Válasz Dr. Kopper László professzor úrnak az

**„Új módszerek a daganatok genetikai jellegzetességeinek**

**és heterogenitásának vizsgálata (1004-15)”**

című MTA Doktori Értekezésem bírálatára

**Kopper László professzor úr kérdéseire adott válaszaim**

1. *Milyen kérdésekre ad olcsóbb, gyorsabb választ az AIPF a PCR technikákkal összehasonlítva?*

Az immunfenotípus és FISH vizsgálatokat lehetővé tevő AIPF technika egyes kiválasztott, ritkán előforduló sejtek további, mélyebb vizsgálatát teszi lehetővé morfológiai azonosítás után. Leginkább tehát az áramláscitometriás, vagy mágneses sorting kapcsán kiválasztott, dúsított sejtpopulációk elemzésének technikájával rokon, igaz utóbbiak esetében sokkal több sejtre van szükség a populáció értelmezéséhez. AIPF esetén sokszorosan adódott, hogy több millió sejtes háttérből mindösszesen néhány (3-10) daganatsejtet azonosítottunk, ami kismértékű, igen korai disszeminációra enged következtetni. Ezt az alacsony érintettséget az előbbi módszerekkel akkor lehet kimutatni, ha 10-20-szoros sejtmennyiséget szűrünk át, ami a beteg számára már megterhelő lehet és lényegesen nagyobb technikai kihívást jelent. Egyes genetikai eltérések (pl. specifikus transzlokációk) PCR-rel történő azonosítása valóban kiválóan alkalmas a daganatos érintettség hasonlóan alacsony szintű megragadására (pl. minimális reziduális betegség), ezzel azonban a sejtek egyben ilyen célra fel is használódtak. Míg tehát egyes daganatsejt típusokban a gén- és fehérje expresszió aberráns kombinációit lehet specifikusan kimutatni, máskor a domináns génhibák megragadásával tudjuk az érintettséget igazolni. Az AIPF technika nagy ígérete, hogy a sejtek a tárgylemezen ott maradnak az azonosítást követően, ami – bizonyos korlátok között – további genetikai információk kinyerését is lehetővé teszi. A daganatos betegségek mellett sikeres tanulmányokat folytattunk többféle sejtes rendszerben, pl. anyai vérben keringő magzati vörösvérsejtek azonosítására is. Bár ilyen irányú fejlesztést magunk nem végeztünk, az in situ metodika mellett elvben az immunfluoreszcensen azonosított daganatsejtek akár további PCR-alapú DNS vizsgálatokra is alkalmasak.

1. *Egynapos FISH esetén a fluoreszcens jelek minősége kifejezetten fokozódott. A HER2 meghatározás problémáit ismerve kérdés az, hogy nem nő-e pl. a fals-pozitív esetek aránya, ill. ezeket hogyan lehet ezt kizárni?*

Ismeretes, hogy a szövettani minták minősége számos, részben alig kontrollálható biológiai és technológiai okból kifolyólag, igen változatos lehet. A fluoreszcens vizsgálatok szempontjából mindez azzal jár, hogy a specifikus jel és a háttér (zaj) intenzitása esetről esetre fluktuálhat. Éppen ezért a FISH technikában is minden olyan lehetőség előrelépés, amely a jel/zaj arány fokozódásához vezet. Az egynapos (újabban quick) FISH alkalmazás előnye nem elsősorban a több fluoreszcens jel megjelenésében nyilvánul meg, hanem a specifikus jelek megjelenésének kontúrosságában, ill. a szöveti struktúrák jobb azonosíthatóságában, értelmezhetőségében. Mindez együttesen a fluoreszcens jelek elhatárolását, interpretálását segíti, és esetenként megszabadít a nem specifikus jelenségek zavaró hatásától. Ebből a szempontból tehát az egynapos FISH akár a fals pozitiv eredmények csökkenéséhez is hozzájárulhat. Korai tanulmányunk óta a technika széles körben elterjedt, intézeti rutin munkákban is napi szinten alkalmazzuk, megfelelő minőségbiztosítás mellett, és zavaró értelmezési, ill. diagnosztikai nehézségek - egyes problémás esetektől eltekintve - nem jellemzőek.

1. *A szöveti autofluoreszcencia vizsgálatok során mit jelent a „Viszonylag szövet specifikus emissziós mintázat”? Kérdés az is, hogy ez a módszer milyen gyakorlati kérdések megválaszolására alkalmas?*

A nem-destruktív szövetvizsgálatok alapelve, hogy a szöveti összetételről minél több információt kapjunk, anélkül, hogy azt lényegesen megváltoztattuk volna, pl. festéssel, emésztéssel, egyes összetevők kivonásával. Ennek értelmében az autofluoreszcencia kifejezetten praktikus megközelítés, mert a stabil szöveti összetevők, ill. a változó metabolikus aktivitás függvényében a gerjeszthető fény mértéke és jellege erősen különbözik. A szövetalkotók által kibocsájtott fluoreszcencia detektálásával és digitális ábrázolásával nem csak az anatómiai viszonyokat (erek, kötőszöveti rostok, stb.), hanem az anyagcsere, a funkcionális és szekretoros aktivitás mértékét is leképezhetjük, azaz az emissziós mintázat az adott szövetre specifikus. Ez segíthet pl. a szöveten belüli nagyobb egységek, pl. a daganatos területek automatizált kijelöléséhez, de pl. egy tumoron belül a nekrózisok, bevérzések elkülönítése is könnyen lehetséges mindenféle festés alkalmazása nélkül. Az eltérő területek azonosításával a szövetminták osztályozhatók, minősíthetők, de akár automatizált mintavétel is szóba jön további (pl. molekuláris) vizsgálatok céljából.

1. *Génhibák szöveti kimutatása esetenként immunhisztokémiával, a mutáns fehérje ellenes specifikus antitestekkel is megközelíthető, konkrétan elemzésre került a mutáns BRAF fehérje ellenes VE-1 antitest klón alkalmazása. Mi van előbb, az új génhiba, vagy a megfelelő antitest?*

Vad típusú fehérje fokozott vagy csökkent expressziója viszonylag gyakran és klinikailag releváns formában, jellegzetes módon jelentkezik daganatokban (pl. Her-2, androgén receptor, stb.). Mutáns fehérjék vizsgálatára antitestek az eseteknek egyelőre kis hányadában kerültek kifejlesztésre, ez nem is minden esetben bizonyult lehetségesnek. A mutáció révén többnyire ismert aminosav csere vagy a peptidlánc nagyobb szegmentális változása következik be, mely a fehérje konformáció változásával, a mutáns fehérjét jellemző új epitópok kialakulásával jár. A legújabb rekombináns technológiák segítségével ezek az epitópok klónozhatók és szerencsés esetben olyan antitestek állíthatók elő, melyek nagy affinitással, jelentősebb keresztreakció nélkül kötődnek a célfehérjéhez. Ilyen esetekben ezek az antitestek akár diagnosztikus rutin alkalmazásra kerülhetnek a szövettani diagnosztikában, így van ez a VE-1 antitest esetében is. További lehetőség, hogy a génhiba a fehérje, vagy egyes régióinak az expresszióját teljesen kiüti, pl. stop kodon, kereteltolódás következtében ( INI1, PTEN) vagy a fehérje lebontását, turnoverét befolyásolja, pl. p53 fehérje mutációk esetében. Többnyire tehát a génhiba pontos molekuláris feltérképezése és a proteomikai megközelíthetőség együtt jár. Esetünkben a mutáns fehérjét specifikusan jelölő reakció azért volt különösen érdekes, mert a mutáció szempontjából ismételten fennáll a gyanú a szöveti heterogenitásra, és a fehérje vizsgálatok ennek pontos, sejtenkénti megítélését lehetővé teszik. Eredményeink azt mutatták, hogy LCH agresszív formáiban a BRAF mutáció lényegében homogénen, minden neoplasticus histiocytában aktív formában van jelen.

1. *Disszeminált/keringő daganatsejtek viabilitása és a klinikai tesztelés kérdése hogyan értékelendő a jelenlegi törekvések és eredmények tükrében?*

A szolid tumorokból származó keringő daganatsejtek nagy része az irodalmi adatok alapján kísérletes körülmények között nem okoz metasztázist, a jelenséget metasztatikus inefficienciának nevezték el a 2000-es évek elején. Emlőrákos betegek véréből végzett tanulmányunkban az elsők között igazoltuk – az AIPF morfológiára épülő módszerével -, hogy a sejtek pusztulása a betegekben természetes körülmények között is végbemegy, ami a DTC kimutatás és interpretáció lényeges változását eredményezte. Jelenleg már megkülönböztetik a spontán tumorsejt pusztulást (anoikis) és az immunmediált sejtlízist, az utóbbi makrofág, ill. cytotoxikus T-sejt interakciót feltételez (mintáinkban mi is láttunk ezekre utaló egyértelmű jeleket). Ugyanakkor világos, hogy módszerünkkel minden bizonnyal detektáltuk azokat a sejteket is, melyek túlélik a hematogén invázió okozta stresszt és képesek a kitapadásra. A jelenleg sokat emlegetett új módszerekkel a keringő daganatsejteken keresztül, amennyiben a számuk ezt lehetővé teszi, alkalom nyílik egy adott génhiba monitorizálására, ennek eredménye azonban jelenleg inkább további kérdéseket vet fel. A periférián észlelhető pozitív jelenségek és a tumortömeg, tumoraktivitás viszonya leginkább metasztatikus tumorban egyértelmű, a követés során a progresszió esetleges jeleit még nehéz egyértelműen megítélni, a nagyléptékű klinikai tanulmányok zajlanak. Külön szempont, hogy a keringő tumorsejtek metabolikus aktivitása nagyon eltérhet a daganatszövettől (EMT jelensége), valamint, hogy a disszemináció milyen klonális/szubklonális evolúció eredménye, azaz a sejtek mennyiben reprezentálják a daganat fő tömegét.

1. *Elképzelhetőnek tartja-e, hogy a primer tumorban olyan markerek legyenek, amelyek a metasztatizálási hajlamot előre jelzik?*

Természetesen ismertek a szolid tumorok esetében a daganatsejtek leválását (E-cadherin, beta-catenin), migrációját (proteázok), kitapadását (hialuronsav receptor…) alapvetően befolyásoló tulajdonságok, így ezek összevetése a tényleges invazív aktivitással, hematogén és limfogén disszeminációval fontos része a prognosztikai besorolásnak. Munkáinkban a teljeskörű metasztatikus profil feltérképezésére eddig nem volt mód, helyette a disszemináció tényének és egyes genetikai változók kimutatásának kérdéseivel foglalkoztunk. Mára azonban teljesen elfogadott, hogy az NMYC génamplifikáció a progresszív viselkedésű neuroblasztomák markere, mely tehát indirekt formában ugyan, de minden másnál jobban jelzi a metasztatikus hajlamot. Érdekes lenne persze ennél specifikusabb jelek ismerete is. A részletesebb neuroblastoma vizsgálódások kapcsán a sejtfunkcióra vonatkozó fehérjék párhuzamos kimutatására is kísérletet tettünk, igaz, ezek a munkák nem kerültek publikálásra. A Ki-67 fehérje expresszió meghatározásával a disszeminált tumorsejtekben megállapítottuk, hogy az előrehaladott stádiumú neuroblastomák esetén a DTC-k sejtproliferációs aktivitása jóval magasabb volt, ami a sejtek túlélését, aktív proliferációját sugallta a csontvelőben.

1. *Aurora B és gátlószereinek hatásmechanizmusa: lehet, hogy a topoisomerase II gátlása egyben inaktiválja az Aurora B-t, csökkenti annak fokozott expresszióját?*

A kromoszóma állomány integritását nagy részben z AuB aktivitás hiánya vagy túlsúlya és a mitotikus orsó kialakulásának ehhez viszonyított idő-ablaka (spindle assembly checkpoint, SAC) határozza meg. A topoisomerase II enzim a kromatin stabilizálásában és ciklus átalakulásának biztosításában is központi szerepet kap. Általánosságban érvényes, hogy malignus tumorokban a több TOP2A expresszió magasabb grádust és rosszabb túlélést jelent. Génje a Her2 mellett van a 17q21 régióban, azonban Her2/TOP2A koamplifikációt emlő, prosztata és gyomorrákban viszonylag ritkán találtak. A topoisomerase II gátlása antraciklin alapú terápiával bevett gyakorlat és helyesnek tűnik a kérdésben felvetett mechanizmus is, miszerint a topo2-gátló kezelés az Aurora-kináz működésére jelentős szinergista hatással van. Topo2 depléció során csökken az AuB-kináz aktivitása, az AuB-komplex nem mozgatja a mitotikus orsót, elmarad a kromatida szétválás (Coelho PA et al, PLoS Biol, 2008). A hatás tehát centroméra non-disjunctio, syntelikus kromoszóma asszociációk formájában manifesztálódik és ilyen módon sejtpusztulást indukál (Nezi L, Curr Opin Cell Biol, 2009). A topo2 a kérdésben sugalltaknak megfelelően szükséges a megfelelő AuB-kináz működéshez, gátlása csökkenti a kináz aktivitását, kérdés ugyanakkor, hogy egy esetlegesen fokozott kináz expresszió ezt milyen mértékben és milyen időzítéssel képes kompenzálni. A válasz egyben arra is magyarázattal szolgálhat, hogy bizonyos daganatsejt klónok miért reagálnak olyan különbözőképpen a topo2 kezelésre.

1. *Munkáiban az AuB és p53 kodelécióját ismételten kimutatta, ami az eddig feltételezett AuB expresszió fokozódással nincs összhangban. Mi a hatása a deléciónak? Elképzelhető, hogy mindketten fontos szerepet játszanak a DNS hibáinak kijavításában (repairben), egymás működését erősítve?*

A 17-es kromoszóma rövidkarján (p13) egymáshoz igen közel elhelyezkedő p53 és AURKB gén együttes vizsgálata magától értetődően adódott tanulmányaink során. A p53 géndeléció, mint a p53 deficiencia kialakulásának egyik lehetséges oka régóta ismert, az ehhez társuló AURKB deléció lehetősége ilyen méretekben nem volt korábban ismert. A deléció a IHC metodikával vizsgálva nem járt együtt az AuB fehérje expresszió jelentős változásával, egyes esetekben ugyan csökkenést észleltünk, de az eredmény nem volt statisztikailag szignifikáns. Mint az előző kérdés taglalásánál már kiderült, kísérletes eredmények szerint az AuB fehérje fokozott expressziója mellett a fehérje defekt működése vagy hiánya is súlyos károkat okoz, beleértve a nem megfelelően időzített expressziót, a sejtosztódás aktív gátlását, a kromoszóma szeparáció szinkronizációjának zavarát és ezeken keresztül a súlyos karyotípus eltéréseket. Mindez arra hívja fel a figyelmet, hogy a túlműködésen túl az AuB kináz deficiencia genetikai értelemben progresszióra hajlamosít, igaz, ennek egyértelmű jeleit szöveti preparátumainkban még keressük. A kivizsgálásra érdemes magyarázatok között szerepel a homológ AURKB gén (akár kompenzatórikus) felszabályozásának lehetősége, mely alaphelyzetben elegendő kináz aktivitást biztosíthat a mitotikus apparátus működtetéséhez, de mindez kevésnek bizonyulhat kináz gátló kezelés kapcsán. Ezért is látszik szükségesnek az Aurora kináz gátló terápiák hatékonyságának jövőbeni vizsgálatakor az AuB-státusz pontos ismerete.

1. *Reaktív csíracentrumok és transzformált lymphoma sejtek vizsgálata során a proliferációs aktivitást az előbbiben magasabbnak találták, ami ritka, de jól megmagyarázható megfigyelés. Közrejátszhat ebben az Aurora-család?*

A nyirokcsomóban antigén hatásra lejátszódó aktiváció morfológiailag legjobban megfogható jele a B-sejtek proliferációja a másodlagos tüszők csíracentrumaiban. A stimulus hatására viszonylag hirtelen óriási tömegű B-sejt differenciációra van szükség, melyek közül a nagy affinitású átrendeződött immunglobulin termelő klónok kiválasztódnak és fennmaradnak, míg az alacsony affinitású klónok apoptosis útján kiszelektálódnak. Ennek a folyamatnak az eredménye az igen aktív sejtproliferáció, mely a nyirokcsomó megnagyobbodásával és metabolikus aktivitásának növekedésével is jár, ez azonban néhány óra/nap alatt egyensúlyba kerül a sejtpusztulással. A csíracentrum B-sejtjei az expanzió szakaszában igen aktív sejtciklus tevékenységet (DNS-szintézis, sejtosztódás) végeznek, melyhez a szükséges faktorok, így a teljes mitotikus apparátus is aktiválódnak. Ezen belül tehát az Aurora kinázok expressziója a fokozott proliferációs tevékenység arányában, a megfelelő rendben történik a sejtciklus G2/M fázisában. Fő következtetéseink közé tartozik, hogy az Aurora-B expresszió csak a sejtciklus aktivitás, azaz a sejtproliferációs ráta ismeretében értelmezhető. Ezt jól példázza a B-sejtes csíracentrum aktivitás, hiszen itt óriási mértékű expresszió fokozódás következik be fiziológiás körülmények között, de ez teljesen arányos a sejtciklus aktivitással. A váratlanul maga AuB a G2/M-fázis elhúzódására enged következtetni, ami előfeltétele lehet a p53 indukálta fiziológiás sejtpusztulásnak. Az expresszió ugyanakkor kifejezetten dinamikus, így az AuB expresszió a follikuláris B-sejtes aktivitás lecsillapodásával visszaesik. A szabályozás felborulása olyan esetekben nyilvánvaló, ahol a magas és állandó AuB expresszió alacsonyabb sejtproliferáció mellett észlelhető. Mivel egyértelmű kromoszomális okokat saját eredményeink és az irodalmi adatok alapján nem ismerünk, a regulációs zavar hátterében mélyebb genomikai, epigenetikai okok húzódhatnak.

Debrecen, 2016. április 18. Dr. Méhes Gábor