

Bírálat Dr. Györffy Balázs „Transzkriptom szintű adatok a rosszindulatú daganatos betegek várható terápiás válaszána és túlélésének előrejelzésére” című MTA doktori értekezéséről

Általános értékelés

Dr. Györffy Balázs MTA Doktori Pályázatát 2013-ban nyújtotta be. A doktori értekezés a jelölt összesen 21 nemzetközi folyóiratban megjelent közleményére épül, ezek közül 11-ben első-, 4-ben utolsó- és 6 közleményben társszerző. A téziseket megalapozó folyóiratok, melyekben a közlemények megjelentek összesített impaktfaktora: 98,88. Kiemelkedő tudományos aktivitását jelzi, hogy a tézisek beadásának pillanatában az értekezésen kívül további 29 közleményének összesített impaktfaktora 96,08. Tovább játszva a számokkal meg kell említenem, hogy 2014-ben további 12 közleménye jelent meg, eddigi közleményeinek impakt faktora 277,171, melyekre eddig érkezett független idézetek száma: 1 382, Hirsh index: 23. A PhD fokozat megszerzését követően a közleményeinek IF-a: 255,0. Kiemelkedő teljesítmény egy fiatal kutatótól.

Györffy Balázs vizsgálatainak/bioinformatikai fejlesztéseinek fő célja olyan biomarkerek azonosítása melyek a transzkriptom szintű adatok alkalmazásával a legjobb jelölteknek bizonyulnak rosszindulatú daganatos betegek várható terápiás válaszána és túlélésének megítélésére. Célja olyan bioinformatikai fejlesztések megvalósítása, melyek transzkriptom adatokra támaszkodva újabb biomarkerek felismerését teszik lehetővé. Nagy jelentőségű, hogy tumortípustól függetlenül kemorezisztencia –biomarkerek meghatározását célozza meg, melynek alapja, hogy a tumorok általában hasonló rezisztencia-mechanizmusokat alakíthatnak ki, ami lehetővé teszi a rezisztencia kialakulása háttérében álló legmegbízhatóbb markerek kiválasztását és a jelátviteli útvonalakban résztvevő rezisztencia markerek azonosítását. A jelölt bioinformatikai ismeretei nemzetközi viszonylatban kiemelkedőek. Külföldön szerzett ismereteit maximálisan és nagyon eredményesen kamatoztatja hazai környezetben.

A tézisek formai bírálata

A tézisek teljes terjedelme 138 oldal, melynek felépítése az alábbi:

- *tartalomjegyzék*: 2,5 oldal könnyen követhető, jól tagolt, segíti a dolgozat áttekintését
- *rövidítés jegyzék*: könnyíti a bírálót a dolgozat olvasása során
- „Bevezetés”: terjedelme 19 oldal, mely strukturáltan foglalja össze azt az irodalmi háttérrel, melyre a célkitűzések épülnek. Lényegre törően ismerteti a terápiás válasz előrejelzésére alkalmazható biomarkerek jellegzetességeit, a szisztémás és a célzott terápiával szembeni rezisztencia kialakulásának feltételezett és már ismert okait. Transzkriptom szintű adatok jelentőségét, a DNS-chip technológia lényegét és alkalmazási területeit a daganatos betegségekben, kiemelve az emlő, a melanoma malignum és a petefészek daganatok egyes jellegzetességeit. Könnyen áttekinthető az

onkológiai bioinformatika jelentőségének, szerepének áttekintése. Az irodalmi hivatkozások relevánsak, számuk 276.

- A „*Kutatási célok*” – a jelölt három pontban fogalmazza meg kutatási célkitűzéseit és nem rendhagyó módon, a vizsgálatait során nagyon komplex módon alkalmazott megközelítéseket pontonként részletesen bemutatja, ami a vizsgálatok könnyebb áttekinthetőségét segíti elő. A jelölt megjegyzi, hogy a célkitűzések egyes kérdéseit árnyalja, hogy a biomarkereket egyrészt több tumortípus és több gyógyszer esetén vizsgálták és a transzkriptom meghatározás technológiai nem voltak egységesek, viszont ezekre az analíziseket követően részletes magyarázatot szolgáltatott.
- *Módszerek leírása*: 24 oldalon keresztül mutatja be a vizsgálatait során alkalmazott elemzéseket, sejtvonalak, módszereket, analíziseket, statisztikai elemzéseket. Ez az a fejezet melyben nem találtam meg azt a rendezettséget, ami a tézisek többi fejezetére jobban jellemző, hiányoltam alkalmazott módszerek áttekintő leírását, könnyebb lett volna követni a módszerek sokféleségét, fejezetek számaival utal arra, hogy mikor melyiket használták. Néhány, erre a fejezetre jellemező kritikai megjegyzést emelek ki:
 - A gyógyszer-rezisztencia meghatározásához használt 30 rosszindulatú daganatos sejtvonala leírását nem lehet a módszerek között megtalálni, sokkal egyszerűbben követhető lenne az eredmények leírása, ha már a korábban van utalás a sejtvonalak kiválasztási kritériumaira, szervenkénti megoszlására, klinikai paramétereire. A módszerek (anyagok) fejezetben kellett volna felsorolni az alkalmazott kemoterápiás szereket, a használt koncentrációkat is.
 - A génexpresszió meghatározásához alkalmazott többféle leírás is rendezetlen, néha redundáns, így nehezen áttekinthető. RNS preparálás leírása is egyszerűbb lett volna, ha rendszerezi a jelölt és visszautal arra, hogy az egyes vizsgálatoknál melyiket alkalmazták.
 - Sokszor egy egyszerű táblázat jobban érhetőbbé teszi a megfigyelést, mint a részletes szöveges leírás (34. oldal), ami ha pl. kezelések összehasonlítását írja le nehezen követhető.
 - A célzott terápiás szerekekkel szembeni rezisztencia módszertani leírása (40. oldal) nem egyértelmű. A gén chip kiértékelés fejezetben azt írja a jelölt, hogy a GSK caArray adatbázisban több mint 300 ismert sejtvonala transzkriptom szintű génexpresszióját határozták meg (ezek irodalmi adatok). Az eredmények fejezetben 45 sejtvonallal írt (73. oldal). A 45 kiválasztott sejtvonala kiválasztása csak az 5. táblázat címéből derül ki.
 - Nem tartom szerencsésnek, hogy a sejtvonalak, melyeket kemoterápiás szerekekkel szembeni rezisztencia-profil meghatározásához használt ABC sorrendben vannak felsorolva, ezeket is először az eredmények fejezetben írja le a jelölt. Sokkal áttekinthetőbbek lennének az adatok, ha az egyes szervek csoportjainak megfelelően lennének az eredmények bemutatva.
 - A fenti megjegyzések inkább egy fiatal, kiemelkedő teljesítményű kutatónak szólnak, elsősorban azzal a céllal, hogy már a mű elején, annak megfelelő

fejezetében inkább írjon le olyan módszereket, anyagokat, sejtvonalatokat stb., melyek a későbbiek során könnyebben követhetőbbé teszik az elért eredményeket

Eredmények: Az eredmények bemutatása követi a kutatási célokban megfogalmazott célokat. Az elemzések, a bemutatott analízisek, a sokszínű komplex adatok, azok tömör leírása igényelte az eredmény fejezet többszöri átolvasását. Ugyanakkor meg kell állapítanom, hogy a módszerekkel szemben ennek a fejezetnek a leírása szemléletes, lényegre törő. De nem szerencsés, hogy az ábrák leírása, tartalma sokszor csak az ábra szövegből derül ki, se az ábrák se a táblázatok nincsenek a szövegben idézve, ez jelentősen megkönnyítené az ábrák azonosítását, azok tartalmának követését. Néhány helyen elírás található, mivel ezek nem értelemzavaróak nem sorolom fel mindet, csak utalok néhányra *6. ábra az ábraszövegben utalni kellett volna az egyes gyógyszerek rövidítésére, többet kellett volna írni erről az analízisről. A 13. ábra szövege nem jól látható, érdemes lett volna eltérő színnel jelölni a szülői sejtvonalatokat*, az ábra szövegben elütés található, mivel az ábrán a gyógyszerrel kezelt vonalat *“treatD”* és nem *treadD* jelzi. 15. ábra szövegben elütés. 9. ábra a koncentrációt fel kellett volna tüntetni az ábrán, nem a bírálóra bízni, hogy találja ki azt. A 10-es ábra kicsit részletesebb magyarázatot igényel, szerencsésebb lett volna kicsit nagyítani a könnyebb áttekinthetőség miatt, a „legerősebb” génnek nevét az ábrán vagy az ábra szövegben meg kellett volna jeleníteni, erre utalást a szövegben sem találtam. A „következő ábra” elnevezés zavaró, mivel több ábra van egymás alatt és köztük szöveg nem szerepel, de ismételten írom, hogy az ábrák számozására történő hivatkozás a szövegben lényegesen megkönnyíti azok megértését.

Az én példányomban az 57. oldal hiányzik, ez a 4.2. fejezet a tartalomjegyzék alapján **„Túlélés előrejelzése sejt kultúra modellben azonosított gének felhasználásával”**.

74. oldal „a sejt vonalakban elvégzett igazolás után a legjobb géneket veserákos” mintákban is megvizsgálták és igazolták az LGALS8, a RAB17 és az EPCAM gének összefüggését a sunitinib-rezisztenciával. Ezzel kapcsolatban egy technikai kérdésem lenne: hogyan történt a mintagyűjtés a gyógyszeres kezelés előtt? A betegek hány %-ának a mintáit tudták az analízisben felhasználni?

A melanoma pathogenezisével kapcsolatba hozott génlisták összehasonlítása során 9 génlistát találtak, melyek megfeleltek az analízis feltételeinek. Ezek a közlemények 2002-2005 között jelentek meg. Az analízist követően jelentek-e meg a feltételeknek megfelelő közlemények? Ha igen mennyiben módosítja a korábbi megállapításokat, ha ezeket az adatokat bevonják az analízisbe?

Mi lehet az elsődleges oka annak, hogy a génexpressziós mintázatok alapján a melanoma áttétképző potenciáljával kapcsolatba hozható génlistákat nem tudtak azonosítani?

Léteznek-e olyan tanulmányok, melyek a melanoma heterogenitás és a génexpresszió közötti különbséget a tumor különböző részeiből származó minták génexpressziós eltérései alapján bizonyítják be?

Az eredmények között kiemelten jelentősek azok az analízisek, melyeket emlőrák prognózisával kapcsolatban, a nyers adatok keresztelemzését követően kaptak. Sikert rávilágítaniuk a redundáns közlések veszélyeire is. Mi lehet az oka annak, hogy az irodalomban emlőrák vonatkozásában a közölt mintázatok többsége nem volt képes a jó és rossz prognózisú betegeket egymástól elkülöníteni?

Milyen feltételeknek kell megfelelni ahhoz, hogy klinikai döntéshozatalra alkalmas génexpressziós adatok szülessenek?

Irodalmi adatok szerint az ösztrogén receptor fokozott kifejeződés inkább az alacsony malignitású daganatokra jellemző, ugyanakkor a jelölt által vizsgált mintákban és alkalmazott kiértékelés során sikerült három olyan gént találni – köztük az ösztrogen receptor 2-t-, melyek a túléléssel szoros korrelációt mutattak. Mennyire alkalmas ez a három gén a túlélés előrejelzésére petefészekrákoknál?

Egy most megjelent közleményben 1525 petefészekrák meta-analízisének eredménye mennyiben hasonlítható a jelölt eredményeihez (*Riester M et al.: Risk prediction for late-stage ovarian cancer by meta-analysis of 1525 patient samples. J Natl Cancer Inst. 2014 Apr 3;106(5).*)?

A tézisek „Megbeszélés” része következetesen, a kutatási céloknak megfelelően foglalja össze az eredményeket, könnyen követhető módon. A komplex, saját elemzések eredményeinek, gyenge pontjainak és az irodalmi elemzések hiányosságainak összefoglalása meggyőző egységet alkotnak.

A saját kutatási eredmények összefoglalása a kutatási céloknak megfelelően három fő csoportban történik. Ezek közül az eredmények közül az alábbiakat tartom a legérdekesebb és legfontosabb megfigyeléseknek/eredményeknek:

1. Tumortípustól függetlenül olyan géneket és génexpressziós mintázatokat azonosítottak, melyek a gyógyszerekkel szembeni rezisztenciát előre tudják jelezni.
2. Melanoma malignumban rezisztens sejtvonal-párok felhasználásával a kemorezisztencia génjeit azonosították.
3. Független betegmintán génexpressziós mintázatuk alapján megállapították, hogy kemoterápiára érzékenyként osztályozott, doxorubicin monoterápiával kezelt betegek túlélése több mint 50%-al hosszabb, mint a rezisztensként osztályozott betegek túlélése. Azonosították és klinikai mintákban is igazolták a doxorubicinnel szembeni rezisztencia egyik oki („driver”) génjét, a PSMB7 gént.
4. Öt célzott terápiás szerrel szembeni érzékenységet vizsgálva relatív rezisztenciát előrejelző biomarkereket azonosítottak. Vese- és tüdőrák mintákban igazolták az LGALS8, a RAB17 és az EPCAM gének összefüggését a sunitinib-rezisztenciával.

5. Korábban közölt emlőrákos betegek adatainak felhasználásával létrehoztak egy integrált, klinikai és génexpressziós adatokat tartalmazó adatbázist, mely korábbi prognosztikus biomarkerek kereszt-elemzését teszi lehetővé.
6. Az általuk készített gén chip adatbázis kiértékelésével azonosítottak, az emlőrákos betegek túlélésével legjobban összefüggő géneket, melyek a PGR, az ÖR2 és a TSPAN8, ezek szerepét 64 saját betegben is igazolták.
7. A biomarkerek alkalmazására elkészítettek egy világhálón keresztül elérhető diagnosztikai rendszert, mely emlőrákos betegek várható túlélését tudja előre jelezni, valamint ösztrogén- és HER2 receptor státusz meghatározására is alkalmas.

Összefoglalva: A doktori értekezés egy kiemelkedő tehetségű fiatal kutató olyan műve, melyben foglalt eredményeknek már jelentős visszhangja van. Vizsgálatai, bioinformatikai fejlesztései a daganatkutatás egyik legfontosabb területét célozzák meg. A dolgozatban foglalt tudományos eredmények hitelesek, egyértelmű, hogy a jelölt saját eredményei.

Megállapítom, hogy a munka alkalmas az MTA doktora cím pályázására, javaslom a nyilvános vita kitérését és messzemenően támogatom az értekezés téziseinek elfogadását.



Dr. Balázs Margit
az MTA doktora

Debrecen, 2014. október 14.