



## Tisztelt Pár Professor Úr!

Köszönöm Pár Alajos Professor Úrnak, hogy elvállalta a disszertáció bírálatát és köszönöm az értékelést és Professor Úr értékes megjegyzéseit, érdekes kérdéseit.

### A feltett kérdések és a rájuk adott válaszok:

1. *"Megerősítésre került-e a cirrhosisban megváltozott claudin expresszió felvetett szerepe a HCV fertőzés fenntartásában?"*

A cirrhosisban megnövekedett claudin-1 expressziót munkacsoportunk mellett más kutatócsoportok is leírták és újabb adatok is megerősítették. Reynold és mtsai különböző etiológiájú cirrhosisban az általunk leírt adatokkal egyezően a claudin-1 expresszió emelkedését találták (Reynolds GM. et al.: Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology*. 2008 Feb;47(2):418-27), míg Tsujiwaki és mtsai a claudin-4 és -7 megemelkedett expresszióját írták le humán cirrhosisban. A claudin-4 és -7 expressziója a májsejteken a fibrosis erősségével együtt növekedett és nem a gyulladáshoz kapcsolódó aktivitás mértékével (Tsujiwaki M.: *Aberrant expression of claudin-4 and -7 in hepatocytes in the cirrhotic human liver. Med Mol Morphol*. 2015 48(1):33-43), mely egybeesik az általunk leírtakkal, amennyiben a fibrosis/cirrhosis mértéke korrelált a megemelkedett claudin-4 és -7 expresszióval.

A megnövekedett claudin-1 expresszió HCV fertőzésre gyakorolt hatása indirekt módon a közelmúltban is leírásra került. Egy humanizált kiméra egérmodellben nemrég bebizonyították, hogy a claudin-1 elleni antitest kezelés *in vivo* csökkenti a fertőzött hepatocyták számát és ezáltal rámutattak annak a *de novo* infekciós útnak a fontosságára, mely a krónikus vírusfertőzés, illetve a krónikus hepatitis fenntartásában is szerepet játszik. A vírusreceptort támadó antitest terápia a krónikus fertőzés gyógyításában is felhasználható. A befolyásolt jelátviteli utak érintettségét humán biopsziás mintákban is igazolták. (Mailly L. et al.: *Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. Nat Biotechnol*. 2015 May;33(5):549-54.)



- 
2. „A májtranszplantációt követő HCV kiújulás során leírt megváltozott mikroRNS expressziós mintázat szerepére fény derült-e az adatok megjelenése óta eltelt időben?”

Ezzel a témával foglalkozó közleményünkben (*Gelley F. és mtsai: MicroRNA profile before and after antiviral therapy in liver transplant recipients for hepatitis C virus cirrhosis. J Gastroenterol Hepatol. 2014 Jan;29(1):121-7.*) írtuk le, hogy a vizsgált mikroRNS-ek (miR) közül a miR-99a\* és a miR-22a expressziója HCV rekurrencia esetén megnövekedett a rekurrencia előtti normál állapothoz képest, míg a miR-21 és a miR-194 expresszió csökkent volt ebben az összevetésben. Egy újabb közlemény szerint a miR-194 akadályozza a vírus bejutását a hepatocytákba a CD81 receptor termelődésének csökkentése révén, így a csökkent miR-194 elősegíti a HCV vírus bejutását a hepatocytába (*Mekky RY et al.: Mir-194 is a hepatocyte gate keeper hindering HCV entry through targeting CD81 receptor. J Infect. 2015 Jan;70(1):78-8.*). Ez az újabb adat értelmezhetővé teszi az általunk talált eredményt, hogy HCV rekurrencia esetén a csökkent miR-194 expresszió miatt kedvez a HCV fertőzésnek. Emellett HCV fertőzés esetében a csökkent miR-21 kedvezőtlen lehet, mivel a miR-21 pozitív prediktív értéke 88%-nak bizonyult az SVR jelzésére. (*Motawi TM et al.: MicroRNAs as predictor markers for response to interferon treatment of chronic hepatitis C genotype-4 in Egyptian patients., PLoS One. 2015 Mar 26;10(3):e0121524.* )

3. „Jelenthet-e potenciális célpontot a célzott terápia számára a claudinok jellegzetes, tumor-típusonként változó expressziója?”

Igen, többfajta daganattípusban is felmerült a *Clostridium perfringens* enterotoxin claudin-3-, -4-n keresztül cytólízist okozó hatásának kihasználása (*Black J.D. et al.: Clostridium perfringens enterotoxin (CPE) and CPE-binding domain (c-CPE) for the detection and treatment of gynecologic cancers. Toxins (Basel). 2015 Apr 1;7(4):1116-25.*). Többféle *in vitro* és *in vivo* modellrendszert teszteltek a módosított toxinnal (*Nagase S. et al: Recent advances in claudin-targeting technology. Biol Pharm Bull. 2013;36(5):708-14, Sahin U.: Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development. Clin Cancer Res. 2008 Dec 1;14(23):7624-34.; Kominsky S.L.: Claudins: emerging targets for cancer therapy. Expert Rev Mol Med. 2006 Aug 4;8(18):1-11.; Kominsky SL et al.: Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated*



through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol.* 2004 May;164(5):1627-33. ). Másfelől a claudinok különböző típusai a daganatterápiás szerek horgonyzóhelyeiként is felmerülnek, így Offner a claudinokat általános értelemben is célzott terápiák célpontjaként javasolta (*Offner S et al: Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancreatic carcinoma therapy. Cancer Immunol Immunother.* 2005 May;54(5):431-45. Epub 2004 Oct 16.). Ezen túlmenően már az egyes daganatok kialakulásában és progressziójában szerepet játszó claudinoknak a jelátviteli utak befolyásolásán át történő célzott terápiáját is fejlesztik egyes daganatok esetében. Colorectális daganatok és emlőrák májáttétjei esetében ilyen lehet a Src kináz családba tartozó Lyn blokkolása, mely szelektív gátlószerrel a claudin-2 expresszió csökkenését eredményezi (*Tabariès S. et al.: Lyn modulates Claudin-2 expression and is a therapeutic target for breast cancer liver metastasis. Oncotarget.* 2015 Apr 20;6(11):9476-87.).

4. "A vizsgált áttétek esetében mennyiben tekinthető relevánsnak a primer tumorokkal való összehasonlítás, amennyiben nem ugyanazon betegek primer tumorairól és ezen primer tumor által képzett áttétről van szó?"

Az áttéteknek a primer tumorokkal való összehasonlítása kapcsán, mind tumor markerek, célzott terápiás célpontok, mind pedig molekuláris mechanizmusok tekintetében sok vizsgálat történik. Sok esetben vizsgálnak egy szervben belül különböző szöveti eredetű és szövettani típusú áttéteket a göccs elváltozások differenciáldiagnosztikai eszköztárának bővítése és a diagnózisok specificitásának növelése érdekében. Az áttétképzés folyamatának tanulmányozásához a legideálisabb ugyanazon beteg primer tumorának és metasztázisainak tanulmányozása. Egyre több adat szól amellett, hogy az áttétek jelentős része különbözik egyes molekuláris jellemzőjében a primer tumortól (*Thomson AH et al.: Changing molecular profile of brain metastases compared with matched breast primary cancers and impact on clinical outcomes. Br J Cancer.* 2016 Feb 23. doi: 10.1038/bjc.2016.34; 15.; Amir E et al.; Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2012 Feb 20;30(6):587-92.) és eltérő áttéti lokalizáció is járhat más expressziós profillal (*El-Deiry WS et al.: Molecular profiling of 6,892 colorectal cancer samples suggests different possible treatment options specific to metastatic sites. Cancer Biol Ther.* 2015 Dec 2;16(12):1726-37.). A betegek túlélését sokszor az áttétek differenciáltsága is megszabhatja, mely nem feltétlenül egyezik meg a primer tumor áttétjével (*Szendroi A és mtsai: Prognostic factors and survival of renal clear cell carcinoma patients with bone*



*metastases. Pathol Oncol Res. 2010 Mar;16(1):29-38.* ). Ugyanazon beteg primer tumorának és májjáttétjének műtéti rezekátuma és pathológiai anyaga ritkán áll egyszerre rendelkezésre. Kedvező esetekben az egyedi májjáttétek műtéti indikációt képeznek, főleg colorectalis daganatok esetében fordul elő vizsgálható számú anyag. Jelenleg egy ilyen mintagyűjteményben tanulmányozzuk a claudinok és miR-ek expressziós mintázatának változását a primer vastagbélrákok és májjáttétjeik vonatkozásában. Összességében véve az általunk is alkalmazott módszer a májjáttétek kutatásában nemzetközileg elfogadott gyakorlat, azonban ha vizsgálható ugyanazon betegek primer tumora és áttéte és nagyszámú esetet lehet összegyűjteni, akkor ez a legmegbízhatóbb módszer.

5. „Igazolják-e vizsgálatok a claudinok expressziójának microRNS-ek vagy más jelátviteli utak által történő szabályozását?”

Igen, vannak igazolt kapcsolatok a claudinok expressziójának miR-ek által történő szabályozására, de összességében véve kevés *in vitro*, illetve *in vivo* rendszerben igazolt adattal rendelkezünk e tekintetben. A szekvencia homológai alapján egy adott miR-nek akár több száz célpontja is lehet, de a biológiailag releváns kapcsolat jóval kevesebb. Ezeket az adott miR expressziós változásával és a cél mRNS, illetve még inkább a fehérje expressziójának változásával kell igazolni és a negatív korrelációt bizonyítani. Feltehetően a májban is a különböző kórfolyamatokban egy adott claudin kifejeződését eltérő miR-ek is szabályozhatják. Vannak már adatok arra is, hogy jelátviteli utak, adott kinázok befolyásolják a claudinok expresszióját, így klasszikus példaként a PKC is befolyásolhatja a claudin expressziót (*Iitaka D et al.: PKCδ-iPLA2-PGE2-PPARγ signaling cascade mediates TNF-α induced Claudin 1 expression in human lung carcinoma cells. Cell Signal. 2015 Mar;27(3):568-77; 47. Leotlela P.D. et al.: , Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. Oncogene. 2007 May 31;26(26):3846-56.*).

A 3. pontban említett Src családba tartozó Lyn kináz is befolyásolhatja a claudin-2 expresszióját (*Tabariès S. et al.: Lyn modulates Claudin-2 expression and is a therapeutic target for breast cancer liver metastasis. Oncotarget. 2015 Apr 20;6(11):9476-87.*).



Kevés validált claudin-miR szabályozási kapcsolat áll rendelkezésre, a legtöbb adat a claudin-1 molekulát érinti, amelynek 33 validált miR szabályozó kapcsolata van (*miRWalk*: <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>), ebből lényeges lehet a miR-155, amely miR idáig főként gyulladáshoz kapcsolt folyamatokban került előtérbe (*Lopez-Ramirez MA et al.: MicroRNA-155 negatively affects blood-brain barrier function during neuroinflammation. FASEB J. 2014 Jun;28(6):2551-65.; Qin W et al.: MicroRNA-155 is a novel suppressor of ovarian cancer-initiating cells that targets CLDN1.. FEBS Lett. 2013 May 2;587(9):1434-9.*). A további claudin molekulákra vonatkozóan ez idáig csak kevés közlemény igazolta a miR-ek szabályozó kapcsolatát (CLDN-4: 2, CLDN-5: 1, CLDN-7: 2). A PDGFR-b gént érintően pedig a miR-224 került fel, és a miRWalk adatbázis validált targetként említi, de a közlemény alapvetően *in silico* predikción alapul (*Murakami Y. et al.: Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. Oncogene. 2006 Apr 20;25(17):2537-45.*).

6. „Megállapítható-e a vizsgált mutatók közül olyan biomarker, amely a fibrosis progresszióval F0-tól F4-ig vagyis a cirrhosisig, illetve a tovább a HCC-ig tükrözné a kórfolyamat fokozatos előrehaladását?”

A claudin-1, -4 és -7 expresszió növekedése több munkacsoport vizsgálatai alapján is korrelál a fibrosis előrehaladtával, mely az első pontban leírásra került. Munkacsoportunk a közelmúltban vizsgálta a mikroRNS expresszió és a fibrosis korrelációját. Eredményeink szerint a miR-122 negatív korrelációt mutatott a szövettanilag és elasztográfiás vizsgálatokkal is igazolt fibrosissal (*Halász T. és mtsai: miR-122 negatively correlates with liver fibrosis as detected by histology and FibroScan. World J Gastroenterol. 2015 Jul 7;21(25):7814-23.*). Még nem közölt vizsgálataink szerint a claudin-1 expresszió és a szövettanilag igazolt fibrosis mértéke (Metavir) és a tranziens elasztográfia (liver stiffness) során mért fibrotikus átépülés pozitívan korrelál egymással (Dr. Halász Tünde Ph.D. munkája).

A miR-ek a vérből is kimutathatóak és a jövőbeni vizsgálatok egyik kiemelt kérdése lesz, hogy a mikroRNS-ek terápiás célpontként való azonosítása mellett milyen diagnosztikai potenciált jelent vérszintjük meghatározása. A hepatocelluláris carcinoma és a vérben mérhető mikroRNS szintek között több összefüggést is leírtak már, ezek nagyszámú mintán történő validálása a jövőbeni vizsgálatok feladata lesz (*Lin XJ et al.: A serum microRNA classifier for early detection of hepatocellular carcinoma:*

Semmelweis Egyetem, Budapest  
Általános Orvostudományi Kar  
II. sz. Pathológiai Intézet



Semmelweis University, Budapest  
Faculty of Medicine  
II<sup>nd</sup> Department of Pathology

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](mailto:jtimar@korb2.sote.hu)

---

*a multicentre, retrospective, longitudinal biomarker identification study with a nested case-control study. Lancet Oncol. 2015 Jul;16(7):804-15; Forner A.: Hepatocellular carcinoma surveillance with miRNAs. Lancet Oncol. 2015 Jul;16(7):743-5.)*

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

Tisztelettel:

Dr. Kiss András  
egyetemi docens  
Semmelweis Egyetem, II. sz. Pathológiai Intézet

Budapest, 2016 február 29.