

Válaszok Dr. Igaz Péter bírálataira

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Dr. Igaz Péter Professzor Úrnak, hogy vállalta MTA doktori dolgozatom bírálatát, köszönöm pozitív értékelését, dicséret szavait.

Valamennyi, a doktori mű alapjául szolgáló munka a 2001-2016 közötti időszakból származik, 2016 utáni saját közleményre a doktori értekezésben nem hivatkozik [...], furcsának tartom ezt, hiszen az MTMT alapján 2020-ban is jelent meg az értekezés témájához kapcsolható utolsó szerzős közleménye jó nemzetközi folyóiratban...

Az értekezésbe bevonni kívánt közlemények kiválasztása meglepően nagy kihívásnak bizonyult. Részben amiatt, ami egy későbbi kérdésben is felmerül: eddigi pályafutásom során jelentősen változott ezen kutatási terület módszertana, ami miatt a két évtizede, illetve elmúlt években készült publikációk nagymértékben eltérnek egymástól. A bemutatott közlemények témája talán emiatt is kissé szerteágazó, de mégis a polimorfizmusok genotipizálása, funkcionális és asszociáció elemzésének hármasságába jól beleilleszthető. Ezen rendszerbe valóban beépíthető lett volna az a 2020-ban megjelent közleményünk, amely a kutyák *WFS1* génjének miRNS-kötőhelyében elhelyezkedő SNP-jét vizsgálja, mégis úgy éreztem, hogy a valamelyest hasonló, ugyanakkor részletesebb humán eredmények mellett ezen munka bemutatása nem emelte volna jelentősen a dolgozat tudományos és orvosi értékét.

*A kutyák *DRD4* polimorfizmusainak vizsgálata kapcsán felállíthatók voltak-e korrelációk e polimorfizmusok és a különböző kutyafajták genetikai rokonsága vonatkozásában?*

Munkánk során tervueren, groenandael és malinois belga juhászkutyákat, németjuhászokat, valamint szibériai husky-kat és európai farkasokat vizsgáltunk. A kutya farkastól történő genetikai elválása kb. 14000–20000 évvel ezelőtt kezdődött, a mai, „modern” kutyafajták szelekciója pedig néhány száz éves múltra tekint vissza. A belga-, valamint a németjuhász kutyák egy Nyugat-Európában elterjedt pásztorkutya-típustól származnak, a fajták pontos leírására a XIX. század végén került sor. A belga juhászkutyák szőrük típusa és színe alapján 4 csoportba – tervueren, groenandael, malinois és laekenois – sorolhatók, az Amerikai Kennel Klub ezeket négy külön fajtaként tartja számon. A beltenyésztés révén kialakult kutyafajták genetikailag elkülönülő alpopulációk, ugyanakkor az egyes fajták meghatározása, a kutyák csoportosítása alapvetően az állatok külső jegyein, fizikai tulajdonságain, emberi életben betöltött szerepén (vadász-kutya, terelőkutya stb.) alapul. A genomon elszórtan elhelyezkedő megfelelően nagyszámú mikroszatellita alapján ezzel együtt a kutyák fajtája az esetek túlnyomó többségében helyesen meghatározható [Parker 2004]. A fajták közötti genetikai különbözőség az általunk vizsgált kutyák elemzése során is megmutatkozott. Husky-kban és farkasokban a *DRD4* gén 3. exonjában lévő VNTR esetén 8 modulból álló allélt is azonosítottunk, és az „5” változat bizonyult leggyakoribbnak, míg a belga és németjuhászkutyákban csak a „2” és a „3a” allél fordult elő. A dolgozatban nem került bemutatásra a *DRD4* 2. intronjában elhelyezkedő VNTR elemzése: ez a lókuszt a farkasokban nem bizonyult polimorfnek, husky-kban és tervuererekben a rövid változat, míg a másik két belgajuhász fajtában és német juhászkutyákban pedig épp a másik allél mutatkozott ritka variánsnak. Más polimorfizmusok esetén is megfigyeltük, hogy a belgajuhász típusok között esetenként nagyobb különbözőség figyelhető meg, mint az egyes kutyafajták között: hasonló eredményre jutott egy átfogó elemzés [Wijnrocx, 2016] is, melynek tanúsága szerint számos kutyafajta között kisebb genetikai eltérés mutatkozik, mint amekkora a belgajuhász típusok között tapasztalható. Eredményeink alapján tehát a kutyafajták közötti genetikai különbség egyértelműen megmutatkozik, a genetikai rokonság megbízható feltérképezéséhez azonban több (és variábilisabb) polimorfizmus elemzése szükséges.

A C4 komplement gén polimorfizmusai kapcsolttságban állnak-e a 21-hidroxiáz egyes variánsaival, amelyeknek a congenitalis adrenalis hyperplasia kórképben relevánsak?

A 6. kromoszóma rövid karján helyezkedik el az RCCX-modul, mely 4 gént foglal magában, ezek egy szerin-treonin kinázt (RP), a C4A vagy C4B komplement komponenst (C4A, illetve C4B), a 21-hidroxiáz enzimet (CYP21) és egy extracelluláris mátrixfehérjét (TNX) kódolnak. Az RCCX modulok száma a kromoszómán 1, 2 vagy 3 lehet. Az ismétlődő egységek közül azonban egy kromoszómán csupán egy CYP21 gén aktív, a többi a 3. exonban lévő 8 bp-os deléció miatt pszeudogén, nem kódol működőképes enzimet. A C4 génekről ezzel szemben minden modul esetében funkcióképes C4A vagy C4B fehérje fejeződik ki, melyek nem csak primer szerkezetükben, hanem aktivitásukban is eltérést mutatnak. Ezen a kromoszóma szakaszon nagy kiterjedésű, konzervált régiók, úgynevezett ősi haplotípusok helyezkednek el. A C4A-t nem tartalmazó modulszerkezet az ún. 8.1-es kiterjedt haplotípus alkotóeleme, a C4B-t nem tartalmazó RCCX modulhoz ezzel szemben hasonló, nagy kiterjedésű konzervált DNS-szakaszok nem kapcsolódnak.

Az aktív CYP21 génben igen sok, több mint 200 mutáció ismert, amiben a nagymértékben hasonló szekvenciájú pszeudogén jelenléte alapvető szerepet játszik. Ezek a mutációk csökkent aktivitású vagy funkcióképtelen enzim kifejeződése révén congenitalis adrenalis hyperplasia kialakulásához vezetnek. Gyakoriak a különböző méretű deléciók, melyek akár igen nagy kiterjedésűek is lehetnek: a CAH-X-szindrómában a szteroid hormon szintézis zavara az Ehlers–Danlos-szindróma tüneteivel társul egy deléció miatt, amely a CYP21 mellett a TNX gént is érinti [Merke 2020]. A mutációk mellett a génben nagy gyakorisággal fordulnak elő olyan polimorfizmusok, melyek az enzimműködést kisebb mértékben befolyásolják: a nem-klasszikus congenitalis adrenalis hyperplasia gyakorisága egyes régiókban 0,1–0,5%-ot is elérheti [Hannah-Shmouni 2017].

Munkacsoportunk korábban a CYP21 gén 25 SNP-jének egymáshoz, illetve a környező, nagyobb kiterjedésű haplotípusokhoz viszonyított kapcsolttságát elemezte [Blaskó 2009]. Érdekes, hogy a génen belül az egyes SNP-k között szoros kapcsolttság nem figyelhető meg, ugyanakkor bizonyos polimorfizmusok valamely allélja mégis szignifikánsan kapcsolt távolabbi régiók egyes variánsaival. Ez a látszólagos ellentmondás a polimorfizmusok jelentősen különböző korával magyarázható. Az rs6466 SNP T allélja, valamint az rs1058152 T változata az ősi, 8.1-es haplotípus része, míg az rs1040312, rs1040311, rs6465 és rs6461 SNP-k a C4B-t nem tartalmazó RCCX modullal mutattak szignifikáns összefüggést. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy ez a tanulmány egészséges személyek mintáit elemezte, ezek a variánsok többsége tehát (súlyos) congenitalis adrenalis hyperplasiát nem okoz. Az összefüggés ugyanakkor a betegséget okozó variációk és a C4-génszám között is megfigyelhető. Egy 127 beteget vizsgáló kutatás eredményi szerint az egészséges populációra 61%-os gyakorisággal jellemző 4 C4 kópia a páciensek csupán 39%-ban figyelhető meg, az egyik leggyakoribb patogén, missense mutáció (rs6471) pedig szoros asszociációt mutat az 5, illetve 6 C4-génszámmal [Chen 2012].

A doktori műben részletesen elemzi a különböző polimorfizmusok kimutatására használható módszerek jellegzetességeit, és több közleménye is ezek beállítására vonatkozik. Napjainkban e módszerek többsége az újgenerációs szekvenálás térnyerésével viszonylag háttérbe szorult. Mi a véleménye, vannak még olyan körülmények, amelyekben e korábbi módszereket napjainkban is érdemes alkalmazni, illetve lehet-e előnyük az újgenerációs szekvenálással szemben?

Az újgenerációs szekvenálás széleskörű elterjedése napjainkban valóban lehetővé teszi akár a teljes genom (vagy exom) viszonylag gyors meghatározását elérhető költségek mellett. A technika olyan szintű előrelépés a DNS- és RNS-szekvenálás terén, ami talán már nem is csupán villámgyors fejlődést, hanem inkább szemléletváltást jelent. A módszer ugyanakkor mégis több, munka- és időigényes, valamint költséges lépésből áll a DNS-könyvtár elkészítésétől a

bázissorrend meghatározásán keresztül a rengeteg rövid (önmagában értelmezhetetlen) szekvencia bioinformatikai elemzéséig, s mindehhez természetesen olyan berendezésre is szükség van, ami egy kisebb kutató vagy akár klinikai laboratóriumban nem áll rendelkezésre. Mindezek miatt azokban az esetekben, amikor egy vizsgálat célja csupán egy rövid génszakasz elemzése, vagy egy, illetve néhány variáns genotípusának meghatározása, egyszerűbb, gyorsabb, olcsóbb, és általában elérhetőbb a hagyományosabb eljárások alkalmazása. Egy 2023-ban megjelent összefoglaló közlemény a restrikciós endonukleázokon, illetve egyéb innovatív, szekvencia-specifikus emésztésen alapuló eljárásokat mutat be, és beszámol arról, hogy ezek hatékonyan alkalmazhatók a korai diagnosztika, vagy pl. esetleges gyógyszerrezisztencia monitorozása során [Darbeheshti 2023]. Szükséges lehet egyetlen báziscsere elemzése a rekombináns DNS-ek irányított mutagenézissel történő módosítása során, ami a legtöbb laboratóriumban elérhető eszközökkel, valamilyen PCR-alapú technikával pár óra alatt egyszerűen és megbízhatóan elvégezhető. Noha a monogénes jellegeket és betegségeket egy génen belül sok esetben több, különböző genetikai variáció okozhatja, mégis gyakori, hogy ezek közül egy vagy néhány gyakorisága kiemelkedő. Ezek célzott vizsgálata a klinikai diagnosztika gyors, hatékony eszköze lehet. Elmúlt években megjelent tanulmányok a sarlósejtes anémia kimutatására [Arishi 2021], valamint az 5-fluorouracil kezelés szempontjából alapvető jelentőségű dihidropirimidin-dehidrogenáz deficiencia vizsgálatára [Diasio 2022] alkalmazott direkt genotipizáló eljárások alkalmazásáról számolnak be. Bár nem genotipizálás, de az elmúlt években a koronavírus fertőzés gyors, hatékony, real-time PCR alapú detektálása szintén nélkülözhetetlen diagnosztikai módszerré vált. A célzott eljárások és az újgenerációs szekvenálás tehát eltérő „volumenű” analízis hatékony eszköze lehet, és megemlíthető, hogy – platformtól függően – az utóbbi esetén, a hibásan meghatározott bázisok aránya 5–10% is lehet, aminél a célzott genotipizáló módszerek és a Sanger-szekvenálás megbízhatóbb eredményt ad.

A miR-185 és a WFS1 variánsai közötti funkcionális kapcsolatot vizsgálta-e, illetve vannak erre már adatok?

A miRdSNP adatbázis szerint a miR-185 nem áll kapcsolatban a *WFS1* génnel, illetve a benne található polimorfizmusokkal. A miRNASNP adatbázisban megtalálható a miR-185 és a *WFS1* rs9457 közötti kölcsönhatás, emellett szerepel benne az rs1046322 és a miR-668 kapcsolata is. Nem ritka, hogy a különböző adatbázisok között hasonló ellentmondások mutatkoznak, ami nem feltétlen hiba, hanem sok esetben azzal magyarázható, hogy az egyes adatbázisok más-más forrásokon, predikciós eljárásokon alapulnak. Saját elemzésünk szerint a miR-185 kötődhet a *WFS1* gén 3' UTR-éhez, a mikro-RNS seed szekvenciájának azonban csak 6 nukleotidja komplementer az mRNS-sel, ami magyarázhatja azt, hogy ez a kölcsönhatás egyes adatbázisokban nem lehetséges fel. Ebben a régióban helyezkedik el az rs9457 polimorfizmus, melynek G alléja a komplementaritást tovább rontja, és saját eredményeink alapján luciferáz riporter rendszerben több mint 50%-os expresszió emelkedést eredményez. A szakirodalomban a miR-185 és a *WFS1* variánsaival kapcsolatban további tanulmány nem található. Egy korábbi elemzés [van de Bunt M 2013] ugyanakkor a mi koncepciónkhoz hasonlóan felveti a *WFS1* mikro-RNS-ek révén megvalósuló szabályozásának szerepét a 2-es típusú cukorbetegség patogenezisében: a kutatás eredményei szerint a szigetsejtekben magas expressziót mutató mikro-RNS-ek célgénjei között nagy számban fordulnak elő a 2-es típusú cukorbetegség kandidáns génjei.

A Wolfram-szindróma kialakulásért felelős mutációk a gén mely régióit érintik, és ezek hogyan viszonyulnak a vizsgált polimorfizmusok elhelyezkedéséhez? Mi a molekuláris magyarázata a Wolfram szindrómában diabetes mellituson kívül megfigyelhető fő klinikai eltéréseknek, így a diabetes insipidusnak és a siketségnek?

Munkánk során a *WFS1* gén 20 variánsát elemeztük, melyek a gén 5' régiójában, intronokban (2., 3., 4., 6., 7. és 8.), a 8. exonban valamint a 3' UTR-ben helyezkednek el. Célunk volt a teljes

gént lefedni, ugyanakkor olyan polimorfizmusokat kívántunk vizsgálni, melyek nem járnak a gén jelentős funkcióvesztésével, és így önmagukban nem okoznak Wolfram-szindrómát. A Wolfram- (vagy DIDMOAD-) szindróma klinikai manifesztációját tekintve heterogén, a diagnózis minimális feltétele a fiatalkorban jelentkező cukorbetegség és az opticus atrófia. Gyakori emellett a siketség és a diabetes insipidus. A betegeknél változó gyakorisággal további tünetek: neurológiai rendellenességek, nistagmus, mentális retardáció, húgyúti atónia, perifériás és autonóm (kardiovaszkuláris és gasztrointesztinális) neuropátia, pszichiátriai zavarok: depresszió, verbális, illetve fizikai agresszió fordulhat elő. A szindrómát a *WFS1* gén funkcióvesztő mutációi okozzák. A génben egyértelmű mutációs gócpontot nem azonosítottak, a háttérben álló genetikai variációk a gén teljes fehérje kódoló szakaszát lefedik. Az NCBI ClinVar adatbázisa 49 Wolfram-szindrómát okozó *WFS1*-mutációt sorol fel, melyek többsége nonsense variáció, illetve kereteltolódást okozó deléció. A *WFS1* gén a wolframint kódolja, mely az endoplazmás retikulum transzmembrán fehérjéje, mely csatornaként szerepet játszik az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció szabályozásában [Osman 2003]. Ez az ER-stresszel és apoptózissal (is) összefüggésben álló alapvető molekuláris folyamat, illetve a fehérjefunkció hiányában ennek károsodása tehető felelőssé a hasnyálmirigy szigetsejtek, valamint az idegrendszer fejlődésének zavaráért, amivel a meglehetősen szerteágazó tünetek magyarázhatók.

A mikroRNS-ek működésének alapvető jellegzetessége a pleiotropia és a szinergizmus. Vizsgálataiban egy-egy kiválasztott mikroRNS kötőhely variánsainak funkcionális következményeit elemezte, de vajon ez mennyiben bír érdemi funkcionális relevanciával, ha más mikroRNS-ek kötődése nem változik? A vizsgált mikroRNS-ek mellett vannak-e adatok más mikroRNS-ek 3'-UTR kötődéséről a WFS-1, SNAP-25 génekben?

A mikro-RNS-ek és célgénjeik valóban rendkívül szerteágazó és összetett kölcsönhatásban állnak egymással. A miRTarBase adatbázis 3012 humán miRNS-t, 17 387 célgént, és közöttük több mint 4 400 000 interakciót tartalmaz, ezek a kölcsönhatások nem csupán predikción, hanem valamilyen kísérletes megfigyelésen alapulnak. Ezek a számok már önmagukban is szembeütően mutatják a mikro-RNS-ek révén megvalósuló szabályozás komplexitását, amit azonban több tényező tovább növel. A miRNASNP v3 adatbázisban 46 826 pre-miRNS kódoló szakaszban lévő SNP található, a célgénnek 3' UTR-ében lévő variációk száma pedig meghaladja a 7 000 000-t, ezek közül 6229 a mikro-RNS-ek seed szekvenciájának kötőhelyében helyezkedik el. Emellett leírták, hogy – tekintettel arra, hogy a mikro-RNS-ek jelentősen konzeráltak – megvalósulhat a vírus és a gazdasejt között is mikro-RNS által közvetített kölcsönhatás, sőt, akár a táplálékból származó mikro-RNS-nek is lehet aktív, szabályozó hatása [Perge 2017]. A miRDB adatbázis szerint a *WFS1* szabályozásában 43, a *SNAP-25* regulálásában pedig 173 különböző mikro-RNS vehet részt. Mindezt szem előtt tartva talán meglepőnek tűnhet, mégis akár egyetlen mikro-RNS hatásának megváltozása is járhat érdemi biológiai következménnyel. A mikro-RNS-ek patogén folyamatok résztvevői lehetnek, erről átfogó információt a HMDD v3.2 adatbázisban találhatunk. Az általunk is vizsgált miR-185 pl. a RhoA és a Cdc42 kifejeződésének szabályozása révén gátolja a kolorektális daganatsejtek invázióját [Liu 2011], a SOCS3 út befolyásolása révén pedig a cukorbetegség patogenezisében játszhat szerepet [Bao 2015].

Végezetül szeretném még egyszer megköszönni Dr. Igaz Péter támogató bírálatát.

Budapest, 2023. június 21.


Dr. Rónai Zsolt

Irodalom

- Arishi WA, Alhadrami HA, Zourob M. Techniques for the Detection of Sickle Cell Disease: A Review. *Micromachines* (Basel). 2021 May 5;12(5):519.
- Bao L, Fu X, Si M, Wang Y, Ma R, Ren X, Lv H. MicroRNA-185 targets SOCS3 to inhibit beta-cell dysfunction in diabetes. *PLoS One*. 2015 Feb 6;10(2):e0116067.
- Blaskó B, Bánlaki Z, Gyapay G, Pozsonyi E, Sasvári-Székely M, Rajczy K, Füst G, Szilágyi A. Linkage analysis of the C4A/C4B copy number variation and polymorphisms of the adjacent steroid 21-hydroxylase gene in a healthy population. *Mol Immunol*. 2009 Aug;46(13):2623-9.
- Chen W, Xu Z, Nishitani M, Van Ryzin C, McDonnell NB, Merke DP. Complement component 4 copy number variation and CYP21A2 genotype associations in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet*. 2012 Dec;131(12):1889-94.
- Darbeheshi F, Makrigiorgos GM. Enzymatic Methods for Mutation Detection in Cancer Samples and Liquid Biopsies. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 4;24(2):923.
- Diasio RB, Offer SM. Testing for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency to Individualize 5-Fluorouracil Therapy. *Cancers* (Basel). 2022 Jun 30;14(13):3207.
- Hannah-Shmouni F, Morissette R, Sinaii N, Elman M, Prezant TR, Chen W, Pulver A, Merke DP. Revisiting the prevalence of nonclassic congenital adrenal hyperplasia in US Ashkenazi Jews and Caucasians. *Genet Med*. 2017 Nov;19(11):1276-1279.
- Liu M, Lang N, Chen X, Tang Q, Liu S, Huang J, Zheng Y, Bi F. miR-185 targets RhoA and Cdc42 expression and inhibits the proliferation potential of human colorectal cells. *Cancer Lett*. 2011 Feb 28;301(2):151-60.
- Merke DP, Auchus RJ. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency. *N Engl J Med*. 2020 Sep 24;383(13):1248-1261.
- Osman AA, Saito M, Makepeace C, Permutt MA, Schlesinger P, Mueckler M. Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem*. 2003 Dec 26;278(52):52755-62.
- Parker HG, Kim LV, Sutter NB, Carlson S, Lorentzen TD, Malek TB, Johnson GS, DeFrance HB, Ostrander EA, Kruglyak L. Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science*. 2004 May 21;304(5674):1160-4.
- Perge P, Nagy Z, Decmann Á, Igaz I, Igaz P. Potential relevance of microRNAs in inter-species epigenetic communication, and implications for disease pathogenesis. *RNA Biol*. 2017 Apr 3;14(4):391-401.
- van de Bunt M, Gaulton KJ, Parts L, Moran I, Johnson PR, Lindgren CM, Ferrer J, Gloyn AL, McCarthy MI. The miRNA profile of human pancreatic islets and beta-cells and relationship to type 2 diabetes pathogenesis. *PLoS One*. 2013;8(1):e55272.
- Wijnrocx K, François L, Stinckens A, Janssens S, Buys N. Half of 23 Belgian dog breeds has a compromised genetic diversity, as revealed by genealogical and molecular data analysis. *J Anim Breed Genet*. 2016 Oct;133(5):375-83.