

Válasz

Prof. Dr. Kopper Lászlónak

„A keratinociták fiziológiás és patológias változásai környezeti hatásokra és ezek szerepe bőrtumorok kialakulásában” című MTA doktori értekezésemre írott hivatalos bírálata

Mindenek előtt szeretném megköszönni Kopper László Professor Úrnak, hogy az MTA doktori értekezésem opponensi feladatát elvállalta. Végtelen hálás vagyok, hogy Professor Úr időt szentelt a dolgozat minden részletre kiterjedő elolvasására és megtette kritikai észrevételeit.

Külön köszönöm azokat az építő jellegű kérdéseket, amelyeket hozzám intézett és így lehetőséget teremtett a pontatlan, kevésbé egyértelmű, vagy éppen kissé idejétmúlt következtetéseim újragondolására.

Tisztelettel köszönöm méltató szavait, a tudományos eredményekkel való elégedettségének kinyilvánítását és azt, hogy a dolgozatot nyilvános vitára érdemesnek találta.

T. Bírálóm általános megjegyzésként észrevételezi, hogy esetenként túl sok az indokolatlan szakmai zsargon és a gépelési hiba, amely az érthetőség rovására megy.

Válasz: Tisztelettel köszönöm és elfogadom Professor Úr észrevételét, a jövőben születendő munkáimban nagyobb gondossággal járok majd el és a szövegszerkesztő programokat is nagyobb odafigyeléssel választom meg.

Professor úr kérdésként, megjegyzésként intézi hozzám, hogy „Az viszont sajnálatos, és ez nem a jelölt hibája a túlzott optimizmusa ellenére – hogy a szuppresszorgének funkcióvesztését, elszört pozitív klinikai próbálkozások ellenére, terápiásan nem sikerült még befolyásolni”.

Válasz: Ezzel a megjegyzéssel kétségtelenül egyetértek, bár azért a mostani próbálkozások potenciálisan hordozhatják magukban egy jövőben igen sikeres kezelés lehetőségét. A témában megjelent egyik első eredmény 2007-ben a Nature-ben került publikálásra, ahol igazolták, hogy a p53 funkciójának helyreállítása – ha speciális körülmények között is – de lehetséges és ezáltal tumorok regressziója idézhető elő[1]. Emellett egészen friss példaként említenék egy 2012 májusában megjelent közleményt, amelyben a szerzők egy olyan molekuláról számolnak be, amely képes volt a p53 egy gyakran előforduló mutációjára, a p53-R175H esetén a struktúra és a funkció teljes visszaállítására, így egy sor daganatellenes kezelés lehetősége vált ismételten hatásossá a kísérletes rendszerükben[2]. Kétségtelen, hogy még igen hosszú út vezet ezen molekulák klinikai használatáig, de a koncepció működőképességét ezek a közlések mégis bizonyítják.

T. Bírálóm a továbbiakban azt kérdezi: “A 62. oldalon írt „Az UV-indukált fokozott apoptózis hátterében a Trp53 tumor szuppresszor fehérje... (megj: csak akkor „tumor”, ha a funkciója károsodik és ez járunk hozzá a daganat kialakulásához)...fokozott expressziója áll.” Ez igaz lehet, de mi bizonyítja?”

Válasz: A p53 elnevezésében a “tumor szuppresszor gén” elnevezés honosodott meg, és ezt az elnevezést konzekvensen használják ma is, annak ellenére, hogy ez valóban kissé pontatlan, hiszen a vad típusú gén nem elnyomja a tumort, sokkal inkább kialakulása ellen véd[3], Ezzel együtt azonban ez a kifejezés olyan széles körben terjedt el, hogy nem lett volna bátorságom más elnevezést használni.

A p53 szerepét az apoptózis kiváltásában igen sok in vivo és in vitro vizsgálat is alátámasztotta.

Saját munkámban is reprodukáltam a p53 knockout egerek UV-besugárzásával végzett kísérletet, amely azt mutatta, hogy a homozigóta null egerek apoptóziskészsége minimális szemben a vad típusú állatok kifejezett apoptóziskészségével. Az erre vonatkozó eredeti közleményt a referenciák között fel is tüntettem[4].

Professzor Úr következő kérdése így hangzik: “Mit üzen az 5.1.7. ábra?”

Válasz: Az ábra y tengelyén a p53 pozitív sejtek számát ábrázoljuk az epidermisz 1cm-ére vetítve, hasonlóan az 5.1.6-os ábrához. Professzor úr kérdése teljesen jogos, mivel az ábra aláírásában ugyan helyesen szerepel, hogy ez az Xpc knockout vs. vad típusú állatok bőrében észlelhető p53 pozitivitás ábrázolása, de a görbék melletti ábrafelirat tévedés, az az 5.1.6-os ábra görbéit azonosítja, nem erre vonatkozik. Ennek a hibának technikai oka van, elnézést kérek érte.

Az 5.2. rész felveti, hogy az *E2F1* gátlása p53 mutációja esetén onkológiailag hasznos lehet. Ez jó lenne, de ki lehet-e hagyni a történetből a retinoblasztoma gént/fehérjét?

Válasz: Az Rb gén és terméke in vivo észlelések szerint akár felsőbbrendűnek is tekinthető a tumorok kialakulása és az ellenük való védekezés szempontjából, hiszen ezen gén elvesztése embrionálisan letális egerekben[5], illetve a gén mutációja önmagában elegendő a névadó malignus folyamat kialakításában embereknél is. Ezzel együtt, az általam felvázolt koncepció csak úgy működhet, ha feltételezzük, hogy az Rb funkciója teljesen intakt, hiszen ennek mutációja esetén lényegében az E2F1 vagy p53 érintettsége nélkül is kialakul tumor.

Professzor Úr a következőkben így fogalmaz “Az 5.3. rész a Trp53 mutáns klónokkal foglalkozik. A 84. oldalon azt írja, hogy „az UV-indukált tumorokban is szükséges a folyamatos UV hatás a tumor növekedéséhez” (hivatkozás a 308-as irodalomra, 1999-ből). Ez azt jelenti, hogy a tumor kialakulásához állandó UV expozíció kell? (Reggeltől estig kint kell feküdni a strandon?)”

Válasz: Természetesen az általunk felvázolt eseménysor nem ilyen egyszerű, köszönöm szépen Professzor Úr megjegyzését, hogy ezáltal is árnyalhassam a mondanivalómat. Az UV-indukálta tumorképződés számos etiológiai faktorra vezethető vissza. A klinikai tapasztalat is az, hogy számos fehér bőrű, kék szemű, könnyen a napon leégő páciensnél nem alakul ki spinalioma, még akkor sem, ha relatíve sokat voltak napon. Más esetekben ennek az ellenkezőjét látjuk, azaz kisebb UV terhelés és látszólagos nagyobb UV-iránti tolerancia esetén is létrejön ez a daganat. Az itt idézett közlemény egy korábbi kollaborációs partnerem, Frank de Gruijl 1990-es évekből származó közleménye, akik elsőik között igazolták, hogy a hairless (szőrtelen) egerek folyamatos UVB besugárzása nélkülözhetetlen ahhoz, hogy in vivo daganatok kialakulását észleljük. Az ő modellrendszerükben nem került meghatározásra az a minimális UVB dózis, és különösen nem az a minimális idő, ami két besugárzás között el kell teljen, ahhoz, hogy tumorok kellő hatékonysággal előidézhetőek legyenek. Ezek teljesen jogos kérdések, amelyek megválaszolása még várat magára, de fontos információ lehetne egyebek mellett például a „heti hány szoláriumhasználat biztonságos még?” kérdésfelvetésre. Erre az utóbbi kérdésre vonatkozóan néhány hete jelent meg közlemény a British Medical Journal-ben, ahol a szerzők metaanalízist végeztek a szoláriumok kockázatát felmérő klinikai vizsgálatok adatait értékelve és arra konklúzióra jutottak, hogy a szoláriumhasználat egyértelmű kockázatot jelent mint a basalioma, mint a spinalioma kialakulás szempontjából[6]. A kérdés azon részére, hogy a napon tartózkodásnak milyen hosszúnak kell lennie, azt válaszolom, hogy az UV-sugárzás ugyan nem ionizáló sugárzás, mégis a kumulatív dózissal egyértelmű szerepe van, azaz az elszenvedett károsodások összeadódnak az évek során, aminek jó klinikai illusztrációja a photoaging, a „fényöregedés” jelensége.

T. Bírálóm megjegyzi, hogy a „A preambulum és a bevezetés (35 oldal) vegyes benyomást kelt. Jó

néhány évvel ezelőtt sok új adatot tartalmazott volna, néhányat tartalmaz most is, de zöme „tankönyv vagy kézikönyv” ízü”, tele olyan szövegekkel, amelyek mára már jól ismertek. Bizonyos értelemben utal erre az irodalomjegyzék is, 365 hivatkozással, melynek kétharmada 2002-ből vagy előbbi időből származnak.”

Válasz: Ezzel kapcsolatban ismételtelen csak megköszönni szeretném Professzor Úr észrevételét. Igyekeztem a dolgozat összeállításánál megmutatni, hogy egy hosszabb aktív kutatói időszakot átívelő, szintézis jellegű munkát állítok össze, amihez elengedhetetlennek éreztem az első közlések felsorolását minden jelentősebb megfigyelésnél. Ezzel természetesen jelentősen emelkedett a hivatkozott közlemények átlagéletkora. Nagyobb figyelmet szentelhettem volna annak, hogy mindenütt rögtön párhuzamba állítsam az eredeti közléseket a dolgozat írása előtt kevésbé megjelent publikációkkal. A friss irodalmi hivatkozásokat igyekeztem minden esetben áttanulmányozni, de referenciaként nem minden esetben neveztem meg őket.

T. Bírálóm következő észrevétele arra vonatkozik, hogy az egyes közleményekben általam végzett munka nem azonosítható pontosan.

Válasz: A személyes hozzájárulásomat az egyes közleményekhez a Tímár Professzor Úrnak írt válaszümban részletekbe menően felsoroltam, engedtesék meg, hogy e helyütt csak röviden válaszoljak a kérdésre.

Minden első és utolsó szerzős közleményben az ötlettől a gyakorlati kivitelezésen át a kézirat megírásáig meghatározó szerepet játszottam. A többedik szerzős közleményeknél a szerepem minden esetben igen jelentős volt, amint azt a HIF1alfa és a PTCH polimorfizmus közleményeknél részleteztem. A későbbiekben témavezetői feladatokat láttam el, ahol már a gyakorlati kivitelezés pl. a keratinocita differenciációs és génexpressziós munkában a PhD hallgatóm, dr. Paragh György munkáját dicséri. A kísérletek megtervezésében, az eredmények értékelésében, a következtetések levonásában, ennek a klinikum számára való rendszerbe foglalásában és a kézirat elkészítésében ilyenkor is jelentős szerep jutott nekem. Fentiek mellett minden közleménybe a magam részéről a bőrgyógyász klinikai tapasztalatot, az egerekkel, sejtekkel való munka és az UV kísérletek gyakorlati kivitelezését tettem hozzá. A besugárzáshoz szükséges fényforrások beszerzését, a dozimetriai számításokat én végeztem. Az UVB sugárzással végzett kísérletek közvetlen megvalósítását én kezdtem el, majd az általam betanított PhD hallgató és asszisztens folytatta. A közleményekben részletezett kísérletekhez én munkám és irányításom nélkülözhetetlen volt, mivel UV-kísérletek végzésében korábbi munkáimból fakadóan nekem volt kellő jártasságom.

T. Bírálóm véleménye szerint: „Jó felvetés a PI3K-AKT-mTOR jelátviteli út szerepének felvetése (bár kár, hogy a vizsgálatokból kimaradt pl. a PTEN és az mTORC1 – utóbbi szoros kapcsolatban van a HIF1alfával). Említés történik arra, hogy a”az Akt foszforilációját egy specifikus anti-F-aktin antitest segítségével vizsgáltuk. Kétségtelen, hogy az aktint is lehet vizsgálni, de bíráló ebben a környezetben a PI3K-úton szereplő Akt-re gondolna, ami nem az aktint jelenti. (Jacob Furth spontn thymus lymphomákat – innen a „t”, figyelt meg „Ak” törzsű egerekben; v-akt, virális antigén.) Ha a felvetés jogos, akkor kérdés, hogy az anti-aktin antitesttel végzett vizsgálatok eredményeit hogy lehet magyarázni?

Válasz: Professzor Úr egy gépelési hibára irányítja rá a figyelmemet, amiért szintén elnézést kérek. Természetesen vizsgálatainkban a foszforilált Akt-ra voltunk kíváncsiak, azaz anti P-Akt lett volna helyes, amint ezt az eredeti közlemény Anyagok és Módszerek része is tartalmazza.

A következő blokk értékelésekor Kopper Professor Úr megjegyzi: „– Az 5.6. rész új szfingolipid származékokat ír le a keratinocyták differenciációjával kapcsolatban. Csak egy kérdés: ha a stratum corneumnak a sejtjei már magot nem tartalmazó keratinnal kitöltött élettelen zsákok (lásd a Preambulumban), és a szfingolipidek adják a stratum corneum lipidjeinek felét, akkor voltaképpen mi a funkciója a stratum corneumnak? És ennek mi a morfológiai és molekuláris alapja? Hatást gyakorolnak ezek a szfingolipidek a differenciációra?

Válasz: Az emberi bőr sajátossága a sejtmag nélküli keratinociták rétege a stratum corneum, amelyeket talán túlzás volt élettelen zsáknak neveznem. Nyilvánvalóan az itt található lipidek a korábbi terminális differenciáció lépései során alakultak ki. A bőr élő rendszer, amelyben még a mag nélküli corneocytáknak is megvan a maguk szerepe, amely nyilvánvalóan nem passzív és nem szorítkozik csak a mechanikai barrier létrehozására. Az epidermalis barrier és permeabilitás funkcióknál a szfingolipidek megfelelő szintézisének a szerepe meghatározó. Ennek egy példaként említem azt a vizsgálatot, ahol a szerin-palmitoil transzferáz enzim béta-chloro-L-alanin általi gátlásának hatását vizsgálták. Ez a molekula a szfingolipid szintézis kulcs enzime, gátlásával jól tanulmányozhatóak az inadekvát szfingolipid produkció hatásai. A gátlószer egyszeri alkalmazása után az acetonnal kezelt szőrtelen egerek barrierfunkciója lassabban állt vissza, ami az aktív szfingolipid szintézis esszenciális voltát támasztja alá[7]. Azt talán túlzás lenne kijelenteni, hogy a stratum corneum lipidjei egyfajta visszacsatoló mechanizmussal hatnának az alsóbb sejtsorok terminális differenciációjára, de a terminális differenciáció folyamatára a közben létrejövő szfingolipidek bizonyára hatással vannak. Léteznek ugyan szfingolipid anyagcsere egyes elemeire, pl. a szfingolipid aktivátor proteinre (SAP) nézve knockout egerek, ezeknél azonban a neurológiai tünetek dominálják a fenotípust[8]. Emellett a szfingolipid bioszintézis más szintjén, pl. a szfingomyelin szintetáz-1 gátlása inkább atherosclerosis kialakulásában bír drámai hatással[9].

Professzor Úr megjegyzi ,hogy: „– Az 5.8. rész a PTCH 1315 kodon polimorfizmusát és a nem-melanoma bőrtumороk kockázatával való kapcsolatát elemzi. Pozitív az intellektuális megközelítés, de probléma a kis esetszám miatt a következtetések feltételezése.”

Válasz: A populációgenetikai vizsgálatok visszatérő nehézsége a megfelelő mintaszám. Esetünkben is a rendelkezésre álló DNS mennyisége korlátokba ütközött, mi magunk is szerettünk volna egy ennél bővebb mintaszámmal dolgozni. Ezzel együtt, az alkalmazott mintaszám nem tekinthető túlságosan alacsonynak, amennyiben 79 fekete-afrikai (Yoruba) 86 amerikai feketebőrű, 90 észak-európai amerikai, 27 dán, 94 ír, és összesen 163 különböző bőrtumor anamnézissel bíró svéd mintát tartalmazott az eredeti 7 amerikai kezdeti anyag mellett. A mintaszám így összesen 546 elemű volt, ami már statisztikai számításokhoz kellő számosságú csoportot adott.

Ismételten köszönöm Kopper László Professor Úrnak, hogy a dolgozatom opponensi munkáját elvégezte. Köszönöm, hogy MTA értekezésemet mind formailag, mind tartalmilag az előírt követelményeknek megfelelőnek tekinti, eredményeit elégségesnek tartja és annak nyilvános vitáját megtarthatónak tartja.

Tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2012. november 6.

Dr. Wikonkál Norbert
egyetemi docens

Referenciák:

1. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*. 2007;445(7128):661-5.
2. Yu X, Vazquez A, Levine AJ, Carpizo DR. Allele-specific p53 mutant reactivation. *Cancer Cell*. 2012;21(5):614-25.
3. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009;137(3):413-31.
4. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*. 1994;372(6508):773-6.
5. Morgenbesser SD, Williams BO, Jacks T, DePinho RA. p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature*. 1994;371(6492):72-4.
6. Wehner MR, Shive ML, Chren MM, Han J, Qureshi AA, Linos E. Indoor tanning and non-melanoma skin cancer: systematic review and meta-analysis. *Bmj*. 2012;345:e5909.
7. Holleran WM, Man MQ, Gao WN, Menon GK, Elias PM, Feingold KR. Sphingolipids are required for mammalian epidermal barrier function. Inhibition of sphingolipid synthesis delays barrier recovery after acute perturbation. *J Clin Invest*. 1991;88(4):1338-45.
8. Oya Y, Nakayasu H, Fujita N, Suzuki K. Pathological study of mice with total deficiency of sphingolipid activator proteins (SAP knockout mice). *Acta Neuropathol*. 1998;96(1):29-40.
9. Li Z, Fan Y, Liu J, Li Y, Huan C, Bui HH et al. Impact of sphingomyelin synthase 1 deficiency on sphingolipid metabolism and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(7):1577-84.