**Válaszok Nagy Endre professzor úr opponensi bírálatára**

Először is szeretném megköszönni professzor úr bírálatát, elismerő szavait, kritikai megjegyzéseit.

Feltett megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

Köszönöm a nyelvtani hibákra, elütésekre és pontatlan fogalmazásokra tett megjegyzéseit, amelyeket elfogadok, értük elnézését kérem.

Kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

1. A miRNA-t a 10. oldalon 20-24 nukleotidként, a 69. oldalon 16-29 nukleotidként definiálja. Mind a kettő elfogadható. Kérem, fejtse ki ezt részletesen.

Válasz: Köszönöm a kérdést. Az érett, funkcionális aktivitással bíró mikroRNS-ek különböző hosszúságúak. A bevezetésben én a rövidebb 20-24 nukleotid hosszúságban adtam meg a szekvenciájuk hosszúságát, szemben a részletes irodalmi összefoglaló fejezetben megadott hosszabb szakasszal. Ennek oka az, hogy a bevezetésben már a saját tapasztalatainkat is figyelembe vettem, amit a kis-RNS szekvenálás során tapasztaltunk. Több daganatszövet, sejttenyészet szekvenálása során az érett mikroRNS-ek a referenciaszekvenciákra történő illesztése során munkánkban a 20-24 nukleotid hosszúságó szekvenciák bizonyultak biológiailag relevánsnak, mérhetőnek szemben a rövidebb (<19 nukleotid) vagy a hosszabb (>24 nukleotid) hosszúságú mikroRNS-ekhez viszonyítva. Az irodalmi összefoglalóban hivatkozott korai, a mikroRNS-ek biogenéziséről szóló munkák helyesen a 16-29 nukleotid hosszúságot adják, meg, aminek oka az is, hogy egyéb fajokban az ilyen hosszúságú mikroRNS-ek is biológiailag aktívak.

2. A miRNA expresszió sejtciklus független-voltát igazolta (172. oldal). Kérem, helyezze ezt szélesebb biológiai összefüggésbe.

Válasz: nagyon köszönöm, erre a véleményem szerint is, munkám egyik legfontosabb eredményére tett kérdését. Az elsőre meglepő eredményt mi is kétkedve fogadtuk el, és számos plusz vizsgálatot kellett elvégeznünk ennek megerősítésére. A sejtciklus independens mikroRNS expresszió arra utal, hogy egy sejt, vagy elváltozásra jellegzetes mikroRNS expressziós mintázat kialakulása hosszabb időtartam alatt következik be, mint a sejtciklus progressziója. Ez az eredmény azt is jelentheti, pl. daganatok esetén, hogy amennyiben egy daganat-specifikus mikroRNS expressziós mintázatot igazolunk, annak kialakulásáért nem a dinamikus sejtciklus változások a felelősek, hanem az ép és daganatos sejtek közötti különbségek, amelyek a tumorigenézis folyamata során következik be. A másik fontos, tágabb biológiai üzenete lehet az is, hogy a sejtciklus progresszió szabályozása mikroRNS independens, legalábbis akkor, ha a sejt már belépett a sejtciklusba. A G0 fázisból történő kilépést gátló vagy a sejtciklust beindító mikroRNS-ek természetesen elképzelhetőek. Azonban amennyiben a sejt már megkezdte a ciklust a sejtciklust hajtó vagy gátló fehérjék mennyiségét nem a mikroRNS-ek befolyásolják. A sejten belüli mikroRNS pool stabil koncentrációja, amit eltérő sejtciklus dinamikával rendelkező normál fibroblaszt és tumoros sejtvonalakban is kimutattunk szintén arra utal, hogy a mikroRNS-ek szabályozó szerepe csekély a sejtciklus vonatkozásában, ha a sejt már belépett a sejtciklusba.

3. Mi lehet a magyarázata annak, hogy a PTEN mutációkhoz asszociált pajzsmirigy daganat folliculáris carcinoma, míg SHDx-hez asszociált pajzsmirigy daganat papilláris carcinoma (112. oldal és 33. oldal 10. táblázat).

Válasz. Nagyon köszönöm a kérdést. A csírasejtes PTEN mutációkhoz társuló kórképek heterogén betegségek, több minor és major manifesztációkkal, amelyek között a pajzsmirigy folliculláris carcinómája major manifesztáció, de papilláris pajzsmirigy carnioma is kialakulhat. Esetünkben a Cowden szindróma klinikai diagnózisát a betegben kialakult manifesztációk vetették fel, és a genetikai vizsgálat ezt megerősítette. A betegben kialakult paraganglióma SDH mutációra utalt, amit szintén igazolni tudtunk. Azt gondoljuk, hogy ennek a két ritka mutációnak a jelenléte ebben a betegben pusztán véletlen egybeesés, de természetesen a daganatok biológiai viselkedésére is lehetnek hatással a tumorszuppresszor gének mutációja. Azóta több olyan esetet is publikáltak, akikben egyszerre több autoszomális domináns öröklődésű tumorszindrómát mutattak ki, saját gyakorlatunkban is igazoltunk patogén BRCA1 génmutációt egy patogén RET mutációt hordozó, multiplex endokrin neoplazia 2-es típusban szenvedő betegben. Az új generációs szekvenálási technológiák egyre nagyobb térhódításával, véleményem szerint több ilyen szokatlan társulásra fog fény derülni a jövőben.

4. Érdekesek a cirkadián órával kapcsolatos gondosan megtervezett kísérletek (142. oldal). Vajon mi lehet a szinkronizált kultúrákban a cirkadián óra átállásának molekuláris háttere?

Válasz: hálásan köszönöm a kérdést. A cirkadián óra ritmikus működés hátterében összetett, többszörösen visszacsatolt molekuláris mechanizmusok állnak, amelyet két egymáshoz kapcsolódó kör szabályoz. A primer visszacsatolási hálózat elemei a CLOCK és az Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (ARNTL vagy BMAL1), amelyek az úgynevezett hélix-loop-hélix (bHLH) struktúrával rendelkező Period-Arnt-Single (PAS) transzkripciós faktor család tagjai. Ezek egymással heterodimert alkotva serkentik az E-boxot tartalmazó enhanszer cisz-regulátorokat, beleértve a period (*PER1*, *PER2*, *PER3*) és cryptochrom (*CRY1*, *CRY2*) gének átíródását. Negatív válaszjelként a PER és CRY retranszlokálódnak a sejtmagba, majd gátolják saját transzkripciójukat a CLOCK:ARNTL komplexen keresztül. A heterodimer egy másik regulációs szignálon keresztül aktiválja a Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 (*NR1D1* vagy RevErbα) és Retinoid-related orphan receptor α (*ROR*α) gének transzkripcióját. Mindkét szekvencia kötőhelye megtalálható az *ARNTL* gén promóterében, azonban míg a Rorα serkentő hatással bír az átírásra, addig az NR1D1 éppen ellenkezőleg gátolja azt. Ezen autoregulációs visszacsatolási folyamatok eredményeképp az óragének egy megközelítőleg 24 órás ciklusa jön létre, mely ritmikusan oszcillál. Ennek létrejöttében és további működésében számos poszttranszlációs modifikáció, például foszforilációs és ubikvitinációs mechanizmusok játszanak kulcsfontosságú szerepet.

Végezetül szeretném ismételten megköszönni Nagy Endre professzor Úr bírálói munkáját, és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2018. április 26.

dr. Patócs Attila