

Opponensi vélemény dr. Klekner Álmos „Asztrocitómák invazivitásának szerepe a személyre szabott onkoterápiában” c. MTA doktori disszertációjáról

A leggyakoribb agydaganatok a gliális tumorok. Ha szó szerint vesszük a disszertáció címe a tartalmat nem fedi mert asztrocitómák csak egy részét képezik a daganatos spektrumnak amit a jelölt elemzett. Másrészt, a gliális daganatok invazivitása kiterjedten vizsgált de molekuláris szinten egyáltalán nem lezárt kérdés, aminek megértése alapvető jelentőségű. Ha ezen összefüggések tisztázódnának akkor lehet majd biomarkerekké vagy prognosztikus markerekké konvertálni ezeket, amit majd fel lehet(ne) használni az ilyen betegek személyre szabott terápiájának kidolgozásra.

A disszertáció célkitűzéseit 8 pontban foglalta össze a jelölt. Ennek első pontja az agytumor biobank kialakítása volt, ami alapjául szolgálhatott a kutatásoknak. Ezzel kapcsolatos a biobankba bevont daganatos betegek kezelési és túlélési adatainak összegyűjtése azaz a különböző terápiás modalitások klinikai hatékonyságának elemzése. A 2. célkitűzés megszületésének időpontja érdekes kérdés, mivel a 1p/19q kodeláció prognosztikus és prediktív szerepének vizsgálata a 2000-es évek végétől standard volt világszerte így annak hasznosságát azelőtt már jóval igazolta az irodalom.... A 3. célkitűzés a bázisterápiának számító TMZ kezelésekre szükséges gyógyszeres mérésre alkalmas új költséghatékony eljárás kidolgozása igen korszerű kutatási feladat. A 4. célkitűzés az EGFR és integrin (melyik) expresszió prediktív szerepének elemzése GBM-ben (vagy ahogy máshol jelzi asztrocitómában) érdekes kutatási kérdés, amit nem lehet megválaszolni az EGFR gént érintő genetikai eltérések feltérképezése nélkül. Az 5. célkitűzés egy meglehetősen vitatható kutatási programot vázol ahol a malignus agydaganatok és tüdőrák agyi áttéteinek összehasonlításából kívánja megérteni az agydaganatok invazivitásáért felelős mechanizmusokat. A 7. célkitűzés a peritumorális agyállomány molekuláris jellemzése GBM és agymetasztázis összehasonlítása révén. A 6. célkitűzés a GBM kemoirradiációra adott válaszában molekuláris elemzése, elsősorban az invazivitásért felelős molekulák vonatkozásában. A 8. célkitűzés új GBM prognosztikus markerek kiválasztása az ún. inváziós panelből, melyet a korábbi pontokban elemzett.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények száma 16 ebből a jelölt 7 angol nyelvű közleményben első vagy utolsó szerző így meghatározó szerepe igazolható. Ezen cikkek között 1 db Q1-es, 4 db Q2-es és 2 db Q3-as szerepel. További 6 magyar nyelvű közlemény is szerepel a disszertációban, amelyek közül 4-ben meghatározó szerepet töltött be a jelölt. A magyar cikkek Q3 és Q4 minősítésű lapokban jelentek meg. Mindösszesen tehát 11 olyan közleményre épül a disszertáció amelyben a jelölt meghatározó szerepe egyértelműen bizonyítható, ugyan akkor ezek harmada magyar (bár originális közlemény).

A hazai gliális tumor biobank létrehozása üdvözlendő és önmagában is komoly teljesítmény aminek nemzetközi jelentőségét bizonyítja a jelölt számtalan nemzetközi kooperációs kutatásban való részvétele.

Saját kutatásai közül a hazai GBM betegek kezelési adatainak elemzése a nemzetközileg már sokszorosan igazolt terápiás hatásokat erősítette meg a sugárterápia, TMZ és angiogenezis gátlók kombinált alkalmazásával.

Hasonló képen az 1p/19q ko-deléciós molekuláris markerek prognosztikus és prediktív szerepének elemzése hazai oligoasztrocitómás és oligodendrogliomás beteganyagban, egy a napi rutin diagnosztikában standardként használt eljárás tankönyvi adatait igazolta vissza.

Az EGFR génhibáinak elemzése GBM-ben kollaborációs munka volt, amelyben a jelölt társszerző volt a publikációkban. Az igazi újdonság ezen vizsgálatokban a negatív eredmény volt, vagy is hogy az EGFR TK szakaszát érintő mutációk nem fordulnak elő GBM-ben. Az asztrocitómák EGFR-b1 integrin expressziójának és heteroasszociációjának prognosztikus szerepére vonatkozó vizsgálatok is nagy sokszerzős kollaborációkban történtek ahol a jelölt meghatározó szerepe nem volt egyértelmű, bár ez a munkája lett a disszertáció legjobb publikációja (D1). A megfigyelés hogy az EGFR és b1 integrin együttes expressziója és heteroasszociációja a növekvő malignizálódással fokozódik, igen érdekes megfigyelés. *Felmerül a kérdés hogy a fokozott protein expresszió mögött nem-GBM asztrocitómákban az EGFR génnek valamilyen hibája (CNV vagy ECD-deléció) kimutatható-e a GBM-hez hasonlóan?*

GBM-TMZ kezelésének farmakovigilanciájára vonatkozó vizsgálat igazi originális kutatás amely egy kémiai természetű munkából és egy valódi in vivo kezelések során GBM betegek szérum és tumor elemzésén alapul. A jelölt új kapilláris elektroforézis-alapú eljárást dolgozott ki a TMZ és metabolitjainak az MTIC- és AIC-nek érzékeny kvantitatív kimutatására. A módszerrel a TMZ féléletideje vízben és szérumban nagyon hasonló szobahőn (appr. 30 perc). *Miután a TMZ DNS-t károsító aktív metabolitja a metilhidrazin, felmerül a kérdés hogy az új módszer alkalmas-e ennek a kimutatására is?* A módszert 2 GBM-es TMZ kezelt beteg esetében is alkalmazta a TMZ szérum-koncentrációjának meghatározására, ami az irodalmi adatokat mutatta. Egy GBM-es beteg esetében normál agyszövetből és különböző tumorterületekről vett mintában is meghatározta a TMZ koncentrációt. A bíráló számára meglepő módon több tumor-részletben is ugyanolyan szintű volt a TMZ mint a normál agyszövetben. Több helyen is az olvasható hogy a tumorban detektálták a TMZ-t. *Lehet azt tudni hogy a minták tartalmaztak-e necrosist, bevérzést, illetve a tumorstroma milyen mértékű lehetett ezekben? (kisebb vagy nagyobb a TMZ az ilyen területeken).* Hasonló képen kérdés az hogy a normál glia/fehérállomány és a tumor között van-e különbség a TMZ koncentrációban? Szemben a várakozással a kémiai munkában utolsó szerző a jelölt és a klinikai anyagon történt vizsgálatban csak társszerző.

A disszertáció döntő része amely a jelölt saját kutatásait tartalmazza az asztrocitómák invazivitását meghatározó ECM molekulákra vonatkozó vizsgálatok. Mint minden prekonceptió, annak minősége meghatározza hogy milyen eredmények keletkezhetnek ezek elemzéséből. Az un. ECM panel matrix fehérjéket (laminin, fibronectin, tenascin), proteoglikánokat (perlekán, syndecan, versican, neurocan, neuroglycan, brevican), néhány MMP formát (-2, -8, -9) és kondroitinázokat és bizonyos hialuronsav szintázokat valamint a HMMR/CD168 adhézios molekulát tartalmazott. Fájdalmasan hiányoznak a kezdeti panelből

a kondroitin szulfát és heparán szulfát bioszintézis kulcsenzimeit és a CD44 splice variánsait. Későbbi panelekbe a CD44 közös domén belekerült, de pl. egyéb szerin proteáz pl. (uPA) kimaradt. Ami még fájdalmasabb hogy a daganatok áttétképzésében oly sokat elemzett heparanáz enzim is hiányzik, pedig az idegszöveti proteoglikánok között a HSPG-k mind ott vannak. Másrészt mára már ismert hogy a proteáz aktivitás nem feltétlenül, sőt sokkal gyakrabban a proteáz inhibitorok fokozott expressziója miatt növekszik, így a TIMP vagy a PAI jelenlétének ismerete nélkül nehéz értelmezni az expressziós eltéréseket. Ugyan akkor szerepel a panelben a Ki-67 sejtciklus marker és a GFAP ami gliális intermedier filamentum marker, egyik sem ECM komponens.

Ezen panel felhasználásával elsőként GBM és tüdő adenocarcinoma-áttét expressziós mintázatát hasonlította egymáshoz illetve a környező agyszövethez. Nem érthető a koncepció amely azt feltételezi hogy a lokális invázió (GBM esetén) hasonló ECM komponensek részvételével történik mint az ún. metasztatikus bölcső kialakulása (tüdőrákban). A GBM-ben változó ECM fehérjék közül RNS szinten a panel fele szignifikánsan eltérő expressziót mutat azonban ezek egy része az 50% alá csökkenés vagy 2x növekedési határérték közelében változott csak. A matrix proteinek közül a FN, perlekán és syndecan-1/2 fokozódása igen jelentős, hasonlóan az MMP2/9-hez. Nehezen értelmezhető ugyan akkor a Tenascin-C és –R illetve a HAS 1-2-3 egymással homlokegyenest ellentétes változásai. A magam részéről a GBM-ADCmet összehasonlítást szakmailag erősen vitathatónak tartom. A metasztázis ECM expressziós profilja meglepő módon nagyban hasonlított a GBM-hez ha a normál agyhoz viszonyított (FN, perlekán, syndecan-1, CD168, MMP2/9 fokozódás) és itt is megfigyelhető a tenascin C/R és a HAS 1-3 ellenétes mozgása. Ezen jelenségre értelmes magyarázat az lehet hogy mindkét daganatban az agy gliaszövege adja a stromát döntően....Mindezek értelmezése csak a fehérje expressziók elemzésével lehetséges, amihez már csak egy igen limitált panelt használt fagyasztott metszeteken IFC-vel. *Ez lehetőséget adott volna azonban arra hogy a GBM lokális invazivitását vagy a metasztázis lokális invazivitását is elemezték volna, amire utaló adatot nem láttam az elemzésben.* A morfológiai elemzés megmondhatná azt is hogy daganatsejt vagy stroma eredetű markerrel állunk szemben. A 11. és 12. ábra hasonló elemzést tartalmaz bár az ECM fehérjék nem átfedőek nagyon és a 11. ábra a GBM/met összehasonlítás amire már fentebb utaltam. A 12. ábrán gyakorlatilag az látszik, hogy az óriási (nagyságrendi) RNS expressziós eltérésekből fehérje szinten alig marad valami, a GBM ebben a tekintetben nagyon hasonlít az agyszövethez, míg a tüdőáttét agrin és MMP9 szempontjából fokozott expressziós mintázatú. *Itt érhető tetten az hogy mennyire elválk az mRNS és fehérje expresszió egymástól ami minimálisan magyarázatra szorul: hogy ez technikai probléma vagy biológiai természetű?*

A GBM kombinált kezelése során bekövetkező változások inváziós panel elemzése nehezen hasonlítható az előbbiekhöz: számos elem hiányzik, újabbak szerepelnek, mint a HER2, az integrinek, CDH2 (indokukat nem találtam). Patológiailag sok daganatban kell rutin szerűen elemezni a terápiák hatását neoadjuváns kezelések utáni műtéti anyagban amire patológiai kiértékelési módszereket dolgoztak ki mivel a mintákban négyféle lehetőség szerint CR, PR SD, PD állapotokat lehet találni és kell értékelni. *Az inváziós panelre vonatkozó elemzések így a morfológia ismerete nélkül gyakorlatilag értelmezhetetlenek.* Erre rakódik még rá az mRNS

és fehérje expressziós különbségek jelensége is. Fentiek miatt értelmezhetőek a kapott eredmények illetve azok statisztikai szignifikancia hiánya, ami hatalmas egyes csoportokon belüli szórásokból adódnak (mivel ezekben a CR és PD keveredése valószínűsíthető). Végeredményben ebből csak az MMP9 RNS szintű csökkenése és a brevican fehérje szintű eltűnése igazolódott. Ez utóbbi GBM matrix-markernek tekinthető és nem különösebben váratlan, amennyiben hatékony a kemo-irradiációs kezelés....egy GFAP jelöléssel is valószínűleg hasonló eredményt kapnánk.

A peritumorális agyállomány elemzése jellegzetesen agydaganat-specifikus jelenségre vonatkozó kutatás mivel az agydaganatok esetében jellemző a szabad szemmel nem látható peritumorális mikroinvázió ami áttétek esetében nem ismert jelenség. Az un. inváziós panel ebben az esetben is kicsit eltérő a korábbiaktól amiben az EGFR1 megjelenése szemben a HER2-vel legalább indokolható. Az elemzések során mRNS és fehérje szinten 11 fehérje expressziója változott egy irányba de ezek közül csak a CD168/HRMM emelkedése a tumorok (GBM és metasztázis) körüli agyban valamint az integrin $\alpha 1$, tensinR, FN és versican emelkedése volt szignifikáns tüdőrák metasztázis körül. *A jelenség értelmezéséhez a minták szöveti szintű elemzésére volna szükség hogy adott sejttípusokhoz vagy matrixhoz kapcsolható legyen.*

A fenti heroikus elemzések értelme az lehet ha ezekből prognosztikus vagy a címben jelzett terápiás/prediktív konzekvencia lenne levonható. A későbbi gyakorlati felhasználhatóság számára biztos a protein szintű expresszió előnye, mert a daganatokból paraffinos blokkok mindig elérhetők, míg friss minta amelyből megfelelő minőségű RNS izolálható, alig. A GBM-es betegcsoport inváziós expressziós mintázatának elemzése, talán nem meglepő módon, az eltérő túléléssel rendelkező betegcsoportokban nem mutatott eltérést és az SD értékek sem sejtettek nagy csoporton belüli szórásokat. Hasonló mondható el a protein szintű elemzés eredményéről is. Mindkét esetben egy J48 pruned tree statisztikai osztályozó módszerrel és a Weka3.6 elemző programmal csoportelemzést végzett. Megjegyzendő hogy ezen kulcsszerepet betöltő statisztikai elemző programról alig lehet tudni valamit és az elemzés biológiai részletei is homályban maradnak csak a végeredményét láthatjuk. A két betegcsoportot a mintázat RNS expresszió esetében 64.2%-rossz, 93.3%-jó találati aránnyal azonosította helyesen. A protein-mintázat esetében ez az elemzés a jó prognózisú csoportot 100, míg a rossz prognózisú csoportot 75%-os találati aránnyal azonosította. Az alacsony mintaszám azonban ezen értékelések erős korlátja. Láthatóan az inváziós mintázat elsősorban a kedvező prognózis megítélésében látszik hasznosabbnak, míg a kedvezőtlen prognózis megítélésére nem alkalmas. *Az egyes molekulák súlyát tekintve a bíráló számára értelmezhetetlen a kiválasztott jelentős fehérjék listája: brevican, CDH12, integrin- $\alpha 3$ valamint a laminin- $\alpha 4$ és $\beta 1$ mivel ezt a disszertációban lévő kísérleti adatok nem támasztják alá..*

Az egész elemzés jelentősége és értelme az hogy amennyiben ezen mintázat vagy egyes elemeinek prognosztikus értéke meghaladja a jelenlegi klasszikus patológiai paramétereket vagy azoktól független prognosztikus tényező. *Ilyen összehasonlítás az anyagban nem történt pedig a szövettani altípusnak, a beteg életkorának (gyerek/felnőtt), a PCNA jelölődés mértékének, az apoptotikus index értékének, a necrosis és calcificatio jelenlétének alapvető*

szerepük van, nem beszélve a genetikai profiltól (p53 és MGMT mutációk, CIMP státusz). Továbbmenve, a megfigyelések jelentőségének értékeléséhez független beteg- illetve tumoros anyagon történő validálás szükséges. Másrészt szükséges volna az is hogy a TCGA nyitott adatbázisban legyenek ezek a megfigyelések validálva (mRNS expressziós profilok) illetve leellenőrizve, ahol közel 500 ilyen daganat génexpressziós profilja és klinikai adatai elérhetőek.

Mindezek alapján a bíráló a disszertáció új, a jelölt kutatásaihoz szorosan köthető tudományos eredményeinek az alábbiakat fogadja el:

1. Új TMZ kimutatási módszert dolgozott ki amelyet klinikai körülmények között is tesztelt néhány esetben
2. GBM-ben egy ECM alapú inváziós panelt elemzett amelyből a FN, perlekán és szindekán1/2 HSPG-k valamint az MMP2/9 fokozott expresszióját írta le, ami nagyban hasonlít tüdő adenocarcinoma agyi áttétéhez.
3. Kemoirradiációval kezelt GBM-ben a fenti inváziós panelből az MMP9 mRNS és a brevican fehérje szintű csökkent expresszióját találta
4. A GBM körüli agyszövetben az inváziós panelből a CD168/HRMM fokozott expresszióját észlelte

Ezen értékekkel szinte egyenlő arányban merültek fel tudományos kérdések amelyek megválaszolása illetve elemzése nélkül a bemutatott kutatási eredmények tényleges súlya nem ítéltető meg.

Budapest 2017 május 16.

dr. Tímár József

az MTA doktora