Válasz Dr. Szalai Csaba, az MTA doktora bírálatára

Hálásan köszönöm a dolgozat minden részletre kiterjedő kritikai bírálatát valamint a kutatásaink során elért eredmények elismerő méltatását.

Válaszok a bíráló kérdéseire:

A TaqMan RT-PCR validációhoz tartozó cikkben van egy táblázat, amelyben több mint 20 esetben a különbséget jelző P érték nagyobb, mint 0,05. Ez azt jelenti, hogy nem minden esetben sikerült igazolni a microarray eredményeket? Mekkora az egyezés a kétféle módszer között?

A vizsgálatban összesen 46 génre végeztünk TaqMan RT-PCR validációt. Mivel olyan géneket választottunk ki, amelyek több génnel való rezisztenciával is kapcsolatban voltak, ezért ennél többet, összesen 76 rezisztencia-génexpresszió közötti kapcsolatot tudtunk igazolni. A 24 nem szignifikáns összefüggés alapján a gén chipek és az RT-PCR eredményei 76%-ban egyeztek.

A 4.5. pontban a szövegben az szerepel, hogy 40 sejtvonalból 27 rezisztens leányvonalat fejlesztettek ki. Ezzel szemben a 18. ábrán, illetve a hozzá tartozó cikkben is az szerepel, hogy 2 sejtvonalból 29 leányvonalat fejlesztettek ki. Melyik az igaz?

Összesen 29 rezisztens sejtvonalat fejlesztettünk ki, ezért van az értekezés 18. ábráján is 29 sejtvonal. Azonban az RT-PCR méréseket csak 27 sejtvonalra végeztük el, mivel több vizsgálatot összevonva futtattunk meg és nem volt annyi üres hely, hogy az összes sejtvonalat lemérjük. A 4.5 pont alatt a két szám sajnos felcserélődött.

A 68. oldalon számomra egy kicsit homályos megfogalmazással az olvasható, hogy azt találták, hogy egy-egy sejtvonalban a rezisztencia kialakulásánál mindössze egy-két mechanizmus volt aktív. Ez az addig közöltekből számomra nem következik. Miből állapították meg?

Ennek a hátterét a 19. ábra mutatja, ahol egy színkóddal ábrázoltuk, hogy az egyes gének expressziója milyen mértékben nőtt meg. Egy példával illusztrálva: az ABCB1 gén expressziója jelentősen megnőtt az MDA231-RA-5 és MDA231-RP-12 sejtvonalakban, de egyáltalán nem változott az MDA231-RA-1 és MDA231-RP-19 vonalakban. Ugyanez volt megfigyelhető a többi gén esetén is. Igazán magas expressziót két sejtvonaltól eltekintve (MDA231-RA-10 és MCF7-RA-2) csak egy-két gén esetén mutattak a vizsgált vonalak. Egyetlen olyan sejtvonal sem volt, ahol az összes vizsgált gén aktivitása megnőtt volna. Ezekből arra következtettünk, hogy egy vonal esetében a rezisztencia hátterében is valószínűleg csak a néhány megváltozott mechanizmus állhat.

Ezek szerint a cikkben a doxorubicinnel mutat rezisztenciát, míg az értekezésben a paclitaxellel. Mi az igazság? Illetve mi lehet a magyarázata, hogy bár asszociációt mutatott a cikkben doxorubicin rezisztenciával, de ellentétes trenddel?

Mindkét gyógyszerrel szembeni rezisztencia igaz, azonban ellentétes előjellel.

Ez az ellentétes összefüggés az eltérő hatásmechanizmuson alapulhat. A taxánok a replikációs fehérjéken hatnak, a mitotikus orsó kialakulását gátolják, eredetileg ezért vártuk az összefüggést a két kérdéses tubulin génnel (TUBB2C és TUBB3). A doxorubicin az antraciklinek családjába tartozik, amelyek elsősorban interkaláción keresztül gátolják az RNS képződését a DNS-ről.

A fordított összefüggés okát egészen pontosan nem tudjuk megmondani, azonban valószínűleg a gyógyszerek hatásának fázis-specificitásával függhet össze. Amíg ugyanis a fentiek alapján a taxánok csak osztódó sejtekre tudnak hatni, addig az antraciklinek nem fázisspecifikusak. Másként fogalmazva, amíg a taxánok potenciálja egyenesen arányos a proliferáció mértékével, addig az antaciklinek esetében fordított összefüggés is lehet. Ezt az elképzelést akkor tudnánk igazolni, ha multivariáns elemzést végeznénk egy proliferációs markerrel, mint pld az MKI67 expressziója (ez azonban sajnos nem volt benne az általunk lemért gén-panelben).

Az ABCB1 igazoltan aktiválódik, vagy egyelőre a statisztikai adatok nem meggyőzőek a szerepét illetően?

Az ABCB1 szerepét számos irodalmi adat is alátámasztja, és önmagában nálunk is elérte a szignifikancia-határt. Azonban a többszörös mérést figyelembe véve ez a szignifikancia elveszett, ami arra utal, hogy a mi modell rendszerünkben az ABCB1 nem volt a legfontosabb gének között.

Különböző eredetű sejtvonalak génexpresszióit hasonlította össze az alapján, hogy rezisztensek, vagy érzékenyek egy adott kemoterápiás szerre. Az eredetüktől függően ezek a sejtvonalak a rezisztenciától függetlenül is nyilván különböztek a génexpresszióban. Nem okoz-e ez torzítást az eredményekben?

A vizsgálatok egy részében (Ref: Győrffy, Oncogene, 2005 és Győrffy, Melanoma Res, 2006) nem egyszerűen különböző tumortípusokat vizsgáltunk, hanem sejtvonal párokat. Mindegyik pár egy eredeti (kemoterápiára érzékeny) és egy ebből származó, a kemoterápiára rezisztens vonalat tartalmazott. Statisztikai elemzés során azokat a géneket kerestük, amelyek mind a négy párban eltérő expressziót mutattak.

A vizsgálatok egy másik csoportjában (Ref: Győrffy, Int J Cancer, 2006 és Pénzváltó, PLoS One, 2013) pedig igyekeztünk az elérhető legnagyobb számú sejtvonalat vizsgálni párhuzamosan. Itt abból indultunk ki, hogy nagyszámú

vonal vizsgálatával az egyes tumortípusok génexpressziós mintázatra gyakorolt hatása is csökkenni fog.

Ezek ellenére sem tudjuk azonban azt mondani, hogy ezek a vizsgálatok torzítástól mentesek. Ez kiegészül azzal, hogy a sejtvonalak mutációs státuszát sem ismertük. Jelenleg dolgozunk egy olyan vizsgálaton, ahol a RAL jelátviteli út vizsgálata során a sejtvonalakat nem eredet szerint, hanem a KRAS és a BRAF génekben levő mutációk alapján osztjuk szét. Reményeink szerint már a közeljövőben látni fogjuk, hogy ezzel az alternatív megközelítéssel stabilabb eredményeket tudunk-e elérni?

A sejttenyészeteket hosszú ideig különböző kemoterápiás szerek jelenlétében tartották fent. Nem változtak-e (differenciálódtak) meg teljesen ezek a sejtvonalak ilyen hosszú idő alatt?

A vizsgálatok során négy év után ellenőriztük, hogy a sejtvonalak megfelelnek-e az eredeti vonalnak. Ehhez STR (short tandem repeat) analízist végeztettünk 10 különböző lókuszra a John Hopkins egyetemen. Ezután az STR eredményeket a német Leibniz intézet STR adatbázisához hasonlítottuk. Bár ennek a vizsgálatnak az volt a célja, hogy a kontaminációt kizárjuk, azonban ez azt is igazolja, hogy a sejtvonalak a többéves vizsgálatok alatt sem változtak meg.

Ettől függetlenül a párhuzamos rezisztenciát modellező vizsgálatban (Ref: Tegze, PLoS One, 2012) hagyományos citogenetikai vizsgálatnak is alávetettük a rezisztens és az eredeti sejtvonalakat is. Az új kromoszómális eltérések teljes új kromoszómákat és kromoszóma-darabokat is tartalmaztak. Az új vonalak kromoszóma-száma 60-110 között volt – a számfeletti kromoszómaszám azonban már a szülői vonalakban is megvolt. Ez önmagában valóban azt mutatja, hogy az új vonalak jelentősen differenciálódtak. Azt, hogy ez a sejtek működése szempontjából valóban milyen jelentőségű, epigeneikai elemzéssel tudnánk megállapítani, amivel azt tudnánk megvizsgálni, hogy ezek mely része volt valóban aktív. Ez például azáltal lehetséges, ha FAIRE-seq segítségével kiderítjük, hogy ezekben a vonalakban a kromatin mely részei vannak nyitott állapotban.

----

3. A legújabb egy sejt szinten történő NGS (pl. nuc-seq) eredmények alapján egy tumorban minden sejt genetikailag különböző. Egyrészt mi a véleménye erről, másrészt, ha ez így van, nem befolyásolja-e az eredményt, hogy génexpressziós vizsgálathoz honnan vesszük a mintát? Van-e erre valami szabály?

Az egy sejt szinten történő szekvenálás az onkológiában koncepcionálisan nem tud áttörést ígérni. Ennek az egyszerű oka, hogy előtte ezt a sejtet el kell távolítani – ha pedig már eltávolítottuk, akkor onnantól az erre a sejtre specifikus változások már lényegtelenek a beteg szempontjából.

Jelenleg végzünk egy olyan kutatást, amiben azt próbáljuk megválaszolni, hogyan tudjuk genom-szintű adatok alapján megmondani, hogy ha egyetlen minta áll rendelkezésünkre, akkor attól a tumor többi része milyen mértékben tér el. Ehhez a vizsgálathoz egy-egy tumor különböző helyeiről vett mintákat hasonlítunk össze, a kutatást a Yale egyetemmel és a Cancer Research UK-vel együttműködve végezzük. Azt már mindenképpen látjuk, hogy a különböző helyekről vett minták eltérő eredményt adnak, de még nem tartunk ott, hogy ezt az eltérést előre tudjuk jelezni. Reményeink szerint ezen kutatás eredményei alapján már a közeljövőben fogunk tudni erre a kérdésre „kézzelfogható" választ adni.

----

4. Hogyan látja a jövőjét a génexpresszió alapú diagnosztikának?

A onkológiai kezelésben használt szerek döntő többségénél semmilyen biomarkerünk nincsen, amivel a várható hatást vagy a kezelés szükségességét előre tudnánk jelezni. Eközben a génexpresszió alapú biomarkerek eddigi használata (pld HER2 receptor) igazolja, ez viszonylag olcsó módszer arra, hogy a betegeket klinikailag is releváns alcsoportokba osszuk szét. Ez kapcsolódik azzal, hogy a génexpresszió mérése pld RT-PCR-el elenyésző költséget jelent a gyógyszerek árához viszonyítva. Véleményem szerint ezen két, egymást erősítő tényező miatt a következő évtizedek során a génexpresszió mérésén alapuló kiegészítő tesztek még nagyobb elterjedése várható.

----

5. A genomika fejlődésével milyen ígéretes módszereket prognosztizál, amelyek jelentősen javíthatják a tumorok diagnózisát és a személyre szabott terápiát?

A rosszindulatú tumorok progressziója során kettő kérdést kell megválaszolnunk: elsőként azt, hogy az aktuális tumorban mi változott meg – erre a most rendelkezésre álló módszerek (gén-chip, következőgenerációs szekvenálás, chip-seq, stb.) már alkalmasak. Ezen módszerek további fejlődése, az érzékenység és specificitás növekedése, az árak csökkenése és a méréshez szükséges idő rövidülése folyamatosan megfigyelhető.

A másik kérdés, ami valójában sokkal bonyolultabb, hogy hogyan is működik ez az egész. Hiába van minden sejtben másik mutáció, ha nem tudjuk, hogy ezen mutációk közül melyikről történik mRNS átírás, az átírt mRNS-ről milyen fehérje fog képződni, és egyáltalán – melyik változás olyan, amelyik a prognózist is befolyásolja?

Az áttörést a mérések különböző szintjének összekapcsolása hozhatja. Azonban jelenleg ez számítástechnikai korlátokba ütközi. Már az ezek által generált óriási adattömeg tárolása önmagában is megoldhatatlan. Tegyük fel például, hogy egy egyszerű, és teljesen logikus vizsgálatot szeretnék végezni, amiben azt a kérdést tesszük fel: mi lett azokkal a betegekkel, akiknek ugyanilyen volt a génexpressziós és a következőgenerációs szekvenálási profilja, mint a mi betegünknek? Ha csak a TCGA-ban jelenleg elérhető 10 ezer

beteghez szeretnénk viszonyítani, már akkor az ehhez szükséges tárolókapacitás petabájtos méretű. Ha félévente megduplázódik a számítógépek kapacitása, akkor is még további négy-öt év, hogy egyáltalán az adatok lementése lehetővé válhasson. Összefoglalva: a jövendő időt a „nagy adatok korának" nevezhetjük, amelyhez még az informatika egy további forradalmára lesz szükség.

Végezetül még egyszer köszönöm Szalai professzor úrnak az építő jellegű kritikai megjegyzéseket, valamint hogy az értekezés nyilvános vitára bocsátását és a dolgozat elfogadását javasolja.

Budapest, 2014.10.16.

Győrffy Balázs