

Válaszok Dr. Széll Márta professzor asszonynak, az MTA doktorának doktori értekezésem bíráltnak feltett kérdéseire

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Széll Márta professzor asszonynak, a MTA doktorának a dolgozatom bírálatára szánt idejét és a rendkívül alapos és precíz bírálatot. Az elismerő szavak különösen sokat jelentenek számomra. Sajnálom a bennrekedt formai hibákat, melyekért elnézést kérek.

Válaszaim a kérdéseire a következők:

1) Jelölt a 10. oldalon a Bevezetés részben (3. bekezdés utolsó mondata) azt írja, hogy a vezikulák miRNS tartalma valószínűleg membránreceptorokon keresztül kerül be a befogadó sejtekbe. Milyen specificitással rendelkeznek azok a membrán receptorok, amelyek ezt a funkciót ellátják, és milyen mechanizmust igényel a miRNS-ek befogadó sejtek általi felismerése és internalizációja? Kérem a Jelöltet, hogy ezt röviden ismertesse.

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) különböző mechanizmusok révén internalizálódnak a befogadó sejtekbe, lehetővé téve a bioaktív molekulák átadását, amelyek befolyásolhatják a sejtek működését. Az EV-k főbb internalizációs útvonalai a következők:

Az **endocitózis** egy gyűjtőfogalom, a molekuláris internalizációs útvonalak egész sorát foglalja magában és a legjellemzőbb folyamat az EV-k internalizációjában.

A **klatrin-közvetített endocitózis** során klatrinnal bevont vezikulák felvétele történik, amelyek a klatrin mellett számos transzmembrán receptort és ligandumokat tartalmaznak. Ezek a klatrin bevonatú vezikulák struktúrálisan deformálják a membránt, amely egy vezikuláris behúzódat formál, mely azután lecsípdődik. Az ezt követő intracelluláris vezikulum klatrin bevonata lebontásra kerül, majd összeolvad az endoszómával, ahol tartalma kiürül.

Hasonló folyamat a **kaveolin-mediált endocitózis** is. A kaveolák a sejtmembrán apró bemélyedései, amelyek a klatrin által létrehozott behúzóadásokhoz hasonlóan képesek a sejt belsejébe jutni. Ezek a kaveolák speciális membránterületeken, úgynevezett glikolipidraft-okban találhatóak, és sok bennük a kaveolin nevű fehérje (például a Caveolin-1), ami szükséges a kialakulásukhoz. Ezek a fehérjék csoportosan helyezkednek el ezeken a területeken.

Lipidraft-mediált internalizáció. A lipidraftok a plazmamembrán bizonyos, speciális területei (mikrodoménjai), melyeket megváltozott foszfolipid-összetétel jellemez. Ezek a membránterületek gazdagok koleszterinben és szfingolipidekben, például szfingomielinben. Szervezőközpontként működnek a különböző jeltávíteli útvonalakban szerepet játszó molekulák összeszereléséhez, befolyásolják a membrán fluiditását és közvetítik a membránfehérjék mozgását. Az EV-k kölcsönhatásba léphetnek a lipidraftokkal, s ez a mechanizmus gyakran kapcsolódik mind a klatrin-, mind a kaveolin-mediált endocitózishoz.

Egy másik lehetséges internalizációs mechanizmus az EV-membrán és a sejt plazmamembránjának **közvetlen fúziója**, melynek eredményeképp a EV tartalma direkt a citoplazmába kerülhet. Ebben a folyamatban is speciális fehérjék, például ún. SNARE fehérjék és kofaktoraik az SM fehérjék, vagy Rab-

fehérjék vesznek részt. Bár a legtöbb kutatás szerint az EV-k elsősorban endocitózis révén kerülnek a sejtekbe, egyes közlemények a fúziós mechanizmus lehetőségét is felvetik.

Fagocitózis. A sejtek ezzel a folyamattal nagy részecskéket, köztük EV-ket nyelhetnek el úgy, hogy a plazmamembránjuk kinyúlik és körbezárja a célt, majd fagoszómát képez. Ez a mechanizmus különösen a makrofágokhoz hasonló specializált sejtekre jellemző, amelyek a sejten kívüli anyagok eltávolítására szolgálnak.

Ezek a különböző internalizációs útvonalak rávilágítanak arra, hogy az EV-k felvétele összetett folyamat, és hogy az EV-k és a befogadó sejtek közötti kölcsönhatást több paraméter is befolyásolhatja.

Sejt-specifikus EV felvétel

Az EV-k sejttípus-specifikus felvétele vitatott kérdés. Egyes vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a fluoreszcensen jelölt EV-ket gyakorlatilag minden vizsgált sejttípus képes felvenni, mások szerint ez egy receptor-ligand kapcsolaton alapuló, célzott folyamat. Például hasnyálmirigy adenokarcinómából származó EV-ket leginkább a peritoneális exsudátum sejtjei internalizálták, míg a T-sejtek kevésbé, mely alátámasztja a fogadó sejttípus jelentőségét. Emellett pl. a Tetraspanin 8 (Tspan8) fehérjét tartalmazó EV-ket főként endotélsejtek és hasnyálmirigysejtek vették fel nagy mennyiségben. Bizonyos kölcsönhatások mechanizmusa is ismert: például a tejből származó EV-ket a C-típusú lektin receptor (DC-SIGN) és mucin (MUC1) molekulák közötti kapcsolat segíti a dendritikus sejtekben, míg MUC1-hiányos EV-k nem tudtak bejutni. Az Arginyl-Glycyl-Aspartát (RGD) peptid inhibitorral történő kezelés pedig az integrin-mediált internalizáció gátlásával csökkentette az EV-felvételt a makrofágokban és dendritikus sejtekben, de a mikroglia esetében nem.

Ez azt jelzi, hogy több mechanizmus felelős az EV-sejt kommunikációért, és különböző sejttípusok az EV kommunikációs stratégiák különböző kombinációit használják.

Kwok ZH, Wang C, Jin Y. Extracellular Vesicle Transportation and Uptake by Recipient Cells: A Critical Process to Regulate Human Diseases. Processes (Basel). 2021 Feb;9(2):273. doi: 10.3390/pr9020273. Epub 2021 Jan 31. PMID: 34336602; PMCID: PMC8323758.

Liu YJ, Wang C. A review of the regulatory mechanisms of extracellular vesicles-mediated intercellular communication. Cell Commun Signal. 2023 Apr 13;21(1):77. doi: 10.1186/s12964-023-01103-6. PMID: 37055761; PMCID: PMC10100201.

Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. J Extracell Vesicles. 2014 Aug 4;3. doi: 10.3402/jev.v3.24641. PMID: 25143819; PMCID: PMC4122821.

2) A dolgozat 21. oldalán (első mondat), a Bevezetés részben a veserákok előfordulásával kapcsolatosan a Jelölt azt írja, hogy az évente 2-4%-kal nő. Ez riasztó adat. Ez egy valós növekedés, amelynek a háttérében valamilyen objektív kiváltó ok van, vagy inkább annak tudható be, hogy a diagnosztikai eljárások fejlődésével nő a diagnosztizált esetek száma?

A European Association of Urology 2024-es ajánlásában leírtaknak megfelelően a vesesejtes karcinóma (RCC) előfordulása évente körülbelül 2%-kal növekszik világszerte és Európában az elmúlt két évtizedben. Ennek több oka is van:

1. Növekvő felismerési arány: A hasi képalkotó vizsgálatok szélesebb körű alkalmazása miatt egyre több apró vesedaganatot fedeznek fel véletlenszerűen (incidentálisan), ami hozzájárul az esetszám növekedéséhez. Ezt alátámasztja a kisméretű daganatok (ún. small renal mass) felismerésének magasabb aránya is.

2. Emellett azonban az ajánlás kiemeli, az **életmódbeli tényezőket**: a dohányzás, elhízás, magas vérnyomás és metabolikus szindróma igazoltan emeli a veserák előfordulási kockázatát, melyet egyértelműen mutat e daganattípus gyakoribb előfordulása az ún. fejlett országokban összehasonlítva az afrikai vagy ázsiai populációkkal.

Dohányzás: A dohányosoknál magasabb a RCC kialakulásának kockázata, a kockázati arány 1,23 és 1,58 között mozog.

Elhízás: Azoknál, akiknek a testtömegindexe (BMI) 35 felett van, 1,71-szer nagyobb a RCC kockázata, mint azoknál, akiknek a BMI-je 25 alatt van.

Magas vérnyomás: A magas vérnyomás 1,70-szeresére növeli a RCC kialakulásának kockázatát.

A metabolikus szindróma 1,62-szeres relatív kockázatot jelent a RCC kialakulására.

*Ljungberg B., Bex A., Albiges L., Bedke J., Capitanio U., Dabestani S., Hora M., Klatte T., Kuusk T., Lund L., Marconi L., Pignot G., Powles T., Tran M., Volpe A., Bonn S., Giles R.H., Abu-Ghanem Y., Campi R., Fernández-Pello Montes S., Palumbo C., Schouten N. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma- LIMITED UPDATE MARCH 2024.
<https://uroweb.org/guidelines/renal-cell-carcinoma>*

3) A 33. oldalon (4. bekezdés) a Módszerek részben a Jelölt ismertette, hogy a génexpressziós vizsgálatok kvantitálása során számos konstitutívan kifejeződő gént alkalmaztak belső kontrollként, amelyek daganattípustól függően különböztek. Volt ennek valamilyen kísérletes úton bizonyított elvi háttere? Minek tudható be a belső kontroll gének expressziós vizsgálatokban alkalmazott sokfélesége?

A belső kontrollként alkalmazott gének sokféleségének van kísérletesen bizonyított elvi háttere. A normalizáció elengedhetetlen a megbízható qPCR vizsgálatokhoz, mivel ez a folyamat kontrollálja az extrakciós hozam, a reverz transzkripció hatékonyság és az amplifikációs folyamatok variabilitását. A leggyakrabban alkalmazott normalizációs stratégia a referencia gének használata, azonban ezek alkalmazhatóságát minden esetben kísérletesen validálni kell az adott szövet- vagy sejttípus és kísérleti elrendezés függvényében.

A referencia gének eltérő kiválasztása daganattípustól függően annak tudható be, hogy az ideális referencia génnek stabil expressziót kell mutatnia az adott biológiai környezetben, és expressziós szintjeinek korrelálnia kell a minták teljes mRNS mennyiségével. Mivel különböző szövetekben és kísérleti körülmények között egyes referencia gének expressziója változhat, ezért nem létezik univerzális belső kontroll gén. Emiatt a normalizációhoz alkalmazott géneket minden vizsgálatban kísérletesen kell validálni, hogy biztosítsuk azok stabilitását az adott körülmények között.

Emellett a referencia gének nem megfelelő megválasztása félrevezető eredményekhez vezethet, ezért egyetlen referencia gén használata nem mindig elfogadható, hacsak a kutatók nem szolgálnak egyértelmű bizonyítékkal annak invariáns expressziójára az adott kísérleti környezetben. Az optimális referencia gének számát és típusát tehát minden esetben kísérletesen kell meghatározni.

A saját kísérletekben a különböző daganattípusokban teszteltük a különböző háztartási gének expresszióját és a megfelelő kombináció kiválasztásához a legtöbb esetben a NormFinder algoritmust alkalmaztuk.

Bustin SA. Improving the quality of quantitative polymerase chain reaction experiments: 15 years of MIQE. Mol Aspects Med. 2024 Apr;96:101249.

Bustin SA et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr;55(4):611-22.

Wang H et al. Tissue-specific selection of optimal reference genes for expression analysis of anti-cancer drug-related genes in tumor samples using quantitative real-time RT-PCR. *Exp Mol Pathol.* 2015 Jun;98(3):375-81.

Smith TAD et al. Selection of endogenous control genes for normalising gene expression data derived from formalin-fixed paraffin-embedded tumour tissue. *Sci Rep.* 2020 Oct 14;10(1):17258.

Andersen CL et al. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5245-50.

4) A 37. oldalon, ugyancsak a Módszerek részben, a 2. bekezdésben a Jelölt a miRNS-ek expressziós elemzésének módszeréről ír. Mi az elvi alapja az érett miRNS-ek specifikus detektálásának? Hogyan lehet elkülöníteni őket a saját előalakjaiktól, a pri- és pre-miRNS-ektől?

Más RNS species-ekhez hasonlóan a miRNS-ek detektálásának elvi alapja a kis RNS-ek specifikus szekvenciája, mely révén felismerhetők és kvantifikálhatók.

Az **érett miRNS** detektálás leggyakrabban a következő elveken alapul:

1. Specifikus hibridizáció – Komplementer próbák segítségével (pl. microarray) alkalmazásával
2. RT-qPCR (reverz transzkripció kuantitatív PCR) – Specifikus primerek és fluoreszcens jelölés (pl. SyberGreen) segítségével. Ennek a módszernek a specificitását nagyban növeli a forward és reverz primereket kiegészítő specifikus próbák alkalmazása (leggyakrabban Taqman vagy LNA próbák).
3. Újgenerációs szekvenálás (NGS) – Nagy áteresztőképességű vizsgálat az összes expresszált miRNS azonosítására/mennyiségi meghatározására. A legtöbb RNS típustól eltérően az érett miRNS-ek nukleotidjai rendelkeznek 3' hidroxilcsoporttal és 5' foszfátcsoporttal is. Ez lehetővé teszi az speciális adapterek ligációját a miRNS-ek 3' és 5' végéhez, ezáltal lehetséges az érett miRNS-ek univerzális reverz transzkripciója és könyvtárkészítése, miközben minimalizáljuk a más RNS-típusok által okozott háttérrel.

A pre- és pri-miRNS-ek detektálása szintén a specifikus szekvenciájukon alapul, és az érett miRNS-ekhez hasonlóan individuálisan a hurok, valamint a 3 és 5' régióra specifikus próbákkal célzottan lehetséges. Ez a célzott megközelítés akár közepes áteresztőképességű PCR array-ek használatára is alkalmat ad.

A miRNS előalakok nagyáteresztőképességű módszerrel (újgenerációs szekvenálással) való vizsgálata már komplikáltabb, érett miRNS-ekkel együtt detektálni őket nehézkes a méret és szerkezeti különbségek miatt.

A **pri-miRNS**-ek átlagosan 500–3000 nukleotid hosszúságúak, de esetenként több kilobázis méretűek is lehetnek, főleg, ha egy klaszterben több miRNS egyszerre íródik át. NGS-sel történő detektálásának fő kihívásai az alacsony abundancia az érett miRNS-ekhez képest, a változatos mérettartomány, a komplex másodlagos struktúrák (komplex hajtszerkezet), a sejtmagi lokalizáció, valamint, hogy akár klaszterekben egyszerre több miRNS is átíródhat egy transzkriptumon elhelyezkedve.

Az érett miRNS-ek detektálására használt kis RNS-szekvenálási (small RNA-seq) módszerekkel szemben a pri-miRNS-ek kimutatásához teljes RNS-szekvenálásra (total RNA-seq) vagy célzott hosszú olvasású RNS-szekvenálásra (long-read RNA-seq) van szükség.

A könyvtárkészítésnél az rRNS-depléción (rRNS eltávolítás) vagy a poli(A)-kiválasztás elősegíti a pri-miRNS-ek dúsítását. A teljes RNS-ből a magi RNS frakció izolálásával vagy kromatin-asszociált RNS izolálással szintén van lehetőség pri-miRNS dúsításra.

A pri-miRNS-ek globális transzkriptom vizsgálatának egyértelmű limitációja a kromatin-asszociált RNS tisztítás és a rendkívül nagy mélységben való szekvenálás szükségessége (Conrad et al.).

Amennyiben 2-300 pri-miRNS célzott könyvtár készítése és szekvenálása a cél, a költség-haszon jelentősen optimalizálható, dúsító próbák alkalmazásával.

A **pre-miRNS** detektálásának elve NGS-sel. A prekursor miRNS-ek (pre-miRNS-ek) kb. 60–70 nukleotid hosszúságú, hajtű alakú RNS-molekulák, amelyek a primer miRNS-ekből (pri-miRNS) képződnek a DROSHA komplex által végzett hasítás után.

A pre-miRNS-ek azonosítása újgenerációs szekvenálás (NGS) segítségével szintén speciális könyvtárkészítési stratégiákat igényel, mivel hosszabbak, mint az érett miRNS-ek, de rövidebbek, mint a pri-miRNS-ek; relatív alacsony abundanciájuk és másodlagos szerkezetük (hajtűforma) befolyásolhatja a reverz transzkripció hatékonyságát. A pre-miRNS-ek nincsenek poli(A) farokkal ellátva, ezért a poli(A)-alapú szelekció nem megfelelő, így rRNS-depléciónal dúsított teljes RNS-szekvenálás vagy méretszelektálással összekötött kis RNS-szekvenálás (small RNA-seq) alkalmazható.

Ebben a total RNS izolálást követően poliakrilamid gélen méretszelektálás történik, hogy 40-100 nt hosszú kis RNS-frakciót nyerjünk. Ezután kerülnek fel speciális (custom) 5' és 3' adaptorok, amelyekre a pre-miRNS-ek hajtűszerkezete miatt van szükség, ami gátolhatja a ligáció folyamatát. Ezt követően történik meg az amplifikáció, tisztítási lépések, végül a szekvenálás.

5) Az in vivo állatkísérletes módszerek ismertetésénél a Jelölt leírja (Módszerek fejezet, 45-46. oldal), hogy a szunitinib kezelések során az állatok szájon át kapták a szert, míg a szorafenib kezelés során gyomorszondát alkalmaztak a szer bevitelére. Van ennek a metodikai eltérésnek valamilyen elvi alapja? Ugyanitt ír arról a Jelölt, hogy a vizsgálat befejeztével a kísérleti állatok veséjét, máját és tüdejét gyűjtötték be immunhisztokémiai elemzés céljából? Volt-e annak valamilyen elvi oka, amiért a kísérleti állatok agyát nem vették bele a vizsgálandó szervek közé?

A szunitinib kezelés valóban *per os* történt, azonban *gavage* – tehát gyomorszonda alkalmazásával, kezelési dózis kontrollja céljából. Tehát mindkét kísérletben gombos végű *gavage* szondátú segítségével juttattuk be a hatóanyagot az állatok gyomrába naponta egyszer. Ez a módszer a gyakorlott kézben pár másodperces művelet, mely nem terheli meg az állatokat. A nem egyértelmű megfogalmazásért a dolgozatban elnézést kérek.

Az állatok feláldozását követően a szervek vizsgálatában egyik célunk a gyógyszerek esetleges toxikus hatásának vizsgálata állt, így a májra és vesére fókuszáltunk.

A másik szempont az áttétképzés volt. A vesesejtes karcinóma (RCC) esetében az áttétképződés elsősorban a tüdő, a csont, a máj és a nyirokcsomókban gyakoribbak, ritkán találunk áttétet az agy, a gyomor-bélrendszer és az endokrin mirigyek területén. A hepatocelluláris karcinóma távoli áttéteket leggyakrabban a tüdőbe, a hasi nyirokcsomókba, a csontokba, a mellékvesékbe és a rekeszizom felszínére ad. Tehát egyik daganat esetében sem elsődleges az agyi metasztázisok megjelenése.

Így összességében fő fókusz a parenchymás szervek közül a vese, máj és tüdő voltak.

Bianchi M, et al. Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: a population-based analysis. *Ann Oncol.* 2012;23(4):973–980. doi: 10.1093/annonc/mdr362

Gulati S, Barata PC, Elliott A, Bilen MA, Burgess EF, Choueiri TK, Darabi S, Dawson NA, Gartrell BA, Hammers HJ, Heath EI, Magee D, Rao A, Ryan CJ, Twardowski P, Wei S, Brugarolas J, Zhang T, Zibelman MR, Nabhan C, McKay RR. Molecular analysis of primary and metastatic sites in patients with renal cell carcinoma. *J Clin Invest.* 2024 May 30;134(14):e176230. doi: 10.1172/JCI176230. PMID: 39007269; PMCID: PMC11245151.

Sneag DB, Krajewski K, Giardino A, O'Regan KN, Shinagare AB, Jagannathan JP, Ramaiya N. Extrahepatic spread of hepatocellular carcinoma: spectrum of imaging findings. *AJR Am J Roentgenol.* 2011 Oct;197(4):W658-64.

6) A Jelölt az 50-51. oldalakon a Génontológiai, útvonal- és hálózatelemzési módszereket ismerteti, az 51. oldal 2. bekezdés utolsó mondatában azt írja, hogy a patkány transzkriptom adatok elemzéséhez a Reactome pathway génkészleteit alkalmazták. A Módszerek fejezet megelőző részeiben nem volt róla szó, hogy patkány kísérleti állatokat is használtak volna a vizsgálataikhoz. Mi volt az oka annak, hogy ezt a részt így fogalmazta meg a Jelölt?

A hypophysis neuroendokrin daganatok funkcionális vizsgálatához két patkány hypophysis sejtvonalat használtunk, mivel egészen napjainkig hypophysis daganatok modellezésére humán sejtvonala kereskedelmi forgalomban sajnos nem elérhető. Az alkalmazott két sejtvonala patkány hypophysis daganatokból származik, így a transzkriptom adatok elemzéseknél patkány génkészleteket vettünk alapul. A humán kísérletek (veserák, hepatocelluláris karcinóma, mellékvesedaganatok szövetek, endothél sejtek), valamint a xenograftok esetében, ahol humán sejtvonalat alkalmaztunk az Ingenuity, a BioCarta, a Reactome Human és KEGG humán adatbázisokat alkalmaztuk. A pontatlan megfogalmazásért elnézést kérek.

7) A 62. oldalon, már az Eredmények részben ír arról, hogy a világossejtes veserákban az ECM molekulák és a sejtadhéziós útvonalakban szignifikáns változást mutattak ki. Ezt megelőzően arról is ír, hogy a miR-124-3p hatására csökkent az ITGB1 gén expressziója. Az ECM molekulák között ki tudták-e mutatni az EDA+, úgynevezett onkofötális fibronectin expressziójának (vagy EDA+/össz fibronectin arány) változását, amely az $\alpha 5\beta 1$ integrin receptor ligandja?

Az onkofötális vagy EDA+ fibronectin a fibronectin egy speciális izoformája, mely az ún. „extra-domain A” (EDA) régiót érintő, alternatív splicing hatására keletkezik. Ez az izoforma elsősorban az embriogenezis és a fiziológiás angiogenezis folyamatában vesz részt, ezért is nevezik onkofötális formának. Emellett kimutatható olyan patológiás folyamatokban is, mint pl. a sebgyógyulás, tumorigenezis vagy neovaszkularizáció.

Az említett kísérletben 1, 2 ill. 3 miRNS transzfekcióját követően végeztünk génexpressziós profilozást microarray platformon két sejtvonalon. Az alkalmazott módszer így nem tette lehetővé a különböző izoformák detektálását, annak ellenére, hogy egy gén expresszióját több próba alkalmazásával detektálja. Tehát nincs információnk arra vonatkozóan, hogy a miR-124-3p tumorsuppresszor miRNS *in vitro* transzfekciójának hatására hogyan alakult az onkofötális FN1 expresszió. Az alkalmazott microarray módszerrel azonban az ITGB1 és a TGFB1 csökkent expressziója mellett sem az ITGA5, sem a FN1 expresszió változását nem tapasztaltuk.

Ennek ellenére az onkofötális izoforma jelentősége erősen felvethető, mégpedig a TGF β jelátvitel érintettsége miatt. Kimutatták ugyanis glioblasztómában, hogy az EDA+FN expressziója jelentősen megnövekszik a daganatok ereiben. A TGF β SMAD3- és SMAD4-függő módon indukálta az EDA+FN-t humán mikrovaskuláris endotélsejtekben és daganatokból származó endotélsejtekben.

Mivel az említett kutatásban elsősorban a tumor endothél mutatott kifejezetten magas onkofötális FN1 expressziót és mi *in vitro* csak tumorsejteket kezeltünk szintetikus miRNS-sel, adódhat a kérdés, hogy magukban a tumor szövetekben hogyan alakul ezen gének kifejeződése. Az integratív hálózatanalízishez használt világossejtes veserák génexpressziós vizsgálatok renálízisének eredményét áttekintve a FN1 és ITGA5 a 11-ből 8, az ITGB1 pedig 3 vizsgálatban mutatott átlagosan 5,8-szoros, 3,1-szeres, illetve 4-szeres expressziót a daganatmintákban a normál veseszövetekhez képest. Így valóban felvethető az onkofötális FN1 izoforma jelentősége a daganatok progressziójában. Ennek validációjához azonban speciális, izoforma-specifikus génexpressziós assay esetleg RNS szekvenálás, valamint a gyakorlatban gyakrabban használt izoforma-specifikus antitest alkalmazására lenne szükség.

Ventura E et al. TGF- β induces oncofetal fibronectin that, in turn, modulates TGF- β superfamily signaling in endothelial cells. *J Cell Sci.* 2018 Jan 9;131(1):jcs209619. doi: 10.1242/jcs.209619

8) A 70. oldalon arról ír a Jelölt, hogy immunfestéseket végeztek a szenzitív és rezisztens xenograft tumorokon, majd COX-2, E-cadherin és Pax-8 festődéseket mutat be. Mivel a β -catenin ismert kulcs molekulája az epiteliális-mezenchimális fenotípus kialakulásának, felmerül a kérdés, hogy ennek e molekulának a kifejeződését vizsgálták-e.

A β -catenin fehérjeszintű vizsgálatát nem végeztük el a szunitinib-szenzitív és -rezisztens daganatokon, mivel a transzkriptom szelvenálás eredményei alapján sem a β -catenin (CTNNB1), sem pedig az általunk vizsgált irodalmi Wnt célmolekulák (TCF1, LEF1, AXIN2, CCND1, MYC1, JUN) expressziója nem mutatott változást egyik összehasonlításban sem, amikor a kontroll-, szenzitív és rezisztens mintákat vetettük össze.

Ez alapján valószínűsíthetjük, hogy a rezisztencia kialakulásával összefüggő EMT folyamatának aktivációjában más tényezők játszanak szerepet, mint például a TGF β -, Notch-, TNF- α -, Hedgehog- és receptor tirozin-kináz jelátviteli útvonalak, illetve a miRNS-ek.

Ang HL et al. Mechanism of epithelial-mesenchymal transition in cancer and its regulation by natural compounds. *Med Res Rev.* 2023 Jul;43(4):1141-1200. doi: 10.1002/med.21948

Buyuk B et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Signaling Pathways Responsible for Breast Cancer Metastasis. *Cell Mol Bioeng.* 2021 Sep 2;15(1):1-13. doi: 10.1007/s12195-021-00694-9

Nieszporek A et al. Molecular mechanisms of epithelial to mesenchymal transition in tumor metastasis. *Acta Biochim Pol.* 2019 Dec 28;66(4):509-520. doi: 10.18388/abp.2019_2899.

Lee HM et al. Diverse pathways of epithelial mesenchymal transition related with cancer progression and metastasis and potential effects of endocrine disrupting chemicals on epithelial mesenchymal transition process. *Mol Cell Endocrinol.* 2017 Dec 5;457:103-113. doi: 10.1016/j.mce.2016.12.026

9) Nagyon értékes és a Jelölt eredményeit validáló eredménynek tartom, hogy a rezisztencia modellek vizsgálata során az integrált adatalemzésekkel azonosítani tudtak olyan miRNS-eket 8miR-663a és miR1) és azok cél génjeit (MDGA1 és FRAS1), amelyek expressziós változásai együtt mozogtak. Voltak-e további találatok, amelyek akár az általuk vizsgált tumor típusban, akár más szerzők által vizsgált tumortípusban már leírásra kerültek?

A miRNS-target keresés során olyan adatbázisokat is felhasználtunk, mint az Ingenuity Expert Findings, a miRecords és a TarBase, amelyek kurált formában tartalmazták az adott időpontig experimentálisan validált interakciókat. Kísérleti adatainkban a miRNS és RNS-szekvenálási

eredmények, valamint a miRNS-target predikciók összevetésével összesen kilenc olyan interakciót azonosítottunk, amelyeket expresszió alapján felmerültek és korábban funkcionálisan is validáltak. Ezeket magas konfidenciájúnak tekintettük, de mellettük olyan új interakciókat kerestünk további kísérletes validálásra, amelyekre eddig nem állt rendelkezésre funkcionális bizonyíték.

A korábban funkcionális kísérletekkel igazolt miRNS-mRNS interakciók, melyek potenciálisan fennállhatnak a szunitinib rezisztencia hátterében a génexpressziós eltérések fényében:

ID	Log Ratio (expression)	Source	Confidence	ID	Symbol	Log Ratio (expression)
hsa-miR-145-5p	2,225	Ingenuity Expert Findings	Experimentally Observed	ROBO4	ROBO4	-2,734
hsa-miR-146b-5p	8,598	Ingenuity Expert Findings	Experimentally Observed	IL8	CXCL8	-1,533
hsa-miR-223-3p	4,203	Ingenuity Expert Findings,TarBase,TargetScan Human,miRecords	Experimentally Observed	MEF2C	MEF2C	-1,32
hsa-let-7i-5p	8,313	miRecords	Experimentally Observed	HMOX1	HMOX1	-1,137
hsa-miR-135b-5p	5,28	miRecords	Experimentally Observed	ALOX5AP	ALOX5AP	-3,397
hsa-miR-146b-5p	8,598	miRecords	Experimentally Observed	COL13A1	COL13A1	-2,802
hsa-miR-494-3p	3,895	miRecords	Experimentally Observed	HMOX1	HMOX1	-1,137
hsa-miR-195-5p	3,339	TarBase	Experimentally Observed	HMOX1	HMOX1	-1,137
hsa-miR-30a-5p	6,31	TarBase	Experimentally Observed	WNT5A	WNT5A	-1,871

10) A 82. oldalon, a rezisztencia mechanizmusok vizsgálatai eredményeit megbeszélő részben (Megbeszélés, 15. sor) a Jelölt azt írja, hogy a sejtciklus G2/M átmenetének felgyorsulását azonosították az azt szabályozó molekulák fokozott expressziója által. Felmerül a kérdés, hogy olyan csökkent expressziójú gént nem azonosítottak, amelynek eredeti funkciója a tumor szuppresszió, és csökkent expressziójával járul hozzá a daganatképződéshez?

De igen, az alábbi tumorsuppresszor géneket azonosítottuk csökkent expresszióval, amelyek fontos szerepet játszanak a sejtciklus szabályozásában, DNS-károsodásra adott válaszreakcióban és apoptózisban, és csökkent működésük hozzájárul a daganatképződéshez:

GADD45B (Growth Arrest and DNA Damage Inducible Beta, fold change: 0,11, p=0,0001). A *GADD45B* a sejtciklus megállításában és az apoptózis indukciójában vesz részt stresszválasz esetén. Csökkent expressziója akadályozhatja a sejtek megfelelő reakcióját DNS-károsodásra, ezáltal elősegítve a genetikai instabilitást és a tumoros átalakulást.

CDKN1A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A, fold change: 0,17, p=0,0000). Az egyik legismertebb tumorsuppresszor gén, amely p21 fehérjét kódolja. A p21 a sejtciklus G1/S fázisában gátolja a CDK-ciklin komplexeket, megakadályozva a sérült sejtek osztódását. Csökkent expressziója a kontrollálatlan sejtosztódást és daganatképződést segítheti elő.

CHEK2 (Checkpoint Kinase 2, fold change: 0,64, p=0,0082). A *CHEK2* a sejtciklus ellenőrzési pontjait szabályozza DNS-károsodás esetén, foszforilálja és aktiválja a p53 fehérjét, elősegítve az apoptózist. Csökkent expressziója a károsodott sejtek túlélését és felhalmozódását eredményezheti, növelve a tumor kialakulásának kockázatát.

TP53 (Tumor Protein 53, fold change: 0,68, p=0,0026). A "genom őrének" is nevezett p53 fehérjét kódoló gén kulcsszerepet játszik a sejtciklus szabályozásában, az apoptózisban és a DNS-károsodás javításában. Csökkent expressziója a sejtek ellenőrizetlen osztódásához, genetikai instabilitáshoz és daganatok kialakulásához vezethet.

A fent említett tumorsuppresszor gének csökkent expressziója egyértelműen hozzájárulhat a daganat kialakulásához, mivel közös funkciójuk a sejtciklus szabályozása, a DNS-károsodásra adott válasz és az apoptózis indukciója. Ezek a gének normál körülmények között biztosítják, hogy a sérült vagy mutációt hordozó sejtek ne osztódjanak tovább, hanem helyreállítsák a DNS-károsodást, vagy programozott sejthalál révén eliminálódnak. Ezért csökkent expressziójuk a hypophysis daganatokban a sejtciklus ellenőrzési pontjainak diszfunkcionális működéséhez, a DNS-károsodott sejtek túléléséhez és kontrollálatlan osztódásához vezethet, ami növeli a genetikai instabilitást és elősegíti a daganatképződést.

Gong L, Cai L, Li G, Cai J, Yi X. GADD45B Facilitates Metastasis of Ovarian Cancer Through Epithelial-Mesenchymal Transition. *Onco Targets Ther.* 2021 Jan 12;14:255-269. doi: 10.2147/OTT.S281450

Patel, K., Murray, M.G., Whelan, K.A. (2022). Roles for GADD45 in Development and Cancer. In: Zaidi, M.R., Liebermann, D.A. (eds) *Gadd45 Stress Sensor Genes. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1360. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-94804-7_2

Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jun;9(6):400-14. doi: 10.1038/nrc2657.

Shamloo B, Usluer S. p21 in Cancer Research. *Cancers (Basel).* 2019 Aug 14;11(8):1178. doi: 10.3390/cancers11081178.

Nagy P, Papp J, Grolmusz KV, Bozsik A, Pócza T, Patócs A, Butz H. Pathogenic role of CHEK2 variants in Hungarian cancer patients: implications for breast cancer risk and genetic counselling. *Magy Onkol.* 2025 Mar 21;69(1):35-41

Stolarova L, Kleiblova P, Janatova M, Soukupova J, Zemankova P, Macurek L, Kleibl Z. CHEK2 Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate. *Cells.* 2020 Dec 12;9(12):2675. doi: 10.3390/cells9122675

Luo L, Gao W, Wang J, Wang D, Peng X, Jia Z, Jiang Y, Li G, Tang D, Wang Y. Study on the Mechanism of Cell Cycle Checkpoint Kinase 2 (CHEK2) Gene Dysfunction in Chemotherapeutic Drug Resistance of Triple Negative Breast Cancer Cells. *Med Sci Monit.* 2018 May 15;24:3176-3183. doi: 10.12659/MSM.907256

Chen, X., Zhang, T., Su, W. et al. Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. *Cell Death Dis* 13, 974 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05408-1>

11) Nagyon érdekes és unikális megfigyelés, hogy a Jelölt és munkatársai hipofízis onkocitómákban a miRNS-expresszió globális downregulációját figyelték meg, amelyhez egyértelműen tudták kötni a Drosha enzim csökkent mennyiségét. Van-e az irodalomban arra adat, hogy egyéb tumor(ok)ban is megfigyelhető ez az aspecifikusnak tekinthető miRNS mennyiség csökkenés, illetve a miRNS biogenezis globális zavara?

Igen, irodalmi adatok alapján a daganatok többségében megfigyelhető a miRNS-ek szintjének globális csökkenése.

Egy, a Nature-ben publikált eredeti közleményben a szerzők 217 különböző miRNS szisztematikus expressziós elemzését végezték el 15 tumortípusból származó 334 párosított tumor-normál mintán, és a miRNS-ek általános downregulációját figyelték meg a tumorokban a normális szövetekhez képest (Kumar et al 2007). Emellett, a mi eredményeinkhez hasonlóan, a miRNS-profilok jól tükrözték a daganatok differenciáltsági állapotát.

Nem világos azonban, hogy a miRNS-ek globális downregulációja és a tumorok differenciálatlan állapota között milyen ok-okozati összefüggés áll fenn. Ezt pár évvel később elemezték funkcionális DROSHA és DICER1 géncsendesítéssel. Nemcsak tüdő, de oszteoszarkóma, vastagbél- és emlőkarcinóma sejteken is a miRNS-biogenezis gátlása fokozott sejtosztódáshoz és nagyobb kolóniaképző képességhez vezetett, ami fokozott transzformációs potenciált tükrözött. Így feltételezhető, hogy összeségében a miRNS-ek globális csökkentése tehát elősegíti a daganatsejtek

átalakulását és proliferációját. Ennek megfelelően pl. ovárium karcinómás vagy neuroblasztómás betegekben a magas *DROSHA* és *DICER1* expresszió hosszabb túléléssel társult (Meritt et al 2008; Lin RJ et al. 2010).

Érdekes módon azonban nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) minták vizsgálatában amellet, hogy daganatmintákban általánosan alacsonyabb volt a miRNS-expresszió a normál szövetekhez képest, a *DROSHA* expressziója fordított összefüggést mutatott a túléléssel, azaz alacsony expressziója hosszabb medián túléléssel járt, míg a magas *DROSHA* expresszió rövidebb túléléssel állt összefüggésben (Diaz-Garcia 2013). Ennek a fordított összefüggésnek a magyarázata nem ismert.

Fontos azonban megjegyezni, hogy ahogy a biológiában sokszor a kimutatott tények ellenkezőjére is találunk példát. Sugito és munkatársai, 2006-ban nyelőcső karcinómában a miRNS biogenezis enzimjeinek emelkedett expresszióját detektálta, bár a miRNS expresszió vizsgálta nélkül (Sugito 2006).

Lu, J. et al. (2005). *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. *Nature*, 435(7043), 834–838.
doi:10.1038/nature03702

Kumar, M.S. et al.. *Impaired MicroRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis*. *Nat. Genet.* 2007, 39, 673–677.

Sugito, N. et al. *Rnasen regulates cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients*. *Clin. Cancer Res.* 2006, 12, 7322–7328.

Diaz-Garcia, C.V. et al. *Dicer1, drosha and miRNAs in patients with non-small cell lung cancer: Implications for outcomes and histologic classification*. *Carcinogenesis* 2013, 34, 1031–1038.

Merritt, W.M. et al. *Dicer, drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer*. *N. Engl. J. Med.* 2008, 359, 2641–2650.

Lin, R.J. et al. *Microrna signature and expression of dicer and drosha can predict prognosis and delineate risk groups in neuroblastoma*. *Cancer Res.* 2010, 70, 7841–7850.

12) A Jelölt a 112. oldalon ír róla, hogy egyes csírasejtvonalbeli génmutációkat (*SDHB*, *RET*, *VHL* és *NF1*) hordozó hasnyálmirigy neuroendokrin betegek szérumban mintáiban egyes miRNS-ek csökkent mennyiségben vannak jelen a sporadikus betegségben szenvedő betegekhez viszonyítva. Van-e sejbiológiai mechanizmussal alátámasztható oki összefüggés a mutáció hordozás és a specifikus miRNS mennyiség csökkenés között vagy a két tényező egymástól független és csupán asszociációt mutat?

A tudományos irodalom alapján a csíravonalas *SDHB*, *RET*, *VHL* és *NF1* mutációk és bizonyos miRNS-ek csökkent szérumszintje közötti kapcsolat természete nem ismert.

Mindenesetre az említett gének csíravonalas betegségkókozó variánsai összefüggésben állnak a megváltozott miRNS expresszióval szöveti szinten:

Az *SDHx* (szukcinát-dehidrogenáz) és *VHL* génmutációk az anyagcsere megváltozásához vezetnek, ami intracelluláris pszeudohipoxiás állapotot idézhet elő, így ezen génmutációt hordozó daganatok a feokromocitoma-paragangliómák ún. pszeudohipoxia molekuláris alcsoportjába tartoznak. Ez az állapot a hipoxia-indukálható faktor (HIF) útvonal aktiválásához vezethet, amely számos miRNS expresszióját befolyásolja. Például a miR-210 egy jól ismert hipoxia-indukált miRNS, melynek túlzott expressziója figyelhető meg *SDHx*-mutációval rendelkező daganatokban, ami összefüggésbe hozható a HIF útvonal aktiválásával (Kulshreshtha et al. 2006; Tsang et al. 2014).

A *RET* és *NF1* gének elsősorban a feokromocitómák 2. molekuláris alcsoportjához tartoznak, melynek jellemzője a fokozott kináz jelátvitel, mely egyéb daganatokban is onkogén transzformációhoz vezet. A *RET*, valamint *NF1* mutációk szintén jellegzetes miRNS expressziós változásokhoz vezetnek az érintett szövetekben (Mancikova et al. 2017; Chiacchiarini et al. 2021; Khosravi et al. 2023).

A miRNS-ek expresszióját azonban nemcsak a genetikai mutációk, hanem epigenetikai változások, környezeti tényezők és a daganat mikrokörnyezete is befolyásolhatja. Például a multiplex endokrin neoplázia (MEN1) szindrómához kapcsolódó hasnyálmirigy neuroendokrin tumorokat genom-szintű hipermetiláció jellemzi, amely szintén hatással bír a miRNS-ek expressziójára (Tirosh et al. 2020).

Ezért a csírvonalas mutációk és a specifikus miRNS-ek csökkent szérumszintje közötti kapcsolat nem feltétlenül ok-okozati, lehet asszociatív is. Emellett mindenképpen figyelembe kell venni az adott szövetet, jelen esetben a vért, melynek alakos elemei adják a keringő miRNS-ek túlnyomó többségét. És mindenképpen további kutatások szükségesek annak megértéséhez, hogy ezek a mutációk hogyan befolyásolják a keringő miRNS-ek expresszióját.

Wachtel H et al. *Molecular Genetics of Pheochromocytoma/Paraganglioma*. *Curr Opin Endocr Metab Res*. 2024 Sep; 36:100527.

de Bresser, C.J.M. et al. *The Molecular Classification of Pheochromocytomas and Paragangliomas: Discovering the Genomic and Immune Landscape of Metastatic Disease*. *Endocr Pathol* 35, 279–292 (2024).

Kulshreshtha R et al. *A microRNA signature of hypoxia*. *Mol Cell Biol*. 2007 Mar;27(5):1859-67.

Shen G et al. *Hypoxia-regulated microRNAs in human cancer*. *Acta Pharmacol Sin*. 2013 Mar;34(3):336-41.

Tsang VH et al. *Overexpression of miR-210 is associated with SDH-related pheochromocytomas, paragangliomas, and gastrointestinal stromal tumours*. *Endocr Relat Cancer*. 2014 May 6;21(3):415-26.

Tirosh A et al. *Genetic and epigenetic alterations in pancreatic neuroendocrine tumors*. *J Gastrointest Oncol*. 2020 Jun;11(3):567-577.

Mancikova V et al. *Multilayer OMIC Data in Medullary Thyroid Carcinoma Identifies the STAT3 Pathway as a Potential Therapeutic Target in RETM918T Tumors*. *Clin Cancer Res*. 2017 Mar 1;23(5):1334-1345.

Chiacchiarini M et al. *Role of tissue and circulating microRNAs and DNA as biomarkers in medullary thyroid cancer*. *Pharmacol Ther*. 2021 Mar;219:107708.

Khosravi T et al. *The role of miRNAs and lncRNAs in neurofibromatosis type 1*. *J Cell Biochem*. 2023 Jan;124(1):17-30.

13) A dolgozat egyik értékes, a klinikum számára is fontos eredménye (117. oldal), hogy egy 3-5 miRNS-ből, valamint a chromogranin-A-ból álló kombinált teszttel még a legnagyobb kihívást jelentő hasnyálmirigy neuroendokrin betegcsoportban is jó diagnosztikus hatásfokot tudtak elérni. Felmerülhet a kérdés, hogy a chromogranin-a keletkezéséhez vezető biogenezis út végrehajtó és/vagy szabályozó fehérjék expressziójának szabályozásában esetleg részt vesznek-e azok a miRNS-ek, amelyek abundanciájának vizsgálatát együttesen ajánlják diagnosztikai célból?

A jelenlegi tudományos irodalom alapján nincs közvetlen bizonyíték arra, hogy az általunk azonosított miRNS-ek (hsa-let-7b-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-30d-5p, miR-451a, miR-486-5p) közvetlenül szabályoznák a chromogranin A (CgA) biogenezisében részt vevő végrehajtó vagy szabályozó fehérjék expresszióját.

Összeségében nagyon kevés adat áll rendelkezésre a CgA miRNS-ek általi regulációjáról. Érdekes módon a TarBase 2025 verziójában egyetlen egy kísérletesen validált CgA-miRNS interakció sem szerepel. Bár a miRDB adatbázisban predikciók alapján jelenleg 39 potenciális CgA-t szabályozó miRNS

szerepe vetődhet fel, ezek között nem szerepelnek az általunk azonosított miRNS-ek. Az egyetlen általam fellelt irodalmi közlemény a CgA miRNS-ek általi regulációjáról *Zhang és munkatársaitól* származik, melyben kimutatták, hogy a Chromogranin A (*CHGA*) gén 3'-nem átíródó régiójában (3'-UTR) található C+87T (rs7610) polimorfizmus hogyan befolyásolja a miR-107 CgA fehérje expresszióra kifejtett hatását. A szerzők megállapították, hogy a miR-107 kötőhelyét érintő C+87T variáns T allélja esetében a *CHGA* expressziója érzékenyebben reagál a miR-107 hatására.

Zhang K et al. Molecular Mechanism for Hypertensive Renal Disease: Differential Regulation of Chromogranin A Expression at 3'-Untranslated Region Polymorphism C+87T by MicroRNA-107. J Am Soc Nephrol. 2015 Aug;26(8):1816-25.

Őszintén remélem, hogy Professor Asszony számára válaszaim megfelelően rávilágítanak a felvetett kérdésekre és elfogadhatónak találja azokat.

Budapest, 2025. 04. 14.



Butz Henriett