

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**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.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	7
3. Szakirodalmi áttekintés	8
3.1 Demencia.....	8
3.2 Alzheimer-kór	8
3.2.1 Történeti áttekintés	8
3.2.2 Epidemiológia	9
3.2.3 Genetikai háttér.....	10
3.2.4 Patofiziológia	10
3.2.5 Makroszkópos patológia.....	15
3.2.6 Mikroszkópos patológia.....	15
3.2.7 Klinikai tünetek.....	19
3.2.8 Diagnosztika	20
3.2.9 Terápia	24
3.3 Lewy-testes demencia	24
3.3.1. Történeti áttekintés	24
3.3.2 Epidemiológia	25
3.3.3 Genetikai háttér.....	25
3.3.4 Patofiziológia	25
3.3.5 Makroszkópos patológia.....	26
3.3.6 Mikroszkópos patológia.....	27
3.3.7 Klinikai tünetek.....	29
3.3.8 Diagnosztika	30
3.3.9 Terápia	31
3.4 Lemur tirozin-kináz 2.....	32
3.4.1 Az LMTK2 jellemzése és élettani szerepe	32
3.4.2 Az LMTK2 interakciós partnerei	34
3.4.3 LMTK2 malignus tumorokban.....	36
3.4.4 LMTK2 neurodegenerációban.....	36
4. Célkitűzések	38
5. Anyagok és módszerek	39
5.1 Az LMTK2 neuropatológiai karakterizálása AD-ben és neocorticalis LBD-ben	39
5.1.1 Betegek és minták	39
5.1.2 Kromogén immunhisztokémiai (CHR-IHC) jelölés	41
5.1.3 Fluoreszcens immunhisztokémiai (IF-IHC) jelölés	41

5.1.4 CHR-IHC értékelése	42
5.1.5 IF-IHC digitális képanalízise	42
5.1.6 Statisztikai analízis	43
5.2 Az LMTK2 és tau-patológia kapcsolatának vizsgálata AD-ben	43
5.2.1 Betegek és minták	43
5.2.2 CHR-IHC jelölés	44
5.2.3 Fluoreszcens kettős-jelölt immunhisztokémia (FDL-IHC)	44
5.2.4 Szemikvantitatív CHR-IHC analízis	45
5.2.5 FDL-IHC digitális képanalízis	46
5.2.6 Statisztikai analízis	46
6. Eredmények	48
6.1 Az LMTK2 neuropatológiai karakterizálása AD-ben és neocorticalis LBD-ben	48
6.1.1 CHR-IHC eredmények	48
6.1.2 IF-IHC eredmények	52
6.2 Az LMTK2 és tau-patológia kapcsolatának vizsgálata AD-ben	53
6.2.1 CHR-IHC eredmények	53
6.2.2 FDL-IHC eredmények	54
7. Megbeszélés	58
8. Összefoglalás	65
9. Summary	66
10. Tárgyszavak	67
11. Irodalomjegyzék	68
12. Köszönetnyilvánítás	83
13. Támogatások	83
14. Függelék	84

1. Rövidítések jegyzéke

α Syn	α -synuclein
AATYK2	Apoptózis-asszociált tirozin-kináz 2
A β	Amiloid-béta
AD	Alzheimer-kór
ADAS-Cog	Alzheimer's disease Assesment Scale - Cognitive Subscale
aHPC	Anterior hippocampus
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid prekursor protein
AR	Androgén receptor
ATP	Adenozin-trifoszfát
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-xL	B-cell lymphome-extra-large
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
BREK	Brain-enriched kinase
CAA	Cerebralis amiloid angiopátia
cAMP	Ciklikus adenozin-monofoszfát
CBS	Corticobasalis-szindróma
CDK	Ciklin-dependes kináz
CFTR	Cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
CHR	Kromogénes
CNT	Kontroll csoport
CPRK	CDK5/p35-regulált kináz
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DLB	Lewy-testes demencia
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5 th edition
ECM	Extracelluláris mátrix
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
FAB	Fragment antigen-binding

Fc	Fragment crystallizable
FDL	Fluoreszcens kettős-jelölt
FDG	¹⁸ Fluorodeoxiglükóz
FFPE	Formalin-fixált paraffinba ágyazott
FTLD	Frontotemporalis lobaris degeneráció
GBA	Glükocerebrozidáz gén
GSK3 β	Glikogén-szintáz-kináz-3- β
HE	Hematoxin-eozin
HIER	Hő-indukált epitóp feltárás
IF	Immunofluoreszcens
IHC	Immunhisztokémia
LBD	Lewy-testes betegség
LMTK2	Lemur tirozin-kináz 2
KIR	Központi idegrendszer
KLC	Kinezin-1 könnyű lánc
KPI2	Kináz-foszfátáz-inhibitor-2
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz
MCI	Enyhe kognitív zavart
MMP	Mátrix metalloproteináz
MMSE	Mini-mentál teszt
MRI	Mágneses rezonancia képalkotás
NIA-AA	National Institute on Aging and Alzheimer's Association
NFT	Neurofibrilláris köteg
NFG	Neuronális növekedési faktor
NMDA	N-metil-d-aszparaginát
NLRP3	Nod-like receptor family pyrin domain containing 3
PBS	Foszfát pufferes sóoldat
PCA	Posterior corticalis atrófia
PD	Parkinson-kór
PDD	Parkinson-kórhoz társuló demencia

PET	Positron emission tomography
PKC	Protein-kináz C
PNN	Perineuronális háló
PP1	Protein-foszfataz 1
PP1C	Protein-foszfataz 1 katalitikus alegység
PPA	Primer progresszív afázia
PSA	Prosztata specifikus antigén
PxxP	Prolin-(aminosav)-(aminosav)-prolin
REM	Rapid eye movement
ROI	Region of interest
RVxF	Arginin-valin-(aminosav)-fenilalanin
SEM	Standard hiba
SH3	Src homológ 3
siRNS	Short interfering ribonukleinsav
Smad2	Mothers against decapentaplegic homolog 2
SNP	Egypontos nukleotid-polimorfizmust
SNCA	α -synuclein gén
SPECT	Single photon emission computed tomography
TBS	TRIS pufferes sóoldat
TGF β	Transzformáló növekedési faktor- β
TLR4	Toll-like receptor 4
TPA	2-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetát
TPR	Tetratricopeptide repeat
TRIS	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán
VEGF	Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
VTF	Valin-treonin-fenilalanin
WD	Triptofán-aszpartát
WWY	Triptofán-triptofán-tirozin

2. 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 tízmillió beteget érint világszerte. Ennek ellenére a mai napig nem áll rendelkezésre olyan módszer, amivel gyógyítani lehetne a betegségeket, csupán tünetei 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 fiziológiás és patológiás folyamatban részt vesz. 2018-ban született meg az első tudományos közlemény, amelyben munkacsoportunk korábbi sejtbiológiai és állatkísérletes adatok alapján felvetette az LMTK2 szerepét neurodegeneratív folyamatokban.

Elméletünk igazolásához dokumentált humán AD és DLB mintákat választottunk, melyeket azonos átlagéletkorú nem-demens kontroll csoporttal hasonlítottunk össze. Továbbá az AD-ben patognomikus neurofibrilláris kötegek (NFT) központi idegrendszeren belüli lokalizációja és az LMTK2 expresszió közötti feltételezett összefüggés tisztázására eltérő neuropatológiai (Braak) stádiumú AD beteganyag 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.

3. Szakirodalmi áttekintés

3.1 Demencia

A demencia nem-specifikus klinikai tünetegyüttes, melyben a korábban megszerzett kognitív képességek progresszív hanyatlása figyelhető meg, amihez gyakran társul a memória-, viselkedés-, beszéd- és motoros készségek zavara. A jelenleg használt diagnosztikus kritériumrendszer (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th edition – DSM-5), alapján ezen tünetek súlyossága befolyásolja a beteg mindennapi életvitelét, munkavégzését és szociális kapcsolatait¹. Fontos hangsúlyozni, hogy a szellemi hanyatlás egy korábban elért szinthez képest romlik, így veleszületett-, illetve a kognitív fejlődés korai stádiumában jelentkező kórképek nem sorolhatók ide. Noha elsősorban az idősebb korosztályt érinti, ki kell emelnünk, hogy a demencia nem része a fiziológiás öregedésnek. Az új kritériumrendszer a DSM-4-től eltérően elhagyta a pejoratív, stigmatizáló demencia megnevezést és bevezette a neurokognitív zavar kategóriát. A tünetek súlyossága alapján további két alkategória az enyhe és súlyos neurokognitív zavar különíthető el. Előbbi esetén a mindennapi életvitelhez szükséges képességek megtartottak.

A demenciákat csoportosíthatjuk a folyamat kiindulása alapján². Elsődleges demenciák közé tartoznak az idegsejtek progresszív, irreversibilis, funkcionális és morfológia elváltozásával, pusztulásával járó betegségek, ahol a demencia a vezető tünet, aminek kialakulása nem magyarázható más cerebrális (pl. tumor), vagy extracerebrális kórfolyamattal. Ezzel szemben másodlagos demenciák kapcsán egy jól definiálható, gyakran a központi idegrendszertől távol eső szervben kialakuló kórkép okoz demenciát. Attól függően, hogy a KIR mely része érintett beszélhetünk corticalis, subcorticalis és kevert demenciákról. A demenciát okozó kórkép lefolyása szerint reverzibilis és irreverzibilis formákat különíthetünk el. Az alapján, hogy a tünetek mely életkorban jelentkeznek, lehet preszenilis (65 év alatt) és szenilis (65 év felett) demencia. Ennek tükrében a neurodegeneratív kórképek az elsődleges, irreverzibilis demenciák közé tartoznak.

3.2 Alzheimer-kór

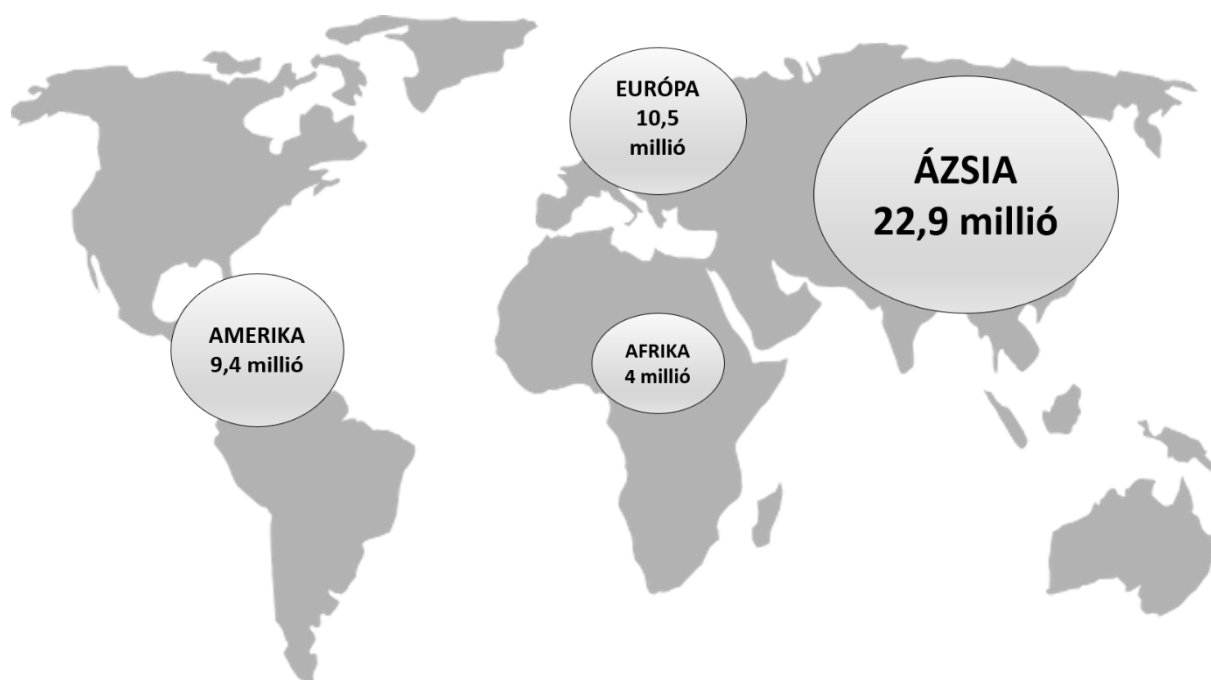
3.2.1 Történeti áttekintés

Az első dokumentált eset Alois Alzheimer német pszichiátertől származik, aki Auguste D-n tett megfigyeléseit a 37. Délnyugat-Német Pszichiáter Találkozón ismertette Tübingenben 1906-ban³. Auguste D 50 éves volt mikor a férje paranoid tüneteket vett észre az asszonyon. A tünetek gyors romlása mellett alvás-és memóriazavar, agresszivitás, érzelmi labilitás és progresszív zavartság jelentkezett, így került a frankfurti közkórházba, ahol 1906-ig, 55 éves korában

bekövetkezett haláláig kezelték. Ekkor Alzheimer a müncheni kórház hisztopatológiai laboratóriumát vezette, ahol elvégezte a nő agyának mikroszkópos vizsgálatát. Az újonnan kidolgozott Nissl-festéssel azonosította a kórképre jellemző amiloid plakkok és NFT-k jelenlétét a mintákban. Noha a tubingeni konferencián nem övezte nagy érdeklődés, a kor meghatározó pszichiáttere és Alzheimer főnöke Kraepelin 1910-ben az általa szerkesztett pszichiátria kézikönyvben Alzheimer-kórként közölte Auguste D esetét. Alzheimer 1911-ben publikálta Josef F esettanulmányát. A férfi a klinikai tünetek alapján AD-ben szenvedett, azonban a szövettani vizsgálat során csak amiloid plakkokat talált NFT nélkül, így tévesen „plaque only” alcsoportként azonosította. Az eredeti mintákon végzett modernkori immunhisztokémiai analízis azonban megerősítette, hogy egyazon kórkép eltérő stádiumairól van szó⁴. Sokáig csak a 65 éves kor alatt jelentkező preszenilis eseteket hívták AD-nek, míg az idősebb korban kialakuló betegségre szenilis demenciaként hivatkoztak. A nevezéktan mai formája 1976 után Robart Katzman javaslatára terjedt el⁵.

3.2.2 Epidemiológia

A legutolsó „World Alzheimer Report” alapján 2015-ben megközelítőleg 46,8 millió ember szenvedett demenciában világszerte⁶. Egyes becslések szerint ez a szám 20 évente megduplázódik, azaz 2030-ra 74,7; míg 2050-re 131,5 millió embert fog érinteni a betegség. Napjainkban a legtöbb demens beteg a fejlődő országokban él. A demencia kontinensek közti megoszlását az 1. ábra mutatja be. Az „Alzheimer Europe” szervezet becslése alapján 148 927 demens beteg élt Magyarországon 2013-ban⁷. Az AD a leggyakoribb demenciát okozó kórkép, ami megközelítőleg az esetek 50-75%-ért felelős⁶. Az életkor szerinti megoszlást tekintve az esetek 6-7% jelentkezik 65 éves kor előtt, ezt követően 5 évenként megduplázódik a prevalencia⁸. Az AD esetek megközelítőleg 75%-a sporadikus, a fennmaradó familiáris esetek döntő többsége nem követi a Mendel-i öröklésmenetet, csupán kevesebb, mint 5%-uk öröklődik autoszomális domináns módon⁹. Noha, a betegség kialakulása valószínűleg multifaktoriális eredetű az alábbi tényezők növelhetik a kockázatot: női nem, alacsony iskolázottság, csökkent szellemi és fizikai aktivitás közép-és időskorban, korábban elszenvedett fejsérülés, vaszkuláris rizikótényezők^{2,10}.



1. ábra A demenciában szenvedő betegek kontinensek közti megoszlása a 2015-ös „World Alzheimer Report” alapján⁶.

3.2.3 Genetikai háttér

A familiáris AD tünetei fiatalabb (<60 év) életkorban jelentkeznek. Dominánsan öröklődnek a Presenilin-1 és Presenilin-2 gént érintő mutációk¹¹. Az amiloid prekursor protein-t (APP) kódoló gén a 21-es kromoszómán helyezkedik el, a leggyakoribb a hosszú kar 21.3 régióját érintő mutációja. Megjegyzendő, hogy Down-szindrómában a 21-es triszómia következtében fokozott amiloid-béta (A β) termelés detektálható, ami felhalmozódik a szenilis plakkokban, így ezekben a betegekben egy bizonyos életkor után az AD megjelenésével kell számolni¹¹. Az apolipoprotein E (APOE) gén ϵ 4 allél polimorfizmus az egyik legjelentősebb rizikófaktornak számít. Heterozigóták esetén háromszorosára míg homozigótákban több mint tízszeresére nő az AD kialakulásnak kockázata¹².

3.2.4 Patofiziológia

Az AD kialakulásának hátterében álló komplex patológias folyamatok a mai napig nem ismertek teljes részletességgel. Az évek során számos hipotézis látott napvilágot, azonban egyértelmű bizonyítékkal egyik sem tud szolgálni. Feltételezhető, hogy a kórkép kialakulásához több kóros tényező együttes jelenléte szükséges (multifaktoriális eredet).

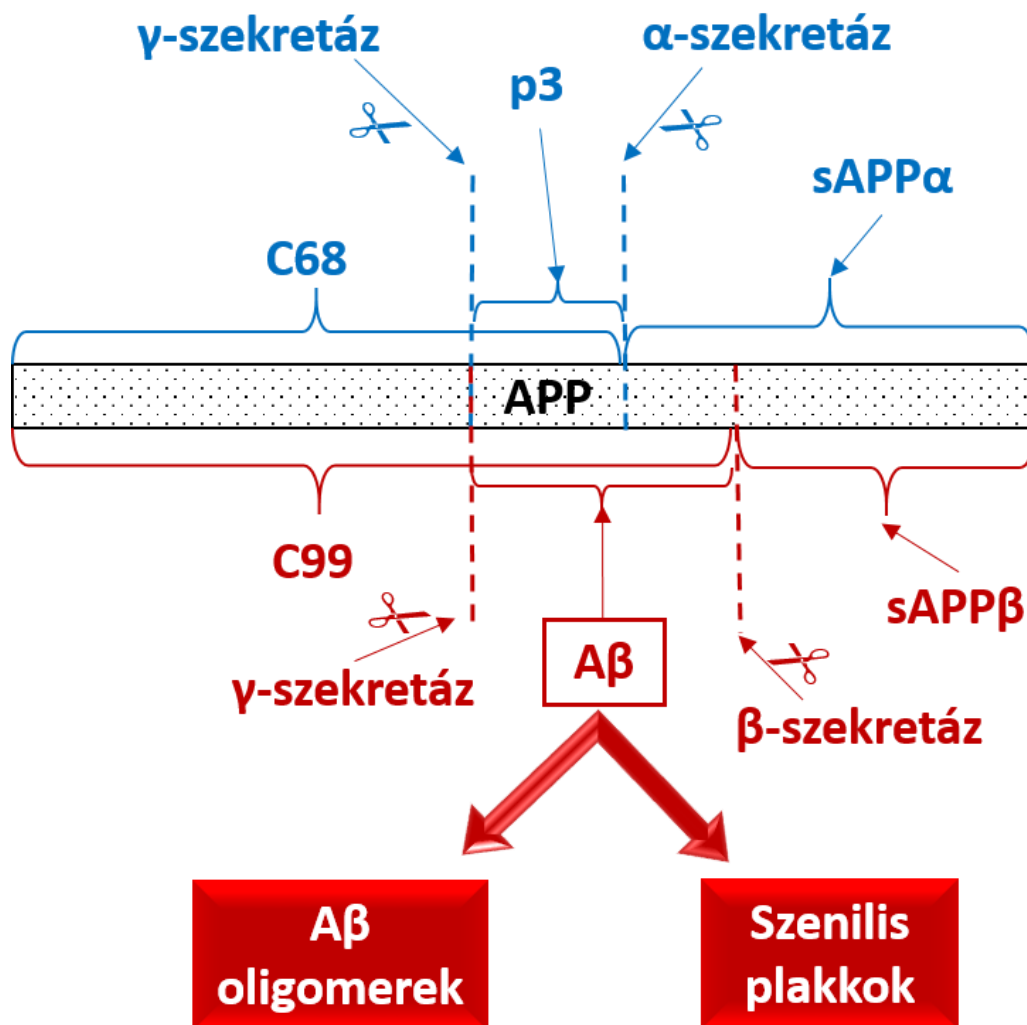
3.2.4.1 Kolinerg hipotézis

Ez volt az első hipotézis, ami molekuláris szintű változásokra vezette vissza az AD kialakulását. A hippocampus, frontális lebeny, amygdala, nucleus basalis és medialis

septum régiókban a szelektív kolinerg neuronpusztulás következtében zavart szenved a figyelem, tanulási képesség és memória⁵. A kolinerg markerek mint kolin-acetil-transzferáz és acetilkolin-észteráz szintjének csökkenése összefüggést mutat a kognitív zavar megjelenésével¹³. A közelmúltban kiderült, hogy a megváltozott kolinerg transzmisszó hozzájárulhat az AD-ben megfigyelt kóros mértékű N-metil-d-aszparaginát (NMDA) receptor aktivációhoz¹⁴. Ez a hipotézis adta az alapját az AD kezelésében használt gyógyszerek (pl. acetilkolin-észteráz gátlók, NMDA-receptor antagonisták) kifejlesztésének.

3.2.4.2 Amiloid-kaszád hipotézis

A hipotézis az A β termelés és clearance közti egyensúly felbomlására vezeti vissza az AD-ben kialakuló tüneteket¹⁵. Az APP egy transzmembrán fehérje, melynek extracelluláris régióját fiziológias körülmények között a dizintegrin és metalloproteináz (ADAM) családba tartozó α -szekretáz hasítja. Ezáltal keletkezik egy szolubilis APP α protein, valamint a membránhoz kötött 83 aminosav hosszú karboxi-terminális régióból (C83) a γ -szekretáz egy további p3 nevű peptidet hasít le¹⁵. AD-ben ez a mechanizmus megváltozik, az APP-t az α - helyett β -szekretáz bontja egy rövidebb szolubilis APP β , valamint egy hosszabb membránkötött (C99) régióra. Utóbbiból vágja le a γ -szekretáz az A β peptidet¹⁵. Az alacsony szolubilitású és proteolitikus degradációval szemben kifejezetten rezisztens A β leggyakrabban 40, illetve 42 aminosav hosszúságú formákban keletkezik¹⁶. Az A β ₄₂-t, a leginkább hidrofób izoformát tartják a legtoxikusabbnak¹⁶. Ezeknek a peptideknek fokozott az aggregációs hajlamuk, így lerakódnak az extracelluláris szenilis plakkokban oldhatatlan A β fibrillumok formájában (2. ábra). Ugyanakkor a legújabb kutatási eredmények alapján, az eredeti hipotézissel ellentétben, az úgynevezett szolubilis A β oligomereknek van kiemelt szerepe az AD-ben megfigyelhető neurotoxicitásért¹⁷. Kísérletes körülmények között bizonyították, hogy az A β oligomerek zavart okoznak a neurotranszmisszióban, károsítják a szinaptikus funkciókat és hozzájárulnak a neuronok pusztulásához¹⁸. Továbbá, a szolubilis oligomerek szintje jobban korrelál az AD tünetek súlyosságával mint a fibrilláris aggregátumok mennyisége¹⁹. Mindazonáltal ez a hipotézis sem tud egyértelmű magyarázattal szolgálni az AD-ben megfigyelhető komplex patológiás folyamatokra.



2. ábra Az amiloid prekursor protein (APP) proteolitikus hasítása egészséges agyban (kék) és Alzheimer-kórban (piros)¹⁵. Fiziológias körülmények között az APP-t az α -szekretáz hasítja szolubilis APP α (sAPP α) és karboxi-terminális 68 aminosav hosszú (C68) régiókra. Utóbbiból a γ -szekretáz egy további p3 peptidet távolít el. Alzheimer-kórban az APP-t a β -szekretáz bontja szolubilis APP β (sAPP β) és karboxi-terminális 99 aminosav hosszú (C99) régiókra. A C99-ből a γ -szekretáz hasítja le az amiloid- β (A β) peptidet. Az A β fokozott aggregációs készsége okán oligomereket képez, valamint oldhatatlan fibrillumok formájában lerakódik a szenilis plakkokban.

3.2.4.3 Tau fehérje

A tau egy mikrotubulus-asszociált fehérje, ami számos esszenciális sejtbiológiai folyamatban vesz részt: mikrotubulus stabilizáció, axonális transzport, szinaptikus transzmisszió²⁰⁻²². AD-ben a fehérje kóros poszt-transzlációs modifikáción (hiperfoszforiláció, acetiláció, trunkáció) megy keresztül és nő az aggregációs hajlama¹¹. Kiemelt jelentősége a tau-hiperfoszforiláció; eddig közel 100 foszforilációs helyet és 38 tau-kinázt azonosítottak²³, közülük külön említést érdemel a ciklin-dependens-kináz (CDK5) és a glikogén-szintáz-kináz-3- β (GSK3 β). A két major tau-kináz

patomechanizmusban betöltött szerepét nagyszámú tudományos közlemény támasztja alá²⁴⁻²⁷. AD-ben a tau fehérjén lévő foszfátcsoportok mennyisége 3-4-szerese a normál agyban mért értéknek²⁸. A hiperfoszforilált-taunak fokozott az aggregációs készsége, valamint neurotoxikus tulajdonsággal is rendelkezik azáltal, hogy hozzájárul a normál tau és egyéb mikrotubulus-asszociált fehérjék szekvesztrációjához, végső soron a mikrotubulusok széteséséhez²⁹. Ezen felül az aggregálódott hiperfoszforilált-tau a fő összetevője az AD-re patognomikus intracelluláris NFT-knek. A kutatók egyetértenek abban, hogy a tau fehérjét és A β oligomereket érintő változások meghatározók a patogenezisben. Kísérletes adatok bizonyítják, hogy az A β peptid hozzájárul a tau hiperfoszforilációhoz, valamint a fehérje citoplazmatikus és dendritikus transzlokációjához^{30,31}, ezzel is támogatva az AD multifaktoriális eredetét.

3.2.4.4 Oxidatív stressz

A szabad oxigényökök felhalmozódása, valamint az ezt ellensúlyozni hivatott antioxidáns enzimek (pl. szuperoxid-dizmutáz) aktivitásában és expressziójában bekövetkező változások ismertek AD-ben³². Az A β képes elősegíteni a reaktív oxigényökök képződését egy az NMDA-receptorok aktiválását magában foglaló mechanizmus révén³³. Ugyanakkor maguk a reaktív oxigényökök is fokozzák az A β termelést és aggregációt, valamint a tau-hiperfoszforilációt, ezáltal egy ördögi kört hoznak létre³⁴. Továbbá a neuronokban nagy számban előforduló mitokondriumok különösen érzékenyek az oxidatív stresszre, ami az organelumok funkciózavarához és további reaktív oxigényökök termeléséhez, végezetül kaszpáz-mediált sejthalálhoz vezet³⁵.

3.2.4.5 Neuroinflammáció

Folyamatosan nő azon közlemények száma, melyek központi szerepet tulajdonítanak a neuroinflammációnak és mikroglia funkció zavarának AD-ben. A mikroglia neuroprotektív szerepet töltenek be azáltal, hogy lebontják az A β -t³⁶. A clearance a „toll-like receptor” (TLR)4-en keresztül történik³⁷. A nagy mennyiségű A β -aggregátum krónikus ingert jelent a receptorra, így a TLR-jelátvitel zavarát és gyulladásszerű folyamatokat indukál³⁸. Az A β további mikroglia receptorokkal is kapcsolatba lép, mint a CD36; feltételezhető, hogy ez az interakció közvetlen hatással van a „nod-like receptor family pyrin domain containing 3” (NLRP3) inflammaszómá aktiválására³⁹. A mikroglia részt vesznek a tau fagocitózisban is⁴⁰. Amellett, hogy aktivált mikroglia gyakran asszociálnak az NFT-khez, úgy tűnik az AD-ben megfigyelt mikroglia-mediált

extracelluláris tau clearance zavara még hozzá is járul a patológiás tau fehérje KIR-i terjedéséhez⁴¹. AD-ben a tau diszfunkció következtében megváltozik több olyan neuronális fehérje (pl. fractalkine) szekréciója, melyek mikroglia receptorukhoz történő kötődése elengedhetetlen ezen sejtek „nyugalmi állapotának” fenntartásához, ami következőképpen gyulladási folyamatokat indíthat el⁴¹. Ugyanakkor extraneurális tényezők is hozzájárulhatnak a neuroinflammáció kiváltásához AD-ben. Az egyik ilyen teória a gasztrointesztinális rendszer és a KIR közti kommunikáció, miszerint a bélben élő baktériumok által termelt faktorok a vér-agy gáton átjutva interakcióba léphetnek a mikrogliaakkal és befolyásolhatják azok működését⁴².

3.2.4.6 Extracelluláris mátrix (ECM)

A legújabb kutatások alapján az ECM összetételében (pl. IV-es típusú kollagén, perlekán, fibronectin) szignifikáns változások figyelhetők meg, már az AD korai, klinikai tünetekkel nem járó stádiumában⁴³. A perineuronális háló (PNN) egy speciális ECM struktúra, mely elsősorban a parvalbumin-pozitív neuronok körül található meg. Fontos szerepe van a szinaptogenezis gátlásában, az oxidatív stressz elleni védelemben, továbbá kation pufferként szolgál a sejtek számára⁴⁴. Több tanulmány beszámol a PNN neuroprotektív szerepéről AD-ben^{45,46}, míg a PNN-el nem rendelkező neuronok sokkal érzékenyebbek az A β -plakkok és NFT-k citotoxikus hatásával szemben⁴⁷. AD-ben kulcsszerepet tulajdonítanak a kóros mátrix metalloproteináz (MMP) aktivitásnak⁴⁸. A MMP-ok fokozott aktivitása hozzájárulhat a PNN degradációjához, ezzel növelve az idegsejtek vulnerabilitását. Az ECM neuroprotektív szerepének ellentmond az a tény, hogy több komponense (pl. heparán-szulfát proteoglikánok, kondroitin-szulfát proteoglikánok) részt vesz az A β fibrillumok stabilizálásában, kimutatható a szenilis plakkokban, illetve befolyásolja a tau clearance-t⁴⁹. Feltételezhető, hogy AD-ben a MMP-ok és inhibitoraik közti egyensúly megbomlása ECM degradációhoz vezet, emiatt egyfajta kompenzatorikus válaszként megemelkedik az ECM komponensek szintézise, azonban a folyamat zavart szenved és a neuroprotektív hatás helyett a túlzott mértékű ECM termelés hozzájárul az AD patológia progressiójához. Ezt az elképzelést megerősíti az a megfigyelés is, hogy a hippocampusban a szenilis plakkok és NFT-t hordozó dendritek közelében nagy mennyiségben található a funkcionálisan ép, individuális szinapsziseket körülvevő és megvédő speciális ECM struktúra az ún. „axonal coat”⁴⁶.

3.2.5 Makroszkópos patológia

Makroszkóposan kifejezett atrófia látható a tau patológiával érintett területeken, mint az entorhinalis cortex, hippocampus és amygdala. A verrucae area entorhinalis az AD korai szakaszában elsimul, összhangban az NFT-k terjedésével és a neuronpusztulással⁵⁰ Súlyosan érintett a gyrus temporalis inferior, valamint gyri temporales medius et superior, míg a gyrus frontalis inferior megkímélt. Az atrófia hátterében a szürkeállomány vastagságának és hosszának csökkenése áll. Ez utóbbi a felszínre merőleges kolumnáris struktúrák rendezettségének felbomlásával magyarázható⁵¹. Fontos hangsúlyozni, hogy az atrófia mértéke az NFT-vel ellentétben nem korrelál az A β felhalmozódással¹¹. A féltekék fehérállományában futnak a kóros neuronok axonjai, így nem meglepő hogy a szürke- és fehérállományt érintő atrófia korrelál egymással. Ezzel szemben, a corpus callosum sorvadása enyhébb fokú és elsősorban a spleniumot, valamint a genut érinti⁵². Mágneses rezonancia képalkotással (MRI) kimutatható, hogy a fornix atrófia már a betegség korai stádiumában jelen van⁵³.

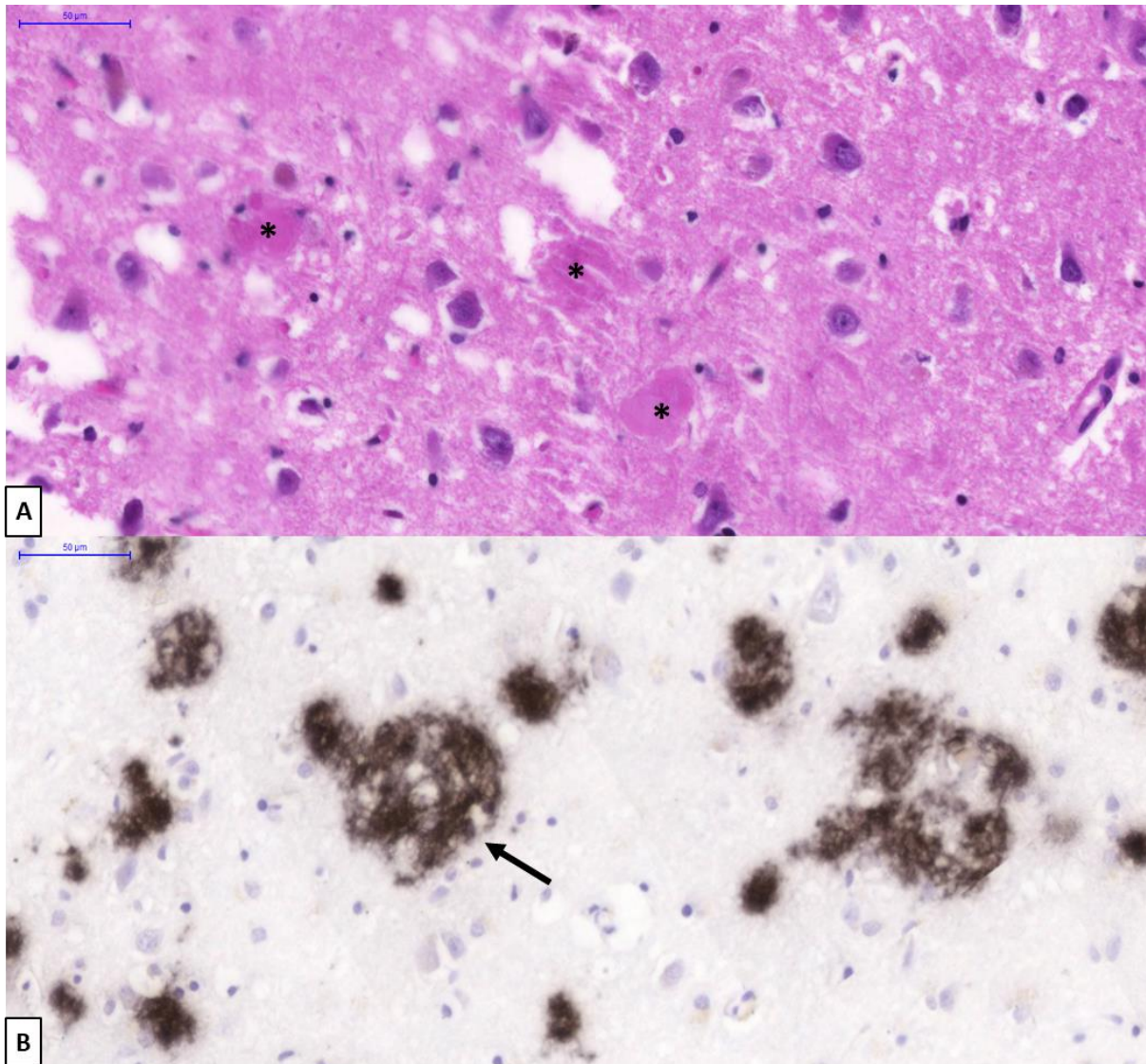
3.2.6 Mikroszkópos patológia

Mikroszkóposan megkülönböztetünk pozitív és negatív léziókat. Előbbihez tartoznak a szövettanilag könnyen azonosítható elváltozások (pl. szenilis plakkok, NFT-k), míg utóbbi csoportba soroljuk a neuronok és szinapszisok pusztulását, melyek vizualizálása gyakran nehezebb feladat. AD-ben patognomikus az extracelluláris szenilis plakkok és intracelluláris NFT-k felhalmozódása.

3.2.6.1 A β depozitumok

A klasszikus szenilis plakkok központi magja nagy mennyiségű A β depozitumot tartalmaz (3. ábra). A körülötte lévő A β -negatív neuritikus komponenst koronának hívjuk. A mag Kongó-vörössel pozitív és polarizált fényben metakromáziát mutat, azaz amiloid tulajdonságokkal rendelkezik. A β immunisztokémiával (IHC) egyértelmű, hogy a peptidek nem csak β -redős konformációban, hanem ennél jóval változatosabb formában vannak jelen a KIR-ben¹¹. A molekuláris neuropatológia szemszögéből a szenilis plakk nem megfelelő elnevezés, mivel az A β depozitumok különféle morfológiával (fokális, diffúz, csillag) a parenchymában és erek falában egyaránt kimutathatók⁵⁴. Leggyakrabban a kevésbé immunreaktív, elmosott szélű és nagyobb kiterjedésű diffúz A β depozitumok fordulnak elő, ugyanakkor ezek az elváltozások nagy számban találhatók mentálisan egészséges személyekben is, így valószínűleg nem rendelkeznek közvetlen neurotoxikus hatással¹¹. A fokális A β depozitumok denz, szférikus, eozinofil, amiloid megjelenésű

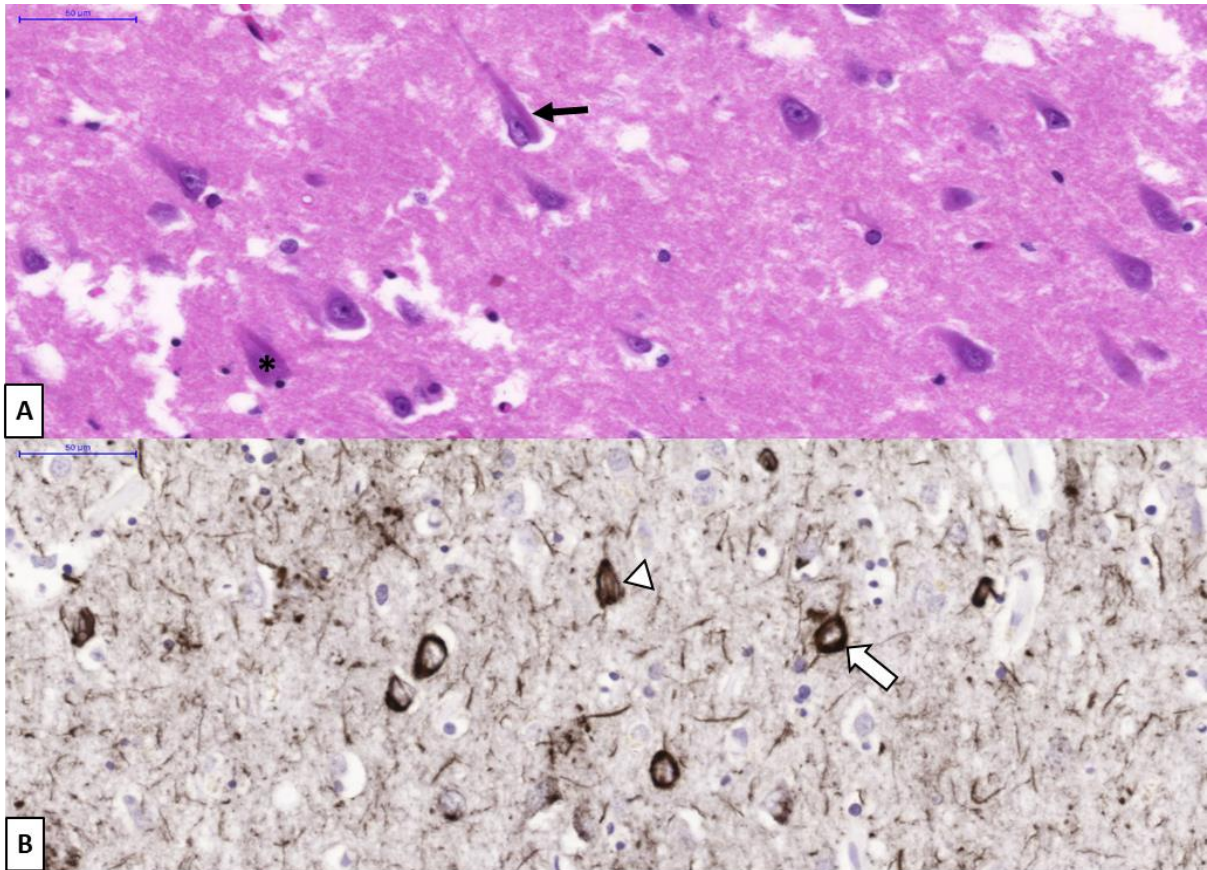
elváltozások, melyek jól láthatók hematoxilin-eozin (HE) festett metszeteken, azaz ezek a depozitumok adják a klasszikus szenilis plakokk magját, melynek fő komponense az A β ₄₂. A magot világos halo veszi körül, melyben gyakran található mikrogliák. A koronát neuritek és asztrocita eredetű elemek alkotják. Elsősorban a lipofuszcint, széteső mitokondriumokat és NFT-ket tartalmazó degeneratív neuritek fordulnak elő. Kisebb számban láthatók a nagy, gömbszerű, A β PP-pozitív disztrófiás neuritek⁵⁵. Az erek falában lerakódó A β depozitumokra cerebrális amiloid angiopátiaként (CAA) hivatkozunk. Az artériák, hajszálerek és vénák egyaránt érintettek. A CAA az erek elágazódásától indul ki, először a membrana basalist érinti, innen terjed a tunica mediara⁵⁶. Előrehaladott esetben fibrinoid (media) nekrosis és következményes cerebrális vérzések alakulnak ki. Ezek főként a lebenyekre lokalizálódnak, szemben a hipertenzió okozta basalis ganglionokat érintő agyvérzéssel⁵⁷. Az A β depozitumok KIR-i lokalizációjának és súlyosságának neuropatológiai osztályozása a Thal és mtsai. által 2002-ben felállított kritériumrendszer alapján történik⁵⁸.



3. ábra Szenilis plakkok rutin hematoxinin-eozin (HE) festéssel (A panel) és amiloid- β ($A\beta$) immunhisztokémiával (IHC) (B panel). A HE képen a szenilis plakkok extracellulárisan elhelyezkedő, homogén, eozinofil aggregátumokként ábrázolódnak (csillag). IHC-val jól vizualizálható a plakkokban nagy mennyiségben jelenlévő $A\beta$ aggregátumok (nyíl). (Az IHC képen a fehérjét 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kromogénnel (barna) vizualizáltuk, a magfestés hematoxinin. Skála: 50 μ m)

3.2.6.2 Neurofibrilláris kötegek

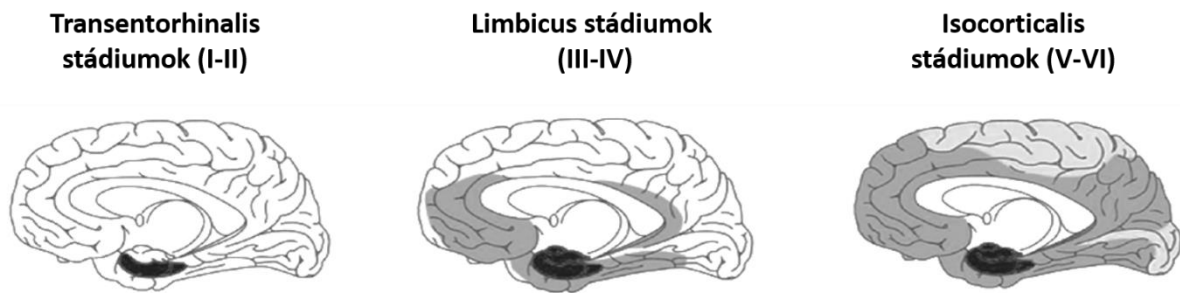
Az NFT-k Bielschowsky-féle ezüstözéssel jól vizualizálható intracelluláris eredetű zárványok. Az eredeti eljárást mára felváltotta a foszfo-tau IHC (4 ábra). Leggyakrabban lánghyelv formában láthatók a közepes méretű piramissejteknél, ugyanakkor egyes multipoláris idegsejteknél (pl. nucleus basalis Meynert neuronjai) gyakran gömbölyded megjelenésűek. A „ghost tangle” az érintett neuron pusztulását követően is detektálható, extracelluláris lokalizációjú NFT¹¹. Feltételezhető, hogy a



4. ábra Neurofibrilláris kötegek (NFT) rutin hematoxilin-eozin (HE) festéssel (A panel) és foszfo-tau immunhisztokémiával (IHC) (B panel). A HE képen az NFT-k eozinofil intracelluláris kötegekként ábrázolódnak melyek diszlokálják a sejtmagot (fekete nyíl). A kötegek a neuron pusztulása után is megtartják annak alakját, ezek az ún. „ghost-tangle”-ök (csillag). Az IHC képen jól látható az NFT-k fő komponense a hiperfoszforilált-tau (fehér nyíl) intracelluláris felhalmozódása, valamint a neuronpusztulás után visszamaradt „ghost-tangle”-ök (fehér nyílhegy). (Az IHC képen a fehérjét 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kromogénnel (barna) vizualizáltuk, a magfestés hematoxilin. Skála: 50µm).

protein aggregátumok jelenléte szükséges, de nem elégséges feltétele az idegsejtek elhalásának, mivel NFT-k jelenléte megfigyelhető, egészséges, kognitív zavarban nem szenvedő személyekben is⁵⁹. Az NFT-k szerkezetileg páros-helikális filamentumokból épülnek fel. A fő összetevőjük a hiperfoszforilált-tau. A kötegek egy része ubikvitinált és pozitív reakciót ad p62 IHC-val. Miután az NFT-k megjelentek a KIR-ben egy specifikus terjedési mintázatot követnek az AD progresszió során. Kutatások igazolták, hogy az NFT-k terjedése sokkal szorosabb összefüggést mutat az egyes anatómiai régiók közötti projekciókkal, mint az A β depozitumok esetén^{60,61}. Ezzel magyarázható a tau patológia hierarchikus terjedése, ami a *Braak* és *Braak* által felállított neuropatológiai klasszifikáció alapja⁶². A vizsgálathoz az alábbi négy régióból szükséges mintát venni: (1) hippocampus anterior régiója (aHPC), ami tartalmazza a szomszédos entorhinalis és

transentorhinalis cortexet, (2) posterior hippocampus a corpus geniculatum laterale szintjében és a szomszédos occipitotemporalis cortex, (3) gyrus temporalis medius és részben a gyrus temporalis superior, (4) primer látókéreg központban a fissura calcarinával. Formalin-fixált paraffinba ágyazott (FFPE) mintákon kell elvégezni a foszfo-tau IHC-t, majd meghatározni az NFT-k regionális kiterjedését, amire szakirodalmi adatok alapján az AT8 klón a legalkalmasabb⁶³. A Braak tau stádiumokat az NFT-patológiával érintett agyi régiók alapján az 5. ábra mutatja. A felsorolt neuropatológiai osztályozások mellett használják még az ún. „ABC score”-t⁶⁴, ami egyesíti a legelterjedtebb kritériumrendszereket: „A” az amiloidra (Thal és mtsai.)⁵⁸, „B” a Braak (tau) stádiumokra (Braak és mtsai.)⁶² a „C” pedig a neuritikus plakkokat értékelő „Consortium to Establish a Registry for Alzheimer’s Disease” (CERAD) beosztásra (Mirra és mtsai.)⁶⁵ vonatkozik.



5. ábra Braak tau stádiumok a neurofibrilláris kötegek (NFT-k) központi idegrendszeren belüli lokalizációja alapján. Korai stádiumban (I-II) a patológia a transentorhinalis és entorhinalis régiókra (fekete) korlátozódik. A progresszió során a limbicus rendszerre (III-IV stádium) (sötét szürke), végül a teljes isocortexre (V-VI stádium) (világos szürke) kiterjednek. (Forrás: Braak és mtsai., 2011.⁶⁶)

3.2.7 Klinikai tünetek

Az AD-re jellemző patológiás elváltozások akár évtizedekkel a klinikai tünetek előtt megjelenhetnek a KIR-ben. A fiziológias öregedéssel járó memóriazavar és az AD demencia között megkülönböztetünk egy állapotot az enyhe kognitív zavart (MCI). Az MCI általában 40-50 éves korban kezdődik, azaz kb. 2-3 évtizeddel megelőzi az AD-t. Elsősorban a rövidtávú memória érintett. A betegek feledékenyek lesznek, elhagynak dolgokat, nehezebben találják a szavakat, a tünetek gyakran nem is az érintettnek, hanem a hozzátartozóinak tűnnek fel először². Noha az MCI tekinthető egyfajta pre-klinikus stádiumnak, fontos hangsúlyozni, hogy nem minden MCI-ben szenvedő betegben alakul ki az AD-re jellemző klinikai kép⁶⁷.

Az AD két fő klinikai megjelenési formája az amnesztikus és nem-amnesztikus variáns. Az esetek többségében amnesztikus AD-ről van szó, ahol domináns a memóriazavar, a beteg szinte

képtelen új dolgokat megtanulni, vagy az újonnan elsajátított tudást felidézni, ezzel szemben a többi kognitív domén kevésbé érintett⁶⁸. A nem-amnesztikus típusban megkülönböztetünk corticobasalis-szindrómát (CBS), primer progresszív afáziát (PPA), posterior corticalis atrófiát (PCA) és frontális demenciát⁶⁹. CBS-ben a basalis ganglionok, frontális- és parietális lebenyek érintettek. Megfigyelhető apraxia, agnosia, akinesia, aszimmetrikus rigiditás, myoclonus és idegenkéz-szindróma, emellett kognitív zavar is előfordulhat⁷⁰. A PPA logopéniás formában jelentkezik, azaz a beteg lassabban beszél, nehezebben találja a szavakat, nem tudja megismételni a mondatokat, míg az egyszerű szavak visszamondása hibátlan. Ez utóbbit a beérkező verbális információk munkamemóriába történő tárolási zavarának tulajdonítják⁷¹. A PCA gyakran fiatalabb korban jelentkezik és a progresszív visuospatialis zavar mellett a többi kognitív domén (pl. memória) viszonylag megtartott. Attól függően, hogy a dorsalis occipitoparietális vagy a ventralis occipitotemporalis régió érintett előfordulhat simultanagnosia, acalculia, öltözködési apraxia, Gerstmann-szindróma, apperceptív vizuális agnosia, prosopagnosia, alexia⁷². A frontális demencia AD-ben nem különíthető el teljes biztonsággal a frontotemporalis lobaris degenerációban (FTLD) látható viselkedési tünetektől. Domináns az exekutív funkció, a figyelem, odafigyelés és viselkedészavar (pl. impulzivitás, dezinhibíció)⁶⁹. Az AD progresszió során az egyre több régiót érintő neuronpusztulás és funkciózavar következtében pszichés zavarok (depresszió, téveszmék, hallucináció), extrapyramidális tünetek (parkinsonismus, inkontinencia) is megjelennek. Végül a páciens teljesen ágyhoz kötötté válik és ebből kifejlődő másodlagos kórképben hal meg (pl. tüdőgyulladás)².

Megemlítettük, hogy az NFT patológia KIR-i kiterjedése (Braak tau stádiumok) szoros összefüggést mutat a kognitív tünetekkel, míg az A β esetén ez kevésbé szignifikáns⁷³. A legújabb eredmények kimutatták, hogy a szinaptikus proteinek szintjén detektálható változások előre jelezhetik a kognitív hanyatlás mértékét^{21,74,75}. Továbbá, AD-ben a CAA- és vaszkuláris patológia összefügg a pszichotikus tünetek súlyosságával⁷⁶.

3.2.8 *Diagnosztika*

A diagnosztika magában foglalja a neuropszichológiai tesztek, neurológiai-, belgyógyászati- és radiológiai vizsgálatok elvégzését. Az autoanamnézis mellett a hetero-anamnézis felvétele is fontos, hiszen sokszor csak a páciens környezetében élő személyek vesznek észre olyan tüneteket, amik magának a betegnek fel sem tűnnek, vagy nem tulajdonít nekik nagyobb jelentőséget. Kognitív tesztek közül a legelterjedtebb a mini-mentál teszt (MMSE), ugyanakkor az ADAS-Cog (Alzheimer's disease Assessement Scale- Cognitive Subscale), Hachinski-skála,

órarájzoló teszt és a lebenyfunkciókat specifikusan vizsgáló tesztek is hasznosak lehetnek. A neurológiai és belgyógyászati kivizsgálás a másodlagos demenciák, mint térfoglaló folyamatok, metabolikus zavarok, infekciók kizárását szolgálják². A klinikai tüneteken alapuló széleskörben elterjedt „National Institute on Aging and Alzheimer’s Association” (NIA-AA) kritériumrendszert az 1. táblázat mutatja be.

Képalkotó vizsgálatok közül az MRI-nek van kitüntetett szerepe. A hippocampus, entorhinalis cortex és a környező szürkeállomány aránytalan atrofíát mutat, ezzel együtt megfigyelhető az oldalkamrák alsó szarvának kompenzatorikus tágulata. Az atrofia kiterjedése és progressziója a Braak tau stádiumoknak megfelelő. A hippocampus térfogatában bekövetkező változások már a kognitív tünetek megjelenése előtt detektálhatók. Noha funkcionális MRI-t ritkán használnak a klinikai diagnosztikában, a véráramlás alapján mért aktivitáscsökkenés mintázata további értékes információkkal szolgálhat⁷⁷. „Positron emission tomography” (PET)-el lehetőség nyílik in vivo detektálni a KIR-ben lerakódott A β fibrillumokat. Több nyomjelző anyag is létezik (pl. ¹⁸F-flutematomol, ¹⁸F-florbetapir, stb.), melyek használhatóságát az adott anyag felezési ideje mellett, ára, hozzáférhetősége és a PET-centrum izotóp előállításának kapacitása is limitálja⁷⁸. Abban az esetben, ha egyáltalán nem, vagy csak minimális A β -t mutat a „scan”, a kognitív zavart valószínűleg nem AD okozza. Mindazonáltal a közepes-, illetve magas amiloid terheltség sem egyértelmű bizonyíték AD-re, hiszen más típusú demenciákban, sőt mentálisan egészséges személyekben is előfordulhat⁷⁹. A ¹⁸Fluorodeoxiglükóz (FDG)-PET a glükóz metabolizmus révén nyújt információt a szinaptikus aktivitás és regionális diszfunkció mértékéről még a klinikai tünetek megjelenése előtt. A hipometabolizmus a precuneus, a gyrus cinguli posterior része és a parieto-temporalis területeken kezdődik, majd a progresszió során az egész agyra kiterjed¹¹.

Rohamosan nő a liquor biomarkerekkel foglalkozó tanulmányok száma, melyek vizsgálata egyre inkább szerves részét képezi a diagnosztikus folyamatnak. A patofiziológiai változások alapján két csoportba oszthatjuk a biomarkereket. Az egyik részük a KIR-i lerakódás következtében alacsonyabb mennyiségben található a liquorban (pl. A β), míg a másik csoport az idegsejt pusztulás következtében magasabb liquor szintet mutat (pl. tau). Figyelembe véve, hogy A β ₄₂ csökkenés és totál-tau növekedés előfordulhat más típusú demenciákban is, ezek nem elég specifikusak AD-re. Ennél megbízhatóbb a hiperfoszforilált-tau, a magasabb liquor szint fontos segítség az AD és más demenciát okozó kórképek elkülönítésében⁷⁹. A felsorolt biomarkerek kombinált mérése a megfelelő klinikai képpel párosulva magas szenzitivitású és

specificitású módszer az AD diagnosztikában. Ugyanakkor definitív diagnózis a mai napig csak a neuropatológiai vizsgálattal állítható fel.

Valószínű AD demencia

1. *Teljesül a demencia kritériuma*
2. *Lassú, fokozatos betegségkezdés (hónapok, évek)*
3. *Egyértelmű (dokumentált) romlás a kognitív képességekben*
4. *A kezdeti domináns tünetek az alábbi csoportok egyikébe tartoznak:*
 - a) *Amnesztikus*
 - b) *Nem-amnesztikus*
 - *Beszédzavar*
 - *Vizuospatialis diszfunkció*
 - *Exekutív funkciózavar*
5. *Egyéb kognitív károsodást okozó kórképek (pl. vaszkuláris demencia, DLB, FTLD) teljes biztonsággal kizárhatók*

Lehetséges AD demencia

1. *Teljesül a demencia kritériuma*
2. *Atípusos kezdet (hirtelen kognitív romlás, bizonytalan kórtörténet)*
3. *Kevert etiológia:*
 - a) *Cerebrovaszkuláris társbetegség (pl. stroke az anamnézisben)*
 - b) *DLB-re jellegzetes tünetek megléte*
 - c) *Társbetegség vagy gyógyszeres kezelés, ami közvetlen hatással van a kognitív képességekre*

Valószínű AD demencia patofiziológiai bizonyítékkal

1. *Teljesül a valószínű AD demencia klinikai kritériuma*
2. *Kimutatható AD specifikus biomarkerek:*
 - a) *Alacsony liquor A β 42 szint és amiloid pozitivitás PET-el*
 - b) *Emelkedett liquor tau szint (totál-tau és foszfo-tau)*
 - c) *Csökkent temporo-parietalis FDG felvétel PET-en*
 - d) *A temporalis és medialis parietalis lebeny aránytalan atrófiája strukturális MRI-vel*

1. táblázat A „National Institute on Aging and Alzheimer’s Association” (NIA-AA) klinikai tüneteken alapuló diagnosztikus kritériumrendszere Alzheimer-kórban (AD)⁶⁸. (Lewy-testes demencia – DLB, Frontotemporalis lobaris degeneráció – FTLD, Amiloid-béta – A β , Positron emission tomography– PET, ¹⁸Fluorodeoxiglükóz – FDG, Mágneses rezonancia képalkotás – MRI).

3.2.9 Terápia

Az AD jelen tudásunk szerint gyógyíthatatlan kórkép, így a terápia a beteg tüneteinek enyhítésére és életminőségének javítására irányul. Megkülönböztethetünk gyógyszeres és nem-gyógyszeres kezelési módokat⁸⁰. Utóbbihoz tartozik az étrend megváltoztatása, az antioxidáns bevitel növelése, mozgásterápia a koordináció javítás érdekében, a lehetőségekhez mérten szellemi aktivitás fokozása, pszichoterápia (pl. kognitív-viselkedésterápia). Ki kell hangsúlyozni a beteg és hozzátartozóinak edukációját, felkészítését a kórképpel együtt járó változásokra, hiszen az AD nem csupán az érintett személyre, hanem a vele együtt élő emberekre is hatással van.

A gyógyszeres kezelés lehetőségei kifejezetten korlátozottak, így egyre nagyobb nyomás nehezedik a kutatókra, hogy a patomechanizmus részletes feltérképezésével effektív terápiás opciókat nyújtsanak a klinikusoknak. A korábban említett kolinerg-hipotézis szolgált alapul a jelenleg használt acetilkolin-észteráz gátlók és NMDA-receptor blokkolók kifejlesztéséhez. Előbbi csoportba a rivastigmin, donepezil, tacrin, galantamin tartoznak, melyek a kolinerg neuronok pusztulása miatt kialakult acetilkolin transzmisszió zavarát hivatottak ellensúlyozni. Elsősorban közepesen súlyos demenciában alkalmazzák, azonban a kezdeti pozitív hatás 1-2 év után csökken, a progresszió folytatódik². Az NMDA-receptor blokkolók, elsősorban a nem-kompetitív antagonisták memantin az AD-ben megfigyelhető glutamaterg excitotoxicitást védi ki, de nem károsítja pl. a tanulási folyamatokhoz szükséges fiziológiás glutamát transzmissziót. Enyhe és súlyos fokú demenciában egyaránt adható, azonban a pozitív hatás időtartama itt is limitált². A kezelést a beteg tüneteinek függvényében ki kell egészítenünk további gyógyszerekkel (pl. antipszichotikumok, antidepresszánsok, stb.).

Jól látható, hogy az AD kezelése egy komplex feladat, melyben az egészségügyi és szociális ellátórendszer mellett a családtagok is komoly szerepet vállalnak. 2010-es adatok alapján hazánkban egy demens beteg kezelési költsége évi 1 997 457 Ft otthoni és 1 884 417 Ft idősok otthonában történő gondozás esetén. A demencia becsült prevalenciája alapján ez összesen több mint 262 milliárd forintnyi költséget jelentett az adott évben⁸¹.

3.3 Lewy-testes demencia

3.3.1. Történeti áttekintés

A Lewy-testes demencia története szorosan összefügg az AD-vel, mivel Friedrich Heinrich Lewy 1912-ben az Alois Alzheimer által vezetett müncheni pszichiátriai klinika neuropatológiai laboratóriumában a Parkinson-kór tanulmányozása közben írta le először az

eozinofil intraneuronális inklúziókat⁸². A Lewy-test (LB) megnevezés 1919-ből Konstantin Tretyakov orosz neuropatológustól ered⁸³. Okazaki és mtsai. 1961-ben hozták összefüggésbe a corticalis LB-k jelenlétét egy parkinsonismussal társuló atípusos demenciával⁸⁴. Később, John Woodward 27 neuropszichiátriai tünetekkel és kognitív zavarral küzdő beteg autopsziás mintájában igazolta az LB-ket, ugyanakkor csak egy részüknek volt parkinsonismusa⁸⁵. Kosaka és mtsai. javaslatára 1984-től tekintjük a Lewy-testes betegséget (LBD) különálló entitásként⁸⁶. A nevezéktan alapján az LBD csoportba 3 kórkép tartozik, a Parkinson-kór (PD), a Parkinson-kórhoz társuló demencia (PDD) és a Lewy-testes demencia (DLB). 1990-ben fedezték fel, hogy az LB-k fő komponense a patológiásan aggregálódott α -synuclein (α Syn) fehérje⁸³. 1995-ben született meg az első (és azóta többször átdolgozott) nemzetközi együttműködésen alapuló diagnosztikus DLB kritériumrendszer, amit a vezető kutató után gyakran McKeith kritériumként említenek⁸⁷.

3.3.2 Epidemiológia

A DLB az AD után a második leggyakoribb neurodegeneratív demencia, ami demens betegek közel 25-30%-át érinti⁸⁸. A DLB prevalenciája a 65 évesnél idősebb emberek között kb. 5%⁸⁹. Ez az adat az életkor előrehaladtával nő, gyakrabban fordul elő férfiakban, mint nőkben, nemek szerinti megoszlása 4:1⁹⁰. A LB neuropatológiai előfordulását figyelembe véve, azok gyakrabban fordulnak elő az afroamerikai és kaukázusi populációban⁹¹. A DLB megjelenésének kockázata nagyobb, ha a betegnek korábban depressziója, szorongásos zavara, stroke-ja volt, illetve APOE gén polimorfizmus vagy PD előfordult a családi anamnézisben⁹².

3.3.3 Genetikai háttér

A DLB esetek döntő többsége sporadikus, a familiáris öröklődés kifejezetten ritkának számít. A vizsgált családokban PD és DLB fenotípus egyaránt előfordul. A betegség akár már tizenéves korban elkezdődhet, hátterében az α -Syn gén (SNCA) szekvenciában és génkópia számban bekövetkező eltéréseket találtak⁹³. Egy tanulmány a 2-es kromoszóma hosszú karján a 35-36-os lókuszt azonosította a családi öröklődés egyik lehetséges genetikai okaként, azonban konkrét gént nem sikerült leírniuk⁹⁴. A sporadikus esetekben 3 gént írtak le, melyek genetikai variánsai egyértelmű rizikófaktornak számítanak DLB-ben, ezek a SNCA, az APOE és a glükocerebrozidáz (GBA)⁹⁴.

3.3.4 Patofiziológia

A DLB-ben karakterisztikus LB-k és Lewy-neuritek (LN) fő komponense a kórosan aggregálódott α -Syn filamentumok. A synuclein proteincsaládba az α -, β - és γ - synuclein

tartozik⁹⁵. Pontos sejtbioológiai funkciójuk nem ismert, azonban lokalizációjuk alapján a szinaptikus transzmisszióban lehet meghatározó szerepük. Noha a β - és γ -synuclein is megjelenhet neurodegeneratív betegségekből⁹⁶ a leggyakrabban α -Syn akkumuláció fordul elő. Ezt a betegcsoportot összefoglalóan α -synucleinopátiáknak nevezzük, ide tartozik az LBD és a multiszipitómás atrófia (MSA). Utóbbi esetén az α -Syn nem LB-k, hanem a magyar származású patológusokról elnevezett Papp-Lantos testek formájában detektálhatók⁹⁷. Az α -Syn aggregáció oka nem tisztázott, bizonyos patológiás állapotok (pl. oxidatív stressz) fokozzák az oligomerizációt és fibrillum képződést⁹⁸, másfelől a sejtek clearance mechanizmusai, mint selejtféherje válasz („unfolded protein response”)⁹⁹, autofágia¹⁰⁰, aggreozóma¹⁰¹ rendszer is zavart szenvednek. Feltételezhető, hogy az α -Syn patológia prion-szerű terjedést mutat a KIR-ben, azaz „megfertőzik” az egészséges sejteket. Ezt támasztja alá, hogy korábban transzplantált embrionális substantia nigra sejtekben is idővel megjelennek az LB-k¹⁰², valamint, hogy „vad fenotípusú” egerekben a kóros konformációjú α -Syn fehérje LBD-t indukált¹⁰³.

A dopaminerg neuronok fiziológiás működésében jelentős szerepe van α -Syn-nek, így ezek a sejtek különösen érzékenyek az LB patológiára¹⁰⁴. A fehérje szabályozza a dopamin szintézis egyik kulcsenzimének a tirozin-hidroxiláznak a működését¹⁰⁵, továbbá hatással van a dopamin transzporterre (DAT) is, csökkenti a neurotranszmitter visszavételét¹⁰⁶. AD-ben tapasztalható képest, súlyosabb fokú kiterjedt kolinerg sejtpusztulás és a kolin-acetiltranszferáz csökkenés detektálható DLB-ben¹⁰⁷. A károsodás mértéke összhangban van a kognitív deficittel és magyarázhatja a kolin-észteráz gátlókra adott kedvező terápiás választ¹⁰⁸. Továbbá, egy közelmúltban megjelent tanulmány kimutatta, hogy a kognitív hanyatlás gyorsabban progrediál DLB-ben mint AD-ben¹⁰⁹.

Jelentős változások mutathatók ki a szinaptikus jelátvitelben. A SNARE-komplex elemeinek, mint synaptophysin, synapsin, synaptotagmin, SNAP25, VAMP2 szintje jelentősen csökken¹¹⁰, ezáltal, a pre-szinaptikus neurotranszmitter felszabadulás hiányában, a poszt-szinaptikus sejtek elvesztik bemeneteiket, ami komoly funkciózavarhoz vezet. A szinaptikus vezikulák recirkulációjában szerepet játszó proteinekben (Dynamin 1, PSD95, Rab3A) is jelentős redukció mérhető, ami korrelál a kognitív deficittel^{111–113}.

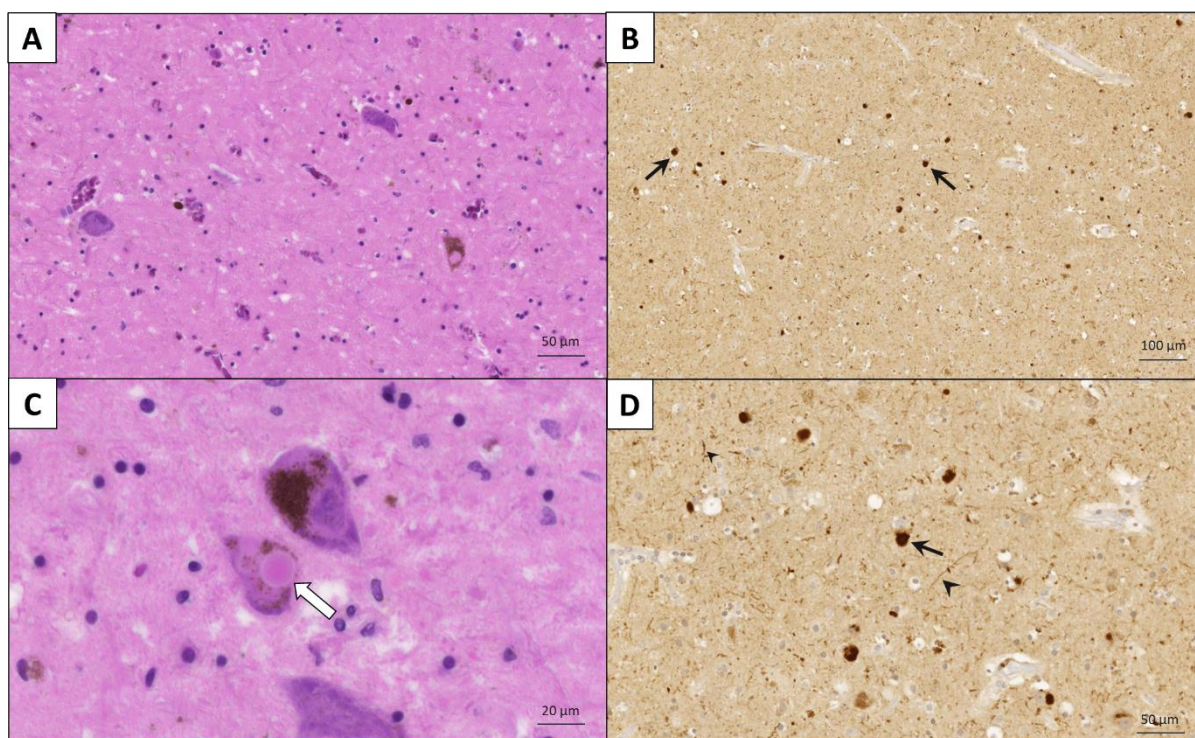
3.3.5 Makroszkópos patológia

A DLB makroszkópos patológiai megjelenése hasonló a PD-ben láthatóhoz⁸⁰. Az agy össztömege a normál tartományon belül mozog, enyhe corticalis atrófia a frontális lebeny területén előfordulhat. A neuromelanin vesztés miatt a substantia nigra és a locus coeruleus

kifejezetten sápadt színű. Ha a DLB-hez jelentős mértékű AD patológia társul, súlyos fokú hippocampus, amygdala és temporo-occipitalis atrófia is megfigyelhető¹¹⁴. Ugyanakkor, tiszta („pure”) DLB-ben az agyi atrófia mértéke kevésbé prominens, mint AD-ben.

3.3.6 Mikroszkópos patológia

Az LB-k mikroszkópos megjelenésében eltérések mutatkoznak attól függően, hogy melyik KIR-i régióra lokalizálódnak⁸⁰. A „klasszikus” agytörzsi LB-k HE festéssel, egy központi kerek, vagy ovális eozinofil magból és az azt körülvevő világos halo-ból álló intracelluláris zárványok (6. ábra, A és C panel). Ezzel szemben a corticalis LB-k szabálytalan alakúak, az irreguláris mag körül gyakran hiányzik a halo. A központi mag fő komponense a kórosan aggregálódott α -Syn fibrillumok, melyek az axonokban is lerakódnak LN formában. A patológiás elváltozások kitűnően vizualizálhatók α -Syn IHC-vel (6. ábra, B és D panel). Komoly diagnosztikus kihívást jelenthet a neuropatológus számára a DLB-ben gyakran megfigyelhető AD patológia, azaz A β plakkok és NFT-k, míg a tiszta DLB viszonylag ritka. Általános elvként azt lehet mondani, hogy kifejezett LB terheltség esetén a kórkép inkább DLB, míg jelentős mértékű AD társpatológia detektálásakor megfontolandó a kevert AD és DLB diagnózis (2. táblázat)⁹⁸. A két betegségre jellegzetes patológiás elváltozások között szinergizmus áll fenn, ami fenotípusosan súlyosabb kognitív deficittel párosul¹¹⁵. Mindazonáltal, az LB valószínűleg szükséges, de nem elégséges feltétele a DLB kialakulásának, mivel mentálisan egészséges személyek agyából is kimutatható. Ezt az állapotot incidentális DLB-nek hívják és a betegség pre-klinikai stádiumának tartják¹¹⁶. Feltételezhető, hogy a szimptomás demencia kialakulása multifaktoriális hátterű.



6. ábra Lewy-testek (LB-k) és Lewy-neuritek (LN-k) hematoxilin-eozin (HE) festéssel (A és C) és α -synuclein (α Syn) immunhisztokémiával (IHC) (B és D). A HE képen közepes nagyítással (A) egyértelmű a súlyos fokú idegsejt pusztulás és neuromelanin veszteség; nagy nagyítással (C) egy „klasszikus” LB látható (fehér nyíl). α Syn IHC-val kis nagyítással (B) is jól detektálható az LB-k központi magját alkotó α Syn zárványok (fekete nyilak); közepes nagyítással (D) az LB-k mellett (fekete nyíl) LN-k is (fekete nyílhegy) is megfigyelhetők. (Immunhisztokémiai reakció α -Syn ellenes primer antitesttel, barna 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kromogénnel)⁸⁰.

ALZHEIMER PATOLÓGIA NIA-AA/BRAAK STÁDIUMOK

LB PATOLÓGIA	<i>Nincs, Alacsony/ Braak 0-II</i>	<i>Közepes/ Braak III-IV.</i>	<i>Magas/ Braak V-VI.</i>
<i>Agytörzs-predomináns</i>	Magas	Magas	Közepes
<i>Limbicus (transitionalis)</i>	Magas	Közepes	Alacsony
<i>Diffúz neocorticalis</i>	Alacsony	Alacsony	Alacsony
<i>Amygdala-predomináns</i>	Alacsony	Alacsony	Alacsony
<i>Bulbus olfactorius-ra lokalizált</i>	Alacsony	Alacsony	Alacsony

2. táblázat A Lewy-teszt demencia (DLB) klinikai szindróma valószínűsége a kórszövettani kép alapján⁹⁸. (LB: Lewy-test; AD: Alzheimer-kór NIA-AA: National Institute on Aging and Alzheimer's Association).

Az első neuropatológiai osztályozás Kosaka és mtsai. (1984) nevéhez fűződik akik az LB-k KIR-i lokalizációja alapján 3 csoportot állítottak fel: (1) agytörzs-predomináns, (2) limbicus (transitionalis), (3) diffúz neocorticalis⁸⁶. Az LB-k terjedése valószínűleg hierarchikus mintázatot követ, ezen alapul a Braak (PD) stádiumrendszer⁸⁰. Az eredeti tanulmány megjelenése óta kiderült, hogy az LB-k nem a Braak által feltételezett nucleus dorsalis nervi vagi és nucleus olfactorius anterior területéről indulnak ki, hanem már korábban kimutathatók az enterális idegrendszerben, amit az LBD prodromális szakaszának vélnek¹¹⁷. A McKeith kritériumrendszer szerint az α Syn IHC szemi-quantitatív értékelését az alábbi 10 régióban kell elvégezni: IX-X. agyideg magvak, locus coeruleus, substantia nigra, nucleus basalis Meynert, amygdala, gyri transentorhinalis et cinguli, gyrus temporalis medius, gyrus frontalis medius és lobulus parietalis inferior. Az eredményeket az aktuális (2017-es) osztályozás öt csoportba sorolja.

A Kosaka által eredetileg javasolt három kategória mellett, megkülönböztetünk amygdala-predomináns és bulbus olfactoriusra lokalizált típusokat (2. táblázat)⁹⁸. Fontos megjegyezni, hogy ezek neuropatológiai diagnózisok, míg a DLB klinikai diagnózis, így szövettani mintára való alkalmazása helytelen.

3.3.7 Klinikai tünetek

A DLB-ben corticalis és subcorticalis demencia jellegzetességei egyaránt előfordulnak. A heterogén tünetek miatt nehéz meghatározni a DLB kezdeti jeleit. Mindazonáltal, az LBD csoportban specifikusnak mondható a „rapid eye movement” (REM) alvászavar és autonóm diszfunkciók (pl. ortosztatis hipotenzio)⁸⁰. Diagnosztikus értelemben különbséget teszünk DLB és PDD között. A kutatások eddig nem tártak fel kardinális eltéréseket a két betegség patofiziológiájában¹¹⁸, így a különbségtétel kizárólag a demencia megjelenésének időpontján alapul. Abban az esetben, ha a mozgásszervi tünetek (pl. parkinsonsimus) több mint egy évvel megelőzik a demenciát a diagnózis PDD; ha kognitív zavarral indul a kórkép, vagy a mozgásszervi tüneteket egy éven belül követi, a diagnózis DLB⁹⁸.

DLB-ben domináns a kognitív fluktuáció, a figyelem-, térbeli orientáció- és exekutív funkciók zavara, míg a memória relatíve megőrzött az AD-hez képest⁸⁰. A kognitív képességek perceken, akár napokon keresztül fluktuálnak. A betegek visszatérő és igen részletes vizuális hallucinációkról számolnak be¹¹⁹. Az LBD csoportban karakterisztikus a REM alvászavar, élénk, ijesztő rémálmokkal, gyakran motoros tünetekkel kísérve. A páciens ilyenkor akár sérülést is okozhat a környezetében lévőknek. A substantia nigra érintettsége magyarázza a

spontán parkinsonismust. Az AD-hez képest gyakoribb a vegetatív idegrendszer diszfunkciója, mint ortosztatis hipotenzió, inkontinencia, sinus caroticus hiperaesthesia¹²⁰. DLB-ben tilos a típusos neuroleptikumok alkalmazása, mivel jelentősen növelik a neuroleptikus malignus szindróma kockázatát és az extrapyramidális tüneteket is negatívan befolyásolják⁸⁰. Emocionális zavarok közül gyakran fordul elő depresszió, ami a legújabb kutatások szerint összefügghet a cink metabolizmus zavarával⁷⁵.

3.3.8 *Diagnosztika*

A diagnózis felállításához, az AD-nál leírtaknak megfelelően teljes körű kivizsgálás szükséges. A neuropszichiátriai tünetek mintázata karakterisztikus lehet az egyes demencia típusokra, így ezen tesztek elvégzése rendkívül értékes információval szolgálhat (pl. élénk, vizuális hallucinációk esetén valószínűsíthető a DLB)⁸⁰. Mindazonáltal a betegség klinikai diagnózisában jelentős pontatlanságok vannak. Egy korábbi felmérés szerint a betegek legalább négy orvost keresnek fel panaszaiikkal, ennek ellenére közel egyharmaduknál még két év után sincs helyes diagnózis¹²¹. Az orvosok elsősorban PD-nek, AD-nek vagy más pszichiátriai kórképnek tulajdonítják a tüneteket¹²².

Strukturális MRI-vel a globális agyi atrófia, temporalis lebeny és hippocampus sorvadása enyhébb fokú, mint AD-ben¹²³. A kolinerg-rendszer súlyos károsodásával összhangban a nucleus basalis Meynert jelentős destrukciót mutat¹²⁴. Egy tanulmány a PDD-hez viszonyítva jelentősebb temporo-parieto-occipitalis atrófiát írt le DLB-ben¹²⁵. A dopamin rendszer funkcionális integritása megítélhető „single photon emission computed tomography” (SPECT)-el. A striatumban kifejezetten dopamin transzporter (DAT) redukció látható, ami összhangban van az extrapyramidális tünetekkel¹²⁶. Meta-jodo-benzil-guanidin (MIBG) szcintigráfiával csökkent jelet kapunk a myocardiumban, ami tükrözi a szív szimpatikus denervációját¹²⁷. FDG-PET-el a látókéregben nagyfokú hipometabolizmus detektálható, ami magyarázhatja a gyakran társuló vizuospatialis zavar és vizuális hallucinációk jelenlétét¹²⁸. Továbbá, DLB-ben szignifikáns kolin-acetiltranszferáz aktivitáscsökkenés látható a medialis occipitalis cortex területén AD-hez képest¹²⁹. EEG-vel a posterior régióban mérhető lassúhullám tevékenység, periodikus fluktuációkkal⁹⁸. Ezek alapján azt mondhatjuk, hogy a funkcionális képalkotó vizsgálatok komoly segítséget jelenthetnek a DLB differenciáldiagnosztikájában, ugyanakkor ezen modalitások széles körű klinikai alkalmazása még várat magára.

DLB-specifikus liquor, vér vagy szöveti biomarkerek azonosítása különösen nehéz, hiszen a tiszta DLB patológia viszonylag ritka a kevert AD-DLB-hez képest, így nem meglepő hogy az

A β_{42} liquor szintje DLB-ben is csökkent¹³⁰. Magasabb liquor tau mérhető DLB-ben, mint PD-ben vagy PDD-ben¹³¹. Az α Syn-t vizsgáló tanulmányok nem egységesek, egy részük csökkent értéket mért a liquorban¹³², míg mások emelkedést¹³³. Ennek oka feltételezhetően az, hogy az α Syn négy izoformában expresszálódik, így olyan antitestek használata indokolt amelyek specifikusan mutatják a totál synuclein mennyiséget¹³⁴. A legújabb kutatások középpontjába az α Syn oligomerek kerültek. Az liquor α Syn oligomer/totál α Syn hányados képes biztonsággal differenciálni a DLB-t az AD-től. Mindezek ellenére DLB-re egyértelműen specifikus biomarkerek nem állnak rendelkezésre⁸⁰. Definitív diagnózis DLB-ben is csak részletes neuropatológiai vizsgálattal állítható fel¹³⁵.

A klinikai tüneteken, radiológia elváltozásokon és potenciális biomarkereken alapuló aktuális McKeith kritériumrendszert a 7. ábra mutatja be.

Esszenciális tünetek	Diagnózist támogató tünetek	Indikatív biomarkerek
<ul style="list-style-type: none"> • Demencia • Memóriazavar • Figyelem, exekutív funkciók, térbeli orientáció 	<ul style="list-style-type: none"> • Neuroleptikus hiperszenzitivitás • Posturalis instabilitás • Ismétlődő esések, syncope • Autonóm diszfunkciók • Hiperszomnia, hipozmia • Nem vizuális hallucinációk • Rendszerezett téveszmék • Apátia, depresszió 	<ul style="list-style-type: none"> • \downarrowDAT felvétel basalis ganglionok • \downarrowMIBG scyntigraphia myocardium • PSG-vel megerősített RBD
„Core” tünetek		Diagnózist támogató biomarkerek
<ul style="list-style-type: none"> • Kognitív fluktuáció • Vizuális hallucinációk • Spontán parkinsonizmus • REM alvászavar 		<ul style="list-style-type: none"> • Med. temp. lebeny megőrzöttsége • Gen. perfúzió/metab. \downarrow SPECT/PET és \downarrow occipitalis aktivitás • Post. lassúhullám tevékenység EEG-n periodikus fluktuációval
<p>Valószínű DLB:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 vagy több „core” tünet \pm indikatív biomarker <i>vagy</i> • 1 „core” tünet + 1 vagy több indikatív biomarker <p>Lehetséges DLB:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 „core” tünet indikatív biomarker nélkül <i>vagy</i> • 1 vagy több indikatív biomarker „core” klinikai tünet nélkül 		

7. ábra A Lewy-teszt demencia (DLB) diagnosztikus kritériumrendszere⁹⁸. Az esszenciális tünetek hiányában nem állítható fel DLB diagnózis. (REM: „rapid eye movement”; DAT: dopamin transzporter; MIBG: meta-jodo-benzil-guanidin; PSG: polysomnográfia; RBD: REM alvászavar; SPECT: „single photon emission computed tomography”; PET: „positron emission tomography”; EEG: elektroencefalográfia; med. temp: medialis temporalis; gen.: generalizált; metab.: metabolikus; post.: posterior; \downarrow : csökkenés; \pm : megléte vagy hiánya).

3.3.9 Terápia

A DLB az AD-hez hasonlóan gyógyíthatatlan betegség. A terápia alapjaiban megegyezik az AD-nél leírtakkal, ugyanakkor van néhány DLB-specifikus különbség. A kolinerg rendszer kiterjedt zavara miatt a betegek kedvezőbben reagálnak az acetilkolin-észteráz gátlókra¹⁰⁸. A memantin jól tolerálható, de kevésbé effektív a neuropszichiátriai-, kognitív- és motoros

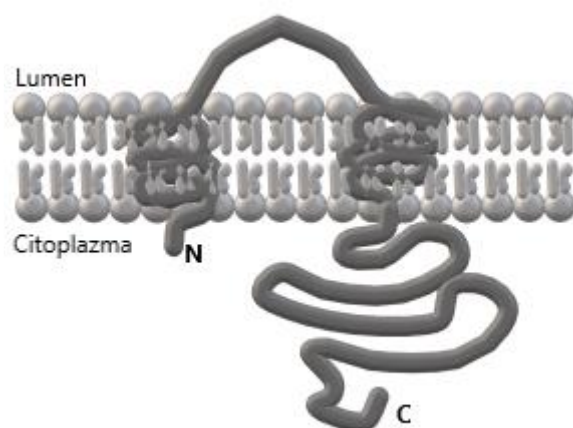
tünetek tekintetében¹³⁶. Parkinsonismus esetén dopaminerg gyógyszerek rendelhetők, amik fokozhatják a pszichotikus tüneteket, így a megfelelő dozírozás kiemelt jelentőségű¹³⁷. A neuroleptikus hiperszenzitivitás miatt a típusos szerek adása kerülendő DLB-ben, ugyanakkor ez a mellékhatás ritkább PD-ben és PDD-ben¹³⁸. REM alvászavar kapcsán fontos a beteg védelme a szoba megfelelő berendezésével, gyógyszeres kezelésre a clonazepam és melatonin javasolható¹³⁹.

3.4 Lemur tirozin-kináz 2

3.4.1 Az LMTK2 jellemzése és élettani szerepe

A fehérjét a 2000-es évek elején írta le párhuzamosan, de egymástól függetlenül három kutatócsoport élesztő két-hibrid rendszerekben és adatbázis kutatás által¹⁴⁰⁻¹⁴². Az LMTK2 gén a 7-es kromoszóma rövid karján a 21.3-as lókuszon helyezkedik el és egy 250 kDa molekulatömegű fehérjét kódol¹⁴³. A strukturálisan egyedi membrán-asszociált lemur tirozin-kináz proteincsaládnak 4 tagja van: LMTK1A, LMTK1B, LMTK2 és LMTK3. A párhuzamos felfedezések következtében az LMTK2 több megnevezése ismert, mint kináz-foszfataz-inhibitor-2 (KPI2), apoptózis-asszociált tirozin-kináz 2 (AATYK2), CDK5/p35-regulált kináz (CPRK), „brain-enriched kinase” (BREK) és KIAA1079^{140-142,144,145}. A leggyakrabban használt lemur tirozin-kináz 2 elnevezést a protein hosszú karboxi-terminális „farki” régiója és a Madagaszkáron őshonos gyűrűsfarkú maki (vagy lemur) hosszú farka közti hasonlóság inspirálta¹⁴³. Noha a kináz domén szerkezete alapján tirozin- és szerin-treonin- kettős specificitású kináznak tűnhet, kutatások bizonyították, hogy valójában egy szerin-treonin-kinázzal van szó, így a lemur tirozin-kináz megnevezés helytelen^{141,142,146}.

Az LMTK2 aktivitását in vitro kináz esszével és peptid „microarray” -el vizsgálták. A kísérleti elrendezésben rekombináns nagy tisztaságú LMTK2 fehérjét használtak (azaz más típusú kináz nem vett részt a reakcióban), ami a detektált autofoszforyláció és cél-fehérje foszforyláció alapján valószínűleg egy konstitutívan aktív kináz^{141,146}. A fehérje az amino-terminális tandem transzmembrán doménjével „horgonyoz” a membránhoz, úgy, hogy az amino- és karboxi-terminális vége egyaránt a citoplazmába lokalizálódik (8. ábra)¹⁴⁷. A transzmembrán domént az amino-terminális kináz domén majd a hosszú karboxi-terminális „fark” követi.



8. ábra A lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) sematikus ábrázolása¹⁴⁸. A fehérje két transzmembrán régióval „horgonyoz” a plazmamembránhoz. Az amino-terminális (N) és karboxi-terminális (C) régiók egyaránt a citoplazmába lokalizálódnak.

Az LMTK2 elsősorban, de nem kizárólag az agyban expresszálódik, nagy mennyiségben kimutatható a hippocampusban és a neocortexben. Az idegsejteken belül megtalálható a somában, axonokban és a növekedési kúpokban^{140,142,144,145}. Subcellulárisan elsősorban a Golgi-apparátusban és a korai endoszómákban koncentrálnak^{140,149,150}.

Az LMTK2 feltételezhetően szerepet játszik a post-natalis neuronfejlődésben, mivel nagy mennyiségben kezd expresszálódni a születést követő 2-3. héten. Kísérletes körülmények között PC12 sejtvonalban neuronális növekedési faktor (NGF) hatására az LMTK2 gyors protein-kináz C (PKC)-függő foszforiláción megy keresztül, ugyanakkor direkt PKC-LMTK2 kölcsönhatást nem sikerült kimutatni¹⁴². Az NGF jelátvitel csökkenti az LMTK2 aktivitását, ezzel hozzájárul a neuritek növekedéséhez, tehát az LMTK2 feltehetőleg negatív regulátora a neuronális differenciációnak¹⁴².

Az LMTK2 a karboxi-terminális „farki” részen hét prolin-(aminosav)-(aminosav)-prolin (PxxP) motívumot tartalmaz¹⁴². A PxxP motívum gyakran direkt interakcióba lép az Src homológ 3 (SH3) doménnel^{151,152}. Számos kinázon van SH3 domén, vagy SH3 domént tartalmazó állványfehérjével lép kapcsolatba a célfehérjéjével^{153,154}. Ez alapján elképzelhető, hogy az LMTK2 szabályozásában SH3 doménnel rendelkező kinázok is részt vesznek, azonban eddig nem sikerült ilyen interakciós partnert azonosítani.

A fehérje élettani szerepét vizsgáló állatmodellek száma erősen limitált. LMTK2 „knockout” egerek életképesnek bizonyultak, ugyanakkor a hímeknél azozoospermiát és ebből adódóan

infertilitást detektáltak¹⁵⁵. Az eltérést a csírasejtek kiérési defektusára vezették vissza, ami alapján az LMTK2 kitüntetett szerepet tölt be a fiziológias spermatogenezisben.

3.4.2 Az LMTK2 interakciós partnerei

A teljes LMTK2 interakció jelenleg nem ismert, azonban számos fehérje-fehérje kölcsönhatást és jelátviteli útvonalat leírtak, ami alapján feltételezhető, hogy az LMTK2 fontos szerepet tölt be több esszenciális celluláris mechanizmusban.

3.4.2.1 CDK5/p35

A CDK-k szerin-treonin specifikus protein-kinázok, melyek részt vesznek a sejtciklus és transzkripció szabályozásában, a neuronális morfogenezisben és differenciációban¹⁵⁶. Az CDK5 az aktivátor alegység p35-ön keresztül köt az LMTK2-höz^{140,157}. Az LMTK2-n a kináz domén közelében elhelyezkedő aminosav (391-632) szekvenciával jön létre a kapcsolat, azonban az, hogy a p35 mely régiója vesz ebben részt, valamint magát az interakciót szabályozó mechanizmusok nem ismertek¹⁴⁰. A CDK5 a CDK fehérje család egyedi tagja, abban az értelemben, hogy nem igényel aktiváló foszforilációt, helyette a p35 vagy p39 aktivátor fehérjék kötésére van szükség¹⁵⁶. Az enzim esszenciális az idegsejtek éréséhez, migrációjához, szinaptikus plaszticitáshoz és a szinaptikus vezikulák exocitózisához¹⁵⁸. A CDK5/p35 komplex a szerin-1418 helyen foszforilálja az LMTK2-t, ezáltal fokozza az enzim kináz aktivitását és stimulálja a „downstream” fehérjék (pl. a protein-foszfataz 1 katalitikus alegysége – PP1C) foszforilálását¹⁵⁷. A CDK5 funkcionálisan inaktív az extraneurális szövetekben, mert a p35 csak az idegsejtekben expresszálódik^{157,159}. Mindazonáltal szerin-1418 pozícióban foszforilált LMTK2 kis mennyiségben extraneurálisan is kimutatható, így valószínűsíthető hogy a fehérje regulációjában további kinázok is részt vesznek¹⁵⁷. Megjegyzendő, hogy a CDK5 és a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) nagyon hasonló konszenzus szekvencián (a szerin/treonin után közvetlenül prolin van) foszforilálja a célfehérjét¹⁶⁰. Így elképzelhető, hogy a MAPK a CDK5-höz hasonlóan szabályozza az LMTK2 aktivitását. Kísérletes adatok alapján az NGF és PKC kezelés fokozta a CDK/MAPK-mediált LMTK2 foszforilációt PC12 sejtvonalban, ugyanakkor hogy ez a hatás közvetlenül a MAPK vagy a CDK5 eredménye, nem ismert¹⁴².

3.4.2.2 PP1C

A PP1 szerin-treonin protein-foszfataz számos alapvető sejtbiológiai funkcióhoz nélkülözhetetlen. A katalitikus alegység szerepet játszik a sejtciklus, apoptózis, glikogén

homeosztázis, RNS processzálas, fehérje szintézis, izomaktivitás és idegsejtek működésében^{161,162}. A PP1C arginin-valin-(aminosav)-fenilalanin (RVxF) motívummal lép interakcióban¹⁶³. Az LMTK2 valin-treonin-fenilalanin (VTF) motívummal köt a PP1C-hez és foszforilálja azt a treonin-320 helyen, ami csökkenti az enzim foszfatáz aktivitását^{157,164}. Ezt a folyamatot facilitálja a CDK5/p35, ezáltal egy közös CDK5/p35-LMTK2-PP1C jelátviteli útvonalat alkotva. A gátló foszforiláción túl az LMTK2 közvetlenül kötődik a PP1C regulátor alegységéhez az inhibitor-2-höz, így két mechanizmussal is gátolja a foszfatáz működését¹⁴¹.

3.4.2.3 Kinesin-1

A neuronok polarizált sejtek, a legtöbb fehérje a sejtestben termelődik, innen a jól szervezett intracelluláris transzport útján jutnak el rendeltetési helyükre. Ehhez 4 szereplőre van szükség: mikrotubulusok, molekuláris motorproteinek, szállítmányok (cargo), és energia ATP formájában¹⁶⁵. A Kinesin-1 egy fontos motorprotein, ami részt vesz számos esszenciális „cargo” axonális transzportjában, mint mitokondriumok, APP, vagy szinaptikus vezikula prekursorok¹⁶⁶. Funkcionálisan aktív formában a kinesin-1 hetero-tetramer két nehézláncból és két könnyűláncból (KLC) áll. Előbbiek mozognak a mikrotubulusok mentén, míg utóbbiak kötik meg a „cargo”-t¹⁶⁶. Egy közelmúltban megjelent tanulmány alapján az LMTK2 a karboxi-terminálison elhelyezkedő triptofán-aszpartát (WD) motívummal közvetlenül kötődik a KLC „tetratricopeptid repeat” (TPR) régióhoz, ami elősegíti az LMTK2 axonális transzportját¹⁶⁷. Továbbá, hogy az LMTK2 mediálja a KLC1-LMTK2-p35 komplex kialakulást, ami elengedhetetlen a p35 intracelluláris szállításában. Az LMTK2 géncsendesítés (siRNS-alapú fehérje szintézis gátlás) hatására nem csak a p35, hanem a CDK5 axonális transzportja is zavart szenved, ami degeneratív elváltozásokat indukálhat a neuronokban¹⁶⁷.

3.4.2.4 Miozin-VI

A miozin-VI egy aktin-függő molekuláris motorprotein, részt vesz az endo- és exocitotikus membránok retrográd transzportjában. Két kutatócsoport egymással párhuzamosan azonosította az LMTK2 és miozin-VI közti interakciót^{150,168}. Az LMTK2 közvetlenül kapcsolódik a miozin-VI karboxi-terminális régiójában található triptofán-triptofán-tirozin (WWY) motívumhoz. A motorprotein ugyanezzel a motívummal köti az endocitotikus adapter fehérjéket¹⁴⁹. Az LMTK2 a kináz régió közelében elhelyezkedő aminosav (567-773) szekvenciával kapcsolódik a miozin-VI WWY motívumhoz, ami

részben átfed a p35-höz kötődő szakasszal (391-632)^{140,168}. A szekvenciák közti átfedés felveti a lehetőségét, hogy a miozin-VI és p35 verseng az LMTK2 kötőhelyért, azonban ezt kutatási adatok eddig nem támasztották alá. LMTK2 és miozin-VI kolokalizáció megfigyelhető az endocitotikus és a visszavételre kerülő vezikulák kompartmentumaiban. A miozin-VI kötésen keresztül az LMTK2 kulcsszerepet játszik a transferrin-receptor endocitotikus transzportjában^{150,168}.

3.4.2.5 Cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR)

A CFTR egy ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) aktivált klorid-ioncsatorna, melynek mutációja és funkciózavara jól ismert cisztás fibrózisban¹⁶⁹. Az LMTK2 direkt interakcióba lép a CFTR-el, valamint foszforilálja azt a szerin-737 pozícióban^{146,170}. Ennek eredményeként fokozódik a CFTR endocitózis és csökken a sejtfelszínen lévő transzporterek száma, így az LMTK2 negatívan befolyásolja a csatornán átfolyó klorid-ion transzportot^{146,170}. Ezt megerősíti az a megfigyelés is, hogy az LMTK2 depléción fokozta a CFTR-t célzó cisztás fibrózisban alkalmazott gyógyszerek hatékonyságát¹⁷⁰.

3.4.3 LMTK2 malignus tumorokban

Számos tanulmány vizsgálta az LMTK proteincsalád szerepét a leggyakoribb humán daganatokban¹⁷¹. Az LMTK2 elsősorban prosztata adenocarcinómában került a kutatások középpontjába, ugyanakkor a fehérje mutációját bizonyították tüdő adenocarcinómában és sarcomatoid carcinómában is^{172,173}. Teljes genom asszociációs vizsgálattal egy pontos nukleotid-polimorfizmust (SNP) mutattak ki az LMTK2 gén 9-es intron rs6465657 pozícióban prosztata rákban¹⁷⁴. Harries és mtsai. később ezt az SNP-t funkcióvesztő variánsként azonosították, ami hozzájárul az LMTK2 féléletidejének csökkenéséhez¹⁷⁵. Továbbá, alacsonyabb LMTK2 expressziót detektáltak prosztata carcinómában benignus prosztata hiperpláziával összehasonlítva¹⁷⁵. Megjegyzendő, hogy az LMTK2 interakciós partnere a miozin-VI „overexpresszió” fokozza a prosztata specifikus antigén (PSA) és a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) szekrécióját, mely fehérjék részt vesznek a tumor progresszióban¹⁷⁶. A közelmúltban kiderült, hogy az LMTK2 negatív szabályozója az androgén receptornak (AR). Az enzim depléción prosztata adenocarcinómában magasabb AR aktivitást eredményez, ami növeli a malignus sejtek osztódási képességét¹⁷⁷.

3.4.4 LMTK2 neurodegenerációban

Kutatócsoportunk publikálta az első összefoglaló közleményt a szakirodalomban, ami felvetette az LMTK2 szerepét neurodegenerációban¹⁴³. Sejtbiológiai- és állatkísérletes tanulmányok,

valamint az LMTK2 interaktom 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 GSK3 β , jól ismert tau-kinázok, fokozott aktivitásuk az AD-re patognomikus tau-hiperfoszforilációhoz vezet²⁴⁻²⁷. 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 indukál¹⁷⁸. Az axonális transzport zavara az egyik feltételezett ok az intracelluláris fehérje aggregátumok felhalmozódásának hátterében. Az említett LMTK2 aktivitás csökkenése GSK3 β dezinhibícióhoz vezet, ami a motorproteinek foszforilálásával megzavarhatja az axonális transzportot¹⁶⁴. Ezen mechanizmusokat részletesen tárgyaljuk a Megbeszélés fejezetben.

A 3. táblázat tartalmazza az ismert fiziológias és patológias folyamatokat, amelyekben az LMTK2 részt vesz.

<u>FIZIOLÓGIÁS FOLYAMATOK</u>	<u>KÓROS ÁLLAPOTOK</u>
Neuron differenciáció ¹⁴²	Prosztata carcinoma ^{174,175,177,179,180}
Intracelluláris vezikulák forgalma ¹⁵⁰	Tüdőrák ^{172,173}
Axonális transzport ¹⁶⁴	Cisztás fibrózis ^{168,170}
Spermatogenezis ¹⁵⁵	Neurodegeneráció ^{143,167,181}

3. táblázat Fiziológias és patológias folyamatok, melyekben kimutatható a lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) szerepe¹⁸¹

4. 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 funkciójának 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 valószínűsített¹⁴³ LMTK2 és tau-patológia közti kapcsolat tisztázása Alzheimer-kórban eltérő agyi régiókban és AD neuropatológiai (Braak) stádiumokban.

5. Anyagok és módszerek

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

A kutatómunka e fázisában az LMTK2 hisztopatológiai karakterizálást kromogén immunhisztokémiai, valamint az enzim mennyiségi változását fluoreszcens immunhisztokémiai és digitális képanalitikai módszerekkel vizsgáltuk a két leggyakoribb neurodegeneratív demenciában azonos átlagéletkorú nem-demens kontroll csoporttal összehasonlítva.

5.1.1 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 (4. táblázat).

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 történt¹³⁵.

	Patológiai azonosító	Nem	Kor (év)	PMD (óra)	Agytömeg (gramm)	Agy pH	Neuropatológiai Braak tau stádiumok
CNT esetek	A007/15	N	74	66	1191	6,53	II. stádium
	A158/14	N	73	73	1095	6,4	II. stádium
	A319/14	N	90	44	1150	5,79	II. stádium
	A002/13	F	90	45	1252	6,9	MAC
	A261/12	F	63	23	1464	-	MAC
	A308/14	N	66	78	1414	5,93	MAC
Neocorticalis LBD esetek	A062/16	F	86	29	1234	-	-
	A274/16	N	83	52	1164	-	-
	A341/15	F	79	48	1519	6,77	I. stádium (társpatológia)
	A276/14	N	90	67	979	6,75	III. stádium (társpatológia)
	A304/06	N	92	55	1244	6,59	III. stádium (társpatológia)
	A040/10	N	87	9	1060	6,13	II. stádium (társpatológia)
AD esetek	A092/15	N	86	13	1056	6,68	VI. stádium
	A192/13	F	77	71	1325	6,86	VI. stádium
	A277/12	F	79	20	1270	6,88	VI. stádium
	A308/13	N	74	20	1053	-	VI. stádium
	A355/13	F	73	26	1239	5,75	VI. stádium
	A377/14	N	85	79	1135	-	VI. stádium

4. táblázat Neuropatológiai minták: patológiai azonosító, nem, életkor, post-mortem idő (PMD), agytömeg, agy pH, neuropatológiai Braak tau stádiumok¹⁸¹. (F:férfi, N: nő, MAC: minimális öregkori patológia elváltozások – Braak tau +, de nem éri el az I. stádiumot).

5.1.2 Kromogén immunhisztokémiai (CHR-IHC) jelölés

Eredményeink validitása érdekében a felhasznált reagensek, antitest koncentrációk, inkubációs idők neuropatológus (HT) részvételével kerültek optimalizálásra, az alábbiak szerint:

A 7µm vastag FFPE metszeteket „leszálló” alkoholsorban (2x5 perc xilol, 5 perc abszolút alkohol, 5 perc 96% (v/v) alkohol, 5 perc 80% (v/v) alkohol, 5 perc 70% (v/v) alkohol) deparaffináltuk. A reakció vizualizálása peroxidáz-függő reakcióval történik, így szükséges az 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-feltárási 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-Aldrich, 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 tabletta) 4 percig alkalmaztuk a metszeten. A magfestés Harris-féle hematoxin-oldattal (30 másodperc) készült. A mintákat „felszálló” alkoholsorban (5 perc 70% (v/v) alkohol, 5 perc 80% (v/v) alkohol, 5 perc 96% (v/v) alkohol, 5 perc abszolút alkohol, 5 perc xilol) dehidratáltuk. A fedőlemezek felhelyezését automata végezte (ClearVue™ Coverslipper, Thermo Fisher Scientific). Az elsődleges antitestet 1:50, a másodlagost 1:200 arányban hígítottuk TBS oldatban. A mintákat munkaoldattal (TBS, 2x5 perc) öblítettük az antigén feltárási, másodlagos antitest és ABC Kit alkalmazását követően. Az immunreakció validitásának biztosítására a primer antitestet kihagyva IHC negatív metszetek is készültek.

5.1.3 Fluoreszcens immunhisztokémiai (IF-IHC) jelölés

Számos lépés megegyezik a fentebb ismertetett CHR-IHC protokollal (deparaffinálás, antigén feltárási, 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 kromogénestől:

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).

5.1.4 CHR-IHC értékelése

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

5.1.5 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 reprezentatív fotót készítettünk közepes nagyítással (200x), azonos megvilágítási intenzitással, expozíciós idővel és kamera beállításokkal. A digitális adatok kiértékeléséhez egy korábban leírt ImageJ szoftveren alapuló metodikát¹⁸² adaptáltunk, minimális módosításokkal. Az elkészült képeket (90 db) egyszerre egy „stack”-ben nyitottuk meg, annak érdekében, hogy garantáljuk minden módosítás, minden egyes képen, azonos időben és beállításokkal fusson le. A detektálás küszöbértéket a szürkeskálának 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 szürkeskála 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 szürkeskála intenzitást minden beteg esetén, majd az adatok alapján a három kísérleti csoportra (CNT, AD, neocorticalis LBD) vonatkozó átlagos intenzitásértékeket is megadtuk.

5.1.6 Statisztikai analízis

A fluoreszcens IHC szignál átlagos szürkeskála intenzitásértékek statisztikai analízisét SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc.) szoftverrel végeztük. Az adatok normál eloszlást követtek (Shapiro-Wilk teszt) és megegyezett a varianciájuk (equal variance test), így azokat egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA), majd páronként Holm-Sidak tesztel 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.

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

Szakirodalmi adatok és saját eredményeink alapján az LMTK2 expresszió és a tau/NFT-patológia kiterjedése összefüggést mutat AD-ben. Hipotézisünk igazolására két agyi régióra és neuropatológiai (Braak) stádiumra terjesztettük ki vizsgálatainkat, illetve a korábbi metodikák (LMTK2 CHR-IHC) mellett foszfo-tau/LMTK2 fluoreszcens kettős-jelölt IHC-t optimalizáltunk.

5.2.1 Betegek és minták

A beteganyag szelekciója az AD Braak tau neuropatológia 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 (5. táblázat). 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 vizsgálathoz és kutatási célú felhasználáshoz hozzájárultak, a betegadatokat anonimizálták. 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.

Kutatási azonosító	Nem	Kor (diagnóziskor)	MMSE (utolsó)	Braak tau stádiumok	APOE génpolimorfizmus
HT-05-13	F	70	25	II	ε3-ε3
HT-09-13	F	77	22	III	ε3-ε3
HT-11-13	N	55	23	I	ε3-ε4
HT-20-13	F	64	26	I	-
HT-03-14	F	72	16	III	ε3-ε3
HT-13-13	N	80	13	VI	ε3-ε4
HT-14-13	N	84	13	VI	ε3-ε3
HT-06-14	F	77	6	VI	ε3-ε4
HT-10-14	F	68	7	VI	ε4-ε4
HT-14-14	F	55	0	VI	ε3-ε3

5. táblázat Humán post-mortem szövetminták: kutatási azonosító, nem, kor (a diagnózis felállításakor), MMSE (halál előtti utolsó), neuropatológiai Braak tau stádiumok¹⁸³. (F:férfi; N:nő; MMSE: Mini-mentál teszt; APOE: Apolipoprotein E)

5.2.2 CHR-IHC jelölés

A 7 μm vastag FFPE metszetek kromogén immunhisztokémiai jelölésének módszertana, a használt reagensek, inkubációs idők megegyeztek a korábban az 5.1.2 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).

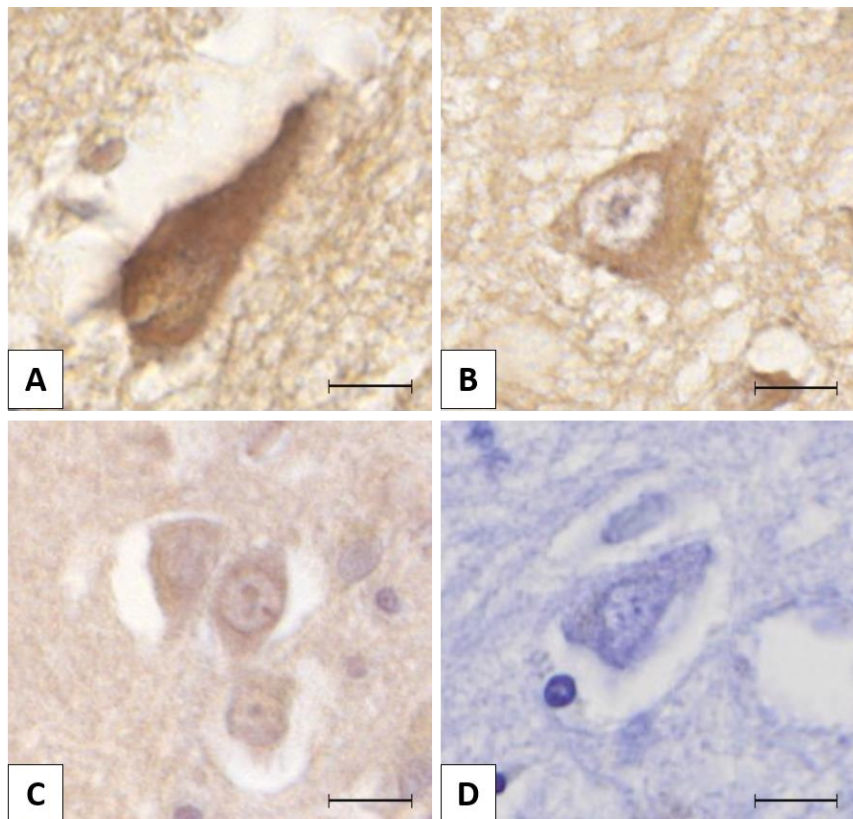
5.2.3 Fluoreszcens kettős-jelölt immunhisztokémia (FDL-IHC)

A minták deparaffinálása, antigén feltárás, nem-specifikus kötőhelyek blokkolása, a primer LMTK2 antitest előkészítése, az autofluoreszcencia blokkolása és a metszetek lefedése megegyezett a korábban 5.1.2 és 5.1.3 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. Mindkét antitest „gazdaállata” egér, így a kettős jelölés kivitelezéséhez a hagyományos másodlagos antitestek helyett fluorofór konjugált „fragment antigen-binding” (FAB)-régiót (FabuLight™, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.) használtunk. Ezek a másodlagos antitestek közvetlenül a primer antitestek „fragment crystallizable” (Fc) régiójához kötődnek, szabadon hagyva azok antigén specifikus FAB régióját, ezáltal külön-külön in vitro jelölhettük a primer antitesteket, megelőzve az esetleges keresztreakciót. 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.

5.2.4 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 megszámláltuk egy négyfokozatú skála alapján (0, 1+, 2+, 3+) a különböző intenzitású immunreakciót mutató sejteket (9. ábra). 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.



9. ábra Az ábra a neuronális lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) immunreakció intenzitásokat mutatja be: (A) erős pozitivitás (3+), (B) közepes pozitivitás (2+), (C) gyenge pozitivitás (1+), (D) negatív reakció¹⁸³. (A fehérjét 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kromogénnel (barna) vizualizáltuk, a magfestés hematoxilin (kék). Skála: 10 µm.)

5.2.5 FDL-IHC digitális képanalízis

A fluoreszcens mikroszkópia az 5.1.5 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 visszahelyettesítéssel 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 változatlanak tekinthető az egyes képeken. Minden esetről 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*.

5.2.6 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 a következő módon: korai stádiumú MFG versus (vs.) korai stádiumú aHPC, korai stádiumú MFG vs. késői stádiumú MFG, korai stádiumú MFG vs. késői stádiumú aHPC, késői stádiumú MFG vs. korai stádiumú aHPC, késői stádiumú MFG vs. késői stádiumú aHPC, korai stádiumú

aHPC vs. késői stádiumú aHPC. Annak érdekében, hogy tisztázzuk az életkor, MMSE értékek, valamint az 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.

6. Eredmények

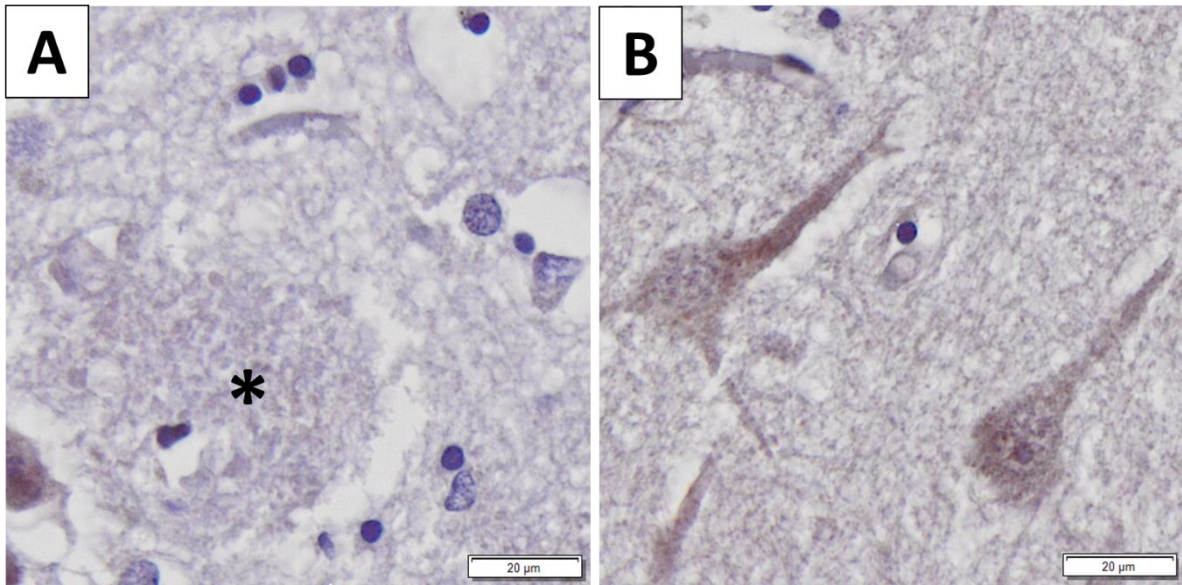
6.1 Az LMTK2 neuropatológiai karakterizálása AD-ben és neocorticalis LBD-ben

6.1.1 CHR-IHC eredmények

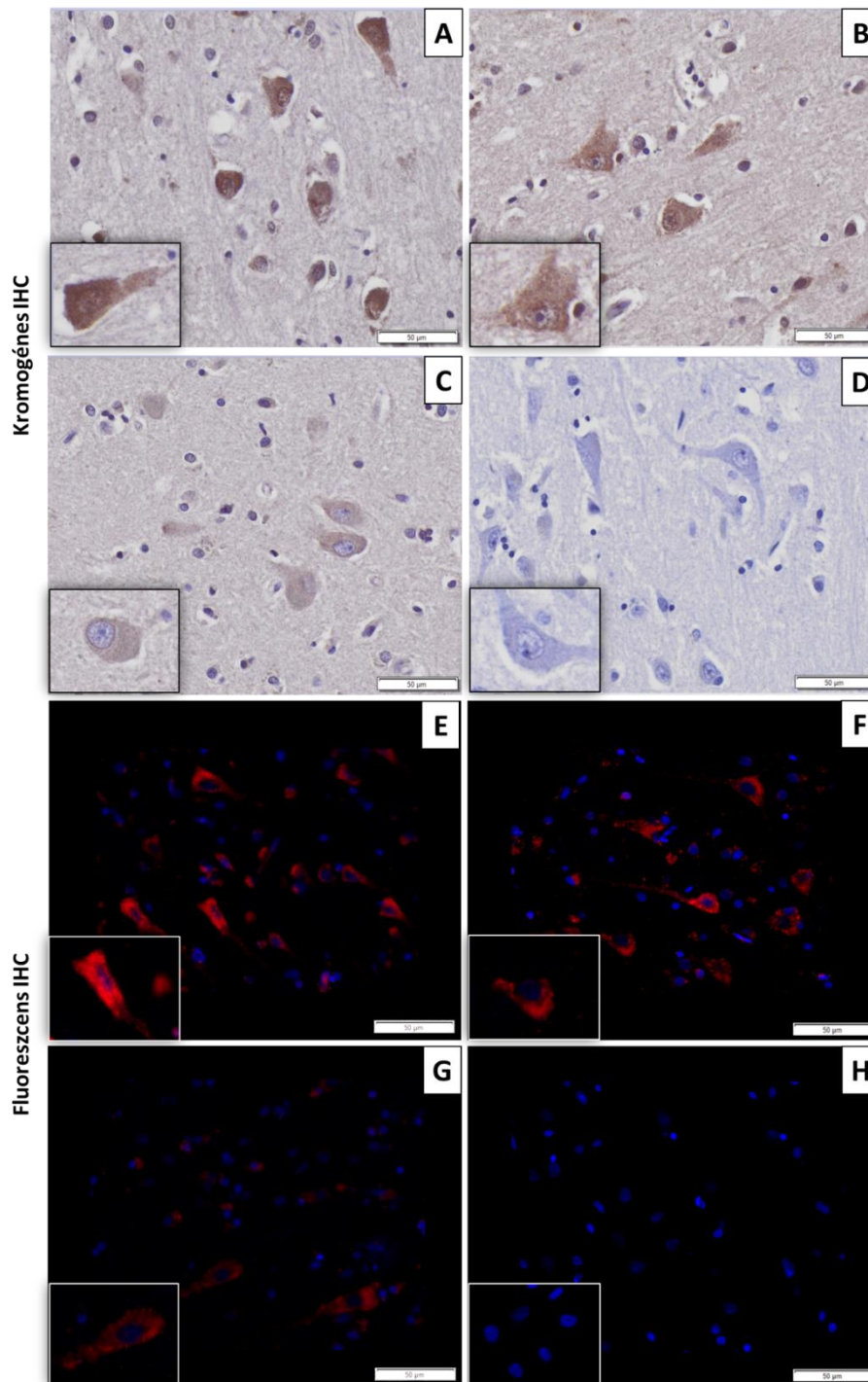
Az LMTK2 IHC erős neuron-specifikus citoplazmatikus reakciót mutatott; a glia sejtek és az idegsejtek magjai negatívak (10. ábra). AD-ben az extracelluláris A β plakkok IHC negatívak (11. ábra, A panel). Az átlagos citoplazmatikus LMTK2 immunpozitivitás alacsony az NFT-t hordozó ún. „tangle-bearing” neuronokban és a morfológiailag normál sejtekben egyaránt (11. ábra, B panel). Szabad szemmel is jól látható, hogy az egyes kísérleti csoportok között jelentős eltérések vannak az immunreakció intenzitásában (12. ábra). 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 (13. ábra).



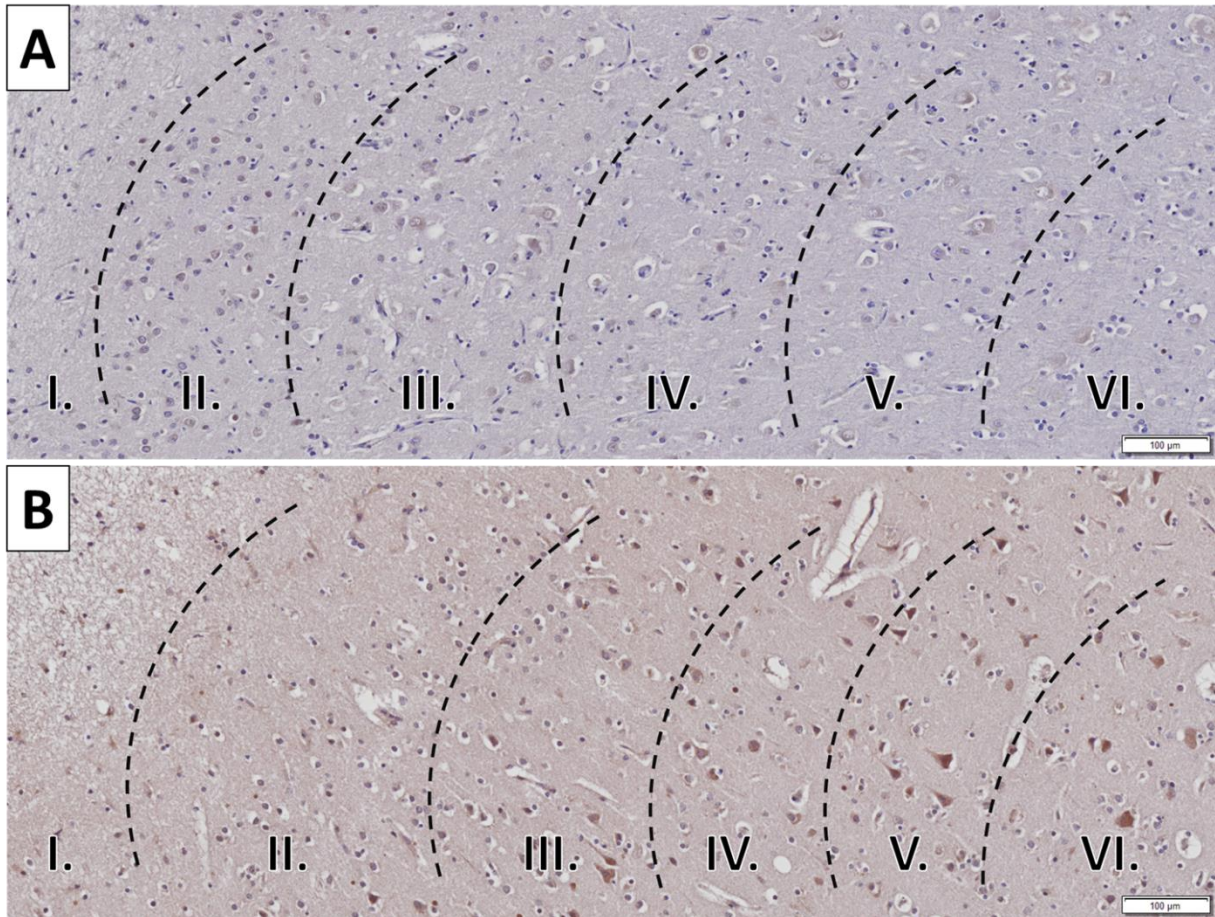
10. ábra A lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) sejt-specifitása humán agyszöveten¹⁸¹. Az ábrán a szürke- (balra) és a fehérállomány (jobbra) határa látható (szaggatott vonal) a gyrus frontalis medius régióban. A neuronok erős citoplazmatikus immunreakciót mutatnak (A panel), míg a glia sejtek negatívak (B panel). (A fehérjét 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kromogénnel (barna) vizualizáltuk, a magfestés hematoxilin (kék). Skála: 100 μ m.)



11. ábra Lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) Alzheimer-kór (AD)-specifikus patológiai elváltozásokban a gyrus frontalis medius régióban¹⁸¹. Az amiloid- β ($A\beta$) plakkokban (csillag) nem detektálható LMTK2 immunreakció (A panel). Az NFT-t hordozó „tangle-bearing” neuron (balra) és a morfológiailag egészséges idegsejt (jobbra) hasonlóan gyenge átlagos citoplazmatikus LMTK2 immunpozitivitást mutat (B panel). (A fehérjét 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kromogénnel (barna) vizualizáltuk, a magfestés hematoxilin (kék). Skála: 20 μ m.)



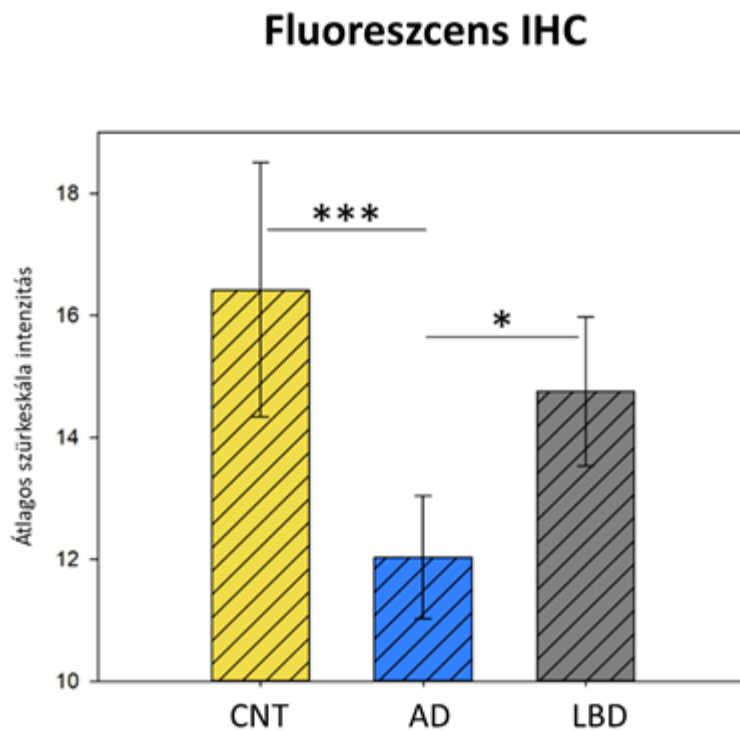
12. ábra A lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) immunreakció intenzitása Alzheimer-kórban (AD), neocorticalis Lewy-tesztis betegségben (LBD), valamint azonos átlagéletkorú nem-demens kontroll (CNT) mintákon a gyrus frontalis medius régióban¹⁸¹. A CNT és neocorticalis LBD csoportokban az immunpozitivitás intenzívebb kromogén (A és B panel) és fluoreszcens (E és F panel) immunhisztokémiával (IHC) egyaránt AD-vel összehasonlítva (C és G panel). A primer antitest elhagyásával készült IHC negatív metszeteket szintén bemutatjuk (D és H panel). (A fehérjét 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kromogénnel (barna), valamint Alexa Fluor® 594 fluoreszcens festékkel (piros) vizualizáltuk. A magfestés (egyaránt kék) hematoxin a kromogén, míg 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) a fluoreszcens mintákon. Skála: 50 µm.)



13. ábra A lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) immunreakció az agykéreg különböző rétegeiben, a gyrus frontalis medius régióban Alzheimer-kórban (AD) és nem-demens azonos átlagéletkorú kontroll csoportban (CNT)¹⁸¹. Kromogén immunhisztokémiával AD-ben (A panel) az agykéreg mind a hat rétege csökkent LMTK2 immunpozitivitást mutat a CNT-hez képest. (A szaggatott vonalak az agykéreg rétegeinek hozzávetőleges határát jelzik – I: stratum moleculare; II: stratum granulosum externum; III: stratum pyramidale externum; IV: stratum granulosum internum; V: stratum pyramidale internum; VI: stratum multiforme. A fehérjét 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kromogénnel (barna) vizualizáltuk, a magfestés hematoxilinnel (kék). Skála: 100 µm.)

6.1.2 IF-IHC eredmények

Összesen 1272 sejtet elemeztünk a fluoreszcens képeken. A 14. ábra mutatja be a CNT, AD és neocorticalis DLB csoportokra vonatkoztatott átlagos szürkeskála intenzitásokat. 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 (14. ábra). 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.

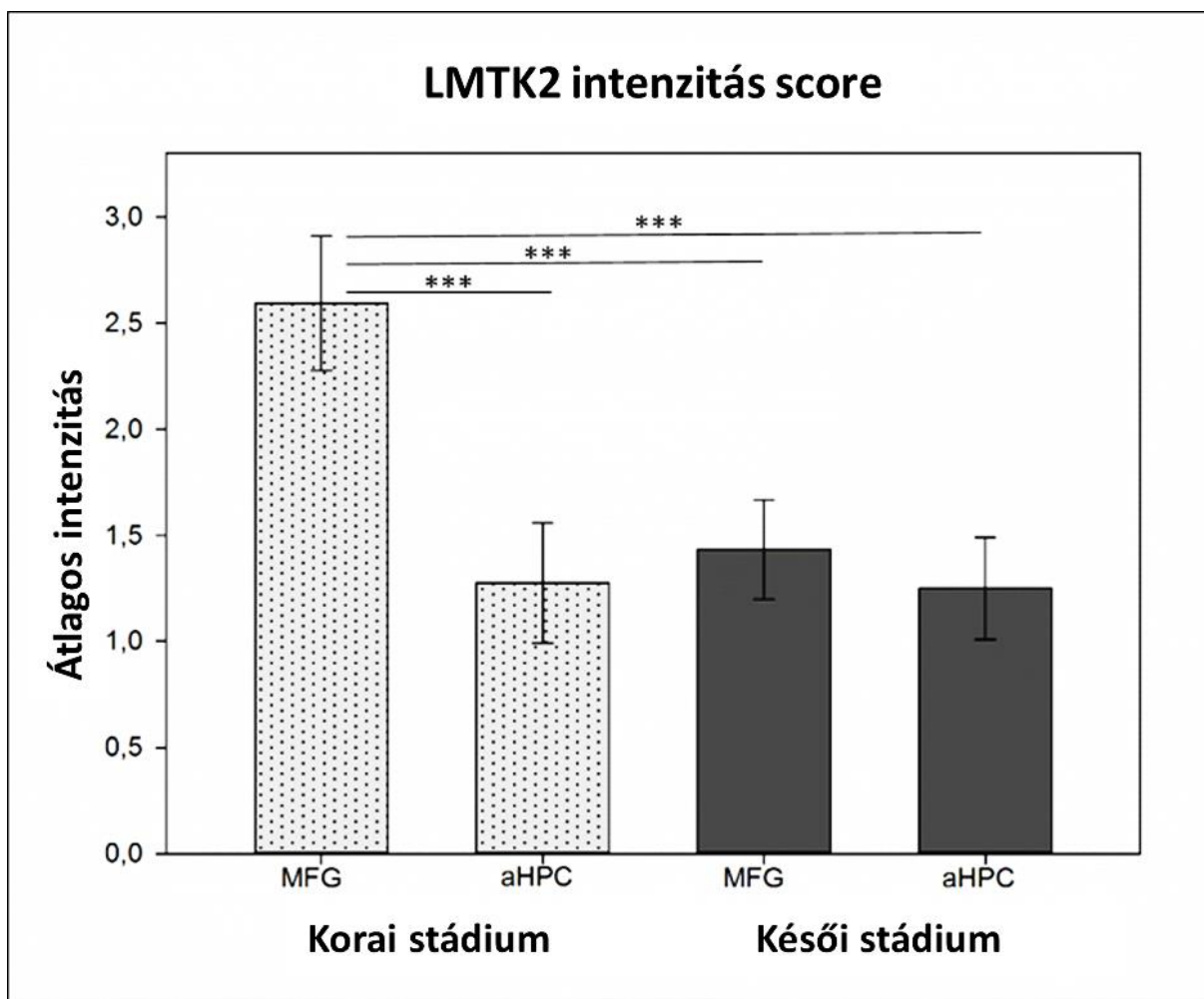


14. ábra Fluoreszcens lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) immunhisztokémia (IHC) intenzitások (szürkeskálán kifejezve) Alzheimer-kórban (AD), neocorticalis Lewy-testes betegségben (LBD) és azonos átlagéletkorú nem-demens kontroll csoportban a gyrus frontalis medius régióban¹⁸¹. Statisztikailag szignifikáns eredményt kaptunk a CNT vs. AD ($p < 0,001$ (***)) és neocorticalis LBD vs. AD ($p < 0,05$ (*)) csoportok között, míg a CNT vs. neocorticalis LBD összehasonlítás nem adott szignifikáns értéket.

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

6.2.1 CHR-IHC eredmények

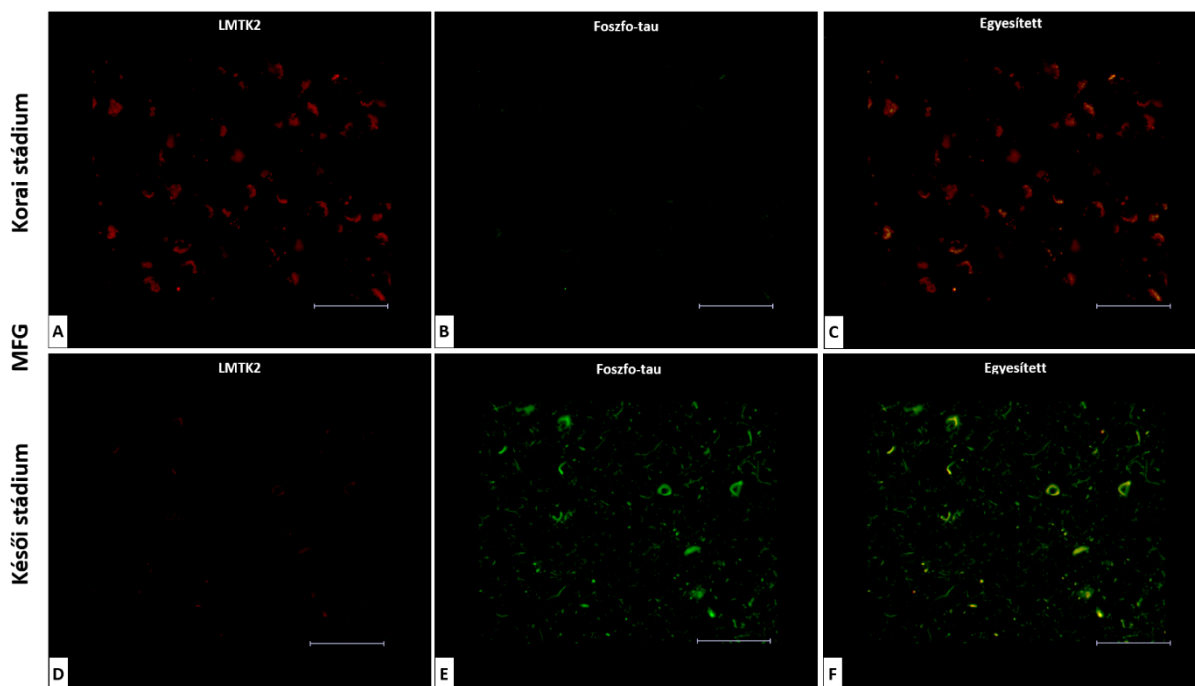
Összesen 1215 sejt CHR-IHC intenzitását értékeltük a 4 kísérleti csoportban (aHPC és MFG régiók korai és késői AD neuropatológiai stádiumokban). Az NFT patológiával érintett 3 csoportban (MFG késői stádiumban, aHPC mindkét stádiumban) elsősorban az alacsonyabb LMTK2 intenzitásértékek (1+) domináltak, 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. Párónként 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 csoport (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.



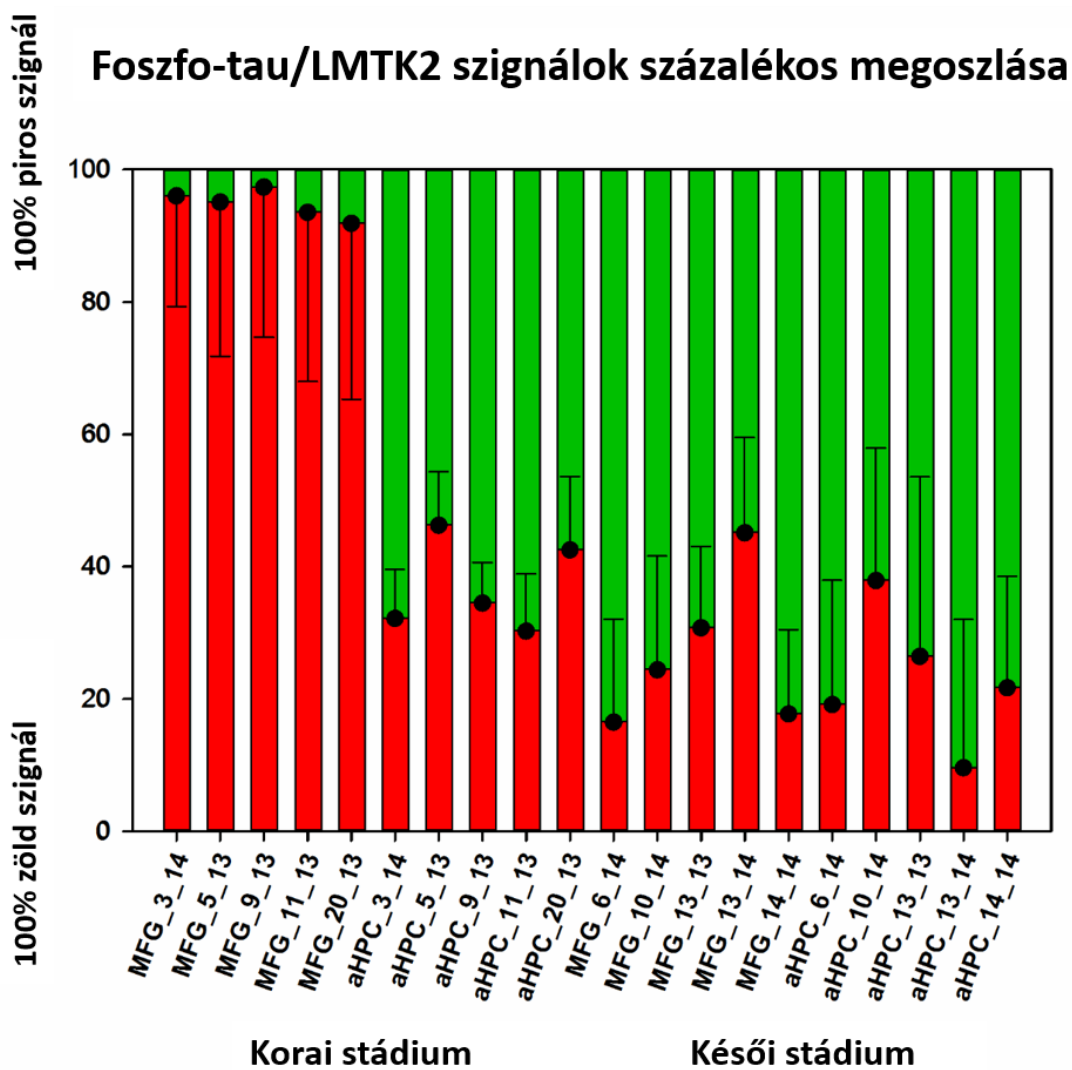
15. ábra Átlagos lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) IHC intenzitás „score” a gyrus frontalis medius (MFG) és anterior hippocampus (aHPC) régiókban korai és késői neuropatológiai stádiumú Alzheimer-kóros betegekben¹⁸³. A páronkénti összehasonlítás statisztikailag szignifikáns ($p < 0,001$ (***) különbséget mutatott az átlagos LMTK2 intenzitás értékekben az NFT-től megkímélt endogén kontroll (MFG korai stádiumban) és az NFT-vel súlyosan érintett (MFG késői stádium és aHPC mindkét stádium) csoportok között.

6.2.2 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 ábrázolódott az NFT-vel érintett (MFG késői és aHPC mindkét stádiumban) csoportokban (16. ábra). A 17. 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 18. ábra mutatja be.

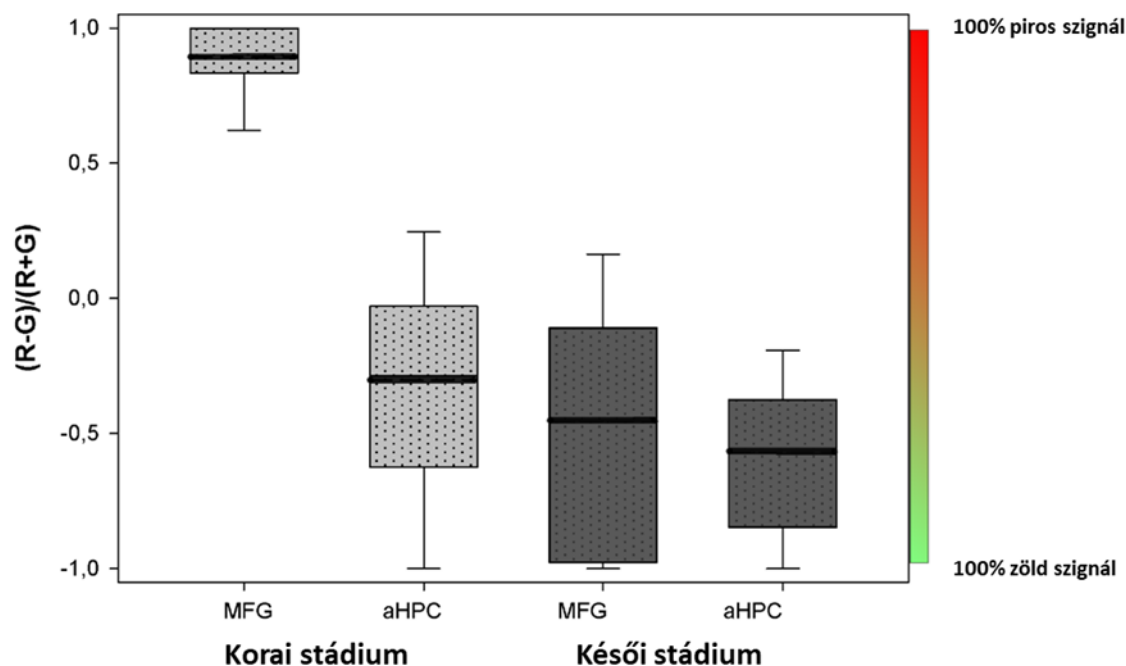


16. ábra Lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) és foszfo-tau kettős jelölt fluoreszcens immunhisztokémia a gyrus frontalis medius (MFG) területéről korai (A, B, C panel) és késői (D, E, F panel) neuropatológiai stádiumú Alzheimer-kóros betegek mintáin¹⁸³. Az LMTK2 immunreakció (piros) pre-domináns az NFT-től megkímélt korai stádiumban (A és C panel), míg egyértelmű foszfo-tau túlsúly (E és F panel) és csökkent LMTK2 szignál (D panel) látható a késői stádiumban. (Az LMTK2-t Alexa Fluor® 594, a foszfo-tau-t Alexa Fluor® 488 fluoreszcens festékekkel vizualizáltuk. Skála: 50 μ m.)



17. 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 tüntették fel¹⁸³.

LMTK2 és foszfo-tau szignálok százalékos megoszlása



18. 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-kórban¹⁸³. A diagramok a kísérleti csoportokban mért piros (LMTK2) és zöld (foszfo-tau) fluoreszcens szignálok interkvartilis tartományát ábrázolják egy (-1)-től (+1)-ig terjedő skálán. (A medián értékek fekete vonallal vannak jelezve. A (+1) érték 100% LMTK2 szignál melletti 0% foszfo-taut jelent, míg a (-1) 100% foszfo-tau és 0% LMTK2 szignálokra vonatkozik).

A piros (LMTK2) és zöld (foszfo-tau) szignálok korrelációs statisztikai analízise erős negatív összefüggést (Spearman korrelációs koefficiens= -1) mutatott minden egyes kísérleti csoportban (6. táblázat).

	Korai stádium				Késői stádium			
	MFG		aHPC		MFG		aHPC	
Spearman Korelációs Koefficiens	-1		-1		-1		-1	
P érték	0.0000002		0.0000002		0.0000002		0.0000002	
Átlag (Piros; Zöld)	0.946	0.054	0.349	0.651	0.273	0.727	0.215	0.785
Standard deviáció	0,087		0,233		0,237		0,159	
Standard hiba	0,00175		0,00468		0,00349		0,00238	
Vizsgált párok száma	2464		2478		4609		4457	

6. táblázat A lemur tirozin-kináz 2 (LMTK2) (piros) és foszfo-tau (zöld) fluoreszcens szignálok közti korreláció a gyrus frontalis medius (MFG) és anterior hippocampus (aHPC) régiókban Alzheimer-kór korai és késői neuropatológiai stádiumaiban¹⁸³.

7. Megbeszélés

A humán protein atlasz¹⁸⁴ 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 e 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 kisfokú 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.

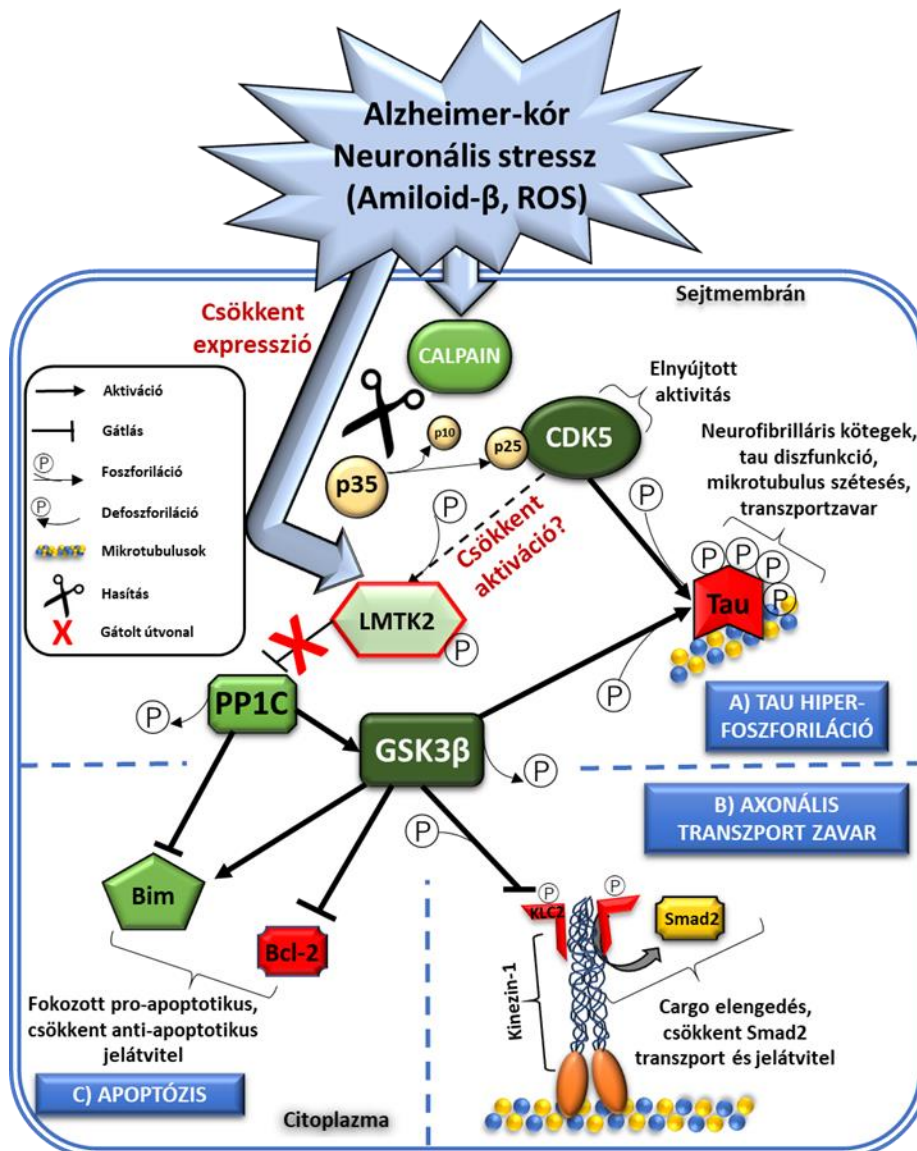
Az LMTK2 CHR-IHC és foszfo-tau/LMTK2 FDL-IHC vizsgálatok megerősítettek, hogy az LMTK2 szint csökkenése nem egy generalizált változás az AD betegek agyában, hanem szorosan összefügg az NFT patológia kiterjedésével. Egyazon korai AD neuropatológiai stádiumú betegben (is) szignifikánsan magasabb volt az LMTK2 immunopozitivitás a megkímélt MFG régióban, mint az NFT-vel súlyosan érintett aHPC-ben. Az életkor, MMSE értékek, illetve APOE génpolimorizmus 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 génextpressziós vizsgálattal alacsonyabb LMTK2 expressziót mértek a neocortex és a hippocampus területén tau transzgén (Tau P301L) egerekben, míg az AD patológiától mentes kisagyban nem volt eltérés¹⁸⁵. Mórotz és mtsai. 2019-ben közöltek egy, a mi IHC eredményeinket kiegészítő humán western blot tanulmányt (részben az általunk LMTK2 neuropatológiai karakterizálására használt AD és CNT mintákon)¹⁶⁷. 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 kisagyi 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 (19. ábra.).

A neuronális homeosztázis fenntartásához elengedhetetlen a jól szervezett precíz axonális transzport. Ha ez a komplex folyamat zavart szenved az a szállított sejtorganellek és proteinek akkumulációjához vezethet. Szakirodalmi adatok támasztják alá, hogy az axonális transzport defektusa korai esemény számos neurodegeneratív kórkép patogenezisében¹⁶⁵. Fiziológias körülmények között az LMTK2 indirekt módon részt vesz az axonális transzportfolyamatok szabályozásában^{164,167}. Egy közelmúltban megjelent tanulmány alapján az LMTK2 közvetlenül kötődik az egyik fő molekuláris motorprotein a Kinezin-1 könnyűláncjaihoz (KLC 1/2)¹⁶⁷. 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 is¹⁶⁷. Tekintve, hogy a CDK5 esszenciális a neuronok élettani működéséhez az intracelluláris transzport defektusa hozzájárulhat a neurodegeneratív folyamatokhoz.



19. ábra. Potenciális LMTK2-kapcsolt jelátviteli zavar Alzheimer-kórban (AD)¹⁴³. AD-ben neuronális stressz (pl. amiloid- β , reaktív oxigéngyökök (ROS)) hatására a calpain a ciklin-dependens kináz 5 (CDK5) aktivátor p35-öt p25-re és p10-re hasítja. A p25 növeli a CDK5 féléletidejét, valamint csökkent affinitással köt az LMTK2-höz. Ez, továbbá a neuronális stressz hatására alacsonyabb LMTK2 expresszió gátolja az LMTK2-mediált foszforilációs útvonalat, ami csökkent protein-foszfátáz 1 katalitikus alegység (PP1C) gátláshoz és közvetetten glikogén-szintáz-kináz-3- β (GSK3 β) dezinhibícióhoz vezet. (A) Tau-hiperfoszforiláció a fokozott GSK3 β és CDK5/p25 aktivitás következtében, ami károsítja a tau fiziológias funkcióit, mikrotubulus defektushoz és neurofibrilláris kötegek (NFT) képződéshez vezet. (B) A GSK3 β gátlás hiányában az enzim foszforilálja a Kinesin-1 motorprotein 2-es könnyűláncát (KLC2), ami a cargo elengedését és a Smad2 transzport, illetve jelátvitel zavarát okozza (C) Az aktivált GSK3 β gátolja az anti-apoptotikus Bcl-2 és serkenti a pro-apoptotikus Bim szinteket és jelátvitelt. Noha a PP1 gátolja a Bim-et, ez nem tudja ellensúlyozni a GSK3 β -mediált Bim aktivációt és következményes apoptózist. (Színkód: A zöld funkcionálisan aktív, a piros inaktív enzimek. A nyilak vastagsága, valamint a színárnyalatok az aktivitási szintet tükrözik, vékony nyilak/halvány színek alacsony aktivitás, vastag nyilak/erős színek magas aktivitás.)

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 kulcsenzime a GSK3 β ¹⁸⁶. Már 2004-ben leírták, hogy a CDK5 közvetetten szabályozza a GSK3 β aktivitását a PP1C-n keresztül¹⁸⁷, 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 láncszemét¹⁶⁴. 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 cargók (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^{164,188}. A Smad2 transzkripció faktor a nukleocitoplazmatikus útvonal révén a transzformáló növekedési faktor β (TGF β) jelátviteli útvonal egyik kulcsfehérjéje¹⁸⁹. Az LMTK2 génexpresszió csökkenése (géncsendesítés által) megzavarja a Smad2 kötődést a KLC2-höz, ezáltal gátolja a TGF β receptor nukleáris szignalizációt¹⁶⁴. A TGF β /Smad2 jelátviteli útvonal zavarát megfigyelték több gyakori neurodegeneratív kórképben, beleértve az AD-t^{190,191}, 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*²⁴⁻²⁷. 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^{157,164,187,192,193}, ami úgy tűnik életkorfüggő folyamat. Idős egerekben a GSK3 β aktivitás magasabb a fiatal példányokhoz képest, ami tau hiperfoszforilációhoz vezet^{193,194}. 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^{140,157}. AD-ben neuronális stressz hatására a calpainok fokozott működése nyomán a p35 kofaktor p25-re és p10-re hasítódik¹⁹⁵⁻²⁰⁰. A CDK5/p25 komplex hosszabb féléletidejéből adódó elnyújtott

kináz aktivitása révén hozzájárul a tau hiperfoszforilációhoz^{196,199–201}. A p25 kisebb affinitással köt az LMTK2-höz mint a p35¹⁴⁰, ami magyarázhatja az enzim csökkent funkcióját AD-ben. Ez a változás PP1C dezinhibícióhoz és indirekt módon GSK3 β túlműködéshez, végső soron tau hiperfoszforilációhoz vezet^{24,25,27}.

Egy közelmúltban megjelent tanulmány siRNS alapú nagy áteresztőképességű szűrési technikát alkalmazva az LMTK2-t egy potenciális apoptózis regulátor fehérjeként azonosította¹⁷⁸. 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 szerekre¹⁷⁸. 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^{202,203}. 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 sejt²⁰⁴. Mindazonáltal bizonyos sejtkárosító ingerek (pl. oxidatív stressz, A β peptidek, hiperfoszforilált-tau) képesek aberráns módon reaktiválni a sejtciklust^{146,156,205–207}. Tekintve, hogy a neuronok elvesztették osztódási képességüket, a sejtciklusba történő ismételt belépés különböző szabályozó mechanizmusok révén apoptózishoz fog vezetni^{207,208}. Egyre több kutató vallja azt a teóriát, hogy a neurodegeneratív betegségek valójában a „neuronok malignus daganatai”^{209–211}. Korántsem elképzelhetetlen, hogy bizonyos sejtkárosító faktorok, amelyek kontrollálatlan sejtosztódást képesek okozni más szövetekben kiterjedt degeneratív elváltozásokhoz és sejtpusztuláshoz vezetnek az idegszövetben. Több tanulmány is csökkent LMTK2 expresszióról számolt be rosszindulatú daganatokban^{175,212}, ami alapján felmerülhet, hogy az LMTK2 a tumor-szupresszor fehérjékhez hasonló funkcióval bír. A neuronokban a kóros sejtciklus reaktiváció fokozza a ciklin D és a ciklin E expressziót, valamint a G1 és G2 fázis CDK-k aktivitását^{213–218}. A magasabb CDK aktivitás a retinoblastoma protein foszforilációjához és egyidejűleg az E2F elengedéséhez vezet^{215,218,219}. Az E2F gátolja az pro-apoptotikus gének expresszióját, továbbá transzaktivál számos „downstream” sejtciklus gént ezzel serkentve az előrehaladását ennek a végeredményben halálos ciklusnak²²⁰. 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.

Kutatómunkánk eredményeként a szakirodalomban elsőként közöltük az LMTK2 neuropatológiai karakterizálását a leggyakoribb neurodegeneratív demenciákban. Igazoltuk, hogy az LMTK2 szint változása AD/tauopátia-specifikus, illetve annak mértéke jelentősen összefügg az NFT-patológia 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 modellben²²¹. Jól ismert, hogy a vasculáris társpatológia fokozza az AD tünetek súlyosságát²²²⁻²²⁴, így az LMTK2 szint farmakológiai befolyásolása pozitív terápiás hatást fejthet ki a betegségben. Erre valószínűleg lesz lehetőség, mivel a közelmúltban azonosítottak egy 2-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetát (TPA) válasz régiót az LMTK2 gén promoter szakaszán. A szintetikus PKC aktivátor TPA stimulus fokozta az LMTK2 gén expresszióját²²⁵. Mindazonáltal további vizsgálatok szükségesek, hogy részletesen feltérképezzük az LMTK2 neurodegenerációban betöltött szerepét, valamint a fehérje farmakológiai befolyásolásának lehetőségét.

8. 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-ben 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.

9. Summary

Alzheimer's disease (AD) and dementia with Lewy bodies (DLB) are the most common neurodegenerative dementias affecting millions of people worldwide. According to our knowledge the diseases are incurable, only supportive therapy available. Therefore, there is a growing pressure on the scientists to provide novel therapeutic targets by mapping the pathomechanism of the diseases. Lemur tyrosine kinase 2 has become to the centre of interest, recently. Cell biological and animal model studies suggest that the enzyme is implicated in neurodegeneration. However, the number of human-based investigations are very limited.

In our work we aimed the neuropathological characterization of LMTK2 in the two most frequent neurodegenerative dementias, as well as the clarification of the proposed link between LMTK2 and tau pathology.

Neuropathological characterization of LMTK2 was carried out on post mortem brain samples of AD, clinically DLB, histologically neocortical Lewy body disease (LBD) patients, compared them to age-matched controls (CNTs) without dementia. For morphometric evaluation chromogenic (CHR) immunohistochemistry (IHC) was used. Group-based comparison of LMTK2 immunopositivity was performed with fluorescent IHC. LMTK2-tau correlation was observed on early (Braak I-III.) and late (Braak VI.) AD neuropathological stage samples from the region of anterior hippocampus (aHPC) and middle frontal gyrus (MFG) with LMTK2 CHR-IHC and phospho-tau/LMTK2 fluorescent double labelling IHC techniques.

LMTK2 is a neuron-specific marker. Immunolabelling localized to the cytoplasm on both neurodegenerative and CNT samples. Regarding hallmark pathological features of AD, amyloid- β plaques were negative, neurofibrillary tangle (NFT)-bearing neurons and morphologically normal cells showed similarly weak average cytoplasmic immunoreaction. In AD the LMTK2 immunopositivity was significantly decreased compared to neocortical LBD and CNT group. This tendency was observed in every cortical layer. We detected a strong negative correlation between phospho-tau and LMTK2 signals in different neuropathological stages of AD.

According to our results decreased level of LMTK2 is specific to AD. The alteration is not a general features of AD brains, because it is inversely proportionate to the extent of NFT pathology. We believe that, our research can contribute to the understanding of LMTK2's role in neurodegeneration and the protein will be a potential biomarker/drug target in AD.

10. Tárgyszavak

Magyarul

Alzheimer-kór, axonális transzport, LMTK2, neurodegeneráció, tau, Lewy-testes betegség, digitális képanalízis

Angolul

Alzheimer's disease, axonal transport, LMTK2, neurodegeneration, tau, Lewy body disease, digital image analysis

11. Irodalomjegyzék

1. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)*. (American Psychiatric Association, 2013).
2. Csiba, L. *Fejezetek a neurológiából*. (Debrecen University Press, 2010).
3. Hippus, H., Neundörfer, G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* **5**, 101–108 (2003).
4. Möller, H. J., Graeber, M. B. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **248**, 111–122 (1998).
5. Katzman, R. The Prevalence and Malignancy of Alzheimer Disease: A Major Killer. *Arch. Neurol.* **33**, 217–218 (1976).
6. Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Gemma-Claire, A., Wu, Y.-T., Prina, M. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's Dis. Int.* **84** (2015) doi:10.1111/j.0963-7214.2004.00293.x.
7. Alzheimer Europe. 2013: The prevalence of dementia in Europe - Country comparisons - Policy in Practice - Alzheimer Europe. *2013 Dementia in Europe Yearbook* <https://www.alzheimer-europe.org/Policy-in-Practice2/Country-comparisons/2013-The-prevalence-of-dementia-in-Europe/Hungary> (2013).
8. Qiu, C., Kivipelto, M., von Strauss, E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin. Neurosci.* **11**, 111–28 (2009).
9. Goldman, J. S., Hahn, S. E., Catania, J. W., Larusse-Eckert, S., Butson, M. B., Rumbaugh, M., et al. Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: Joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors. *Genet. Med.* **13**, 597–605 (2011).
10. Podcasy, J. L., Epperson, C. N. Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias. *Dialogues Clin. Neurosci.* **18**, 437–446 (2016).
11. Kovacs, G. G. *Neuropathology of neurodegenerative diseases: A practical guide. Neuropathology of Neurodegenerative Diseases: A Practical Guide* (Cambridge University Press, 2014). doi:10.1017/CBO9781107588660.
12. Genin, E., Hannequin, D., Wallon, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., et al. APOE and Alzheimer disease: A major gene with semi-dominant inheritance. *Mol. Psychiatry* **16**, 903–907 (2011).
13. Schaeffer, E. L., Gattaz, W. F. Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: Participation of the phospholipase A2 enzyme. *Psychopharmacology (Berl)*. **198**, 1–27 (2008).
14. Lin, H., Vicini, S., Hsu, F. C., Doshi, S., Takano, H., Coulter, D. A., et al. Axonal $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors modulate presynaptic NMDA receptor expression and structural plasticity of glutamatergic presynaptic boutons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16661–16666 (2010).
15. Hardy, J. A., Higgins, G. A. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*. **256**, 184–185 (1992).

16. Deane, R., Bell, R., Sagare, A., Zlokovic, B. Clearance of Amyloid-Beta; Peptide Across the Blood-Brain Barrier: Implication for Therapies in Alzheimers Disease. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **8**, 16–30 (2009).
17. Ricciarelli, R., Fedele, E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer’s Disease: It’s Time to Change Our Mind. *Curr. Neuropharmacol.* **15**, (2017).
18. Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., De Felice, F. G. Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer’s disease. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, (2015).
19. Mroczko, B., Groblewska, M., Litman-Zawadzka, A., Kornhuber, J., Lewczuk, P. Amyloid β oligomers (A β Os) in Alzheimer’s disease. *J. Neural Transm.* **125**, 177–191 (2018).
20. Tiwari, S. S., D’Orange, M., Troakes, C., Shurovi, B. N., Engmann, O., Noble, W., *et al.* Evidence that the presynaptic vesicle protein CSPalpha is a key player in synaptic degeneration and protection in Alzheimer’s disease. *Mol. Brain* **8**, 6 (2015).
21. Bereczki, E., Branca, R. M., Francis, P. T., Pereira, J. B., Baek, J. H., Hortobágyi, T., *et al.* Synaptic markers of cognitive decline in neurodegenerative diseases: A proteomic approach. *Brain* **141**, 582–595 (2018).
22. Guo, T., Noble, W., Hanger, D. P. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol.* **133**, 665–704 (2017).
23. Hanger, D. *Tau Phosphorylation Sites*. https://docs.google.com/spreadsheets/d/1hGYs1ZcupmTnbB7n6qs1r_WVtXHt1O7NBLyKBN7EOUQ/edit#gid=0 (2013).
24. Pei, J. J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Bogdanovic, N., Winblad, B., Cowburn, R. F. Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer’s disease neurofibrillary degeneration. *Brain Res.* **797**, 267–277 (1998).
25. Pei, J. J., Braak, E., Braak, H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Winblad, B., *et al.* Distribution of active glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**, 1010–1019 (1999).
26. Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., *et al.* Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* **38**, 555–565 (2003).
27. Flaherty, D. B., Soria, J. P., Tomasiewicz, H. G., Wood, J. G. Phosphorylation of human tau protein by microtubule-associated kinases: GSK3 β and cdk5 are key participants. *J. Neurosci. Res.* **62**, 463–472 (2000).
28. Kopke, E., Tung, Y. C., Shaikh, S., Del Alonso, C. A., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non- paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **268**, 24374–24384 (1993).
29. Alonso, A. D., Grundke-Iqbal, I., Barra, H. S., Iqbal, K. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 298–303 (1997).
30. Götz, J., Chen, F., Van Dorpe, J., Nitsch, R. M. Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science (80-)*. **293**, 1491–1495 (2001).

31. Zheng, W. H., Bastianetto, S., Mennicken, F., Ma, W., Kar, S. Amyloid β peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience* **115**, 201–211 (2002).
32. Praticò, D. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 609–615 (2008).
33. Makhaeva, G. F., Lushchekina, S. V., Boltneva, N. P., Sokolov, V. B., Grigoriev, V. V., Serebryakova, O. G., *et al.* Conjugates of γ 3-Carbolines and Phenothiazine as new selective inhibitors of butyrylcholinesterase and blockers of NMDA receptors for Alzheimer Disease. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
34. Zhao, Y., Zhao, B. Oxidative stress and the pathogenesis of alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2013) doi:10.1155/2013/316523.
35. Zhu, X., Perry, G., Moreira, P. I., Aliev, G., Cash, A. D., Hirai, K., *et al.* Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *J. Alzheimer's Dis.* **9**, 147–153 (2006).
36. Takata, K., Kitamura, Y., Saeki, M., Terada, M., Kagitani, S., Kitamura, R., *et al.* Galantamine-induced amyloid- β clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* **285**, 40180–40191 (2010).
37. Lee, C. Y. D., Landreth, G. E. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J. Neural Transm.* **117**, 949–960 (2010).
38. Go, M., Kou, J., Lim, J. E., Yang, J., Fukuchi, K. ichiro. Microglial response to LPS increases in wild-type mice during aging but diminishes in an Alzheimer's mouse model: Implication of TLR4 signaling in disease progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **479**, 331–337 (2016).
39. Sheedy, F. J., Grebe, A., Rayner, K. J., Kalantari, P., Ramkhelawon, B., Carpenter, S. B., *et al.* CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat. Immunol.* **14**, 812–820 (2013).
40. Bolós, M., Llorens-Martín, M., Jurado-Arjona, J., Hernández, F., Rábano, A., Avila, J. Direct Evidence of Internalization of Tau by Microglia in Vitro and in Vivo. *J. Alzheimer's Dis.* **50**, 77–87 (2016).
41. Maphis, N., Xu, G., Kokiko-Cochran, O. N., Jiang, S., Cardona, A., Ransohoff, R. M., *et al.* Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. *Brain* **138**, 1738–1755 (2015).
42. Mosher, K. I., Wyss-Coray, T. Go with your gut: Microbiota meet microglia. *Nat. Neurosci.* **18**, 930–931 (2015).
43. Lepelletier, F. X., Mann, D. M. A., Robinson, A. C., Pinteaux, E., Boutin, H. Early changes in extracellular matrix in Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **43**, 167–182 (2017).
44. Wen, T. H., Binder, D. K., Ethell, I. M., Razak, K. A. The Perineuronal 'Safety' Net? Perineuronal Net Abnormalities in Neurological Disorders. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 270 (2018).
45. Baig, S., Wilcock, G. K., Love, S. Loss of perineuronal net N-acetylgalactosamine in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **110**, 393–401 (2005).
46. Lendvai, D., Morawski, M., Négyessy, L., Gáti, G., Jäger, C., Baksa, G., *et al.* Neurochemical mapping of the human hippocampus reveals perisynaptic matrix around functional synapses in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **125**, 215–229 (2013).

47. Morawski, M., Brückner, G., Jäger, C., Seeger, G., Arendt, T. Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **169**, 1347–1363 (2010).
48. Rosenberg, G. A. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol.* **8**, 205–216 (2009).
49. Sethi, M. K., Zaia, J. Extracellular matrix proteomics in schizophrenia and Alzheimer's disease. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 379–394 (2017).
50. Augustinack, J. C., Huber, K. E., Postelnicu, G. M., Kakunoori, S., Wang, R., Van Der Kouwe, A. J. W., *et al.* Entorhinal verrucae geometry is coincident and correlates with Alzheimer's lesions: A combined neuropathology and high-resolution ex vivo MRI analysis. *Acta Neuropathol.* **123**, 85–96 (2012).
51. Duyckaerts, C., Hauw, J. J., Piette, F., Rainsard, C., Poulain, V., Berthaux, P., *et al.* Cortical atrophy in senile dementia of the Alzheimer type is mainly due to a decrease in cortical length. *Acta Neuropathol.* **66**, 72–74 (1985).
52. Fletcher, E., Raman, M., Huebner, P., Liu, A., Mungas, D., Carmichael, O., *et al.* Loss of fornix white matter volume as a predictor of cognitive impairment in cognitively normal elderly individuals. *JAMA Neurol.* **70**, 1389–1395 (2013).
53. Di Paola, M., Di Iulio, F., Cherubini, A., Blundo, C., Casini, A. R., Sancesario, G., *et al.* When, where, and how the corpus callosum changes in MCI and AD: A multimodal MRI study. *Neurology* **74**, 1136–1142 (2010).
54. Delaère, P., Duyckaerts, C., He, Y., Piette, F., Hauw, J. J. Subtypes and differential laminar distributions of β A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol.* **81**, 328–335 (1991).
55. Kovacs, G. Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 189 (2016).
56. Thal, D. R., Griffin, W. S. T., de Vos, R. A. I., Ghebremedhin, E. Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **115**, 599–609 (2008).
57. Attems, J., Lauda, F., Jellinger, K. A. Unexpectedly low prevalence of intracerebral hemorrhages in sporadic cerebral amyloid angiopathy: An autopsy study. *J. Neurol.* **255**, 70–76 (2008).
58. Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., Braak, H. Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* **58**, 1791–1800 (2002).
59. Duyckaerts, C. Tau pathology in children and young adults: Can you still be unconditionally baptist? *Acta Neuropathol.* **121**, 145–147 (2011).
60. Duyckaerts, C., Uchihara, T., Seilhean, D., He, Y., Hauw, J. J. Dissociation of Alzheimer type pathology in a disconnected piece of cortex. *Acta Neuropathol.* **93**, 501–507 (1997).
61. Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., *et al.* Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.* **11**, 909–913 (2009).
62. Braak, H., Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* **82**, 239–259 (1991).

63. Alafuzoff, I., Arzberger, T., Al-Sarraj, S., Bodi, I., Bogdanovic, N., Braak, H., *et al.* Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: A study of the BrainNet Europe consortium. *Brain Pathol.* **18**, 484–496 (2008).
64. Montine, T. J., Phelps, C. H., Beach, T. G., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Dickson, D. W., *et al.* National institute on aging-Alzheimer's association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: A practical approach. *Acta Neuropathol.* **123**, 1–11 (2012).
65. Mirra, S. S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S. M., Crain, B. J., Brownlee, L. M., *et al.* The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* **41**, 479–86 (1991).
66. Braak, H., Thal, D. R., Ghebremedhin, E., Del Tredici, K. Stages of the pathologic process in alzheimer disease: Age categories from 1 to 100 years. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **70**, 960–969 (2011).
67. National Institute on Aging. What Is Mild Cognitive Impairment? <https://www.nia.nih.gov/health/what-mild-cognitive-impairment> (2017).
68. McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., *et al.* The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **7**, 263–269 (2011).
69. Duker, A. P., Espay, A. J., Wszolek, Z. K., Rademakers, R., Dickson, D. W., Kelley, B. J. Atypical motor and behavioral presentations of Alzheimer disease a case-based approach. *Neurologist* **18**, 266–272 (2012).
70. Kouri, N., Whitwell, J. L., Josephs, K. A., Rademakers, R., Dickson, D. W. Corticobasal degeneration: A pathologically distinct 4R tauopathy. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 263–272 (2011).
71. Jung, Y., Duffy, J. R., Josephs, K. A. Primary progressive aphasia and apraxia of speech. *Semin. Neurol.* **33**, 342–347 (2013).
72. Tang-Wai, D. F., Graff-Radford, N. R., Boeve, B. F., Dickson, D. W., Parisi, J. E., Crook, R., *et al.* Clinical, genetic, and neuropathologic characteristics of posterior cortical atrophy. *Neurology* **63**, 1168–1174 (2004).
73. Nelson, P. T., Alafuzoff, I., Bigio, E. H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N. J., *et al.* Correlation of alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: A review of the literature. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **71**, 362–381 (2012).
74. Bereczki, E., Francis, P. T., Howlett, D., Pereira, J. B., Höglund, K., Bogstedt, A., *et al.* Synaptic proteins predict cognitive decline in Alzheimer's disease and Lewy body dementia. *Alzheimer's Dement.* **12**, 1149–1158 (2016).
75. Whitfield, D. R., Vallortigara, J., Alghamdi, A., Hortobágyi, T., Ballard, C., Thomas, A. J., *et al.* Depression and Synaptic Zinc Regulation in Alzheimer Disease, Dementia with Lewy Bodies, and Parkinson Disease Dementia. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **23**, 141–148 (2015).
76. Vik-Mo, A. O., Bencze, J., Ballard, C., Hortobágyi, T., Aarsland, D. Advanced cerebral amyloid angiopathy and small vessel disease are associated with psychosis in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **90**, 728–730 (2019).
77. Johnson, K. A., Fox, N. C., Sperling, R. A., Klunk, W. E. Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, (2012).

78. Sperling, R., Johnson, K. Biomarkers of alzheimer disease: Current and future applications to diagnostic criteria. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* **19**, 325–338 (2013).
79. Clark, C. M., Schneider, J. A., Bedell, B. J., Beach, T. G., Bilker, W. B., Mintun, M. A., *et al.* Use of florbetapir-PET for imaging β -amyloid pathology. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **305**, 275–283 (2011).
80. Bencze, J., Simon, V., Bereczki, E., Majer, R., Varkoly, G., Murnyák, B., *et al.* A Lewy-testes demencia klinikai és neuropatológiai jellemzői. *Orv. Hetil.* **158**, 643–652 (2017).
81. Érsek, K., Kovács, T., Wimo, A., Kárpati, K., Brodszky, V., Péntek, M., *et al.* Costs of dementia in Hungary. *J. Nutr. Heal. Aging* **14**, 633–639 (2010).
82. Mueller, C., Ballard, C., Corbett, A., Aarsland, D. Historical landmarks in dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurol.* **16**, 348 (2017).
83. Goedert, M., Spillantini, M. G., Del Tredici, K., Braak, H. 100 years of Lewy pathology. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 13–24 (2013).
84. Okazaki, H., Lipkin, L. E., Aronson, S. M. Diffuse intracytoplasmic ganglionic inclusions (Lewy type) associated with progressive dementia and quadriplegia in flexion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **20**, 237–44 (1961).
85. Woodard, J. S. Concentric hyaline inclusion body formation in mental disease analysis of twenty-seven cases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **21**, 442–449 (1962).
86. Kosaka, K., Yoshimura, M., Ikeda, K., Budka, H. Diffuse type of Lewy body disease: progressive dementia with abundant cortical Lewy bodies and senile changes of varying degree--a new disease? *Clin. Neuropathol.* **3**, 185–92 (1984).
87. McKeith, I. G., Galasko, D., Kosaka, K., Perry, E. K., Dickson, D. W., Hansen, L. A., *et al.* Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): Report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* **47**, 1113–1124 (1996).
88. Vann Jones, S. A., O'Brien, J. T. The prevalence and incidence of dementia with Lewy bodies: A systematic review of population and clinical studies. *Psychol. Med.* **44**, 673–683 (2014).
89. Hogan, D. B., Fiest, K. M., Roberts, J. I., Maxwell, C. J., Dykeman, J., Pringsheim, T., *et al.* The prevalence and incidence of dementia with lewy bodies: A systematic review. *Can. J. Neurol. Sci.* **43**, S83–S95 (2016).
90. Savica, R., Grossardt, B. R., Bower, J. H., Boeve, B. F., Ahlskog, J. E., Rocca, W. A. Incidence of dementia with Lewy bodies and Parkinson disease dementia. *JAMA Neurol.* **70**, 1396–1402 (2013).
91. Graff-Radford, N. R., Besser, L. M., Crook, J. E., Kukull, W. A., Dickson, D. W. Neuropathologic differences by race from the National Alzheimer's Coordinating Center. *Alzheimer's Dement.* **12**, 669–677 (2016).
92. Boot, B. P., Orr, C. F., Ahlskog, J. E., Ferman, T. J., Roberts, R., Pankratz, V. S., *et al.* Risk factors for dementia with Lewy bodies A case-control study. *Neurology* **81**, 833–840 (2013).
93. Tsuang, D. W., Dalan, A. M., Eugenio, C. J., Poorkaj, P., Limprasert, P., La Spada, A. R., *et al.* Familial dementia with lewy bodies: a clinical and neuropathological study of 2 families. *Arch. Neurol.* **59**, 1622–30 (2002).

94. Bogaerts, V., Engelborghs, S., Kumar-Singh, S., Goossens, D., Pickut, B., Van Der Zee, J., *et al.* A novel locus for dementia with Lewy bodies: A clinically and genetically heterogeneous disorder. *Brain* **130**, 2277–2291 (2007).
95. Chen, X., de Silva, H. A. R., Pettenati, M. J., Rao, P. N., George-Hyslop, P. St., Roses, A. D., *et al.* The human NACP/ α -synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3–q22 and TaqI RFLP analysis. *Genomics* **26**, 425–427 (1995).
96. Peters, O. M., Shelkownikova, T., Highley, J. R., Cooper-Knock, J., Hortobágyi, T., Troakes, C., *et al.* Gamma-synuclein pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2**, 29–37 (2015).
97. Papp, M. I., Kahn, J. E., Lantos, P. L. Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *J. Neurol. Sci.* **94**, 79–100 (1989).
98. McKeith, I. G., Boeve, B. F., Dickson, D. W., Halliday, G., Taylor, J. P., Weintraub, D., *et al.* Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies. *Neurology* **89**, 88–100 (2017).
99. Baek, J. H., Whitfield, D., Howlett, D., Francis, P., Bereczki, E., Ballard, C., *et al.* Unfolded protein response is activated in Lewy body dementias. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **42**, 352–365 (2016).
100. Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., Sulzer, D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* **305**, 1292–5 (2004).
101. Alghamdi, A., Vallortigara, J., Howlett, D. R., Broadstock, M., Hortobágyi, T., Ballard, C., *et al.* Reduction of RPT6/S8 (a Proteasome Component) and Proteasome Activity in the Cortex is Associated with Cognitive Impairment in Lewy Body Dementia. *J. Alzheimers. Dis.* **57**, 373–386 (2017).
102. Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., Olanow, C. W. Lewy body–like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson’s disease. *Nat. Med.* **14**, 504–506 (2008).
103. Luk, K. C., Lee, V. M. Y. Modeling Lewy pathology propagation in Parkinson’s disease. *Park. Relat. Disord.* **20**, S85–7 (2014).
104. Yu, S., Uéda, K., Chan, P. α -synuclein and dopamine metabolism. *Mol. Neurobiol.* **31**, 243–254 (2005).
105. Gao, N., Li, Y. H., Li, X., Yu, S., Fu, G. L., Chen, B. Effect of α -synuclein on the promoter activity of tyrosine hydroxylase gene. *Neurosci. Bull.* **23**, 53–57 (2007).
106. Butler, B., Saha, K., Rana, T., Becker, J. P., Sambo, D., Davari, P., *et al.* Dopamine transporter activity is modulated by α -synuclein. *J. Biol. Chem.* **290**, 29542–29554 (2015).
107. Tiraboschi, P., Hansen, L. A., Alford, M., Sabbagh, M. N., Schoos, B., Masliah, E., *et al.* Cholinergic dysfunction in diseases with Lewy bodies. *Neurology* **54**, 407–411 (2000).
108. Perry, E. K., Haroutunian, V., Davis, K. L., Levy, R., Lantos, P., Eagger, S., *et al.* Neocortical cholinergic activities differentiate lewy body dementia from classical Alzheimer’s disease. *Neuroreport* **5**, 747–749 (1994).
109. Rongve, A., Soennesyn, H., Skogseth, R., Oesterhus, R., Hortobágyi, T., Ballard, C., *et al.* Cognitive decline in dementia with Lewy bodies: a 5-year prospective cohort study. *BMJ Open* **6**, e010357 (2016).

110. Vallortigara, J., Whitfield, D., Quelch, W., Alghamdi, A., Howlett, D., Hortobágyi, T., *et al.* Decreased Levels of VAMP2 and Monomeric Alpha-Synuclein Correlate with Duration of Dementia. *J. Alzheimer's Dis.* **50**, 101–110 (2016).
111. Bereczki, E., Francis, P. T., Howlett, D., Pereira, J. B., Höglund, K., Bogstedt, A., *et al.* Synaptic proteins predict cognitive decline in Alzheimer's disease and Lewy body dementia. *Alzheimer's Dement.* **12**, 1149–1158 (2016).
112. Vallortigara, J., Rangarajan, S., Whitfield, D., Alghamdi, A., Howlett, D., Hortobágyi, T., *et al.* Dynamin1 concentration in the prefrontal cortex is associated with cognitive impairment in Lewy body dementia. *F1000Research* **3**, 108 (2014).
113. Whitfield, D. R., Vallortigara, J., Alghamdi, A., Howlett, D., Hortobágyi, T., Johnson, M., *et al.* Assessment of ZnT3 and PSD95 protein levels in Lewy body dementias and Alzheimer's disease: Association with cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* **35**, 2836–2844 (2014).
114. Nedelska, Z., Ferman, T. J., Boeve, B. F., Przybelski, S. A., Lesnick, T. G., Murray, M. E., *et al.* Pattern of brain atrophy rates in autopsy-confirmed dementia with Lewy bodies. *Neurobiol. Aging* **36**, 452–61 (2015).
115. Howlett, D. R., Whitfield, D., Johnson, M., Attems, J., O'Brien, J. T., Aarsland, D., *et al.* Regional Multiple Pathology Scores Are Associated with Cognitive Decline in Lewy Body Dementias. *Brain Pathol.* **25**, 401–408 (2015).
116. DelleDonne, A., Klos, K. J., Fujishiro, H., Ahmed, Z., Parisi, J. E., Josephs, K. A., *et al.* Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease. *Arch. Neurol.* **65**, 1074–80 (2008).
117. Borghammer, P., Van Den Berge, N. Brain-First versus Gut-First Parkinson's Disease: A Hypothesis. *J. Parkinsons. Dis.* **9**, S281–S295 (2019).
118. Aarsland, D., Ballard, C. G., Halliday, G. Are Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies the same entity? *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **17**, 137–45 (2004).
119. Kalman, J., Kalman, S., Pakaski, M. Demenciákhoz társuló viselkedési és pszichés zavarok felismerése és kezelése antipszichotikumokkal: a CATIE-AD vizsgálat tanulságai. *Neuropsychopharmacol. Hungarica* **10**, 233–248 (2008).
120. Ballard, C., Shaw, F., McKeith, I., Kenny, R. High prevalence of neurovascular instability in neurodegenerative dementias. *Neurology* **51**, 1760–2 (1998).
121. Galvin, J. E., Duda, J. E., Kaufer, D. I., Lippa, C. F., Taylor, A., Zarit, S. H. Lewy body dementia: the caregiver experience of clinical care. *Parkinsonism Relat. Disord.* **16**, 388–92 (2010).
122. Zweig, Y. R., Galvin, J. E. Lewy body dementia: the impact on patients and caregivers. *Alzheimers. Res. Ther.* **6**, 21 (2014).
123. Chow, N., Aarsland, D., Honarpisheh, H., Beyer, M. K., Somme, J. H., Elashoff, D., *et al.* Comparing Hippocampal Atrophy in Alzheimer's Dementia and Dementia with Lewy Bodies. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **34**, 44–50 (2012).
124. Hanyu, H., Tanaka, Y., Shimizu, S., Sakurai, H., Iwamoto, T., Abe, K. Differences in MR features of the substantia innominata between dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *J. Neurol.* **252**, 482–484 (2005).
125. Beyer, M. K., Larsen, J. P., Aarsland, D. Gray matter atrophy in Parkinson disease with dementia and dementia with Lewy bodies. *Neurology* **69**, 747–754 (2007).

126. Piggott, M. A., Marshall, E. F., Thomas, N., Lloyd, S., Court, J. A., Jaros, E., *et al.* Striatal dopaminergic markers in dementia with Lewy bodies, Alzheimer's and Parkinson's diseases: Rostrocaudal distribution. *Brain* **122**, 1449–1468 (1999).
127. Yoshita, M., Taki, J., Yamada, M. A clinical role for [123I]MIBG myocardial scintigraphy in the distinction between dementia of the Alzheimer's-type and dementia with Lewy bodies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **71**, 583–588 (2001).
128. Mak, E., Su, L., Williams, G. B., O'Brien, J. T. Neuroimaging characteristics of dementia with Lewy bodies. *Alzheimers. Res. Ther.* **6**, 18 (2014).
129. Shimada, H., Hirano, S., Shinotoh, H., Aotsuka, A., Sato, K., Tanaka, N., *et al.* Mapping of brain acetylcholinesterase alterations in Lewy body disease by PET. *Neurology* **73**, 273–8 (2009).
130. Kanemaru, K., Kameda, N., Yamanouchi, H. Decreased CSF amyloid beta42 and normal tau levels in dementia with Lewy bodies. *Neurology* **54**, 1875–1876 (2000).
131. Mollenhauer, B., Cepek, L., Bibl, M., Wiltfang, J., Schulz-Schaeffer, W. J., Ciesielczyk, B., *et al.* Tau protein, Aβ42 and S-100B protein in cerebrospinal fluid of patients with dementia with Lewy bodies. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **19**, 164–170 (2005).
132. Shi, M., Bradner, J., Hancock, A. M., Chung, K. A., Quinn, J. F., Peskind, E. R., *et al.* Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Ann. Neurol.* **69**, 570–580 (2011).
133. Kapaki, E., Paraskevas, G. P., Emmanouilidou, E., Vekrellis, K. The Diagnostic Value of CSF α-Synuclein in the Differential Diagnosis of Dementia with Lewy Bodies vs. Normal Subjects and Patients with Alzheimer's Disease. *PLoS One* **8**, e81654 (2013).
134. Campion, D., Flaman, J. M., Brice, A., Hannequin, D., Dubois, B., Martin, C., *et al.* Mutations of the presenilin I gene in families with early-onset alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 2373–2377 (1995).
135. Skogseth, R., Hortobágyi, T., Soennesyn, H., Chwiszczuk, L., Ffytche, D., Rongve, A., *et al.* Accuracy of clinical diagnosis of dementia with lewy bodies versus neuropathology. *J. Alzheimer's Dis.* **59**, 1139–1152 (2017).
136. Stinton, C., McKeith, I., Taylor, J.-P., Lafortune, L., Mioshi, E., Mak, E., *et al.* Pharmacological Management of Lewy Body Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am. J. Psychiatry* **172**, 731–742 (2015).
137. Walker, Z., Possin, K. L., Boeve, B. F., Aarsland, D. Lewy body dementias. *Lancet* **386**, 1683–1697 (2015).
138. Aarsland, D., Perry, R., Larsen, J. P., McKeith, I. G., O'Brien, J. T., Perry, E. K., *et al.* Neuroleptic sensitivity in Parkinson's disease and parkinsonian dementias. *J. Clin. Psychiatry* **66**, 633–7 (2005).
139. McCarter, S. J., Boswell, C. L., St. Louis, E. K., Dueffert, L. G., Slocumb, N., Boeve, B. F., *et al.* Treatment outcomes in REM sleep behavior disorder. *Sleep Med.* **14**, 237–242 (2013).
140. Kesavapany, S., Lau, K.-F., Ackerley, S., Banner, S. J., Shemilt, S. J. A., Cooper, J. D., *et al.* Identification of a novel, membrane-associated neuronal kinase, cyclin-dependent kinase 5/p35-regulated kinase. *J. Neurosci.* **23**, 4975–83 (2003).
141. Wang, H., Brautigam, D. L. A novel transmembrane Ser/Thr kinase complexes with protein phosphatase-1 and inhibitor-2. *J. Biol. Chem.* **277**, 49605–49612 (2002).

142. Kawa, S., Fujimoto, J., Tezuka, T., Nakazawa, T., Yamamoto, T. Involvement of BREK, a serine/threonine kinase enriched in brain, in NGF signalling. *Genes to Cells* **9**, 219–232 (2004).
143. Bencze, J., Mórotz, G. M., Seo, W., Bencs, V., Kálmán, J., Miller, C. C. J., *et al.* Biological function of Lemur tyrosine kinase 2 (LMTK2): implications in neurodegeneration. *Mol. Brain* **11**, 20 (2018).
144. Tomomura, M., Morita, N., Yoshikawa, F., Konishi, A., Akiyama, H., Furuichi, T., *et al.* Structural and functional analysis of the apoptosis-associated tyrosine kinase (AATYK) family. *Neuroscience* **148**, 510–521 (2007).
145. Kikuno, R., Nagase, T., Ishikawa, K. I., Hirose, M., Miyajima, N., Tanaka, A., *et al.* Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* **6**, 197–205 (1999).
146. Wang, H., Brautigan, D. L. Peptide Microarray Analysis of Substrate Specificity of the Transmembrane Ser/Thr Kinase KPI-2 Reveals Reactivity with Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator and Phosphorylase. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 2124–2130 (2006).
147. Nixon, A., Jia, Y., White, C., Bradbury, N. A. Determination of the membrane topology of lemur tyrosine kinase 2 (LMTK2) by fluorescence protease protection. *AJP Cell Physiol.* **304**, C164–C169 (2013).
148. Butler, E. C., Bradbury, N. A. Signal dependent ER export of lemur tyrosine kinase 2. *BMC Cell Biol.* **16**, (2015).
149. Spudich, G., Chibalina, M. V., Au, J. S. Y., Arden, S. D., Buss, F., Kendrick-Jones, J. Myosin VI targeting to clathrin-coated structures and dimerization is mediated by binding to Disabled-2 and PtdIns(4,5)P2. *Nat. Cell Biol.* **9**, 176–183 (2007).
150. Inoue, T., Kon, T., Ohkura, R., Yamakawa, H., Ohara, O., Yokota, J., *et al.* BREK/LMTK2 is a myosin VI-binding protein involved in endosomal membrane trafficking. *Genes to Cells* **13**, 483–495 (2008).
151. Chen, J. K., Tanaka, A., Schreiber, S. L., Lane, W. S., Braucr, A. W. Biased Combinatorial Libraries; Novel Ligands for the SH3 Domain of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12591–12592 (1993).
152. Ren, R., Mayer, B. J., Cicchetti, P., Baltimore, D. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science.* **259**, 1157–1161 (1993).
153. Mayer, B. J. The discovery of modular binding domains: Building blocks of cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 691–698 (2015).
154. Kurochkina, N., Guha, U. SH3 domains: Modules of protein-protein interactions. *Biophys. Rev.* **5**, 29–39 (2013).
155. Kawa, S., Ito, C., Toyama, Y., Maekawa, M., Tezuka, T., Nakamura, T., *et al.* Azoospermia in mice with targeted disruption of the Brek/Lmtk2 (brain-enriched kinase/lemur tyrosine kinase 2) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19344–19349 (2006).
156. Monaco, E. a 3Rd, Vallano, M. Lou. Role of protein kinases in neurodegenerative disease: cyclin-dependent kinases in Alzheimer's disease. *Front. Biosci.* **10**, 143–159 (2005).
157. Manser, C., Vagnoni, A., Guillot, F., Davies, J., Miller, C. C. J. Cdk5/p35 phosphorylates lemur tyrosine kinase-2 to regulate protein phosphatase-1C phosphorylation and activity. *J. Neurochem.* **121**, 343–348 (2012).

158. Shupp, A., Casimiro, M. C., Pestell, R. G. Biological functions of CDK5 and potential CDK5 targeted clinical treatments. *Oncotarget* **8**, 17373–17382 (2017).
159. Tsai, L.-H., Delalle, I., Caviness, V. S., Chae, T., Harlow, E. p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* **371**, 419–423 (1994).
160. Songyang, Z., Lu, K. P., Kwon, Y. T., Tsai, L.-H., Filhol, O., Cochet, C., *et al.* A Structural Basis for Substrate Specificities of Protein Ser/Thr Kinases: Primary Sequence Preference of Casein Kinases I and II, NIMA, Phosphorylase Kinase, Calmodulin- Dependent Kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6486–6493 (1996).
161. Cohen, P. T. W. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J. Cell Sci.* **115**, 241–256 (2002).
162. Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M. J., Beullens, M. The extended PP1 toolkit: Designed to create specificity. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 450–458 (2010).
163. Hendrickx, A., Beullens, M., Ceulemans, H., Den Abt, T., Van Eynde, A., Nicolaescu, E., *et al.* Docking Motif-Guided Mapping of the Interactome of Protein Phosphatase-1. *Chem. Biol.* **16**, 365–371 (2009).
164. Manser, C., Guillot, F., Vagnoni, A., Davies, J., Lau, K. F., McLoughlin, D. M., *et al.* Lemur tyrosine kinase-2 signalling regulates kinesin-1 light chain-2 phosphorylation and binding of Smad2 cargo. *Oncogene* **31**, 2773–2782 (2012).
165. De Vos, K. J., Grierson, A. J., Ackerley, S., Miller, C. C. J. Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 151–173 (2008).
166. Hirokawa, N., Niwa, S., Tanaka, Y. Molecular motors in neurons: Transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* **68**, 610–638 (2010).
167. Mórotz, G. M., Glennon, E. B., Gomez-Suaga, P., Lau, D. H. W., Robinson, E. D., Sedlák, É., *et al.* LMTK2 binds to kinesin light chains to mediate anterograde axonal transport of cdk5/p35 and LMTK2 levels are reduced in Alzheimer’s disease brains. *Acta Neuropathol. Commun.* **7**, 73 (2019).
168. Chibalina, M. V., Seaman, M. N. J., Miller, C. C., Kendrick-Jones, J., Buss, F. Myosin VI and its interacting protein LMTK2 regulate tubule formation and transport to the endocytic recycling compartment. *J. Cell Sci.* **120**, 4278–4288 (2007).
169. Gregory, R. J., Cheng, S. H., Rich, D. P., Marshall, J., Paul, S., Hehir, K., *et al.* Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* **347**, 382–386 (1990).
170. Luz, S., Cihil, K. M., Brautigan, D. L., Amaral, M. D., Farinha, C. M., Swiatecka-Urban, A. LMTK2-mediated phosphorylation regulates CFTR endocytosis in human airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **289**, 15080–15093 (2014).
171. Haag, T., Herkt, C. E., Walesch, S. K., Richter, A. M., Dammann, R. H. The apoptosis associated tyrosine kinase gene is frequently hypermethylated in human cancer and is regulated by epigenetic mechanisms. *Genes Cancer* **5**, 365–74 (2014).
172. Liu, X., Jia, Y., Stoopler, M. B., Shen, Y., Cheng, H., Chen, J., *et al.* Next-generation sequencing of pulmonary sarcomatoid carcinoma reveals high frequency of actionable MET gene mutations. *J. Clin. Oncol.* **34**, 794–802 (2016).

173. Seo, J. S., Ju, Y. S., Lee, W. C., Shin, J. Y., Lee, J. K., Bleazard, T., *et al.* The transcriptional landscape and mutational profile of lung adenocarcinoma. *Genome Res.* **22**, 2109–2119 (2012).
174. Eeles, R. A., Kote-Jarai, Z., Giles, G. G., Olama, A. A. Al, Guy, M., Jugurnauth, S. K., *et al.* Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat. Genet.* **40**, 316–321 (2008).
175. Harries, L. W., Perry, J. R., McCullagh, P., Crundwell, M. Alterations in LMTK2, MSMB and HNF1B gene expression are associated with the development of prostate cancer. *BMC Cancer* **10**, 315 (2010).
176. Puri, C., Chibalina, M. V., Arden, S. D., Kruppa, A. J., Kendrick-Jones, J., Buss, F. Overexpression of myosin VI in prostate cancer cells enhances PSA and VEGF secretion, but has no effect on endocytosis. *Oncogene* **29**, 188–200 (2010).
177. Shah, K., Bradbury, N. A. Kinase Modulation of Androgen Receptor Signaling: Implications for Prostate Cancer. *Cancer Cell Microenviron.* **2**, 1–8 (2015).
178. Conti, A., Majorini, M. T., Fontanella, E., Bardelli, A., Giacca, M., Delia, D., *et al.* Lemur tyrosine kinase 2 (LMTK2) is a determinant of cell sensitivity to apoptosis by regulating the levels of the BCL2 family members. *Cancer Lett.* **389**, 59–69 (2017).
179. Pozo, K., Castro-Rivera, E., Tan, C., Plattner, F., Schwach, G., Siegl, V., *et al.* The Role of Cdk5 in Neuroendocrine Thyroid Cancer. *Cancer Cell* **24**, 499–511 (2013).
180. Shah, K., Bradbury, N. A. Lemur Tyrosine Kinase 2, a novel target in prostate cancer therapy. *Oncotarget* **6**, 14233–46 (2015).
181. Bencze, J., Szarka, M., Bencs, V., Szabó, R. N., Smajda, M., Aarsland, D., *et al.* Neuropathological characterization of Lemur tyrosine kinase 2 (LMTK2) in Alzheimer’s disease and neocortical Lewy body disease. *Sci. Rep.* **9**, 17222 (2019).
182. Labno, Christine (University of Chicago, I. L. M. C. Basic Intensity Quantification with ImageJ.
183. Bencze, Szarka, Bencs, Szabó, Módis, Aarsland, *et al.* Lemur Tyrosine Kinase 2 (LMTK2) Level Inversely Correlates with Phospho-Tau in Neuropathological Stages of Alzheimer’s Disease. *Brain Sci.* **10**, 68 (2020).
184. Tissue expression of LMTK2 - Staining in cerebral cortex - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000164715-LMTK2/tissue/cerebral+cortex>.
185. Matarin, M., Salih, D. A., Yasvoina, M., Cummings, D. M., Guelfi, S., Liu, W., *et al.* A Genome-wide gene-expression analysis and database in transgenic mice during development of amyloid or tau pathology. *Cell Rep.* **10**, 633–645 (2015).
186. Morfini, G., Szebenyi, G., Elluru, R., Ratner, N., Brady, S. T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J.* **21**, 281–293 (2002).
187. Morfini, G., Szebenyi, G., Brown, H., Pant, H. C., Pigino, G., DeBoer, S., *et al.* A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO J.* **23**, 2235–45 (2004).
188. Batut, J., Howell, M., Hill, C. S. Kinesin-Mediated Transport of Smad2 Is Required for Signaling in Response to TGF- β Ligands. *Dev. Cell* **12**, 261–274 (2007).

189. Hill, C. S. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. *Cell Res.* **19**, 36–46 (2009).
190. Katsuno, M., Adachi, H., Banno, H., Suzuki, K., Tanaka, F., Sobue, G. Transforming growth factor- β signaling in motor neuron diseases. *Curr. Mol. Med.* **11**, 48–56 (2011).
191. Town, T., Laouar, Y., Pittenger, C., Mori, T., Szekely, C. A., Tan, J., *et al.* Blocking TGF- β -Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nat. Med.* **14**, 681–687 (2008).
192. Feng, D. D., Cai, W., Chen, X., Bajaj, A., Driver, J., Schernhammer, E., *et al.* The associations between Parkinson's disease and cancer: the plot thickens. *Transl. Neurodegener.* **4**, 20 (2015).
193. Plattner, F., Angelo, M., Giese, K. P. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 25457–25465 (2006).
194. Wen, Y., Planel, E., Herman, M., Figueroa, H. Y., Wang, L., Liu, L., *et al.* Interplay between cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 β mediated by neuregulin signaling leads to differential effects on tau phosphorylation and amyloid precursor protein processing. *J. Neurosci.* **28**, 2624–2632 (2008).
195. Kusakawa, G. I., Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto, T., Hisanaga, S. I. Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J. Biol. Chem.* **275**, 17166–17172 (2000).
196. Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., De La Monte, S., Dikkes, P., Tsai, L. H. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**, 615–622 (1999).
197. Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M., Tsai, L. H. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* **405**, 360–364 (2000).
198. Nath, R., Davis, M., Probert, A. W., Kupina, N. C., Ren, X., Schielke, G. P., *et al.* Processing of cdk5 activator p35 to its truncated form (p25) by calpain in acutely injured neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 16–21 (2000).
199. Peterson, D. W., Ando, D. M., Taketa, D. A., Zhou, H., Dahlquist, F. W., Lew, J. No difference in kinetics of tau or histone phosphorylation by CDK5/p25 versus CDK5/p35 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2884–2889 (2010).
200. Patrick, G. N., Zhou, P., Kwon, Y. T., Howley, P. M., Tsai, L. H. p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 24057–24064 (1998).
201. Engmann, O., Hortobágyi, T., Thompson, A. J., Guadagno, J., Troakes, C., Soriano, S., *et al.* Cyclin-dependent kinase 5 activator p25 is generated during memory formation and is reduced at an early stage in Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* **70**, 159–168 (2011).
202. Engidawork, E., Gulesserian, T., Seidl, R., Cairns, N., Lubec, G. Expression of apoptosis related proteins in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **303**, 79–82 (2001).
203. Guo, Q., Sopher, B. L., Furukawa, K., Pham, D. G., Robinson, N., Martin, G. M., *et al.* Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J. Neurosci.* **17**, 4212–4222 (1997).
204. Frade, J. M., Ovejero-Benito, M. C. Neuronal cell cycle: The neuron itself and its circumstances. *Cell Cycle* **14**, 712–720 (2015).

205. Ahn, K. W., Joo, Y., Choi, Y., Kim, M., Lee, S. H., Cha, S. H., *et al.* Swedish amyloid precursor protein mutation increases cell cycle-related proteins in vitro and in vivo. *J. Neurosci. Res.* **86**, 2476–2487 (2008).
206. Giovanni, A., Wirtz-Brugger, F., Keramaris, E., Slack, R., Park, D. S. Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F x DP, in B-amyloid-induced neuronal death. *J. Biol. Chem.* **274**, 19011–6 (1999).
207. Becker, E. B. E., Bonni, A. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Prog. Neurobiol.* **72**, 1–25 (2004).
208. Liu, D. X., Greene, L. A. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell Tissue Res.* **305**, 217–228 (2001).
209. Houck, A. L., Seddighi, S., Driver, J. A. At the Crossroads Between Neurodegeneration and Cancer: A Review of Overlapping Biology and Its Implications. *Curr. Aging Sci.* **11**, 77–89 (2018).
210. Plun-Favreau, H., Lewis, P. A., Hardy, J., Martins, L. M., Wood, N. W. Cancer and Neurodegeneration: Between the Devil and the Deep Blue Sea. *PLoS Genet.* **6**, e1001257 (2010).
211. Du, L., Pertsemliadis, A. Cancer and neurodegenerative disorders: pathogenic convergence through microRNA regulation. *J. Mol. Cell Biol.* **3**, 176–180 (2011).
212. Shah, K., Bradbury, N. A. Kinase Modulation of Androgen Receptor Signaling: Implications for Prostate Cancer. *Cancer Cell Microenviron.* **2**, (2015).
213. Konishi, Y., Lehtinen, M., Donovan, N., Bonni, A. Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cycle to the cell death machinery. *Mol. Cell* **9**, 1005–1016 (2002).
214. Park, D. S., Farinell, S. E., Greene, L. A. Inhibitors of cyclin-dependent kinases promote survival of post-mitotic neuronally differentiated PC12 cells and sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* **271**, 8161–8169 (1996).
215. Copani, A., Condorelli, F., Caruso, A., Vancheri, C. Mitotic signaling by β -amyloid causes neuronal death. *FASEB J.* **13**, 2225–34 (1999).
216. Park, D. S., Levine, B., Ferrari, G., Greene, L. A. Cyclin dependent kinase inhibitors and dominant negative cyclin dependent kinase 4 and 6 promote survival of NGF-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci* **17**, 8975–8983 (1997).
217. Freeman, R. S., Estus, S., Johnson, E. M. Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: Selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* **12**, 343–355 (1994).
218. Padmanabhan, J., Park, D. S., Greene, L. A., Shelanski, M. L. Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *J. Neurosci.* **19**, 8747–56 (1999).
219. Harbour, J. W., Dean, D. C. The Rb/E2F pathway: Expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* **14**, 2393–2409 (2000).
220. Liu, D. X., Greene, L. A. Regulation of neuronal survival and death by E2F-dependent gene repression and derepression. *Neuron* **32**, 425–38 (2001).
221. Bao, H., Gao, M. Overexpression of lemur tyrosine kinase-2 protects neurons from oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury through reinforcement of Nrf2 signaling by modulating GSK-3 β phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **521**, 964–970 (2019).

222. Alafuzoff, I., Gelpi, E., Al-Sarraj, S., Arzberger, T., Attems, J., Bodi, I., *et al.* The need to unify neuropathological assessments of vascular alterations in the ageing brain. Multicentre survey by the BrainNet Europe consortium. *Exp. Gerontol.* **47**, 825–833 (2012).
223. McAleese, K. E., Alafuzoff, I., Charidimou, A., De Reuck, J., Grinberg, L. T., Hainsworth, A. H., *et al.* Post-mortem assessment in vascular dementia: Advances and aspirations. *BMC Med.* **14**, (2016).
224. Skrobot, O. A., Attems, J., Esiri, M., Hortobágyi, T., Ironside, J. W., Kalaria, R. N., *et al.* Vascular cognitive impairment neuropathology guidelines (VCING): the contribution of cerebrovascular pathology to cognitive impairment. *Brain* **139**, 2957–2969 (2016).
225. Dey, I., Bradbury, N. A. Activation of TPA-response element present in human Lemur Tyrosine Kinase 2 (*lmtk2*) gene increases its expression. *Biochem. Biophys. Reports* **12**, 140–150 (2017).

12. 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 Pathológiai 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 Pathológiai 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.

13. 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, GINOP-2.3.2-15-2016-00043, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, NKFIH-SNN-132999, MTA-DE Cerebrovaszkuláris és Neurodegeneratív Kutatócsoport, valamint a DE ÁOK Tudományfinanszírozás támogatásával valósult meg.

14. 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

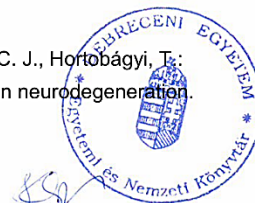
Jelölt: Bencze János
Neptun kód: WD33S7
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

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., Murányi, 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., Kővári, 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., Woulfe, 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.

