikus vizsgálatot indítottunk el, melyben összehasonlítjuk az mtDNS mutációval rendelkező betegeink pszichiátriai tüneteit egy másik szintén súlyos somatikus tüneteket eredményező nem mitochondriális, de genetikusan meghatározott neurológiai betegséggel, a PMP22 gén hibája következtében kialakuló neuropathiával (Dr. Inczedy Farkas Gabriella és mtsi. közlés folyamatban). Eredményeink szerint a depresszió szignifikánsan gyakoribb a mitochondriális csoportban. A mitochondriális depressziós betegek terápiás válasza az alkalmazott SSRI készítményekre rossz volt. Szorongásuk kezelésében a clonazepam volt a leghatékonyabb. A mater utolsó időskori depressziós epizódja több mint másfél évig húzódó folyamatos hospitalizációt igényelt.

Hogyan magyarázható az a megfigyelés, mely szerint a 10. és 180. nap között a plazmid DNS szint 92%-os csökkenése mellett a β -gal aktivitása 67%-al csökkent.

A bejuttatott terápiás gén nem épül be a nukleáris genomba, hanem extrachromosomálisan marad. Ebből adódóan az endonucleasok targetjévé válik és nem menthető meg a degradációtól. A terápiás vektor nem csak magát a terápiás gént tartalmazta. A terápiás gén fehérje szintű expressziójának mértéke nem kell, hogy teljesen megegyezzen a bevitt DNS molekula mennyiségével.

Mi a véleménye a jelöltnek arról, hogy primer autoimmun betegségekben milyen gyakori a neuropathia illetve a mitochondriális mutációk előfordulása?

A primer autoimmun betegségekben gyakran látunk neuropathiát, ami lehet primer folyamat pl. antigangliozid ellenes antitest károsítja a perifériás ideget, vagy sekunder jelenség pl. vasculitisben. A mitochondriális mutációk előfordulási gyakoriságáról az autoimmun betegségek népes csoportjában nem rendelkezem pontos információkkal. Tudomásom szerint ilyen jellegű munka eddig nem született.

A hereditær neuropathiákkal kapcsolatos korrekciót elfogadom, azaz az általam felsorolt 25 gén szűrése a klinikai gyakorlatban csak *egyenlőre* megoldatlan, az új technológiák bevezetése valószínűleg megoldja a kérdést.

Azokban az esetekben, ahol a tünetek felnőttkorban jelentkeztek és genetikai eltérést sikerült igazolni, mi a magyarázata annak, hogy a phenotypus csak a felnőtt korban válik kórossá?

Az egyes gének hibái más és más mechanizmus alapján okozzák a neuropathiát eredményező sejtbiológiai rendellenességet. Például a mitochondriális betegség esetén a mitochondriális dysfunkció okoz energia deficitet, nagy mennyiségű reaktív oxygen gyök termelődést, ami a neurodegenerációt eredményez és ennek következménye a klinikai tünet. A kóros mtDNS-nek

egy bizonyos küszöböt kell elérnie ahhoz, hogy a klinikai tünetek megjelenjenek (csak bizonyos heteroplasmia arány fölött vannak sok esetben klinikai tünetek). Az élet során a postmitotikus szövetekben a kóros mtDNS-ek aránya nő. Más betegségben, pl. a PMP22 esetében a gén dózis hatása okozza a klinikai képet. A duplikáció következtében korábban manifesztálódó klinikai kép a CMT1A alakul ki, míg a deléció a hereditær neuropathia pressure pulsy-t eredményezi. Gén-gén interakciók illetve környezeti hatások is befolyásolják a mutációk phenotypusbeli megjelenését. Erre példa saját esetünk, ahol a PMP22 deléció javította az EGR2 mutáció következtében kialakuló neuropathiában a phenotypust (Reményi és mtsi. 2010).

Az mtDNS epidemiológiai vizsgálatok során talált eredmények a legjobban a francia és taiwani eredményekre hasonlítanak. Hogyan magyarázza ezt?

A különböző beválasztási kritériumok miatt, csak 4 ország eredményei voltak összehasonlíthatóak. Ezek közül a taiwani és a francia eredmények hasonlóak voltak a magyar eredményekhez, míg a finnekénél sokkal magasabb volt az A3243G mutáció előfordulási gyakorisága. Nem zárjuk ki azt, hogy a finn népességben gyakoribb lenne ennek a mutációnak a frekvenciája, de sokkal valószínűbbnek tűnik az a magyarázat, hogy a finn betegség regiszterek a másik három országnál sokkal jobb, célzottabb beteg beválasztást tettek lehetővé.

Milyen egyéb területről ismer a jelölt jelentős eredményeket a génterápia kapcsán?

Számos új eredményről hallhatunk a neurológia területén belül is. Ezek közül azokat említem, amelyek már kereskedelmi forgalomban vannak, vagy a Fázis II. vizsgálatokon túljutottak:

1. A *Cereprot* malignus glioma kezelésére engedélyezték. Ez egy adenovírus konstrukt, amely 1 típusú Herpes simplex thymidine kinase transzgént tartalmaz cytomegalovírus promoterral.
2. Parkinson kórban pozitív eredménnyel zárultak a Fázis 2 vizsgálatok (Neurologix). Adeno-asszociált vírus konstrukcióval a GAD génjét juttatták be stereotaxiás módszerrel a n. subthalamicusba, ahol GABA termelés serkentése javította a Parkinsonos tüneteket.
3. Sclerosis multiplexben lezárultak a Fázis 2 vizsgálatok *BHT-3009 DNS* vakcinával (a myelin bázikus protein génjét tartalmazó plazmid). A vakcina segítségével az immunrendszert újraprogramozzák, ennek eredményeként a beteg a központi idegrendszeri myelin antigéneket jól tolerálja és nem támadja azokat.
4. Az *Ataluren* (PTC124) a patogén mutáció következtében kialakuló kóros stop kodon átugrásával tudja a korai fehérje terminációt megszüntetni. Duchenne típusú izomdystrophiában és cystás fibrosisban zárultak le Fázis 2 vizsgálatok.
5. Duchenne típusú izomdystrophiában PRO44 és PRO51 a dystrophin gén 44. ill. 51. exonjának némítását célozzák a pre-mRNS splicing-ja során (exon skipping). Így az érett mRNS-be a megcélzott exon már nem épül be és működőképes transcript keletkezik (Duchenne típusú izomdystrophiából Becker típus lesz).

Ismételten szeretném megköszönni Dr. Faludi Gábornak tudományos eredményeim elismerését, az értékes bírálatot, az hasznos észrevételeket és kritikákat.

Budapest, 2010. 01. 22.

Dr. Molnár Mária Judit