

**MTA doktori értekezés bírálata**

*Sebestyén Anna: Jelátviteli zavaroktól az onkometabolizmusig - daganatsejtek bionergetikai alkalmazkodása*

*Szalai Csaba*

Sebestyén Anna MTA doktori értekezésében a 2001 és 2020 közötti daganatbiológiai kutatásairól számol be. A dolgozat a tartalom- és irodalomjegyzékkel együtt 195, ezeken kívül 145 oldal és összesen 24 tudományos közlemény eredményeit foglalja össze.

Az értekezés a tartalomjegyzék után egy rövid bevezetéssel kezdődik, majd az irodalmi összefoglaló jön, 4 témában és több alfejezetben. A következőkben található a célkitűzéseket, módszereket, eredményeket, megbeszélést, az összefoglalót, az irodalmi adatokat és a végén a rövidítések jegyzékét. Megállapítom, hogy formai szempontokból a disszertáció megfelel az MTA doktori dolgozatokkal szemben támasztott követelményeknek.

Az MTMT alapján (2021.11.23-as adatok) a PhD fokozat megszerzése óta a jelöltnek 80 publikációja jelent meg, első és utolsó szerzős publikációinak száma összesen 39. Az összes független idézeteinek száma a vizsgált időpontban 949. Publikációs aktivitására jellemző, hogy a dolgozat leadásának időpontja óta 5 publikációval több található az MTMT adatbázisban. Ezek alapján megállapítom, hogy szcientometriai szempontból Sebestyén Anna magasan teljesíti az MTA doktori cím elnyeréséhez szükséges feltételeket.

A Bevezetésben, ahogy a dolgozat többi részében, megbizonyosodhatunk a jelölt kiemelkedő szakmai tudásáról és felkészültségéről. A jelölt szakmaiságához nem fér kétség, a dolgozat kisebb gyengéje a néhány elütés (egy-két példa: hidrid (34. oldal); különbségek (48.); apotózis (4., 53., 67. (2x) 68., 83.); jellemzte (73.); fentotípus (133.); rhandomyosarcomás (141.), stb.) és az időnként túl hosszú, rosszul szerkesztett és ezért nehezen érthető mondatok. Hozzá kell tenni persze, hogy a dolgozat túlnyomó többsége nem ilyen mondatokból áll. Bár van a dolgozat végén rövidítések jegyzéke, sok rövidítés a szövegben nincs definiálva (pl. GLS, HK2, PFK), és van olyan rövidítés (CNI), amely a rövidítések jegyzékében sem található. A SSADH megfejtése a szövegben szerepel, de nincs benne a jegyzékben. A 20. oldalon az MTHFD2 rövidítés metil-tetra-hidro-folát-reduktázként szerepel, pedig ez utóbbi az MTHFR.

Félreértésre adhat okot egy kisebb némenklatúra probléma. A *FASN* a zsírsav-szintáz enzim génje. A kódolt enzim gyakori rövidítése a *FAS* (fatty acid synthase). A szövegben enzimként mindenhol a *FASN* rövidítés található, viszont a rövidítések jegyzékében csak a *FAS* van definiálva, mint zsírsav-szintáz, amely rövidítés viszont csak egyszer fordul elő a szövegben, akkor is valószínűleg a *FAS* génről van szó, ami a Fas Cell Surface Death Receptor génje.

Ezek persze, csak kisebb figyelmetlenségi hibák, és ilyen hosszú szövegben talán el sem lehet kerülni, hogy az ilyen típusú hiányosságok becsússzanak.

A Bevezetés, amely egyben irodalmi összefoglaló is, megismerkedhetünk a jelölt, a dolgozatban tárgyalt főbb témáinak tudományos, irodalmi hátterével, így ismertetésre kerül a transzformáló növekedési faktor béta és a Notch érzékenység változások daganatbiológiai szerepe, az mTOR jelátviteli hálózati csomópont aktivitás változásának daganatbiológiai szerepe, az anyagcsereváltozások tumorbiológiai jelentősége és az in vitro és in vivo kísérletek eredményeinek értelmezése in situ patológiai vizsgálatok segítségével. Az irodalmi összefoglalót szép és informatív ábrák teszik érthetőbbé.

A „Célkitűzések” fejezetben a jelölt 8 pontban foglalja össze az elmúlt 20 év során megfogalmazott kutatási irányokat, amelyek aztán a publikációk és az „Eredmények” fejezetben leírtak alapján meg is valósultak.

A „Módszerek” fejezetben, a dolgozat többi részének megfelelően magas szakmai színvonalon, 18 oldalon keresztül, a kutatások során használt rendkívül heterogén módszerekről, a vizsgált beteganyagról olvashatunk informatív és reprodukálható leírást. A leírásból érezhető, hogy Sebestyén Anna valóban aktívan közreműködött a laboratóriumi munkákban, a statisztikai értékelésekben és a betegmintákkal kapcsolatos feladatokban is. A megértést és a reprodukáltságot 3 nagy táblázat és 2 ábra segíti.

Az „Eredmények” a dolgozat leghosszabb, legérdekesebb és egyben leginformatívabb része. A magas szakmai színvonal itt sem vitatható, én itt is csak egy szerkesztési hiányosságot említek meg. Az eredmények leírásából hiányzik a saját hivatkozás, azaz nem tudhatjuk meg közvetlenül, hogy a leírt kutatások hol és mikor jelentek meg. Pedig ez, az olvasó számára komoly segítséget jelentene a leírtak megértéséhez, értékeléséhez. Ha valami az értekezés magyar szövege, ábrái alapján nem teljesen érthető, nagy segítséget jelenthetne, ha könnyen utána lehetne nézni az eredeti, angol nyelvű publikációkban. Az egyik témával kapcsolatban (Poszttranszplantációs vesedaganatok mTOR aktivitásának jellemzése, tacrolimus kezelés hatása) nem is tudtam beazonosítani a kapcsolódó publikációt.

A dolgozat számos, nemzetközileg is jelentős eredményt mutat be. Kutatócsoportjának egyik jelentős eredménye, hogy elsőként igazolták myelomás sejtekben a mevastatin kezelés dózis- és időfüggő apoptózist indukáló hatásait. A statinok antitumor és kemoterápiát erősítő hatásai klinikai szempontból is igen jelentősek, hiszen az egyik leggyakrabban felírt, legjobban ismert gyógyszer családról van szó, melyek mellékhatásai általában enyhék, jól tolerálhatók, főleg ha a kemoterápiás szerek mellékhatásaival hasonlítjuk össze. A 68. oldalon én úgy értelmeztem, hogy a 19. ábrán a *Bcl-2* gén expresszió csökkenését láthatjuk, de ha jól láttam ez ott nem szerepel. Ezen az ábrán informatívabb lett volna, ha jelölésre kerül, hogy melyik különbség mutatkozott statisztikailag szignifikánsnak.

In vitro és in vivo is kimutatták az immunszuppresszív hatású mycophenolsav proliferáció gátló és apoptózis indukáló hatását humán lymphoma sejtvonalakban és SCID egerekben lymphoma xenograftokkal.

Szintén elsőként végezték el a hazai poszttranszplantációs beavatkozásokkal összefüggésben megjelenő tumorok jellemzését. In vitro és in vivo igazolták a tacrolimus mTOR és mTORC2 aktivitás fokozó hatásait ischaemiás modellekben, illetve a tacrolimus egyes vesecarcinoma sejtek potenciális proliferáció fokozó hatásait is kimutatták. Eredményeik megerősítik azt a gyakorlatot, hogy transzplantációt követően, a kezdeti felépülési időszak után célszerű minél előbb áttérni mTOR gátló alapú immunszuppressziós terápiára.

Jelentős NOTCH1 szignál aktivitást mutattak ki Hodgkin lymphomákban, míg NHL sejtvonalakban és CLL sejtekben nem tapasztaltak ilyet. Ez az útvonal potenciális rapamycin+gamma-szekretáz inhibitor célpont, azonban ezek tesztelése különböző tumorokban csak ritkán bizonyult sikeresnek. A jelölt kutatócsoportjának eredményei arra utalnak, hogy az ilyen kezelés csak igazolt NOTCH1 aktivitás esetében lehet sikeres, ehhez viszont megfelelő biomarkerekre lenne szükség, de a NOTCH szignálok és ligandok aktivitásának térképezése nem könnyű feladat.

A 27. ábrán belül található táblázat értelmezéséhez segített volna annak megadása, hogy a táblázatban megadott számok az apoptotikus sejtek százalékos arányát mutatják. Itt sikerült beazonosítanom a releváns cikket, ebben szerepel ez az információ. Az ábrák feliratait sokszor nehezen értelmezhetőek, például az ábrákon belüli „al-ábrákra” utaló a,b,c, stb. időnként a szöveg előtt van, máskor meg mögötte. Számomra könnyebben értelmezhető, ha előtte van.

Sebestyén Anna és kutatócsoportja a kétezres évek elején elsőként vizsgálta humán lymphoma sejtvonalakban a TGF $\beta$  indukált apoptózis mechanizmusait. Leírták, hogy az indukált apoptózis a halál receptor, és egyes mitokondriális fehérjék mennyiségi változásaitól független módon kaszpáz aktiváció mellett jön létre. Igazolták a mitokondrium depolarizáció jelentőségét és azt, hogy ebben a Bid hasítás, a Bax transzlokációnak van szerepe. Elsők között mutattak rá lymphomákban az alternatív TGF $\beta$  jelátviteli útvonalak, illetve a jelátviteli hálózat összefüggéseinek jelentőségére a legkülönbözőbb negatív szabályozó faktorok hatásainak kiesésében. Jellemezték az mTOR aktivitás gátlás, valamint a rapamycin TGF $\beta$  szenzitizáló hatását lymphomákban.

Az eredmények között mind mennyiségben, mind minőségben, illetve számomra érdekességben kiemelkedik az mTOR aktivitás változások tumornövekedést segítő daganatbiológiai szerepének vizsgálata. Ebben a témakörben nagyon sokféle eredményük született (összesen 14 publikáció), számosat közülük a világon a kutatócsoport írt le elsőként. A rengeteg érdekes és értékes eredmény közül itt csak néhányat említek meg. Általánosan el lehet mondani, hogy több tumornál igazolták, hogy az mTOR aktivitás változásainak fontos prognosztikai jelentősége van. Különböző markerekkel elkülönítették egymástól az mTORC1 és mTORC2 komplexeket, és azt is igazolták, hogy a kétféle mTORC komplex aktivitás változásainak más prognosztikai jelentősége lehet. Több daganattípusban, így lymphomákban, diffúz nagy B sejt lymphomában, coloncarcinomákban, különböző tüdődaganatokban és rhabdomyosarcomákban igazolták az mTORC2 aktivitás és a rossz prognózis összefüggéseit. Több daganattípusban kimutatták a rapalógok kemoterápia szenzitizáló hatását. Bizonyították, hogy Rictor (mTORC2 komplex vázfehérje) expresszió esetén, rapamycin rezisztencia léphet fel, illetve mTORC1 gátlás mellett bizonyos esetekben mTORC2

aktivitás emelkedést lehet megfigyelni. Számos eredményüknek komoly klinikai következménye lehet, így például az mTORC2 hiperaktivitást mutató, terápiarezisztens tumorokban az újgenerációs duál mTOR inhibitorok hatásosak lehetnek. Ezt támasztja alá az a megfigyelésük, hogy a vistusertib (mTORC1 és C2 gátló) legalább 40%-kal csökkentette a proliferációt az összes általuk vizsgált tumor sejtvonalban.

Szintén nagyon érdekesek és értékesek azok a vizsgálatok, amelyeket a tumorok terápiarezisztenciájának hátterében álló mechanizmusokat vizsgálták. Tanulmányozták azokat az alkalmazkodási lehetőségeket, amelyek az mTOR-hiperaktivitással és a metabolikus adaptációs mechanizmusokkal vannak összefüggésben. Kimutatták egyes tumorok metabolikus plaszticitását. Megállapították, hogy egyes tumorok többféle metabolikus útvonalat képesek hasznosítani, ami nagyfokú alkalmazkodásukat teszi lehetővé a legkülönbözőbb stressz hatásokkal, a terápiás kezelésekkel szemben. Ez biztosíthatja egyes tumorsejtek túlélését, majd a későbbi recidívák, metasztázisok kialakulását, ami a betegek rosszabb prognózisával függ össze. Ezeknek az eredményeknek is van terápiás jelentősége, hiszen felveti annak a lehetőségét, hogy az mTOR kombinált gátlása nemcsak a hagyományos vagy célzott kezelésekkel, hanem akár más metabolikus kezelésekkel kombinációban meggátolhatja a daganatok növekedését. A jelölt olyan kombinációk lehetőségét is felvetette, amelyekben az egymást kiegészítő metabolikus hatásokkal el lehetne vágni az alkalmazkodás útvonalait, így metabolikus katasztrófát indíthatnak el a tumorsejtekben. Ehhez kapcsolódnak azok az eredmények is, amelyekben a doxycycline antibiotikum, amely a mitokondriális funkciókat gátolja, különböző kombinációkban hatékonyan gátolta több tumorsejtvonal növekedését.

Az eredmények utolsó alfejezetében a jelölt bemutatja azokat a metodikai fejlesztéseket, amelyekkel a legkülönbözőbb metabolikus katasztrófák indukcióját 3D modellekben, illetve 3D bionyomtatott daganatszövet-szerű struktúrákban lehet tesztelni. Ezeknek a fejlesztéseknek is nagy jelentősége van, hiszen a hagyományos tumormodellek nem adják vissza a tumorok in vivo komplexitását, ami miatt a klinikai fázisban sokszor ideálisnak tűnő gyógyszerfejlesztések buknak el.

A tézisek, eredeti megfigyelések összefoglalása, VI. fejezet 147. oldalán egy valószínű elírás található: „*a p-Ser473-Akt fehérje emelkedett mennyisége (mTORC1 target fehérje) összefüggést mutatott a rossz prognózissal...*”. A dolgozat többi része alapján a p-Ser473-Akt fehérje az mTORC2 aktivitás jele.

Az értekezéssel kapcsolatos kérdéseim:

1. Használják-e a statinokat, vagy a doxycycline-t tumoros betegségek kezelésében? Ha igen melyikben, ha nem, miért nem?
2. A glutamin a tumorok egy részének potenciális energiaforrásai. Glutamin táplálékkiegészítő fogyasztását gyakran javasolják kemoterápia alatt, a platinaszármazékok neuropatiás

mellékhatásainak enyhítésére, amelyet a kemoterápia abbahagyása után is, a tünetek megszűnéséig javasolnak fogyasztani. Nem növeli ez meg a tumor kiújulásának veszélyét?

3. Van-e arra információ, hogy az újgenerációs duál mTOR inhibitoroknak milyen a mellékhatásprofilja a rapamycinnel összehasonlítva?

4. Milyen metabolikus hatású gyógyszerek kombinációinak tesztelését javasolná különböző tumor-ellenes terápiákban?

Az értekezés és a megadott publikációk alapján a következőket fogadom el a jelölt saját tudományos eredményeként:

1. Elsőként igazolták a mevastatin myeloma sejtek proliferációját gátló és apoptózis indukáló hatásait.

2. Elsőként igazolták a mycophenolsav dózis- és időfüggő proliferációt gátló és apoptózist indukáló hatását lymphomákban.

3. Kimutatták több daganatsejtvonalban a rapalógok, mTOR kináz gátlók pozitív, terápiás érzékenyítő hatásait.

4. Igazolták az mTORC2 hiperaktivitás emelkedését és szignifikánsan magasabb mértékét poszttranszplantációs vesedaganatokban.

5. Ischaemiás modellekben igazolták a tacrolimus mTOR és mTORC2 aktivitás fokozó hatásait, illetve kimutatták a tacrolimus vesecarcinoma sejtek proliferáció fokozó hatását.

6. Méréseik alapján valószínűsítették, hogy a rapamycin+gamma-szekretáz gátlás csak igazolt NOTCH1 aktivitás esetében lehet sikeres, ehhez viszont megfelelő biomarkerekre lenne szükség.

7. Elsők között mutattak rá lymphomákban az alternatív TGF $\beta$  jelátviteli útvonalak, illetve a jelátviteli hálózat összefüggéseinek jelentőségére a legkülönbözőbb negatív szabályozó faktorok hatásainak kiesésében.

8. Több tumornál igazolták, hogy az mTOR aktivitás változásainak fontos prognosztikai jelentősége van. Különböző markerekkel elkülönítették egymástól az mTORC1 és mTORC2 komplexeket, és kimutatták, hogy a kétféle mTORC komplex aktivitás változásainak más prognosztikai jelentősége lehet.

9. Az mTOR aktivitás változásokkal összefüggésben számos daganattípusban írtak le jellegzetes metabolikus változásokat, amelyek felhívják a figyelmet a bioenergetikai szubsztráthasznosítás és metabolikus változások progressziós jelentőségére.

10. Elsőként igazolták a gliomák speciális glutamin és GABA oxidációs képességeit és ezzel összefüggő emelkedett SSADH expresszióját, illetve a GABA hasznosítás proliferáció fokozó hatásait.

11. Elsőként mutatták ki a különböző metabolikus támadáspontú kezelések (pl. rapamycin + doxycycline) tumornövekedést gátló hatásait.

12. Kutatócsoportja, Magyarországon elsőként, metodikai fejlesztéseket hajtott végre, amelyekkel a legkülönbözőbb metabolikus katasztrófák indukcióját 3D modellekben, illetve 3D bionyomtatott daganatszövet-szerű struktúrákban lehet tesztelni.

Összefoglalva megállapítom, hogy Sebestyén Anna MTA doktori disszertációja nemzetközileg is igen magas színvonalú kutatómunka eredményeit tartalmazza. A jelölt munkássága jelentősen hozzájárul a tumorokban lejátszódó biokémiai folyamatok megismeréséhez, a terápiarezisztencia mechanizmusainak megértéséhez és a sikeresebb terápiák fejlesztéséhez. Mindezek alapján a doktori értekezés elfogadását, a nyilvános védés kitűzését és a cím odaítélését javaslom.

Budapest, 2021. 11. 26.

Dr. Szalai Csaba, MTA doktora, egyetemi tanár  
Semmelweis Egyetem  
Genetikai Sejt és Immunbiológiai Intézet  
Heim Pál Kórház