

Dr. Molnár Mária Judit „Új eredmények a neuromuscularis betegségek molekuláris diagnosztikája és terápiája területén” című MTA doktori értekezésének bírálata

Bíráló: Dr. Bagdy György

Tudománymetriai értékelés

A jelöltnek a hivatalos forrás, a Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) alapján 141 megjelent tudományos közleménye van, ebből 62 folyóiratcikk, 48 absztrakt, 18 könyvfejezet, 13 egyéb közlemény. Ebből 95-ben első, utolsó vagy egyetlen szerző, ez az összes mű 67%-a. In extenso munkáinak összesített impakt faktora 91,1. Közleményeire összesen 393 hivatkozás jutott, a független idézetek száma 325. Hirsch indexe 12. Az értekezés alapját képező in extenso közlemények száma 32, amelyekből magyar nyelven jelent meg 9. Ezzel a teljesítményével messze meghaladja a Magyar Tudományos Akadémia doktora cím megszerzésének követelményeit a Neurológia szakterületen, de még akkor is bőven teljesíti, ha a lényegesen szigorúbb, de egy genetikai profilú Molekuláris Neurológiai Központ vezetőjére vonatkozóan szintén releváns kategóriát, a Klinikai Genetika, Örökléstan szakterületet nézzük.

Bár munkái között a magasabb impakt faktorú közlemények száma alacsony - összesen 8 olyan közleménye van, amelynek impakt faktora meghaladja a 3.0-at -, ezek között egyrészt kiemelkedő impakt faktorú és idézettségű cikkeket is találunk - például a 2009-ben a 12 impakt faktoros American Journal of Human Genetics-ben megjelent közleményét már most 12-en idézték -, másrészt munkái között kitűnő összefoglaló közlemények is vannak, melyekben a jelölt mind a hazai mind a külföldi olvasótábor részére a kutató klinikus gyakorlatiasságával foglalta össze és adta át a tématerület újdonságait.

Általános szempontok, megjegyzések

Az értekezés témája, a neurogenetika ma, a genomika korszakában egyértelműen az érdeklődés központjában áll, tehát időszerű, az alkalmazott módszerek korszerűek, az eredmények mind klinikai mind elméleti szempontból igen értékesek.

A dolgozat a szokásos fejezeteket tartalmazza, összességében arányos, a téma összetettségéhez viszonyítva olvasmányos munka. Az Előzmények és irodalmi összefoglaló valamint az Eredmények fejezet teljesen, a Megbeszélés fejezet részben 3 témára lett osztva, ezek rendre a Mitochondriás betegségek, az Izomdystrophiák és a Hereditér perifériás neuropátiák. A dolgozat végén 228 referenciából álló listát és 7 oldalas rövidítéslistát találunk.

A dolgozatban tárgyalt vizsgálatok és a közlemények csapatmunkában, gyakran külföldi kollaborációban, olykor a jelölt kinti ösztöndíjának idején születtek. Ez bizonyítja a jelölt szervezőképességét és biztosítja az eredmények színvonalát. Ugyanakkor az értekezésből nem, vagy csak nehezen követhető nyomon, melyik vizsgálat, mérés hol készült, ennek megállapításához az eredeti közleményekhez kell visszanyúlnunk.

A célkitűzések az értekezés 1. szöveges oldalán kevesebb, mint 6 sort tesznek ki, ebből az első 4 sor nagyon általános, a világon jelenleg készülő ill. nemrég megvédett értekezések közül több tucatra érvényes. Különösen nagy az aránytalanság, ha ezt a 6 sort a jelölt által

felsorolt saját tudományos eredmények közel 4 oldalnyi terjedelmével vetjük össze. Az egyetlen konkrét célkitűzés az utolsó, „A Duchenne típusú izomdystrophiában a plazmid mediálta géntranszfer optimalizálása és humán alkalmazásra való előkészítése”.

Az elnevezésekben, rövidítésekben sok a pontatlanság, az elírás. Érdemes lett volna ilyen szempontból néhányszor újra átnézni a szöveget. Több helyütt az az érzése az olvasónak, hogy a dolgozat korábban megírt munkák összeollózáásával készült, ami természetesen nem probléma, de a szerzőtől utólag ezek átszerkesztését, egységesítését követeli meg.

Furcsa például a MERRF rövidítés 9. oldalon található magyarázata: Myoclonus Epilepsia Ragged Red rostokkal (csak a rövidítés utolsó szava van lefordítva). Ugyanakkor a tartalomjegyzékben a rövidítés kizárólag az eredeti angol kifejezésekkel van megadva, a szövegben az első előfordulásának helyén (8.o.) pedig a MERFF rövidítés egyáltalán nincs megmagyarázva. Néhány rövidítés magyarázata sehol sem szerepel a dolgozatban.

Nem szerencsés a szövegben a saját publikációkra való hivatkozást egyszerűen közleményeknek nevezni, jobb lenne pl. a saját közlemények megjelölés.

A 2.1 táblázat címe: Patogén pontmutációk megoszlása a mitochondriális genomban (www.mitomap.org). Érdekes módon viszont a táblázatban sehol, még a mutáció lokalizációja oszlopban sem található egyetlen DNS lokalizáció sem. Ráadásul a hivatkozás (www.mitomap.org) ilyen táblázatot - legalábbis a releváns című lapjain - nem tartalmaz.

Több helyen a táblázatok az adatoknak csak egy részét tartalmazzák, további fontos adatok csak a szövegből, esetleg csak az eredeti közleményekből bogarászhatók ki, vagy egyáltalán nem kerültek közlésre. Pl. a 4.4 táblázat csak a betegek vérben talált heteroplazmia adatait tartalmazza, pedig a betegek kb. felében biopszia is történt.

Az értekezést megalapozó tudományos munkák jegyzékében is több elírás maradt, pl. a 20-as, 31-es és 32-es angol nyelvű közlemények címében magyar szavak találhatóak.

Sok helyen nem következetes a nomenklatúra, pl. a 12. oldalon Leigh szindrómában, Barth Szindrómában, „Süketség és Dystonia” Szindrómában szerepel.

Részletes elemzés

A 6. oldalon az előzmények és irodalmi összefoglalás fejezetben az egyik megállapítás referenciájaként a (www.mitomap.hu) honlap található. Ez azért érdekes, mert ezt megadva a kereső vagy a (www.mitomap.org) lapra visz, vagy pedig a jelölt téziseinek pdf változatát hozza be. Ha a téziseknek ezt a világhálón található változatát megnézzük, szövege az adott helyen már a (www.mitomap.org) referenciát tartalmazza. Ezek alapján feltételezem, hogy a (www.mitomap.hu) elírás, és a nem arról van szó, hogy a jelölt ily módon szándékosan vezeti az olvasót a neten található téziseihez.

A hyperglycosylatált - helyesen hyperglycosylált

Értelmetlen a mondat a 26. oldalon: “A 7 exon homozygota C-T tranzíciója (R148X) roma alapító mutációkat ismert a Lom típusú neuropathia hátterében”

“DNS break” – magyar neve: DNS törés

A mitochondrialis betegségek molekuláris genetikai diagnosztikai lehetőségei c. fejezetben hiányzik annak az említése, hogy a DNS szintű diagnosztikai analízis legtöbbször nem lehetséges vér limfocitákból, hanem csak a célszervekből, így pl. izombiopsziából izolált DNS-ből.

A Genetikai tanácsadás, prenatális diagnosztika a mitochondrialis betegségekben c. fejezetben, a 14. oldalon röviden ki kellene fejteni, mi az „üvegyak-hatás”, hogy érthető legyen a random genetikai drift (és nem draft, ahogy ott szerepel).

2.3. A hereditér sensomotoros neuropathiák jellegzetességei fejezetben az alábbi felosztást találjuk:

“A klinikai kép, az ENG paraméterek és a n. suralis morfológiai jellegzetességei alapján az örökletes neuropathiák között a következő fenotípusok különböztethetők meg (Boerker et al. 2002): 1.) Charcot-Marie-Tooth betegség (CMT), 2.) Hereditér kompressziós paresisekre hajlamosító neuropathia (hereditér neuropathia with liability to pressure palsies – HNPP), 3.) Dejerine- Sottas neuropathia, 4.) Congenitalis hypomyelinizációs neuropathia, 5.) Roussy-Levi Szindróma.” Hogy néz ki pontosan a ma elfogadott klasszifikáció?

A SIMPLE gén hivatalos nomenklatúrája LITAF gén (lipopolysaccharide-induced TNF factor)

28. o. “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 mondat pontatlan, nem érthető mire gondolt a jelölt. Nem immunológiai eredetűre? Vagy arra, hogy akkor a genetikai eredet valószínűsíthető?

Furcsa a fejezetcímbe a „Beteganyagok” kifejezés

3.2.3. Molekuláris biológiai metodikák

“nmol/L” – helyes nomenklatúra nmol/l

“kapott band-ek” – magyarul fragmentumok, DNS szakaszok, stb.

“A szekvenáló reakciót az illető régióra specifikus reverz primerekkel végeztük el.” - Forward primerek nem szükségesek az amplifikációhoz?

A szekvencia eltérést a másik DNS szálon is illik megerősíteni, tehát reverz szekvenálást végezni. Ez megtörtént-e?

A “Mitochondriális betegségek vizsgálata során alkalmazott módszerek” alfejezetben szerepel a “*Linkage analízis*”, amiről nem tudni, melyik autoszómális domináns betegségben végezték és mi okból. Sőt ebben a fejezetben következik a *PMP22 gén duplikáció/deléción meghatározás*, valamint a *Roma neuropathiák vizsgálata* ami nem mitochondrális betegség, hanem CMT. Ugyancsak a mitochondrális betegségek alatt szerepel a *Az FKRP mutációk vizsgálata* is, ami izomdystrophia.

3.2.5. Génterápiás vizsgálatok:

Célszerű lett volna az értekezésben említeni, hogy a vizsgálat hol történt. A közlemények alapján valószínűsíthető, hogy a McGill Egyetemen.

4.1.1. Új mtDNS rendellenességek, új mtDNS betegségek leírása:

A 2. eset leírásban olvasható, hogy “A deléciót egy 400 bp nagyságú ún. „bridging fragment” hidalta át.” Jó lett volna erre egy ábrát látni, szemléltetésképpen.

4.11. Ábraalírásában úgy tűnik, hiba van, a normál szekvencia van hibásként jelölve.

4.1.7. Új diagnosztikai módszer validálása az mtDNS betegségek prenatalis felismerésére c. fejezetben a 4.6. Táblázat nem érthető, részletesebb magyarázatra lenne szükség, és az aláírás és a fejléc is eltér, pl. az aláírásban csak band 3, a fejlécben csak band 4 szerepel.

4.2.1. Dystrophin deficienciához társuló szekunder calpain deficiencia fejezet:

69. oldal, „Lánytestvére (2. beteg) aszimptómás...” Kérdésem, akkor nevezhetjük-e betegnek? A fejezet végén az alábbi következtetést találjuk: “Feltételezzük, hogy betegeinknél a dystrohinopathia nagy valószínűséggel azért okozott enyhe klinikai tüneteket, mert az egyidejűleg jelenlevő calpain deficiencia védelmet jelentett az izomsejtek számára”. Ezt azonban semmi nem támasztja alá, nem arról van-e szó, hogy az enyhe tünetekért a dystrophin mutáció típusa felelős? Erre utal egyébként a 120. oldalon található diskuszió is. A fent említett személy feltehetően hordozza, de kimutatták-e szekvenálással a dystrophin mutációt?

4.24. Ábra felirata hiányzik: Melyik sáv melyik mintához tartozik? (74.o.)

4.36. Ábra aláírása „x C-T mutáció jelenléte homoplasmikus formában.” Mit jelent az x? A homoplasmikus feltehetően elírás, helyesen homozigóta.

91-92. oldal Primer és szekunder mitochondrialis diszfunkcióhoz társuló neuropathia c. fejezethez kapcsolódó kérdés: Ismert-e a perifériás neuropathia társulása mitochondriális genom defektusával?

92. oldal. Fénymikroszkópos vizsgálatok és n. suralis morfometria inflammatorikus myopathiákban.

c. fejezethez kapcsolódó kérdések: IBM-ben leírtak-e társult neuropathiát? Történt-e genetikai analízis, amely igazolta az IBM diagnózisát? Mennyire volt heterogén a betegcsoport?

A 120. oldaltól a tartalomjegyzék és a szöveg oldalszámozása elválik egymástól.

Kérdések

A dolgozatban szereplő preimplantációs genetikai diagnosztika alkalmazása esetén milyen heteroplasmia arány elfogadható? Csak a Csak a 100%-ban vad típusú mtDNSeket hordozó sejteket ültetik vissza? Mennyi a tisztán vad típusú mtDNS-t hordozó sejtek tapasztalati aránya? Hány petesejtet kell vajon ehhez produkálni emberben?

Az izomdystrophiák molekuláris terápiája – státusz 2009 c. fejezetet a jelölt így zárja: “A PTC 124 metodika klinikai kipróbálás előtt áll mind DMD-ben, mind cystas fibrózisban (Linde és Kerem 2008).” Úgy tudom, az első DMD vizsgálat 2010-ben negatív eredménnyel zárult, ami nagy csalódást okozott nemcsak a betegekben, hanem a szakmában is. Hogy látja a jelölt, mi volt ennek az oka és mi a magyarázat arra, hogy cystas fibrózisban hatásos volt?

A 28. oldalon találjuk az alábbi állítást: “Ma kb. 28 gént és 35 lókuszt azonosítottak az örökletes neuropathiákban.” Mennyit azonosítottak mostanra, 2011 elejére?

A 32. közlemény, melynek címe MOLECULAR EPIDEMIOLOGY ANALYSIS OF THE MTDNA A3243G MUTATION IN HUNGARY, 5 megye 631 betegének adatait elemzi. Találtak-e a szerzők az A3243G mutációban 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?

Az EREDEMÉNYEK 4.1.1. –ben, az Új mtDNS rendellenességek, új mtDNS betegségek leírás c. fejezetben a 3. eset leírásban találjuk az alábbi állítást: “Egy infantilis myopathiában szenvedő gyermek *tRNS^{Leu(UUR)}* génjében több pontmutációt is detektáltunk.” Itt a jelölt 4-et sorol fel. Kérdésem, hogy A 3268, 3261 és 3259 pozícióban tapasztalt nukleotid csere is patogénnek bizonyult-e vagy csak a A3266G báziscsere? Ellenőrizték-e a mitochondriális genom SNP adatbázisában ill. konzervált szakaszokat érintettek-e?

Hasonló, az adatbázissal kapcsolatos kérdés fogalmazható meg a 4. esetben leírt A8332G mutáció kapcsán.

4.1.2. Fenotípus variációk MERRF (myoclonus epilepsy, ragged red fiber) szindrómában - b. Fenotípus variáció MERRF mutációval rendelkező egyetétjű ikrekben c fejezetben szerepel, hogy az ikrekben leírt mutációt neurológiai tünetekkel nem rendelkező édesanyjuk is hordozza. Az ikrek tünetmentes anyjában milyen mértékű a heteroplazmia?

4.1.6.2. Az mtDNS *tRNS^{Lys}* gén A8344G mutáció genetikai epidemiológiai vizsgálata c. fejezthez: “A vizsgált betegek közül mindössze 5 nő és 1 férfi betegnél igazolódott az A3243G mutáció. A betegek családtagjainak szűrése során további 8 esetben derült fény az A3243G mutációra.” Itt pontosan hány családról van szó?

“Egy betegünkönél a mutációt a súlyos klinikai tünetek ellenére csupán az izomból izolált DNS-ből 20%-os heteroplazmia arányban tudtuk kimutatni.” Mi lehet az a magyarázata, hogy az izomban talált alacsony heteroplazmia mellett ilyen súlyos fenotípust alakult ki?“. Vajon a vérből izolált DNS-ben mennyi lett volna a heteroplazmia arány?

„A neurológiai és pszichiátriai tünetek és a genotípus összefüggéseinek elemzése mitochondriális betegségekben” c., a Megbeszélés-ben található fejezet érdekes fejtegetést, és emellett néhány ellentmondást tartalmaz. „A depresszióról, mint szimptomáról számos mitochondriális betegségben beszámoltak...de soha nem korrelált a tünet súlyossága a mutáns mtDNS arányával” ugyanakkor a jelölt a saját vizsgálatát így írja le: „A kétpetétjű ikerpár családjában a maternálisan öröklődő A8344G mutáció új fenotípus, affektív betegség formában jelentkezett, ahol a az mtDNS heteroplazmia aránya a pszichiátriai tünetek súlyosságával korrelált.” Ugyanakkor a 4.4 táblázat adatai ezt csak trend szinten erősítik meg, pl. 44% vérben mért heteroplazmia aránynál depresszió egyáltalán nincs feltüntetve. Az igen magas heteroplazmia arány mellett jelentkező depresszió könnyen lehet, hogy a meglévő myoclonus epilepsy, mentális hanyatlás, vagy egyéb fizikai tünet talaján alakul ki. Kérdésem, hogy depresszió mely tünetei jelentkeznek magas heteroplazmia arány mellett? Időben együtt járnak-e a fizikai tünetek megjelenésével? Az egyes betegeknek feltüntetett szorongásra, pánikra mennyire vonatkozik az időbeni egybeesés a fizikai tünetekkel?

A vérben és agyban mért heteroplazmia arány jelentősen eltér. Mennyire jár együtt a neuronokban mért heteroplazmia arány a központi idegrendszeri szimptomákkal?

A dolgozat legfontosabb megállapításai

A jelölt infantilis myopathiában, valamint dystonia és stroke-szerű tünetek háttérében először írta le az mtDNS bázis szubsztitúció patogénitását és a társuló SNP-k szinergisztikus hatását.

Új fenotípust társított az mtDNS A8344G mutációjához maternálisan öröklődő affektív megbetegedés képében egy dizygota ikerpárnál és édesanyjuknál.

Az mtDNS tRNS^{Lys} és határoló gének rendkívüli variabilitásának igazolásával a régió vizsgálatának rutin diagnosztikus fontosságát emelte ki.

Elsőként írta le az autosomális domináns progresszív ophthalmoplegia externa hátterében az RRM2B heterozygota mutációját.

Doppler és PET vizsgálatok végzett mitochondrialis betegekben és kis arteriola diszfunkciót, valamint központi idegrendszeri érintettséget állapította meg.

Kutató munkaként preimplantációs diagnosztikai kísérleteket validált heteroplasmikus egér modellen.

Új MPZ mutációt írt le egy magyar családban és jellemezte a mutáció fenotípusos megnyilvánulását.

Mitofusin mutáció következtében kialakuló strukturalis és ultrastrukturalis jellegzetességeket jellemezett.

Magyarországon elsőként írta le a roma típusú hereditár sensomotoros neuropathiákat.

Primer mitochondriális betegségekben ill. szekunder mitochondrialis diszfunkció (IBM és CADASIL betegség) következtében kialakuló szekundér módon előforduló perifériás neuropathiákat mutatott ki.

Elsőként igazolta a dystrophin gén rendellenessége következtében kialakuló nem-szindrómás halláskárosodást.

Az izomdystrophiák molekuláris terápiáját célozva ígéretes kísérleteket végzett a dystrophin gén bevitelére electroporációval és szonoporációval egér- ill. humán vizsgálatokban.

Összefoglalás

Molnár Mária Judit értekezése mind tartalmi, mind formai szempontból megfelel az MTA doktora fokozat megszerzéséhez támasztott követelményeknek, a munka tudományos eredményeit minden kétséget kizáróan elegendőnek tartom a cím megszerzéséhez, és ezért az értekezés nyilvános vitára tűzését és a cím odaítélését melegen támogatom.

Budapest, 2011. január 20.

Dr. Bagdy György
egyetemi tanár, az MTA doktora