

**Válasz Professzor Dr. Balázs Margit az MTA doktora bírálatára
(Igaz Péter: Endokrin daganatok és immun-neuroendokrin kölcsönhatások
molekuláris, bioinformatikai és klinikai vizsgálatok)**

Igen tisztelt Professzor Asszony!

Először is szeretném megköszönni, hogy Professzor Asszony elvállalta értekezésem bírálatát. Hálásan köszönöm részletes, gondolatébresztő és kedvező bírálatát MTA doktori értekezésemről. A felmerült kérdések jövőbeli kutatómunkám során is hasznosak lehetnek.

Professzor Asszony formai megjegyzéseit illetően az alábbi válaszokat teszem:

1. A közleményeket azért nem csatoltam az értekezéshez, mivel a már így is 215 oldal hosszúságú értekezést nem szerettem volna túl nagyméretűvé tenni. Igyekeztem a cikkek legfontosabb eredményeit érthető formában beépíteni az értekezésbe.
2. A dolgozat mérete miatt az ábrák felbontását csökkentettem az eredeti publikációkban szereplő ábrákhoz képest. Sajnos ennek következtében a 18. ábra nyomtatási verziója nem lett tökéletes, amiért utólag is elnézést kérek. Csatoltan megküldöm a 18. ábra eredeti verzióját tartalmazó Oncogene-ben megjelent cikkünk elektronikus verzióját.
3. Az eredmények és megbeszélés fejezetekben bemutatott eredményeimre nem tüntettem fel saját munkáimat hivatkozásként, csak független hivatkozásokat. Kétségtelen, hogy a saját vonatkozó közleményekre történő hivatkozások megkönnyíthették volna a bírálati munkát.

Professzor Asszony elgondolkodtató kérdéseire az alábbi válaszokat fogalmaztam meg:

1. A jelölt téziseiben azt írja, hogy jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg daganatok elkülönítésére, a malignitás jelzésére a hsa-miR-511 és hsa-miR-503 mikroRNS-ek expressziós különbsége bizonyult a legjobbnak, de ez a megállapítás további megerősítést igényel nagyobb elemszámú mintacsoportban. Kérdésem, hogy az eltelt idő alatt történtek-e erre vonatkozóan további vizsgálatok? Megerősítést nyert-e a fenti megállapítás a jelölt vagy más munkacsoport által? Érdekelne, hogy milyen eredmények születtek eddig a microRNS-ek szerepére vonatkozóan a daganat őssejtekre?

Válasz: Az utóbbi időben kutatócsoportom figyelme elsősorban a bioinformatikai vizsgálatok során azonosított útvonalak in vitro validálása (retinoidok), az adrenolitikus szer mitotán hatásainak génexpressziós szintű vizsgálata, valamint a keringő, plazma mikroRNS-ek diagnosztikai alkalmazhatóságának vizsgálata felé fordult. A *hsa-miR-511* és *hsa-miR-503* mikroRNS-ek alkalmazhatóságáról daganatszövet minták malignitásának tanulmányozására nem végeztünk még ismételt vizsgálatot, de a minták gyűjtését folytatjuk, és kellő számú vizsgálati csoportok összegyűjtése esetén a vizsgálat folytatását tervezzük.

A *hsa-miR-503* fokozott kifejeződését más munkacsoportok is leírták mind felnőttkori [1], mind gyermekkori mellékvesekéreg-carcinómában [2]. *Özata és mtsai* [3] a *hsa-miR-503* növekedett expresszióját a mellékvesekéreg-carcinoma rossz prognosztikai markereként azonosították. A *hsa-miR-511* kifejeződéséről más mellékvesekéreg-carcinómával foglalkozó közleményt nem találtam, bár nem mellékvesekéreg daganatokban csökkent kifejeződését már leírták (pl. hepatocellularis carcinómában [4]). Az eddigi adatok alapján a mellékvesekéreg carcinoma mikroRNS expresszióját vizsgáló tanulmányokban viszonylag kevés az átfedés [5], amiben az eltérő mintacsoportok, vizsgálati csoportok és módszerek különbségei szerepet játszhatnak.

A mikroRNS-ek daganat őssejtekben játszott szerepe intenzív kutatások tárgya [6,7]. Mind az őssejtek kolóniaképző tulajdonságát, osztódását fokozó, mint azt gátló hatású mikroRNS-eket leírtak más daganatokban. Bár a mellékvesekéreg-carcinómában is ismertek őssejtek [8], ezek mikroRNS-szintű vizsgálatáról nem találtam adatot. Érdekes megfigyelés ugyanakkor, hogy a *hsa-miR-503* kifejeződésének csökkenése mesenchymális őssejtekben a hypoxia-indukálta apoptózis folyamatában közrejátszhat [9].

2. A mikroRNS-ek cél mRNS-einek azonosítására kidolgozott új módszerrel kimutatták, hogy a mellékvesekéregben a sejtciklus G2/M ellenőrzőpontját a mikroRNS-ek is szabályozzák, azonban ezek a mikroRNS-ek nem azonosak más szövetekben validált mikroRNS-ekkel, ami szövetspecifikus hatásra utal. Tekintettel arra, hogy ezek bioinformatikai predikciók, történtek-e ennek igazolására kísérleti vizsgálatok? Milyen kísérleti eredmények vannak más daganatokra vonatkozóan a szövetspecifitás igazolására?

Válasz: Kutatócsoportom még nem végzett kísérleti vizsgálatokat (pl. luciferáz módszerrel) a mikroRNS-ek cél mRNS-einek validálására.

A mellékvesekéreg-carcinómában szignifikánsan változó mikroRNS-ek sejtciklus szabályozásában szereplő prediktált mRNS célpontjait más szövetekben, ill. sejtvonalakon vizsgálták más munkacsoportok. A mellékvesekéregben talált mikroRNS-ek közül a *hsa-miR-503* célpontja például a *CDC25A* retinoblastomában és prosztatákban [10]. A *hsa-miR-210* célpontja pedig az *E2F3* elongációs faktor számos daganatban, így leukaemiában, lymphomában, glioblastomában, pancreas, emlő, tüdő és veserákban is [10]. Ezek a cél mRNS-ek ugyanakkor nem egyeznek meg azokkal, amelyeket bioinformatika predikciókkal azonosítottunk. Ez lehet a szövetspecifikus hatásmód részjelensége.

A szövetspecifikus hatásra számos eredmény utal, hiszen ugyanaz a mikroRNS egy daganatban fokozott (onkogén), míg másokban csökkent (tumor szupresszor) kifejeződésű is lehet. Néhány példát sorolok fel az alábbiakban:

A vizsgálataink szerint mellékvesekéreg-carcinómákban tumorszuppresszornak minősíthető *hsa-miR-214* csökkent expresszióját cervix-carcinómában is igazolták [11]. Szemben a mellékvesekéreg- és cervix-carcinómákban észlelt csökkent kifejeződésével, a *hsa-miR-214* más daganatokban (pancreas-, szájüregi squamosus, petefészek-, gyomor-carcinoma [12-15])

fokozott kifejeződést mutat, így onkogén hatású lehet, ami ismét a mikroRNS-ek szövetspecifikus hatását támasztja alá.

A *hsa-miR-375* sejtproliferációt gátló, tumorszuppresszor jellegű hatását több daganat mikroRNS expressziós vizsgálata támogathatja, mivel hasnyálmirigy ductális adenocarcinómában [16], gyomor carcinómában [17] és squamosus nyelőcső-carcinómában is csökkent expresszióját írták le [18]. Vizsgálatainkban is csökkent kifejeződését észleltük a kortizoltermelő mellékvesekéreg-daganatokban. Ezzel szemben a *hsa-miR-375* kifejeződését prosztatarákban fokozottnak találták [19].

A szövetspecifikus hatás pontos mechanizmusa nem ismert, ennek vizsgálata a mikroRNS kifejeződéssel foglalkozó kutatások egyik fontos kérdése lehet.

3. A mellékvesekéreg funkcionális genomikai meta-analízise során saját adataikat vetették össze az irodalomban fellelhető, elég heterogén adathalmazokkal. Az adatok összehasonlítása nem volt egyszerű feladat, nemcsak azért, mert a jelölt és munkatársai voltak az elsők akik ugyanazon mintákon kromoszómális eltéréseit és génexpressziós változásait vizsgálták ebben a daganat típusban, így nem állt nagyobb számú parallel minta rendelkezésre az analízishez, hanem azért is mert a mások által alkalmazott platformok eltérőek voltak. Kérdésem ezzel kapcsolatban, hogy mennyire befolyásolja az analízist az, hogy a CGH vizsgálatok során alkalmazott targetek a rendkívül kondenzált kromoszómáktól (klasszikus CGH), 750-1,4 Mb méretű BAC array-eken túl a nagyfelbontású array platformokig terjedtek? Érdekelne, hogy hogyan integrálták a meta-analízisbe az eltérő platformok adatait? A CGH adatok validálására milyen módszert alkalmaztak saját vizsgálataik során? Milyen mértékű a különböző kromoszómális eltérések heterogenitása egy daganaton belül? A 11 saját minta analízise során milyen kontroll mintákat használtak a génexpresszió változások elemzéséhez? Vannak-e mellékvesekéreg daganatokra specifikus olyan gén eltérések (hasonlóan más daganatokhoz), melyek a terápia kiválasztásában meghatározóak?

Válasz: Vizsgálataink során a CGH és génexpressziós adatok korrelációjához a géncsoport dúsulás (GSEA) vizsgálatot alkalmaztuk. E módszerben a GSEA felbontása a kromoszómaeltérések vizsgálatára rosszabb, mint a különböző CGH vizsgálatoké, ezért a CGH eredmények génexpressziós vizsgálatokkal történő korrelációját ez nem befolyásolhatta.

A különböző platformok adatait külön-külön manuálisan analizáltuk, az eltérő platformok miatt integrált, együttes elemzés nem volt kivitelezhető.

A CGH adatokat saját módszerünkben nem validáltuk más módszerrel.

A referencia DNS a kereskedelmi forgalomban elérhető, Promega cégtől rendelt G1521 női DNS volt.

A tumor heterogenitásról mellékvesekéreg-daganatokban egy közleményt találtam, ami a hiper- és aneuploidia jelentőségét vizsgálta. Mellékvesekéreg-carcinómára jellemző a heterogén mitotikus viselkedés, a diploid sejtek arányának csökkent és a tetraploid sejtek fokozott előfordulása [20]. A kromoszómális eltérések heterogenitásának mértékéről mellékvesekéreg-carcinómán belül nem találtam adatot.

Bár intenzív kutatások folynak e téren, egyelőre a terápiás választ meghatározó géneltérésekről nem számoltak be mellékvesekéreg-carcinómában. Megnehezíti e vizsgálatokat a mellékvesekéreg-carcinoma ritka előfordulása. Említésre méltó azonban két nagyszámú mintát vizsgáló microarray vizsgálat, amelyek szerint a mellékvesekéreg-carcinoma a génexpressziós mintázat alapján két (egy jobb és egy rosszabb prognózisú) csoportba osztható [21,22]. Két, sejtciklus szabályozásában szerepet játszó gén, a *PINK1* és *BUB1* expressziós különbségét prognosztikus jelként azonosították [21]. E megfigyelések jelentősége azonban a klinikai gyakorlatban, a terápia megválasztásában még nem tükröződik. Ebben szerepet játszik az is, hogy a mellékvesekéreg-carcinómában rendelkezésre álló terápiás lehetőségek korlátozottak.

4. A jelölt a sejtciklus útvonalainak vizsgálata során a C-MYC csökkent kifejeződését találta mellékvesekéreg daganatokban, melynek hátterében feltételezései szerint a 8q24 kromoszómarégió elvesztése áll. Kérdésem, hogy a saját és mások CGH adatai alapján milyen gyakorisággal fordul elő a C-MYC onkogén deléciója a vizsgált daganatokban? Vannak-e a C-MYC delécióra vonatkozóan FISH vizsgálataik? Milyen más daganat típusban fordul elő a gén down-regulációja és ezekben az esetekben milyen mechanizmus áll a csökkent génkifejeződés hátterében?

Válasz: A 8q24 delécióját saját CGH vizsgálatunk mellett *Stephan és mtsai* [23] írták le mellékvesekéreg carcinómában. *Stephan és mtsai* 25 mellékvesekéreg-carcinómát vizsgáló tanulmányukban a daganatok kb. 20 %-ában észlelték e deléciót. A 8q régió delécióját rossz prognosztikai jelként azonosították. FISH vizsgálatokat nem végeztünk.

Amennyiben hipotézisünk helyes, a *C-MYC* csökkent kifejeződése egyedülálló mechanizmusnak tűnik a daganatok világában, mivel a daganatok nagy többségében expressziója fokozott mértékű [24]. Néhány adat szól arról, hogy egér laphámrákban [25] ill. testicularis teratomákban [26] is csökkent lehet a *C-MYC* kifejeződése. A *C-MYC* expresszió csökkenésének molekuláris mechanizmusáról nem találtam adatot ezekben az esetekben.

Egy 2011-ben megjelent közleményben gyermekkori mellékvesekéreg-carcinoma vizsgálata során ismét megerősítették a *C-MYC* kifejeződésének csökkenését mind mRNS, mind fehérje szinten [27]. Felmerült, hogy a *C-MYC* csökkent kifejeződése a daganat hypoxiával szembeni ellenállóképességét növeli, ami különösen a necrotikus, előrehaladott stádiumú daganatok patogenezisében játszhat szerepet.

A *C-MYC* deléciója (8q24) egyébként előfordul akut leukaemiákban (pl. promyelocytás leukaemia), azonban ez a „double minute” kromoszómatöredékeken található *C-MYC* többszörös megjelenésével társul, így ez esetben lényegében fokozott *C-MYC* kifejeződésről van szó [28].

A mellékvesekéreg-carcinoma csökkent *C-MYC* kifejeződésének jelentőségét funkcionális vizsgálatokkal lenne majd célszerű vizsgálni, pl. *in vitro* a *C-MYC* transzfekció hatását mellékvesekéreg sejtvonalon, vagy kondicionális knock-out ill. knock-in állatmodelleken.

Még egyszer köszönöm Professzor Asszony megjegyzéseit és gondolatébresztő kérdéseit, és tisztelettel kérném válaszaim elfogadását.

Budapest, 2012. augusztus 31.

Tisztelettel:

Dr. Igaz Péter PhD
egyetemi adjunktus

Felhasznált irodalom:

- [1] Soon PS, Tacon LJ, Gill AJ és mtsai: MiR-195 and miR-483-5p identified as predictors of poor prognosis in adrenocortical cancer. *Clinical Cancer Research* (2009) 15, 7684–7692.
- [2] Doghman M, El Wakil A, Cardinaud B és mtsai: Regulation of insulin like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Research* (2010) 70, 4666–4675.
- [3] Özata DM, Caramuta S, Velázquez-Fernández D és mtsai: The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. *Endocrine-Related Cancer* (2011) 18, 643–655
- [4] Wang W, Zhao LJ, Tan YX és mtsai: MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma, *Carcinogenesis* (2012) 33, 1113-1120.
- [5] Singh P, Soon PSH, Feige JJ és mtsai: Dysregulation of microRNAs in adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol* (2012) 351, 118-128
- [6] Liu C, Tang DG: MicroRNA regulation of cancer stem cells. *Cancer Res* (2011) 71, 5950-5954.
- [7] Vira D, Basak SK, Veena MS és mtsai: Cancer stem cells, microRNAs, and therapeutic strategies including natural products. *Cancer Metastasis Rev* (2012) DOI 10.1007/s10555-012-9382-8
- [8] Simon DP, Hamer GD: Adrenocortical stem and progenitor cells: Implications for adrenocortical carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* (2012) 351, 2–11
- [9] Nie Y, Han BM, Liu XB és mtsai: Identification of MicroRNAs Involved in Hypoxia- and Serum Deprivation- Induced Apoptosis in Mesenchymal Stem Cells. *Int J Biol Sci* (2011) 7, 762-768.
- [10] Bueno MJ, Malumbres M: MicroRNAs and the cell cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*(2011) 1812, 592–601
- [11] Qiang R, Wang F, Shi LY és mtsai: Plexin-B1 is a target of miR-214 in cervical cancer and promotes the growth and invasion of HeLa cells. *Int J Biochem Cell Biol* (2011) 43, 632-641
- [12] Zhang XJ, Ye H, Zeng CW és mtsai: Dysregulation of miR-15a and miR-214 in human pancreatic cancer. *J Hematol Oncol* (2010), 3: 46.
- [13] Scapoli L, Palmieri A, Lo Muzio L és mtsai: MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. *Int J Immunopathol Pharmacol* (2010) 23, 1229-1234.
- [14] Yang H, Kong W, He L és mtsai: MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res* (2010) 68: 425-433.
- [15] Ueda T, Volinia S, Okumura H és mtsai: Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* (2010) 11, 136-146.
- [16] Szafranska AE, Davison TS, John J és mtsai MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* (2004) 26, 4442-4452.

- [17] Tsukamoto Y, Nakada C, Noguchi T és mtsai: MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. *Cancer Res* (2010) 70, 2339-2349.
- [18] Mathé EA, Nguyen GH, Bowman ED és mtsai: MicroRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival. *Clin Cancer Res* (2009) 15, 6192-6200.
- [19] Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ és mtsai: Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer* (2010) 126, 1166-1176.
- [20] Blanes A, Diaz-Cano SJ: DNA and kinetic heterogeneity during the clonal evolution of adrenocortical proliferative lesions. *Human Pathology* (2006) 37, 1295– 1303
- [21] de Reyniès A, Assié G, Rickman DS és mtsai: Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol* (2009) 27, 1108-1115.
- [22] Giordano TJ, Kuick R, Else T és mtsai: Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin Cancer Res* (2009) 15, 668-676.
- [23] Stephan EA, Chung TH, Grant CS és mtsai: Adrenocortical carcinoma survival rates correlated to genomic copy number variants. *Mol Cancer Ther* (2008) 7, 425-431.
- [24] Nesbit CE , Tersak JM , Prochownik EV: MYC oncogenes and human neoplastic disease . *Oncogene* (1999) 18, 3004-3016
- [25] Toftgard R , Roop DR , Yuspa SH: Proto-oncogene expression during twostage carcinogenesis in mouse skin . *Carcinogenesis* (1985) 6, 655-657.
- [26] Watson JV , Stewart J , Evan GI és mtsai: The clinical significance of flow cytometric c-myc oncoprotein quantitation in testicular cancer . *Br J Cancer* (1986) 53, 331-337.
- [27] Leal LF, Mermejo LM, Ramalho LZ és mtsai: Wnt/ β -Catenin pathway deregulation in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* (2011) 96, 3106–3114.
- [28] Frater JL, Hoover RG, Bernreuter K és mtsai: Deletion of MYC and presence of double minutes with MYC amplification in a morphologic acute promyelocytic leukemia–like case lacking RARA rearrangement: could early exclusion of double-minute chromosomes be a prognostic factor? *Cancer Genet Cytogenet* (2006) 166, 139–145.