

## Válaszok Prof. Bödör Csaba opponensi kérdéseire

Mindenek előtt szeretném megköszönni Professzor Úrnak, hogy időt szánt a doktori dolgozat bírálatára. Kérem fogadja az alábbiakban a kérdésekre adott válaszaimat.

### 1) Léteznek-e már a Prox1 célzására akár preklinikai vizsgálatok/adatok?

Tudomásom szerint a Prox1 célzására nem folynak preklinikai vizsgálatok tumoros betegekben. Érdekes módon a Prox1 által szabályozott gének szövetspecifikusak, így a limfatikus rendszerben, és vastag- és végbélrákban (CRC) a Prox1 által szabályozott gének között gyakorlatilag nem figyelhető meg átfedés [1]. A Prox1 szövetspecifikus funkciójára utal továbbá az is, hogy kifejeződése az Apc mutáció által abnormálisan indukált Wnt útvonal hatása alatt áll CRC-ben, amely szabályozás májtumorokra nem igaz [1]. Egy korábbi vizsgálatunkban beállítottunk egy high-throughput screen rendszert, és egy kb. 3000 vegyületet tartalmazó kémiai könyvtár tesztelésével olyan hatóanyagokat kerestünk, amelyek eltérő hatást mutattak a Prox1-et expresszáló és nem expresszáló sejtek között. Adataink azonban nem eredményeztek egyértelmű jelöltet (nem publikált eredmények). Alternatív lehetőség a Prox1 által szövetspecifikusan szabályozott géntermékek célzása, amely stratégia esetében azonban számolni kell azzal, hogy a Prox1 elsősorban represszor funkcióval rendelkezik [1, 2], vagyis a Prox1 által kikapcsolt géneket ismét be kellene kapcsolni, amely nem egyszerű feladat.

### 2) Mi alapján választották ki a 14 miR-t az EV izolálás és a detektált miRNS-ek közötti összefüggés vizsgálatára?

Vizsgálatainkban első lépésként csak néhány miRNS-nek organoid EV-beli előfordulását vizsgáltuk. Ehhez a munkacsoportunkban, illetve az intézetben elérhető TaqMan miR assay-k közül azokat választottuk ki, amelyek i) irodalmi adatok alapján CRC sejtekben jelen vannak, vagy ii) megtalálhatók voltak az EV adatokat tartalmazó Vesiclepedia (microvesicles.org) adatbázis CRC mintáiban.

### 3) A tumor mikrokörnyezet szerepe a daganatok progressziójában, sőt bizonyos terápiákra adott válaszában mára egyértelműnek tűnik, mégsem látjuk ezen megközelítések térnyerését a mindennapi terápiás gyakorlatban. Mit gondol mi a tumor mikrokörnyezetet célzó, moduláló terápiás megközelítések elterjedésének gátja, várható ennek kapcsán áttörés a közeljövőben?

A tumorok mikrokörnyezete rendkívül heterogén, amelynek egyik érdekes példája a pancreas ductális adenokarcinóma (PDAC) tumor-asszociált fibroblasztjainak (CAF) eltérő populációi, a myCAF és iCAF sejtek [3, 4]. Az  $\alpha$ -simaizom aktint ( $\alpha$ SMA) expresszáló myCAF-okkal ellentétben az iCAF sejtekre gyulladáscsökkentő citokinek (pl. IL-6, IL-11, LIF) szekréciója jellemző, és ez utóbbi populáció a tumorsejtektől távolabb helyezkedik el [3]. Az iCAF-myCAF csoportok jelenlétét más tumortípusokban is igazolták, CRC-ben azonban ellentmondásosak az irodalmi adatok. Henner Farin munkacsoportja adatai arra utalnak, hogy a CAF-beli Wnt aktivitás központi az iCAF és myCAF kialakulásában [5]. Saját eredményeink szerint CRC-ben elkülöníthetők például a CD142<sup>high</sup> és CD142<sup>low</sup> CAF sejtek, amelyek azonban kevert iCAF-myCAF expressziós mintázattal jellemezhetők. Emellett bár a TGF $\beta$  és az IL-1 $\alpha$  fontos az iCAF-myCAF polarizációban PDAC-ben, CRC esetében a TGF $\beta$  a CAF-ok aktiválódását eredményezte, a CD142<sup>high</sup> CAF populáció méretének emelkedésével, ugyanakkor nem találtunk egyértelmű iCAF-myCAF eltolódást sem TGF $\beta$ , sem pedig IL-1 $\alpha$  kezelés esetében [6].

Bár több irodalmi adat is arra utal, hogy a CAF-ok a tumorigenezist támogató hatással rendelkeznek, PDAC-ban végzett közelmúltbeli munkák azonban azt mutatták, hogy a CAF-oknak gátló funkciója is lehet. Ezek a vizsgálatok nagyrészt az  $\alpha$ SMA-pozitív sejtek genetikai módszerekkel való eltávolítására, a sonic hedgehog (SHH) genetikai deléziójára, vagy a smoothened (SMO) farmakológiai gátlására

összpontosítottak, amelyek a Hedgehog (Hh) útvonal kulcsfontosságú szereplői [7]. A Hedgehog gátlása szubklinikai modellben megváltoztatta az iCAF/myCAF arányt PDAC-ben, és gátolta a tumor növekedését [8]. Mivel ez az útvonal a fibroblasztokban aktív, a tumorsejtekben viszont nem, így ígéretes célpont lehet.

A CAF-ok központi szerepet játszanak annak a niche-nek a létrehozásában is, amely az agresszív fenotípussal rendelkező tumorsejtek kialakulását eredményezik [9]. Bár az ún. tumor össejtekről jelenleg is intenzív tudományos vita zajlik, az intra-tumorális sejtes heterogenitás létrehozásában központi szerepet játszanak a fibroblasztok. Az általuk termelt faktorok (pl. CRC-ben Wnt-ek, az EGF család tagjai, vagy a hepatocita növekedési faktor, HGF) azonban a normál szöveti össejt niche kialakításában is fontosak, amely korlátozza a terápiás célzásuk lehetőségét. Mindazonáltal a CAF-ok heterogenitásának feltérképezése, az egyes alpopulációk tulajdonságainak megértése, illetve az általuk kialakított speciális tumor mikroniche molekuláris elemzése elvezethet olyan specifikus molekulák azonosításához, amely által egyes CAF alpopulációk gátolhatók.

4) Az EV-k kutatása egy ideje az orvosi biológiai kutatások egy legizgalmasabb területét jelenti. Milyen lehetséges klinikai előrelépésről tud a Jelölt beszámolni, mely daganattípus esetén a legelőrehaladottabbak a vizsgálatok a lehetséges (korai) diagnosztikus vagy prediktív biomarkerként való alkalmazás kapcsán?

A PDAC betegek több, mint 90%-a mutációt hordoz a *KRAS* onkogénben. Egy tanulmány például genetikailag szerkesztett, a mutáns G12D *KRAS*-t célzó shRNS-sel feltöltött EV-eket alkalmazott PDAC egér modellben, amely hatásosnak bizonyult [10], és az EV-k terápiás alkalmazhatóságára enged következtetni.

2023. december 15-én 178, EV-eket érintő klinikai vizsgálat volt megtalálható a [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) weboldalon. Az EV-k főbb alkalmazásai a biomarker azonosítás, az EV alapú terápia, a gyógyszer-célzó rendszerek fejlesztése és a tumor vakcinák. 39 vizsgálat tumorokkal kapcsolatos, amelyek közül 6 lezárt: retinoblasztómával, nem kissejtes tüdőrákkal, szájüregi és prosztatarákkal kapcsolatosak, publikált eredmények nélkül. Más tumortípusoknál már előrehaladottabb fázisban tart az EV-k vizsgálata: az ExoDx prosztata teszt (Bio-Techne, <https://www.exosomedx.com/patients/exodx-prostate-test>) már a piacon elérhető, az USA-ban hozzáférhető, exoszómákon alapuló, vizeletből elvégezhető vizsgálat annak felmérésére, hogy mekkora a klinikailag jelentős, vagy előrehaladott prosztatarák jelenlétének az esélye.

5) Az EV-k izolálására és detektálására alkalmazott eljárások mennyire kerültek ma már standardizációra, mennyire tekinthetők már homogénnek, megbízhatónak az eredmények? Milyen előrelépések történtek e téren az elmúlt időszakban? (A Jelölt említést tesz e potenciális limitációról a dolgozat kitékintés részében)

Az utóbbi évtizedben jelentős előrelépés történt az EV-k izolálásának, illetve jellemzésének standardizációja területén. A Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság (International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) Rigor & Standardization állandó albizottsága (<https://www.isev.org/rigor-standardization>) széleskörű nemzetközi standardizációs tevékenységet végez, és az EV-kkel kapcsolatos tudományos eredmények reprodukálhatóvá tételén is dolgozik. Az ISEV által kezdeményezett, az EV-kkel foglalkozó szakemberek által széleskörűen támogatott MISEV2018 [11] és a MISEV2023 ajánlások (publikálás alatt) is hozzájárultak a standardizációhoz és az eredmények reprodukálhatóságának emelkedéséhez. Ezen ajánlások részletes irányelveket fogalmaznak meg, hogy milyen EV szeparációs eljárások esetében milyen kontrollok alkalmazására és minőségellenőrzésre van szükség, ugyanakkor a minta típusa és rendelkezésre álló mennyisége alapvetően befolyásolja az

elvégezhető ellenőrzési lépéseket. Ezért rendkívül fontos, hogy a tudományos közleményekben részletesen ismertessék az EV izolálás lépéseinek részletes dokumentációját.

A standardizáció és a klinikai tisztaságú EV preparátum előállítására ugyanakkor jelentős próbálkozások vannak PDAC esetében is [12]. Mivel a legtöbb esetben a terápiás irányú vizsgálatokhoz az EV-ket mezenchimális őssejtekkel (MSC) termeltetik, az egyes MSC-k közötti varianciát is standardizálni kellene, amely azonban nem megoldott.

6) A BH3 mimetikumok témakörében tett megfigyelései kapcsán merül fel, hogy van-e esetleg klinikai eredmény a hematológiai daganatokban jól alkalmazható BH3 mimetikum, a venetoclax alkalmazásáról CRC-ben?

Egy érdekes megfigyelés szerint a normál colon epitélisejtek Bcl-2-től függenek, a CRC progressziója során azonban a tumorsejtek Bcl-xL dependensek lesznek [13]. Mivel a venetoclax elsősorban a Bcl2-t célozza, így a Bcl-xL-re nagyobb specifitást mutató BH3 mimetikumok, mint például az A1155463, alkalmasabbnak tűnnek a CRC esetében. Egy nemrég publikált tanulmány is erre a következtetésre jutott egér modellekben [13]. Egy másik közlemény szerint míg a Bcl-xL célzása önmagában is hatásos volt CRC sejtekben, ez nem volt érvényes a Bcl-2-re és az Mcl-1-re [14]. Saját vizsgálatunkban az A1155463 erősen szinergisztikus hatást mutatott más hatóanyagokkal, mint például az epigenetikai gátló JQ1, a MEK inhibitor trametinib, vagy a Hsp90 gátló PU-H71 [6]. Emellett a Bcl-xL gátlása FGFR4 által közvetített menekítési választ indukál CRC-ben, amely felveti annak a lehetőségét, hogy az FGFR4-et is párhuzamosan gátolni kell a maximális hatás eléréséhez [15].

A clinicaltrials.gov adatbázis alapján azonban Norvégiában például zajlik egy klinikai teszt (NCT05725200), amelynek célja annak bemutatása, hogy a metasztatikus CRC-ben szenvedő betegeknél megvalósítható az egyéni terápia kiválasztása a betegből készített organoidok széles körű genomiális és transzkriptomikai profilozása, valamint gyógyszerérzékenységi vizsgálata alapján. Ebbe a tesztbe a Venetoclax-ot is be kívánják vonni.

#### Felhasznált irodalom

1. Petrova TV, Nykanen A, Norrmen C et al. Transcription factor PROX1 induces colon cancer progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype. *Cancer Cell*. 2008;13:407-419.
2. Hogstrom J, Heino S, Kallio P et al. Transcription Factor PROX1 Suppresses Notch Pathway Activation via the Nucleosome Remodeling and Deacetylase Complex in Colorectal Cancer Stem-like Cells. *Cancer Res*. 2018;78:5820-5832.
3. Biffi G, Oni TE, Spielman B et al. IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGFbeta to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2019;9:282-301.
4. Ohlund D, Handly-Santana A, Biffi G et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med*. 2017;214:579-596.
5. Mosa MH, Michels BE, Menche C et al. A Wnt-Induced Phenotypic Switch in Cancer-Associated Fibroblasts Inhibits EMT in Colorectal Cancer. *Cancer Res*. 2020;80:5569-5582.
6. Soos AA, Kelemen A, Orosz A et al. High CD142 Level Marks Tumor-Promoting Fibroblasts with Targeting Potential in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023;24.
7. Biffi G, Tuveson DA. Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. *Physiol Rev*. 2021;101:147-176.
8. Steele NG, Biffi G, Kemp SB et al. Inhibition of Hedgehog Signaling Alters Fibroblast Composition in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*. 2021;27:2023-2037.
9. Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*. 2010;12:468-476.
10. Kamberkar S, LeBleu VS, Sugimoto H et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*. 2017;546:498-503.

11. They C, Witwer KW, Aikawa E et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7:1535750.
12. Mendt M, Kamerkar S, Sugimoto H et al. Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. *JCI Insight*. 2018;3.
13. Ramesh P, Lannagan TRM, Jackstadt R et al. BCL-XL is crucial for progression through the adenoma-to-carcinoma sequence of colorectal cancer. *Cell Death Differ*. 2021;28:3282-3296.
14. Luo MJ, Palmieri M, Riffkin CD et al. Defining the susceptibility of colorectal cancers to BH3-mimetic compounds. *Cell Death Dis*. 2020;11:735.
15. Ramesh P, Di Franco S, Atencia Taboada L et al. BCL-XL inhibition induces an FGFR4-mediated rescue response in colorectal cancer. *Cell Rep*. 2022;38:110374.

Végezetül ismét köszönöm a Bírálónak a dolgozatom értékelését, és kérem a fenti válaszaim szíves elfogadását.

Budapest, 2024. január 8.



Wiener Zoltán