

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) fehérje vizsgálata neurodegeneratív demenciákban

Dr. Bencze János

Témavezetők: Dr. Hortobágyi Tibor

Dr. Dag Aarsland



Debreceni Egyetem
Idegtudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2020.

A lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) fehérje vizsgálata neurodegeneratív demenciákban

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Bencze János

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi doktori iskolája
keretében

Témavezetők: Prof. Dr. Hortobágyi Tibor, MTA doktora
Prof. Dr. Dag Aarsland

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Matesz Klára, MTA doktora
Prof. Dr. Bereczki Dániel, MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Miklós, MTA doktora
tagok: Dr. Diószeghy Péter, PhD
Dr. Valikovics Attila, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, In Vitro Diagnosztikai Tömb tanterme
2020. július 24. 10 óra

1. Bevezetés

A demencia a korábban megszerzett kognitív képességek fokozatos hanyatlásával járó kórkép, amely negatívan befolyásolja a beteg munkavégző képességét és szociális kapcsolatait egyaránt. A két leggyakoribb neurodegeneratív demencia az Alzheimer-kór (AD) és a Lewy-testes demencia (DLB), több millió beteget érint világszerte. Az AD patogenezisében kitüntetett szerepe van az extracelluláris, nagy mennyiségű amiloid- β ($A\beta$) peptidet tartalmazó szenilis plakkoknak és az intracellulárisan lerakódó, főként hiperfoszforilált-tau-t halmozó neurofibrilláris kötegeknek (NFT). Ez utóbbi patológiás elváltozás miatt soroljuk, az AD-t a tauopátiák közé. Ezzel szemben a DLB az α -synucleinopátiákhoz tartozik, mivel a legfontosabb szövettani eltérés a nagy mennyiségű α -synuclein aggregátumokat koncentrááló intracelluláris Lewy-testek megjelenése a neuronokban. Noha, a két betegség klinikai megnyilvánulásában számos eltérés van, mégis a DLB neuropatológiai vizsgálatakor kifejezetten gyakori az AD-re jellemző társpatológia, míg a tiszta „pure” DLB viszonylag ritka. Feltehetőleg a kórképek komplex patomechanizmusának egyik sarkalatos pontja az intracelluláris fehérjék termelésében és eltávolításában részt vevő folyamatok egyensúlyának felbomlása. Sajnos a több évtizednyi megfeszített kutatómunka ellenére sem sikerült a neurodegeneráció kialakulásában szerepet játszó valamennyi mechanizmust feltárni, így a mai napig nem áll rendelkezésre olyan módszer, amivel gyógyítani lehetne a betegségeket, csupán tüneti terápia lehetséges. Egyre sürgetőbb feladat a kórképek patomechanizmusának feltérképezése, ezáltal új potenciális terápiás célpontok azonosítása.

A lemur tirozin-kináz 2-t (LMTK2) 2002-ben azonosították először. Ez a speciális szerkezetű membrán-kapcsolt protein-kináz számos fiziológias (neuron differenciáció, intracelluláris vezikulák forgalma, axonális transzport, spermatogenezis) és patológiás (prosztata carcinoma, tüdőrák, cisztás fibrózis) folyamatban részt vesz. A LMTK2 interakciós partnerei között olyan alapvető sejtfunkciókat szabályozó proteinek találunk, mint a ciklin-dependens kináz 5 (CDK5)/p35, a protein-foszfataz 1 katalitikus alegység (PP1C), cisztás fibrózis konduktancia regulátor (CFTR), vagy az egyik fő molekuláris motorprotein a Kinezin-1. Az LMTK2-t korábban elsősorban malignus tumorokban, főleg prosztata adenocarcinómában vizsgálták. Közel két évtizeddel az enzim felfedezését követően 2018-ban született meg az első tudományos közlemény, amelyben felvetettük az LMTK2 szerepét neurodegeneratív folyamatokban.

Sejtbiológiai- és állatkísérletes tanulmányok, valamint az LMTK2 interakció és jelátvitel alapján három mechanizmust azonosítottunk, melyek zavara hozzájárulhat a neurodegeneratív folyamatokhoz: 1) tau-foszforiláció, 2) apoptózis, 3) axonális transzport. Az LMTK2-t szabályozó CDK5, valamint az LMTK2 által indirekten (PP1-en keresztül) regulált glikogén-szintáz-kináz-3- β (GSK3 β), jól ismert tau-kinázok, fokozott aktivitásuk hozzájárul az AD-re patognomikus tau-hiperfoszforilációhoz. A neurodegeneratív kórképekben látható neuronvesztés egyik fontos mechanizmusa az apoptózis. Az LMTK2-mediált gátlás csökkenése a PP1-en és közvetetten a GSK3 β -n pro-apoptotikus folyamatokat indukál. Az axonális transzport zavara az egyik feltételezett ok az intracelluláris fehérje aggregátumok felhalmozódásának hátterében. Az LMTK2 aktivitás csökkenése GSK3 β dezinhibícióhoz vezet, ami a motorproteinek foszforilálásával megzavarhatja az axonális transzportot.

Az LMTK2 és neurodegeneráció kapcsolatát vizsgáló humán kutatások száma meglehetősen limitált, ezért elméletünk igazolásához dokumentált humán AD és DLB mintákat választottunk melyeket azonos átlagéletkorú nem-demens kontroll csoporttal hasonlítottunk össze. Továbbá, az AD-ben patognomikus NFT-k központi idegrendszeren belüli lokalizációja és az LMTK2 expresszió közti összefüggés tisztázása érdekében különböző AD neuropatológiai (Braak) stádiumú beteganyagok kiértékelését is elvégeztük.

Bízva abban, hogy az LMTK2 egy olyan biomarker/terápiás célpont, aminek gyors, megbízható és könnyen reprodukálható kimutatása fontos klinikai szempont lehet a jövőben, a konvencionális immunhisztokémia eszköztárát használtuk munkánk során. Ugyanakkor, az adatok kielemezéséhez a legmodernebb digitális képanalitikai megoldásokat is bevetettük, annak érdekében, hogy nagyobb mennyiségű információt dolgozhassunk fel. Amellett, hogy egyre nagyobb klinikai igény mutatkozik a neurodegeneratív betegségekre specifikus biomarkerek azonosítására, az értekezésben bemutatott munka tudományos jelentőségét indokolja az a tény (is), hogy az LMTK2 neurodegenerációban betöltött szerepét humán mintákon korábban nem vizsgálták, így a közölt eredmények első szakirodalmi leírásnak tekinthetők.

2. Célkitűzések

A neurodegeneratív demenciák súlyos, jelen tudásunk szerint gyógyíthatatlan kórképek. A betegségek patomechanizmusának feltárása, ezáltal új potenciális biomarkerek/gyógyszercélpontok azonosítása esszenciális feladat diagnosztikus és terápiás szempontból egyaránt.

Az LMTK2 megfelelhet ezeknek a kritériumoknak, azonban a neurodegeneratív kórképekben betöltött szerepéről rendelkezésre álló tanulmányok száma erősen limitált. Elsődleges célom és fő motivációm a kutatómunka során a szakirodalmi hiányosságok pótlásával hozzájárulni az LMTK2 komplex patofiziológiai funkcióinak feltérképezéséhez a leggyakoribb neurodegeneratív eredetű demenciákban. Megjegyzendő, hogy a DLB klinikai diagnózis használata szövetmintákra helytelen, így a kórképre a neuropatológiai terminológiának megfelelően neocorticalis Lewy-testes betegségként (LBD) hivatkozunk. A kutatómunka megvalósítása során az alábbi konkrét feladatokat tűztük ki célul:

- I) Az LMTK2 hisztopatológiai jellemzése humán neurodegeneratív demenciában szenvedő betegek post-mortem szövetmintáin.
- II) Az LMTK2 fehérje mennyiségi változásának vizsgálata az immunreakció intenzitása alapján a két leggyakoribb neurodegeneratív demenciában, Alzheimer-kórban és neocorticalis Lewy-testes betegségben azonos átlagéletkorú nem-demens kontroll csoporttal összehasonlítva.
- III) Az összefoglaló közleményünkben korábban valószínűsített LMTK2 és tau-patológia közti kapcsolat tisztázása Alzheimer-kórban eltérő agyi régiókban és AD neuropatológiai (Braak) stádiumokban.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Az LMTK2 neuropatológiai karakterizálása AD-ben és neocorticalis LBD-ben

3.1.1 Betegek és minták

A kutatáshoz három kísérleti csoportot hoztunk létre: azonos átlagéletkorú nem-demens kontroll (CNT), AD és DLB. A demens csoportokban 6-6 súlyos neurodegeneratív elváltozásokat mutató AD (Braak VI. stádium) és neocorticalis LBD (diffúz neocorticalis stádium) esetet választottunk ki. A demencia diagnózisa a klinikai kép alapján még a betegek életében felállításra került, melyet a post-mortem neuropatológiai vizsgálat igazolt. A CNT csoportba választott 6 betegben szignifikáns neurodegeneratív változás nem volt kimutatható, haláluk extraneurális okok miatt következett be. A vizsgált agyi régió a gyrus frontalis medius (MFG), mivel ez a terület mindkét kórkép késői stádiumában jelentősen érintett. A kísérleti csoportokban összesen 11 nő és 7 férfi post-mortem formalin-fixált paraffinba-ágyazott (FFPE) mintáit értékeltük. Minden páciens idősebb volt 60 évnél, az átlagos post-mortem idő (a halál ideje és a minta feldolgozása között eltelt idő) 38 óra ($\pm 11,8$ SEM) az AD; 47,1 óra ($\pm 8,6$ SEM) a CNT és 43,3 ($\pm 7,8$ SEM) a neocorticalis LBD csoportokban.

A vizsgálat az „Institutional Ethics Committee of the MRC London Neurodegenerative Diseases Brain Bank (18/WA/0206) at the Institute of Psychiatry Psychology and Neuroscience, King's College London” és a „Brains for Dementia Research (BDR) Project (08/H0704/128+5)” etikai engedélyével zajlott. A páciensek a boncoláshoz, neuropatológiai vizsgálatához és kutatási célú felhasználáshoz hozzájárultak, a betegadatokat anonimizálták. A minták feldolgozása és neuropatológiai vizsgálata a standard kritériumokkal összhangban történt.

3.1.2 Kromogén immunhisztokémiai (CHR-IHC) jelölés

A 7 μ m vastag FFPE metszeteket „leszálló” alkoholsorban deparaffináltuk. Endogén peroxidáz enzimaktivitás gátlása 3% (v/v) H₂O₂-t tartalmazó metanolban 30 percig. A hő-indukált epitóp feltáráshoz (HIER) Trisz-(hidroximetil)-amino-metán - Etilén-diamin-tetraecetsav (TRIS-EDTA; 10 mMol TRIS bázis, 1 mMol EDTA, pH 9,0) antigén-feltáró oldatot és mikrohullámú sütőt használtunk (5 perc 800 watt, 2x5 perc 250 watt). A nem-specifikus antigén kötőhelyeket a másodlagos antitest „gazdaállatának” (kecske) 10%-os (v/v) normál szérumát tartalmazó TRIS pufferes sóoldattal (TBS; Sigma-Adrich, TRIS-buffered saline 20x solution, 20mMol TRIS, pH 7,4) blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. A primer LMTK2 antitesttel (KPI-2,

clone H-9, SantaCruz Biotechnology) egy éjszakán keresztül (overnight) 4°C-on inkubáltuk a metszeteket. A következő napon, szobahőmérsékleten 1 órán keresztül inkubáltuk a mintákat kecske anti-egér biotinilált másodlagos antitesttel (Agilent/Dako). Az IHC reakció detektálásához VECTASTAIN® Elite® ABC HRP Kit-et (Vector Laboratories) használtunk. A 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kromogént (Sigma-Aldrich 10 mg tableta) 4 percig alkalmaztuk a metszeteken. A magfestés Harris-féle hematoxin-oldattal készült. A mintákat „felszálló” alkoholsorban dehidratáltuk. A fedőlemezek felhelyezését automata végezte (ClearVue™ Coverslipper, Thermo Fisher Scientific). Az elsődleges antitestet 1:50, a másodlagost 1:200 arányban hígítottuk TBS oldatban. Az immunreakció validitásának biztosítására, a primer antitestet kihagyva IHC negatív metszetek is készültek.

3.1.3 Fluoreszcens immunhisztokémiai (IF-IHC) jelölés

Számos lépés megegyezik a fentebb ismertetett CHR-IHC protokollal (deparaffinálás, antigén feltárás, elsődleges antitest), míg mások szükségtelenek az IF-IHC esetén (endogén peroxidáz gátlás, biotinilált másodlagos antitest, kromogén). Az fluoreszcens jelölés módszertana az alábbiakban tér el a kromogéneztől:

A munkaoldat foszfát pufferes sóoldat (PBS; Biocare Medical, PBS Plus 10x solution, pH 7,3) volt. A metszeteket 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a fluorofór-konjugált másodlagos antitesttel (Goat Anti-Mouse IgG H&L – Alexa Fluor® 594, Abcam). A másodlagos antitestet 1:200 arányban hígítottuk PBS-ben. Az autofluoreszcencia kiküszöbölésére Vector® TrueVIEW™ Autofluorescence Quenching Kit-et (Vector Laboratories) használtunk. A fedőlemezek felhelyezése manuálisan történt a sejtmagokat is megfestő 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) tartalmú fedőanyaggal (Vectashield® Antifade Mounting Medium with DAPI; Vector Laboratories).

3.1.4 CHR-IHC értékelése

Metszeteinket Virtual Slide Microscope VS120-al (Olympus Corp.), azonos megvilágítási intenzitásokat, expozíciós időket és kamera beállításokat alkalmazva digitalizáltuk. Az LMTK2 sejt-specifitását, subcelluláris lokalizációját, illetve a betegség-specifikus patológiás elváltozásokkal (A β plakkok és NFT-k) való kapcsolatát neuropatológus (HT) segítségével vizsgáltuk.

3.1.5 IF-IHC digitális képanalízise

Az fluoreszcens mikroszkópiához 20x/0,5 420350-9900 Ec Plan-Neofluar objektívvel, Coolcube 1m S/N: 003274. 60N-C 1" 1,0x. 426114 kamerával és a gyártó által javasolt filterekkel szerelt Axio Imager Z2 (Carl Zeiss AG) mikroszkópot használtunk. A digitális képek elkészítése Isis fluorescence imaging platformmal (MetaSystem Hard & Software GmbH) történt. Esetenként 5-5 reprezentatív fotót készítettünk közepes nagyítással (200x), azonos megvilágítási intenzitással, expozíciós idővel és kamera beállításokkal. A digitális adatok kiértékeléséhez ImageJ szoftvert használtunk. Az elkészült képeket (90 db) egyszerre egy „stack”-ben nyitottuk meg. A detektálás küszöbértéket a szűrkeskálának megfelelően 1-255 közé állítottuk, majd az „erode” funkciót alkalmaztuk a kétkomponensű képeken, hogy kiszűrjük a neuronok széli részeit. Az „Analyse particles” modullal megmértük az átlagos szűrkeskála intenzitását az azonosított sejteknek. Annak érdekében, hogy biztosítsuk minden egyes vizsgált objektum valóban neuron az alábbi szűrőket alkalmaztuk: 1) automata szelekció méret alapján; 2) ezt követő manuális szelekció, amivel kiszűrtük a szoftver által tévesen neuronnak azonosított objektumokat (pl. erek). Az individuális sejtek intenzitásának összegzésével meghatároztuk az átlagos szűrkeskála intenzitást minden beteg esetén, majd az adatok alapján a három kísérleti csoportra (CNT, AD, neocorticalis LBD) vonatkozó átlagos intenzitásértékeket is megadtuk.

3.1.6 Statisztikai analízis

A fluoreszcens IHC szignál átlagos szűrkeskála intenzitásértékek statisztikai analízisét SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc.) szoftverrel végeztük. Az adatok egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA), majd páronként Holm-Sidak teszttel értékeltük. Továbbá, kovariancia-analízist (ANCOVA) is futtattunk, hogy meghatározzuk a betegek életkora, illetve a post-mortem idő befolyásolta-e az eredményeinket. Ehhez SPSS 25 szoftvert (IBM Corp.) használtunk, ahol a függőváltozók az IF-IHC eredmények, a rögzített faktorok a betegcsoportok és a nem, a kovariánsok pedig az életkor és a post-mortem idő voltak.

3.2 Az LMTK2 és tau-patológia kapcsolatának vizsgálata AD-ben

3.2.1 Betegek és minták

A beteganyag szelekciója az AD Braak tau neuropatológiai diagnózis alapján történt. Kutatásunkban 5-5 korai (Braak I-III.) és késői (Braak VI.) stádiumú patológiai elváltozásokat mutató beteg összesen 10-10 FFPE mintáját vizsgáltuk. A korai neuropatológiai Braak stádiumú betegek többségének enyhe demenciája volt, míg a késői neuropatológiai stádiumú páciensek mindannyian súlyos demenciában szenvedtek. Az NFT patológia terjedési mintázata

alapján két agyi régiót választottunk ki: 1) aHPC - már korai stádiumban is kimutatható az NFT patológia; 2) MFG - jelentős patológia elváltozások csak késői stádiumban detektálhatók. Ezáltal 4 kísérleti csoportot állítottunk fel, amiből az MFG régió korai stádiumban endogén kontrollnak tekinthető, mivel megkímélt az NFT patológiától, míg a másik három csoport (MFG késői stádiumban és aHPC mindkét stádiumban) súlyosan érintett.

A páciensek a boncoláshoz, neuropatológiai vizsgálatához és kutatási célú felhasználáshoz hozzájárultak, a betegadatok anonimizáltak. A szövetmintákat és klinikai adatokat a Centre for Age-Related Medicine, SESAM, Stavanger University Hospital, Stavanger, Norvégia biztosította számunkra. A kutatás a Nyugat-Norvégiai Területi Orvos-és Egészségtudományi Kutatásetikai Bizottság (REK 2010/633), a magyar Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (19312/2016/EKU), valamint az „Institutional Ethics Committee of the MRC London Neurodegenerative Diseases Brain Bank (18/WA/0206) at the Institute of Psychiatry Psychology and Neuroscience, King's College London” jóváhagyásával zajlott.

3.2.2 CHR-IHC jelölés

A 7 µm vastag FFPE metszetek kromogén immunhisztokémiai jelölésének módszertana, a használt reagensek, inkubációs idők megegyeztek a korábban az 3.1.2 alfejezetben részletesen tárgyalttal. Egyetlen eltérés, hogy a primer LMTK2 antitestet 1:100 koncentrációban használtuk az optimális eredmény érdekében. Ennek oka feltételezhetően a kismértékben eltérő angol és norvég pre-analitikai szövetminta feldolgozás (utóbbi esetben réz-szulfátot is használnak).

3.2.3 Fluoreszcens kettős-jelölt immunhisztokémia (FDL-IHC)

A minták deparaffinálása, antigén feltárás, nem-specifikus kötőhelyek blokkolása, a primer LMTK2 antitest előkészítése, az autofluoreszcencia blokkolása és a metszetek lefedése megegyezett a korábban 3.1.2 és 3.1.3 alfejezetekben leírtakkal. Az LMTK2-t 1:100, a másik primer antitestet a foszfo-tau-t (Ser202, Thr205; clone AT8, Thermo Fisher) 1:500 arányban hígítottuk PBS-ben. Fluorofór-konjugált „fragment antigen-binding” (FAB) (FabuLight™, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.) másodlagos antitesteket használtunk. Az LMTK2-t piros fényt emittáló (Alexa Fluor® 594 – AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG), a foszfo-tau-t zöld fényt emittáló (Alexa Fluor® 488 – AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG) másodlagos antitestekkel jelöltük, majd az így kapott „szendvicsekkel” 4°C-on egy éjszakán át (overnight) inkubáltuk a metszeteket.

3.2.4 Szemikvantitatív CHR-IHC analízis

Metszeteinket Panoramic MIDI II (3DHISTECH Ltd.) szkennelrel digitalizáltuk. A Panoramic Viewer (3DHISTECH Ltd.) programmal esetenként 10-10 nagy nagyítású (400x) reprezentatív fotót készítettünk. Az NFT patológia regionális megoszlásának megfelelően az aHPC mintákban a transentorhinalis régióra, míg az MFG mintákban a neocortexre fókuszáltunk. A szemikvantitatív intenzitás értékelését (scoring) ImageJ szoftver használatával végeztük. A „Cell Counter” modullal megjelöltük és megszámloltuk egy négyfokozatú skála alapján (0, 1+, 2+, 3+) a különböző intenzitású immunreakciót mutató sejteket. Meghatároztuk az átlagos IHC intenzitás „score”-t minden egyes mintára, majd ezeket összesítve kiszámoltuk az átlagértékeket az aHPC és MFG régiókra korai és késői stádiumokban egyaránt.

3.2.5 FDL-IHC digitális képanalízis

A fluoreszcens mikroszkópia az 3.1.5 alfejezetben leírt módon és beállításokkal történt. Esetenként 5-5 közepes nagyítású (200x) fotót készítettünk. A foszfo-tau (zöld) és LMTK2 (piros) fluoreszcens szignálok digitális analízisét ImageJ szoftverrel az alábbi metodika szerint végeztük: a) Az egy esethez tartozó piros és zöld csatornák egymásra helyezésével kapott képeket egy „stack”-be rendeztük. Ezt követően az RGB „stack” képeket átkonvertáltuk 8-bites szürkeskálába, de az eredeti piros és zöld csatorna adatokat megtartottuk, annak érdekében, hogy a mért szürkeskála értékeket visszahelyettesíthessük, ezáltal elvégezhessük a két protein kvantitatív analízisét. b) A küszöbértékek meghatározása manuálisan történt. c) A méret szerinti szelekciót követően, a 400 pixelnél nagyobb objektumokat értékeltük. Az említett visszahelyettesítéses módszerrel megkaptuk az adott „region of interest” (ROI) területére vonatkozó piros és zöld csatorna nyers integrált denzitás adatszlopait. A megfigyelt foszfo-tau/LMTK2 reláció alapján azt volt a feltevésünk, hogy a proteineknek megfelelő fluoreszcens szignálok összege változatlanok tekinthető az egyes képeken. Minden esetben meghatározásra került, hogy a piros és zöld szignálok milyen arányban járulnak hozzá a képek összintenzitásához, azaz megadtuk az egyes fehérjék százalékos megoszlását. Végül a csoportokra vonatkozó értékeket is kiszámoltuk a piros és zöld csatorna adatok alábbi matematikai egyenleten alapuló transzformációjával:

$$R-G/R+G = X \quad (1)$$

ahol R a mért piros szignál (LMTK2) százalékos értéke, G a mért zöld (foszfo-tau) szignál százalékos értéke és X (-1) és (+1) közötti értéket vehet fel. Ha X= (+1) akkor 100% piros és

0% zöld szignált, míg, ha $X = (-1)$ akkor 100% zöld és 0% piros szignált mértünk az adott csoportban.

Fontos hangsúlyozni a két metodika közti alapvető különbséget: a CHR-IHC az átlagos LMTK2 intenzitás „score”-t hasonlítja össze a csoportok között, az FDL-IHC pedig a foszfo-tau/LMTK2 szignálok százalékos megoszlását méri egy adott csoporton belül.

3.2.6 Statisztikai analízis

Az egyes csoportokra vonatkozó átlagos CHR-IHC intenzitás „score” értékek normál eloszlást követtek (Shapiro-Wilk teszt), így az adatokat t-teszttel hasonlítottuk össze páronként. Annak érdekében, hogy tisztázzuk az életkor, mini-mentál teszt (MMSE) értékek, valamint az apolipoprotein E (APOE) génpolimorfizmus hatását az CHR-IHC eredményekre ANCOVA tesztet is futtattunk. Az FDL-IHC adatok nem követtek normál eloszlást, ezért a kísérleti csoportokon belül a foszfo-tau és LMTK2 fluoreszcens szignálok közti összefüggést Spearman korrelációval vizsgáltuk.

4. Eredmények

4.1 Az LMTK2 neuropatológiai karakterizálása AD-ben és neocorticalis LBD-ben

4.1.1 CHR-IHC eredmények

Az LMTK2 IHC erős neuron-specifikus citoplazmatikus reakciót mutatott; a glia sejtek és az idegsejtek magjai negatívak. AD-ben az extracelluláris A β plakkok IHC negatívak. Az átlagos citoplazmatikus LMTK2 immunpozitivitás alacsony az NFT-t hordozó ún. „tangle-bearing” neuronokban és a morfológiailag normál sejtekben egyaránt. Szabad szemmel is jól látható, hogy az egyes kísérleti csoportok között jelentős eltérések vannak az immunreakció intenzitásában. Alapvetően azt mondhatjuk, hogy az LMTK2 immunpozitivitás gyengébb AD-ben, mint a CNT és neocorticalis LBD csoportokban, ami az MFG agykéreg mind a hat rétegében megfigyelhető.

4.1.2 IF-IHC eredmények

1272 sejtet elemeztünk összesen a fluoreszcens képeken. Noha, az egyes esetekhez tartozó átlagos intenzitásértékek bizonyos ingadozást mutattak az adott kísérleti csoporton belül (13,6-19 a CNT, 10,8-13,4 az AD és 12,8-16,4 a neocorticalis LBD eseteknél) a standard deviációjuk közel egyező volt, ezzel megfelelő alapot szolgáltatva a statisztikai analízishez. Az egyszempontos ANOVA statisztikailag szignifikáns különbséget mutatott a három kísérleti csoport között ($p < 0,001$) az IF-IHC mintákon mért átlagos szürkeskála intenzitásokban. A páronkénti összehasonlítás alapján a CNT vs. AD ($p < 0,001$) és neocorticalis LBD vs. AD ($p = 0,014$) csoportok között szignifikáns, míg a CNT vs. neocorticalis LBD csoportok között nem volt szignifikáns összefüggés. Az ANCOVA teszt sem az életkort ($p = 0,100$) sem a post-mortem időt ($p = 0,718$) nem találta jelentős befolyásoló tényezőnek az IF-IHC eredmények viszonylatában.

4.2 Az LMTK2 és tau-patológia kapcsolatának vizsgálata AD-ben

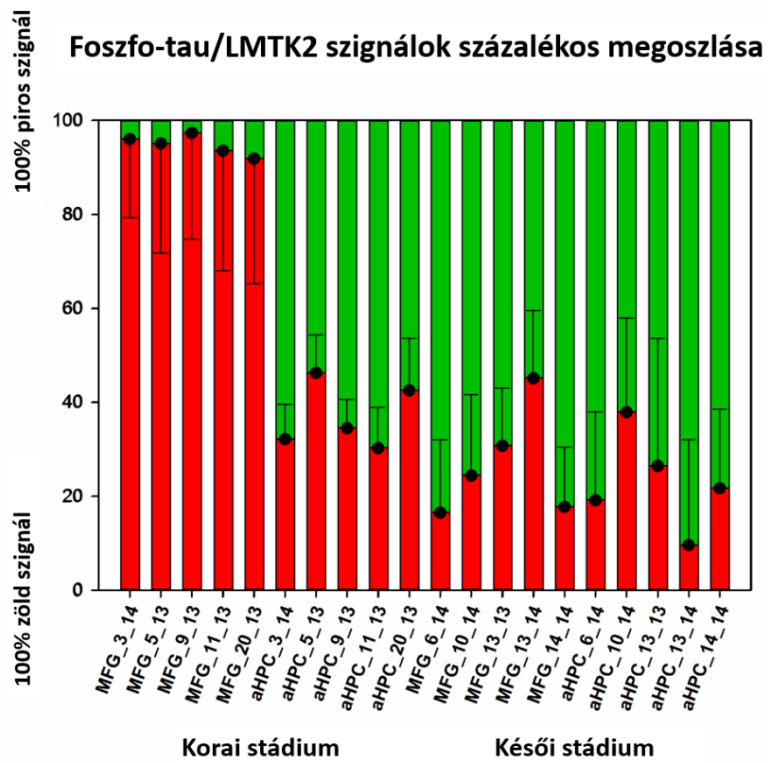
4.2.1 CHR-IHC eredmények

Összesen 1215 sejt CHR-IHC intenzitását értékeltük a 4 kísérleti csoportban (aHPC és MFG régiók korai és késői AD neuropatológiai stádiumokban). Az NFT patológiával érintett 3 csoportban (MFG késői stádiumban, aHPC mindkét stádiumban) elsősorban az alacsonyabb LMTK2 intenzitásértékek (1+) domináltak, míg a legerősebb (3+) immunreakció csak az endogén kontroll korai stádiumú MFG régióban fordult elő. Az egyes esetekre vonatkoztatott

átlagos IHC intenzitás „score” a következő variabilitást mutatta a csoportokon belül: 2,13-2,92 MFG korai stádium, 1,07-1,70 aHPC korai stádium, 1,22-1,81 MFG késői stádium és 1,00-1,55 aHPC késői stádium. Mindazonáltal a standard deviációk közel azonosak voltak, ezzel megalapozva a statisztikai analízist. A csoportokra kiszámított átlagos intenzitás értékek az alábbiak szerint alakultak: 2,59 MFG korai stádium, 1,28 aHPC korai stádium, 1,43 MFG késői stádium, 1,24 aHPC késői stádium. Páronként összehasonlítva a kísérleti csoportokat az LMTK2 IHC intenzitás „score” szignifikánsan ($p < 0,001$) eltért az NFT-mentes endogén kontroll (MFG korai stádiumban) és a három NFT patológiával súlyosan érintett csoportok (MFG késői és aHPC mindkét stádiumban) között (15. ábra). Utóbbi három régió összehasonlítása nem adott statisztikailag szignifikáns eredményt. Az LMTK2 CHR-IHC intenzitásértékeket az életkor ($p = 0,137$), MMSE értékek ($p = 0,132$), illetve APOE génpolimorfizmus ($p = 0,253$) nem befolyásolta jelentősen.

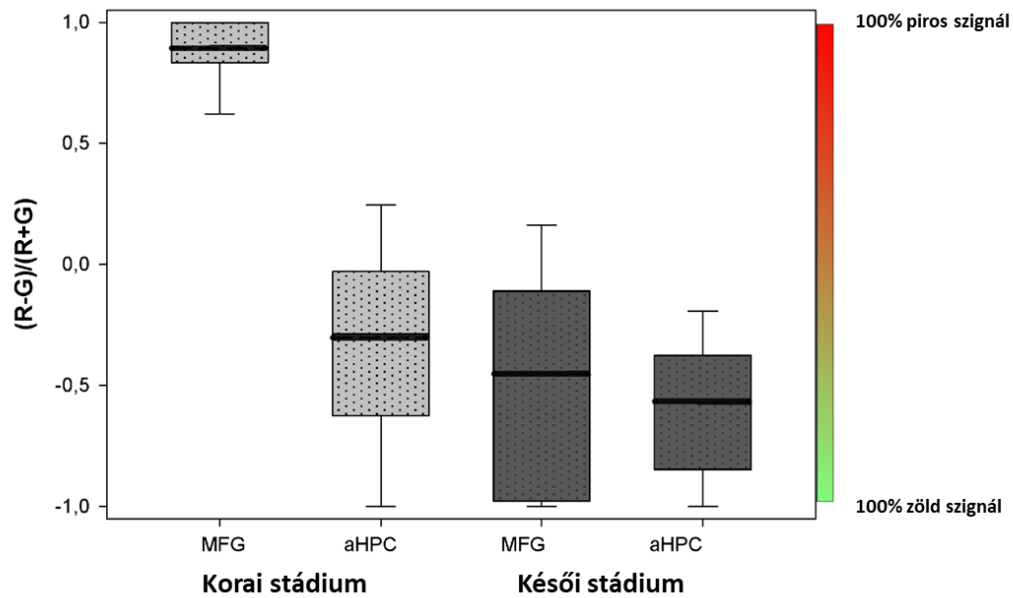
4.2.2 FDL-IHC eredmények

A foszfo-tau/LMTK2 FDL-IHC az LMTK2 pre-dominanciáját mutatta az endogén kontroll csoportban (MFG korai stádiumban), míg foszfo-tau túlsúly és csökkent LMTK2 immunpozitivitás ábrázolódt az NFT-vel érintett (MFG késői és aHPC mindkét stádiumban) csoportokban. Az 1. ábrán látható az egyes esetekre meghatározott foszfo-tau/LMTK2 szignálok százalékos megoszlási értéke. Ezen adatok alapján a csoportszintű LMTK2 (piros) és foszfo-tau (zöld) fluoreszcens szignálok összehasonlítását a 2. ábra mutatja be. A piros (LMTK2) és zöld (foszfo-tau) szignálok korrelációs statisztikai analízise erős negatív összefüggést (Spearman Korrelációs Együttható = -1) mutatott minden egyes kísérleti csoportban.



1. ábra Az ábrán az anterior hippocampus (aHPC) és gyrus frontalis medius (MFG) régiók korai és késői Alzheimer-kór neuropatológiai stádiumába tartozó esetekre vonatkoztatott átlagos piros (lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2)) és zöld (foszfo-tau) fluoreszcens szignálok százalékos megoszlását tüntettük fel.

LMTK2 és foszfo-tau szignálok százalékos megoszlása



2. ábra Foszfo-tau és lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) fluoreszcens szignálok a gyrus frontalis medius (MFG) és anterior hippocampus (aHPC) régiókból korai és késői neuropatológiai stádiumú Alzheimer-kórban. A diagramok a kísérleti csoportokban mért piros (LMTK2) és zöld (foszfo-tau) fluoreszcens szignálok interquartilis tartományát ábrázolják egy (-1)-től (+1)-ig terjedő skálán. (A medián értékek fekete vonallal vannak jelezve. A (+1) érték 100% LMTK2 szignál mellett 0% foszfo-taut jelent, míg a (-1) 100% foszfo-tau és 0% LMTK2 szignálokra vonatkozik).

5. Megbeszélés

A humán protein atlasz adatbázisával összhangban, CHR-IHC metodikával igazoltuk, hogy az LMTK2 idegszövetben neurodegeneratív kórképekben is a neuronok citoplazmájában expresszálódik, a sejtmagokban és glia sejtekben nem detektálható. Az AD-specifikus patológiás elváltozások vonatkozásában, az A β plakkok negatívak voltak LMTK2 IHC-vel, ami azt valószínűsíti, hogy a fehérje nem vesz részt a protein aggregátumok képzésében. A „tangle-bearing” és morfológiailag normál neuronok hasonlóan gyenge átlagos citoplazmatikus immunopozitivitást mutattak.

Az IF-IHC intenzitásadatok alapján az LMTK2 fehérje mennyisége jelentősen csökken AD-ben a CNT-hez és neocorticalis LBD-hez képest. A statisztikai tesztek szignifikáns eltérést tártak fel az AD vs. CNT és AD vs. neocorticalis LBD viszonylatában, míg a CNT vs. neocorticalis LBD csoportok között minimális, de statisztikailag nem számottevő különbséget detektáltunk, mely adatokat sem a post-mortem idő, sem az életkor nem befolyásolta jelentősen. A neocorticalis LBD-ben mért kismértékű LMTK2 csökkenést a gyakran társleletként megfigyelhető AD patológiának tulajdonítottuk, majd kísérletesen is igazoltuk, hogy az LMTK2 alteráció AD/tauopátia-specifikus és valószínűleg nem kapcsolódik közvetlenül az α -synucleinopátiákhoz.

Az LMTK2 CHR-IHC és foszfo-tau/LMTK2 FDL-IHC vizsgálatok megerősítettek, hogy az LMTK2 szint csökkenése nem egy generalizált változás az AD betegek agyában, hanem szorosan összefügg az NFT patológia kiterjedésével. Egyazon korai AD neuropatológiai stádiumú betegben (is) szignifikánsan magasabb volt az LMTK2 immunopozitivitás a megkímélt MFG régióban, mint az NFT-vel súlyosan érintett aHPC-ben. Az életkor, MMSE értékek, illetve APOE génpolimorfizmus nem befolyásolták szignifikánsan az LMTK2 CHR-IHC adatokat. A foszfo-tau/LMTK2 FDL-IHC szignálok statisztikai analízise erős negatív korrelációt mutatott a két fehérje megoszlásában minden kísérleti csoportban, azaz az LMTK2 expresszió fordítottan arányos a foszfo-tau/NFT patológia kiterjedésével.

Eredményeinkkel összhangban néhány korábbi kutatás is csökkent LMTK2 szintet detektált AD-ben. Genomszintű génexpressziós vizsgálattal alacsonyabb LMTK2 expressziót mértek a neocortex és a hippocampus területén tau transzgen (Tau P301L) egerekben, míg az AD patológiától megkímélt kisgyermekben nem volt eltérés. Mórotz és mtsai. 2019-ben közzétették a mi IHC eredményeinket kiegészítő humán western blot tanulmányukat (részben az általunk

LMTK2 neuropatológiai karakterizálására használt AD és CNT mintákon). A Braak (tau) neuropatológiai stádiumok alapján három kísérleti csoportot határoztak meg: kontroll – Braak I-II; enyhe demencia Braak III-IV; súlyos demencia Braak V-VI. A homloklebenyben az LMTK2 expresszió csökkent az NFT patológia progressziójával, de a kisagyban (hasonlóan az egérmodellhez) nem volt változás. Ugyanakkor, nem adták meg pontosan hogy a homloklebeny mely régióját vizsgálták, valamint az aHPC régió értékelése is hiányzott, így direkt összehasonlítás nem lehetséges az általunk végzett kutatással. Mindazonáltal, az LMTK2 szint NFT patológia kiterjedésével összefüggő csökkenése, valamint az NFT-mentes kisgyi régióban mért változatlan értékek (amit a mi kísérleti elrendezésünkben az endogén kontroll MFG korai AD-ben reprezentált) bizonyos mértékig validálják a mi IHC eredményeinket.

Noha, az LMTK2 jelátviteli útvonal vizsgálata nem képezte részét a kutatásunknak, a korábbi összefoglaló közleményünkben felvetett, sejtbiológiai és állatkísérletes tanulmányokon alapuló adatok magyarázattal szolgálhatnak a csökkent LMTK2 szint neurodegenerációban betöltött szerepére. A potenciális mechanizmusokat három csoportba soroltuk: 1) axonális transzport zavara; 2) tau hiperfoszforiláció; 3) fokozott apoptózis.

A neuronális homeosztázis fenntartásához elengedhetetlen a jól szervezett, precíz axonális transzport. Ha ez a komplex folyamat zavart szenved az a szállított sejtorganellumok és proteinek akkumulációjához vezethet. Szakirodalmi adatok támasztják alá, hogy az axonális transzport defektusa korai esemény számos neurodegeneratív kórkép patogenezisében. Fiziológiás körülmények között az LMTK2 indirekt módon részt vesz az axonális transzportfolyamatok szabályozásában. Egy közelmúltban megjelent tanulmány alapján az LMTK2 közvetlenül kötődik az egyik fő molekuláris motorprotein a Kinezin-1 könnyűláncjaihoz (KLC 1/2). Az interakció facilitálja az LMTK2 fehérje axonális transzportját, valamint elősegíti a CDK5 aktivátor p35-öt is magában foglaló KLC1-LMTK2-p35 komplex kialakulását. Az LMTK2 expresszió csökkenése (géncsendesítés által) komoly zavart okozott nem csak a p35, de a CDK5 transzportjában is. Tekintve, hogy a CDK5 esszenciális a neuronok élettani működéséhez, az intracelluláris transzport defektusa hozzájárulhat a neurodegeneratív folyamatokhoz.

Az LMTK2 indirekt módon is részt vesz a Kinezin-1-függő axonális transzportfolyamatokban. A KLC-k foszforilációja fontos regulációs mechanizmus a cargo megkötése és elengedése szempontjából, ennek egyik kulcs enzime a GSK3 β . Már 2004-ben leírták, hogy a CDK5 közvetetten szabályozza a GSK3 β aktivitását a PP1C-n keresztül, azonban a kapcsolat természetét (direkt vagy indirekt) nem sikerült feltárni egészen 2012-ig. Manser és mtsai. az

LMTK2-t azonosították, mint a CDK5/p35, PP1C, GSK3 β jelátviteli útvonal hiányzó láncszemét. A négy fehérje közösen egy egységes foszforilációs útvonalat alkot, amely regulálja a Kinezin-1-függő axonális transzportot. A CDK5/p35 a szerin-1418-as helyen foszforilálva aktiválja az LMTK2-t. A foszforilált LMTK2 gátolja a PP1C aktivitását a treonin-320 helyen történő foszforilációval. Ez a lépés a csökkent PP1 foszfatáz aktivitás következtében ahhoz vezet, hogy az enzim nem tudja eltávolítani az inhibitorikus foszfátcsoportot a GSK3 β szerin-9 pozícióból. A gátolt GSK3 β nem tudja foszforilálni a KLC2-t, ami elősegíti a cargok (pl. mothers against decapentaplegic homolog 2 (Smad2)) megkötését. Végeredményben azt mondhatjuk, hogy az LMTK2 negatív szabályozója a KLC2 foszforilációnak, azaz hozzájárul a Smad2 Kinezin-1-függő axonális transzportjához. A Smad2 transzkripciós faktor a nukleocitoplazmatikus útvonal révén a transzformáló növekedési faktor- β (TGF β) jelátviteli útvonal egyik kulcsfehérjéje. Az LMTK2 génexpresszió csökkenése (géncsendesítés által), megzavarja a Smad2 kötődést a KLC2-höz, ezáltal gátolja a TGF β receptor nukleáris szignalizációt. A TGF β /Smad2 jelátviteli útvonal zavarát megfigyelték több gyakori neurodegeneratív kórképben, beleértve az AD-t, ami megerősíteni látszik az LMTK2 változás patomechanizmusban betöltött szerepét.

Az NFT- k karakterisztikus patológiai elváltozások AD-ben. Az aggregátumok fő komponense a hiperfoszforilált-tau fehérje. A CDK5 és a GSK3 β jól ismert major tau-kinázok, melyek részt vesznek a tau hiperfoszforilációban in vivo. Noha a CDK5, illetve GSK3 β önmagában is elegendő lenne a tau hiperfoszforilációhoz, meglepő módon a két enzim között negatív korrelációt találtak. A korábban leírt útvonalon a CDK5 közvetetten gátolja a GSK3 β aktivitást, ami úgy tűnik életkor-függő folyamat. Idős egerekben a GSK3 β aktivitás magasabb a fiatal példányokhoz képest, ami tau hiperfoszforilációhoz vezet. Az életkor-függően magasabb GSK3 β működés pontos magyarázata nem ismert. Az egyik lehetséges válasz, hogy az enzim aktivitását fékező mechanizmusok (pl. LMTK2 jelátvitel) károsodnak. Fiziológias körülmények között a CDK5/p35 komplex aktiválja az LMTK2-t. AD-ben neuronális stressz hatására a calpainok fokozott működése nyomán a p35 kofaktor p25-re és p10-re hasítódik. A CDK5/p25 komplex hosszabb féléletidejéből adódó elnyújtott kináz aktivitása révén hozzájárul a tau hiperfoszforilációhoz. A p25 kisebb affinitással köt az LMTK2-höz mint a p35, ami magyarázhatja az enzim csökkent funkcióját AD-ben. Ez a változás PP1C dezinhibícióhoz és indirekt módon GSK3 β túlműködéshez, végső soron tau hiperfoszforilációhoz vezet.

Egy közelmúltban megjelent tanulmány, siRNS alapú nagy áteresztőképességű szűrési technikát alkalmazva az LMTK2-t egy potenciális apoptózis regulátor fehérjeként azonosította.

A LMTK2 génexpresszió gátlása (géncsendesítés által) csökkentette az anti-apoptotikus „B-cell lymphoma-2” (Bcl-2) és „B-cell lymphoma-extra-large” (Bcl-xL), valamint növelte a pro-apoptotikus „Bcl-2-interacting mediator of cell death” (Bim) fehérjék szintjét. Ennek következtében a sejtek érzékenyebbé váltak az apoptózist-indukáló és egyéb citotoxikus kemoterápiás szerekre. A magasabb Bim és alacsonyabb Bcl-2, valamint Bcl-xL értékek hátterében a fokozott PP1 és GSK3 β aktivitást találták, amit az LMTK2-mediált inhibíció hiányára vezettek vissza. AD betegek agyában magasabb Bim szint mérhető, míg a Bcl-2 valószínűleg protektív az AD-hez kapcsolódó sejtkárosító faktorokkal szemben. Ez alapján az LMTK2 fontos szerepet tölt be az apoptózis szabályozásában, csökkent aktivitása pedig hozzájárulhat a neurodegeneratív betegségekre jellemző kifejezett apoptotikus sejthalálhoz.

Jelenlegi tudásunk szerint a neuronok döntő többsége terminálisan differenciálódott sejt. Mindazonáltal, bizonyos sejtkárosító ingerek (pl. oxidatív stressz, A β peptidek, hiperfoszforilált-tau) képesek aberráns módon reaktiválni a sejtciklust. Tekintve, hogy a neuronok elvesztették osztódási képességüket, a sejtciklusba történő ismételt belépés különböző szabályozó mechanizmusok révén apoptózishoz fog vezetni. Egyre több kutató vallja azt a teóriát, hogy a neurodegeneratív betegségek valójában a „neuronok malignus daganatai”. Korántsem elképzelhetetlen, hogy bizonyos sejtkárosító faktorok, amelyek kontrolálatlan sejtosztódást képesek okozni más szövetekben kiterjed degeneratív elváltozásokhoz és sejtpusztuláshoz vezetnek az idegszövetben. Több tanulmány is csökkent LMTK2 expresszióról számolt be rosszindulatú daganatokban, ami alapján felmerülhet, hogy az LMTK2 a tumor-szupresszor fehérjékhez hasonló funkcióval bír. Az neuronokban a kóros sejtciklus reaktiváció fokozza a ciklin D és a ciklin E expressziót, valamint a G1 és G2 fázis CDK-k aktivitását. A magasabb CDK aktivitás a retinoblastoma protein foszforilációjához és egyidejűleg az E2F elengedéséhez vezet. Az E2F gátolja az pro-apoptotikus gének expresszióját, továbbá transzaktivál számos „downstream” sejtciklus gént ezzel serkentve az előrehaladását ennek a végeredményben halálos ciklusnak. Ha az LMTK2-t egyfajta sejtciklust fékező/tumor-szupresszor fehérjének tekintjük, elképzelhető, hogy az E2F csökkenti az enzim expresszióját a transzkripció gátlásával. Mindazonáltal, az E2F-LMTK2 interakciót eddig nem sikerült kísérletesen igazolni.

Röviden összefoglalva:

- Az LMTK2 a neuronok citoplazmájára lokalizálódik CHR-IHC-val neurodegeneratív kórképekben (AD, neocorticalis LBD) és azonos átlagéletkorú nem-demens kontroll csoport post-mortem agymintáin egyaránt.
- Az AD-re patognomikus szövettani elváltozások közül az A β plakkok negatívak, míg a „tangle-bearing” neuronok a morfológiailag egészséges sejtekhez hasonlóan alacsony átlagos citoplazmatikus LMTK2 immunpozitivitást mutattak.
- Jelentősen csökkent az LMTK2 immunreakció intenzitása súlyos (Braak VI. stádiumú) AD-ben, a neocorticalis LBD és CNT csoportokhoz képest IF-IHC technikával, ez a tendencia a vizsgált MFG régióban az agykéreg mind a hat rétegében megfigyelhető.
- Az LMTK2 CHR-IHC intenzitás „score” szignifikánsan alacsonyabb az NFT patológiával súlyosan érintett aHPC régióban korai neuropatológiai stádiumú AD-ben (Braak I-III), valamint az aHPC és MFG régiókban késői neuropatológiai stádiumú AD-ben (Braak VI), mint az NFT-től megkímélt endogén kontroll korai stádiumú MFG régióban.
- A foszfo-tau/LMTK2 FDL-IHC erős negatív korrelációt mutat a két fehérje megoszlásában a vizsgált korai és késői AD neuropatológiai stádiumú régiókban, azaz az LMTK2 expresszió mértéke fordítottan arányos a foszfo-tau/NFT patológia kiterjedésével. Következésképpen az LMTK2 szint csökkenése nem egy generalizált változás az AD betegek agyában, hanem szorosan összefügg az NFT-k kiterjedésével.

Az LMTK2 feltehetően fontos szerepet tölt be az AD patomechanizmusában, így bízunk benne, hogy a közeljövőben potenciális biomarker/gyógyszercélpont lehet. Ebbe az irányba mutatnak a legújabb kísérletes eredmények is, miszerint az LMTK2 „overexpresszió” neuroprotektív hatást fejtett ki in vitro cerebralis ischemia/reperfúziós modellben. Jól ismert, hogy a vasculáris társpatológia fokozza az AD tünetek súlyosságát, így az LMTK2 szint farmakológiai befolyásolása pozitív terápiás hatás fejthet ki a betegségben. Erre valószínűleg lesz lehetőség, mivel a közelmúltban azonosítottak egy 2-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetát (TPA) válaszregiót az LMTK2 gén promoter szakaszán. A szintetikus Protein Kináz C aktivátor TPA stimulus fokozta az LMTK2 gén expresszióját. Mindazonáltal, további vizsgálatok szükségesek, hogy részletesen feltérképezzük az LMTK2 neurodegenerációban betöltött szerepét, valamint a fehérje farmakológiai befolyásolásának lehetőségét.

6. Összefoglalás

Az Alzheimer-kór (AD) és a Lewy-testes demencia (DLB) a két leggyakoribb neurodegeneratív eredetű demencia, több millió embert érintve világszerte. Jelen tudásunk szerint a betegségek gyógyíthatatlanok, csak tüneti terápia lehetséges. Egyre nagyobb nyomás nehezedik a kutatókra, hogy a patomechanizmus részletes feltérképezésével, új potenciális terápiás célpontokat azonosítsanak. A lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) az utóbbi években került az érdeklődés központjába. Sejtbiológiai és állatkísérletes adatok alapján a fehérje érintett lehet neurodegenerációban, azonban a humán kísérletek száma erősen limitált.

Kutatómunkánk során célul tűztük ki az LMTK2 neuropatológiai karakterizálását a két leggyakoribb neurodegeneratív demenciában, valamint a feltételezett LMTK2 és tau-patológia közti kapcsolat tisztázását AD-ben.

Az LMTK2 neuropatológiai karakterizálását AD, DLB klinikai szindrómában szenvedő, szövettanilag neocorticalis Lewy-testes betegséget (LBD) mutató, valamint azonos átlagéletkorú nem-demens kontroll (CNT) páciensek post-mortem agymintáin végeztük. Kromogén (CHR) immunhisztokémiával (IHC) a szövettani morfológiát, míg fluoreszcens IHC-vel az LMTK2 immunpozitivitás csoportonkénti összehasonlítását vizsgáltuk. Az LMTK2-tau kapcsolatot korai (Braak I-III.) és késői (Braak VI.) AD neuropatológiai stádiumokban az anterior hippocampus (aHPC) és gyrus frontalis medius (MFG) régiókban értékeltük, LMTK2 CHR-IHC-vel, valamint foszfo-tau/LMTK2 fluoreszcens kettős jelölt IHC-vel.

Az LMTK2 neuron-specifikus marker, a citoplazmára lokalizálódik súlyos neurodegeneratív kórképekben és nem-demens CNT csoportban egyaránt. Az AD-specifikus patológiai elváltozások közül az amiloid- β plakkok negatívak, a neurofibrilláris kötegekkel (NFT) terhelt ún. „tangle-bearing” neuronok a morfológiailag ép sejtekhez hasonlóan gyenge átlagos citoplazmatikus immunreakciót mutattak. AD-ban az MFG agykéreg minden rétegében szignifikánsan alacsonyabb az LMTK2 immunpozitivitás, mint a neocorticalis LBD- és kontroll csoportokban. Az LMTK2 és foszfo-tau szignálok között erős negatív korreláció áll fenn AD különböző stádiumaiban.

Eredményeink alapján az LMTK2 szint csökkenés specifikus AD-re, ami azonban nem egy generalizált változás a betegek agyában, mértéke fordítottan arányos az NFT patológia kiterjedésével. Bízunk benne, hogy kutatómunkánk hozzájárul az LMTK2 neurodegenerációban betöltött szerepének megértéséhez, ezáltal a fehérje a közeljövőben potenciális biomarker/gyógyszerterápiás célpont lehet AD-ben.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek **Hortobágyi Tibor** és **Dag Aarsland** Professzoroknak, akik bevezettek a tudomány világába, megismertették velem a kutatómunka szépségeit, valamint tanácsaikkal, szakértelmükkel segítették szakmai fejlődésemet.

Köszönettel tartozom **Méhes Gábor** Professzor Úrnak a Pathologiai Intézet, valamint **Csiba László** Professzor Úrnak az MTA-DE Cerebrovaszkuláris és Neurodegeneratív Kutatócsoport vezetőjének, hogy biztosították a kutatómunkám megvalósításához szükséges feltételeket és támogatták azt.

Külön köszönet a Neuropatológiai Laboratórium valamint a Pathologiai Intézeti Laboratórium munkatársainak, kiváltképp **Nagy Katalinnak** és **Kiss Henriettnek** a kísérletek kivitelezéséhez nyújtott segítségükért.

Szeretném megköszönni **Szarka Máté** és a Vitrolink csapatának felbecsülhetetlen segítségét a digitális képanalízis, valamint adatelemzés kapcsán.

Köszönöm **Mórotz Gábornak** és **Chris Miller** Professzornak az LMTK2-vel kapcsolatos értékes tanácsokat, **Matolay Orsolyának** a metszetek digitalizációjához, valamint a fluoreszcens mikroszkópiához kapott segítséget, továbbá valamennyi szerzőtársamnak és korábbi kollégának, hogy hozzájárultak a PhD munkámhoz.

8. Támogatások

A kutatás az Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóságprogramjának (ÚNKP-17-3 és ÚNKP-18-3), valamint az Innovációs és Technológia Minisztérium Új Nemzeti Kiválóságprogramjának (ÚNKP-19-3), a Nemzeti Agykutatási Program (NAP_KTIA_13_NAP-A-II/7 és 2017-1.2.1-NKP-2017-00002), AGR_PIAAC_13-1-2013-0008, NKFIH-SNN-132999, GINOP-2.3.2-15-2016-00043, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, MTA-DE Cerebrovaszkuláris és Neurodegeneratív Kutatócsoport, valamint a DE ÁOK Tudományfinanszírozás támogatásával valósult meg.

9. Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/20/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

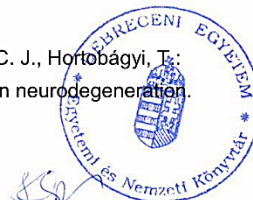
Jelölt: Bencze János
Neptun kód: WD33S7
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bencze, J.**, Szarka, M., Bencs, V., Szabó, R. N., Módis, L. V., Aarsland, D., Hortobágyi, T.: Lemur tyrosine kinase 2 (LMTK2) level inversely correlates with phospho-tau in neuropathological stages of Alzheimer's disease.
Brain Sci. 10 (2), 1-14, 2020.
IF: 2.786 (2018)
2. **Bencze, J.**, Szarka, M., Bencs, V., Szabó, R. N., Smajda, M., Aarsland, D., Hortobágyi, T.: Neuropathological characterization of Lemur tyrosine kinase 2 (LMTK2) in Alzheimer's disease and neocortical Lewy body disease.
Sci. Rep. 9 (1), 1-9, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53638-9>
IF: 4.011 (2018)

További közlemények

3. Gergely, P., Murnyák, B., **Bencze, J.**, Kurucz, A., Varjas, T., Gombos, K., Hortobágyi, T.: Tyrosine kinase inhibitor Imatinib mesylate alters DMBA-induced early onco/suppressor-gene expression with tissue-specificity in mice.
Biomed. Res. Int. 2019, 1-12, 2019.
IF: 2.197 (2018)
4. **Bencze, J.**, Mórotz, M. G., Woosung, S., Bencs, V., Kálmán, J., Miller, C. C. J., Hortobágyi, T.: Biological function of Lemur tyrosine kinase 2 (LMTK2): implications in neurodegeneration.
Mol. Brain. 11 (20), 1-9, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0363-x>
IF: 4.051





5. **Bencze, J.**, Pocsai, K., Murnyák, B., Gergely, P., Juhász, B., Szilvássy, Z., Hortobágyi, T.: The melanin-concentrating hormone system in human, rodent and avian brain.
Open Med. 13 (1), 264-269, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/med-2018-0040>
IF: 1.221
6. **Bencze, J.**, Simon, V., Bereczki, E., Laczkóné Majer, R., Varkoly, G., Murnyák, B., Kálmán, J., Hortobágyi, T.: A Lewy-testes demencia klinikai és neuropatológiai jellemzői.
Orvosi Hetilap. 158 (17), 643-652, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2017.30735>
IF: 0.322
7. Kovács, G. G., Xie, S. X., Lee, E. B., Robinson, J. L., Caswell, C., Irwin, D. J., Toledo, J. B., Johnson, V. E., Smith, D. H., Alafuzoff, I., Attems, J., **Bencze, J.**, Bieniek, K. F., Bigio, E. H., Bódi, I., Budka, H., Dickson, D. W., Dugger, B. N., Duyckaerts, C., Ferrer, I., Forrest, S. L., Gelpi, E., Gentleman, S., Giaccone, G., Grinberg, L. T., Halliday, G., Hatanpaa, K. J., Hof, P. R., Hofer, M., Hortobágyi, T., Ironside, J. W., King, A., Kofler, J., Kövári, E., Kril, J. J., Love, S., Mackenzie, I. R., Mao, Q., Matej, R., McLean, C., Munoz, D. G., Murray, M. E., Neltner, J., Nelson, P. T., Ritchie, D., Rodriguez, R. D., Rohan, Z., Rozemuller, A., Sakai, K., Schultz, C., Seilhean, D., Smith, V., Tacik, P., Takahashi, H., Takao, M., Thal, D. R., Weis, S., Wharton, S. B., White III, C. L., Wolfe, J. M., Yamada, M., Trojanowski, J. Q.: Multisite Assessment of Aging-Related Tau Astroglialopathy (ARTAG).
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 76 (7), 605-619, 2017.
IF: 3.49
8. Hortobágyi, T., **Bencze, J.**, Murnyák, B., Kouhsari, M. C., Bognár, L., Marko-Varga, G.: Pathophysiology of meningioma growth in pregnancy.
Open Med. 12, 195-200, 2017.
IF: 0.484
9. Varkoly, G., **Bencze, J.**, Hortobágyi, T., Módis, L.: A corneális sebgyógyulás és az extracelluláris mátrix.
Orvosi Hetilap. 157 (25), 995-999, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2016.30475>
IF: 0.349
10. Csonka, T., Murnyák, B., Szepesi, R., **Bencze, J.**, Bognár, L., Klekner, Á., Hortobágyi, T.: Assessment of candidate immunohistochemical prognostic markers of meningioma recurrence.
Folia Neuropathol. 54 (2), 114-126, 2016.
IF: 1.093





11. Varkoly, G., **Bencze, J.**, Módis, L., Hortobágyi, T.: Az extracelluláris mátrix rendellenességei epithelialis-stromalis és stromalis cornealis dystrophiákban.
Orvosi Hetilap. 157 (33), 1299-1303, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2016.30481>
IF: 0.349
12. **Bencze, J.**, Varkoly, G., Hortobágyi, T.: Meningeoma és terhesség.
Ideggyogy. Szle. 69 (7-8), 220-224, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18071/isz.69.0220>
IF: 0.322
13. Hortobágyi, T., **Bencze, J.**, Varkoly, G., Kouhsari, M. C., Klekner, Á.: Meningioma recurrence.
Open Med. 11 (1), 168-173, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1515/med-2016-0032>
IF: 0.294

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 20,969

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6,797**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.01.30.

