



OPPONENSI VÉLEMÉNY

Dr Butz Henriett

**Új összefüggések a tumorbiológiában:
epigenetikai eltérések, mint jelátviteli módosítók**

című MTA doktori disszertációjáról

A doktori értekezés témája:

Dr Butz Henriett „Új összefüggések a tumorbiológiában: epigenetikai eltérések, mint jelátviteli módosítók” című doktori munkáját úgy molekuláris, mint klinikai szempontból igen jelentős kutatásnak tartom.

A mutáció indukálta carcinogenesis már régóta ismert, és noha a daganatokban mutakozó epigenetikai eltérések is fókuszba kerültek, az epigenetikai vizsgálatok még mindig nem kerültek hasonlóan alapos kivizsgálás alá. Annak ellenére, hogy ma már az összegyűlt kutatási eredmények alapján terápiás célpontoknak is tekinthetők, azaz a daganatok epigenetikai betegségek is. Az epigenetikai változások ellentétben pl. egy DNS mutációval, könnyen változnak, így egyfelől ezt a daganatos sejtek adaptív mechanizmusként használják, de ugyanennek köszönhetően kiváló terápiás célpontok is egyben, hiszen potenciálisan reverzibilisek és epigenetikai terápiával visszaállíthatók normál állapotukba. Mivel a genomunk kb. 1-2%-a kódol fehérjét, míg az összes többi szekvencia ezek szabályozója, nem meglepő tehát, hogyha a daganatterápiát komolyan személyre szabottan képzeljük el a jövőben, akkor az epigenetikai szabályozó mechanizmusok megismerése, azokba történő beavatkozás és terápiába történő integrálás elengedhetetlen a jövőben, amelyben a hiszton fehérjék működésén túlmenően, a kromatin szerkezetét módosító epigenetikai mechanizmusok megismerése is elengedhetetlen. Ebbe tartoznak a DNS-metiláción túl a kovalens és nem kovalens hiszton módosulások, valamint

a nem kódoló RNS-ek különféle kategóriái. Az értekezés témájában külön kiemelném, hogy már a bevezetésben láttatja, hogy a daganat kialakulását szabályozó „nem kódoló” RNS családba tartozó miRNS-ek különbséget mutathatnak a daganatszöveti és a perifériális térben. Kiemelkedő áttekintést nyújt a metiláció és demetiláció szerepéről különféle daganatokban. Jól áttekinthető ábrákkal részletezi a különféle, a daganatokban általánosan fontos szerepet betöltő jelátviteli folyamatokat, melyek esetében a specifikus gének átíródása és proteinként történő manifestálódása fontos szerepet tölt be a daganatok kialakulásában és progressziójában. Majd a vizsgált, neuroendokrin tumorok jellemzőit taglalja, tumor típusonként.

Épp a fentiek miatt a vizsgált téma rendkívül nagy jelentőségű, amely a daganatok olyan molekuláris megismerését teszi lehetővé, amely diagnosztikai, prognosztikai és terápiás alkalmazások finomhangolását teszi lehetővé. Összességében a rendkívül aprólékosan megtervezett és következetesen végrehajtott kutatások alapján született eredmények alapvető és a klinikai gyakorlatban is hasznosítható ismeretekkel és potenciális gyógyszerek fejlesztésével szolgálnak a daganatterápiában.

Az értekezés részletes bírálata:

Formai és stiláris szempontok:

A doktori értekezés összesen 175 oldalból áll, amiből 4 oldal a tartalomjegyzék, majd egy jól struktúrált, 21 oldalas bevezetés következik. Az irodalmi áttekintést követi a célkitűzések leírása. A célkitűzések megfogalmazása tömör, világos, áttekinthető, pontokba szedett. A három fő pontban az miRNS-ek általi szabályozó mechanizmusok feltárására koncentrált kutatásaiban különböző daganatokban. Vizsgálatai céljának tűzte ki, hogy az miRNS-eket, mint potenciális extracelluláris biomarkereket vizsgálja, illetve a DNS metiláció-demetiláció epigenetikai vizsgálatában merült el, hipofízis neuroendokrin tumorok viselkedését tanulmányozva.

Az értekezés ezt követően a célkitűzésekben megfogalmazott kutatásokban alkalmazott anyagok és vizsgálati módszerek és eszközök ismertetésére fókuszál. Majd ezt követően az eredmények és megbeszélés fejezetben kerül sor a kutatási eredmények tárgyalására és értékelésére, melyet az összefoglalás követ. Az összefoglalás fejezetben nemcsak a feltárt epigenetikai mechanizmusok leírására, hanem a potenciális alkalmazásuk lehetőségére is kitér.

Az értekezés következtetéseit egy oldalon, míg a főbb megállapításait, eredeti megfigyeléseit és új megállapításait két oldalon foglalja össze. A dolgozat végén 307 hivatkozást tartalmazó irodalomjegyzék található. Az értekezés a PhD-t követően megjelent 23 angol nyelven, két magyar nyelven megjelent tudományos közleményen, és három könyvfejezeten alapszik. A 23 nemzetközi közlemény öt kivétellel (négy Q2 és egy Q3), mind Q1, illetve D1 kategóriájú publikáció.

Az értekezés témájának és célkitűzéseinek értékelése:

Mivel a neuroendokrin daganatok terápiája igen nagy kihívás elé állítja az orvoslást, a betegségek megértésének, új, molekuláris szintű diagnosztikai és prognosztikai markerek azonosításának igen nagy jelentősége van a klinikai kutatásokban.

A jelölt a munkájában három fő célt fogalmazott meg:

1. miRNS-ek molekuláris folyamatok szabályozásában betöltött szerepét vizsgálta (miRNS-ek általi szabályozó mechanizmusok feltárása különböző daganatokban, melyben a világossejtes veserákban folyó patogenezis mechanizmusokat kívánta vizsgálni. Majd általánosabban az miRNS-ek anti-angiogén terápiával szemben kialakult rezisztencia mechanizmusokban betöltött szerepét kívánta körüljárni. A hipofízis neuroendokrin tumorokban ugyancsak vizsgálni kívánta a szöveti miRNS-ek által regulált molekuláris folyamatokat a sejtciklus és mitokondriális funkcióban. A glukokortikoid receptor-miRNS-Wnt szabályozás működésének vizsgálata hormonérzékeny daganatokban is a célkitűzések részét képezte.

2. Annak lehetőségét vizsgálta, hogy az extracelluláris miRNS-ek alkalmazhatók-e biomarkernek.

Ehhez a világossejtes veserákosok vizelet mintáiban, míg a hipofízis és hasnyálmirigy neuroendokrin tumorokban miRNS-eket plazmában és exoszómában kívánta analizálni a diagnosztikai pontosság növelése érdekében.

3. A DNS metiláció-demetiláció, mint epigenetikai módosító mechanizmus vizsgálatát a

hipofízis neuroendokrin tumorok viselkedésének kutatására összpontosította, a terápiás lehetőségek vizsgálatának felvetésével.

Az értekezéshez vezető tudományos közleményekben alkalmazott módszerek értékelése

A jelölt a felsorolt munkáiban különféle és igen szerteágazó módszereket alkalmazott. A teljesség igénye nélkül: a klinikai mintákon (vér, vizelet, primer tumor) végzett molekuláris genetikai, exoszóma RNS

tartalmának vizsgálatát, DNS szekvencia meghatározást úgy nukleáris, mint mitokondriális DNS analízist végzett. Az miRNS mintázatok analíziséhez különféle módszereket alkalmazott (microarray, TaqMan Array, szekvenálás). Az in vitro funkcionális vizsgálatokhoz nyolc, a vizsgált betegségeknek megfelelő sejtvonalat használt. A funkcionális vizsgálatokban géncsendesítést (siRNS), miRNS transzfekciót, miRNS tartalmú exoszómákkal történő funkció módosításokat végzett. A sejtvonalakon mért sejt életképességet, osztódási képességet, inváziós képességet, apoptotikus sejthalált különféle, modern és széles körben elfogadott módszerekkel. Az in vivo vizsgálatokhoz transzgén egerek előállítás is történt további vizsgálatokhoz. Az eredményeket a kísérlettípusnak megfelelő bioinformatikai elemzések és statisztikai számítások támasztották alá.

Scientometriai szempontok

Az MTA doktori mű alapjául 23 közlemény szolgált. Ezek közül 22 esetben az angol nyelvű és az összes magyar nyelvű közlemény esetén megállapítható a szerző vezető szerepe (utolsó és/vagy levelező szerző). A szerző összesen 89 szakcikk szerzője/társ szerzője, melyek közül 76 angol nyelvű. A bíráló elkészítésének időpontjában az MTMT adatok frissítési dátuma 2025.03.10, amikor is a tudományos közleményeire összesen 2305 hivatkozást kapott. H-indexei: független: 22, míg az összesített: 23. Magyarországon a „Medical Sciences” területén D1-es besorolású kutató. A Scopus adatbázis szerint, a globális besorolása (19 millió szerzővel összevetve) D2-es besorolású a „biomedical research” és ugyancsak D2-es a „clinical medicine” területén. Mindezen mutatók alapján megállapítható, hogy a jelölt tudományos aktivitása kiemelkedő és messzemenően 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, és érthető stílusban.
2. A dolgozat ábra paneljei jól áttekinthetők, és világosak.
3. Az értekezés felosztása követi a hagyományokat, mely könnyen követhetővé teszi az altémák vizsgálatát.
4. Az eredmények ábrái és táblázatai jól áttekinthetővé és érthetővé teszik a következtetéseket.

5. Apró kritikai észrevétel, hogy néhány ábra kevert nyelven került a disszertációba (pl „kontrol miRNS mimics”)

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. Hálózatanalízissel azonosított, miRNS-ek, a miR-200c-3p, a miR-124-3p és a miR-30a-5p csökkent expressziót állapítottak meg, melyet a TCGA-adatbázisból származó független betegcsoport felhasználásával validáltak világossejtes veserák mintákon. A hármas miRNS transzfekcióval tovább vizsgálva, majd funkció analízissel kimutatták, hogy sejtmigráció és invázió, immun állapot, mind az azonosított miRNS-ek szabályozása alatt álló gének hálózatának függvényei.

1/1 A modellezés kapcsán primer tumor és metasztázisban is mérve összehasonlításra kerültek a miRNS szintek. Volt-e lehetőség mérni, illetve felmerült-e annak a lehetősége, hogy plazmában vagy szérumban keringő exoszómákban megtalálhatóak-e ugyanezek a miRNS-ek?

1/2 Milyen molekuláris változások vezetnek oda, hogy a metasztázisokban tovább csökken a tumor szuppresszor miR-124-3p? Ismert-e a miR-124-3p szabályozó mechanizmusa?

2. A betegekben kialakuló gyógyszerrezisztencia hátterében álló mechanizmusok feltárása céljából in vitro és in vivo rezisztenciamodelleket hoztak létre. A kontroll, szenzitív és rezisztens daganatokat karakterizálták, majd funkcionális vizsgálatokkal miRNS target validálást végeztek, hogy igazolják a miRNS-mRNS párok funkcióját.

2/1 Kimutatható volt-e, hogy az erek permeabilitása változik-e a TyrK gátló anti-angiogenikus szerek alkalmazása esetén?

2/2 Minden tumorra ugyanolyan mechanizmussal értelmezhető-e a gyógyszerrezisztencia kialakulásának ténye, vagy tumor típus specifikusan módosul az aktivált miRNS hálózat és ennek következtében a jellemző jelátviteli útvonalak?

3. Az agyalapi mirigy onkocitómáit összehasonlítva a normál hipofízis szövetekkel, a teljes miRNS profil-t összesen 54 eltérően kifejeződő miRNS-t azonosított PitNET onkocitómában és 8 miRNS-t visszatérő onkocitómákban vs. primer tumorban. Az mRNS expressziós adatok újraelemzésével 485 különböző expresszált gént azonosítottak, melyek leginkább a sejtciklust befolyásolták.

3/1 Terveznek-e, avagy lehetségesnek tartja-e, hogy a Drosha szint helyreállítása terápiás célponttá váljon?

3/2 Csupán feltételezés szintjén kérdezem, hogy hogyan látná esetleg megvalósíthatónak a Drosha szint helyreállítását és ez elegendő lehetne-e a hipofízis onkocitómák gyógyításához?

4. Wnt-szignalizáció szignifikáns változását mutatták ki glükokortikoid hatására, melyben miRNS-k játszanak szerepet. Azt is leírták, hogy különböző modellekben a miRNS profil változása sejt/szövetspecifitást mutatott, de a szabályozott funkciók redundánsak voltak, és elsősorban a WNT jelátvitel szerepelt

4/1 A bemutatott vizsgálatok eredményeként csak a β -katenin-függő WNT jelátvitelre van hatással a glükokortikoid kezelés. Vizsgálták-e esetleg, hogy a sokszor egymást is irányító három fő WNT jelátviteli útvonal működése módosul-e glükokortikoidok hatására?

5. A tumormarkerként alkalmazható miRNS-eket vizeletből, plazmából és szérumból mérték különféle módszerekkel. Kimutatták, hogy a testfolyadékokban található miRNS-ek extracelluláris vezikulákhoz társulhatnak, és potenciálisan érzékenyebb biomarkerekként szolgálhatnak a frakcionálatlan miRNS-ekhez képest.

5/1 Mely forrásokat találták legmegbízhatóbban azonosítható és legkönnyebben mérhető markernek? Volna-e javaslata a diagnosztikát végző laboratóriumoknak, hogy mely technikákat alkalmazhatják a legkisebb befektetéssel?

5/2 Tapasztalataik szerint mennyiben térnek el a teljes vizeletből vagy plazmából/szérumból származó adatok az exoszómákból származó mérési eredményektől?

5/3 Eredményeik tükrében gyorsabbnak és hatékonyabbnak látja-e a jövőben a hasnyálmirigy daganatok diagnosztizálását?

Új megállapítások

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

1. miRNS-ek általi szabályozó mechanizmusok feltárása különböző daganatokban:

- Azonosított három, miR-124-3p, miR-200c-3p és miR-30a-5p, tumorszuppresszor miRNS-t a világossejtes veserák patogenezisében.

- Bizonyította, hogy az aril-hidrokarbon receptor (AHR) szerepet tölt be a világossejtes veserák tumorigenezisében, jelenléte részben diagnosztikai és prognosztikai jelentőségű, és megváltozott szintje részben a csökkent expressziójú miR-124-3p következménye
- A miR-124-3p célmolekuláiként azonosította a CAV1 és FLOT1 géneket, melyeknek szerepe van a tumorsejtek migrációjában és inváziójában és prognosztikai markerként is alkalmazhatók világossejtes veserákban
- Világossejtes veserák és hepatocelluláris karcinóma esetében az erek érbefogását, mint rezisztenciamechanizmust írta le, az angiogenesis gátló szunitinib és szorafenib rezisztencia kialakulásának hátterében.
- Világossejtes veserákban a szunitinib rezisztencia kialakulásában rámutatott, hogy miRNS-ek szabályozzák az MDGA1 és FRAS1 gének működését
- A hipofízis hátsó lebenyéből kiinduló onkocitómák esetében leírták a csökkent miRNS expressziót és megváltozott miRNS expressziós mintázatot, és bizonyította a miR-127-3p és miR-744-5p tumorszuppresszor funkcióját.
- Kimutatta a mitokondriális Aconitáz 2-t (ACO2) célzó miR-744-5p szerepét az onkocitómák citrát-ciklus szabályozásában.
- Kimutatta, hogy a glükokortikoidok hatására megváltozik a Wnt jelátvitel miRNS-ek közvetítésével.

2. *miRNS-ek, mint potenciális extracelluláris biomarkerek vizsgálata területén:*

- Világossejtes veserákban vizeletből exoszómális miRNS kombinációkat határozott meg a daganat kimutatására és egészségestől való elkülönítésére.
- Hipofízis neuroendokrin daganatokban a miR-143-3p-t a betegek nyomonkövetésére alkalmas potenciális biomarkerként azonosította.
- Hasnyálmirigy neuroendokrin tumorokban kimutatta, hogy a miRNS-ek képesek emelni a CgA diagnosztikai pontosságát.

3. *A metiláció-demetiláció, mint epigenetikai módosító mechanizmus vizsgálata daganatok viselkedésében:*

- Globális demetiláció hipofízis neuroendokrin tumorokban a demetiláció folyamata (emelkedett 5hmC/5mC arány) negatívan korrelál a proliferációs rátával és a differenciáltsági állapottal, melynek hátterében a *TET1-3* enzimek és kofaktoruk (*UHRF2*) expressziós eltérései állnak.
- Kimutattuk, hogy az aszpirin daganatellenes hatását hipofízis neuroendokrin daganatokra többek között epigenomikus és genomikus szinten fejti ki, melyben a demetiláció, a p53 és E2f1 transzkripció faktorok, valamint a Survivin központi szerepet töltenek be.

- Leírta a demetiláció-Pttg1-p53 szabályozó kör működését.
- Az 5hmC-t potenciális markerként azonosította a hipofízis neuroendokrin tumorok proliferatív és differenciációs állapotára nézve, valamint a decitabin és az aszpirin daganatellenes hatásának nyomon követésére.

Összefoglalás, javaslat

Butz Henriett MTA doktori értekezése rendkívül magas színvonalú, válogatott tudományos kutatómunka eredményeinek összefoglalása. A doktori értekezésből egyértelműen kiderülnek a nemzetközi kutatásokhoz kapcsolódó saját eredményei. A szerteágazó metodika és az eredmények megfelelő statisztikai elemzése, a laboratóriumi *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* vizsgálatok bevonása, a primer humán minták alkalmazása igen széleskörűen alátámasztott új tudományos eredmények létrejöttét tette lehetővé. A doktori műben megjelenített kutatási eredmények összefoglalása markánsan vetíti előre a klinikai alkalmazás lehetőségeit. A fentiek alapján az értekezés nyilvános vitára tűzését és sikeres védezés esetén a jelölt részére az „MTA Doktora” cím odaítélését javaslom.

Pécs, 2025. március 12.



Dr Pongrácz Judit
egyetemi tanár, az MTA doktora