

Dr. Patócs Attila:

„Molekuláris mechanizmusok a hormonrendszer daganataiban”

című MTA Doktori (DSc) értekezésének opponensi véleménye.

Készítette: Dr. Krenács Tibor, tudományos főmunkatárs, PhD, DSc

Jelölt az értekezés témáját 248 oldalon tárgyalja, amely 3 oldal rövidítésjegyzékből, 7 oldal általános bevezetésből, 58 oldal részletes irodalmi áttekintésből, 2 oldal célkitűzésekből, és végén ennek megfelelő 2 oldal új tudományos megfigyelésekből, 22 oldal anyag és módszerek részéből, 84 oldal eredményekkel egybefűzött megbeszélésekből, néhol az adott módszer vizsgálatspecifikus részleteivel, 614 hivatkozást magában foglaló irodalomjegyzékből, saját közleményekből, tudományos adatok listáiból és köszönetnyilvánításból áll.

Az általános bevezetésben fókuszáltan összefoglalja az endokrin daganatok molekuláris genetikai hátterének jelentőségét és a szerteágazó problémakört, különös tekintettel a disszertáció témájában vizsgáltakra. Ezután, az irodalmi áttekintésben tankönyvi részletességű, sokhelyütt olvasmányos áttekintést ad a vizsgált elváltozások epidemiológiájáról, diagnosztikájáról és klinikumáról, a kórképek hátterében álló főbb molekuláris és funkcionális hatásmechanizmusokról, ideértve az örökletes endokrin tumorszindrómákat (MEN1, MEN-2), pheochromocytoma/paraganglioma szindrómát, a csírasejtes PTEN mutációkhoz társuló kórképeket; valamint a sporadikus endokrin daganatokat, külön kiemelve a glükokortikoid receptor izoformák szerepét a differenciált jelátvitelben, valamint az endokrin rendszer szerepét a cirkadián ritmus fenntartásában, illetve a sejtciklus szabályozás deregulációját sporadikus hipofízis adenomákban. Az először szokatlan, eredmények és megbeszélés részek összevonása, a komplex témák miatt valóban a legjobb megoldás az egyes területeken elért eredmények követhetőségének és jelentőségének értékelésére az elérhető irodalmi adatokkal összefüggésben. A célkitűzések pontjaira az új tudományos eredmények felsorolása jól reflektál.

A téma aktuális, hiszen az endokrin daganatok viszonylag gyakran alakulnak ki örökletes génhibák talaján, melyek feltárása még nem teljes, a sporadikus daganatokban pedig a genetikai hajlamosító tényezők megismerése még ennél is nagyobb kihívás. Jelölt érdeme, hogy az elvárásoknak nemzetközi mércével mérve is kimagasló igényességgel felel meg, amit külföldi munkacsoportokkal közösen készített, magasan jegyzett folyóiratokban megjelent publikációk is igazolnak. Bő másfél évtizedes transzlációs kutatómunkája során jelentős és alkalmanként új, tumorigenezisre hajlamosító génelteréseket azonosított, nagyszámú hazai és nemzetközi beteganyagban, melyek integratív elemzése a klinikumban hasznosuló fontos genotípus-fenotípus összefüggések feltárását tette lehetővé. Például, örökletes endokrin szindrómákban a génelterések azonosítása tünetmentes családtagokban időbeni preventív beavatkozásokat tett lehetővé. Emellett számos genetikai és epigenetikai (mikro-RNS) dereguláció funkcionális következményeit analizálta tovább endokrin daganatokban *in silico* adatbázisok elemzésével, valamint *in vitro* sejtenyészetben végzett gén és mikro-RNS manipulációs kísérletekkel, melyek szintén új tudományos megfigyeléseket eredményeztek. Különösen jelentősek, a GR β receptor elsőkénti igazolása mellékvesekéregben és a glükokortikoid rezisztenciában feltárt szerepére vonatkozó eredmények; a GR receptor aktiválás szerepének igazolása a cirkadián óragének expressziójának ritmikus napszaki ingadozásában; sporadikus hipofízis és mellékvesekéreg karcinómákban a tumorsuppresszor mikro-RNS-es csökkent expressziója és a sejtciklusszabályozás deregulációja közti kapcsolat igazolása; valamint a mellékvesekéregben specifikusan felülregulált és a keringésbe jutott mikro-RNS szintek változásának igazolása hormonhatásra.

Hiteles eredményeit korszerű és szerteágazó módszertani repertoárral alkalmazásával nyerte, amely magában foglalta a hagyományos molekuláris genetikai vizsgálatok (PCR, Sanger szekvenálás) mellett a nagyáteresztőképességű újgenerációs szekvenálás (NGS), valamint mRNS és mikro-RNS (prekurzor transzfekció, felülreguláció) expressziós chip vizsgálatok, ill. valósídejű kvantitatív polimeráz láncreakció alkalmazását. Külön kiemelendő, hogy innovatív molekuláris genetikai

módszerek is kidolgozott és validált: pl. MEN1 gén mutációk kimutatására, formol-paraffinos szövetekből, a DNS töredezettsége miatt újratervezett primerekkel; a CYP21A2 gén haplotipizálásához un. „long range” PCR-t; illetve a GR gén polimorfizmus vizsgálatára a korábbinál hatékonyabb megbízhatóbb módszert fejlesztett ki. Továbbá, a sejtciklus frakciók szétválasztására áramlási citometriát, hormonmeghatározásra saját fejlesztésű, nagy specificitású radioimmunoassay-t; a célfehérjék expresziójának vizsgálatára Western blot, illetve *in situ* azonosítására immunhisztokémiai módszert alkalmazott. Emellett, gén- ill. mikro-RNS felülreguláció céljából funkcionális vizsgálatokhoz transzfekciós kísérleteket, valamint célzott mutagenézis vizsgálatokat is használt.

Néhány formai és szakmai kritikai megjegyzés:

A táblázatok és ábrák többnyire jól áttekinthetők, világosak kivéve, az 5. táblázatot, ahol egyes jelzések (csillag, vagy +) elmosottak, nehezen azonosíthatók, célszerű lett volna az eredeti fénymásolása helyett pl. a 36 ábrához hasonlóan újragépelni. A 49. ábra immunhisztokémiai képein a festetlen szövetnek zavaró sötét háttére van, ami nagyon megnehezíti a specifikus nukleáris WEE1 reakció megítélését.

Az értekezés világosan fogalmazott, benne elütések, kimaradt szavak és a ragozás egyeztetésének hiánya ritkák. Néha azonban következtelen, pontatlan, pongyola, vagy félreérthető megfogalmazás, ill. a latin (vagy angol) és magyar írásmód keveredése előfordul.

Pl. 4. old. „dCT: normalizált cycle threshold” ; a cycle=ciklus, ill. a threshold=határ(érték) helyett.

32. old. az „inducible” „indikábilis”-ként említése, egyszerűbb és magyarosabb lenne az „indukálta” változat.

41. old. magyaros latin írásmód ...”congenitalis...hiperplázia”

67. old. ...”program vizsgálatára. Ennek segítségével számos vizsgálat történt...programjának vizsgálatára”... Vizsgálat 3x.

75. old. „A sporadikus MTC betegek esetében... eltérést az SDHB stb...gének vizsgálata negatív eredményt mutatott”.

„Sejtciklus szerinti válogatás”..., később magyarul fonetikus „szortolt”

IV.9. fejezetcím „Sporadikus” 3x fordul elő a felsorolásban, egyértelmű lett volna egyszer is „úgy hogy a „MEN1-hez társult” daganatokat teszi a felsorolás végére.

172. old. a VI. 2.12. fejezet 2. mondatának tartalma a 3.4.-ben ismétlődik.

19. old. Félreérthető a menin GFAP és vimentin kapcsolatáról írt mondat, „Kimutatták, hogy a GFAP az intermedier filamentum része”... ebből úgy tűnik mintha ők igazolták volna ezt először. Szerencsés lett volna specifikálni a sejttypust, glioma, mert normálisan a GFAP glia, a vimentin a mesenchymális sejtek intermedier filamentuma, együttesen felnőttekben csak alkalmanként egyes malignus daganatokban (pl. glioma, astrocytoma, ependymoma) fordul elő.

91. old. 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 sejtviisszapótlás mértékével.

Ezzel kapcsolatban felmerülő kérdés, hogyan igazolták (vagy igazolnák), hogy a vizsgált sejt vonalakban a Vybrant DyeCycle Orange festék valóban nem befolyásolja a vizsgált sejt vonalak életképességét, és sejtciklus funkcióit?

Menin immunhisztokémiai kimutatásnál mellékpajzsmirigy metszeten, a ...”peroxidáz blokkolásról és antigéneltávolításról”... ír, utóbbiban inkább a nonspecifikus kötőhelyek telítéséről van szó.

100. old. ...”számos új megfigyeléseket és összefüggéseket azonosítottunk”...

113. old. Az SDH funkció? (inkább funkcióvesztés) következménye a mitokondrium diszfunkció”...

167. old. Félreérthető a mondat, ahol a sejtciklus szinkronizált egyébként tenyészetben proliferáló, „HDFa sejtekben statisztikai analízis nem detektált szignifikánsan eltérő gént”, megállapítás, mert nem világos, hogy mihez képest, hiszen az mRNS expressziós chip vizsgálatok 61. ábrán bemutatott eredményei hasonló szignifikáns összefüggéseket mutatnak a 2 daganatos sejtvonal eredményéhez.

172. old. nem világos hogy a VI.2.12. fejezet bevezetésében, milyen, hány páciens mellékveserák malignitás-mintázatát hasonlították össze a NCI-H295R adenoma sejtciklus függő transzkripciójával? Vagy ez *in silico* történt?

További kérdések:

- 1) A keringő hsa-miR-483-5p szint szignifikáns összefüggését találta a mellékvesekéreg karcinómák 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 karcinómákra vonatkozó specificitását? Ha nem, akkor felerősíthet-e terápiás célpontként, jelentősebb mellékhatások nélkül?
- 2) A TGFβ mikro-RNS szabályozása mutat-e átfedést más szolid tumorok kialakulásához, progressziójához, vagy teljesen más a mikro-RNA profiljuk, mint az endokrin daganatokban?
- 3) 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?
- 4) 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)?
- 5) A sejtciklus promotor 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?
- 6) 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?
- 7) Gemcitabin hatására az apoptotikus sejtfrakció szignifikánsan megnövekszik, ugyanakkor a végkonklúzióban azt mondja, hogy a kezelés hatására megemelkedő RRM2 szint a terápiával szembeni kemorezisztencia fiokozódására utal. Hogyan oldható fel ez az ellentmondás?
- 8) 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.

Az értekezés igényesen alkalmazott módszerek hiteles eredményeit foglalja össze, melyek között számos új klinikailag is hasznosuló, tudományos megfigyelés van, ezekből a korábban említettek mellett a jelentősebbek az alábbiak:

- 1) A legtöbb monogén endokrin tumorszindrómával kapcsolatos génmutáció szekvenálásának beállítása és validálása mellett, nagy gendelációk igazolására speciális módszereket (long PCR, MLPA) dolgozott ki és validált.
- 2) MEN2 szindrómában újabb patogén RET mutációk genotípus-fenotípus összefüggéseit tárta fel, melyek preventív klinikai beavatkozásokra adnak lehetőséget.

- 3) MLPA vizsgálattal addig genetikailag negatív eseteket azonosítottak.
- 4) A VHL gén Ser80Ile mutációjáról igazolták, hogy patogén eltérés.
- 5) A RET 10 exon mutációkra mutáció-specifikus, diagnosztikus és terápiás javaslatokat dolgozott ki.
- 6) Kísérletesen igazolta, hogy a GR β szerepet játszik a glükokortikoid rezisztenciában, gátolja a GR α közvetített géntranszkripciót.
- 7) Egyedi modellt állított fel és igazolta, hogy a H295R mellékvesekéreg karcinoma sejtvonal alkalmas az óragének ritmikus expressziójának tanulmányozására.
- 8) Igazolta a mikro-RNS-ek potenciális szerepét a TGF β jelátviteli út, ill. a WEE1 génexpresszió szabályozásában és így a nem funkcionáló hipofízis adenomák patogenezisében.
- 9) Áramlási citometriás módszert dolgozott ki az eltérő sejtciklus frakciók elválasztására, ami lehetőséget adott sejtciklus-függő gén és mikro-RNS expressziós mintázatok vizsgálatára.

Összegezve, Patócs Attila MTA doktori értekezése igen értékes, az endokrin daganatok genetikai, epigenetikai hátterének új részleteit feltáró munka, melynek tudományos eredményeit elegendőnek értékelem az MTA doktori cím elnyeréséhez és mindezek alapján javaslom az értekezés nyilvános vitára bocsátását.

Budapest, 2018. március 29.

Dr. Krenács Tibor
MTA doktora