

Válasz

Prof. Dr. Tímár Józsefnek

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

Elsőként is köszönettel tartozom Tímár József Professzor Úrnak, hogy az MTA doktori értekezésem bírálatát elvállalta. Hálás vagyok, hogy odaadó figyelemmel tanulmányozta át a dolgozatot és kérdéseket intézett hozzám a kevésbé egyértelmű részek tisztázására. Tisztelettel köszönöm elismerő szavait és hogy a dolgozatot nyilvános vitára érdemesnek találta.

Professzor úr kérdésként intézi hozzám, hogy azon négy közleményben, ahol társszerzőként szerepelek, pontosan mi volt az elvégzett munkákban az én szerepem?

Köszönettel veszem a kérdést, mert lehetőségem nyílik rávilágítani a kollaborációs munkákban klinikusként és magyar résztvevőként potenciálisan felmerülő helyzetekre.

A Ptch gén vizsgálatáról szóló közleményben harmadikként vagyok megnevezve szerzőként, azonban a lábjegyzetben feltüntettük, hogy az első három szerző egyformán működött közre a munkában. Valójában az én vizsgálataim indították el a témával való kísérleteket még a Yale Egyetemen Alen Bale és Mae Gaillani-val való beszélgetéseink során. Ők közölték elsőként a Ptch gén jelentőségét a sporadikus basaliomákban[1] A bőrgyógyászati klinikai gyakorlatom elsődleges volt a páciensek kiválasztásához és a tumorminták beszerzéséhez és feldolgozásához, mivel a bőrgyógyászati gyakorlat és az alap kutatásban való jártasság kombinációja az Egyesült Államokban relatíve ritkán észlelhető. A beszerzett mintákon még a Yale Egyetemen végeztem el a DNS izolálás, PCT, majd a gén 24 exonjának manuális szekvenálásait ³³P izotóp használatával. Az ígéretes első 7 eset tapasztalatai alapján bővítettük a kis esetszámú populációt egy nagyobb génbank anyagainak felhasználásával egészítettük ki már a svéd kollaboráló partnerek bevonásával. Az együttműködő kutatóknak lehetőségük volt a DNS mintákon high-throughput pyroszekvenálás módszerét használva relatíve rövid idő alatt a beállított paraméterek mellett a szekvenálást elvégezni. Mind a statisztika elkészítésében, mind a kézirat megírásában az első szerzőkre jellemző munkát végeztem, mivel azonban a munka anyag és pénzigényesebb része Svédországban történt, így a szerzők végső felsorolásban a harmadik hely jutott nekem.

A HIF1alfa vizsgálatában végzett munkában akkori PhD hallgatóm, Dr. Paragh György szerepel megosztott első szerzőként. Ezek a kísérletek akkor még nem lettek volna kivitelezhetőek a Bőrklínikán. Azóta a Klinika és az általam vezetett Fotodermatológiai, Fotokarcinogenezis munkacsoport jelentősen bővült, mára 2 főállású PhD hallgató mellett 2 levelező PhD hallgató és több TDK-s is dolgozik benne. Emellett a labor eszközparkja is tovább gazdagodott, mára önálló sejtbíológiai munkára is képessé váltunk. Az aktív kutatás jelenleg is folyik, eddigi eredményeink a publikációra való előkészítés szakában vannak. Maga a hypoxia vizsgálatának ötlete Prof. Mandl József akadémikus úr érdeme, akinek ezúton is köszönettel tartozom, hogy egy olyan pályázati konzorciumban vehettem részt, amelynek a vezetője a professzor úr volt, én pedig az egyik konzorciumi tag, a SE Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika részéről lehettem a csoportvezető. A közleménybe a magam részéről a bőrgyógyász klinikai tapasztalatot, a hypoxia jelentőségének bőrgyógyászati aspektusból való értelmezését, a keratinocitákkal való munka és az UV kísérletek gyakorlati kivitelezését tettem hozzá. A besugárzáshoz szükséges fényforrás 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. Ezekhez a kísérletekhez én munkám és irányításom nélkülözhetetlen volt, mivel UV-

kísérletek végzésében korábbi munkáimból fakadóan nekem volt kellő jártasságom.

A közleményben nem került ugyan felhasználásra, de a kísérleteinket elvégeztük primer humán keratinocitákon is, amelyeket a Bőrklínikán tenyésztettünk. Ezen sejtek tenyésztését korábban már végezték a klinikán Kárpáti Professzor Asszony laborjában, de a technika beállítására ismételtén szükség volt, amely most az laboromban történt meg a SE Bőrklínikán. A kísérletek megvalósításánál mind az elméleti tervezés, mind a konkrét gyakorlati kivitelezésben is tevékenyen részt vettem. A laborban dolgozó asszisztensnek, a PhD hallgatónak megtanítottam a labortechnikákat, a steril munkavégzés és sejtenyésztés szabályait, a PCR, Western-blot kivitelezését. Ezt követően képessé váltak az irányításom mellett önálló munka végzésére. A kézirat megírásában is jelentős fokban részt vettem, annak bőrgyógyászati szempontú átírása is az én munkám. A közlemény levelező szerzőjeként is én vagyok feltüntetve.

A keratinocita differenciációval és szfingolipidek hatásával foglalkozó közlemények első szerzője az akkori PhD hallgatóm, dr. Paragh György. Ezek a munkák nagyrészt Németországban prof. Gerd Schmitz laboratóriumában kerültek kivitelezésre. Folyamatosan élő volt a kapcsolatom a PhD hallgatómmal, amellet, hogy a szfingolipid keratinocita differenciációját vizsgáló csoport egyedüli bőrgyógyász szakorvosaként kiemelt módon volt ráhatásom a kutatások megtervezésében, kivitelezésében és annak klinikai értelemezésében. Paragh dr. önállóan végezte a munkáját, azonban technikai kérdésekben rendszeresen konzultáltunk. Egyes minták, amelyek a közleményekben végül nem kerültek felhasználásra a Semmelweis Egyetem Bőrklínikájáról származtak. A kézirat elkészítésében is aktívan részt vettem, annak klinikailag helyes voltát ellenőriztem, korrigáltam. A szerzők felsorolásánál meghatározó jelentőségű volt, hogy a kísérletek anyagi hátterét, a felhasznált anyagok nagy részét, a módszereket a német partner biztosította, így pusztán társszerzőként jelenhetett meg a nevem a felsorolásban.

További kérdésként intézte hozzám Tímár professzor úr a p53 pozitív klónok dinamikájának tanulmányozásával kapcsolatos vizsgálatainknál, hogy a p53 sejtek a hám melyik rétegében helyezkednek el, van-e esélyük az immunrendszer effektor sejteinek ezekhez hozzáférni?

Az egér epidermisze az emberéhez képest sokkal vékonyabb, alig néhány sejtsorból áll. A p53 pozitív sejtek a suprabasalis rétegben helyezkednek el, amint azt a keresztmetszeti képen is észlelni lehet[2]. A dermiszben keringő immunsejtek a hamba behatolva képesek citotoxikus hatást kiváltani, ami számos gyulladásos bőrgyógyászati kórkép, pl. ekcémák, psoriasis meghatározó eleme. Professzor Úr kérdését a daganatellenes effektor immunválaszra vonatkoztatva is találhatóak az irodalomban közlések. Egyik kiterjedten vizsgált terület a polifenolok daganatellenes hatásában megfigyelhető immunológiai történéseket írja le[3]. Krónikus UVB besugárzásnak kitett egereket vizsgálva igazolták, hogy a hámban a COX-2 szintje fokozott volt, amit a polifenolok képesek voltak hatékonyan csökkenteni. A DNS károsodás mértékének meghatározására azt a CPD antitest immunhisztokémiai módszert alkalmazták, amelyet a laborunkban is használunk az UV-sugárzás okozta károsodás detektálására. A hatékony polifenol védelem feltétele az IL-12 fiziológiás funkciója, amint ezt IL-12 knockout egereken végzett vizsgálatokkal igazolták[4].

A HIF-1 alfa UV sugárzás hatására létrejövő változásait tanulmányozó közleményünkhöz kapcsolódóan kérdezi Professzor Úr, hogy újabb saját, vagy irodalmi adatok ismertek-e a besugárzást követően rögtön megjelenő HIF-1 alfa mRNS és protein szintű csökkenésére?

A HIF-1 alfa kétfázisos viselkedés ma sem értett minden részletében. Közleményünk már a bírálati szakban volt, amikor egy részben hasonló megfigyelést ismertető cikk jelent meg, amely megerősítette a mi megfigyelésünket, azaz az UV hatására jelentkező bifázisos választ egy más aspektusban is észlelték. Erre a közleményünkben hivatkozunk is[5]. 2008-ban jelent meg egy olyan review, ahol nagy figyelmet szentelnek a HIF-1 alfa viselkedésében megfigyelhető kétarcúságnak[6]. Ebben a közleményben a normoxiás körülmények között a HIF-1 alfa RNS

transzlációja cap-dependens módon történik. Bizonyos feltételek megléte esetén a HIF-1alfa transzlációját a PtdIns3K–Akt–mTOR és a MAPK (RAS–MEK–ERK) útvonalak aktiválódása idézi elő. Később, renális ischémia utáni reperfüziót vizsgálva közölték, hogy a HIF-1alfa felhalmozódása nem annyira az alacsony oxigén koncentráció, hanem sokkal inkább az Akt/mTOR útvonal kontrollja alatt áll[7].

Emellett számos közlemény foglalkozik a HIF-1a regulációjának kis molekulákkal való befolyásolásának lehetséges alkalmazásával az onkológiai terápiában hangsúlyozva ezen ismeretek potenciális klinikai alkalmazását[8].

A későbbiekben a HIF-1alfa további vizsgálatával nem foglalkoztunk, így további saját adat nem áll rendelkezésre.

T. Bírálóm a keratinociták differenciációjára kifejezett hatását tanulmányozó cikkhez kapcsolódóan hiányolja a morfometriai és statisztikai analízist és csak a fehérjék expresszáldását látja bizonyítottnak az epidermiszben.

A keratinocita differenciációban szerepet játszó gének azonosítása során a vizsgálatban célunk olyan új gének azonosítása volt, amelyek keratinocita differenciáció során betöltött szerepe eddig nem volt ismert. A gének expressziójának változását több gén esetében több módszerrel megvizsgáltuk, és számos gént azonosítottunk ami mind egy rövid konfluencia és mind egy hosszabb távú kalcium-indukálta differenciáció során jelentős génexpresszió emelkedést mutattak. Az egyes vizsgálatokban a statisztikai elemzés ugyan elvégezhető lett volna, de úgy véltük, hogy a két külön elemzés nem adna hozzá érdemben ahhoz a tényhez, hogy a két mRNS szinten végzett vizsgálat egybecsengő eredményeket mutatott. A két vizsgálat együttes elemzésére pedig nem lett volna lehetőség, így csak egyszerűen a hosszú távú adatok és azok megoszlásának (SEM) ábrázolása mellett döntöttünk. Az immunhisztokémiai vizsgálatok statisztikai elemzését a meglévő keretek között szintén nem láttuk lényegesnek. Ez vagy nagyon mesterséges határok megvonásával lett volna csak elvégezhető (bazális réteg festődés denzitása a suprabazális réteggel összehasonlítva) vagy csak sokkal több biológiai minta vizsgálatával lett volna lehetőség rá. Lévéen nincsen igazán adekvát és a gyakorlatban bevált teszt az efféle összevetésekre, így az összes szerző és a cikk bírálói is egyetértettek abban, hogy az immunhisztokémiai vizsgálatok a vizsgált gének differenciáció-függő expresszióját támasztják alá. Az immunhisztokémiai eredmények a génexpressziós vizsgálatok validitását és a tapasztalt eltérések fiziológiás jellegét igazolták, így további statisztika alkalmazásától eltekintettünk.

Ismételten köszönöm Tímár József Professzor Úrnak, hogy a dolgozatom bírálatát elvégezte. Köszönöm, hogy MTA értekezésemet mind formailag, mind tartalmilag az előírt követelményeknek megfelelőnek tekinti és nyilvános vitára alkalmasnak tartja. Tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2012. november 6.

Dr. Wikonkál Norbert
egyetemi docens

Referenciák:

1. Gailani MR, Stahle-Backdahl M, Leffell DJ, Glynn M, Zaphiropoulos PG, Pressman C et al. The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas. Nat Genet. 1996;14(1):78-81.
2. Rebel HG, Bodmann CA, van de Glind GC, de Gruijl FR. UV-induced ablation of the epidermal basal layer including p53-mutant clones resets UV carcinogenesis showing squamous cell

- carcinomas to originate from interfollicular epidermis. *Carcinogenesis*. 2012;33(3):714-20.
3. Mantena SK, Meeran SM, Elmetts CA, Katiyar SK. Orally administered green tea polyphenols prevent ultraviolet radiation-induced skin cancer in mice through activation of cytotoxic T cells and inhibition of angiogenesis in tumors. *J Nutr*. 2005;135(12):2871-7.
 4. Meeran SM, Akhtar S, Katiyar SK. Inhibition of UVB-induced skin tumor development by drinking green tea polyphenols is mediated through DNA repair and subsequent inhibition of inflammation. *J Invest Dermatol*. 2009;129(5):1258-70.
 5. Rezvani HR, Dedieu S, North S, Belloc F, Rossignol R, Letellier T et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha, a key factor in the keratinocyte response to UVB exposure. *J Biol Chem*. 2007;282(22):16413-22.
 6. Yee Koh M, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci*. 2008;33(11):526-34.
 7. Conde E, Alegre L, Blanco-Sanchez I, Saenz-Morales D, Aguado-Fraile E, Ponte B et al. Hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1 alpha) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival. *PLoS One*. 2012;7(3):e33258.
 8. Xia Y, Choi HK, Lee K. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2012;49:24-40.