

Bírálat

Dr. Kiss István „Génexpressziók és allélpolimorfizmusok, mint a daganatmegelőzés molekuláris epidemiológiai biomarkerei” c. doktori értekezéséről

Dr. Kiss István teljes terjedelmű doktori értekezést nyújtott be a Doktori Tanácsnak, mellyel eddigi tudományos tevékenységének összefoglalását adva pályázik az MTA doktora cím megszerzésére. A dolgozat 15 impakt faktorral rendelkező újságban és 12 hazai folyóiratban megjelent tudományos közleményre épül, tehát a Jelölt a PhD fokozatának megszerzése óta publikált 27 cikkének eredményeit összegezte a munkájában. Ezek közül az első 2000-re, míg az utolsó 2013-ra datálódik. A közel másfél évtizedet átívelő munka egy rendkívül tudatos témaválasztás mentén zajlott, melynek köszönhetően a doktori mű koherens, témái egymással összefüggnek, és az eredmények értelmezéséből egyértelműen látszik, hogy Dr. Kiss István a daganatos betegségek molekuláris epidemiológiai vizsgálatának hazai és nemzetközi mércével mérve is neves szakembere.

A doktori értekezés 174 oldal terjedelmű, rendkívül igényes kivitelezésű. A megfogalmazott **cím** nagyon jól orientálja az olvasót azzal kapcsolatban, hogy a Jelölt tudományos munkássága milyen kérdések megválaszolására irányul, ugyanakkor szerencsésebbnek tartottam volna a következő címadást: „Génexpressziós MINTÁZATOK és allélpolimorfizmusok...”

A **Bevezetés** 35 oldal terjedelmű, számos grafikonnal, jól összeállított ábraanyaggal szemlélteti a Jelölt a témaválasztásának fontosságát. Ezt követően tételesen végigvezeti az olvasót azokon a géneken, amelynek vagy a polimorfizmusait, vagy a génexpressziós változásait vizsgálta a különböző daganatos megbetegedésekben. Az egyes gének ismertetése kellően mértéktartó terjedelmű, megítélésem szerint a Jelölt pont annyit írt róluk, ami alapján az olvasó tájékozottá válik azzal kapcsolatban, hogy miért is ezekre a génekre esett a választás az egyes kórképek vizsgálatában.

Észrevételeim, kérdéseim a Bevezetés résszel kapcsolatban:

- 1) A 6. ábrán (8. oldal) jól látható, hogy az emlődaganatok esetében az incidencia és a mortalitás között nagyon nagy a különbség. A Jelölt megítélése, ill. epidemiológiai adatok szerint ez melyik tényezőnek tudható be elsősorban: a szűrések miatti korai stádiumú daganatészlelésnek és az azt követő sebészi beavatkozásnak, vagy az elmúlt években a terápiás eljárások terén tapasztalható nagyléptékű fejlődésnek?
- 2) A 7. ábrán ötféle daganat hazai incidencia változását mutatja be, de az ábramagyarázatban csak hármat említ meg.
- 3) A 9. ábra esetében nem kap az olvasó kellő mértékű tájékoztatást sem a szövegben, sem az ábraaláírásban arról, hogy a jobb oldalon található számsor pontosan mit jelent. Ezzel kapcsolatos kérdésem, hogy a Jelölt megítélése, ill. epidemiológiai vizsgálatok eredményei szerint a rossz szociális-gazdasági státuszú rétegek esetében elsősorban a hajlamosító környezeti/életmódbeli tényezők vagy az egészségügyi ellátáshoz való nehezített hozzáférés a fontosabb tényező?
- 4) A 12. oldal első bekezdésében leírtakat nem találtam indokoltnak: elsősorban Prof. Dr. Melegh Béla és Dr. Karcagi Veronika munkájának köszönhetően sokat tudunk a hazai roma lakosság körében diagnosztizált ritka monogénes betegségekről, de ez nem képezi tárgyát ennek a dolgozatnak.

- 5) A 15. oldal utolsó mondatának megfogalmazását (...nem százszázalékosan egyértelmű eredményekkel.) egy kicsit köznyelvinek találtam és hiányoltam a vonatkozó citációkat.
- 6) A 16. oldalon említi a Jelölt a CYP1A1 és CYP1A2 gén közös 5' nem transzlálódó régióját ill. a többi génszakasz nagyfokú homológiáját. Ebből adódik, hogy feltehetően génduplikációval jöhetett létre a két gén. Ismert-e az irodalomból, hogy ez a génduplikáció az evolúció során mikor következett be?
- 7) A 17. oldalon a Jelölt azt írja, hogy a CYP2E1 gén intronikus polimorfizmusainak jelentőségét nehéz értelmezni. Nem lehet, hogy a splicing szabályozásában vesznek részt?
- 8) A 20. oldalon a Jelölt említi, hogy lehetnek olyan GST proteinek is, amelyek nem rendelkeznek enzimaktivitással, hanem strukturális fehérjékként funkcionálnak. Itt hiányoltam a citációt. Nagy hangsúlyt kap, hogy a GST fehérjék a környezeti szennyezés, dohányzás által szervezetünkbe juttatott aromás szénhidrogének ártalmatlanítását végzik. Ezen szennyező anyagok megjelenése előtt mi volt a szerepe ezeknek a fehérjéknek, melyek a természetes szubsztrátjai?
- 9) Ugyanezen az oldalon nem tartom kellően informatívnak a 11. ábrát. Mi volt a forrás, mit jelent az „ND” jelölés a kappa osztálynál, mint jelent az „allélok” az utolsó sorban?
- 10) 23. oldal: Magam is szembesültem többször azzal, hogy egyes irodalmi források kettő, mások pedig három csoportot képeznek a populációkban az acetilátor státusz szerint. Jelölt megítélése szerint nem lehetséges, hogy bizonyos populációkban kettő, másokban három csoport különíthető el?
- 11) A 23. oldalon az utolsó bekezdésben hiányoltam a NATP pszeudogénre vonatkozó citációt. Mi volt a forrás a mikroRNS szabályozásban betöltött funkciójával kapcsolatosan?
- 12) 29-31. oldal: A p53 fehérje degradációjával kapcsolatosan egyre több információ van a COP1, az MDM2 és a Pirh2 fehérjéről, amelyek a p53 ubikvitinációját végzik. A Jelöltnek van-e tudomása olyan p53 mutációról, amely „megakadályozza” hogy ezen fehérjék ubikvitinálják, és ily módon stabilizálja a p53 fehérjét?

Nagyon tetszett, hogy a **Célkitűzések** két formában - egy általánosan megfogalmazottban és az elvégzett vizsgálatokat konkrétan felsoroló formában - is leírásra kerültek.

Az **Anyag és módszer** fejezet 15 oldal terjedelmű. Nagyon gondosan, áttekinthetően történt az összeállítás. A fejezet jelentős részét (5 oldal) az teszi ki, hogy a Jelölt 14 gén polimorfizmus vizsgálatait írja le alfejezetekbe bontva, ezek vagy allél specifikus PCR reakciók vagy PCR RFLP vizsgálatok voltak. Felmerült bennem a gondolat, hogy a használt primereket, a reakciókörülményeket, az alkalmazott restrikciós enzimeket és az analizált fragment méreteket egy táblázatban lehetett volna összesíteni, és ezzel tömörebbé tenni az Anyag és módszerek fejezetet. Észrevételeim, kérdéseim:

- 1) A 43. oldalon a CYP1A1 polimorfizmus vizsgálat leírásánál a Jelölt úgy hivatkozik a p53 polimorfizmus vizsgálatára, mintha az már korábban részletezésre került volna, holott arra 4 oldallal később, a 47. oldalon kerít sort.
- 2) A primereket a leírás szerint nagy koncentráció különbséggel használta a Jelölt az egyes PCR reakciók során: a 47. oldalon a p53 polimorfizmus meghatározásánál 1 μ M koncentrációjú, a GSTM1 és GSTT1 PCR reakcióknál 30 ill. 50 pmol mennyiségű, míg számos más reakció esetében (miR-146a PCR, HPV PCR) jóval alacsonyabb

koncentrációban (1 pM) alkalmazta a Jelölt primereket. Minek volt ez köszönhető? Nagyon különbözött a reakciók hatásfoka?

- 3) Szinte minden reakció detektálásánál részletezte a Jelölt, hogy hogyan történt a végtermékek detektálása, a HPV PCR-ok esetében ez elmaradt.
- 4) Az 50. oldalon leírja a Jelölt, hogy fej-nyaki daganatos betegek 116 fős csoportjából 2 év elteltével mindössze 18 beteggel sikerült folytatni a génexpressziós vizsgálatokat. Mi volt az elsődleges oka annak, hogy csak ilyen kisszámú beteggel tudták folytatni a vizsgálatokat?

Az **Eredmények** fejezet 47 oldal terjedelmű, jól követhetően alfejezetekre bontva, szemléletes ábrákkal mutatja be a Jelölt méréseinek eredményeit: elsőként a génexpressziós, majd a polimorfizmus vizsgálatok eredményeit ismerteti. Észrevételeim, kérdéseim:

- 1) Az állatkísérletek génexpressziós vizsgálatait szemléltető grafikonokon nem került feltüntetésre az Y tengelyen, hogy milyen egységekben adja meg a Jelölt a génexpressziós változásokat: sem ennek a résznek a szövegében, sem az „Anyag, módszerek” fejezetben nem találtam erre való utalást.
- 2) A 17-23. ábrákon az egyes szervekben a kezelésekre bekövetkező időbeli változásokat is bemutatja a Jelölt, szerencsésebbnek tartottam volna ezeket a változásokat vonalas ábrázolással szemléltetni, az oszlopdigramok erre – véleményem szerint - kevésbé alkalmasak.
- 3) 62. oldal: Az alfejezet címeként jobban hangzott volna „Génexpressziós változások humán vizsgálatokban”
- 4) A humán génexpressziós vizsgálatok eredményeit bemutató grafikonokkal kapcsolatosan is hasonló a problémám, mint az állatkísérleteknél: az Y tengelyen megadott %-os értékek mire vonatkoztatva kerültek feltüntetésre? A Jelölt utal rá az „Anyag, módszerek” fejezetben (43. oldal), hogy a Ha-Ras, c-myc p53 és β -aktin gének génpróbáit plazmidba illesztették, de hogy aztán ezt hogyan használták az expresszió kvantitálására, ez nem került leírásra. Mit jelentenek a kontrollokra megadott százalékos értékek (17,6 %, 32,8 és 16,6%) c-myc, a Ha-ras és a p53 gén expressziójának vonatkozásában (62. oldal)? Ugyanakkor a különbségek a kontroll és a betegcsoport között valóban demonstratívák, illetve a 17 beteg két év elteltével leírt génexpressziós változásai is jól követhetők az ábrákon.
- 5) A 64. oldaltól kezdődően a Jelölt a polimorfizmus vizsgálatok eredményeit mutatja be. Ezen, ill. a következő oldalon a 26. és 27. ábrák aláírása szerint genotípusok eloszlását szemlélteti, ugyanakkor a szövegben allélgyakoriságokat említ. Ha genotípusokat szeretett volna szemléltetni a Jelölt, akkor hol jelenik meg a szövegben is említett Val-homozigóta genotípus a grafikonon? Nekem az a meglátásom, hogy a Jelölt igazán allélgyakoriságokat ábrázolt, akkor viszont az ábra aláírásban, ill. a grafikon alá beszúrt kis táblázatban hibás a „genotípus eloszlás” kifejezés és az Ile/Ile és Ile/Val genotípusok feltüntetése.
- 6) A 28. és 29. ábrákon a szöveg, az ábraaláírás és az ábrázolt genotípus eloszlások egymással összhangban vannak, amikor a Jelölt az UGT1A1 genotípusok eloszlását mutatja be a daganatos betegekben és a kontroll csoportban.
- 7) A „high risk” angol kifejezés helyett szerintem bátran lehetett volna használni a „magas kockázatú” ill. „kettős magas kockázatú” kifejezéseket (66-68. oldal).
- 8) A Jelölt a 67-68. oldalakon Kaplan-Meier féle túlélési görbéken szemlélteti az egyes genotípusok túlélését. Sem az „Anyag és módszer”, sem az „Eredmények” részben nem találtam arra utalást, hogy mennyire volt egységes ezeknek a pécsi betegeknek az onkoterápiái kezelése. Ugyanez vonatkozik a későbbiekben bemutatott szombathelyi

fej-nyak daganatos ill. kolorektális daganatos betegcsoportra is. Erre vonatkozóan a Megbeszélés részben sem találtam további információt, a Jelölt ugyanakkor a 117. oldalon megemlíti, hogy „... a GSTM1 és T1 polimorfizmusok prognosztikus hatása feltehetően függ a betegség stádiumaitól, az alkalmazott kezelésektől és más genetikai faktorokkal való kölcsönhatásoktól”, illetve a 121. oldalon is tesz ilyen utalást: „A prognózisra gyakorolt hatás függ a tumortípustól és az alkalmazott kezeléstől.”

- 9) A Jelölt a 69-73. oldalon egy rendkívül gondosan megtervezett, végrehajtott gén-környezeti kölcsönhatás vizsgálat eredményeit mutatja be, amellyel igazolja a pre-miR-146 rs2910164 polimorfizmus kockázatemelő hatását. a beteg és kontroll csoportok illesztése, az alcsoportok kialakítása (stratifikálás), a kapott eredmények analízise és értelmezése példaértékű.
- 10) A 74. a 81. és a 94. oldalon bemutatott VI. VII. és VIII. táblázatok esetében ismét ellentmondás van a szöveg (allélgyakoriságok), táblázat aláírása (allélmegoszlások) és a táblázatban valóban bemutatott adatok (genotípusok) között.
- 11) Az allélpolimorfizmus vizsgálatok eredményeit bemutató alfejezetek címeit furcsállottam: pl. a 89. oldalon induló alfejezet címe. Helyette a következő kiegészítést javasolnám: „6. vizsgálati csoport: GSTM1, XRCC1 polimorfizmus vizsgálatok”. Ugyanez vonatkozik a 93. oldalon található alcímre is: „7. vizsgálati csoport: CYP1A1, CYP2E1, EPHX1 polimorfizmus vizsgálatok” szabatosabb lett volna címként.
- 12) Nagyon tetszett a 92. és 93. oldalon bemutatott elemzés a magas kockázatú allélek együttes előfordulására vonatkozóan: szépen kirajzolódik az a tankönyvi szemléltetés, amellyel a hallgatóknak a „threshold” elméletet bemutatjuk a multifaktoriálisan öröklődő betegségekre való hajlam kialakításával kapcsolatosan. Ugyancsak kiválóan találtam a 95. oldalon a XII. táblázatban bemutatott gén-gén kölcsönhatási vizsgálat eredményeit, amely ismét jól szemlélteti a gyakori betegségek poligénes hajlamosító hátterének kialakulását.
- 13) Szintén a legnagyobb elismeréssel kell szólni arról a rendkívül körültekintő betegbevonásról, a kontroll csoport illesztéséről, az adatok értékeléséről és értelmezéséről, amelyet a cervixrákra hajlamosító polimorfizmus vizsgálatok kapcsán bemutatott a Jelölt.

A bemutatott eredményeket 35 oldalas terjedelemben értelmezi a Jelölt – **Megbeszélés** fejezet - amely sorrendjében követi az eredmények bemutatását.

- 1) Az állatkísérletekben kapott génexpressziós eredményeket nagyon mértéktartóan diszkutálta a Jelölt, világosan szétválasztva annak lehetőségét, hogy a kezelések regulációs (transz) folyamatokon keresztül vagy magán a génen indukált (cisz) mutációkon keresztül vezetnek a tapasztalt változásokhoz, ugyanakkor egyértelmű bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy ezek az expresszió változások a karcinogén expozíció korai biomarkerei lehetnek. A 108-109. oldalon nagyon jó a gondolatmenete annak a résznek, amelyben a Jelölt a génexpressziós mérések gyakorlati alkalmazásának lehetőségeit fejti ki.
- 2) Ezt követően a fej-nyak daganatos betegek perifériás véréből mért génexpressziós adatokat értelmezi a Jelölt. Klinikai relevanciája természetesen ezeknek a méréseknek van, mivel az állatmodelleken alkalmazott, különböző szervekből történő génexpressziós méréseknek biomarker szűrési potenciálja nincs. Saját adatai, valamint a vonatkozó irodalmi adatok is megmutatják, hogy van létjogosultsága ezeknek a méréseknek a klinikumban is, és alkalmazhatók daganatos betegségek biomarkereként. Nagyon tetszett a diszkussziónak az a része, amelyben a Jelölt kifejti

a saját álláspontját, ill. ismerteti az irodalmi adatokat azzal kapcsolatosan, hogy egy szolid tumor jelenléte hogyan indukálhat a periférián detektálható génexpressziós változásokat.

- 3) A Megbeszélés következő részében a Jelölt nagyon jól összehasonlítja az általa alkalmazott hipotézis vezérelt eset-kontroll megközelítést és az elmúlt években nagymértékben alkalmazott teljes genomszűrési eljárásokat. Egyértelmű, hogy a daganatos betegségek esetében teljes mértékben indokolt a karcinogén anyagokat metabolizáló enzimeket kódoló gének variánsainak vizsgálata, így a Jelölt témaválasztása abszolút indokolt. Ezt az is nagyon jól mutatja, hogy a saját eredményeit igen sok, egyéb populációkban végzett vizsgálatok eredményeivel, valamint egyes polimorfizmusok esetében meta-analízisek eredményével is össze tudta vetni. A diszkusszió (és az egész dolgozat) nagy erősségének tartom a kapott eredmények rendkívül gondos, minden aspektusra kiterjedő megbeszélését. A Megbeszélésben ugyanakkor nekem úgy tűnt, hogy a Jelölt elsősorban az irodalomban fellelhető eset-kontroll tanulmányokkal és ezek meta-analízisével vetette össze saját eredményeit. Van-e tudomása olyan GWAS vizsgálati eredményről, amely a dolgozat tárgyát képező daganatos betegségek hajlamosító genetikai faktoraként azonosította az általa vizsgált géneket, ill. azok polimorfizmusait?
- 4) Szeretném felhívni a Jelölt figyelmét egy Sziciliában zajló kapcsolódó munkára, amelyben Antonella Agodi Professzor Asszony és munkatársai a cervix carcinoma-ra hajlamosító genetikai faktorokat vizsgálják, ők elsősorban a methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polimorfizmusára ill. a mediterrán diéta kapcsolatára fókuszálnak.

Végezetül egy közelmúltban lezajlott aktualitással szeretném zárni a véleményemet: A Jelölt a dolgozat utolsó két oldalában eredményeinek **gyakorlati alkalmazásáról, távlatairól** ír (137-138. oldal). Ebben a Jelölt említi a 23andme cég tevékenységét - kellő kritikát és távolságtartást megfogalmazva - illetve leírásra került az is, hogy „Mindazonáltal úgy tűnik, hogy ezeket a genetikai szolgáltatásokat „betiltani” nem lehet, A dolgozat benyújtása óta eltelt idő azonban bebizonyította, hogy igen is be lehet tiltani, ill. fel lehet függesztetni az ilyen jellegű tevékenységet, ahogyan azt az FDA tette a 23andme céggel 2013. novemberében.

Tisztelettel kérem a Jelöltet, hogy válaszaiban törekedjen a tömörségre.

Összegezve megállapítható, hogy Dr. Kiss István a benyújtott teljes terjedelmű dolgozatban bemutatott eredményeivel, valamint eddigi tudományos pályafutásával egyértelműen bizonyította, hogy méltó az MTA doktora fokozat odaítélésére. Ezért javaslom a nyilvános vita kitűzését és a doktori pályamunka elfogadását.

Szeged, 2014. március 5.

Tisztelettel:

Dr. Széll Márta
az MTA doktora

MELLÉKLET
ELÍRÁSOK, GÉPELÉSI HIBÁK LISTÁJA

19. oldal. Az emlőrák kockázata valószínűleg nincs kapcsolata az EPHX1 polimorfizmusokkal...
20. oldal fehérjéből
31. oldal 3. sor: ... azt a magyarázatot adtál, ...
32. oldal 2. bekezdés: ... közleméyn foglalkozott a mikroRNS-ek szerepéről...
33. oldal: 3. bekezdés: növekedési faktor
36. oldal: 1. bekezdés: variancára
39. oldal: p53 bekezdés: teretocarcinoma
47. oldal: ... majd35... (kimaradt a szóköz); egészében
51. 52. 53. oldalak: A Markusovszky Egyetemi Oktatókórház neve három helyen háromféleképpen került helytelenül leírva.
57. oldal: kntrroll
59. oldal. expersszíó-emelkedés
71. oldal: ... a G alléljával gyakoribb ...
80. oldal: ... eredményei szerint A GSTM1 és GSTT1 allélmegoszlásokat ...
81. oldal: táblázat aláírásában: alléplimorfizmusainak; szövegben: coportjában
95. oldal: ... a vizsgálat csoportjainkra vonatkozóan láthatjuk ...
107. oldal: kövertkezményeit
113. oldal: SNP-ek; A metabolizáló enzimek közé tartoznak a glutation-S-transzferáz gének (sic) ...
115. oldal. Az összefüggés hiányát megerősített Wang és...
119. oldal: ... nem lett csak elegendő a csoportok nagysága ahhoz, ..
124. oldal: - az XRCC1 polimorfizmusok prognosztikus értékét vizsgáló közlemények mennyire alacsony.
127. oldal: meat-analízis
129. oldal: menniségét