

Válasz Dr. Krenács Tibor opponensi véleményére

Kedves Krenács doktor!

Először is szeretném megköszönni a dolgozatomról készített részletes és alapos bírálatát, valamint az előremutató kritikai megjegyzéseit.

Sajnálattal tapasztaltam a szövegben előforduló pontatlanságokat és elütéseket, mert sokszor és többen is megnéztük a végső dolgozatot a benyújtás előtt. Különösen fájdalmas ezt megélni akkor, amikor egy olyan intézmény doktori címére pályáztam, ami létrejöttének megalapozásakor Széchenyi István gróf azt mondta: „...*birtokos vagyok, és ha feláll oly intézet, mely a magyar nyelvet kifejtsé, mely avval segítse elő honosainknak magyar neveltetését, jószágomnak egy évi jövedelmét feláldozom reá.*”.

A dolgozat kísérletes munkáinak összefoglalójában megfogalmazott kérdésre, ami az mRNS- és a fehérjeexpresszió ellentmondásos korrelációjára vonatkozik, konkrétan, hogy milyen *epigenetikai szabályozási útvonalak aktiválódhatnak*, nem lehet egyszerűen válaszolni. Az mRNS expressziójának mértéke és különösen szignifikáns különbségek kimutatása az mRNS-expresszióban változó körülmények között manapság általánosan használt mérési technikák. Igaz ez a tumordiagnosztikában és a daganatellenes terápiák fejlesztésében is (1). Ez az mRNS-mérésekre való támaszkodás, összehasonlítva a fehérjeadatok megismerhetőségével, leginkább a viszonylag könnyű hozzáférhetőség miatt terjedhetett el (2,3). Ami azzal a látszólag ésszerű feltételezéssel párosul, hogy ha különbségeket tudunk kimutatni az mRNS-expresszióban, és ugyanakkor eltérő biológiai válaszokat detektálunk, azok a fehérje funkcionális különbségeire vezethetők vissza. Azonban az nem egyértelmű, hogy ez mennyiségi különbségeket is jelent (4). Számos tanulmány szerint a genomszintű korreláció az mRNS- és a fehérje-expressziós szint között gyenge, mindössze 40% körüli (2). Egy kifejezetten ezzel a témával összefüggő tanulmány az mRNS-ek és fehérjetermékek közötti korrelációt vizsgálta olyan mRNS-ek esetében, amelyek egy kísérleti feltételen belül differenciálisan fejeződnek ki, összehasonlítva azokkal, amelyek nem differenciálisan fejeződnek ki. Egy gén akkor differenciálisan expresszált, ha a két kísérleti körülmény között a leolvasások számában, vagy az expressziós szintekben megfigyelt különbség vagy változás statisztikailag szignifikáns. Azt találták, hogy a differenciálisan expresszálandó mRNS-ek szignifikánsan jobban korrelálnak a fehérjetermékükkel, mint a nem differenciálisan expresszálandó mRNS-ek (5). Az expressziós különbséget általában a transzkriptum és a fehérjetermék közötti szabályozási szintek eltéréseinek tulajdonítják (3). Az mRNS és a fehérje expressziója közötti összefüggést befolyásoló főbb tényezők:

- Az mRNS stabilitása és translációs hatékonysága
- A poszt-transzkripció módosítások
- A poszt-transzlációs módosítások (foszforiláció, ubikvitinizáció)
- A keletkezett fehérje stabilitása

1. Fekete T. et al. Meta-analysis of gene expression profiles associated with histological classification and survival in 829 ovarian cancer samples. *Int. J. Cancer* 131, 95–105 (2012).

2. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Gen.* 13, 227–232 (2012).

3. Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. FEBS Lett. 583, 3966–3973 (2009).

4. de Sousa Abreu R, Penalva L.O, Marcotte EM, Vogel C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. Mol. Biosyst. 5, 1512–1526 (2009).

5. Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, Smith VA. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. Sci Rep. 5:10775 (2015).

Válaszok a formai és szakmai kritikai megjegyzésekre:

Egyetértek a bírálóval, hogy jobban kellett volna hangsúlyoznom, hogy a *Bevezetés és előzetes eredmények fejezetben* bemutatott saját eredmények (1.4.4 és 1.5.1 bekezdések) is a disszertáció új megállapításai közé tartoznak. Igazából időrendi elrendezés miatt kerültek ezek az új, a PhD fokozatszerzés után keletkezett eredmények ebbe a fejezetbe, hogy jobban be tudjam vezetni az eredmények fejezetben bemutatott kísérletes munkánk hozadékait, amik folytatásai a korábbi új eredményeinknek. Valóban, a megfelelő saját cikkeinkre mutató hivatkozást többször is elhelyezhettem volna a fejezetben. A bíráló által említett 188-as és 189-es hivatkozások a munkacsoportunk korábbi eredményeire mutatnak, amik a dolgozatban bemutatott kísérleteinkben használt CD44 molekulák sejtmigrációra gyakorolt hatásaira vonatkoznak, ezért illenek azokra a helyekre, ahol szerepeltettem azokat.

A 3. ábrán a word-ről pdf-re konvertálás alatt veszték el jelek, amit nem vettem észre. A késői endoteliális prekursor sejtek (EPC-k) kifejezik a VE-kadherint (VE-kadherin+). Ugyanez igaz a 31. ábrára is, ahol a szignifikanciát jelölő csillagok tűntek el.

A 17-es ábrán a HIF-1 α fehérje szabályozásában résztvevő molekulák nagy száma miatt csak ekkora méretben tudtam bemutatni a teljes folyamatot. Valóban, a kisebb nevek nem nagyon látszanak a nyomtatásban.

A 27-es ábrán valóban anti-CD44v3 antitesttel történt a kezelés, ezért pontosabb lett volna azt írni az oszlop alá, mint az ott szereplő CD44v3-at. De az ábra címében a helyes formulát használtam.

Az 54-es ábrán, ahol a roncsolt ereket mutatom, azért szerepelt a kisebb nagyítás a dolgozatban, hogy jobban tudjam szemléltetni a nem szabályos lefutású erek arányát a kezelés után.

A 30-as ábrán a sejtek mozgásának változását mutatom többféle kísérletes elrendezésben. Az 'A' panelen a sejtek normoxiás alapmozgékonyasága szerepel normoxiás körülmények között. Látszik, hogy a két vastagbélrák-sejtvonal (HT25, HT29) nem nagyon motilis, míg a három másik igen. Hipoxiában (1% és 5% oxigénszinteken) mind a Boyden-kamrás mérések ('B' panel), mind a videomikroszkópos kiértékelések ('C' és 'D' panelek) azt mutatták, hogy a három jobban mozgó sejtvonal fokozott migrációs aktivitással válaszolt a csökkent oxigénszintre. A 'C' és 'D' paneleken ezt úgy lehet leolvasni, hogy az 1-es értékhez képest (ez a normoxiás motilitási mérték) felfelé mozdult-e a görbe. Ez a három jól mozgó sejtvonalnál egyértelmű, míg a két, kevésbé mozgékony sejtvonalnál az 1-es érték körül volt a görbe lefutása a teljes kísérlet alatt (24 óra normoxia + 72 óra hipoxia, amiből a 3. 24 órát mutatják az ábrák). Az is látszik, hogy az 1%-os oxigénszint a HT168-M1 humán melanóma-

sejtvonal mozgását még jobban fokozta, mint az 5%, ugyanakkor a fibroszarkóma (HT1080) és a fej-nyaki laphámrák (PE/CA-PJ15) vonalaknál már nem volt további emelkedés a motilitásukban a még kisebb oxigéntenzióban.

A módszerekkel kapcsolatos megjegyzésekben a bírálónak igaza van a biotin korszerűtlenségével kapcsolatosan (1). És valóban az is igaz, hogy a bemutatott vizsgálatok hosszú időre nyúlnak vissza, ezért is szerepelnek biotinos tesztek azokban. De megjegyzem, hogy az immunfestések alkalmával mindig van negatív kontroll is a tesztekben, ahol a primer antitestet vagy kihagyjuk a lépésekből, vagy izotípuskontrollal helyettesítjük, viszont az előhívó rendszer azokra a mintákra is rákerül, benne a biotinos konjugátumokkal. Így, amennyiben a negatív kontrollokban is detektálunk jelet, akkor azt a tesztet nem vesszük bele az eredmények kiértékelésébe.

2. Teljes mértékben igaza van a bírálónak, elírás történt a szövegben, az antitesteket természetesen $\mu\text{g/ml}$ dózisban használtuk, nem mg/ml -ben.

3. A sejtek fehérjekifejező képességének megváltoztatására alkalmazott shRNS-technikák mindig komoly beavatkozást jelentenek a sejtek biológiai viselkedésébe. Ez gyakran a sejtsztódás vagy az anyagcsere egyes lépéseink megváltozásával jár, de megmutatkozhat a sejtek egyéb tulajdonságainak változásában is. Ráadásul egy *in vivo* metasztázismodell nagyon bonyolult tesztrendszer, rengeteg sejten kívüli paraméter is befolyásolja azt. Ezért az nem meglepő, hogy a vizsgálatunkban a transzfektált sejtek áttétképző képessége is megváltozott a kontroll sejtekhez képest. Azonban az világosan kimutatható volt, hogy míg a hamis shRNS-el transzfektált kontroll sejtekben a hipoxia mimikálása (CoCl_2 -kezelés) a nem transzfektált kontroll sejtek esetében tapasztaltakkal egyezően fokozta az áttétképzést, a HIF-csendesített sejtekben ez nem volt megfigyelhető. Ez számunkra elég bizonyítékot jelent arra, hogy a HIF-nek szerepe van a folyamatban.

4. A 40. ábrán a két panel relatív expressziós adatai nem összehasonlíthatók. A tumorsejtek humán eredetűek, a gazdaszervezet pedig egér. Ennek megfelelően a VEGF relatív expressziójának meghatározásához különböző primereket használtunk a fajoknak megfelelően mind a VEGF-szint, mind a háztartási gének (β -aktin) meghatározásához (3.15.5 bekezdés). A primerek fajspecifitását az inzertek mutatják, egyik sem adott keresztamplifikálást. Azonban, mivel az egyes primereknek az amplifikációs határértéke akár jelentősen is eltérhet, ebben a vizsgálatban csak az egy panelen belüli összehasonlításoknak van értelmezhető üzenete. Azaz azt tudjuk megmondani, hogy mind a két mintában (humán tumorsejt és egér gazdaszövet) az rHuEPO-kezelés csökkentette a fajspecifikus VEGF expresszióját, amiből arra következtetünk, hogy a hipoxia mértékét is.

5. A hipoxia hatása az egyes sejtbioológiai jelenségekre nagyon ellentmondásos. Ahogy a dolgozatban is szerepelt, kis túlzással szinte mindent és azoknak az ellenkezőjét is leírták különböző sejteken, eltérő módszereket alkalmazva. Igaz ez a sejtek proliferációjára gyakorolt hatásra is. Nem gondolom, hogy a tumorsejtek szöveti eredete alapján lenne különbség a proliferációs válaszban, inkább egyedi különbségek játszhatnak benne szerepet. Ráadásul az is látszik a táblázatban, hogy az említett HT1080 humán fibroszarkóma-sejtvonal az 5%-os oxigénre szignifikáns proliferációfokozódással válaszolt, ugyanakkor az 1% oxigén már jelentősen csökkentette azt. Így még egy sejtvonal esetében sem lehet általános következtetést levonni.

6. A tumorheterogenitás és a mintavételezés kérdése nem csak a kutatásban, de a diagnosztikában is kulcsfontosságú probléma. Ráadásul nem csak térben, de időben is heterogének a tumorok, a tulajdonságok (leggyakrabban az expressziós mintázatok) a kezelés hatására is változhatnak, sőt a primer daganat jellemzéséből nem lehet biztos következtetést levonni az áttétek sajátosságaira. Az 55-ös ábrán bemutatott eredmények tüdőadenokarcinómás betegek bronchoszkópos kefe mintáinak feldolgozását mutatják kvantitatív RT-PCR-rel. Az ilyen minták esetében technikai okok miatt vagy nem tudunk egy daganat több területéről mintát venni, vagy a megterhelés miatt nem is lehet azt kivitelezni. Viszont az ép területekből vett minták EPOR-expressziós mintázatának heterogenitása nem csak a mi megfigyelésünk volt. Egy *in silico* vizsgálatot bemutató közleményben több mint 30 féle daganat esetében hasonlították össze a normális és a tumorsejtekben mért EPOR-szinteket a Genotype-Tissue Expression (GTEx) és a The Cancer Genome Atlas (TCGA) adatbázisok alapján (1). Az eredmények azt mutatták, hogy a tüődaganatokban alacsonyabb az EPOR-expresszió más szervekhez képest, de a mi megfigyelésünknek megfelelően a magasabb EPOR-expresszió pozitívan korrelált a betegség kimenetelével.

1. Zhang Y, Wang S, Han S, Feng Y. Pan-Cancer Analysis Based on EPOR Expression With Potential Value in Prognosis and Tumor Immunity in 33 Tumors *Front Oncol* 2022 Mar 14;12:844794.

Válaszok a további kérdésekre:

1. *A migrációs kísérleteknél felmerül a kérdés, hogy vajon, más szubsztráton csak a migráció sebessége változik, vagy egyes alapvető jelek is módosulhatnak, akár 2D akár 3D modellben?*

Elméletünk szerint, amely korlátlan sikló mozgást biztosít minden egyes sejt számára, függetlenül azok eredetére, az adhézións plakkok elrendezése és dinamikája, valamint az aktin citoskeleton szerkezete a mozgás során független a felszíntől, annak borításától. Az egyértelmű, hogy a letapadási pontok molekuláris összetétele (integrinek, vagy más ECM receptorok jelenléte) függ a tényleges aljzattól, és ezért eltérőek lehetnek a különböző szubsztrátokon, azonban az alapstruktúra, az aktin citoskeleton kihorgonyozása az adhéziókhoz változatlan marad. De természetesen például a mozgás sebessége változhat különböző szubsztrátumokon, többek között azért is, mert más típusú/erősségű kapcsolatok alakulnak ki, amelyek megszüntetése is eltérő lehet. Így az adhéziók felépülése és lebomlása befolyásolhatja a sejtmozgás sebességét. Mi is láttunk különbségeket a Boyden-kamrás (3D) és a felszínen történő (2D) mozgásos kísérleteinkben a sejtek sebességében, vagy a mozgó sejtek számában az eltérő szubsztrátok (fibronektin, kollagén I, Matrigel) alkalmazása során, azonban az adhéziók dinamikája és az aktinhálózat szerkezete a mozgások során egyforma volt.

2. *A magas EPOR expresszió klinikai daganatokban jobb túléléssel járt. Mi lehet ennek az oka, hiszen a tumorsejt potenciálisan kaphat túlélési jeleket ezeken keresztül EPO kezelés hatására.*

Ez az eredmény minket is meglepett egy kicsit. Nekünk is az volt a feltételezésünk, hogy a magasabb EPOR-expresszió valószínűleg negatívan befolyásolja a betegség kimenetelét különösen az exogén EPO-kezelés alatt. Ezt számos irodalmi adat is sugallta, vagy alátámasztotta (2-6), ugyanakkor más publikációk azt mutatták, hogy vagy nincs hatása az

EPO-kezelésnek a daganatok progressziójára, vagy pozitívan hat arra (7-9). A korábban említett *in silico* vizsgálatban (1) ugyanakkor megerősítették a mi megfigyeléseinket: a magasabb EPOR-expresszió pozitívan korrelált a betegség kimenetelével tüdő-adenokarcinómában. Sajnos ezekben az említett publikációkban, és nekünk sincs megfelelő magyarázatunk a jelenség hátterére. Valószínűsíthető, hogy a megfigyelések mögött más olyan molekuláris mechanizmusok vannak, amelyek, az EPOR-expressziótól akár függetlenek is lehetnek, és az EPOR kifejeződése nem biztos, hogy korrelál azokkal.

2. Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K, Verma A: Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res.* 61 (9), 3561–3565 (2001).
3. Batra S, Perelman N, Luck LR, Shimada H, Malik P: Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 83 (10), 1477–1487 (2003).
4. Arcasoy MO, Jiang X, Haroon ZA: Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307 (4), 999–1007 (2003).
5. Yasuda Y, Musha T, Tanaka H, Fujita Y, Fujita H, Utsumi H, Matsuo T, Masuda S, Nagao M, Sasaki R, Nakamura Y: Inhibition of erythropoietin signalling destroys xenografts of ovarian and uterine cancers in nude mice. *Br. J. Cancer.* 84 (6), 836–843 (2001).
6. Leyland-Jones B, BEST Investigators and Study Group: Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol.* 4 (8), 459–460 (2003).
7. Gołab J, Olszewska D, Mróz P, Kozar K, Kamiński R, Jalili A, Jakóbisiak M: Erythropoietin restores the antitumor effectiveness of photodynamic therapy in mice with chemotherapy-induced anemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8 (5), 1265–1270 (2002).
8. Thews O, Kelleher DK, Vaupel P: Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in cyclophosphamide cytotoxicity in rat tumors. *Cancer Res.* 61 (4), 1358–1361 (2001).
9. Mittelman M, Neumann D, Peled A, Kanter P, Haran-Ghera N: Erythropoietin induces tumor regression and antitumor immune responses in murine myeloma models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (9), 5181–5186 (2001).

3. *Hogyan magyarázható, hogy elsősorban az LMWH gátolta mind tüdőben, mind májban a tumorkolonizációt az UHF-hez képest, az inváziós képességet mégis az UHF csökkentette jobban?*

Az UFH, LMWH, de még az általunk tesztelt poliszacharidok (dp4-22) is keverékek. Az ilyen anyagok hatásmechanizmusai nagyon nehezen prediktálhatók, és a kezelések hatására fellépő jelenségek nehezen magyarázhatók. Így van ez más, „élő eredetű” anyagokkal is, ahol, ha megpróbáljuk mind jobban kitisztítani az aktív hatóanyagot, akkor gyakran elveszítjük a várt (és a keverékben még megjelenő) hatást. Alapvetően a vizsgált anyagoknál ugyanazokat a hatásmehanizmusokat feltételeznénk, de a frakcionálással más keverékek állnak elő, amik akár jelentősen is különbözhetnek az összetevők arányaiban, ezáltal a hatásuk is eltérő lehet. Ráadásul az *in vitro* kapott eredmények akár nagyon is eltérhetnek az *in vivo* vizsgálatokban tapasztaltaktól, köszönhetően a teljesen más környezet hatásainak.

4. *Hogyan hatott a kiegészítő rHuEPOa, vagy a kobalt klorid kezelés a SCID egerek életminőségére (súlyvesztés, kedélyállapot, mozgékonyosság, állatok elvesztése stb...), ill. végeztek-e túlélési vizsgálatokat ezekben a modelleken?*

Az rHuEPO-kezelés esetében sem *in vitro*, sem *in vivo* nem láttunk mellékhatásokat. A CoCl₂-ot eltérő szöveti eredetű (HT29: humán kolonkarcinóma, HT168-M1: humán melanóma) tumorsejteken teszteltük többféle koncentrációban és időtartamban *in vitro*. Ugyan a különböző sejteken eltérő koncentrációban, de tapasztaltunk proliferációgátlást. 300 µM-tól kezdve felező dózisban, 72 óra után a 150 µM dózisonál a sejtek 67- (HT29) illetve 106%-a (HT168-M1) élt a kontrollhoz képest, 300 µM-nál 42- (HT29) illetve 54% (HT168-M1). *In vivo* 200 mg CoCl₂/liter ivóvíz *ad libitum* adagolása 3 hétig ajánlott. Ezt követően az intesztinalis mukóza sérülését (áteresztő képességének növekedését) tapasztaltuk. Egyes egereknél a májon kisebb (pár mm) nekrotikus területeket is láttunk. A CoCl₂-nak hatása van a kalciumszintre a sejtekben (10,11), ezért a krónikus, vagy a magas dózisú kezelés mindenképp mellékhatásokkal jár.

10. Niwa M, Aoki H, Hirata A, Tomita H, Green PG, Hara A. Retinal Cell Degeneration in Animal Models. *Int J Mol Sci.* 2016 Jan 15;17(1):110.

11. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2015 Sep;5(5):378-89.

5. *Az 5. táblázatban pro-angiogénként említi egymás mellett az MMP-eket és TIMP-eket, ahol utóbbi, előbbi antagonistája. Mi a magyarázat mégis közös pro-angiogénikus hatásukra?*

A mátrix-metalloproteinázok (MMP-k) egy széles spektrumú, sokféle enzimet magában foglaló gyűjtőfogalom, amelybe kollagenázok, zselatinázok, matrilizinek, stromelizinek, membránkötött MMP-k és egyéb molekulák tartoznak (12). Ezek aktiválása előalakokból történik (proMMP-k), általában proteolitikus hasítással, de lehet egyéb vegyületekkel is aktiválni azokat. A proteolitikus aktiválás is egy többlépcsős folyamat, amelyben egyéb szabályozók, köztük a TIMP-ek (tissue inhibitor of metalloproteinases) is részt vesznek, amelyek a nevükből következően alapesetben gátolják az MMP-k aktivitását, ráadásul elég széles spektrumban (13). Azonban léteznek olyan útvonalak, ahol pl. a TIMP2 kötése a monomer MT1-MMP-hez gátolja annak funkcióját, ugyanakkor a dimer esetében elengedhetetlen a proMMP2 kötéséhez és katalitikus vágásához az MT1-MMP által. Tehát ezzel részt vesz az MMP aktiválásában (14,15). Ezen felül leírták a TIMP-ek MMP-független aktivitását is több folyamatban (12), amelyek áttételesen elősegíthetik az angiogenezist. Ilyen például az, hogy a TIMP1 fokozza a VEGF-termelést, ami aberráns neovaszkulátúra kiépülését eredményezi (13). De valóban, ez egy adaptált táblázat volt több publikált hasonló táblázatokból, és én magam is inkább az angiogenezis gátlóihoz tenném a TIMP-eket.

12. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003 May 2;92(8):827-39.

13. Salah NR. Vascular endothelial growth factor (VEGF), tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and nail fold capillaroscopy changes in children and adolescents with Gaucher disease; relation to residual disease severity. *Cytokine.* 2020 Sep;133:155120.

14. Suzuki K, Kan CC, Hung W, Gehring MR, Brew K, Nagase H. Expression of human pro-matrix metalloproteinase 3 that lacks the N-terminal 34 residues in *Escherichia coli*: autoactivation and interaction with tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1). *Biol Chem.* 1998;379:185–191.

15. Knäuper V, Bailey L, Worley JR, Soloway P, Patterson ML, Murphy G. Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13. *FEBS Lett.* 2002;532:127–130.

6. *Mik azok az ön által kutatott migrációs molekuláris mechanizmusok, melyek potenciális befolyásolhatók lehetnek terápiásan jelentősebb mellékhatások nélkül a tumor migráció és áttétképződés gátlására?*

A migráció gátlására három folyamatot tudok elképzelni, amelyek mindegyikére vannak példák és erőfeszítések. Blokkolhatjuk a sejtek adhézióit, az extracelluláris tér bontásában résztvevő enzimeket, valamint a sejtek mozgásának szabályozásában kulcsszerepet játszó molekulákat, elsősorban a kis G-protein fehérjéket (RhoA-Rac1-cdc42) (16-17). Úgy tűnik, hogy a legígéretesebb célpont a Rac1 molekula lesz, amelynek lehetséges gátlásával mi is foglalkozunk. A Rac1 az egyik legfontosabb tagja a Rho GTP-ázoknak, mely többek között szabályozza a sejtadhéziót, a morfológiát és a sejtmozgást is (18,19). A Rac1 fokozott expresszióját figyelték meg emlő-, tüdő-, vastagbél-, gyomor-, prosztatata- és májrákokban (20-24). Korábbi közleményünkben HT168-M1 melanóma- és HT1080 fibroszarkóma-sejtvonalak esetében mi is tapasztaltuk ezen kis G-fehérjék megemelkedett expresszióját hipoxiás körülményekben, mely jól korrelált ezen sejtek megemelkedett migrációs képességével (25). Számos Rac1-et célzó molekula van fejlesztés alatt (26-31), de klinikai hatékonyságuk még nem igazolódott, ezért a jelenleg elérhető gátlószereknel hatékonyabb inhibitorokra lenne szükség.

16. Dominiak A, Chełstowska B, Olejarz W, Nowicka G. Communication in the Cancer Microenvironment as a Target for Therapeutic Interventions. *Cancers (Basel)*. 2020 May 14;12(5):1232.

17. Meirson T, Gil-Henn H. Targeting invadopodia for blocking breast cancer metastasis.

Drug Resist Updat. 2018 Jul;39:1-17.

18. Karlsson, R., Pedersen, E.D., Wang, Z., and Brakebusch, C. (2009). Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1796, 91–98. 10.1016/j.bbcan.2009.03.003.

19. Maldonado, M.D.M., Medina, J.I., Velazquez, L., and Dharmawardhane, S. (2020). Targeting Rac and Cdc42 GEFs in Metastatic Cancer. *Front Cell Dev Biol* 8, 201. 10.3389/fcell.2020.00201.

20. Leng, R., Liao, G., Wang, H., Kuang, J., and Tang, L. (2015). Rac1 expression in epithelial ovarian cancer: effect on cell EMT and clinical outcome. *Med Oncol* 32, 329. 10.1007/s12032-014-0329-5.

21. Wang, P., Liu, G.-Z., Wang, J.-F., and Du, Y.-Y. (2020). SNHG3 silencing suppresses the malignant development of triple-negative breast cancer cells by regulating miRNA-326/integrin $\alpha 5$ axis and inactivating Vav2/Rac1 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 24, 5481–5492. 10.26355/eurrev_202005_21333.

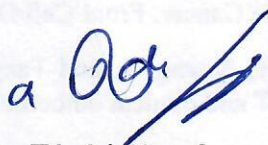
22. Xia, L., Lin, J., Su, J., Oyang, L., Wang, H., Tan, S., Tang, Y., Chen, X., Liu, W., Luo, X., et al. (2019). Diallyl disulfide inhibits colon cancer metastasis by suppressing Rac1-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Onco Targets Ther* 12, 5713–5728. 10.2147/OTT.S208738.

23. Wu, Y., Zhao, Y., Huan, L., Zhao, J., Zhou, Y., Xu, L., Hu, Z., Liu, Y., Chen, Z., Wang, L., et al. (2020). An LTR Retrotransposon-Derived Long Noncoding RNA IncMER52A Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression by Binding p120-Catenin. *Cancer Res* 80, 976–987. 10.1158/0008-5472.CAN-19-2115.

24. Venugopal, S.V., Caggia, S., Gambrell-Sanders, D., and Khan, S.A. (2020). Differential roles and activation of mammalian target of rapamycin complexes 1 and 2 during cell migration in prostate cancer cells. *Prostate* 80, 412–423. 10.1002/pros.23956.
25. Tátrai, E., Bartal, A., Gacs, A., Paku, S., Kenessey, I., Garay, T., Hegedűs, B., Molnár, E., Cserepes, M.T., Hegedűs, Z., et al. (2017). Cell type-dependent HIF1 α -mediated effects of hypoxia on proliferation, migration and metastatic potential of human tumor cells. *Oncotarget* 8, 44498–44510. 10.18632/oncotarget.17806.
26. Levay M, Krobert KA, Wittig K, Voigt N, Bermudez M, Wolber G, et al. NSC23766, a widely used inhibitor of Rac1 activation, additionally acts as a competitive antagonist at muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;347:69–79.
27. Montalvo-Ortiz BL, Castillo-Pichardo L, Hernández E, Humphries-Bickley T, De la Mota-Peynado A, Cubano LA, et al. Characterization of EHop-016, novel small molecule inhibitor of Rac GTPase. *J Biol Chem*. 2012;287:13228–38.
28. Yu M, Gong D, Lim M, Arutyunyan A, Groffen J, Heisterkamp N. Lack of bcr and abr promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *PLoS One*. 2012;7:e49756.
29. Cardama GA, Comin MJ, Hornos L, Gonzalez N, Defelipe L, Turjanski AG, et al. Preclinical development of novel Rac1-GEF signaling inhibitors using a rational design approach in highly aggressive breast cancer cell lines. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014;14:840–51.
30. Trebucq LL, Cardama GA, Lorenzano Menna P, Golombek DA, Chiesa JJ, Marpegan L. Timing of Novel Drug 1A-116 to Circadian Rhythms Improves Therapeutic Effects against Glioblastoma. *Pharmaceutics*. 2021;13.
31. Hampsch RA, Shee K, Bates D, Lewis LD, Désiré L, Leblond B, et al. Therapeutic sensitivity to Rac GTPase inhibition requires consequential suppression of mTORC1, AKT, and MEK signaling in breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8:21806–17.

Végezetül még egyszer köszönöm az alapos bírálatot, kérem, fogadja el a válaszaim!

2023. 06. 25.



Dr. Tóvári József