

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

Igen tisztelt Professzor Úr!

Szeretném megköszönni, hogy Professzor Úr elvállalta értekezésem bírálatát. Őszintén köszönöm részletes és kedvező véleményét, elmélyülésre alkalmat adó kérdéseit MTA doktori értekezésemről.

Az alábbiakban a bírálatban meghatározott megjegyzések és kérdések sorrendjében adom meg válaszaimat.

Válaszok Professzor Úr megjegyzéseire:

- 1. Bár a 215 oldalas értekezés kétségtelenül kiterjedt és impresszionáló munka, célszerűbb lett volna tömörebb dolgozatot alkotni, talán egyes részek kihagyásával is.*

Válasz: Természetesen elfogadom, hogy az értekezés hosszú. Ebben az a törekvésem tükröződik, hogy az elmúlt évek kutatómunkájáról átfogó képet tudjak adni. Kétségtelen, hogy a dolgozatban szerepelnek olyan részek, amelyek nem impakt faktoros közlemények eredményeit ismertetik, például a hisztaminnal kapcsolatos gének in silico genomikai vizsgálata, valamint az első hazai MEN2 genetikai vizsgálatunk eredményeit ismertető Orvosi Hetilapban megjelent közlemény anyaga. Ezeket azért építettem be az értekezésbe, mivel szervesen kapcsolódnak a többi részhez, és a hisztaminbiológia, ill. a MEN2 genetikája a dolgozat fontos alkotói.

- 2. A dolgozat értékét egyáltalán nem csökkenti, csak a bíráló dolgát nehezítette, hogy a módszertanban kevésbé jártas olvasónak vissza-vissza kellett lapozni a módszertani részhez.*

Válasz: A bioinformatikai módszerek értelmezése kétségtelenül nehéz. Valóban egyszerűbben érthetővé tette volna a dolgozat értékelését, ha a módszertant az Eredmények és Megbeszélés részben is részletesebben kifejtem.

- 3. Hiányoltam, hogy a három interneten elérhető mikroRNS target predikciós algoritmus különbségeit nem tárgyalta (miRBase, Pictar, TargetScan).*

Válasz: Ezt a részt azért nem építettem be a dolgozatba, mert úgy gondoltam, hogy nem feltétlenül szükséges a módszertani rész kifejtéséhez. Azért sem illesztettem be a dolgozatba, mivel – részben a dolgozat terjedelmére is tekintettel – ehhez a mikroRNS-mRNS kapcsolódás elméleti hátterét is célszerű lett volna bemutatni. Mindazonáltal jogos igény e

három predikciós algoritmus legfőbb jellemzőinek és különbségeinek ismertetése, ezért ennek legfontosabb kérdéseit itt bemutatom.

Az alábbiakban, a Current Bioinformatics folyóiratban megjelent összefoglaló közleményünkben (Szabó PM, Tömböl Z, Molnár V, Falus A, Rácz K, **Igaz P**: MicroRNA target prediction: problems and possible solutions. CURRENT BIOINFORMATICS 5, 81-88, 2010) megjelent táblázaton keresztül mutatom be e három algoritmus fő különbségeit:

Algoritmus	"Seed" régió		Egyéb jellegzetességek					Konzerváltsági filter
	Tökéletes bázis-párosodás	"Seed" hierarchia	miRNS 3' bázis-párosodás	m9-m11 "mismatch"	AU tartalom	3'UTR pozíció	Többszörös kötőhely	
miRBase v5	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem	Igen
PicTar	Igen	Részben	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem	Igen
TargetScan v4.2	Igen	Igen	Igen	Nem	Igen	Igen	Igen	Igen

4. *A hypothalamikus GnRH neuronokkal foglalkozó vizsgálat kvalitatív PCR reakcióihoz használt primerek szekvenciának közlése kissé túlzónak tartható, ez nem jelent érdemi információt a dolgozat megértéséhez.*

Válasz: Egyetértek ezzel a megjegyzéssel, a primerszekvenciák az MTA doktori értekezés megértéséhez valóban nem nyújtanak érdemi segítséget. Mivel a többi PCR-reakcióhoz is megadtam a felhasznált Taqman assay-k adatait, a hypothalamikus GnRH neuronok vizsgálatához viszont egyénileg tervezett primereket és külön beállított PCR reakciókat használtam, csak a teljesség igényével adtam meg ezeket az adatokat.

5. *A bioinformatikai megközelítés kétségtelenül nagyon korszerű metodika, de a bonyolult statisztikai módszerek és a számos korrekciós tényező alapján felmerülhet a kérdés, hogy az azonosított új patogenetikai útvonalak ténylegesen relevánsak-e biológiai szempontból. Történtek-e valamiféle validálási kísérletek az új útvonalak alátámasztására?*

Válasz: Kutatócsoportom jelenleg éppen az új patogenetikai útvonalak validálásával foglalkozik. A mellékvesekéreg-daganatokon végzett génexpressziós metaanalízisben azonosított retinsav jelátviteli útvonal vizsgálatára koncentrálnak jelenleg. A metaanalízisben azt találtuk, hogy a mellékvesekéreg-carcinómát csökkent retinsav termelés és jelátvitel jellemzi. A 9-cisz-retinsavval *in vitro* kísérleteket végeztünk H295R humán mellékvesekéreg carcinoma sejtvonalon, és ez alapján úgy tűnik, hogy a 9-cisz-retinsav gátolja a sejtek proliferációját és hormontermelését (kortizol, androsztendion) is. Végeztünk microarray vizsgálatot is e sejtvonalon, és itt is számos gén megváltozott kifejeződését találtuk 9-cisz-retinsav hatására, amelyek között a sejtciklus és apoptózis folyamataiban alapvető gének is

megtalálhatók. Valószínűnek tartjuk ez alapján, hogy a 9-cisz-retinsav a mellékvesekéreg-carcinoma kezelésében potenciális jövőbeli hatóanyagként is szóba jöhet.

6. *Mint a jelölt a „Hálózat- és útvonalelemzés” részben kifejti, a génexpressziós eredmények vizsgálata nem egyenlő a patogenezis vizsgálatával, hanem egy génexpressziós pillanatképről van szó. Nem lehet ez alapján tudni, hogy tényleg az okok és nem a következmények vizsgálatáról van szó. Célszerű lett volna ezt a gondolatot az értekezésben jobban kiemelni és a kísérleti validálás jelentőségére felhívni a figyelmet.*

Válasz: Egyetértek e megjegyzéssel, és valóban jobban kiemelhettem volna e kérdés jelentőségét az „Eredmények és Megbeszélés” részben is. A kísérleti validálás jelentősége elsődleges és kutatócsoportom jelenleg is elsősorban ezzel foglalkozik.

7. *Végül mint említettem, az igen jó ábraanyagban voltak nehezebben érthetőek, mint pl. a 22. és 23. ábra, ahol nehéz eldönteni, hogy a gének megváltozott expressziója a jó- vagy rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatokhoz tartozik-e?*

Válasz: A 22. és 23. ábrán a génexpresszió változások a mellékvesekéreg-carcinomára vonatkoznak a jóindulatú daganatokhoz képest. Zölddel a rosszindulatú daganatokban csökkent, pirossal a rosszindulatú daganatokban fokozott kifejeződést mutató géneket ábrázoltuk a jóindulatú daganatokhoz képest. Ez az ábraalírásból valóban nem derül ki egyértelműen, amiért utólag is elnézést kérek.

Válaszok Professzor Úr kérdéseire:

1. *Mi a magyarázata annak, hogy a mellékvesekéreg-daganatok mikroRNS kifejeződési mintázatát real-time PCR-en alapuló Taqman módszerrel, míg a phaeochromocytomákban microarray módszerrel vizsgálta? Nem lett volna célszerűbb mindkét daganatcsoportot ugyanazzal a metodikával vizsgálni?*

Válasz: MikroRNS expressziós vizsgálataink megkezdésekor még nem állt rendelkezésre Agilent platformon mikroRNS expressziós vizsgálatot lehetővé tevő microarray lemez. Mellékvesekéreg-daganatokon végzett vizsgálatainkhoz ezért első generációs Taqman TLDA kártyákat használtunk. Az első generációs kártyák használata technikai nehézségek miatt nem volt könnyű, és a kártya alapján kiválasztott szignifikánsan változó 14 mikroRNS-ből csak 6 validálása sikerült külön-külön Taqman real-time PCR reakciókban (amiben egyébként ugyanazon szekvenciájú primerek vannak, mint a TLDA kártyán). E sikerességi arány más kutatócsoportok eredményeivel megegyezik [1]. E rossz sikerességi arányra, valamint a Taqman TLDA kártyák nagy költségére is tekintettel, amint a mikroRNS microarray már elérhetővé vált Agilent platformon, a phaeochromocytoma mikroRNS expressziós vizsgálatot már ezen végeztük. Az ennek értékelése alapján kiválasztott 5 szignifikánsan változó

mikroRNS közül valamennyi validálása sikerült Taqman real-time PCR módszerrel. Mindezek alapján jobb módszernek tartjuk a mikroRNS microarrayt és az azt követő real-time PCR validálást, és a jövőben is ezt tervezzük.

2. *A phaeochromocytomák mikroRNS expressziós vizsgálata során a neurofibromatosis 1-ben szenvedő betegek mintáit csak a real-time PCR validálás során vizsgálták. Miért nem történtek e mintákra is microarray vizsgálatok?*

Válasz: E módszertani lépés magyarázata a vizsgálat eredményeit közlő cikk bírálati folyamatából következik. A Modern Pathology folyóiratba elsőként benyújtott cikkverzióban a MEN2, VHL, sporadikus benignus és sporadikus recidiváló phaeochromocytomák adatai szerepeltek. A kedvezőnek tartható első bírálatban hiányolták a neurofibromatosis 1 betegek mintáit, amit az első verzióban azért nem illesztettünk bele, mert csak kevés mintával rendelkezünk. A cikk revízióban 5 neurofibromatosis 1-es típusában szenvedő beteg phaeochromocytoma mintáit is beillesztettük. Microarray vizsgálatot azért nem végeztünk ezekre, mivel ez egyrészt igen nagy költségű lett volna, másrészt, és ez még fontosabb, egy új mintákkal végzett ismételt microarray és az összes microarray eredmény új statisztikai elemzése más eredményekre is vezethetett volna, mint az első vizsgálatunk, ami a teljes cikk átírását eredményezhette volna. Ezért úgy döntöttünk, hogy a MEN2, VHL, sporadikus benignus és sporadikus recidiváló phaeochromocytomákra végzett microarray során szignifikánsan változó és validált gének expresszióját vizsgáltuk neurofibromatosis 1-ben valós idejű PCR módszerrel. A cikket ezt követően elfogadták.

3. *Egyre több adat szól arról, hogy a szöveti mikroRNS-ek mellett a mikroRNS-ek a keringésben is kimutathatók. Vannak-e adatok a mellékvese-daganatban szenvedő betegek keringő mikroRNS-eiről?*

Válasz: A keringő mikroRNS-ek vizsgálata az utóbbi évek kutatásainak egyik legforróbb területe [2]. Mellékvese-daganatokban eddig nem jelent meg közlemény e témában. Kutatócsoportom egyik aktuális témája a keringő mikroRNS-ek kifejeződésének vizsgálata, amit az Európai Mellékvesekéreg Kutató Társaság (European Network for the Study of Adrenal Tumors) is befogadott, mint kutatási irányt. Technikailag a plazma mikroRNS-ek vizsgálata komoly kihívást jelent, mivel koncentrációjuk sokkal kisebb, mint a szöveti mikroRNS-eké, és izolálásuk is nehezebb.

4. *Milyen lehetőséget lát a szignifikánsan eltérő mikroRNS-ek terápiás befolyásolására a mellékvese-daganatok kezelésében?*

Válasz: A megváltozott expressziót mutató mikroRNS-ek, mint potenciális terápiás célpontok befolyásolása intenzív kutatások tárgya [3]. Egyelőre a klinikai onkológiai gyakorlatban még mikroRNS expressziót befolyásoló kezelést más daganatban sem vezettek be, bár vannak reményteli célpontok. A mellékvese-daganatokban még nem ismert olyan mikroRNS, amely egyértelmű célpontként alkalmas lenne, amiben az is szerepet játszik, hogy az eddig végzett kevés mikroRNS expressziós vizsgálat között elég jelentősek a különbségek [4]. Ebben az eltérő vizsgálati csoportok, módszerek, statisztikai elemzés különbségei is szerepet játszanak. Amennyiben a mikroRNS-ek kísérletes validálása egyértelműen sikeres, elvileg szóba jöhetne a mikroRNS-ek terápiás befolyásolása is mellékvese-daganatokban, így a tumor szupresszor hatású mikroRNS-ek kifejeződésének fokozása vagy az onkogén mikroRNS-ek kifejeződésének gátlása révén. Több olyan vektor érhető már el, amely mikroRNS-ek bejuttatására alkalmas lehet. Ennek gyakorlati kivitelezésében azonban számos probléma vár megoldásra, így a hatékony szervezetbe juttatás kérdése, a szövetspecifitás problémája, ill. a dózis kérdése. A megfigyelés, hogy a mikroRNS-ek szövetspecifikus hatásúak, vagyis ugyanaz a mikroRNS egyik szövetben onkogén, míg a másokban tumor szupresszor hatású is lehet [5], nagyfokú óvatosságra int szisztémás bejuttatás esetén. Másik nagyon komoly probléma a bevitt vektor dózisa. Virális vektorok esetén komoly probléma lehet, hogy a termelt pre-mikroRNS vagy mikroRNS-gátló oligonukleotid telítheti az endogén mikroRNS érési rendszert, ami az endogén szabályozó rendszer összeomlásához és beláthatatlan következményekhez vezethet [3]. Mindezek alapján nem hiszem, hogy a közeljövőben a mikroRNS-ek terápiás célpontok lennének, de hosszútávon mindenképpen szóba jöhetnek.

5. *A hisztamin és a hisztaminnal kapcsolatos gének és fehérjék mellékvesekéreg-daganatokban észlelt eltérő kifejeződésével kapcsolatban kérdezem, hogy van-e adat a mellékvesekéreg-daganatok eltérő megjelenési gyakoriságáról pl. krónikus asztmában szenvedő betegekben?*

Válasz: Logikus felvetés lehet eredményeink alapján, hogy a krónikus allergiás kórképek, ahol a hisztamin felszabadulása fokozott, összefüggésben lehetnek a mellékvesekéreg-daganatok megjelenésével. A szakirodalomban azonban nem találtam olyan adatot, ami ezt a feltételezést alátámasztaná. Ebben közrejátszhat egyrészt az, hogy a daganatok kialakulása lassú folyamat, másrészt a krónikus asztmás betegek gyógyszeres kezelése, az antihisztaminok kiterjedt alkalmazása révén nemigen találhatunk olyan betegcsoportot, ahol hosszú éveken át fennálló súlyos allergiás kórképben szenvedők ne kapnának kezelést.

6. *A RET-gén TGC611TAC mutációt hordozó betegben kétoldali pheochromocytomára és primer hyperparathyreosisra derült fény. A medulláris pajzsmirigyák hiánya MEN2*

szindrómában a beteg 46 éves korában bizonyára tényleg ritkaságszámba megy. A család további tagjaiban is hasonló lefolyású betegséget figyeltek meg?

Válasz: A TGC611TAC *RET* protoonkogén mutációt hordozó nő kiterjedt családjából csak gyerekei voltak hajlandók alávetni magukat genetikai vizsgálatnak. Az értekezés benyújtása óta még egy nagykorú gyermeke volt hajlandó vérvételnek alávetnie magát, és vele összesen három gyermekben találtuk meg a mutációt. Az érintettekben daganat megjelenését még nem észleltük, ami nem tartható meglepőnek, mivel az index esetben is csak 40 éves kora felett jelentkeztek a tünetek. Véleményünk szerint a mutáció lassú progressziójú betegségre hajlamosíthat. Sajnos a beteg testvérei nem hajlandók sem genetikai, sem klinikai vizsgálatokon jelentkezni, így nem tudjuk megítélni, hogy az index esettel hasonló korú esetleges hordozókban is hasonló lefolyású betegség jelenik-e meg.

Még egyszer köszönöm Professzor Úr megjegyzéseit és elmélyülésre alkalmat adó kérdéseit, és tisztelettel kérném válaszaim elfogadását.

Budapest, 2012. szeptember 7.

Tisztelettel:

Dr. Igaz Péter PhD
egyetemi adjunktus

Felhasznált irodalom:

- [1] Resnick KE, Alder H, Hagan JP és mtsai: The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* (2009) 112: 55-59.
- [2] Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J és mtsai: MicroRNAs in body fluids: the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* (2011) 8, 467–477.
- [3] McDermott AM, Heneghan HM, Miller N és mtsai: The therapeutic potential of microRNAs: disease modulators and drug targets. *Pharm Res* (2011) 28:3016–3029
- [4] Singh P, Soon PSH, Feige JJ és mtsai: Dysregulation of microRNAs in adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol* (2012) 351, 118-128
- [5] Chen CZ: MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* (2005) 353, 1768-1771.