



## OPPONENSI VÉLEMÉNY

Dr Döme Balázs

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

című MTA doktori disszertációjáról

#### A doktori értekezés témája:

Dr Döme Balázs „A kissejtes tüdőrák molekuláris altípusai: biológia, heterogenitás és terápiai” című doktori munkáját úgy molekuláris, mint klinikai szempontból igen jelentős kutatásnak tartom. Különös tekintettel arra, hogy a kissejtes tüdőrák („small cell lung cancer”, SCLC) az összes tüdőrákos eset nem több, mint 13-15%-át teszik ki, de kiemelkedően halálos betegség, melynek a túlélési aránya nem haladja meg a 7%-ot. Rendkívül agresszív kórlefolyása, és késői felismerése miatt, a beteg már a diagnóziskor várhatóan a mellkason kívüli szervi áttéteket hordoz. Nem meglepő tehát, hogy az előrehaladott és igen agresszív betegségben szenvedő betegek a limitált terápiais lehetőségek következtében az alacsony túlélési arányt mutatnak. Mivel hazánkban világviszonylatban is különösen magas a tüdőrák típusok és ezen belül is a kissejtes tüdőrák kialakulásának megléte, nem meglepő módon Magyarország vezető helyen áll a tüdőrák okozta halálozási táblázatban.

Épp a fentiek miatt a téma rendkívül nagy jelentőségű úgy a kissejtes tüdőrák alaposabb molekuláris karakterének megismerése, diagnosztikai, prognosztikai markeres és terápiais célpontok azonosítása szempontjából.

Összességében a rendkívül aprólékosan megtervezett és következetesen végrehajtott kutatások alapján született eredmények alapvető és a klinikai gyakorlatban is hasznosítható ismeretekkel szolgálnak a kissejtes tüdőrák diagnosztikájában és terápiájában egyaránt.

## **Az értekezés részletes bírálata:**

### *Formai és stiláris szempontok:*

A doktori értekezés összesen 99 oldalból áll, amiből 4 oldal a tartalomjegyzék és a rövidítések listája. Ezt követi egy rövid háttér áttekintés, amely bevezeti a kissejtes tüdőrák megismerésében végzett fő kutatási irányok célkitűzéseit. A célkitűzések megfogalmazása tömör, világos, áttekinthető, pontokba szedett. Az értekezés ezt követően a célkitűzésekben megfogalmazott alfejezetekre bomlik, melyek mind tartalmaznak bevezetést, módszertani leírást, eredményeket és megbeszélést.

Az értekezés főbb megállapításait két oldalon foglalja össze a jelölt. A dolgozat végén 201 hivatkozást tartalmazó irodalomjegyzék található. Az értekezés a jelölt 200-at is meghaladó közlemény listájából 8 közleményen alapszik.

### *Az értekezés témájának és célkitűzéseinek értékelése:*

A doktori értekezés témája a kissejtes tüdőrák molekuláris vizsgálatának eredményeivel foglalkozik, mely megállapítások a kissejtes tüdőrák altípusainak meghatározásától, a potenciális terápiás célpontok azonosításáig terjed. A klinikai minták, adatbázisok, sejtkultúrák és xenograft egér modellek felhasználásával, majd az eredmények statisztikai elemzésével záruló kutatások összegzését láthatjuk az értekezésben.

A jelölt a munkája során a következő célokat tűzte a kutatócsoport elé:

- az SCLC biológiájának, heterogenitásának és újabb prognosztikai markereinek megismerése, az SCLC molekuláris altípusok biológiai és klinikai relevanciáját kiemelve
- Sebészileg reszekált kissejtes tüdőrákban az altípus-specifikus transzkripciós faktorok expressziós mintázatának vizsgálata és prognosztikus jelentősége
- SCLC molekuláris alcsoportok vizsgálata proteomikai módszerrel és proteomikai adatok korreláltása a sejtvonalak fenotípusos jellemzőivel, valamint az SCLC sejtvonalak és szövetek nyilvánosan elérhető transzkriptomikai adataival.
- A CD47/PD-L1 expresszió és a CD47 és a PD-L1 expresszió prognosztikai értékének vizsgálata
- Az új immunellenőrzési pontok, a STING és az MHCII, expressziós mintázatának és prognosztikus szerepének az immunsejt-sűrűség és a négy fő SCLC altípus marker összefüggésében történő vizsgálata a különböző tumorkompartmentekben
- A BCL-2 expresszió különbségeinek vizsgálata a különböző SCLC altípusok között. A BCL-2

gátlással szembeni rezisztencia háttérben álló mechanizmusok megismerése, illetve a BCL-2/MCL-1 kombinált gátlás hatékonyságának tanulmányozása in vitro és in vivo

#### *Az értekezéshez vezető tudományos közleményekben alkalmazott módszerek értékelése*

A jelölt a felsorolt munkáiban az immun és molekuláris biológia, illetve a bioinformatika és statisztika csaknem teljes eszköztárát felvonultatja a vizsgálatok során. Láthatóan rendkívüli tudással és hozzáértéssel választotta ki és alkalmazta a kísérletek értékeléséhez szükséges módszereket, melyek értékelése betegminták felhasználásával és a kórkép klinikai kontextusban történő értékelésével zajlott, a megfelelő statisztikai elemzések alapján.

A módszertan tartalmazza a vizsgált betegpopulációk leírását, szöveti mikroarrayk (TMA), immunhisztokémia (IHC) alkalmazását, az eredmények statisztikai elemzésének (R 3.6.3 verzió) megemlítését. A vizsgálatokban 26 SCLC sejtvonalat is használtak a proteomikai elemzésekhez, adatbázisok alkalmazása a transzkriptomikai adatokkal való összevetéshez, mRNS alapú altípusmeghatározáshoz és potenciális gyógyszeres célpontok azonosításához. A KEGG pathway analízis alapján az azonosított fehérjék jelátviteli rendszerekben betöltött helyét és a karcinogenezisben feltételezhető funkcióját is leírták. CD47/PD-L1 expressziójának IHC-val történő ellenőrzéséhez klinikai minták felhasználásával végeztek vizsgálatokat és vontak le következtetéseket a betegek prognózisára vonatkozóan. A jelenleg rendelkezésre álló gyógyszerek Bcl2 expresszióján keresztül az apoptózisra kifejtett hatását jól kiválasztott már gyógyszerként forgalombalevő, illetve klinikai fázisban lévő gyógyszer kombinációval tesztelték a kissejtes tüdőrák altípusaiban.

#### *Scientometriai szempontok*

Az MTA doktori mű alapjául 8 in extenso közlemény szolgált. Ezek közül mind a 8 esetben megállapítható a szerző vezető szerepe (utolsó és/vagy levelező szerző). A szerző összesen 232 szakcikk szerzője/társ szerzője, melyek közül 204 angol nyelvű, míg 28 magyar nyelven íródott. A bírálólat elkészítésének időpontjában tudományos közleményeire összesen 5961 hivatkozást kapott. H-indexei: független: 42, míg az összesített: 47. Az elmúlt tíz évben (2014-2024 között) egy „high impact” publikáció szerzője és Magyarországon D1-es besorolású kutató. A Scopus adatbázis szerint, a globális besorolása (19 millió szerzővel összevetve) D2-es besorolású úgy „biomedicine”, mint „clinical medicine”

területén. Mindezen mutatók alapján megállapítható, hogy a jelölt tudományos aktivitása messze meghaladja az MTA doktori eljárásban a szakterületén elvárt küszöbértéket.

### *A dolgozatot érintő megjegyzéseim és kérdéseim*

#### *Megjegyzések*

1. A dolgozat magyar nyelven íródott, a témát kiválóan leíró, tömör és érthető stílusban.
2. A dolgozat ábra paneljei színesek, jól áttekinthetők, noha a pdf-ből pdf-be alakítás során a felbontás csökkent.
3. Kifejezetten előnyösnek találtam az értekezés felosztását, mely könnyen követhetővé tette a szerteágazó altémák vizsgálatát, az alkalmazott módszertan leírását, a módszertan indoklását és az eredmények diszkuszióját.
4. Az eredmények végén összefoglaló ábrát/ábrákat, illetve táblázatokat beillesztve a kutatási eredmények áttekinthetőbbek lettek volna. Az összefoglaló ábra készítése véleményem szerint nem ütközött volna különösebb nehézségbe, hiszen az értekezés egy célorientált vonalon vezetett a differenciáldiagnosztikai markerektől a kismolekulájú és immunecheckpoint terápiában alkalmazható szerek hatékonyság vizsgálatáig.

#### *Kérdések*

*Mivel az értekezés igen jól dokumentált és áttekinthető, a kérdéseim is néhány, a dolgozat fő témaköreit lefedő területre koncentrálnak és elsősorban érdeklődő jellegűek:*

1. Az első szekcióban leírt multicentrikus vizsgálatokban, öt közép-európai egészségügyi központ vett részt. 386 sebészileg kezelt SCLC-s beteg mintáján vizsgálták az altípusspecifikus transzkripciós faktorok (ASCL1, NEUROD1, POU2F3 és YAP1), valamint a P53 és RB1 fehérjék expressziós mintázatát és azok klinikai és prognosztikai jelentőségét.

**1/1 Az azonosított négy transzkripciós faktor a proteomikai vizsgálatok alapján is jól elkülöníthető fehérje mintázatot mutat. Az eddigi kutatásaik alapján azonosított fehérjék összefüggésbe hozhatók-e olyan diagnosztikai markerként is szolgáló szekretált, és vérben keringő fehérjékkel, amelyek elősegíthetik a kissejtes tüdőrák korai diagnózisát?**

**1/2 Van-e különbség az SCLC-ben szenvedő betegekben a transzkripciós faktorok expressziós megoszlásában/mintázatában rasszok között, illetve krónikus stressznek kitett betegekben?**

**1/3 Alkalmazható lenne-e, az emelkedett transzkripció faktorok siRNS-sel történő csökkentése és ez úton a kissejtes tüdőrák krónikus, nem, vagy lassan progresszáló betegséggé tételében? Milyen módon lenne kivitelezhető egy SCLC specifikus siRNS terápia?**

2. Az összetett minőségi és mennyiségi proteomikai vizsgálatainkban rávilágítottak arra, hogy a négy molekuláris SCLC altípus fehérjeszinten egyértelműen megkülönböztethető. A sejtvonalak változatos neuroendokrin és epiteliális-mesenchymális jellemzőket mutattak, amelyek altípusonként fehérje szinten is eltérőek voltak. Összesen 367 olyan fehérjét azonosítottak sejt-pelletben és 34-et sejtenyészti médiumban, amelyek valamelyik altípusban jelentős túl- vagy alulszabályozást mutattak, köztük ismert gyógyszeresen célozható fehérjéket és potenciális véralapú markereket. Az SCLC-sejtvonalakból származó transzkriptum és a kapcsolódó útvonalak párhuzamos vizsgálata az egyes altípusok egyedi jellegzetességeit mutatták ki, mint például az oxidatív foszforiláció túlszabályozása az SCLC-A-ban, a DNS-replikáció az SCLC-N-ben.

**2/1 Az azonosított fehérjék teljes listája szolubilis fehérje volt, vagy kapcsolódhattak-e a tumorból kibocsátott vezikulákhoz, lipid nanopartikulumokhoz? Vizsgálták-e, illetve tervezik-e vizsgálni a betegség progresszióját is irányítani képes lipid-kapcsolt fehérjék szintjét a betegek szérumában, vagy plazmájában?**

**2/2 Mivel a magas vagy alacsony expressziós szintet mutató fehérjék jelenléte sejten belül akár a szabályozó miRNS-ek csökkent vagy emelkedett jelenlétének, avagy az miRNS-ek aktivitását szabályozó cirkuláris-RNS-eknek is lehet a következménye, ismertek-e az altípusokra jellemző miRNS vagy cirkuláris-RNS mintázatok? Mivel ezek a molekulák vérből is mérhetőek, és így korai diagnosztikai markerek, avagy akár terápiás célpontok is lehetnek, végeznek-e ilyen irányú vizsgálatokat?**

3. Bemutatta, hogy a tumorban azonosítható transzkripció faktorok, az SCLC-A-ban az oxidatív foszforilációs jelátviteli útvonal túlszabályozása, az anti-apoptotikus TP53 mutációja/alulműködése, az apotózist gátló BCL2 túltermelése mind jelen lehet a betegségben. A felsorolt molekulák egyenként és összességükben is a mitokondrium irányába mutatnak, amely összefüggést vizsgálta Dr Döme Balázs kutatócsoportja is.

**3/1 Terveznek-e, avagy végeztek-e olyan vizsgálatokat, melyek során a mitokondrium funkció vizsgálhatóvá válna a kissejtes tüdőrák altípusaiban primer klinikai szövetmintákon?**

3/2 Mivel a mitokondriális működés az mTOR azaz a „mammalian target of rapamycin” jelátviteli útvonalon keresztül szabályozza a sejtmagban kódolt mitokondriális fehérjék szintézisét, a mitokondrium aktivitását és biogenezisét, tesztelték-e a venetoclax alkalmazását rapamicinnel kombinációban? Jelenleg a kísérletekben alkalmazott MCL1 inhibitor azaz az S63845 fázis 1-es vizsgálata tudomásom szerint 2020-ban lezárult. Ezzel szemben a rapamicin engedélyezett gyógyszer. Így klinikai vizsgálatba történő bevonása és a kombinált kezelés hatékonyságának tesztelése nem lenne-e egyszerűbb? Eddigi sejtvonalas és xenotranszplantációs vizsgálatok alapján, amik 2014-ig nyúlnak vissza, a kombináció hatékonyan csökkentette az SCLC sejtek osztódását, migrációját, ami alapján feltételezhető, hogy a betegek számára ez a kombináció gyorsabban vezetne hatékonyabb terápiás kombinációhoz, már az MCL1 gátló engedélyezése előtt?

3/3 D vitaminnal folytatott kísérletek nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) sejtvonalon kimutatták, hogy egy transzfer-RNS-ből származó kis RNS (tsRNS) útvonalon, a D vitamin mitokondrium működést befolyásolva elnyomta a sejtosztódást, migrációt, sejtes inváziót és apoptózist idézett elő a daganat sejtekben. Végeztek-e hasonló kísérleteket SCLC sejtvonalakon? Esetleg ismert volt-e az anamnézisből, hogy a betegek fogyasztottak-e táplálékkiegészítőt vagy a mitokondriális működést is befolyásoló D vitamin készítményeket? Ha voltak ilyen betegek, hatott-e a mitokondrium aktivitásának befolyásolása a túlélési statisztikákra?

4. Az értekezésben többször előforduló megjegyzések a „retrospektív” adatgyűjtésre és az „elérhető” klinikai adatokra utalnak.

4/1 Mi volna véleménye szerint az ideális adatgyűjtési módszer, hogy a betegekről elérhető klinikai adatok minden fontos információt tartalmazzanak, szűrhetőek legyenek és potenciális gyógyszer interakciókra is következtetni lehessen az adatbázisból?

#### *Új megállapítások*

A fenti kérdésekre és észrevételekre adott válaszoktól függetlenül a jelölt új tudományos eredményeinek fogadom el a következőket:

1. Sebészileg reszekált SCLC mintákon azonosította az SCLC molekuláris altípusok klinikopatológiai jelentőségét, mely eredmények IHC segítségével azonosítható és az ASCL1, NEUROD1 és POU2F3 fehérjék expressziós variabilitásához köthetők.

2. Kimutatta, hogy a POU2F3 magas expressziója kedvezőbb túlélési eredményekkel társult, míg az ASCL1 emelkedett expressziója független negatív prognosztikai faktor.
3. Kvantitatív proteomikai adatai alapján a négy molekuláris SCLC altípus fehérjeszinten egyértelműen megkülönböztethető.
4. Kimutatta, hogy az SCLC-sejtvonalakból származó transzkriptum és a kapcsolódó útvonalak párhuzamos vizsgálata alapján az altípusok egyedi jellemzői kimutathatók, köztük az oxidatív foszforiláció túlszabályozása az SCLC-A-ban, a DNS-replikáció az SCLC-N-ben, a neurotropin jelátvitel az SCLC-Pben és az epitheliális-mesenchymális átmenet az SCLC-Y esetében.
5. A YAP1 által vezérelt altípust azonosítja a leginkább eltérő SCLC alcsoportként, melynek a potenciális diagnosztikai markereiként a pl. GPX8, PKD2 és UFO-t emelte ki.
6. Meghatározta a CD47 és a PD-L1 expressziós mintázatának klinikopatológiai és prognosztikai jelentőségét.
7. Megállapította, hogy az immuninfiltráció, különösen a CD8+ citotoxikus T-sejtek sűrűsége prognosztikus a korlátozott stádiumú SCLC betegeknél. Továbbá a STING expressziója a tumorfészekben prognosztikus az immuninfiltrált tumorokban, és így a STING potenciális terápiás célpont SCLC-ben.
8. Megállapította, hogy az SCLC-A és SCLC-P altípusokban szignifikánsan emelkedett a BCL-2 szint, melyre a venetoclax ígéretes altípus-specifikus terápiás szer lehet.
9. Kimutatta, hogy a BCL2 magas SCLC-sejtvonalak venetoclax-rezisztenciája elsősorban az anti-apoptotikus fehérje MCL-1 magas expressziójának és a pro-apoptotikus fehérje BAX alacsony expressziójának köszönhető.
10. Preklinikai vizsgálatokban kimutatta, hogy a BCL-2/MCL-1 venetoclaxszal és S63845-tel történő kettős gátlása hatékony lehet a venetoclax rezisztencia leküzdésére.

### *Összefoglalás, javaslat*

Döme Balázs MTA doktori értekezése rendkívül magas színvonalú, válogatott tudományos kutatómunka eredményeinek összefoglalása. A doktori értekezésből egyértelműen a kissejtes tüdőrák altípusainak karakterizálása, molekuláris jellemzőinek leírása, potenciális, akár személyre szabott terápiás lehetőségeinek feltérképezése tárul az olvasó elé. A szerteágazó metodika és a klinikai mintákon alapuló eredmények megfelelő statisztikai elemzése, a laboratóriumi *in vitro* vizsgálatok bevonása tette

lehetővé kissejtes tüdőrák markereinek és terápiájának modern módszertani azonosítását. A jelölt a PhD fokozata óta végzett önálló kutatói munkája (több, mint 180 tudományos kutatásra alapuló közlemény) kiváló lehetőséget biztosított annak a 8 munkának a doktori műben történő megjelenítésére, amely markánsan vetíti előre a klinikai alkalmazás lehetőségeit. A fentiek alapján az értekezés nyilvános vitára tűzését és sikeres védés esetén a jelölt részére az „MTA Doktora” cím odaítélését javaslom.

Pécs, 2024. augusztus 31.



Dr Pongrácz Judit  
egyetemi tanár, az MTA doktora