

## OPPONENSI VÉLEMÉNY

**Buzás Krisztina:** „*Daganatok kommunikációs stratégiái az immunrendszer válaszáinak tükrében*” című MTA doktori értekezéséről

A dolgozatban a tumor és mikrokörnyezet valamint a tumort jelző biomarkerek kutatásában elért eredményeket tárgyalja, amely aktuális és kiemelkedően fontos kérdés napjainkban is.

A dolgozat elején a gyulladás és az IL-24 citokin szerepét elemzi a tumor elleni immunvédekezés szempontjából. Az ezt követő fejezetekben már kevésbé immunológiai, mint inkább proteomikai és általános biológiai szempontból vizsgálja a melanoma és központi idegrendszeri daganatok exosomák (EV) útján történő kommunikációs útvonalait. A melanoma esetében a különböző kemoterápiás kezelések hatását vizsgálja egy in vitro rendszerben az EV és a tumor ill. a mezenchimális össejt, mint mikrokörnyezet kommunikációjára. Predikciós megközelítéssel indul, majd azt igyekszik kísérleti körülmények közt igazolni. A központi idegrendszeri tumorok esetében egy EV szinten használható tumor progressziót jelző biomarkert szeretne megtalálni. Ehhez predikciós mintázatfelismerő informatikai elemzésekből indul ki, majd komplex proteomikai, miRNS és génexpressziós analíziseket végez. Ezen új megközelítés alapján eljut a tumorok, mint komplex, többdimenziós biológiai rendszerek megismerésében a „composit biomarkerek” alkalmazásához. Ez az individuális betegség diagnosztika és terápia szempontjából egy új módszertan, amelyre törekvés a jelölt munkájában előremutató és újszerű.

A dolgozatot 9 saját közleményre alapozza, melyekből egy „To the editor” jelzésű, egy közlemény eredményei pedig nem találhatóak meg a dolgozatban. Ez alapján a dolgozat új tudományos eredményeket és hiteles adatokat tartalmaz.

**Formai szempontok:** 109 oldalas a dolgozat, jó tagolással, alfejezetekre osztva mutatja be az eredményeket. Elírás, értelemzavar ritka: pl. sraffolás nekem szokatlan kifejezés, vagy a 43. oldalon tumor sztóma a tumor stróma helyett, sebészeti reszekció rezekció helyett. Az FFPE rövidítés magyarázata nem szerepel sem a rövidítések jegyzékében sem a szövegben magyarázatként. Nehezíti az eligazodást a dolgozatban, hogy az eredményeknél a nagy fejezet címek nem kerültek kiemelésre.

### Általános bírálat

A „Bevezetés” fejezet 1 oldal, amely nem igazán téma és problémafelvetés, hanem az elért eredmények leírása 4 bekezdésben.

*Szakirodalmi áttekintés:* 20 oldal, 4 alfejezetre tagolódik. Először bemutatja a TLR-ek és ligandjaik szerepét a makrofág aktivációban és polarizációban, azok jelentőségét a tumor mikrokörnyezetben. A második alfejezetben az IL-24 hatásait és jelentőségét taglalja tumoros mikrokörnyezetben. A következő két fejezet a mikrovezikulák jellemzőit, szerepét tárgyalja melanoma és központi idegrendszeri tumorok összefüggéseivel.

*Célkitűzések:* 7 pontban írja le a tervezett munkákat. Az első pontban a TLR ligandok makrofág aktiváló szerepét, majd az IL-24 immunsejtekre gyakorolt hatásait célzó vizsgálati tervet fogalmazza meg. Ezután 5 pontban a mikrovezikula és tumor progresszió összefüggéseit célzó munkákat tűzi ki célul. A „mikrokörnyezeti stresszorok” kifejezés a célkitűzésekben jelenik meg először, előzetes magyarázat nélkül.

*Eredmények és diszkussziójuk:* 62 oldal, magyarázó ábrákkal, a csatolt közlemények alapján. A csatolt közleményekben könnyebb eligazodni az eredmények és anyag és módszer összefüggéseit illetően. Ugyancsak sajnálatos, hogy a magyarra fordított komplex ábrák logikája a széttagolás miatt elveszett.

*Anyagok és módszerek:* 17 oldal. Nehezen követhető, hiányosak a lírások, némely módszer leírása teljesen hiányzik. pl. sebzáradási assay, sejtproliferációs assay.

Közel 250 irodalmi hivatkozást csatol, melyben kevés az új 2022-23-as irodalom.

### **Scientometriai szempontok**

Összes közleményinek száma 46, a PhD óta megjelent 42, ebből első szerzős 7, utolsó szerzős 12, összesített impakt faktor 202,4, független idézettség: 3373, Hirsch index: 17. Mindezen mutatók alapján megállapítható, hogy jelölt tudományos aktivitása megfelelő, meghaladja az MTA doktori eljárásban elvárt küszöbértékeket

### **Részletes bírálat, kérdések**

Az **Eredmények első fejezetében (3.1)** az anti-bakteriális és anti-tumor immunválasz hasonlóságaira keres alátámasztó adatokat és kísérleti rendszert. Furcsa módon a 3.1.1. alfejezetben melynek címe „A bakteriális antigének hatása a daganatos mikrokörnyezet makrofágjainak polaritására” egy melanomás beteg esetét ismerteti, nincs benne adat a makrofág polarizációra. A beteg kórtörténetét az 1.sz táblázatban időrendben mutatja be, valamint a 4. ábrán képalkotó (UH, CT, MRI) eljárással készített képeket mutat be, melyeken a bíráló számára elvárható jelölések nem szerepelnek. Ugyancsak itt mutat be egy bakteriális génexpressziós qPCR vizsgálatot ami igazolja a *C. pneumoniae* jelenlétét a beteg primer tumorszövetében, vagyis a bőr un. FFPE mintáiban.

1. A *C. pneumoniae* primeren tüdő pathogén. Mivel magyarázza a bőrszövetben a baktérium jelenlétét és mi lehet a hatása a melanoma sejtekre?

A 3.1.2. fejezet célja, hogy a humán kórtörténet alapján kidolgozzon egy in vivo állatmodellt a megfigyelés igazolására. A modellben C57BL/6 és NSG immunhiányos egereket oltottak B16F1 melanoma sejtekkel, majd intranazálisan ismételtelen kezelték az állatokat hőinaktivált *C. pneumoniae*-vel és kontrol felülúszóval. A fejezet első mondatában azt a célt tűzi ki, hogy az adaptív immunrendszer szerepét vizsgálja a tumor progresszióban. Ugyanakkor mind a génexpressziós vizsgálatok, mind a citokin/kemokin fehérje expressziós vizsgálatban makrofág eredetű markereket vizsgált teljes tüdőszövet lizátumban. Sem T sem B limfocita CD marker vagy citokin vizsgálat sem történt. Az immunsejt infiltráció kifejezés a szövettani ábrák magyarázatakor is ugyanezt a bizonytalanságot jelzi.

2. Irodalmi adatok szerint a *C. pneumoniae* hőinaktiválása csökkenti a fertőzött sejtek ICAM1 és citokin expresszióját (S.A. Vielma Circulation Research. 2003;92:1130–37, Jun Yang Infection and Immunity 2003. 72.620). Mennyire lehet ezt összefüggésbe hozni azzal, hogy a hőinaktivált *C. pneumoniae* az in vitro kísérletekben képes a CXCL-1 semlegesítésére? . A CXCL1 kemokint a melanoma sejtek is jellemzően termelik. Összefügghet-e a *C. pneumoniae* tumor progressziót és metasztázist gátló hatása ezen kemokin neutralizálásával? A *C.*

pneumonia in vitro CXCL1 semlegesítő hatása ezen baktérium törzsre specifikus, vagy egyéb baktériumok is képesek ezt a hatást előidézni?

A CD80 és CD11b mint aktivációs marker is a veleszületett immunrendszer sejtjeinek aktivációját jelzi. A *C. pneumoniae* által okozott CD11b expresszió emelkedés nem feltétlenül jelent anti-tumor hatást. Ugyanis a CD11b egyúttal C3b komplement receptor 3-ként (CR3) is funkcionál és ligand kötés hatására anti-inflammatorikus citokin termelést eredményez. Ezért nem egyértelmű a *C. pneumoniae* M1 irányú makrofág polarizációt okozó hatása tumoros mikro környezetben, mert a C3b-vel opsonizált baktérium fagocitózisa anti-inflammatorikus hatást eredményezhet. Ugyancsak hiányolom az 5. ábra szövettani anyagának magyarázatából a mintavételi időpontokat.

3. A 3.1.3. fejezetben a 6a. és b. ábrán nem világos, hogy az idő skála (0-15 óra), valójában mit jelent? Ugyanis az anyag és módszer fejezetben leírtak alapján a *C. pneumoniae* inhalációt a 7, 9, 11, 14 és 16. napon végezték. A mintavétel az első inhaláció (7. nap) után 2 órával, a 2. inhaláció (9. nap) után 4 órával, a 3. inhaláció (11. nap) után 12 órával és 24 órával az 5. inhaláció (17. nap) után történt. Ez alapján kizárólag a 2. inhaláció után 4 órával mutatható ki makrofág M1 transzkriptum emelkedés? Ugyanakkor a COX1-COX2 arány változás a 12 óras (3. inhaláció utáni) mintában kerül ábrázolásra. Mivel magyarázza ezt?

4. **A 3.2. fejezetben** humán rekombináns IL-24 kemotaktikus hatását vizsgálja először in vitro humán neutrofil és monocita tenyészetekben, majd in vivo egér kísérletekben. Milyen mértékben homológ a humán és egér IL-24? Van-e különbség a humán és egér IL-24 receptorok szerkezetében és funkciójában?

5. A 8. ábrán az in vitro kísérletekben, és a 9. ábrán bemutatott in vivo eredmények is azt mutatják, hogy a 10 és 1 ng/ml IL-24 koncentráció kisebb kemotaktikus aktivitást eredményez, mint a 0,1 ng/ml és annál kisebb koncentrációk? Mivel magyarázható ez?

6. Gátlószerek alkalmazásával humán leukocitákon azt találta, hogy mind G-protein mind MEK és JAK-inhibitor hatására is szignifikánsan gátlódik a monocita migráció. Hogy magyarázza ezt a szignalizációs jelenséget?

7. **A 3.3 fejezetben** az extracelluláris vezikulák és a tumor kapcsolatáról keres alátámasztó bizonyítékokat. Elsőként jellemzi az egér B16F1 melanoma sejtvonal által termelt exosomákat méret (SEM képek), expresszált markerek (CD9, CD63, CD81 és Hsp70 WB) és fehérje tömegspektroszkópiás analízis és miRNS szekvenálás alapján. Milyen melanoma specifikus markereket sikerült azonosítani? A Western blot-al azonosított 4 exosoma markerből a fehérje profil analízisben csak kettőt tudtak azonosítani. Mivel magyarázható ez?

8. A melanoma exosomával kezelt MSC 40 féle daganatos transzformációval kapcsolatos gén gPCR vizsgálata alapján a legtöbb gén expressziója már 24 óránál is emelkedett és 72 óra múlva tovább emelkedik. Ugyanakkor néhány gén 24 óránál csökkenést mutat és nem vagy csak a 72 óras mintában mutat emelkedést. Mely gének mutatták ezt a csökkenést? Mi lehet ennek a magyarázata?

9. A citosztatikumok (Doxorubicin és Ag-TiO<sub>2</sub>) a tumorsejtek osztódásának gátlásával hatnak. Ez a tumorsejtek pusztulásához vezet. Miért meglepő, hogy a tumorsejtekből több EV szabadul fel? Milyen ezeknek az apoptotikus sejtekből származó exosomáknak a sejtfelszíni marker

expressziója és fehérje profilja a miRNS változások mellett? Elképzelhető-e az in vitro citosztatikummal kezelt tumorsejtekből származó sEVk in vivo tumorgátló hatása?

10. A különféleképpen kezelt EV-k hatása a mezenhimális őssejtek (MSC) Ki-67 expressziójára IPA-predikció (21. ábra) bizonyítására elvégzett immuohisztokémiai vizsgálatnál hiányolom a képeket. Az oszlopdiagramon mutatott Ki-67 expresszió változások oly minimálisak, hogy gyakorlott mikroszkópos értékelő számára megkérdőjelezi ezen különbségek (13% vs 16%) biológiai jelentőségét.

11. A ctrl és Ag ctrl sEV között, ha jól értem a fénykezelés a különbség. Milyen hatást gyakorolhat a fénykezelés a sEV-ra? Mi az oka annak, hogy a két ctrl nem ugyanazt a hatást mutatja a sejtciklusra, sőt a ctrl sEV inkább a Doxo kezelt sejtekből származó sEVk hatásához hasonlít?

Összességében a 16. 21, 23 25 és 27 ábrán mutatott in silico IPA-predikciós ábrákat szerencsésebb lett volna a bizonyítási kísérlettel és eredményével együtt, egy komplex ábrán mutatni, ahogy az a közleményben is történt.

12. A 28. ábrán mutatott szövet szferoid képződésre gyakorolt ctrl és kezelt sEV hatás esetén csökkent a szferoid térfogata. Felvetődik, hogy ez a zsugorodás miért történik és a sejtek életképessége hogy változott a kezelés hatására? Ugyanis minden paraméter esetében a Doxo kezelt sEV okozta a legjelentősebb hatást. Lehetséges-e, hogy a méretcsökkenés a sejtek pusztulása miatt van?

13. A sEV-k mint jelerősítők a KIR-i tumorok diagnosztikájában fejezetben összehasonlítja a szérumban és EV-ben kimutatható fehérjék expresszióját. A 311 fehérjéből 17 a sEV-ban míg 10 a szérumban mutatott legnagyobb csoportközi eltérést, de a legtöbb nem szövetspecifikus biomarker. Ugyanakkor számos fehérje gyengébb intenzitással jelent meg a sEV-ban, mint a szérumban. Az eredmények alapján nem látom, hogy milyen különbségeket talált a glioblastoma és a kissejtes tüdőrák agyi metasztázisában szenvedő betegcsoportok között? Ezen utóbbi tumor heterogenitása és a tüdőben levő primer tumorból származó sEV szerepe mennyire került megfontolásra?

14. A sEV-ban mért MMP-9 egy nagyon általános gyulladáshoz köthető marker. A sEV-ban mért MMP9 tartalom mennyire korrelál a tumor mérettel? Összefüggés-e ez a túléléssel kapcsolatos 33. ábrán bemutatott eredménnyel? Retrospektív elemzés erre a következtetésre nem alkalmas.

15. A KIR-i tumorok esetében a Raman spektroszkópiával történő sEV elemzése a tumorok eltérő eredetéből, biológiai tulajdonságaiból és sejtes összetételéből adódó különbségeket mutattak. Mennyiben segítheti egy ilyen módszer a radiológiai és szövettani diagnózist? Alkalmas lehet-e tumor markerként történő alkalmazásra és esetleges progresszió előre jelzőnek?

### **Új megállapítások:**

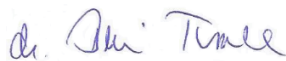
1. Egér melanoma modellben a hőinaktivált *C. pneumoniae* ismételt intranazális alkalmazása csökkentette a tüdőben a tumor góccok számát feltételezhetően a CXCL1 direkt kötése révén okozva átmeneti M1 makrofág polarizációt.
2. Bizonyította, hogy az IL-24 kemotaktikus hatással van a monocitákra és neutrofil granulocitákra, amely mind G-protein, mind a MAPK/JAK jelátviteli útvonalon zajlik.

3. Kimutatta, hogy melanoma sejt eredetű extracelluláris vezikulák a mezenchumális őssejtekben mRNS és fehérje szinten is kimutatható melanoma sejtekre jellemző útvonalak és molekulák expresszióját eredményezi.
4. Kemoterápiás szerrel kezelt melanoma sejtekből megváltozott mennyiségű, és miRNS és fehérje expressziójú sEV-k izolálhatók, melyek megváltoztatják a MSC és a melanoma sejtek osztódását, elősegítik a daganatsejt migrációját valamint a mikroszövet képzési kapacitását.
5. Központ idegrendszeri tumorok esetén a szérumban sEV MMP9 mennyisége jellemző a tumorok elkülönítésére és prognosztikai szerepe is lehet.
6. Raman spektroszkópiás módszerrel a központi idegrendszeri tumoros betegek szérumaiból izolált sEV-k alkalmasak composit biomarker meghatározásra és a betegcsoportok szövettani diagnózison alapuló csoportokba sorolására.

### **Összefoglalás, javaslat**

Tekintettel arra, hogy jelölt sikeres elméleti és klinikai kollaborációs kutatómunkát végzett az elmúlt években, korábbi tudományos fokozata megszerzése óta végzett önálló munkássága magas színvonalú és kellően bizonyított, valamint a fent felsorolt pontok vonatkozásában új, hiteles és eredeti tudományos megfigyelésekkel járult hozzá a tumor kommunikációs stratégiák felderítése terén, javaslom az értekezés nyilvános vitára tűzését, és sikeres védelem esetén részére az *MTA doktora* cím odaítélését.

Pécs, 2024. 02. 07.



Dr. Berki Timea

*MTA doktora*

Pécsi Tudományegyetem, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Tel.: 36-30-9718102

e-mail: berki.timea@pte.hu