

VÁLASZ

Dr. Gyuranecz Miklós opponens véleményére

Szeretném megköszönni Dr. Gyuranecz Miklós opponensnek, hogy elvállalta MTA Doktori értekezésem bírálatát. Köszönöm az alapos bírálatot és a méltató szavakat. Külön köszönöm a dolgozat minőségét méltató szavait, valamint a módszertan kapcsán alkotott pozitív véleményét. Kutatásaim során mindig arra törekedtem, hogy azok valami újat adjanak hozzá közös tudásunkhoz és amikor csak lehet, még az alap kutatási kérdések esetén is, az alkalmazás irányába forduljanak. Ez a törekvés végig kísérté eddigi munkámat, így kollégáimat és hallgatóimat is arra ösztönöztem, hogy ha élhetek ezzel a hasonlattal, „ne a gombhoz akarjanak kabátot varrni”. Törekedjenek a probléma megismerésére és tudományos munkájukkal annak megoldását tűzzék ki célul. Dr. Gyuranecz Miklós elismerő szavait ezért külön is köszönöm.

Az opponens által feltett kérdésekre az alábbiakban válaszolok.

1) Kutatási eredményei miként hasznosíthatóak esetleg a lizoszomális tárolási betegség diagnosztikájában és terápiájában?

Az MPS II (más néven Hunter-szindróma) diagnosztizálásához a klinikai tünetek, a képalkotó vizsgálatok, a vizelet GAG-szintjének vizsgálata, az IDS enzimaktivitás és a genetikai vizsgálatok kombinációja szükséges. Jelenleg a tüneti kezelés a fő terápiás megközelítés.

Glükózaminoglikán (GAG) felhalmozódás miatt a GAG szint mérése mind vérplazma, mind pedig a gerincvelői folyadék analízise során diagnosztikus értékű, eredményeink alapján egyértelmű kórjelző a különböző mutációk esetén is, amelyek egymástól igen eltérő és súlyosságú fenotípushoz (citopatológiához) vezetnek. Itt kell megemlíteni, hogy az ultrastrukturális elemzés is egyértelmű bizonyítékot szolgáltat a diagnózis igazolásakor, már a perifériális vérminták sejtjeinek analízise is egyértelműen és megbízhatóan megmutatta a tároló vakuólumok felhalmozódását a betegekből származó sejtekben. A LAMP2 fehérje megemelkedett szintje a betegségre utaló jel lehet, önmagában nem diagnosztikus értékű, azonban jól kiegészítheti a diagnózis felállítását.

A további eredményeink azonban neurális prekursor vagy neuronszövet sejtekre vonatkoztak, így a humán diagnosztikában a neurális szövetek hozzáférhetősége miatt nem alkalmasak közvetlen diagnosztikai célokra. Amennyiben vizsgálatainkat a porcszövetek esetében is megerősítenék egy hasonló differenciációs modellben, akkor esetleg az ízületi folyadék vizsgálata már egy könnyebben célba vehető mintaforrás lehetne a diagnosztizálás céljára, esetleg az egyes lizoszomális betegségek elkülönítéséhez is.

Az MPS II-t hagyományosan a klinikai megjelenési forma alapján két csoportba osztják: enyhe és súlyos formára. Mindkét forma több szervi rendellenességgel jár, mint például: durva arc, csontrendszer fejlődési zavara (*dysostosis multiplex*), visszatérő légúti fertőzések, organomegália, sérvek, mongol foltok, alacsony termet, kardiovaszkuláris betegségek és halláskárosodás. A két forma osztályozása elsősorban a központi idegrendszer (CNS) érintettségének jelenléte vagy hiánya és a túlélés hossza alapján történik. Azon betegek, ahol a központi idegrendszer érintett, a betegség főként progresszív kognitív károsodásban nyilvánul meg, a betegeknek rövid a várható élettartamuk, és gyakran 20 éves koruk előtt halnak meg súlyos légzőszervi vagy szívbetegségben (Mao et al. 2024).

A diagnózis felállítására vonatkozó ajánlásokat a Hunter-szindróma Európai Szakértői Tanácsa (HSEEC) dolgozta ki klinikai adatokra alapozva (Scarpa et al 2011). A diagnózis során tehát ha a klinikai tünetek és képalkotó vizsgálatok eredményei alapján felmerül a kórkép, akkor először vizeletvizsgálat, majd enzimaktivitás mérés (iduronate 2-sulfatase (I2S) enzim) következik, ehhez bőrbíopsziából származó fibroblaszt sejteket, vagy perifériális vérmintából származó fehérvérsejteket használnak. Pozitív tesztek esetén genetikai vizsgálat következik az egyes MPS típusok elkülönítésére (7 fő- és számos altípust ismerünk a mukopoliszacharidózis betegségcsoportban). Ez azért fontos, mert a megfelelő enzimpótló terápia kiválasztása csak a pontos diagnózis esetén lehetséges. Azonban az enzimpótlás –rekombináns fehérje adása– a már kialakult rendellenességeket, így a központi idegrendszeret érintő károsodást sem képes kompenzálni, csupán a szervezet szöveteinek működését tudja támogatni és a tüneteket mérsékelni. A csontvelő átültetés is, csak kisgyermekkorban elvégezve lehet elég hatásos, ellenkező esetben itt is csak a tünetek mérséklésére van esély. Kísérleti fázisban génterápiás és kismolekulákon alapuló, a GAG szintézis egyik lépését blokkoló kismolekula tesztelése zajlik, amely több MPS betegség esetén is alkalmazható lehetne. Habár eredményeink új összefüggéseket tártak fel a differenciálódó neurális szövet vizsgálata során, további célzott kutatás lenne szükséges, hogy kismolekulák vagy terápiás targetek kerülhessenek meghatározásra. Sajnálatos, hogy a ritka betegségek viszonylag kis számú érintett betege miatt e betegségek kutatási támogatása és főként a gyógyszergyárak érdeklődése a terület iránt alacsony, így a génterápia vagy a kismolekulák alkalmazásán alapuló eljárások terén elért áttörésig, beleértve a klinikai biztonságosságuk bizonyítását, nem várható komolyabb előrelépés a ritka betegségek, így a lizoszómális tárolási betegségek gyógyítása terén sem.

Referenciák:

Mao, SJ. et al. (2024). The diagnosis and management of mucopolysaccharidosis type II. Ital J Pediatr 50, 207 doi: 10.1186/s13052-024-01769-9

Scarpa, M. et al. (2011). Mucopolysaccharidosis type II: European recommendations for the diagnosis and multidisciplinary management of a rare disease. Orphanet J Rare Dis. 6:72. doi: 10.1186/1750-1172-6-72

2) Az összejt alapú in vitro 3D neurális szövettenyészet tesztrendszereknek történt-e már gyakorlati felhasználása pl: valamilyen gyógyszergyártó céggel együttműködve?

Amennyiben a kérdés a dolgozatban bemutatott rendszerre vonatkozik, akkor a válasz részben igen. Egy, a ritka betegségek sorába tartozó fejlődésneurológiai betegség az ún. Kleefstra-szindróma (amelyet az EHMT1-gén mutációja okoz) vizsgálatához kötődik a rendszer felhasználása. A betegséget klinikai megjelenése alapján sokszor autizmus spektrumbetegségként (ASD) diagnosztizálják. Amennyiben nem merül fel kétség és nem történnek további vizsgálatok, így genetikai vizsgálat, akkor sokszor rejtve marad a valódi ok a tünetek mögött. Egy ASD kutatás kapcsán kutatócsoportunk írt le egy magyarországi beteg gyermeket a szindrómával és végzett vizsgálatokat a gyermek vérmintájából genetikai újraprogramozással létrehozott iPSC sejtvonalak (Varga et al. 2016) segítségével, valamint térképezte a mutációt (Bock et al. 2016). A neurális sejtmodellen több lényeges megfigyelést írtunk le a betegség neuropatológiáját tekintve. Ezeket a kutatásokat a Richter Gedeon Nyrt támogatásával a Richter témapályázat keretében végeztük, amelyet közleményben publikáltunk (Nagy et al. 2017). A kutatások folytatásaként a dolgozatomban ismertetett 3D organoid technikát alkalmazva kollégáim a betegség neuropatológiájának további feltárását 3D modellrendszeren végezték, amelyről tanulmányt jelentettek meg (Balogh A, et al. 2024), szintén a Richter Gedeon Nyrt támogatásával. Habár a

vizsgálatok során konkrét gyógyszerjelöltek tesztelése nem történt meg, a létrehozott tesztrendszer validálása megmutatta annak alkalmasságát a gyógyszerjelölt molekulák tesztelésére.

Nemzetközi kitekintésben az iPSC alapú 3D organoidok tesztrendszerként való felhasználása hihetetlen iramban fejlődik, az eredmények egy önálló kötetet megtölthetnének. Cégek is létrejöttek abból a célból, hogy megbízható és folyamatosan elérhető tesztrendszereket biztosítsanak a kutatások számára (pl: Organome, Hubrecht, Stemonix), amely egyértelműen jelzi az egyre növekvő piaci igényt az *in vitro* szövettényeszetekben előállított organoidok iránt. Az állatmodellekkel összehasonlítva az *in vitro* organoidok csökkenthetik a kísérletek bonyolultságát, és lehetővé teszik az emberi fejlődés olyan jellemzőinek tanulmányozását, amelyeket állati modellekben nehéz lehet vizsgálni (pl: magzati fejlődés, központi idegrendszert érintő modellek).

Talán a legemlékezetesebb a közelmúltból a Zika-vírus (ZIKV) fertőzés hatásának vizsgálata (Qian et al. 2016) és lehetséges terápiás targetek vizsgálata volt (Dang et al. 2016; Salick et al. 2017). Agboola és kollégái közelmúltban megjelent összefoglaló tanulmánya részletesen bemutatja az egyes betegségek modellezése terén az utóbbi években elért eredményeket. Habár számos publikáció látott napvilágot, továbbra is az egyes betegségek patomechanizmusának minél pontosabb feltérképezése áll a kutatások középpontjában. A minél komplexebb és a szövetet minél inkább modellezni képes organoidok létrehozása és karakterizálása továbbra is jelentősen kutatott terület. Az áttörést talán a genetikai manipulációk alkalmazása jelentheti, amelyre példa Kim és kollégáinak 2023-as tanulmánya, ahol genetikai módosítással és optogenetikai módszerrel α -szinuklein (α -syn) aggregáció indukciós rendszert hoztak létre az iPSC sejtvonalban és ennek segítségével vizsgálták az α -szinuklein gyors felhalmozódását és toxikus hatásának mérséklésére képes molekula jelöltek Parkinso-kór preklinikai tesztjükben.

Mindazonáltal a heterogenitás, a differenciációs protokollok adaptálásának szükségessége az egyes betegségek esetén létrehozott sejtvonalakhoz (vagyis a különböző genetikai háttérű sejtvonalak változékonysága) komoly korlátokat jelent és további technológiai és diagnosztikai fejlesztések szükségesek a szélesebb körű alkalmazáshoz (Costamagna et al. 2021; Zhang et al. 2024).

Referenciák:

Varga, E. et al. (2016). Establishment of EHMT1 mutant induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a 11-year-old Kleefstra syndrome (KS) patient with autism and normal intellectual performance, Stem Cell Research, 17(3),531-533, doi: 10.1016/j.scr.2016.09.031.

Bock, I. et al. (2016). Targeted next generation sequencing of a panel of autism-related genes identifies an EHMT1 mutation in a Kleefstra syndrome patient with autism and normal intellectual performance. Gene. 2016;595(2):131–41. doi: 10.1016/j.gene.2016.09.027.

Nagy, J. et al. (2017). Altered neurite morphology and cholinergic function of induced pluripotent stem cell-derived neurons from a patient with Kleefstra syndrome and autism. Transl. Psychiatry 7, e1179. doi: 10.1038/tp.2017.144.

Balogh, A. et al. (2024). Establishment of human pluripotent stem cell-derived cortical neurosphere model to study pathomechanisms and chemical toxicity in Kleefstra syndrome. Sci Rep. 14(1):22572. doi: 10.1038/s41598-024-72791-4.

Qian, X. et al. (2016). Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. Cell. 165(5):1238–54. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.032.

Dang, J. et al. (2016). Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3. Cell Stem Cell. 19(2):258–65. doi: 10.1016/j.stem.2016.04.014.

Salick, M.R. et al. (2017). Modelling Zika Virus Infection of the Developing Human Brain In Vitro Using Stem Cell Derived Cerebral Organoids. J. Vis. Exp. 56404. doi: 10.3791/56404.

Agboola, O.S. et al. (2021). Brain organoid: a 3D technology for investigating cellular composition and interactions in human neurological development and disease models in vitro. Stem Cell Res Ther 12, 430 doi: 10.1186/s13287-021-02369-8

Kim, M.S. et al. (2023). Advanced human iPSC-based preclinical model for Parkinson's disease with optogenetic alpha-synuclein aggregation. Cell Stem Cell. 30(7):973-986.e11. doi: 10.1016/j.stem.2023.05.015.

Costamagna, G. et al. (2021). Advancing Drug Discovery for Neurological Disorders Using iPSC-Derived Neural Organoids. Int J Mol Sci. 22(5):2659. doi: 10.3390/ijms22052659

Zhang, T. et al. (2024). Application Prospect of Induced Pluripotent Stem Cells in Organoids and Cell Therapy. Int J Mol Sci. 25(5):2680. doi: 10.3390/ijms25052680.

3) Tudományos eredményei közül melyikre a legbüszkébb, melyiket tartja a legnagyobb hatásúnak és miért?

Köszönöm ezt az érdekes kérdést, szerencsére nem is olyan egyszerű rá válaszolni. A legbüszkébb az előbb már említett Kleefstra-szindróma kutatása kapcsán elért eredményekre vagyok. Talán azért is, mert nagyon megérintett a kutatásban érintett autizmus spektrumbetegséggel diagnosztizált betegcsoport. Habár a mentorok és a klinikusok is jól a fejünkbe vésik, hogy nem szabad „bevonódni” de mégis, még az anonim klinikai leírások olvasása kapcsán is a kutató, és talán egy fiatal édesanya még inkább része lesz, átérzi a családok gyötrelmeit, amelyet egy beteg gyermekkel átélnek az évek alatt. Amikor a munkánk nyomán hirtelen megszületik a diagnózis, neve lesz annak a klinikai képnek, ami addig sehová nem illett be igazán, akkor az egy komoly áttörés, sokszor megnyugvást és változást hoz a családok életébe. Erre a kutatásra és az ott elért eredményekre igazán büszke vagyok.

Hogy mit tartok a legnagyobb hatásúnak? Nem tudnék egy cikkre rámutatni, inkább úgy fogalmaznék, hogy azt a több éves munkát, ahol publikációk sorozatával mutattuk meg kollégáimmal és tanítványaimmal, hogy az összejtekből *in vitro* létrehozható differenciációs rendszerek nagyon jó modellrendszerként biztosítanak akár fejlődésbiológiai kérdések, akár betegségek patomechanizmusának megértésében, és ezáltal hasznos tesztrendszerként működhetnek toxicitás vizsgálatokban vagy gyógyszerjelöltek tesztelésében. Az, hogy ezzel az eszköztárral a kísérletekben felhasznált állatok száma csökkenthető és a kutatások pontossága növelhető, már önmagában komoly eredmény. Azt remélem, hogy ez a munka tovább folytatódik egyre több hazai laboratóriumban is és további értékes kutatási eredményeket hoz majd.

Végezetül szeretném megköszönni a bírálatot és remélem, hogy kérdéseire adott válaszaimat megfelelőnek tartja és elfogadja.

Tisztelettel:

Kelt: Gödöllő, 2025. március 27.



Dr. Kobolák Julianna Ilona