

Opponensi vélemény

Dr. Weiner Zoltán: „Organoid technológián és állatmodelleken alapuló vizsgálatok gastrointesztinális tumorokban” című MTA doktori értekezéséről

A kolorektális karcinóma (CRC), valamint a pancreas duktális adenokarcinóma (PDAC) magas mortalitással járó, kiemelt népegészségügyi problémát jelent, tekintve gyakori előfordulását (CRC), valamint rendkívül agresszív klinikai lefolyását (PDAC). Az elmúlt években, a genomikai technológiák exponenciális fejlődésének következtében a malignus megbetegedések kialakulásának megértésében és kezelésében is előrelépés történt. Bár a genetikai profilalkotás a fentebb említett két entitás esetében számos patomechanikai kérdésre választ szolgáltatott, kialakulásuk és pontos mechanizmusuk mindmáig nem teljesen ismert. A jelenség hátterében kiemelt szerepet tölthet be az intratumorális heterogenitás, valamint az extracelluláris vezikulák is, melyek potenciális terápiás célpontként/eszközként is szolgáltatathatnak. Mindezeket figyelembe véve a doktori értekezés témája rendkívül aktuális, az alkalmazott metodológia (organoid) nemcsak hazánkban, de nemzetközi szinten is elsők között került alkalmazásra, ezáltal a mű úttörő jellegűnek tartható.

A munka középpontjában az entitások hátterében álló patomechanizmusok felderítése áll, különös tekintettel az extracelluláris vezikulák (EV) kibocsátását, valamint ún. cargoját befolyásoló tényezőkre. A dolgozatban bemutatott eredmények technológiai szempontból a legújabb, rendkívül széles innovatív platformokra épülnek. A munka során in vivo egérmodellek, valamint különböző organoidok (intesztinális organoidok, hasnyálmirigy duktális organoidok, CRC és PDAC beteg eredetű organoidok) is felhasználásra kerültek. A módszertani paletta emellett tartalmaz lentivirális transzdukciót, áramlási citometriát, sejtszortolást, whole-mount immunfestést, RT-qPCR-t, microarray-t, low-density miRNA array-t, Western-blot-ot, valamint konfokális mikroszkópiát is. A számos metodikát felvonultató dolgozatban a módszerek részletekbe menő ismertetése helyett a szerző 4 oldalban tömören és lényegre törően foglalta össze az alkalmazott legfontosabb technikákat.

Eredményeit 9 fő csoportra osztva, a legfontosabb következtetések hangsúlyozásával, rendkívül részletesen összesen 100 oldalban foglalja össze, az alábbiak szerint:

1. A Prox1 a tumor-öszejtpopuláció méretét szabályozza és elősegíti a daganat progresszióját CRC-ben.
2. A driver mutációk módosítják az intesztinális adenómasejteknek a TGF- β által kiváltott, Bim-mediált apoptózisra való érzékenységét.
3. Az EV-k szekréciója az Apc mutáció és más CRC progressziós faktorok befolyásoló hatása alatt áll.
4. Az EV kibocsátás korrelációt mutat a Wnt aktivitással egér hasnyálmirigy duktális sejtekben, de nem mutatható ki kapcsolat humán PDAC organoid modellben.
5. A CD44 expressziós szintje különböző EV kibocsátási intenzitással rendelkező CRC sejtpopulációkat jelöl.
6. Az EV-k EGF aktivitást közvetítenek a bélhámósejt niche-ben.
7. A fibroblasztokból származó EV-k a CRC sejtek osztódását indukálják amfiregulin szállítása által.
8. Az IFITM1 expresszió intenzitása eltérő EV felvétellel jellemezhető CRC sejtpopulációkat jelöl.

9. Átfedő miRNS profil organoid és vérplazma eredetű EV-k között PDAC-ben.

Az eredmények részletes összefoglalását követően a szerző tézisszerű felsorolásban 8 új tudományos megfigyelést tesz:

1. A PROX1 vagy valamely általa szabályozott géntermék fontos hatással bírhat CRC-ban. A szerző és munkacsoportja kimutatták, hogy a PROX1-pozitív sejtek egy alcsoportja összejt aktivitással rendelkezik intestinális adenómában, valamint kolorektális carcinómában. További vizsgálataik során kimutatták, hogy az Apc mutáció következtében kialakuló magas Wnt aktivitás a Prox1 expresszióját indukálja, továbbá bizonyították, hogy tumor xenograft modellben vizsgálva a Prox1+ sejtek jobb túléléssel rendelkeztek kedvezőtlen körülmények között, ami az intenzívebb autofágiának tudható be.

2. A TGF- β által kiváltott apoptózis mechanizmusának tanulmányozása során a szerző és munkatársai bizonyították, hogy a TGF β a Bim pro-apoptotikus fehérjén keresztül fejt ki apoptotikus hatását. Emellett rávilágították, hogy a BH3 mimetikumok sejthalált indukálnak olyan késői CRC betegekből származó organoidokban is, melyek már rezisztenciát mutatnak a TGF β apoptotikus hatásával szemben.

3. Az extracelluláris vezikulák szekrécióját befolyásoló hatások vizsgálata során bizonyították, hogy az extracelluláris-mátrix változása mellett, az APC mutáció jelenléte, valamint a Wnt magas aktivitása is fontos szerepet tölt be.

4. Az intratumorális sejtes heterogenitás vizsgálata során kimutatták, hogy amaz fontos szerepet játszik az extracelluláris vezikulák kibocsátásának mértékében.

5,6. A CRC-ban kiindulópontnak tekinthető Lgr5+ őssejteken végzett vizsgálatok során kimutatták, hogy az intestinális kripták körüli fibroblasztok amfiregulint tartalmazó extracelluláris vezikulákat bocsátanak ki, melyeknek közvetlen hatásuk van az Lgr5+ őssejtek proliferációjára. Emellett igazolták, hogy ezen extracelluláris vezikulák amfiregulin transzportjuk által a CRC sejtek proliferációját is indukálják a CRC tumorigenezis azon fázisában, amikor az EGF jelátviteli út még normális működésű.

7. Az intratumorális sejtes heterogenitás további vizsgálata során a szerző és kutatócsoportja bizonyította, hogy a sejtfelszíni IFITM1 expresszió meghatározza az EV felvétel mértékét CRC-ban, valamint hogy az IFITM1 fontos szereplő az EV felvétel gátlásában. Ezen eredményeik alapján arra a fontos megállapításra jutottak, hogy bizonyos CRC sejt alpopulációk eltérő EV felvételi képességgel rendelkeznek, melyet mindenképpen figyelembe kell venni az EV alapú célzó eszközök tervezésekor.

8. Végül pancreas adenocarcinómával kapcsolatos kutatásai során a szerző bizonyítja, hogy a mutációk mellett az extracelluláris mátrixban bekövetkezett változások is kritikusan módosíthatják az extracelluláris vezikulák felszabadulását.

A bíráló az új tudományos megfigyeléseket megalapozottnak tartja és elfogadja.

Tudományometriai szempontból az értekezés alapjául szolgáló közlemények száma összesen 12 lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemény. Az előbb felsoroltak közül 2 esetben első-szerzős közleményről, míg 7 esetben utolsó-szerzős közleményről beszélhetünk. A 12 közlemény összesített impakt faktora: 135,241. A Jelölt a tudományos eredményeit kiváló folyóiratokban közölte.

A dolgozat formai értékelése:

A dolgozat egy számos pontra alapozott, gondosan összeállított „Tartalomjegyzék-ke” indul (3. oldal), melyet a „Rövidítések jegyzéke” követ (4-6 oldal). Tekintettel, hogy az alkalmazott szaknyelv számos rövidítést használ, a rövidítések jegyzéke teljes mértékben indokolt, és kielégítően részletes. Ezt követően egy tömör, 1 oldalas összefoglaló következik (7. oldal) melyet a 8 pontba szedett, szintén tömör 10 oldalas bevezetés követ (10-19 oldal). A Jelölt a 20. oldalon 7 pontban fogalmazza meg célkitűzéseit. Az „Anyag és módszer” fejezetben a Jelölt mindösszesen 4 oldalban tömören és lényegre törően foglalja össze az alkalmazott legfontosabb, az eredmények megértéséhez nélkülözhetetlen metodikákat kiemelve, hogy azok részletes leírása a vonatkozó referenciában megtekinthető. Ezt követi a közel 100 oldalas, rendkívül részletes „Eredmények és megbeszélésük” fejezet, melyben a szerző 8 pontban mutatja eredményeit. Az alpontban taglalt eredmények végén, minden esetben megtalálható a vonatkozó alpont megbeszélése is, amely rendkívüli módon hozzájárul a dolgozat könnyebb megértéséhez. Ezt követően a Jelölt 4 oldalban foglalja össze a dolgozat legfontosabb következtetéseit (124-127 oldal).

Összességében a dolgozat gondosan és igényesen megszerkesztett mű, az eredmények követhető formában, célratorően vannak bemutatva. A szemléltetést 73 ábra segíti. A hivatkozások száma bőséges és összetétele naprakész.

A dolgozathoz kapcsolódó kérdéseim:

- 1) Léteznek-e már a Prox1 célzására akár preklinikai vizsgálatok/adatok?
- 2) Mi alapján választották ki a 14 miR-t az EV izolálás és a detektált miRNS-ek közötti összefüggés vizsgálatára?
- 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?
- 4) Az EV-k kutatása egy ideje az orvosbiológiai 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?
- 5) Az EV-k izolálására és detektálására alkalmazott eljárások mennyire kerültek ma már standardizációra, mennyire tekinthetőek már homogénnek, megbízhatónak az eredmények? Milyen előrelépések történtek e téren az elmúlt időszakban? (A Jelölt említést tesz e potenciális limitációról a dolgozat kitekintés részében)
- 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?

A bíráló véleménye, hogy Dr. Wiener Zoltán doktori habitusa és az értekezésben bemutatott több mint tíz éves konzekvens és a nemzetközi tudományos vérkeringésbe is beépülő eredmények alapján az igényesen összeállított értekezés javasolható a nyilvános vitára, és sikeres védés esetén az MTA doktora fokozat odaítélése messzemenően támogatható. A magas színvonalú munkához tisztelettel gratulálok!



Dr. Bödör Csaba
egyetemi tanár, MTA doktora
Semmelweis Egyetem
Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet

Budapest, 2023. október 2.