

Opponesi vélemény

Butz Henriett „Új összefüggések a tumorbiológiában: epigenetikai eltérések, mint jelátviteli módosítók” című MTA doktori értekezéséről

A vezető halálokok listáján a daganatos megbetegedések a második helyet foglalják el, a ráknál több halált csak a kardiovaszkuláris betegségek okoznak. A tumorok kialakulásában jelentős szerepe van a mutációknak, a DNS szekvenciájában lévő olyan öröklött vagy szerzett változásoknak, melyek aktiválják a proto-onkogéneket, vagy gátolják a tumorszupresszor géneket.

Tumor azonban nem csak mutációk megléte esetén alakul ki. Az epigenetika a génexpresszió szabályozásának olyan módja, mely nem függ a mutációktól, és elsősorban a kromatin hozzáférhetőségét szabályozza, mint például a DNS metilációja, vagy a hiszton fehérjék kovalens poszttranszlációs módosulásai. Eltérő mechanizmussal működik, mégis az epigenetikai reguláció tárgykörébe tartoznak a mikroRNS-ek, melyek a messenger RNS-ekre hatva a fehérjék transzlációját gátolják.

A tumorbiológiában az epigenetikai szabályzó mechanizmusok feltárását taglaló cikkek száma az elmúlt 25 évben dinamikusan növekedett, míg 2000-ben mindössze 337 cikket találunk, a tavalyi évben már több mint ötezeret. Mindezt figyelembe véve a témaválasztást, - az epigenetikai mechanizmusok kutatását a tumorbiológiában - nagyon időszerűnek és fontosnak tartom.

Általános bírálat:

I. Formai szempontok

A disszertáció tudományos tartalommal rendelkező része 143 oldal terjedelmű, mely 53 ábrát és 21 táblázatot is magában foglal. Az értekezés formai szempontból megfelel a doktori művekkel szemben támasztott kritériumoknak, a szerző világosan tagolt fejezetekben tárja az olvasó elé munkájának hátterét, konkrét célkitűzéseit, a munka során alkalmazott módszereket. A megbeszélés nem kapott külön fejezetet, hanem az egyes eredmények leírása után található. A disszertáció tartalmaz egy rövid összefoglalást, egy 1 oldalas következtetések című fejezetet, valamint az eredeti megfigyelések és új megállapítások listáját. A dolgozatot egy 307 publikációt tartalmazó irodalomjegyzék zárja.

A disszertáció nyelvezete egységes, és csak elvétve tartalmaz elütéseket. Ugyanakkor az alsó margó szűkre szabása zavaró, sok helyen az oldalszámozásba belelóg a szöveg (17, 75, 81. oldal) és a táblázatok 2 oldalon megjelenítése sem szerencsés, különösen úgy, hogy azok egy oldalra is befértek volna (11, 12, 16, 19. táblázat). Az ábrák és táblázatok gondosan kivitelezettek, informatívak és nagyban segítik a megértést. A számszerűsíthető szignifikáns különbségeket bemutató ábrák több mint felénél az ábraalírásában nincs megadva a szignifikanciát jelző szimbólumok jelentése, és az a statisztikai módszerek fejezetben sem szerepel. Az *in vitro* sejt kultúrákon végzett kísérleteket bemutató ábrák ábraalírásából és többnyire a szövegből sem derül ki az adott kísérletben alkalmazott technikai illetve biológiai replikátumok száma. Az alkalmazott statisztikai módszerekről sincs említés az ábraalírásokban.

II. Tudománymetriai szempontok

Az értekezés alapját 23 angol és 2 magyar nyelvű lektorált folyóiratban megjelent közlemény adja, melyekben két kivételtől eltekintve a jelölt meghatározó, első vagy utolsó szerző. A 23 angol nyelvű cikkből 15 cikk D1 vagy Q1 kategóriájú folyóiratokban jelent meg, a cikkek összesített impakt faktora 100,44, a cikkek átlagos impakt faktora 4,37. A jelölt kiemelkedő tudományos aktivitását mutatja, hogy nevéhez köthető folyóiratcikkek száma a PhD elnyerése után 71, független idézettsége 1507. Ezekkel

a paraméterekkel a jelölt magasan teljesíti az MTA által meghatározott, a doktori cím elnyeréséhez szükséges tudománymetriai feltételeket.

III. Koherencia szempontok

A bíráló feladata az értekezés tudományos megalapozottságának megállapításán túl az is, hogy véleményt alkosson arról, hogy az értekezésben összefoglalt eredmények egy kerek egészzé összeállnak-e, mennyire koherens a bemutatott munka. A disszertáció címének megfelelően a tárgyalt cikkek mindegyike tumorokkal és epigenetikával kapcsolatos, ugyanakkor ez egy nagyon szerteágazó terület. A jelölt világossejtes veserákkal, valamint hipofízis és hasnyálmirigy neuroendokrin tumorokkal, összességében 5 típusú tumorról kapcsolatos eredményeit taglalja a disszertációban. Az eredmények két epigenetikai mechanizmus köre csoportosíthatók, a miRNS általi szabályzás, illetve a DNS metiláció/demetiláció. Véleményem szerint nem csökkentette volna a disszertáció értékét, ha vagy csak a világossejtes veserákkal kapcsolatos eredmények, vagy csak a neuroendokrin tumorokkal kapcsolatos eredmények kerültek volna bemutatásra. Ez a megoldás könnyebben kivitelezhetővé tette volna az eredmények egy fejezetben való diszkutálását is.

Részletes bírálat, kérdések:

A disszertáció bevezetése tömör, mégis olvasmányos, jól követhető. A jelölt bevezeti az olvasót az epigenetikai szabályozó mechanizmusok tumorbiológiai aspektusaiba, a jelátviteli útvonalak módosulásaiba daganatokban, valamint összegzi a leglényegesebb tudnivalókat a disszertációban bemutatott különféle tumorokról.

A célkitűzések 3 kérdéskörbe csoportosítva, tömören és világosan vannak megfogalmazva.

A módszerek fejezet gazdag részletességgel van megírva. Külön szeretném kiemelni, hogy a disszertációban bemutatott munka során nagy mennyiségű mintát gyűjtöttek és analizáltak, pl. 682 formalin-fixált paraffinba ágyazott szövet, 200 feletti plazma/szérum minta, 108 vizelet minta. A kísérletes minták mellett *in silico* analíziseket is végeztek, melyek során a nyilvánosan hozzáférhető adatbázisokban közzétett mérési eredményeket elemezték újra. Ez a világossejtes veserák esetén 1562 daganatszövet és 524 egészséges veseszövet gén és miRNS expressziós adatainak újraelemzését jelentette, mely jól jelzi az elvégzett munka volumenét. A disszertáció egyik legfőbb erénye az élvonalbeli technológiák alkalmazása a kutatás során, és azok sikeres ötvözése a klasszikus vizsgálati módszerekkel.

Az eredményekkel kapcsolatos kérdések:

1. A világossejtes veserákkal kapcsolatos vizsgálatokban kimutatták, hogy a sejtek pro-invazív és mesenchymális irányú tranzíciója és az ér befogás állhat az angiogenezis gátlószerekkel szembeni rezisztencia hátterében. Ezzel kapcsolatban szeretném megkérdezni, hogy van-e esetleg valamilyen kísérleti stádiumban álló hatóanyag, mely ezt a mechanizmust célozza? Milyen potenciális lehetőségek merülnek fel? Van-e olyan *ex vivo* szövettenyésztésen alapuló technika (organ-on-a-chip) mely alkalmas lehetne a hatóanyagok tesztelésére?
2. Nagyon érdekesnek tartom azt az agyalapi mirigy onkocitómával kapcsolatos megfigyelésüket, miszerint az anyagcsere útvonalak szerepet játszanak a DNS szintézisben és a sejtciklus szabályozásában. Ez kifejezetten csak erre a daganattípusra igaz, vagy minden daganatra, esetleg általános érvényű minden sejtben megfigyelhető jelenség?
3. A disszertációban azt írja a jelölt, hogy a glükokortikoidok hatására megváltozott Wnt jelátvitelt legalább részben miRNS-ek szabályozzák (88. oldal). Ugyanakkor az eredmények azt mutatják, hogy a glükokortikoid kezelés különböző miRNS válaszokat váltott ki a modellként alkalmazott három glükokortikoid válaszadásra képes sejt rendszerben. Ugyanakkor a Wnt útvonal aktiválódását mindhárom sejttípusban beigazolódt. Hogyan magyarázható ez? Más-más miRNS regulálja a Wnt útvonalat a különféle sejtekben? A bevezetésben azt olvashatjuk, hogy a tumorokban található epigenetikai eltérésekre terápiás célpontokként tekintenek (6. oldal).

Ez vonatkozik a miRNS-re is? És ha igen, akkor nem jelent-e problémát, hogy ennyire sejtspecifikus az a miRNS készlet mely egy-egy jelátviteli útvonalat szabályoz?

4. A jelölt a 20. táblázatban listázza azokat a transzkripciós faktorokat, melyek aktivitása megváltozik aszpirinkezelés hatására. Ezt a mérést PitNET sejteken végezték? Személyes érdeklődésemnél fogva feltűnt, hogy két endoplazmás retikulum stressz válaszban kulcsszerepet játszó transzkripciós faktort is tartalmaz a lista, az ATF4-et és az XBP1-et. Milyen irányba változott az ATF4 és XBP1 transzkripciós faktorok aktivitása az aszpirin kezelés hatására? Ismert-e más sejtekben is az aszpirin ER stresszt befolyásoló hatása?
5. A disszertációban rengeteg eredményt mutat be a jelölt, és az eredeti megfigyeléseket bemutató listában 20 megállapítást sorakoztat fel. Arra lennék kíváncsi, hogy melyik az az eredmény, amit a legjelentősebbnek tart? Ha csak egyet tudunk megjegyezni, melyik legyen az?
6. Van-e jelenleg olyan terápia (akár kísérleti/pre-klinikai fázisban) mely a daganatok epigenetikai eltéréseit célozza, vagy még túl korai ez a kérdés?

Új megállapítások

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

1. Azonosította a legfontosabb szereppel bíró tumorszuppresszor miRNS-eket a világossejtes veserák patogenezisében, és kimutatta, hogy a miR-124-3p, miR-200c 3p és a miR-30a-5p szabályozza a tumor sejtek migrációját s ezáltal a dagant progresszióját.
2. Bizonyította az ARH fokozott kifejeződésének szerepét világossejtes veserákban, melyet részben a miR-124-3p szabályoz.
3. A CAV1 és FLOT1 géneket miR-124-3p célmolekuláiként azonosították, és bizonyították szerepüket a tumorsejtek migrációjában és inváziójában.
4. Bizonyította az AHR, miR-124-3p, CAV-1 és FLOT-1 prognosztikai jelentőségét világossejtes veserákban.
5. Világossejtes veserák és hepatocelluláris karcinóma esetében kimutatták, hogy a daganatsejtek a migráció fokozódásával járó fenotípus váltása és az érbefogás jelensége áll az angiogenesis gátló szunitinib és szorafenib rezisztencia kialakulásának hátterében.
6. Világossejtes veserákban kimutatták, hogy a szunitinib rezisztencia kialakulásában szerepet játszik a MDGA1 és FRAS1 gének működésének miRNS-ek általi szabályozása.
7. Hipofízis neuroendokrin tumorokban igazolták a sejtciklus G2/M átmenetet szabályozó molekulák (CDK1 és a CDC25A) és azok miRNS-ek általi szabályozásának szerepét a nem-funkcionáló daganatok patogenezisében.
8. A hipofízis onkocitómák esetében kimutatták a miRNS expresszió globális csökkenését, és az expressziós mintázat megváltozását és ennek okaként azonosították a Drosha enzim csökkent jelenlétét. Bizonyították a miR-127 3p és miR-744-5p tumorszuppresszor funkcióját e daganattípus kialakulásában, valamint kimutatták az Aconitáz 2-t célzó miR-744-5p szerepét az onkocitómák citrát-ciklus szabályozásában.
9. Szintetizálták a 14q32 lókuszon kódolt miRNS klaszter expressziós mintázatát különböző endokrin daganatokban, és kimutatták, hogy szövetspecifikus funkciót tölt be a daganatok progressziójában.
10. Mellékvesekéreg daganatokban és különböző glükokortikoid célszövetekben kimutatták a glükokortikoidok hatására megváltozott Wnt jelátvitel működését.
11. Igazolták, hogy a miRNS-ek alkalmazhatóak folyadékbiopsziás biomarkerként klinikai mintákon.

12. Vizeletből olyan exoszómális miRNS kombinációkat határoztak meg, melyek alkalmasak a világossejtes veserákos minták elkülönítésére az egészséges és a jóindulatú vesedaganatos mintáitól.
13. Igazolták, hogy a daganatsejtek miRNS tartalmú exoszómákat szekretálnak, melyeken keresztül környezetükben található sejtekkel kommunikálnak.
14. Gonadotróp eredetű nem-funkcionáló hipofízis neuroendokrin tumorokban a betegek nyomonkövetésére alkalmas potenciális biomarkerként azonosították a miR-143-3p-t.
15. Hasnyálmirigy neuroendokrin tumoros betegekben igazolták a keringő miRNS-ek diagnosztikai jelentőségét és kimutatták, hogy a miRNS-ek képesek emelni a kromogranin A diagnosztikai pontosságát.
16. Hipofízis neuroendokrin tumorokban igazolták, hogy a demetiláció folyamata (emelkedett 5hmC/5mC arány) negatívan korrelál a proliferációs rátával és a differenciáltsági állapottal. A folyamat hátterében azonosították a metiláció-demetiláció folyamatát szabályozó TET1-3 enzimek és kofaktoruk expressziójának eltéréseit.
17. Az aszpirin hipofízis neuroendokrin daganatellenes hatásának vizsgálata során epigenomikus és genomikus szintű mechanizmusokat fedeztek fel és igazolták a demetiláció, a p53 és E2f1 transzkripció faktorok, valamint a Survivin és Pttg1 szerepét.
18. Potenciális markerként azonosították az 5hmC-t, mely jellemzi a hipofízis neuroendokrin tumorok proliferatív és differenciációs állapotát, valamint alkalmas a decitabin és az aszpirin daganatellenes hatásának nyomon követésére.

Összefoglalás, javaslat

Összegezve, Dr. Butz Henriett jelentős tudományos eredményekkel járult a terület tudásanyagának bővítéséhez. MTA doktori értekezése mind tartalmi, mind formai szempontból megfelel az elvárásoknak, ezért javaslom az értekezés nyilvános vitára tűzését, és sikeres védelem esetén a jelölt részére az MTA doktora cím odaítélését.

Debrecen, 2025. február 26.



Dr. Jeney Viktória

Tudományos tanácsadó
Debreceni Egyetem
Molekuláris Medicina Kutatóközpont