

Bírálat Wiener Zoltán „Organoid technológián és állatmodelleken alapuló vizsgálatok gasztrointesztinális tumorokban” című MTA doktori értekezéséről

Dr. Wiener Zoltán a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai intézetének Molekuláris Onkobiológiai Kutatócsoportját vezeti. MTA doktori értekezése ezzel a tematikával koherens, az értekezés alapját képező 12 közlemény közül 7 a kutatócsoport munkájából készült, folytatva azt a kutatási irányt, amelyet a pályázó Kari Alitalo laborjában posztdokorként megkezdett.

A 12 közlemény magas (ill. közülük kettő kiemelkedő) impakt faktorú folyóiratokban jelent meg, ehhez mérhető idézettséggel. Néhány újabb közlemény idézettsége még nem túl magas, így ezeknek a tudományos visszhangja hosszabb idő távlatában lesz pontosabban mérhető. A jelölt összes tudományos közleményeinek száma a MISEV2018 guideline-tól eltekintve 40, ezekre 600 feletti független idézetet kapott, h indexe 22. Ezen közlemények felében első, vagy utolsó szerző, ami figyelemre méltó.

A dolgozatba került 12 közlemény között is tízben terminális szerző a jelölt, ezek tematikailag két fő területet fednek le. A posztdoktori munka és ahhoz kapcsolódó későbbi finnországi kutatások a kolorektális tumorok – tumor őssejtek Prox1 és TGF β általi szabályozása köré csoportosulnak. Az önálló témavezetőként végzett hazai kutatások fókuszában is gasztrointesztinális tumorok állnak, és felbukkannak a már ismerős molekuláris szabályozó elemek, de a repertoár kibővül az anyaintézmény extracelluláris vezikula (EV) profiljával.

A 141 oldalas doktori mű ugyan tartalmaz néhány elütést, nyelvtani pontatlanságot, és megtévesztő megfogalmazást, de összességében olvasható, sőt az eredményekhez érve kifejezetten olvasmányos. A *Rövidítések jegyzékét* rövid *Összefoglalás* követi, melyből kiderül, hogy sok érdekes dolgról szó lesz a későbbiekben, de talán e nagyfokú diverzitásnak köszönhetően itt még nem kapunk átfogó, koherens képet az ismertett munkáról. A *Bevezetést* követő 10 oldalnyi *Irodalmi áttekintés* a későbbiekben vizsgálandó tumorok és fontos molekuláik néhány releváns vonását ismerteti, értelemszerűen itt nem lehet teljes képet adni a terület nagyfokú komplexitása miatt. A *Célkitűzések* ismertetése után az *Anyagok és módszerek* fejezet mindössze 4 oldal, az esszenciális aspektusokat említi röviden, s a részleteket illetően a közleményekhez irányít. Bár ez a metodikákban kevésbé jártas olvasó számára nem okvetlenül könnyíti meg a mű befogadását, a csaknem százoldalas *Eredmények és megbeszélésük* fejezet láttán már belátjuk, hogy ez a rövidített módszertani fejezet a mű terjedelmét segít keretek között tartani, még akkor is, ha az igen érdekes, sőt, értékes és modern módszerekről is szívesen olvasnánk többet. Az eredmények alfejezetekbe történő rendezése jól sikerült, az értekezést megalapozó közlemények egyes részeinek ezen alfejezetekhez való hozzárendelése logikus. Ezek olvasása kapcsán izgalmas történetek kerekednek ki a kolorektális és hasnyálmirigy tumorok, ill. azok őssejteinek szabályozási

folyamatairól, és az extracelluláris vezikulumok ebben játszott szerepéről. Külön dicséretet érdemel a minden alfejezet végén megjelenő diszkusszió, mely jelentősebb ismétlések nélkül is lehetővé teszi a bemutatott eredmények kontextusba helyezését. Az eredményeket illusztráló ábrák szépen szerkesztettek, jól követhetőek, az ábraszövegek részletessége hatékonyan segíti az interpretációt. Az értekezés formátuma sajnos nem teszi lehetővé a nagyobb feloldású mikroszkópos képek mellékelését, azonban így is dicséretes a képek minősége, és a bennük rendszeresen feltüntetett méretskála, még akkor is, ha ennek mérete nem mindig került be az ábraszövegbe. Az *Összefoglalás és kitekintés* 4 oldalon ismerteti a főbb eredményeket, és azok potenciális felhasználhatóságát, jelentőségét. Ezt bőséges *Irodalomjegyzék* követi.

Mivel a dolgozat szakmai helytállóságát a közlő folyóiratok magas színvonala eleve biztosítani hivatott, a bíráló abban a szerencsés helyzetben van, hogy saját kíváncsiságát kielégítendő tehet fel kérdéseket. Ezek a következők:

Érdekes szinergizmus figyelhető meg az IGF-1R gátlása és a TGF β stimulus között ami koherens a KRas-okozta apoptózis rezisztenciával. Ismert-e a két szignálút konvergenciája a BIM indukcióján (ill. annak gátlásán) kívül?

Mivel magyarázható, hogy az Akt foszforiláció KRas jelenlétében fokozódik (Apc WT sejtekben), noha a kanonikus Akt útvonal a Ras-tól upstream indul (és az itt bemutatott munka is PI3K függetlenségre utal)? Mivel magyarázható, hogy bár a TGF β ebben az organoid modellben az Akt foszforilációt serkenti (23e ábra), mégis fokozza az apoptózist?

A 30c ábrán nagyon érdekes az EMT-jellegű fenotípus váltás a IV. kollagén I.-re történő cseréje kapcsán. Kísérik-e ezt a jelenséget más, EMT-re jellemző expresszóm változások? Ismert-e, hogy milyen szignál folyamatok állhatnak a háttérben? Ennek fényében egy klinikai tumor esetén elképzelhető-e, hogy a fokozott I. kollagén termelés ilyen úton vezet fokozott metasztatikus képességhez? Hasonló mechanizmusra utaló eredmények ismertek-e PDAC-ban, ahol az I. kollagén szintén fokozza az EV szekréciót?

Van-e adat arról, hogy előrehaladott kolorektális karcinómákban is független-e az EV szekréció az exogén Wnt-től, mint PDAC esetén.

A kísérletek azt sugallják, hogy az amfiregulin az EV-k membránjához kötött (antitesttel blokkolható), majd az 58. ábrán ez megerősítést nyer, azonban az ábra az EV internalizációját is mutatja. Lehet-e tudni, hogy ez már a ligand-receptor kölcsönhatás eredménye, vagy, ha ettől függetlenül is internalizálódnak az EV-k, mikor és hogyan valósul meg a ligand-receptor kötés és a szignalizáció?

Az bemutatott organoid modellek nem tartalmaznak stróma és immunsejteket. Mivel az eredményekből kiderül, hogy a fibroblasztok és epitheliális sejtek kölcsönösen használják az EV-eket a másik populáció befolyásolására, a kokultúrás vizsgálatokon túl lát-e lehetőséget az eddigi kutatásai kiterjesztéseként (hosszabb távon) komplexebb organoidok létrehozására? Egy ilyen modell pl. segíthet eldönteni, hogy a peritumorális fibroblasztok vannak aktivált állapotban, vagy a CRC CAF-ok vesztik el fenotípusukat az önálló tenyésztés során.

Ismert-e az IFITM1 EV-fevételt gátló (kvázi protektív) szerepe egyéb, egészséges hámszövetek őssejtjeiben?

Mivel a hasnyálmirigy adenokarcinómára ismerten immunszuppresszív tumor mikrokörnyezet jellemző, kíváncsi lennék, hogy a PDAC-ban és a krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban egyaránt előforduló miRNS-ek közül lehet-e valamelyiknek immun-moduláló szerepe.

Végezetül, az értekezésben prezentált kísérletes munka alábbi megállapításait javaslom új eredményként elfogadni:

1. A *Prox1* deléciója csökkenti az adenoma és a CRC őssejtpopulációk méretét, míg az *Apc* mutáció miatt magas Wnt aktivitás a *Prox1* expresszióját indukálja, a *Prox1*+/*Lgr5*+ sejtek függetlenné válnak a normál bélhám őssejt niche-ben fontos Notch útvonal aktivitásától, és az intenzívebb autofágiának köszönhetően hipoxiás körülmények között jobb túlélést mutatnak. A $CKI\alpha$ kiütésével megnövelt Wnt aktivitás a p53 hiánya esetén az epitelsejtekben megjelenő alacsony szintű gyulladásos fenotípust átalakítja tumorgátlóból a tumor növekedését serkentő folyamattá.

2. A $TGF\beta$ a Bim pro-apoptotikus fehérjén keresztül fejt ki apoptotikus hatását, melyben az őssejt aktivitással rendelkező *Lgr5*+ adenoma sejtek is érintettek. Míg az *Apc* inaktiválása növeli az adenomasejtek $TGF\beta$ szenzitivitását, a *KRas* onkogén részleges rezisztenciát okoz. A BH3-mimetikumok sejtthálalt indukálnak olyan késői CRC betegekből származó organoidokban is, melyek már rezisztenciát mutatnak a $TGF\beta$ apoptotikus hatásával szemben.

3. Az intesztinális organoidok EV szekrécióját az *Apc* mutáció és a Wnt magas aktivitása, illetve az ECM összetételének változása módosítja. A $CD44^{high}$ CRC sejtek több EV-t szecernálnak, mint a $CD44^{low}$ sejtek. A Wnt aktivitás hasnyálmirigy duktális organoidokban is indukálja az EV kibocsátást, ugyanakkor a külső Wnt forrástól független késői PDAC mintákban ez a kapcsolat nem bizonyítható.

4. Az intesztinális kripták körüli fibroblasztok amfíregulint tartalmazó EV-eket bocsátanak ki, melyeknek közvetlen hatásuk van az *Lgr5*+ őssejtek proliferációjára, valamint a $KRAS^{WT}$ és $BRAF^{WT}$ kolorektális carcinómák proliferációját is indukálják amikor az EGF jelátviteli út még

normális működésű. Az IFITM1_{low} sejtek nem csak több EV-t vesznek fel, hanem az EV-knek nagyobb a hatása az IFITM1_{low} sejtek proliferációjára.

5. A PDAC organoidokból származó és a vérben keringő EV-k miRNS cargo-ja között átfedés van. A miR-21 és a miR-195 nagyobb mennyiségben van jelen a PDAC vérplazma EV mintáiban a kontrollokhoz képest, bár ezek a miRNS-ek nem specifikusak a PDAC-ra. Az I-es típusú kollagén felhalmozódása az ECM-ben lényegesen magasabb EV szintet eredményez a hasnyálmirigy duktális organoid tenyészetekben.

Az értekezés egészét mérlegelve azt nyilvános vitára alkalmasnak tartom, sikeres védelem esetén az MTA doktora tudományos fokozat odaítélését támogatom

Debrecen, 2023. december 18.



Vereb György