

## **Vélemény dr. Buzás Krisztina „Daganatok kommunikációs stratégiái az immunrendszer válaszáinak tükrében” c. MTA doktori értekezéséről**

A rákkutatás a 2000-es években fordulóponthoz érkezett mivel az előző évtizedek kutatási eredményei a daganatimmunológiában végre áttöréshez vezettek a rosszindulatú betegségek kezelésében is az új immunterápiák napi rutin terápiába való bevezetésével. Ez annak ellenére bekövetkezett hogy még mindig számtalan nyitott kérdés maradt és ezek részben felelősen azért is hogy ezek az új terápiák még hatékonyabbak lehessenek illetve hogy még többféle daganatfélésegekben lehessen alkalmazni őket. Ennek fényében különösen értékes és érdekes a jelölt munkássága (42 angol cikk a PhD megszerzése után) és disszertációja amely a mikrobiológia és immunológia területén folytatott kutatásairól szól amelyek során a exosomák szerepét kitüntetően tanulmányozta.

A disszertáció a munkásság publikációs szempontból 1/5-ét mutatja be (9 angol cikk) melyek között egy Letter to the Editor is van ami nem peer reviewed anyag, bár nagyon érdekes (J Invest Dermatol). Miután csak 9 közlemény került ebbe a válogatásba megjegyzendő továbbá hogy ezek közül a 2012-es Immunology Lettersben megjelentet a disszertáció nem tárgyalja így ténylegesen a disszertáció csak 7 angol nyelvű közleményre épül ami elfogadható volna ha azok egyetlen terület kutatási eredményei lennének, de ezek meglehetősen szerteágazó tematikájúak amelyeket csak részben köt össze a daganatok exosomája.

Formailag a disszertáció 108 oldal terjedelmű amelynek 1/3-a bevezetés és 50 oldal az Eredmények és az ezzel összevont Discussió is. Ez oldalszámra megfelelő volna, de tartalmilag igazán nincsen Discussió, az elért eredmények nincsenek tágabb kontextusba helyezve főleg friss irodalmakkal összevetve. Ezzel kapcsolatban nehezményezem az idős irodalmak túlsúlyát (2000-2010). Az immunológia és az onkoimmunológia gyorsan fejlődik és fontos lett volna pozicionálni a jelölt munkásságát és eredményeit.

Egy általános megjegyzés még hogy a jelölt tudományos alapfogalmakat meglehetősen szabadossággal használ ami sokszor nagyon félreérthető. Másrészt az egész disszertációban bár daganat elleni immunválasz elemzéseit történnek, egyszer sem láttam legalább fogalmilag tisztázni hogy ennek két formája van (mint mindenféle immunválasznak) a veleszületett és a szerzett forma aminek az egyes témákban igen is lehet jelentősége.

*A jelölt 7 pontban foglalta össze célkitűzéseit amelyek közül az első a TRL ligand C. pneumoniae hatásainak elemzése szerepel egy klinikai melanóma eset kísérletes elemzése révén.*

*a második célkitűzés az IL-24 immunsejtek migrációjára gyakorolt hatásainak elemzése volt*

*a harmadik célkitűzése daganatsejt-eredetű ECV-exosomák tartalmának és biológiai hatásainak elemzése volt*

*a negyedik és ötödik ezzel kapcsolatban a mikrokörnyezeti stresszorok ECV-k összetételére gyakorolt hatásainak elemzése volt*

*a hatodik a központi idegrendszeri daganatok (humán) által termelt ECV-k elemzése volt, míg a hetedik célkitűzés a központi idegrendszeri daganatok diagnosztikáját elősegítő új eljárás kidolgozása volt.*

Ezen 7 célkitűzés megvalósítása mögött 8 nemzetközi közlemény eredményei álltak.

Az első célkitűzés megvalósulása egy melanómás beteg C. pneumoniae sepsisére bekövetkezett csodás regressziója állt, amelynek kísérletes elemzése egér melanóma tüdőmetasztázis modelljében került elemzésre. ekkor azt találták hogy a tüdőmetasztázisok az inaktivált C. pneu. adására regrediáltak és azokban CD11b/CD80 immunsejt populáció jelent meg.

***Kérdés: ezek az infiltráló sejtek (CD11b/CD80) milyen sejtpopulációt jelentettek?***

A jelölt elemezte hogy a C. pneumoniae kezelés m2/M1 macrophag polarizációs átmenetet okoztak amit a citokin és kemokín profil eltolódásával igazolt.

A következő célkitűzés megvalósítására IL-24 kezelt különféle immunsejtek migrációját elemezte. Megjegyzendő hogy több helyen is leukociták megjegyzés szerepel valamint hogy a kísérletekben a neutrofil leukociták migrációjának indukcióját is kimutatta...mely sejteket nem tekintenek immunsejteknek. Minden esetre azt találta hogy az IL-24 hatására indukált monocita és limfocita migráció indukció G-protein által mediált, ami új megfigyelés.

***Kérdés hogy mely IL-24 receptor vagy a/b alegység lehet ezért felelős, miután valamennyi receptora JAK-STAT jelpályán szignalizál.....***

A következő vizsgálat az egér B16 melanóma ECV/exosoma termelés elemzése és jellemzése volt. Sajnos nem lehet semmit tudni arról hogy ez a melanóma melyik típusú emberi melanóma genetikai megfelelője? Mi a driver onkogénje? (BRAF, NRAS, KIT???)

Az ECV-k elemzésekor számos fehérjét találtak amelyeket IPA analízisnek vetett alá. A fehérjék között számos melanosomális volt (DCT, tyrosinase, TYRP1, MREG, PME2) amit az IPA nem vett észre.

***Kérdés: milyen kapcsolat lehet az ECV-k termelése és a melanosoma képzés között a melanóma sejtekben?***

Az ECV-kben emellett számos MIR-t is azonosított, amelyek között a *let* család is megjelent amelyek a RAS onkogén inhibitorai. Vajon ez azt jelenti hogy ezek a RAS jelpálya modulációjáért lennének felelősek?

A melanóma-ECV-k hatásait MSC sejtek viselkedésére tesztelte és az egyik fő állítás az hogy ezek az ECV-k transzformálták (ráadásul malignusan) ezeket, melynek bizonyítéka a MSC sejtek proliferációjának fokozódása és az apoptotikus képesség csökkenése volt. Legjobb tudásom szerint transzformációt in vitro is lehet elemezni, de ez a kontakt gátlás elvesztését, a klonogenicitás megjelenését jelenti de az igazi bizonyíték a tumorigenicitás megjelenése amit állatokba való beoltás révén lehet tesztelni....

***Kérdés: melanóma ECV-k valódi transzformációt okoztak MSC sejtekben?***

A jelölt azt állította hogy itt az MSC-k onkogén átprogramozódása következett be mert a melanóma onkogének jelentek meg az MSC-kben mRNS és fehérje szinten. Az onkogén szót meglehetősen szabadossággal használta a jelölt. Ezek elsősorban proto-onkogének, NRAS, MET, KIT valamint szupresszor gén RB1. A kettő között a diferencia az hogy az onkogének mutáltak vagy amplifikáltak.

***Miután itt RNS alapú expressziós vizsgálat volt észlelt-e mutációt bennük a jelölt?***

A talált gének nagy része a normális sejtekben is funkcionáló, adott esetben az ECM kölcsönhatásokban alapvető adhéziós molekula volt, amelyek a sejt migrációban is szerepelnek, de ettől még nem onkogének. Nagyon érdekes megfigyelés volt hogy a melanóma ECV-k az MSCben PD1 expressziót indukáltak.

***Vajon milyen szignalizációs útvonal felhasználásával történhetett ez meg?***

3.3.4. Melanóma exosomák in vivo tumorigenezise: itt szó szerint idéztem az Eredmények fejezetből egy alcímet. A kísérletben azt vizsgálták hogy a melECV és az ezekkel módosított MSC-k befolyásolják-e a B16 melanóma áttétképző képességét... Ennek semmi köze sincs a tumorigenezishez, ami a malignus transzformációt jelenti, de itt már transzformált daganatsejteket használt a jelölt. Az eredmények igen érdekesek mert főleg a módosított MSCk fokozták az áttétképzést, esetleg még szokatlan szervekbe is. Maguk az MSC-k pedig kimutathatók voltak nyirokcsomókban, MSC daganat nem jelent meg, szóval nem transzformálódtak malignusan.

A következőkben daganat-eredetű ECVk sajátosságait elemezte (NPC és melanóma) melyeket kemoterápiás kezelés (Doxo), oxidatív stressznek illetve hőshocknak tettek ki. Kimutatták hogy fokozódik ezek stresszek hatására az ECV termelés. Részletesebb elemzésnek a melanóma ECV-eket tették ki. Ezek az ECVk az MSC sejtek növetkedését megváltoztatták a stressz típusától függően. Érdekes azonban az oszlopdigrammokat közlelről szemügre venni mert a statisztikai különbségek mögött minimális biológiailag jelentős változások álltak, másrészt 24 órás proliferációs tesztet nem illik végezni mert a ciklusidők miatt irreális, a 48/72 órás tesztek érdekesek elsősorban ebből a szempontból. Megjegyzendő hogy a sejtciklus elemzések is elsősorban a Doxo hatására bekövetkező szignifikáns lassulást jelentettek.

***Ezzel kapcsolatban kérdezem hogy a DOXO átkerülhetett az ECV-ke a kezelt daganatsejtekből?***

Nagyon érdekes hogy a daganatos ECVk az endothelsejtek migrációját fokozták a legnagyobb mértékben....A 3D kokultúrákban azt tapasztalták hogy a daganatos ECV-k a DOXOval kezelt sejtekből gátlást míg a többi stresszor fokozódást váltott ki.

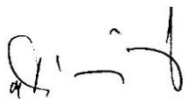
A következőkben az un. „központi idegrendszeri daganatok” szérum és ECV összehasonlítását végezte LC-MSMS segítségével. Itt érdekes megállni egy pillanatra. A klinikai beteganyag kétféle rosszindulatú daganatot tartalmazott, a GBM-et és a tüdőrák áttéteket. Sajnos azonban az un. NSCLC a valóságban két szövettanilag és genetikailag teljesen eltérő daganatból, laphámrák és adenocarcinoma áttétekből állt. A másik probléma hogy jóindulatú daganatként meningeomát használtak amelynek semmi köze sincs szövettanilag és genetikailag a GBM-hez, amelynek prekuzora vagy jóindulatú megfelelője az astrocitóma, aminek viszont végképpen nincsen köze a tüdőrákhoz. Ezért aztán óvatosan kell értékelni a kapott biomarker eredmények gyakorlati hasznát. Az nagyon érdekes ugyan akkor hogy az ECV alapú vizsgálat érzékenyebbnek bizonyult mint a vérből történő és az is hogy az MMP9 egy jó GBM prognosztikai markernek bizonyult.

Ezen vonalon tovább haladva Raman spektroszkópiával is elemezte az ECV-k lehetséges biomarker szerepét, ami igen ígéretes új irányzat lehet, azonban ehhez is arra van szükség hogy a választott daganatcsoportok relevánsak legyenek, különben ugyan jelentős differenciákat fokunk kapni csak a klinikai kérdések megválaszolásához nem tudnak közelebb vinni.

Összefoglalva

A disszertáció szerteágazó daganatkutatási és immunológiai eredményekről számol be amelyeket főleg a daganat eredetű exosomák elemzése kötnek össze. Legfontosabb új eredményeknek tűnnek a *C.pneumoniae* által kiváltott melanóma ellenes immunválasz elemzése tűnik. Emellett az IL-24 jelpályájának új útvonala a G-proteinhez köthető is érdekes eredmény. Az (egér)melanóma ECV-k összetételének és biológiai hatásainak elemzése is izgalmas amely elsősorban a daganatos progresszió fokozásának kimutatását jelentette. Az ECV alapú diagnosztika szempontjából talán figyelemre méltó az MMP9 ECV-ből történő meghatározása GBM esetében ami klinikailag hasznosíthatónak tűnik. A többi eredmény egyfajta preliminary eredménynek tekinthető, amelyek további részletes elemzések kiinduló pontjai lehetnek. Mindezek alapján a disszertáció nyilvános vitára bocsájtását javaslom és sikeres védelem esetén a fokozatszerzést is támogatom.

Budapest, 2024. február 8.



dr. Tímár József, az MTA doktora

professzor emeritus