

Dr. Klivényi Péter Professzor Úr bírálatában szereplő kérdésekre adott válaszok

(Klekner Álmos: „Asztrocitómák invazivitásának szerepe a személyre szabott onkoterápiában” című MTA doktori munka vonatkozásában)

Szeretném megköszönni Dr. Klivényi Péter Professzor Úr értékes bírálatát, előremutató véleményét és sokszor jogos kritikai észrevételeit. Pontokba szedett kérdéseire, azoknak megfelelő sorrendben válaszaim a következők:

1. Az intratumoralis heterogenitás egy elég jelentős probléma a (epi)genetikai faktorok értékelésekor. Ennek kiküszöbölésére milyen lépések történtek?

Az intratumorális heterogenitás minden humán glioblasztómát (GBM) érintő kutatás esetében súlyos kihívás elé állítja a kutatót. Ez a heterogenitás többek között a magyarázata annak, hogy a GBM-sejtvonalakon leírt tudományos megfigyeléseket nem lehet teljes mértékben a humán tumorra vonatkozóan is megfeleltethetőnek tekinteni. A gyakorlatban a tumorra jellemző heterogenitásból származó eltérő eredmények megszületését nem is lehet kivédeni. Ezért a kutatások során azt az elvet követjük, ami a szövettani diagnosztikára is nagy vonalakban érvényes: ha egy tumor különböző területeiről különböző grádusnak megfelelő képet kapunk, akkor a legmagasabb grádusnak megfelelő diagnózist tekintjük mérvadónak a kezelés megválasztásakor. Vizsgálataink során minden tumorból több darabot is lefagyasztottunk, és a konkrét feldolgozás előtt előbb a tumormintákból metszetet készítettünk, melyet tapasztalt neuropathológus véleményezett, és csak abból a tumormintából indult tovább a vizsgálat, amely a szövettani vélemény alapján egyértelműen a várt grádusú tumornak (a legtöbb esetben glioblasztómának) bizonyult. Ezzel a nekrotikus területeket, a jelentősen bevérzett területeket vagy eltérő dignitású területeket megbízhatóan ki lehetett szűrni. A morfológiai kép alapján heterogénnek tűnő tumorminták genetikai heterogenitását nem állt módunkban meghatározni. Erre nem volt kapacitásunk, és kérdéses is, hogy a gyakorlatban mennyire kivitelezhető. A mi vizsgálatainkban a neuropathológus véleményére hagyatkozva válogattuk ki a vizsgálatra szánt szövetmintákat, további előzetes tesztelés nem történt.

2. A genetikai eltérések különbözőek-e attól függően, hogy primer (de novo) vagy szekunder (astrocitoma eredetű) glioblastomát vizsgálunk?

Vizsgálataink során beválogatott GBM minták mind primer tumorból származtak, így a primer-szekunder GBM közötti különbségeket inváziós szempontból értékelni nem tudjuk. Mivel azonban ez a jövőre nézve érdekes témafelvetés, ezért terveink közé fel fogjuk venni és el fogjuk végezni, köszönöm szépen a figyelemfelkeltést!

3. Hogyan változik az inváziós spektrum asztrocitoma különböző grádusaiban? Van-e valamilyen jellegzetes mintázatváltozás, amely előre jelezhetné a transzformációt, ill. terápiás célpontként is szolgálhatna?

A különböző grádusú asztrocitómák inváziós spektrumának vizsgálatának kérdését külön köszönöm, hiszen az invázió dignitástól függő jellege szervesen a témához tartozik és természetes következő lépése kutatásainknak. Ennek megfelelően már ez irányban történtek mérések, és valóban, arra a megállapításra jutottunk, hogy az inváziós spektrum grádus-specifikus (1. táblázat), és az elkülönítésben fő szerepet játszó kulcsmolekulák is azonosíthatók voltak (2. táblázat).

megkülönböztetés szintje	találati esély (%)		LDA során azonosított kulcsmolekulák száma
	IB1	LDA	
normál vs. AI	90,62	96	4 gén
AI vs. AII	78,57	89,3	7 gén
AII vs. AIII	85,71	82,6	5 gén
AIII vs. GBM	80	82,6	6 gén
low grade vs. high grade	77,58	78,9	5 gén
összes grádusból	51,3	50,8	4 gén

1. táblázat Az általunk felépített osztályozók találati pontossága keresztvalidációt követően RNS expressziós szintek alapján

normál	integrin β 1 laminin α 4 tenascin C tenascin R	A I	integrin α 3 integrin α 7 integrin β 1 laminin α 4 MMP2 tenascin R versican	A II	cadherin 12 ErbB2 neurocan syndecan 1 versican	A III	brevican cadherin 12 fibronectin laminin β 1 neurocan tenascin C	GBM
---------------	--	------------	--	-------------	--	--------------	---	------------

2.A. táblázat TLDA mérések eredményeinek analízise után az egyes grádusokat elkülönítő kulcsmolekulák

low grade	brevican	high grade
	ErbB2	
	fibronectin	
	ingerin β 1	
	versican	

2.B. táblázat TLDA mérések eredményeinek analízise után az alacsony és magas grádusú asztrocitómákat elkülönítő kulcsmolekulák

Eredményeinket ez évben publikáltuk (5), és jelentőségét egyrészt abban látjuk, hogy az onkoterápiás indikációkat meghatározó grádusbeosztást – ami az esetek nagy részében objektíven nehezen megítélhető paraméter – jelentősen megkönnyítheti, valamint a disszertációban is emlegetett kulcsmolekulák azonosítására is lehetőség nyílt, aminek később még terápiás következményei is lehetnek.

4. A peritumorális szövet mennyire tekinthető homogénnek egy invazív terjedésű tumor esetén? Számomra ez azt jelenti, hogy ebben a régióban vannak még normál sejtek is, de már közöttük fellelhető különböző arányban tumorsejtek is. Ráadásul a tumorsejtek befolyásolhatják az ép sejtek génexpresszióját is (pl. citokinekkal). Ezek befolyásolhatják a génexpressziós eredményeket. Történt-e szövettani analízis a tumoros-nem tumoros sejtek arányának meghatározására?

A peritumorális agyállomány vizsgálatokor 3 fő mintacsoportot vizsgáltunk. Ebből két szövetmintacsoport olyan betegekből származott, akiknél daganat melletti agyállományt vizsgáltunk. A mintaszelekciónak két lépcsője volt: az első, makroszkópos szelekció már műtét közben megtörtént, amikor látható volt, hogy a tumorreszekció során tumor melletti agyállomány is feláldozásra fog kerülni, akkor azokat kutatási célokra megmentve intraoperatívan lefagyasztottuk. A második szelekciós lépcsőt a neuropathológus által végzett mikroszkópos vizsgálat jelentette: csak azokat a mintákat továbbítottuk expressziós analízisre, melyek esetében a neuropathológus egyértelműen peritumorális agyállományt állapított meg, és tumorsejtre gyanús sejtek csak elvétve fordultak elő. A peritumorális agyállományban ugyanis valóban fordulhatnak elő daganatból származó sejtek, de ezek arányát kvantitatívan nem határoztuk meg. Véleményünk szerint ezeknek a sejteknek az aránya olyan kismértékű volt, hogy az egész szövetminta feldolgozásából származó mRNS vagy proteinmennyiséget számottevően nem befolyásolta. Ennek ellenére elismerem, hogy kutatástechnikailag precízebb lenne a tumorsejt-arány pontos meghatározása, de ehhez szükséges flow-cytometriás szeparátorral nem rendelkezünk, és pusztán biztonsági mérés céljából elvégzendő vizsgálatokra nem futotta kapacitásunkból. Természetesen a későbbiekben magasabb besorolású publikációhoz ennek igényét majd szem előtt kell tartanunk, köszönöm szépen a kérdést, ill. megjegyzést.

5. A génexpressziós változásokat nem követte protein szintű változás a glioblasztómában a vizsgált gének esetében. Ennek értelmezése hiányos, nincs megfelelő irodalmi kontextusba helyezve.

Vizsgálataink során az mRNS-szintű és proteinszintű expressziók nem mutattak mindig teljes átfedést egymással. Az irodalomban ez a megfigyelés már ismert jelenség, és nagy számú közleményben foglalkoznak a tumorkutatók vele (ld. hivatkozások). Ez a kérdés bennünket is sokat foglalkoztatott, és arra a megállapításra jutottunk, hogy ennek az eltérésnek 2 fő oka van. Az egyik, hogy az észlelt különbségek bár egy irányba mutatnak, de statisztikailag nem szignifikánsak. Ez tulajdonképpen kategóriáját tekintve nem is jelent különbözőséget, hiszen egyrészt a detektálási módszerből eredő nagyságrendek eltérése eredményezheti ezt, másrészt a mintaszám emelésétől később az egybeesés javulása várható. A második ok a poszt-transzkripció és poszt-transzláció szabályozási folyamatokban keresendő. Ugyanis nem tudjuk pontosan meghatározni, hogy minden mRNS-ről átíródik-e a szóban forgó protein, mely aztán később enzimatis hasításokkal inaktívvá válhat, vagy egyszerűen mutáció következtében eleve inaktív termék keletkezik és elképzelhető, hogy a PCR-hoz használt primer az mRNS-hez tökéletes specifikitást mutatva azt gond nélkül beviszi a replikációs ciklusokba, míg a károsodott valós fehérjetermék már polypeptid-szinten a tömegspektrométerben már nem hoz specifikus eredményt. Emellett természetesen az élő tumorszövetben a degradációs folyamatok is hiperaktívak lehetnek, vagy számos más „tumorszupresszor” hatás is érvényesülhet, ami a fehérjeszintű változásokért felelős. Ennek felderítése célkitűzéseink között szerepel, de idáig még nem jutottunk. Remélem, hogy nem sokára ezzel összefüggő eredményekről is beszámolhatok majd.

6. A munkák között nem találtam adatokat a miRNS vizsgálatáról, annak ellenére, hogy pl. a miRNS21 prognosztikai faktorként szerepel az irodalomban. Történtek-e erre vonatkozó vizsgálatok?

Jelen disszertációban szereplő kutatások során miRNS vizsgálatok nem történtek. A bírálóval teljesen egyetértve ezek vizsgálatát magam is kifejezetten figyelemfelkeltőnek és relevánsnak tartom. A perifériás vérkeringésből kinyerhető mikroszómák, mikrovesiculák és az általuk vizsgálható tumorból származó miRNS és DNS vagy cfDNS már régóta a figyelem középpontjába került (1-4), de nekünk ezirányú vizsgálataink még nem voltak. A bennük rejlő igen magas kutatási potenciál szele azonban már bennünket is elérte, és ezért indult meg már kb. 4 évvel ezelőtt a Tumorbankunk kibővítése szérumból és kb. 1 éve vizeletmintákkal is (már a bankunk elnevezése kezdetektől fogva azért Agydaganat- és Szövetbank, mert a vérszövetet is tartalmazza). Óriási jelentőségét látnánk, ha a gliómás betegek perifériás vérmintájából a mikroszómák segítségével az inváziós spektrum meghatározható lenne, hiszen ez esetben agyműtét nélkül lehetne diagnosztikai információhoz jutni. Ez a kutatási irányvonal oly mértékben felkeltette érdeklődésünket, hogy már előzetes laborvizsgálatokat kezdeményeztünk, és Szegeden Buzás Krisztina és Szabó Zoltán már a mi mintáinkon dolgozik,

hogy proteomikai vizsgálatokra alkalmas mikroszómákat izoláljon, Debrecenben pedig Zahuczky Gábor igyekszik a keringő nukleinsavból PCR-ra alkalmas mintákat izolálni. Oly mértékben tartom érdekfeszítőnek és izgalmasnak ezt a kérdést, hogy a Nemzeti Agykutató Program 2. ütemének támogatását is nagyrészt erre a célra szeretnénk fordítani.

Végül szeretném megköszönni Klivényi Professzor Úr MTA disszertációmra fordított értékes figyelmét és építő jellegű kritikai észrevételeit, melyek mind a tudományos eredményeim interpretációjához, mind pedig a jövőbeni irányvonalak meghatározásához nagy segítséget jelentettek.

Debrecen, 2017.06.12.

Dr. Klekner Álmos

Hivatkozások

1. Dong L1, Li Y1, Han C2, Wang X1, She L1, Zhang H1.: miRNA microarray reveals specific expression in the peripheral blood of glioblastoma patients. *Int J Oncol.* 2014 Aug;45(2):746-56. doi: 10.3892/ijo.2014.2459.
2. Gonda DD1, Akers JC, Kim R, Kalkanis SN, Hochberg FH, Chen CC, Carter BS.: Neuro-oncologic applications of exosomes, microvesicles, and other nano-sized extracellular particles. *Neurosurgery.* 2013 Apr;72(4):501-10. doi: 0.1227/NEU.0b013e3182846e63.
3. Manterola L1, Guruceaga E, Gállego Pérez-Larraya J, González-Huarriz M, Jauregui P, Tejada S, Diez-Valle R, Segura V, Samprón N, Barrena C, Ruiz I, Agirre A, Ayuso A, Rodríguez J, González A, Xipell E, Matheu A, López de Munain A, Tuñón T, Zazpe I, García-Foncillas J, Paris S, Delattre JY, Alonso MM.: A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. *Neuro Oncol.* 2014 Apr;16(4):520-7. doi: 10.1093/neuonc/not218.
4. Noerholm M1, Balaj L, Limperg T, Salehi A, Zhu LD, Hochberg FH, Breakefield XO, Carter BS, Skog J.: RNA expression patterns in serum microvesicles from patients with glioblastoma multiforme and controls. *BMC Cancer.* 2012 Jan 17;12:22. doi: 10.1186/1471-2407-12-22.
5. Virga J., Bognár L., Hortobágyi T., Zahuczky G., Csősz E., Kalló G., Tóth J., Hutóczki G., Reményi-Puskár J., Steiner L., Klekner A.: Tumor grade versus expression of invasion-related molecules in astrocytoma. *Pathol Oncol Res.* 2017 Feb 4. Epub ahead of print

Hivatkozások az RNS-protein expresszió eltéréseire

1. Antonis Koussounadis, Simon P. Langdon, In Hwa Um, David J. Harrison, and V. Anne Smith: Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep.* 2015; 5: 10775.
2. Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics.* 2002 Apr;1(4):304-13.
3. Christine Vogel and Edward M. Marcotte: Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet.* 2012 Mar 13; 13(4): 227–232.
4. Maier T, Güell M, Serrano L: Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 2009 Dec 17;583(24):3966-73.