

Bírálat Dr. Butz Henriett

**„Új összefüggések a tumorbiológiában: epigenetikai eltérések,
mint jelátviteli módosítók” c.**

MTA doktori értekezéséről

Dr. Butz Henriett, a Jelölt Irodalomjegyzékkel együtt 163 oldalas MTA doktori értekezést nyújtott be. A Jelölt kutatói pályájának egy tízéves periódusában (2012-2022 között) megjelent 23 eredeti közleményében publikált adataira támaszkodva írta meg értekezését. A 23 közlemény közül a Jelölt mindössze kettőben társszerző, a többi 21-ben vagy első, vagy utolsó szerző; ez nagyon jól tükrözi, hogy a Jelölt vezető szerepet töltött be a közlemények megszületésének hátterében álló kutatómunkában. A dolgozat példaértékű módon rendkívül koherens: a Jelölt azokat az eredményeit ismerteti benne, amelyek a daganatos betegségek epigenetikai aspektusainak vizsgálata során születtek. Példaértékű a dolgozat abból a szempontból is, hogy ugyanannak a témának mind az alapkutatási, mind a klinikai, diagnosztikai vetületeit érinti a Jelölt, értékes adatokat szolgáltat a daganat kutatás alapkérdéseiben is, ugyanakkor az eredményeinek klinikai translációs lehetőségeit is részletesen ismerteti.

A dolgozat felépítése logikus, jól követhető. Nyelvezete dicséretesen szabatos, az Olvasó könnyen tudja követni a leírtakat. A terjedelmes dolgozatban azonosítottam néhány központozási hibát és elírást, ezekről az érdemi bírálat mellékleteként egy listát csatoltam, de semmiféleképpen nem szeretném azokat a védés során részletezni.

A **Bevezetés** részt három alfejezetre osztotta a Jelölt. Az első részben a vizsgált epigenetikai mechanizmusokat ismerteti, a második részben azokat a jelátviteli folyamatokat, amelyeket a vizsgált epigenetikai folyamatok a tumorgenezis során érintenek, végezetül néhány oldalban betekintést nyerünk a vizsgált daganattípusok pathomechanizmusába, diagnosztikai lehetőségeibe. A Bevezetés részben hat szemléletes ábrával is alátámasztja a mondandóját.

A Jelölt a **Célkitűzéseit** egy oldalnyi terjedelemben, három altémára osztva, összesen kilenc pontban ismertette. Itt is nagyon jól tükröződik kutatási témájának koherenciája, és hogy nagy körültekintéssel és céltudatossággal végzi kutatómunkáját, tervezi meg vizsgálatait.

A **Módszerek** fejezet 24 oldal terjedelmű. Kiemelném, hogy a Jelölt munkája során a molekuláris biológiai vizsgálatok igen széles tárházát alkalmazta. Azt is érdekes volt követni, hogy a Jelölt az évek során hogyan haladt a technológia fejlődésével, hogyan alkalmazta az évről-évre rendelkezésünkre álló új metodikákat (Gén és miRNS expressziós profil meghatározásához alkalmazott módszerek: 1. Génexpressziós microarray; 2. Génexpressziós profil készítése humán TaqMan Array segítségével; Génexpressziós profil meghatározása újgenerációs szekvenálás segítségével).

Az **Eredmények és Megbeszélés** rész 80 oldal terjedelmű, ugyanazt a hármas fő tagolást követi, amellyel a Jelölt a Célkitűzéseit megadta. Nagyon tetszett, hogy egy-egy alfejezetben az eredmények bemutatását követően a diszkussziót is megtette a Jelölt, ez így sokkal jobban volt követhető, mintha két egymást külön részben mutatta volna be a Jelölt az összes eredményét, majd ezt követően egy „tömbben” írta volna meg a hozzájuk tartozó megbeszélést. Az Eredmények és Megbeszélés részben 45 ábrát és 16 táblázatot mutat be a Jelölt. Ezek mindegyike példaértékű

pontossággal került összeállításra, az ábra és táblázatmagyarázatok pedig nagyban segítik a bemutatott eredmények értelmezését.

A dolgozatot 6 oldalas **Összefoglalással**, majd ezt követően egy egyoldalnnyi **Következtetések** résszel zárta a Jelölt, végezetül az **Eredeti megfigyelések, új megállapítások** részben pontokba szedve listázta az eredményeit. Az **Irodalomjegyzékben** 307 közleményt sorol fel, saját eredményeit ezek tükrében értelmezte a Jelölt.

A dolgozat olvasása és értékelése közben a következő kérdések fogalmazódtak meg bennem:

- 1) Jelölt a 10. oldalon a Bevezetés részben (3. bekezdés utolsó mondata) azt írja, hogy a vezikulák miRNS tartalma valószínűleg membránreceptorokon keresztül kerül be a befogadó sejtekbe. Milyen specificitással rendelkeznek azok a membrán receptorok, amelyek ezt a funkciót ellátják, és milyen mechanizmust igényel a miRNS-ek befogadó sejtek általi felismerése és internalizációja? Kérem a Jelöltet, hogy ezt röviden ismertesse.
- 2) A dolgozat 21. oldalán (első mondat), a Bevezetés részben a veserákok előfordulásával kapcsolatosan a Jelölt azt írja, hogy az évente 2-4%-kal nő. Ez riasztó adat. Ez egy valószínű növekedés, amelynek a hátterében valamilyen objektív kiváltó ok van, vagy inkább annak tudható be, hogy a diagnosztikai eljárások fejlődésével nő a diagnosztizált esetek száma?
- 3) A 33. oldalon (4. bekezdés) a Módszerek részben a Jelölt ismertette, hogy a génexpressziós vizsgálatok kvantitálása során számos konstitutívan kifejeződő gént alkalmaztak belső kontrollként, amelyek daganattípustól függően különböztek. Volt ennek valamilyen kísérletes úton bizonyított elvi háttere? Minek tudható be a belső kontroll gének expressziós vizsgálatokban alkalmazott sokfélesége?
- 4) A 37. oldalon, ugyancsak a Módszerek részben, a 2. bekezdésben a Jelölt a miRNS-ek expressziós elemzésének módszeréről ír. Mi az elvi alapja az érett miRNS-ek specifikus detektálásának? Hogyan lehet elkülöníteni őket a saját előalakjaiktól, a pri- és pre-miRNS-ektől?
- 5) Az *in vivo* állatkísérletes módszerek ismertetésénél a Jelölt leírja (Módszerek fejezet, 45-46. oldal), hogy a szunitinib kezelések során az állatok szájon át kapták a szert, míg a szorafenib kezelés során gyomorszondát alkalmaztak a szer bevitelére. Van ennek a metodikai eltérésnek valamilyen elvi alapja? Ugyanitt ír arról a Jelölt, hogy a vizsgálat befejeztével a kísérleti állatok veséjét, máját és tüdejét gyűjtötték be immunhisztokémiai elemzés céljából? Volt-e annak valamilyen elvi oka, amiért a kísérleti állatok agyát nem vették bele a vizsgálandó szervek közé?
- 6) A Jelölt az 50-51. oldalakon a Génontológiai, útvonal- és hálózatelemzési módszereket ismerteti, az 51. oldal 2. bekezdés utolsó mondatában azt írja, hogy a patkány transzkriptom adatok elemzéséhez a Reactome pathway génkészleteit alkalmazták. A Módszerek fejezet megelőző részeiben nem volt róla szó, hogy patkány kísérleti állatokat is használtak volna a vizsgálataikhoz. Mi volt az oka annak, hogy ezt a részt így fogalmazta meg a Jelölt?
- 7) A 62. oldalon, már az Eredmények részben ír arról, hogy a világossejtes veserákban az ECM molekulák és a sejtadhéziós útvonalakban szignifikáns változást mutattak ki. Ezt megelőzően arról is ír, hogy a miR-124-3p hatására csökkent az ITGB1 gén expressziója. Az ECM molekulák között ki tudták-e mutatni az EDA+, úgynevezett onkofötális fibronectin expressziójának (vagy EDA+/össz fibronectin arány) változását, amely az $\alpha 5 \beta 1$ integrin receptor ligandja?
- 8) A 70. oldalon arról ír a Jelölt, hogy immunfestéseket végeztek a szenzitív és rezisztens xenograft tumorokon, majd COX-2, E-cadherin és Pax-8 festődéseket mutat be. Mivel a β -

catenin ismert kulcs molekulája az epiteliális-mezenchimális fenotípus kialakulásának, felmerül a kérdés, hogy ennek e molekulának a kifejeződését vizsgálták-e.

- 9) Nagyon értékes és a Jelölt eredményeit validáló eredménynek tartom, hogy a rezisztencia modellek vizsgálata során az integrált adatelemzésekkel azonosítani tudtak olyan miRNS-eket 8miR-663a és miR1) és azok cél génjeit (*MDGA1* és *FRAS1*), amelyek expressziós változásai együtt mozogtak. Voltak-e további találatok, amelyek akár az általuk vizsgált tumor típusban, akár más szerzők által vizsgált tumortípusban már leírásra kerültek?
- 10) A 82. oldalon, a rezisztencia mechanizmusok vizsgálatai eredményeit megbeszélő részben (Megbeszélés, 15. sor) a Jelölt azt írja, hogy a sejtciklus G2/M átmenetének felgyorsulását azonosították az azt szabályozó molekulák fokozott expressziója által. Felmerül a kérdés, hogy olyan csökkent expressziójú gént nem azonosítottak, amelynek eredeti funkciója a tumor szuppresszió, és csökkent expressziójával járul hozzá a daganatképződéshez?
- 11) Nagyon érdekes és unikális megfigyelés, hogy a Jelölt és munkatársai hipofízis onkocitómákban a miRNS-expresszió globális downregulációját figyelték meg, amelyhez egyértelműen tudták kötni a Drosha enzim csökkent mennyiségét. Van-e az irodalomban arra adat, hogy egyéb tumor(ok)ban is megfigyelhető ez az aspecifikusnak tekinthető miRNS mennyiség csökkenés, illetve a miRNS biogenezis globális zavara?
- 12) A Jelölt a 112. oldalon ír róla, hogy egyes csírasejtvonalbeli génmutációkat (SDHB, RET, VHL és NF1) hordozó hasnyálmirigy neuroendokrin betegek szérumban mintáiban egyes miRNS-ek csökkent mennyiségben vannak jelen a sporadikus betegségben szenvedő betegekhez viszonyítva. Van-e sebiológiai mechanizmussal alátámasztható oki összefüggés a mutáció hordozás és a specifikus miRNS mennyiség csökkenés között, vagy a két tényező egymástól független és csupán asszociációt mutat?
- 13) A dolgozat egyik értékes, a klinikum számára is fontos eredménye (117. oldal), hogy egy 3-5 miRNS-ből, valamint a chromogranin-A-ból álló kombinált teszttel még a legnagyobb kihívást jelentő hasnyálmirigy neuroendokrin betegcsoportban is jó diagnosztikus hatásfokot tudtak elérni. Felmerülhet a kérdés, hogy a chromogranin-a keletkezéséhez vezető biogenezis út végrehajtó és/vagy szabályozó fehérjék expressziójának szabályozásában esetleg részt vesznek-e azok a miRNS-ek, amelyek abundanciájának vizsgálatát együttesen ajánlják diagnosztikai célból?

Eredeti eredményeknek a következőket ajánlom elfogadni:

- 1) A Jelölt és kutatócsoportja elsőként mutatta meg az aril-hidrokarbon receptor (AHR) szerepét világossejtes veserákban. Azonosították a legfontosabb szereppel bíró miRNS-eket a betegség pathogenezisében, melyek közül a miR-124-3p kitüntetett szereppel bír. Megmutatták, hogy a csökkent miR expresszió a TGF β 1, az ITGB molekulákon keresztül, valamint az ECM és jelátviteli folyamataik befolyásolásán keresztül fejti ki hatását. Eredményeik alapján a Jelölt felveti, hogy a miR-124-3p, a CAV1 és a FLOT1 fehérjék a világossejtes veserákban prognosztikus jelentőséggel bírnak és a jövőben a kórkép terápiájának lehetséges célpontját jelenthetik.
- 2) Elsőként mutatták ki, hogy a világossejtes veserákban alkalmazott szunitinib, valamint a hepatocelluláris rákban alkalmazott szorafenib kezelések során fellépő rezisztencia mechanizmusok központi eleme a sejtmigráció, valamint hogy mindkét daganattípusban megfigyelhető a környező szövetek ereinek befogásának jelensége a tumorsejtek által. Azonosították a migrációs fenotípus hátterében álló molekuláris mechanizmusokat. Az általuk azonosított miR663a és miR-1 által szabályozott MDGA1 és FRAS1 fehérjéket potenciális adjuváns terápiás célpontokként azonosították.

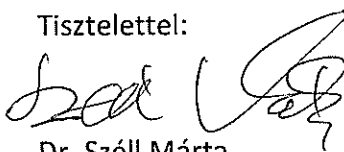
- 3) Elsőként hajtottak végre átfogó vizsgálatot annak kiderítésére, hogy a hipofízis neuroendokrin tumorokban milyen molekuláris folyamatok állnak a G2/M sejtciklus átmenet zavarainak hátterében. A diszregulált CDC25A-CDK1 útvonalat, valamint a tumorszuppresszor miR-424 és miR-503 molekulákat azonosították kulcsfontosságú molekuláknak ezekben a pathogenetikai folyamatokban. Azonosították azt is, hogy a hipofízis onkocitómákban alacsonyabb kifejeződést mutató miRNS-ek 40%-a egy adott humán kromoszóma régióon belül (14q32) kódoltak. A miRNS klaszter elemeinek további vizsgálatát diagnosztikai és prognosztikai potenciáljuk feltárása szempontjából tartja előre vivőnek a Jelölt.
- 4) Új megállapításokat tettek azzal kapcsolatosan, hogy a keringésben detektálható miRNS-ek hogyan alkalmazhatók diagnosztikus biomarkerként. Világossejtes veserákban szenvedő betegek keringéséből meghatározták azt a jellegzetes miRNS mintázatot, amely nem csak az egészséges egyénektől való megkülönböztetést, de a tumor méret szerinti diszkriminációt is lehetővé teszi. Hipofízis neuroendokrin tumorokban szenvedő betegek pre –és posztoperatív mintáinak vizsgálatával kimutatták a betegek keringésében általánosan alacsonyabb szinten való miRNS kifejeződést. A miR143-3p-t a betegek nyomon követésére alkalmas potenciális biomarkerként azonosították. Megmutatták, hogy egy 3-5 miRNS-ből, valamint a chromogranin-A-ból álló kombinált teszttel még a legnagyobb kihívást jelentő hasnyálmirigy neuroendokrin betegcsoportban is jó diagnosztikus hatásfokot tudtak elérni.
- 5) Kollaborációban kifejlesztettek egy új tömegsperkrometriás módszert, amellyel genomi skálán tudják mérni az 5-metilcitozin és 5-hidroximetilcitozin intermedierek mennyiségét. Az új mérési módszerrel tanulmányozták és elsőként kimutatták, hogy a hipofízis neuroendokrin tumorok kezelésére használt decitabin hatását az 5hmC és 5hmC/5mC arány mérésével lehet nyomon követni. Az aszpirin epigenetikai módosító hatását is igazolták hipofízis neuroendokrin tumorokban és azonosították az általa mediált onkogén útvonalakat.

Összefoglalva megállapítom, hogy a Jelölt, Dr. Butz Henriett dolgozatában elmúlt 10 éves kutatómunkájának (2012-2022) koherens összefoglalását adta meg. Kiemelkedően magas színvonalú diagnosztikai és kutatói utánpótlás nevelő munkája mellett végzi iskolateremtő, ugyancsak kivételesen kiemelkedő eredményű kutatómunkáját. Pályáíve példaértékű és a jövő orvosbiológiai kutatásokat végző generációi számára követendő.

A fentiek alapján a doktori művet nyilvános vitára alkalmasnak találom.

Szeged, 2025. február 21.

Tisztelettel:



Dr. Széll Márta
az MTA doktora

MELLÉKLET

a dolgozatban azonosított gépelési és központozási hibákról

- 18. o. 5. sor_Érdekes módon a (nem kell a vessző)
30. sor_CDKN2A transzkripcióját (nem kell a zárójel)
- 23. o. 24. sor_daganat diagnózisa (nem kell a vessző)
27. sor_sem pedig a sejtvonalak, így... (kell a vessző)
- 24. o. 10. sor_laboratóriumi vizsgálatok nem segítenek sem (nem kell a vessző)
- 25. o. 6. sor_Fontos tehát új (nem kell a vessző)
22. sor_megjelenhetnekkialakulhatnak (szótorlódás)
- 29. o. 9. sor_metasztatikus (betűtorlódás)
- 30. o. 13. sor_A centrifugálást 2 két (vagy a 2 vagy a két szó)
23. sor_és további felhasználásig (nem kell a kötőjel)
- 31. o. 1. sor_kontroll (két l)
5. sor_komprehenzív (helyette átfogó)
10. sor_139 különféle szövetmintát használtunk: (kiegészíteni)
11. sor_kontroll (két l)
16. sor_funkciójának (hosszú ó)
19. sor_Ebben összesen (nem kell a vessző)
22. sor_végeztünk: hipofízis
27. sor_Nukleinsav (betűkihagyás)
- 32. o. 17. sor_Invitrogen kittel a gyártó utasításai szerint a fehérjék (kiegészíteni a kittel kifejezéssel, valamint hiányzik a névelő)
22. sor_1 mL (magyarul ml)
33. sor_20 uL EV (μ)
- 33. o. 5. sor_adatokat (nem kell)
17. sor_futtattuk 384-well (384-lyukú)
20. sor_kontrolljaként (két l)
- 35. o. 5. sor_amplifikációjának (betűkihagyás)
13. sor_készítettük el, követve (kell a vessző)
24. sor_A readek (helyettes leolvasások)
25. sor_algoritmust (http:...) után nem kell a vessző
- 36. o. 3. sor_leolvasási (read)/totál read/ (read helyett leolvasás)
4. sor_vágóértéket (helyette küszöb)
- 37. o. 20. sor_eltérsek (betűkihagyás)
- 38. o. 9. sor_Illumina (miért dőlt betű)
14. sor_read (helyett leolvasás)
17. sor_Hypophysis (miért latinus)
31-33. sor (miért van a mondat zárójelben)
- 39. o. 4. sor_75 cm² (mértékegység)
táblázatban_Sejtvonal Neve (helyette kisbetűvel a neve)
- 40. o. 16. sor_klónoztuk /XbaI /és/HindIII-HF/ (dőlt betűkkel)
19. sor_/Escherichia coli/ (dőlt betűvel)
20. sor_Ampicillin tartalmú (külön írva)
31. sor_az /XbaI/ (dőlt betűvel)
32. sor_kontroll (két l)
- 41. o. utolsó sor_1 mL (helyette μ l)
- 42. o. utolsó sor_A proliferáció vizsgálatához (külön kell írni)
- 43. o. 2. sor_exklúziós (kizárásos)
3. sor_halott sejtek számát és számoltuk azok arányát.
8. sor_fehérje koncentrációját (külön kell írni)

- 13. sor_jelenlétének (helyett folyamatainak)
- 25. sor_0,5 mL (ml)
szobahőmérsékleten (betűkihagyás)
- 34.sor_tripszinizáltuk helyett tripszinezünk
- 44.o. 4. sor_tripszináltuk helyett tripszinezünk
- 12. sor_100 µL
- 13. sor_5µL
- 48. o. 30. sor_ és a strómaelemeket kizárva. (nem kell a zárójel)
- 49.o. 13. sor_10µL (µl)
- 15. sor_0,2mL (ml)
- 50. o. alulról a 3. sor_(http:.....) programok segítségével végeztük...
- 51. o. 1. sor_alkalmazásával. (betűkihagyás)
- 4. sor_sunitinib (nem konzekvens)
- 59. o. 6. sor_ kapjunk (helyette kapunk)
- 65. o. 1. sor_ 4,59 és 8,00 szeres (helyette ötödére/nyolcadára??)
- 67. o. 8. sor_patogenezisében (betűkihagyás)
- 68. o. 11. sor_kontroll (két l)
- 69. o. 10. sor_ A szunitinib (betűkihagyás)
metasztázisok (betűkihagyás)
- 70. o. 4. sor_potenciálni (helyette potenciózás)
- 10. sor_eptheliális (helyette epiteliális)
- 72. o. alulról a 4. sor_szunitinib (betűkihagyás)
- 73. o. 1. sor_szunitinib (betűkihagyás)
- 77. o. 12. és 14. sorokban kontroll (két l)
- 81. o. 5. sor_ normal hipofízis (helyette normál)
- 83. o. 11. sor_ Fontos kiemelni, (fontos után nem kell a vessző)
- 18. sor_esldőként írtuk (betűtévesztés)
- utolsó előtti sor_ kontroll (két l)
- 88. o. 10. sor_poszttranszkripció (betűkihagyás)
- 93. o. ábra alatt 3. sor_hozható (k nem kell)
- 94. o. 25. sor_vizsgáltuk a (betűtévesztés)
- 33. sor_Diszkrináció (betűtévesztés)
- 95. o. utolsó sr_diszkrináció (betűtévesztés)
- 98. o. 5 sor_keretlében (betűtévesztés)
- ábra alatti 1. sor_patogenezisében (nem kell a vessző)
- 102. o. 2. sor_ kontroll (két l)
- 105. o. 9. sor_preamplikációs (helyette preamplifikációs)
- 107.o. utolsó sor_megfelelőjükhöz (betűtévesztés)
- 108. o. 8. sor_vonatkozóan (nem kell a vessző)
- 18. sor_Emellett (nem kell a vessző)
- 111.o. ábrában minden kontroll (két l)
- 116.o. táblázatban Kontroll (két l)
- 118. o. 22. sor_detektáltunk alacsonyabb az 5hmC-szintet (az névelő nem kell)
- 122. o. 7. sor_multidomain helyett multidomén
- 128. o. 3. sor_A Western blot (kis w)
- 129. o. ábra alatt 1. sor_survivin és 5. sor_Survivin (kisbetű vagy nagybetű)
- 132. o. 27. sor_hatására stabilizálódik a p53 (hiányzik a névelő)