



Tisztelt Hunyady Professor Úr!

Először is szeretném megköszönni Professor Úrnak, hogy számos teendője mellett elvállalta disszertációm bírálatát. Köszönöm az alapos bírálatot és az elismerő szavakat.

Az általános megjegyzésekben a Professor Úr által említett rövidítések és teljes kiírások néhol vegyes használata helyett valóban helyesebb lett volna konzekvensen az egyiket vagy másikat használni. A teljes kiírásokat olyan helyeken használtam, ahol nyomatékosítani szerettem volna a tartalmat.

A 150. oldalon említett mondatban valóban elírás található, a mondat helyesen a következő: „Másfelől a claudin-7 is szignifikánsan emelkedettebb volt a HCV fertőzött cirrhotikus májakban a HCV fertőzött nem cirrhotikus májakhoz képest.”. Elnézést kérek az elírásért.

Az ábráknál törekedtem az angol rövidítések átírására, azonban több angol rövidítés esetében a magyar fordítás rövidítését inkább éreztem zavarónak és ezért inkább az ábramagyarázatban tüntettem fel a rövidítések feloldását.

A formai megjegyzések tekintetében az egyes ábrák méretét illető kritika jogos. Magyarozatként, illetve mentséggként azt tudom felhozni, hogy a dolgozat terjedelmét az ábrákat illetően is próbáltam bizonyos határokon belül tartani.

A disszertáció alapjául szolgáló közleményekben valóban részletesen feltüntetésre kerültek a Professor úr által hiányolt részletesebb információk, az áttekinthetőség miatt nem tüntettem ezeket fel, de érthető Professor úr kifogása, hogy a pontosabb értelmezhetőség miatt mégis érdemes lett volna feltüntetni ezeket. A kvantitatív képanalízisek esetében egységes módszert alkalmaztunk, melyet az „III.2.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok” fejezetben, az „Az alkalmazott immunreakciók kiértékelése” alfejezetben részleteztem és ebben leírásra került, hogy esetenként tíz-tizenöt véletlenszerűen kiválasztott, nem átfedő látóteret fotóztunk. Ie, majd az immunhisztokémiai reakció pozitívitasának, intenzitásának meghatározására digitális morfometriát végeztünk és reakciók kiértékelésekor az esetenként vizsgált



látóterek értékeit átlagolva minden mintához átlag-terület százalékos értéket rendeltünk (*Gyongyosi,2014; Holczbauer,2013; Holczbauer,2014; Korompay,2012; Torzsok,2011*).

Az ábráknál sokszor törekedtem, hogy az oszlopdiagramok mellett a „dot plot” ábrák is fel legyenek tüntetve, mivel így az egyes esetek mért értékei konkrétan szerepelnek. A Kaplan-Meier görbék konkrét esetszámai a publikációkban vannak részletezve, de az egyes vizsgálatok során elemzett csoportok esetszámát az „Anyagok és módszerek” fejezetben a „Vizsgált betegcsoportok” alfejezetben összegeztem. Ez gyakorlatilag megegyezett a vizsgált betegek számával.

Kérdések

1. „Volt-e valamilyen pre-szelekciós szempont abban a vonatkozásban, hogy miért éppen a munkában szereplő tight junction alkotórészeket és mikroRNS-eket vizsgálták? „

A tight junction fehérjék vizsgálatába nem sokkal a molekulacsalád felfedezése után kapcsolódtam be. Érthető módon, először az elsőként megismert és elérhető fehérjéket vizsgáltam, fokozatosan bővítve a sorozatot, hiszen ma már 27 claudin altípust ismerünk. A tight junction fehérjék és ezen belül a claudinok sejt- és szövetspecifikusan is jellemző expressziós mintázatot alkotnak. Az irodalmi adatok alapján, köztük munkacsoportunk adataival, az egyes szövetekre, sejttípusokra legjellemzőbb claudin profilt igyekeztük vizsgálni, összevetve a normális és kóros – elsősorban daganatos – szövetek claudin expressziós mintázatát. A mikroRNS-ek (miR) tekintetében a tanulmányozott miR-k egyrészt a nemzetközi irodalomban közölt, az általunk vizsgált májbetegségekben fontos szereppel bíró miR-ek, mint például a miR-122 a HCV vírus replikációjában. Másrészt a lehetséges szekvencia homológia és több mikroRNS adatbázis segítségével Tömböl és munkatársai methodikája alapján (*Tombol Z, Szabo PM, Molnar V et al.: Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. Endocr. Relat.Cancer 2009; 16: 895–906.*) kerültek a miR-ek kiválasztásra. Ennek során több adatbázis is összevetésre került: TargetScan 6.0 (<http://www.targetscan.org>), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de>), és MicroCosm Targets Version 5 (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>), másfelől a miRBase (www.mirbase.org) és a heidelbergi miRWalk (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>) adatbázisok



összehasonlításával határoztuk meg az általunk vizsgált májbetegségekben a lényeges fehérjék expressziós szabályozásában negatív regulációs szerepet játszható miR-eket.

2. „Van-e arra adat, hogy nem csak a mikroRNS -ek, hanem a primer mikroRNS -ek vagy a pre-mikroRNS-ek is módosíthatják egyes gének expresszióját?”

Az érett mikroRNS-k a génexpresszió negatív szabályozását a messenger RNS-ek (mRNS) mennyiségének lebontás általi csökkentésével, illetve a fehérje transzláció gátlásával érik el. A humán genomban több mint 2000 mikroRNS (miR) található. Az érett miR keletkezésében először a primer transzkriptumok (primary transcripts: - pri-miR) átírását főleg az RNS polimeráz II.enzim végzi, majd a további miR biogenezis a primer transzkriptumok processzálását jelenti. A pri-miR forma a sejtmagban már pre-miR-é alakul a Drosha ribonukleáz által, majd a citoplazmában a mikroRNS-ek további hasítását, az érett forma kialakítását a Dicer ribonukleáz végzi. Az irodalom nem utal arra, hogy akár a pri-, akár a pre-miR-ek az érett miR-hez bármiben is hasonló szabályozó szerepet játszanának. Mind a pri-miRNS, mind a pre-miRNS ehhez a funkcióhoz relatíve hosszú molekulák és önmagukkal részlegesen kettősláncú szerkezetet alkotnak, amely a végső funkció kivitelezését nem teszi lehetővé. A miR-eknek a citoplazmában kell aktívnak lenniük, hogy a génexpresszióra gyakorolt negatív hatásukat kifejtsék. Ugyanakkor a Drosha és a Dicer enzimek által végzett hasítás heterogenitása miatt ugyanazon mikroRNS esetében is eltérő primer és pre-mikroRNS variánsok keletkeznek. A variánsok érése különböző lehet és prognosztikus összefüggést is leírtak már egyes variánsok és a betegség kimenetele között, így például tüdőrákban (*Shin KM et al: The pri-let-7a-2 rs1143770C>T is associated with prognosis of surgically resected non-small cell lung cancer. Gene. 2016 Feb 15;577(2):148-52.*, *van den Berg FT et al.: Design of Effective Primary MicroRNA Mimics With Different Basal Stem Conformations. Mol Ther Nucleic Acids. 2016 Jan 12;5:e278*)



-
3. „A vizsgálatok egy része kemoterápia/neoadjuváns kezelés után eltávolított szövetmintákból történt. Megváltoztathatta-e ez az előzetes kezelés a daganat vagy éppen a daganat mellett reszekált ép szövet tight junction alkotórészeinek és/vagy mikroRNS expressziójának a mintázatát?”

A Sorafenib kezelt hepatocelluláris carcinómában (HCC) szenvedő betegek az aspirációs citológiai vizsgálat után részesültek célzott kezelésben, így ez a kérdés nem merült fel. A HCC, a colorectális carcinomák májjáttétjei, valamint a pancreas ductalis carcinomák májjáttétjeinek rezekciós mintáinak tanulmányozása során a tumor körüli tumormentes májszöveteket és májbetegségtől mentes normál májmintákat is vizsgáltuk és ebben az összevetésben nem találtunk különbséget egyik claudin expressziója tekintetében sem.

A hepatoblastomák tanulmányozása során a betegek rezekciós műtétjére a SIOPEL protokoll szerint került sor, kemoterápiát követően és ezen műtétek rezekátumaiból származtak a vizsgálati blokkok. A tumormentes, környező májszövet TJ fehérje és mikroRNS expresszióját hasonlítottuk össze a tumorsejtekével, tehát így mind a tumorszövet, mind a tumormentes szövet érintett volt ugyanattól a hatástól. A mért miR expressziós változások tehát nem a kezeletlen hepatoblastomára, hanem a SIOPEL protokoll szerinti kemoterápiás kezelésen átesett hepatoblastomára vonatkoznak. Gyermekkori tumorról lévén szó, korban megfelelő normál májszövet minták nem álltak rendelkezésre.

A bíráló által feltett kérdés nagyon fontos aspektusát érinti tumorokkal kapcsolatos vizsgálatoknak, mivel a kemoterápiás szerek hatnak a nem daganatos szövetekre is, ahogy a mellékhatások mutatják. A megváltozott nem daganatos szöveti expresszió és a daganat közti kölcsönhatás vizsgálata fontos terület lesz a jövőben, mint ahogy az áttétképzés során is a „host faktorok” szerepe is bebizonyosodott.

A kemoterápiás kezelésekk alatt feltehetően változik a nem tumoros szövetek expressziós mintázata is, azonban ennek mértékéről nincsenek pontos adatok. Sok esetben a proliferációs aktivitás befolyásolja, hogy milyen gének expressziója lehet érintett. A kemoterápiás kezelésekk a tumorsejtek miR expresszióját is változtatják (Li WG, Yuan YZ, Qiao MM, Zhang YP. *High dose glargine alters the expression profiles of microRNAs in pancreatic cancer cells. World J Gastroenterol. 2012 18:2630-9.*; Phuah NH, In LL, Azmi MN, Ibrahim H, Awang K, Nagoor NH *Alterations of microRNA expression patterns in human*



Prof. Dr. Timár József
egyetemi tanár, igazgató

Jozsef Timár, M.D., Ph.D., D.Sc.
Professor, Chairperson

Budapest, Üllői út 93., H-1091 HUNGARY – Tel.: (36) 1 215-7300/3430, tel/fax: (36) 1 215-6921
e-mail: jtimar@korb2.sote.hu

cervical carcinoma cells (Ca Ski) toward 1'S-1'-acetoxychavicol acetate and cisplatin. Reprod Sci. 2013 20:567-78.). A SIOPEL szerint a cisplatin DNS keresztköteket okoz és apoptózist indukálhat (*Zhang G, Sun L, Lu X, Chen Z, Duerksen-Hughes PJ, Hu H, Zhu X, Yang J. Cisplatin treatment leads to changes in nuclear protein and microRNA expression. Mutat Res. 2012a 746:66-77.*). Ennek ellenére RNS-sel is kölcsönhathat. Kis RNS-ek platinálása (pl.: siRNS) hatással van ezeknek a kis RNS-eknek a processzálására és biológiai aktivitására (*Drayton RM. The role of microRNA in the response to cisplatin treatment. Biochem Soc Trans. 2012 40:821-5.*). Ezen túlmenően a kezdeti miRNS-szint is hatással lehet a ciszplatin hatékonyságára, ahogy miR-21 túlzott expressziója ciszplatin-rezisztens gyomorrák sejtvonalban jelentősen csökkentette a ciszplatin antiproliferatív hatását. (*Yang SM, Huang C, Li XF, Yu MZ, He Y, Li J. miR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells by regulating PTEN. Toxicology. 2013 306:162-8.*). Továbbá a miR biogenezis már akár különböző stresszes körülmények között megváltozhat, ideértve a DNS károsodást, gyulladással válasz aktiválódását és hőmérséklet ingadozását (*Zhang X, Li W. 5-Fluorouracil in combination with cisplatin alters the microRNA expression profile in the CNE nasopharyngeal carcinoma cell line. Mol Med Rep. 2012b 6:303-8.*). Összességében bármilyen kezelés vagy behatás eltérést okozhat a miR expresszióban, és a sejtek molekuláris összetételében is, amely betegenként eltérő lehet. A claudinok tekintetében ilyen típusú, a kemoterápia hatását felmérő összehasonlítások a normál szövetek tekintetében csak korlátozottan szerepelnek az irodalomban, mivel a biopsziás lehetőségek korlátozottak, különösen a máj esetében. A szájnyálkahártya esetében egy friss közlemény a standard dózisu kemoterápiák után vizsgálta a claudin-1 és az occludin expresszióját. Bár a nyálkahártya atrófiát mutat a kezeléseket követően, azonban a fenti két tight junction komponens esetében nem találtak szignifikáns expressziós eltérést a kemoterápiát megelőzően és azt követően. Az endothel ZO-1 expressziója csökkent le a kezelés hatására (*Wardill H.R. et al.: Tight junction defects are seen in the buccal mucosa of patients receiving standard dose chemotherapy for cancer. Support Care Cancer. 2016 Apr;24(4):1779-88.*).



-
4. „Váratlannak tartható, hogy az diszkriminancia analízis alapján az ép epehólyag hámja, az extrahepaticus epeutak hámja és az intrahepaticus epeutak hámja eltérő claudin expressziós mintázatot mutat. Vajon mi okozhatja a különbözőséget?”

Az érett epeúti rendszer különböző szakaszain és az ezekben fejlődő epeúti tumorokban érvényesülő eltérő génexpressziós mintázat biológiailag nem váratlan. Ez a jelenség tetten érhető a máj kifejlődése és ezen belül az epeút rendszer különböző részeinek kialakulása folyamán. A folyamat több lépcsős, melynek során a fejlődési szakaszok során, majd az egyes betegségek kialakulásában is a miR-ek szintjén eltérő expressziós mintázatok játszanak szerepet (*Finch M.L. et al.: Regulation of microRNAs and their role in liver development, regeneration and disease. Int J Biochem Cell Biol. 2014 Sep;54:288-303*). A claudinok komplex mintázatát a máj fejlődésében ilyen részletességgel nem vizsgálták, bár a máj progenitor sejteket emberben claudin-3, míg patkányban claudin-7 expresszió is jellemzi (*Schmelzer E. et al.: The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. Stem Cells. 2006 Aug;24(8):1852-8. , Yovchev MI et al.: Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. Hepatology. 2007 Jan;45(1):139-49.*).

Az eltérő szövetek és az azokból kialakuló daganatok is jellegzetes claudin expressziós mintázattal rendelkeznek, mely mintázatok mennyiségi és minőségi összetevőikben is eltérnek. Munkacsoportunk a máj sejtszintű differenciációja és annak modellezése során is vizsgálta a claudinok expresszióját. Embriónális őssejtek máj irányú differenciálódása során a claudinok expressziója szignifikánsan változik, a claudin-1-é csökken, míg a claudin-4-é nő (*Erdélyi-Belle B. és mtsai: Expression of Tight Junction Components in Hepatocyte-Like Cells Differentiated from Human Embryonic Stem Cells. Pathol Oncol Res. 2015 Sep;21(4):1059-70.*) A jövőben érdemes lesz megvizsgálni, hogy az eltérő claudin expressziós mintázatnak az epeút rendszer különböző szakaszain kifejlődő cholangiocarcinomáiban van-e prognosztikus vagy prediktív szerepe, illetve adott esetben célterápiás horgonyzóhely lehet..



-
5. *„A Megbeszélés fejezetben a szerző bemutatja, hogy eredményeik néhány vonatkozásban nem mindig egyeznek meg más kutatócsoportok eredményeivel, arra is említ példát, hogy saját korábbi eredményeiktől is eltérést találtak. Mi okozhat ilyen diszkordanciát, illetve hogyan oldható fel az eredményekben mutatkozó alkalmankénti különbözőség?”*

Leggyakrabban a mintaszám emelésével juthatunk megbízhatóbb eredményekhez, amennyiben a módszerek, beleértve a metodikákat és illetve a kiértékelést standard módon történik. A minták beválogatása és előzetes leletezésében is lehetnek eltérések. A diszkordancia nagyon sok tényezőtől, alapvetően azon, egy dinamikusan változó biológiai rendszert szeretnénk megismerni, leírni és megérteni és ebben a rendszerben egy adott behatás nem mindig ugyanazt a választ indukálja. Ez nyilván függ az egyéni diverzitásunktól, amelyet alapvetően a genetika és az epigenetikus módosulások határoznak meg. Ez utóbbiak szintén dinamikusan, a környezeti hatásokra megváltoznak. A vizsgálható mintákban a makromolekulák megőrzöttsége is függ az őket ért kezelésektől, beleértve a formalin fixálás hatását is, illetve hogy a beteg milyen gyógyszeres, célzott terápiás kezelésen, sugárterhelésen esett keresztül. Mindezen variabilitás okozta bizonytalanság az eredmények interpretálásának tekintetében akkor csökkenthető, ha nagy mintaszámmal dolgozunk. Ennek kivitelezhetősége egyfelől a ritka betegségek, másfelől az egyes vizsgálatok költségessége miatt korlátozott. Az eredmények eltéréseinek természetesen az is oka lehet, hogy egyre kisebb mennyiségeket, egyre korábban tudunk detektálni, és ami korábban egységesnek tűnt az ma már heterogén képet mutathat.

6. *„Alkalmazzák-e Pathológia Intézetük napi gyakorlatában az általuk megfigyelt claudin-4 expressziós különbözőséget a hepatocellularis carcinoma és a cholangiocarcinoma differenciáldiagnosztikájában?”*

Igen, a cholangiocarcinomák diagnosztikája során a claudin-4 immunhisztokémiai reakciót, illetve a cervix carcinomák esetén a claudin-1 immunhisztokémiai reakciót, valamint a fibrolamelláris májrák esetén a claudin-5 reakciót alkalmazzuk.



Prof. Dr. Timár József
egyetemi tanár, igazgató

Jozsef Timár, M.D., Ph.D., D.Sc.
Professor, Chairperson

Budapest, Üllői út 93., H-1091 HUNGARY – Tel.: (36) 1 215-7300/3430, tel/fax: (36) 1 215-6921
e-mail: jtimar@korb2.sote.hu

7. „Kutatási eredményei alapján lát-e a szerző lehetőséget a hepatitis C vírus fertőzés megelőzésére és/vagy kezelésére akár a tight junction alkotórészek, akár a mikroRNS -ek útján? Van-e esetleg tudomása ezzel kapcsolatos gyógyszerfejlesztésről?”

A 2010-s Science cikk közlés után (*Lanford RE et al.: Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. Science. 2010 Jan 8;327(5962):198-201.*), mely állatkísérletben, csimpánz modellen bizonyította, hogy az RNS interferencia jelenségét felhasználva, a miR-122-vel komplementer oligonukleotid intravénásan beadva igen hatékony volt. A hepatitis C vírus replikációjához szükséges miR-122 szintjének hepatocytákban való csökkentésével a vírusszám is jelentősen és egyelőre úgy tűnik, rezisztencia mentesen csökkenthető. A target miR-122 adja a hepatocytákban levő miR-ek több, mint 2/3-t. A kifejlesztett gyógyszer, a MIRAVIRSEN, igen rövid idő alatt került klinikai fázisba és jelenleg igen előrehaladott klinikai vizsgálatok vannak folyamatban (*van der Ree MH et al.. Miravirsén dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. Aliment Pharmacol Ther. 2016 Jan;43(1):102-13. ; Sanchez-Niño MD, Ortiz A.: HCV infection and miravirsén. N Engl J Med. 2013 Aug 29;369(9):877-8. ; Janssen HL, Kauppinen S, Hodges MR: HCV infection and miravirsén. N Engl J Med. 2013 Aug 29;369(9):878; Janssen HL et al.: Treatment of HCV infection by targeting microRNA. N Engl J Med. 2013 May 2;368(18):1685-94.)*

Még egyszer köszönöm Hunyady Professzor Úr alapos bírálatát és kérem válaszaim elfogadását.

Tisztelettel:

Dr. Kiss András

egyetemi docens

Semmelweis Egyetem, II.sz. Patológiai Intézet

Budapest, 2016 február 29.