**Válasz dr. Krenács Tibornak a feltett opponensi kérdéseire:**

Hálásan köszönöm Krenács Tibor bírálói munkáját és köszönöm pozitív véleményét.

Feltett megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

**A formai és szakmai kritikai megjegyzések:**

A táblázatok és ábrák áttekinthetőségével kapcsolatban tett megjegyzésével egyetértek. Sajnos az 5. táblázat, amiben kifogásolhatóak az egyes jelzések (csillag, vagy +) hasonlóan az összes ábrához az eredeti publikációban megjelent táblázatok és ábrák alapján lettek újragépelve, ennek ellenére is kevésbé látható maradt.

A 49. ábra immunhisztokémiai feldolgozását Londonban végezték el, így az ottani laboratóriumból kapott képek minőségén, sajnos nem volt módunk változtatni. A specifikus nukleáris WEE1 reakció megítélését az ott dolgozó patológus kollégák végezték.

A néhol következetlen, pontatlan, vagy félreérthető megfogalmazásáért valamint a latinos (vagy angol) és magyaros írásmód keveredéséért elnézést kérek. Kiemelném a 19. oldalon talán félreérthető a menin GFAP és vimentin kapcsolatáról írt mondatot. A kifogásolt mondat „Kimutatták, hogy a GFAP az intermedier filamentum része”… hivatkozik az előző mondatra, amiben a menin funkciójáról írtam: „Bár a menin alapvetően nukleáris lokalizációjú fehérje, több munkacsoport beszámolt a menin citoplazmában való szekvesztrációjáról [22–24]. Kimutatták, hogy a GFAP (gliális fibrilláris savas protein) az intermedier filamentum (IF) része, melyben a vimentin az egyik fő alkotóelem”. Érzésem szerint ebben nem állítottam, hogy ez a mi munkánk lenne, végig harmadik személyben fogalmaztam és a szükséges referenciákat is hivatkoztam. Bízom benne, hogy ez nem félreérthető.

Egyetértek a bírálóval abban, hogy a 91. old. Bemutatott, „A mitokondriális metabolikus aktivitást jelző alamarBlue inkább életképesség, mint proliferáció mérésére alkalmas, bár kétségtelen, hogy ha párhuzamosan az pusztuló apoptotikus frakciót is méri, az alamarBlue teszt mutathat összefüggést a sejtvisszapótlás mértékével. Munkánkban során egyidejűleg meghatározásra került az apoptózis mértéke, valamint a sejtciklus vizsgálata is, amely eredményeket a 68. ábra tartalmazza.

A Vybrant DyeCycle Orange festéknek a sejtvonalak életképességére és a sejtciklus funkcióira gyakorolt hatását több módon elemeztük. A jelzett festékkel elválasztott sejtekből izolált RNS minősége megegyezett a festékkel nem jelzett sejtekével. A három különböző sejtvonalból készített teljes genomos génexpressziós mérés adataival elvégzett bioinformatikai útvonal-analízis mindhárom esetben a sejtciklussal szorosan összefüggő biológiai útvonalakat (a “sejtciklus”, a “sejtszintű összeszerelés és elrendezés” valamint a “DNS replikáció, rekombináció és javítás”) mutatott, szemben a szinkronizációs eljárást követő génexpressziós mintázatokkal, ahol a szinkronizálásra specifikus gének által meghatározott folyamatok közül kiemelendőek voltak a ”DNS javítás”, ”DNS károsodásra adott válasz” és a ”sejtszintű stressz-válasz” folyamatok, arra utalva, hogy a szinkronizációs eljárások az általunk kifejlesztett sejtválogatásnál nagyobb mértékben befolyásolják a sejtek életképességét. A sikeres sejtválogatást minden esetben egy kontroll áramlási citometriás mérés követett, amelynek során a sejtciklus újra elemzésére került sor.

Egyetértek a bírálóval a Menin immunhisztokémiai kimutatáshoz írt megjegyzésével.

Természetesen szintén helyes a megállapítás, hogy a mitokondrium diszfunkció az SDH funkcióvesztés következménye (113. old.).

A 167. oldalon kifogásolt mondatban, ahol a sejtciklus szinkronizált egyébként tenyészetben proliferáló, ”HDFa sejtekben statisztikai analízis nem detektált szignifikánsan eltérő gént”, arra vonatkozott, hogy a teljes genomos génexpressziós mérés, a szigorú, poszthoc teszttel kiegészített statisztikai eljárás nem mutatott szignifikáns géneltérést, de a 61. ábrán bemutatott egyedi génexpressziós mérések igazolták, azokat a szignifikáns összefüggéseket, amelyeket a 2 daganatos sejtvonalban már a microarray mérések is kimutattak.

A 172. oldalon bemutatott mellékvesekéregrák malignitás-mintázatának vizsgálatához a kutatócsoport korábban elvégzett mellékvesedaganatok feldolgozása mellett két másik tanulmányból elérhető génexpressziós adatokat elemeztük. Összesen 216 mellékvesedaganat génexpressziós mintázata volt elérhető. Az RRM2 expresszió validáláshoz 12 mellékvesekéregrák vizsgálatát végeztük el.

**További kérdések és az arra adott válaszok:**

1. A keringő hsa-miR-483-5p szint szignifikáns összefüggését találta a mellékvesekéreg karcinomák megjelenésével. Ismert, hogy a mikro-RNS-ek számtalan célponttal rendelkeznek, ezért adódik a kérdés, hogy pl. a miR-483-5p részt vesz-e egyéb, pl. gyulladásos, vagy regeneratív folyamatok szabályozásában is és ha igen, mennyiben befolyásolja ez biomarkerként a mellékvesekéreg karcinomákra vonatkozó specificitását? Ha nem, akkor femerülhet-e terápiás célpontként, jelentősebb mellékhatások nélkül?

Válasz: Köszönöm a bíráló kérdését. A mikroRNS-ek valóban redundáns hatással bírnak, egy mikroRNS számos célgénnek az expresszióját képes befolyásolni. A miR-483-5p az IGF2-t kódoló gén intronjában található és mint ilyen fokozott expresszióját a rosszindulatú mellékvesekéreg daganatokban várhattuk is, hiszen az IGF2 overexpresszió volt az első biztos genetikai marker ezekben a daganatokban. Erről a mikroRNS-ről viszonylag kevés validált célgén ismert, de pl. a TGFβ-1 expressziót befolyásolta chondrocitákban ([Xu R](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Xu%20R%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=28924102) és mtsai. MicroRNA-483-5p Modulates the Expression of Cartilage-Related Genes in Human Chondrocytes through Down-Regulating TGF-â1 Expression. [Tohoku J Exp Med.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28924102) 2017 Sep;243(1):41-48.). és az RBM5 tumorszuppresszor gén expresszióját prosztata carcinoma sejtvonalakban ([Yang ZG](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yang%20ZG%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=28727371) és mtsai: miR-483-5p promotes prostate cancer cell proliferation and invasion by targeting RBM5. [Int Braz J Urol.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28727371) 2017 Nov-Dec;43(6):1060-1067.). A diagnosztikában történő alkalmazására irányulva fontos megfigyelésünk volt, hogy a keringésből is kimutatható, jól mérhető és expresszióját nem befolyásolják azok a hormon tesztek, amelyeket a mellékvesedaganatos betegek endokrinológiai kivizsgálása során alkalmaznak, így biomarkerként történő használata továbbra is indokolt lehet.

Terápiás célpontként történő alkalmazásának a korlátja elsősorban a mellékvesekéregbe történő célzott bejuttatása tűnik. Jelenleg nem találtam olyan munkát, amely ennek a mikroRNS-nek a gátlását alkalmazná terápia fejlesztés céljára.

1. A TGFb mikro-RNS szabályozása mutat-e átfedést más szolid tumorok kialakulásához, progressziójához, vagy teljesen más a mikro-RNA profiljuk, mint az endokrin daganatokban?

# Válasz: Nagyon köszönöm a kérdést. Az endokrin daganatok mikroRNS mintázata eltér a többi szolid tumorban kimutatott mikroRNS profiltól hiszen a mikroRNS egyik fő jellegzetessége a sejt/szövet-specificitás. Természetesen egyes jól karakterizált mikroRNS-ek, mint pl. az elsősorban onkomir hatású miR-21, miR-155, vagy a főleg tumorszuppresszor mikroRNS-ek mint pl. a let-7 család vagy miR-15, miR-16 ugyanolyan mintázatot mutatnak az endokrin daganatokban mint a szolid tumorokban. Ezek közül a TGFβ család tagjai expresszióját is befolyásoló mikroRNS a miR-21 a TGFβR2, TGFβR3, BMPR2-t célozza U251 és U87 glioblastoma sejtekben és leiomyomában és a SMAD7-t tüdőben és májszövetben, a miR-155 a SMAD5 expresszióját gátolja elsősorban diffúz nagy B-sejtes limfómában, míg a SMAD1-t Burkitt limfómában. Természetesen a kapcsolat a TGFβ és mikroRNS-ek között sem egyirányú. Számos olyan mikroRNS ismert, amelyek expressziója TGF kezelést követően változik. A korábban említett mikroRNS-ek közül a miR-155 expressziója tüdő fibroblasztokban, a miR-21 emlőrákban és a vese tubulus epitél sejtekben indukálódott TGF adást követően. A TGFβ és mikroRNS-ek közötti bidirekcionális kapcsolatról a Trends is Pharmaceutical Science-ben közöltünk összefoglaló tanulmányt. ([Butz H](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Butz%20H%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22613783), [Rácz K](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=R%C3%A1cz%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22613783), [Hunyady L](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hunyady%20L%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22613783), [Patócs A](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pat%C3%B3cs%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22613783). Crosstalk between TGF-β signaling and the microRNA machinery. [Trends Pharmacol Sci.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=butz+H+and+trends) 2012 Jul;33(7):382-93.

1. Az SDH ill. VHL génmutációk miatt felszaporodó szukcinát és PHD enzim (és egyéb metabolikus enzimek) gátlása következtében kialakuló oxidatív foszforiláció tökéletlensége, egyensúly megbomlása, valamint a HIF1a aktivitás befolyásolja-e esetleg felerősíti a glikolitikus aktivitást ezekben a daganatokban, mint az számos, malignus szolid tumorban előfordul?

Válasz: Nagyon köszönöm a kérdést. Igen, ezekben a daganatokban is megfigyelhető a HIF1α stabilizálódása és célgénjeinek fokozott expressziója. Dahia és mtsai. mutatták ki először teljes genomos génexpressziós vizsgálatokkal a *VHL* és *SDHx* asszociált daganatok génexpressziós mintázatának hasonlóságát, amelynek vezető markere a HIF1α overexpresszió és a glikolízis fokozódása volt ezekben a daganatokban összehasonlítva a *RET* és az *NF1* génmutációkhoz társult daganatokhoz viszonyítva. (Dahia PL, et al.: HIF1alpha regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas.PLoS Genet. 2005 Jul; 1(1):72-80.). Ezt követően számos tanulmány igazolta ezt a jelenséget, azonban továbbra is nyitott az a kérdés, hogy mi vezethet az SDH alegységen belüli génekhez társult eltérő fenotípusok megjelenéséhez, pl. miért az *SDHB* mutációk okoznak malignus pragangliómát. Ennek tisztázása és a metabolikus jellegzetességek tisztázása jelenleg is kutatócsoportom egyik fő témája.

1. Mi a magyarázata és milyen körülmények között mehet végbe egyes ciklinek nélkül is a teljes sejtciklus, milyen faktorok helyettesítik ilyenkor a ciklin-függő kinázokat (CDK4/6, ill. CDK2)?

Válasz: Hálásan köszönöm a nagyon izgalmas kérdést. A sejtciklus szigorú szabályozására és az egyes ciklinek valamint ciklin dependens kinázok kizárólagos szerepére vonatkozó alapelvek a 2003-as évben kérdőjeleződtek meg. Ebben az évben két munkacsoport is bebizonyította, hogy mind a Cdk2 (Ortega [Nat Genet.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=ortega+and+CDK2+and+nature+genetics) 2003 Sep;35(1):25-31) mind pedig a Ciklin E1 (Geng et al. Cell. 2003; 114: 431–443) hiányos egerek is életképesek és több mint két évig túlélnek, látható szervi elégtelenség nélkül. Ezek a tanulmányok bizonyították elsőre, hogy a sejtciklus szabályozásában redundáns szerepük lehet a különböző ciklin dependens kinázoknak és számos kompenzatórikus mechanizmus biztosítja a sejtciklus végbemenését. A CDK4 és CDK6 fehérjék 71%-ban megegyező aminosav szekvenciával rendelkeznek a szubsztrát specificitásuk is hasonló, a D típusú ciklineket foszforilálják. A CDK4-/- egér életképes, csak a testméretek és szerveinek mérete kisebb a vad típusú egérhez képest. A CDK6-/- egérben csak a nőstény mérete volt kisebb a vad típushoz képest, és a hematopoiesis károsodása figyelhető meg. Ezek alapján a két CDK egymás funkcióját kompenzálhatja a másik hiánya esetén. A CDK4/6-hoz hasonlóan a CDK2 funkciójának kompenzációját is el tudja végezni a CDK4 vagy CDK6, ami szintén a sejtciklus korai G1 fázisában játszik szerepet és a D típusú ciklineket foszforilálja. A CDK2 hiányában a CDK1 köti az E ciklint és biztosítja a G1/S átmenetet (Aleem et al. Nat Cell Biol 2005; 7:831-6.). Mindezen eredmények alapján a CDK1 tűnik az egyetlen nélkülözhetetlen ciklin dependens kináznak.

1. A sejtciklus promoter fehérjék emelkedett expressziója a daganatok forkozott sejtciklus progressziójára utal. Milyen okokra vezethető vissza, hogy a ciklin-függő kináz inhibitor p21waf1 fokozott kifejeződését is megfigyelték számos malignus daganattípusban?

Válasz: Nagyon köszönöm a szintén fontos és érdekes kérdést. A p21 egy ciklin-dependens kináz inhibitor, amelynek legfontosabb szerepe a sejtek védelme a genotoxikus stresszel szemben és a p53-nak a fő transzkripciós célgénje. A sejten belül komplex funkciója van; a sejtmagban a CDK1, CDK2 kinázhoz kötődve gátolja azok funkcióját ezáltal blokkolja a sejtciklus G1/S átmenetét vagy a G2-ből a mitózist. Elsődleges szerepe a károsodott DNS kijavítása, ezen belül is elsősorban a két szálú DNS-törések valamint azoknak a DNS szakaszoknak a kijavítása, amikor több, egymáshoz közeli nukleotidokat érint a károsodás. Ugyanakkor a sejttípustól, az intracellularis lokalizációtól, a p53 státusztól és a genotoxikus stressz mértékétől függően tumorgátló és tumorindukáló szerepe is lehet, amit a p53 vagy p53-hiányos környezet határoz meg. Olyan állapotokban, amikor a p53 hiány, vagy mutáns p53 mellett a p21 expresszió is jelen van, a sejtek egy részében egy agresszív, kemoterápia-rezisztens sejt populáció szelektálása történhet meg. Ez elsősorban a nagy genom instabilitást mutató rákok esetében figyelhető meg ([Georgakilas AG](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Georgakilas%20AG%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=28279624), [Martin OA](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Martin%20OA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=28279624), [Bonner WM](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bonner%20WM%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=28279624).p21: A Two-Faced Genome Guardian. [Trends Mol Med.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28279624) 2017 Apr;23(4):310-319. ) Szintén fontos megfigyelés, hogy számos ráktípusban pl. emlő és vastagbél carcinomában a p21 expresszió megvédte a rákos sejteket sugárzás vagy kemoterápiás szerek által indukált apoptózis általi sejthaláltól (S.Q. Xu, W.S. El-Deiryp21(WAF1/CIP1) inhibits initiator caspase cleavage by TRAIL death receptor DR4 Biochemical and Biophysical Research Communications, 269 (2000), pp. 179-190). Ezekhez kapcsolódva immunhisztokémia vizsgálatokkal igazolták, hogy a fokozott p21 expresszió összefüggést mutatott a rossz túléléssel gliómák, prosztatarák, cervix, petefészek és nyelőcsőrák esetében. A daganat-promotáló hatás oka lehet még a p21 sejten belüli lokalizációja is. A citoplazmában található p21 elsősorban antiapoptótikus hatással míg a sejtmagban található p21 esetén inkább a sejtosztódást gátló hatása dominál. (T.R. Gawriluk, *et al.*Comparative analysis of ear-hole closure identifies epimorphic regeneration as a discrete trait in mammals Nature Communications, 7 (2016), p. 11164). Ehhez kapcsolódva igazolták, hogy a rákos sejtek az ép sejtektől eltérően a citoplazmájukban tárolják a sejtciklus reguláló fehérjék (E ciklin, CDK2, p21 és p27) mennyiségének több mint felét, így szintén alátámasztva az intracellularis lokalizáció fontosságát a sejt sorsának eldöntésében. (G. Orend, *et al.*Cytoplasmic displacement of cyclin E-cdk2 inhibitors p21Cip1 and p27Kip1 in anchorage-independent cells Oncogene, 16 (1998), pp. 2575-2583).

1. A mellékvesekéreg adenomákban kialakulásában a MEN1 gén szerepét csekélynek jelzi, ugyanakkor mások beszámolnak a gént tartalmazó 11q13 régió elvesztéséről? Kiderült-e azóta, hogy milyen más tumorszupresszor gén van ebben a régióban, aminek elvesztése kapcsolatba hozható az adenomák kialakulásával?

Válasz: Köszönöm a bírálónak a nagyon fontos kérdést. A válasz röviden nem, nem derült ki mindezidáig, hogy milyen egyéb gén(ek) lehetnek felelősek a mellékvesekéreg adenómák kialakulásért. [Fernandez-Ranvier GG](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Fernandez-Ranvier%20GG%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18324346)Affymetrix GeneChip (U133 plus 2.0) microarray módszerrel 54 (11 rák és 33 adenóma) daganat elemzését végezte el, amelynek során 25 gént találtak, ebben a régióban amelyek elkülönítik a jó és rossz daganatokat. Olyan vizsgálat, ami fókuszáltan ezt a régiót vizsgálta volna a jóindulatú daganatokban az ép mellékveséhez képest nem került publikálásra.

1. Gemcitabin hatására az apototikus sejtfrakció szignifikánsan megnövekszik, ugyanakkor a végkonkluzióban azt mondja, hogy a kezelés hatására megemelkedő RRM2 szint a terápiával szembeni kemorezisztencia fokozódására utal. Hogyan oldható fel ez az ellentmondás?

Válasz: Nagyon köszönöm a kérdést. Munkánk során vizsgáltuk a gemcitabin, a mitotán és a 9-cisz-retinsav önálló és kombinációs hatásait is a sejtek proliferációjára, apoptózisára, a sejtciklus fázisainak eloszlására valamint az RRM2 expresszióra nézve. Kimutattuk, hogy mindegyik kezelés csökkentette a sejtek proliferációját, a gemcitabin kezelés már korábbi időpontokban és nagyobb mértékben csökkentette a proliferációt, amelynek hátterében a gemcitabin apoptózist serkentő szerepe állhat. Ugyanakkor a gemcitabin önmagában és kombinációban adva is emelte az RRM2 mennyiségét, ami irodalmi adatok alapján a rossz prognózissal és a kemorezisztánciával mutatott összefüggést, amit az RRM2 siRNS vagy mikroRNS-el történő csendesítése után sikerült feloldaniuk. Tulajdonképpen ezek a megfigyelések vezettek ehhez a konklúzióhoz, saját klinikai adatunk a dolgozat benyújtásakor nem állt rendelkezésre. Jelenleg a gemcitabin hatásának vizsgálata nemzetközi együttműködésben folytatódik munkacsoportunkban, az eredmények jelenleg nem elérhetőek.

1. A sha-miR-24 és a hsa-miR-28 emelkedett szintje sporadikus mellékpajzsmirigy adenomákban… nem mutatott összefüggést a menin festődéssel”…ugyanakkor az összegzésben azt mondja, hogy ezek a miR-ek szerepet játszhatnak ezekben a daganatokban a MEN1 gén csendesítésében. Ez ellentmondásnak tűnik, amit fel kellene oldani.

Válasz: Hálásan köszönöm a kérdést. A miR-24, miR-28 és *MEN1* gén kapcsolata összetett. A miR-24 direkt interakciót tud létesíteni a *MEN1* 3’UTR-el és képes csendesíteni expresszióját, ugyanakkor a menin mint transzkripciós faktor stimulálja a miR-24 expresszióját. Eredményeink során a sporadikus, *MEN1* mutációt nem hordozó mellékpajzsmirigy adenómákban ezeknek a mikroRNS-eknek az emelkedett szintjét igazoltuk a *MEN1* mutációt hordozó daganatokhoz képest. Mivel a sporadikus daganatok közül 4 olyan volt, amiben a menin festődés negatív volt, de mutációt nem igazoltunk, felvetődik, hogy ezekben a daganatokban ezek a mikroRNS-eknek közrejátszottak a *MEN1* csendesítésbe. A sporadikus daganatokban megfigyelt mikroRNS emelkedés természetes *MEN1* mellett egyéb géneket is céloz, amelyek közül a mellékpajzsmirigy adenómák vonatkozásában kiemelt jelentőségő a p21, hiszen génjének csírasejtes mutációja a MEN4 szindrómát okozza, amelynek manifesztációi hasonlítanak a MEN1 szindrómában találtakhoz. Ugyanakkor egy másik lehetséges magyarázat lehet az ellentmondásra a menin immunhisztokémia bizonytalansága is. Munkánkban a biztosan *MEN1* mutációt hordozó szövetek vizsgálatával kimutattuk, hogy ezzel az antitesttel végzett immunhisztokémia 82,6 % szenzitivitással és 89,7%-os specificitással bírt a *MEN1* mutáció jelenlétére nézve, ami okozhatta a korreláció hiányát.

Végezetül hálásan köszönöm Krenács Tibor dr. alapos bírálói munkáját, gondolatébresztő kérdéseit és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2018. április 23.

Dr. Patócs Attila