

Opponensi vélemény dr. Hortobágyi Tibor „Neuropatológiai vizsgálatok neurokognitív zavarral járó betegségekben” c. MTA doktori disszertációjáról

A neurodegeneratív kórképek a leggyakoribb központi idegrendszeri betegségek amelyek kutatása hazánkban nemzetközi hírű. Ezen kutatások azonban dominálónan alapkutatások voltak amelyekre nem épült rá megfelelő színvonalú alkalmazott kutatás. Ennek egyik oka biztosan az hogy hazánkban a neuropatológusok száma igen alacsony és ha „kifejlődik” is egy-egy nemzetközi tekintély, az hamar egy határon túli Intézetben találja magát vezető pozícióban. Hortobágyi doktor ellenkező pályát futott be, mert bár neuropatológussá Londonban a King’s College-ban vált, onnan hazatérve a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetében lett egyetemi tanár és egyik hajtó motora lett a NAP programnak.

A disszertáció célkitűzései igen számosak (13) azonban ezek az alábbi kutatási területekre csoportosíthatók:

1. az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) különféle genetikai alcsoportjának összehasonlítása
2. Alzheimer-kórban a sejtciklus szabályozás zavarainak, a szinaptikus diszfunkciónak, a klaszterin szerepének és az „unfolded protein response-UPR” neuropatológiai elemzése
3. Lewy-testes demenciákban a szinaptikus diszfunkció elemzése valamint egyéb összehasonlító neuropatológiai vizsgálatok Alzheimer és Parkinson kórral
4. Neurodegeneratív és vaszkuláris demenciákban a neurotranszmitter és gyulladáso mediátorok elemzése
5. Traumás agykárosodásokban az axonális károsodások neuropatológiai elemzése és a PARP rendszer szerepének tisztázása a neuronpusztulásban.

A disszertáció 135 oldalon fejt ki a kutatások alapjait és azok eredményét. Az értekezéshez a szerző 70 publikációját használta fel, melyekből 8 első/megosztott első szerzős és 10 utolsó/megosztott utolsó szerzős. Ebből a szempontból nehéz dolga volt a bírálónak mert a megosztott első/utolsó szerzősséget a jelölt nem jelezte egyértelműen sem a szövegben sem a Tézisekben. A publikációk között egy Science és két Nature Neuroscience sok társszerzős cikk is szerepel. Összefoglalva a felhasznált publikációk 80%-a társszerzős munka amelyekben a neuropatológia vizsgálatok elvégzése köthető a jelölthöz (klasszikus patológia és immunhisztokémia, elektronmikroszkópia), a használt egyéb módszerek esetében a jelölt megjegyzi hogy azokat PhD hallgatók, genetikusok és sejtbiológusok végezték. Mindezek

fényében értékelendő a jelölt által összegyűjtött saját kutatásainak új eredményei, amelyekből 40-et jegyez. Hasonlóképpen nagy kihívás volt az hogy az Eredmények fejezet nem különül el hanem összevontan szerepel a Diskusszióval. Ez önmagában nem lenne baj, ha az új originális megfigyelésekhez az eredeti közlemények referenciája szerepelne.... Fentiek alapján a bíráló az első/utolsó szerzős dolgozatokban foglalt kutatásokra és azok eredeti megfigyeléseire fókuszált ahol a jelölt vezető/meghatározó szerepe egyértelműnek tűnik.

ALS kutatások

Az ALS 10%-a familiáris amelyek egy részéért a TAR-DNS-kötő fehérje mutációja felelős. Egy 2009-es Science közleménybe kimutatták hogy örökletes ALS-t a FUS (egy másik transzkripció és splicing szabályozó) mutációja is okozhat, aminek eredményeként az idegrendszerben **FUS+ citoplazmatikus inklúziók** keletkeznek. A FUS mutációja frontotemporalis lobáris degenerációt is okozhat, ahol az inklúzióban a FUS mellett transportin-1 is jelen van. Ezért különféle genetikájú ALS-ekben (FUS-, C9orf72-mutáns és sporadikus) elemezték a FUS és **transportin** együttes szekvesztrálódását és azt találták hogy szemben a FTLD-vel, a transportin-1 nem szekvesztrálódik a FUS inklúziókba aminek oka az hogy a FUS mutációja a C-terminális szakaszon van amely a nukleáris transzportért felel.

TARBP-ALS-ek esetében azt elemezte hogy az ubiquitinált inklúziókban a **TDP-43** jelen van-e. Megállapította hogy a sporadikus és Guam-ALS-ekben az ubiquitin- és p62-pozitív inklúziókban a TBP43 is kimutatható volt. Ugyan akkor a familiáris ALS-ekben, főleg a SOD1 mutáns formában, ritkán lehetett ezt megfigyelni. A TBP43+ inklúziók negatívak voltak P-tau fehérjére.

Miután **optineurin** (OPTN) mutációkat észleltek sporadikus és familiáris ALS-ben, ezért különféle neurodegeneratív proteinopátiákban szisztematikusan elemezte a TDP43 protein és az OPTN kifejeződését. A TDP43-kapcsolt ALS-ek és FTLD-ék harmadában lehetett OPTN-t is kimutatni az inklúziókban, ugyan akkor nem jelentek meg ilyenek a FUS-mutáns degenerációkban. OPTN inklúziók jelentek meg az Alzheimeres esetek egy kis részében, Huntington betegségben, de hiányoztak a spinocerebelláris ataxia-3-ban.

Alzheimer betegség

Az AD biomarkere a **clusterin**. A jelölt azt vizsgálta hogy a szenilis plaquokban az amiloid (A β) mellett jelen van-e a clusterin. Megállapította hogy A β 40+ plakkokban clusterin van jelen, míg a A β 42+-okból hiányzik. Ugyan akkor a kontroll nem-AD agyakban az A β 42+

plakkokban jelen volt a clusterin, amiből arra következtetett hogy a clusterin hiánya a Ab42+ plakkokban a neurodegeneráció és az idegsejt pusztulás jeleként értékelendő.

Lewy testes demenciát (LTD) és Parkinson betegségeket **α -synuclein+** plakkok jellemzik, azonban ezekben AD-patológiai elemek is kimutathatók a kognitív funkciók károsodása mellett/háttérében. A két betegcsoportban az α -synuclein mellett a P-tau és A β fehérjéket tartalmazó inklúziókat vizsgált a neocortexben a mentális funkcióval összehasonlítva. Bár a csökkenő kognitív funkció az α -synuclein pozitivitással korrelált, azonban a betegekben megjelentek a senilis plakok és a P-tau is. Megállapította hogy az LTD-ben a kognitív funkciók kieséséhez az A β és P-tau felhalmozódása is jelentősen hozzá járul.

A familiáris Alzheimer (FAD) betegségben presenilin-1 mutáció mutatható ki. A presenilin a NOTCH jelpályában érintett, mint a β -catenin degradációs mechanizmus eleme. Nem-idegsejtekben a presenilin kiesése a ciklin-D1 fehérje akkumulációjához és sejtproliferációhoz vezet. Örökletes AD egérmódelben és PS-1 mutáns humán AD mintákon elemezte a **ciklin-D1 és β -catenin** kifejeződést. Megállapította hogy a PS-1 mutáció az idegsejtekben (egérmódelben és humán anyagon) a ciklinD1 fehérje felhalmozódásához vezet. In vitro körülmények között ennek következménye a sejtciklusba való belépés, de apoptotikus sejthalál volt, amit si-RNS-ciklin-D1-el, sejtciklus blokkal (quercetin) meg lehetett akadályozni, azonban γ -szekretáz gátlóval nem. A PS1-mutáns egerek hippocampusában β -catenin akkumulációt lehetett megfigyelni.

Felmerül a bírálóban hogy a BRDU pozitivitás S-fázisba való belépést jelent (in vitro assay) Az idegsejtek posztmitotikus állapotból in vivo nem tudnak visszalépni a sejtciklusba, tehát in vitro M-fázisba történő tovahaladás is volt észlelhető? Valamint hogy S-fázisra vagy M-fázisra utaló jelek in vivo is megfigyelhetők voltak?

Vaszkuláris demencia

A kolin acetiltanszferáz (ChAT) aktivitását elemezte vaszkuláris demenciában és AD-ben posztmortális mintákon. A kontroll csoporthoz képest a kombinált vaszkuláris és Alzheimeres demenciában csökkent ChAT aktivitást talált két régióban is BA9 és 20/21, ugyan akkor az infarktusos demenciában a BA9-ben még emelkedett értékeket is mért.

Ehhez kicsit hasonló anyagon elemezte a serotonin receptorok funkcióját (5HT1A,2A) radioligand módszerrel. Infarktusos demenciában és stroke-ban a ligand-kötő képesség

emelkedése volt tapasztalható mindkét receptor esetében a temporális cortexben. Ugyan akkor ez hiányzott szubcorticalis ischemiás vaszkuláris demenciában vagy kevert AD+ vaszkuláris demenciában. Ezen megfigyelések alapján a különféle vaszkuláris demenciák esetében eltérő terápiás stratégiák körvonalazódhatnak.

Agyi trauma

Korai kutatásai során egérmodellt dolgozott ki a traumás agykárosodás mechanizmusának elemzésére melynek segítségével a dexametazon terápiás hatását mutatta ki. A modell felhasználásával a perilezionális területeken található membránkárosodott sejtek kimutatására EwansBule-albumin fluoreszcens jelölési módszert dolgozott ki amellyel ezen sejtek pontosan lokalizálhatók és kvantitálhatók.

A korai traumatikus agykárosodás kimutatásának igazságügyi jelentősége van. Az axonok károsodásának érzékeny jele lehet a β -APP megjelenése. IHC módszerrel ezt vizsgálta három betegcsoportban posztmortem ahol a halál 30 percen belül vagy 35-60 perc között következett be a sérülés után, illetve nem agytrauma miatt halálozás 45-109 perc között. A β -APP protein megjelenését csak az agykárosodást követő 35-60 percben bekövetkezett halál esetében lehetett kimutatni.

Az általa kidolgozott traumás agykárosodási egérmodellben az nNOS által indukált DNS károsodás miatt aktiválódó PARP működését elemezte és specifikus inhibitorok hatását is mérte. Megállapította hogy az aktiválódó nNOS miatt megemelkedik a PARP aktivitás amit PAR fehérje mérésével végzett. Mind a NOS gátló előkezelés mind a PARP gátló előkezelés lecsökkentette a léziós térfogatot.

Felmerül a kérdés hogy ebben az esetben a PARP aktiválódás fiziológiás szükséges folyamat amely a frissen keletkezett DNS-hibák kiküszöbölését szolgálja, így a PARP gátlás a keletkezett mutációk véglegesítését eredményezheti?

Másik kérdés hogy a BRCA-mutáns daganatok esetében bevezetett PARP gátló kezeléseknek lehetséges olyan nem kívánt mellékhatása hogy a neuronokban vagy gliasejtekben mutációk felhalmozódását eredményezheti? NGS adatok alapján az agydaganatok a legalacsonyabb mutációs frekvenciával jellemzett daganatok, így egy ilyen hatás alapvetően, nagyságrendileg változtathatja meg a mutációs frekvenciát....

A fentebb összefoglalt kollaborációs kutatásokból a jelölt személyéhez egyértelműen köthetőnek az alábbi originális megfigyeléseket tartom:

1. Kimutatta hogy örökletes ALS-t a FUS (transzkripció és splicing szabályozó) mutációja is okozhat, aminek eredményeként az idegrendszerben FUS+ citoplazmatikus inklúziók keletkeznek.
2. A TDP43-kapcsolt ALS-ek és FTLD-ék harmadában lehetett OPTN-t is kimutatni az inklúziókban, ugyan akkor nem jelentek meg ilyenek a FUS-mutáns degenerációkban. OPTN inklúziók jelentek meg az Alzheimeres esetek egy kis részében, Huntington betegségben, de hiányoztak a spinocerebelláris ataxia-3-ban.
3. Megállapította hogy AD-ben az A β 40+ plakkokban clusterin van jelen, míg a A β 42+-okból hiányzik. Ugyan akkor a kontroll nem-AD agyakban az A β 42+ plakkokban jelen volt a clusterin, amiből arra következtetett hogy a clusterin hiánya az A β 42+ plakkokban a neurodegeneráció és az idegsejt pusztulás jeleként értékelendő
4. Egérmodellt dolgozott ki a traumás agykárosodás mechanizmusának elemzésére melynek segítségével a dexametazon terápiás hatását mutatta ki.
5. A β -APP protein megjelenését a traumás agykárosodást követő 35-60 percben bekövetkezett halál esetében lehetett kimutatni, amit az igazságügyi orvosi gyakorlatban lehet hasznosítani.
6. A traumás agykárosodás mértékét az nNOS vagy az aktiválódó PARP gátlásával csökkenteni lehet kísérleti modellben.

Mindezek alapján a bíráló elismeri hogy a jelölt disszertációja mögött hosszú évtizedek kutatásai állnak amelyeket döntően kollaborációban végzett azonban ezek egy részében egyértelműen meghatározó szerepet játszott, így a keletkezett eredmények a neuropatológia szempontjából nemzetközi jelentőségűek, ennek alapján a disszertáció nyilvános vitára tűzését javaslom.

Budapest, 2021. április 19.

dr. Tímár József

az MTA doktora