

Dr. Döme Balázs

## A kissejtes tüdőrák molekuláris altípusai: biológia, heterogenitás és terápia

című MTA Doktori értekezésének bírálata

1) Dr. Döme Balázs 1997-ben szerzett általános orvosi diplomát, majd 2004-ben PhD fokozatot a Semmelweis Egyetemen. Az Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérletes Rákkutató Intézetben helyezkedett el, 1998-ban Heidelbergben volt tanulmányúton. 2004-től az OKPI Tumorbiológiai Osztályát vezette, 2007-ben nevezték ki osztályvezető főorvosnak. 2009 óta vendégprofesszor és vezető kutató a Bécsi Orvosegyetem Transzlációs Mellkasi Onkológiai Program keretei között. 2013 óta a SE Mellkassebészeti Klinika tudományos főmunkatársaként és 2022 óta a Lund-i Egyetem Transzlációs Medicina Tanszékének vendégprofesszora is. Az értekezés alapjául szolgáló közleményekben levelezési címként a Bécsi Orvosegyetem-i munkahely szerepel.

Jelölt magasan ívelő pályafutást mondhat magáénak. Kutatói munkássága sok szempontból méltatható. A 164 nemzetközi szakcikk, melyekre eddig 4237 független idézettség született. A 35 összefoglaló cikk, melyekre 816 független citáció jelent meg. Teljes független idézettsége 5486. Közleményeinek közel 50%-a vagy első-, vagy (főként) utolsó szerzős, egyben levelező szerzős (gyakran megosztott). Hirsch-indexe 44, a g-index 70. Szcientometriai szempontból tehát a doktori követelmények sokszorosáról van szó.

A méltatást folytatni lehet a Jelölttel együttműködő, szintén a nemzetközi és hazai szakma fiatal és idősebb generációjának legjavából érkező társutalók nagy számával. Külön méltatható az alkalmazott metodikák igen magas színvonala: MS alapú proteomika, immunohisztokémia, a molekuláris patológia széles eszköztára, a KEGG, a GSEA alkalmazása és a big data világában szükséges kifinomult statisztikai elemzések, a lista nem teljes. Azt is hozzá kell tenni, hogy az értekezés magyar nyelven kifogástalan, pontos és érthető.

Gazdag tematikájú és mélyre ásó kutatásai csak néha távolodnak el a klinikai patológiától. Vagyis a multidiszciplináris, nem csak orvos-patológusi szaktudást igénylő kutatás mindig közel marad a napi gyakorlat sürgető kérdéseinek boncolgatásához.

**Rátérve az értekezés anyagára magára:** 8 tudományos cikkről van szó, ezek közül az első 3 összefoglaló közlemény. A közlemények IF-a 5,3 től 254-ig terjed (CA Cancer J Clin). Jelen bírálata review-kra nem tér ki, de Bíráló köszöni Jelöltnek e cikkek értekezésbe foglalását olyan szempontból is, hogy az egész anyag megértését Bíráló számára megkönnyítették. A 8-ból 7 angol nyelvű, valamennyi 2022-es, vagy 2023-as. A bírálata az egyes eredeti közlemények értekezésben elfoglalt sorrendje szerint halad előre.

2) A 2022-ben a **J Pathology**-ban megjelent munkában a Rodin és mtsai által 2019-ben kijelölt úton haladva tovább, nagy esetszámú, korai stádiumú, operált SCLC betegcsoport (illetve reszekátum, n=386) felhasználásával IHC módszerrel elsőként vizsgálták a Rodin és mtsai által eredetileg transcriptomikai módszerrel azonosított SCLC szubtypusok (-A, -N, -P és -Y) gyakoriságát és klinikopathológiai jellegzetességeit. A sebészi minták nagy száma azért is kiemelendő, mert csak így lehetett előrehaladni annak a régi, de tisztázatlan koncepciónak a mentén, hogy az SCLC valószínűleg közel sem olyan homogén betegség, mint arra akár napjaink terápiás gyakorlata is utal. Ilyen számú korai stádiumú SCLC mintával dolgozó kutatás korábban nem látott napvilágot.

A reszekátumok mellett párhuzamosan és hasonló célpontok szerint vizsgáltak 26 humán SCLC sejtvonalat is. Sőt, a sejtvonalakon tanulmányozták az egyes potenciális célzott és immunterápiás készítmények szubtípus szerinti hatékonyságát is.

**A reszekátumokban SCLC-A, vegyes AN, N, P és quadruple-negatív (QN) szubtípusokat találtak. YAP-1 altípust ebben a vizsgálatban nem azonosítottak (szemben Rodin et al 2019-es mRNS alapú munkájával). Igazolták, hogy az A és az N szubtípusnak megfelelő transzkripció regulator előfordulhat egy tumorsejten belül is és előfordulhatnak tumorsejt clasterek egy tumoron belül, melyek vagy A, vagy N szubtípusúak. Tehát igazolták a korábban feltételezett cellularis és cluster heterogenitást SCLC tumorokban.** Ez az irány közelebb vihet az SCLC rendkívüli malignanciájának és terápia refrakteritásának megértéséhez.

A transzkripció regulátor szubtípusok és mOS összefüggésének vizsgálata:

**A medián feletti ASCL1 expresszió rövidebb mOS-t prognosztizált (29.6 vs 42.9 hónap).** Hasonló mértékű negatív prognosztikus jelentést hordozott a NEUROD-1 expresszió is. Az A és az N az SCLC neuroendokrin szubtípusai. Ugyanakkor a medián feletti POU2F3 expressziójú csoport mOS-e 69,3 hónap volt a 30,1 hónappal szemben. **Független prognosztikus faktornak az ASCL1 szubtípus és az adjuváns kemoterápia bizonyult (egyéb vizsgált tényezők: életkor, stádium, nem, COPD).** Az ASCL1 prognosztikus jelentőségét a paraffinos blokkokban és a TMA formájában tendelkezésre álló mintákban is igazolták.

**KÉRDÉS:** *IHC-val ebben a munkában nem találtak YAP1 szubtípust. Más szerzők mRNS expresszióval és Jelölt munkacsoportja MS-proteomikai metodikával ugyancsak megerősítették a YAP1 alcsoport létezését. Mi lehet az eltérő metodikák eltérő eredményének a magyarázata?*

A 26 SCLC sejtvonál mindegyikében, MS-proteomikai módszerrel több mint 8000 fehérjét azonosítottak. Ebben a vizsgálatban 6 féle szubtípust találtak: -A, -N, -P, -Y, AN és heterogén -P szubtípust is. Különbéle potenciális hatóanyagokat teszteltek az egyes szubtípusokban. Kimutatták, hogy

-az ASCL1 erősebb expressziója az AURK inhibitor alisertib gyengébb hatékonyságával jár együtt

-erősebb YAP1 expresszió a sejtciklus gátlószerek (CDK-inhibitorok) gyengébb hatásával járt együtt, valamint a kemorezisztencia potenciális biomarkerének is mutatkozott

-a nagyobb NEUROD1 expresszió viszont az alisertib és az IGF-1R inhibitor nagyobb hatékonyságát vont maga után, ugyanígy

-a nagyobb POU2F3 a kemoterapeutikumok jobb hatását vetítette előre.

**Összességében a 386 operált SCLC eset eredményei alapján a NE szubtípusok rövidebb, a nem NE SCLC szubtípusok hosszabb mOS-t prognosztizáltak.**

Valamennyi felsorolt eredményt Jelölt és kutatócsoportja saját eredeti kutatási eredményének fogadom el.

3) Szeitz és mtsai **2022-ben a Clinical and Translational Medicine**-ben jelentették meg módszertani szempontból szinte még lélegzetelállítóbb munkájukat, melyben humán kissejtes tüdőrák szövetek mély proteomikai elemzését végzik ismét csak a 4 újonnan azonosított transzkripció regulátor szubtípus szerint. Tudománytörténeti szempontból ez volt az SCLC első átfogó proteomikai vizsgálata,

melyben egyúttal potenciális terápiás célpontokat is azonosítottak. A nyert sokezer proteomikai adatot egybevetették az SCLC már létező transzkriptomikai adatbázisával, valamint a Human Protein Atlas v20.1-gyel és a The Cancer Surfaceome Atlas 2022-vel.

**Huszonhat humán SCLC sejtvonal sejtfázisának és mediumának elemzésével 10161 fehérjét azonosítottak. Ezek közül a sejtés fázisban 367, a mediumban 34 olyan fehérjét ismertek fel, melyek az ASCL1, a NEUROD1, a POU2F3 és a YAP1 alcsoportban szubtípus-limitáltan másképpen expresszázódtak, mint a másik 3 szubtípusban. Ezzel megerősítették e szubtípusok ténylegesen megkülönböztethető voltát.** Valamint megerősítették azt is, hogy az SCLC szövet csökkenő neuroendokrin karaktere az epithelialis-mesenchymalis transitio jellegzetességek erősödésével jár együtt.

A Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) alkalmazásával kimutatták saját mintáikban, hogy

SCLC-A szubtípusban nagyobb mennyiségben vannak jelen azok a fehérjék, melyek

- az oxidatív foszforilációért
- a fenilalanin metabolizmusért
- a leukocytá transendothelialis migrációért
- a subpallium fejlődésért, valamint
- a neuralis precursorsejt proliferációért felelősek.

SCLC-N szubtípusban kifejezettebben jelen vannak

- a sejtciklus fenntartásáért,
- a phagosoma funkcióért,
- a riboflavin metabolizmusért,
- a peroxosoma-proliferátor által aktivált receptor szignalizációért, valamint
- az immunválasz citokin szignalizációért felelős fehérjék.

SCLC-P-szubtípusban kifejezettebb

- a foszfolipáz D szignalizáció,
- a lizoszoma és a glycan degradáció, valamint
- a neurotrophin szignalizáció és a lamellipodium organizáció fehérjéinek jelenléte.

SCLC-Y szubtípusban kifejezettebb

- az extracellularis matrix – receptor interactio
- az adhézio, az integrin expresszió
- a splicosoma, a peroxosoma és az o-glycan biosynthesis
- az interleukin szignalizáció
- a gyulladási válasz, valamint
- a növekedési faktorok által aktivált rendszerek fehérjéinek jelenléte.

Az idézett fenti lista nem teljes.

Ezután 6, potenciális kezelési célpontot is azonosítottak. Itt csak 3-at sorolok fel, valamennyire jellemző, hogy a gátlószerek annál hatásosabbak, mint daganatellenes szerek, minél magasabb az expressziójuk az egyes sejtvonalakban:

- a dasatinib az EPHA2-t expresszázó SCLC sejtvonalakban
- a vorinostat a HDAC1-et jobban expresszázó SCLC sejtvonalakban és
- az imatinib, valamint pazopanib a KIT-et jobban expresszázó daganatokban.

Valamennyi felsorolt eredményt Jelölt és kutatócsoportja saját eredeti kutatási eredményének fogadom el.

4) Lang és mtsai 2022-ben az **ESMO Open**-ben publikálták azt a közleményt, mely ismét nagyszámú, mintegy 104 műtéti reszekátum felhasználásával vizsgálta korai stádiumút SCLC-ben azt, hogy prognosztikus jelentőségű-e a 4 féle transzkripció regulátor szubtypus, vagy a CD47 és a PD-L1 expresszió? A CD47 pozitívítás révén a tumorsejt azt jelzi a phagocyták felé, hogy „DO NOT EAT ME”. A CD47 tehát egy veleszületett immunmechanizmus ellenőrzőpontja. A minták 85%-a volt CD47 pozitív, az ASCL1, a NEUROD1, a POU2D3 és a YAP1 alcsoportok között CD47 expressziót illetően nem volt különbség.

A CD47 expresszió tendenciaszerűen (n.s.) a mOS rövidebb voltával kapcsolódott. Első pillanatra logikus a túlélésre gyakorolt esetleges kedvezőtlen hatás, mert a CD47 fékezi a phagocyták daganateellenes működését. De ez a kérdés – ismerve a PD-L1 történetét – valószínűleg nem ilyen egyszerű.

Közismert, hogy kissejtes tüdőrákban az immuno-monoterápia (úgy mint PD-L1 expresszióban gazdag NSCLC-ben) nem hatásos. Ezért is izgalmasak az itt következő PD-L1 adatok. Kimutatták, hogy a 106 specimen tumorsejtfészkeiben mindösszesen 9,6%-ban detektálható a PD-L1. Utóbbiak főként stage I, vagy stage II SCLC-ben szenvedő betegekből származtak. Felvetik, hogy a korábbi stádium esetleg nagyobb PD-L1 expresszióval kapcsolódik össze. Ugyanakkor nem tapasztaltak különbséget a 4 féle transzkripció regulátor szubtypus PD-L1 expressziós karakterében.

Külön vizsgálták a stroma PD-L1 expresszióját és meglepetésképpen azt figyelték meg, hogy **a minták 59,6%-ában a stroma expresszálta a PD-L1-et, legalább az ottani sejtek 1%-át meghaladó mértékben. Ismét igazolódott, hogy a stromalis PD-L1 pozitív reszekátumok is főként korábbi stádiumú betegekből származtak (N0-s betegekből).**

*KÉRDÉS: a tüdőrák esetleg immunogénebb korai, mint késői stádiumban? Ha igen, mi minden tehető felelőssé az immunogenitás elvesztéséért késői stádiumban?*

Ez a kérdés annál is inkább kézenfekvő, mert saját jelen munkájukban is azt tapasztalták, hogy a **PD-L1 pozitív, reszekált betegek mOS-se 72 hónap volt a PD-L1 negatívak 32 hónapjával szemben (igaz a  $p=0.116$ , ns). Viszont a stromára vonatkoztatott hasonló elemzés már statisztikailag is szignifikáns különbséget talált (42 vs 14 hónap,  $p < 0.003$ ). Sőt, a stromalis PD-L1 expresszió a túlélés független prognosztikus faktorának bizonyult.**

*Adódik a kérdés, hogy a PD-L1 negatív hatású immunellenőrző pont (fék), mégis pozitív prognosztikus faktor? Mint ahogy ezt már emlőrákban is igazolták, amennyiben pl. a magasabb PD-L1 sűrűbb TIL-lel jár.*

*További kérdés: Lehetséges, hogy a stromában tumorelles hatású elemek (pl. CD8 sejtek) lehetnek PD-L1 pozitívak, melyek ennek révén is védelem alatt állnak az ott megjelenő apoptotikus hatásokkal szemben? (Sok tumor-immunológiai közleményben a TC és az IC PD-L1 expressziót egyaránt vizsgálják.)*

Valamennyi felsorolt eredményt Jelölt és kutatócsoportja saját eredeti kutatási eredményének fogadom el.

5) Dora Dávid első szerzőségével 2023-ban a **Cancer Immunology Immunotherapy**-ban jelent meg az operábilis kissejtes tüdőrák STING és MHCII expresszióját vizsgáló következő munka. Elemezték a tumorok CD45 (myeloid sejtek), a CD8 és a CD68 (macrophag) infiltrációját, a tumorelles immunválasz részleteit a 4 transzkripciós regulator altípus függvényében, valamint a mOS-re gyakorolt hatásokat.

Összesen 219 operált SCLC reszekátum állt rendelkezésre a klinikai adatokkal együtt. Korábbról ismert volt, hogy a kissejtes tüdőráksejtek MHCII-et inkább expresszálnak. Az MHCII-ről, valamint a STING expresszióról kevés adat állt rendelkezésre. A STING rövidítés jelentése angolul: stimulator of interferone genes/innate immune sensor for tumor detection. A tumor interferon- $\alpha$  termelésének egy fajta biomarkere, vagyis a szervezet tumorelles természetes védekezésének az egyik megnyilvánulása. A STING a TME-ben serkenti az AP sejteket. Korábbi adatok szerint daganatos betegségben a STING expresszió a hosszabb túlélésnek kedvez. Az MHCII expresszió pedig közismerten szintén az antigénprezentálás egyik meghatározó struktúrája (CD4 sejtek érése).

Eredményeik szerint STING expressziót kissejtes tüdőráksejtekben ritkán lehet megfigyelni, a STING sokkal inkább a stroma CD45, CD8 és CD68 sejtjeiben, valamint a stroma fibroblastjaiban jellegzetes.

MHCII expresszió: a tumorsejtek MHCII expressziója igen változó, viszont a stroma immunsejtjei gyakran MHCII pozitívak, 22,5%-ukban az expresszió magas.

A két immune checkpoint-ot együtt értékelve: **az SCLC minták 55%-a sem STING-et, sem MHCII-t nem expresszált, 30%-ban az egyiket, vagy a másikat expresszáltak a daganatsejtek. És a tumoroknak csak a 15%-ában volt jelen mind STING, mind MHCII. A STING és az MHCII egymással arányosan fejeződtek ki egy-egy SCLC tumorban, jelenlétük az immunsejt-infiltrációval pozitív korrelációt mutatott.**

Fontos új felismerés, hogy ASCL1, NEUROD1 és POU2F3 altípusú SCLC-ben immunsejt és STING/MHCII expresszió alig van, illetve egyáltalán nincs. A YAP1 szubtypusban viszont a YAP1 expresszióval arányos CD45 és CD8 infiltráció jellemző a tumorsejtfészkekben. **Vagyis kissejtes tüdőrákban a transzkripciós regulator szubtypus tehát messzemenően befolyásolja a tumorfészkek immunsejt infiltrációját.**

A 219 SCLC reszekátum csak 36%-ában voltak jelen CD45 sejtek, sőt, **a tumorminták 2/3-ában egyáltalán nem fordultak elő immunsejtek (nemcsak CD45).** Ezt előre bocsátva, a TME immuninfiltrációjának mértékét illetően végül 4 csoportra osztották a vizsgált 219 reszekátumot:

- 1)Immun-oázis típus: mind a tumorsejtfészkek, mind a stroma sok myeloid, CD8 és macrophag elemet tartalmaz
- 2)Stroma-oasis: a stromában sok myeloid, CD8 és macrophag, de a tumorsejtfészkekben kevés ezen elemek száma
- 3)Infiltration limited: a stromában kevés immunsejt, a tumorsejtfészkekben egyáltalán nem található
- 4)Immune-desert: sem a stromában, sem a tumorsejtfészkekben nincsenek immunsejtek.

Azt is megfigyelték, hogy minél sűrűbb az SCLC szövet CD45 infiltráltsága, annál sűrűbb a CD8 infiltráltság is. A klinikai lefolyással a fenti jellegzetességek a következőképpen függték össze I-es és II-es stádiumú betegekben:

- 1) mOS különbség nem volt a desert és az infiltration limited (mindkettőben rövid mOS), valamint a stroma oasis és az oasis tumorok között (mindkettőben hosszú mOS).

- 2) Ugyanakkor a CD45 és a CD8 stroma-oasis tumoros betegek szignifikánsan hosszabb túlélők voltak, mint a CD45/CD8 desert, vagy infiltration limited betegek (p 0.001).
- 3) Összegyűjtve a **CD8 stroma-oasis és oasis betegeket a mOS 74.4 hónapnak bizonyult az infiltration-limited és -desert phenotípusúakban tapasztalt 12.5 hónappal (p 0.0001). A különbség hasonlóan markáns volt a CD45 sejtekkel kapcsolatosan is (stroma oasis/oasis vs infiltration limited/desert (59.9 vs 13.3 hónap, p 0.0019).**
- 4) A CD68 sejtekkel kapcsolatos összehasonlítások nem utaltak a macrophagok fontosabb szerepére a mOS meghatározásában. Kivéve, hogy a tumorsejtfészkekben megjelenő CD68 pozitivitás épphogy rövidebb túléléssel társult.
- 5) A STING expresszió mind a tumorsejtekben, mind a stromában jó prognosztikus jelnek bizonyult.
- 6) A CD8 oasis és stroma-oasis phenotípusú tumorokban a tumor STING pozitivitása további kedvező túlélésbeli hatást gyakorolt.

Fenti eredményeik alapján logikusan vonták le azt a következtetést, hogy az immunsejt infiltráció a tumorfészkekben kezdődik és utána terjed át a stromára. És nem fordítva. Vagyis ha a stroma már az immun-oasis képét mutatja, az immunológiai hatás ugyanolyan erős, mintha az immunsejteket a tumorban helyezkednének el. Ha még csak a tumorsejtekben van immunsejt, de a stromában nincs, még nem biztos, hogy ott valaha is lesz.

Valamint rendkívül lényeges, hogy mindez csak a YAP1 transzkripció regulátor szubtypusban zajlik! Ebben a szubtypusban tumoros gyulladás jellemző – a tumorban mindenképpen, de alighanem valamilyen mértékben szisztémásan is.

*KÉRDÉS: Pozitív prediktív tényező lehet-e a tumoros gyulladás – vagy esetleg a YAP1 szubtypus - az ICI-ok hatásosságát illetően SCLC-ben?*

6) A Valkó Zuzsanna elsőszerzőségével, a **Br J Cancerben 2023**-ban publikált munkában SCLC sejtvonalak felhasználásával az antiapoptotikus BCL-2 család fehérjéinek szubtypusonkénti expresszióját vizsgálták, valamint arra is választ kerestek, hogy a BCL-2 nagyobb mennyiségű jelenléte egy-egy szubtypusban prediktálta-e a venetoclax (ismert BCL-2 inhibitor) rákellenes hatását. A venetoclax-ot már humán fázis I/II-ben is tesztelték kissejtes tüdőrákos betegeken. Az itt felhasznált 27 féle humán SCLC sejtvonalban mind a 4 féle szubtypus reprezentált volt. A venetoclax in vivo tumornövekedést gátló hatását az egyes SCLC sejtvonalaknak xenograftként, immunhiányos egerekbe való beültetésével vizsgálták.

A 4 féle szubtypus közül az ASLC1 és a POU2F3 alcsoport daganatsejtjei rendelkeztek a legnagyobb BCL-2 expresszióval. Ez azonban nem járt együtt a xenograft tumorok venetoclax-szal szembeni érzékenységével. Fordítva viszont, a venetoclax-szal szembeni rezisztencia együttjárt egy másik antiapoptotikus fehérjével, az MCL-1 nagyobb expressziójával. Feltéve, hogy a sejtvonalban az apoptózisban nélkülözhetetlen BAX fehérje is jelen volt. Ezután arra kerestek választ, hogy a venetoclax kezelés kombinációja az MCL-1 gátlószerével, az S63845 nevű kísérletes szerrel gátló hatékonyságú-e BAX tartalmú SCLC xenograftokban? A daganatok BAX tartalmát a BAX-ot is átvivő plazmid vektorral végzett transfectióval érték el. Igazolták ezzel, hogy **a kombinált anti-BCL-2 és anti-MCL-1 kezelés minden olyan SCLC tumorgraft ellen hatásos volt, mely BAX-ot is kifejezett.** A két gátlószer összehatódó hatását Combenefit szoftverrel elemezték, igazolták, hogy a két szer daganatellenes hatása között szinergizmus áll fenn. A kettős gátlószeres kezelés nyomán egyébként BAX+BAK heterokomplexek képződnek és ennek révén az apoptózis aktiválódhat. Ezek a munkák

tehát kimutattak egy új venetoclax rezisztencia mechanizmust és preklinikai adatokat szolgáltatottak arra, hogy a BCL-2 és az MCL-1 kombinált gátlása lehetőséget teremt az SCLC-ben megfigyelt venetoclax rezisztencia legyőzésére olyan daganatokban, melyekben a BAX jelen van.

**KÉRDÉS:** Milyen mellékhatások lépnek fel venetoclax kezelés során emberben? Kialakulásuk prediktálható-e valamilyen molekuláris jellegzetességgel (pl. BCL-2 expressióval)?

Az értekezés kivételesen értékes és gazdag kutatást foglal magába, szinte felsorolni is nehéz az eredeti tudományos eredményeket. Az értekezést nyilvános vitára alkalmasnak tartom és az MTA doktora fokozat megítélését javaslom.

2024. július 12.

dr. Losonczy György  
az MTA doktora