buzas.krisztina_52_23

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

DAGANATOK KOMMUNIKÁCIÓS STRATÉGIÁI AZ IMMUNRENDSZER VÁLASZAINAK TÜKRÉBEN

DR. BUZÁS KRISZTINA

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
SZENT-GYÖRGYI ALBERT ORVOSTUDOMÁNYI KAR -
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
IMMUNOLÓGIAI TANSZÉK

EÖTVÖS LORÁND KUTATÁSI HÁLÓZAT
SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT
BIOKÉMIAI INTÉZET

SZEGED
2023

„A természet nem ért tréfát: mindig igaz,
mindig komoly, mindig szigorú, mindig igaza van;
a hibák és tévedések mindig az emberéi.”
Johann Wolfgang von Goethe

1. BEVEZETÉS

A dolgozatban ismertetett kísérletes munkák a daganatsejtek környezetükkel való kommunikációjának módjaira és azok következményeinek feltárására irányultak.

Az emberi test szervei, szövetei élénk és kétirányú kommunikációt folytatnak környezetükkel. Fogadják a külvilág ingereit, feldolgozzák azokat és működésük során reagálnak a környezet hatásaira. A testünket érő folyamatos mikrobiális ingerek igen nagy részben Toll Like Receptorok (TLR) segítségével érik el sejtjeinket, és ezen receptorok bonyolult jelátviteli hálózatán keresztül késztetik azokat válaszreakciókra. Az immunsejtjeink, például a makrofágok is képesek reagálni ezekre a mikrobiális ingerekre, akár a daganatos mikrokörnyezet elemeiként is. Munkánk során kísérletes modellekben bemutattuk, hogy a melanóma sejtek és a tumor asszociált makrofágok kommunikációja TLR ligandumokkal befolyásolható, ezáltal a daganatot infiltráló, tumortámogató tulajdonságú immunsejtek anti-tumorális polaritásúvá tehetők. A szolubilis kommunikáció elemei közül mélyebben vizsgáltuk az anti-tumorális hatásáról is ismert interleukin-24-et, amelyről kimutattuk, hogy a TLR ligandok hatására is termelődő interleukin G protein kapcsolt jelátviteli mechanizmusokon keresztül *in vitro* és *in vivo* is segíti a mieloid sejtek migrációját.

A sejtjeink azonban nem csak szolubilis elemekkel, hanem minden testfolyadékunkban megtalálható extracelluláris vezikulákkal (EV) is képesek információt átadni vagy azt fogadni. Az extracelluláris vezikulák rendkívüli komplexitással bíró, membránnal határolt részecskék, amelyek mind a membránjukba ágyazottan, mind a lumenükben jelátviteli molekulák széles választékát hordozzák. A daganatsejtek intercellulárisan megvalósuló vezikuláris kommunikációja kapcsán *in vitro* kísérletes rendszerben bebizonyítottuk, hogy a melanóma exoszómák képesek a daganatszövet mátrixának őssejtes elemeiben onkogén genetikai programot, többek közt PD-1 expressziót indítani. *In vivo* modellekben ezen folyamatok a daganatos megbetegedés progressziójához vezettek.

Az extracelluláris vezikulák tanulmányozása során arra a következtetésre jutottunk, hogy a vezikulák információtartalma függ a kibocsájtó sejt típusától, valamint az adott sejt épp aktuális állapotától; molekuláris mintázatuk stresszorok hatására megváltozik. Ezen változások a vezikulákat felvevő sejtek biológiai működését is befolyásolják, többek között a sejtciklust, a migrációs vagy aggregációs kapacitást, osztódási, illetve apoptotikus hajlamot.

Az EV-k minden testfolyadékban megtalálhatóak, rendkívüli stabilitást mutatnak az enzimatikus hasításokkal szemben és biológiai barriereken is képesek átlépni. Ezen

tulajdonságaik alapján a diagnosztikai eljárásoknak is ideális jelöltjei lehetnek. Klinikai vizsgálatainkban arra a következtetésre jutottunk, hogy a központi idegrendszer tumoraiból származó, szérum vezikulák a megbetegedésre jellemző molekuláris mintázatot hordoznak, amely a vezikulák Raman spektrumában is nyomon követhető. A fehérjemintázatok és Raman spektrumok gépi tanulási módszerekkel történő analízise invazív beavatkozások nélkül alkalmassá tehető bizonyos betegcsoportok egyértelmű elkülönítésére.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Munkánk során arra kerestük a választ, hogyan befolyásolhatják TLR ligandumok a daganatos mikrokörnyezet immunológiai elemeit. Ennek során megvizsgáltuk a tumort infiltráló makrofágok polaritását befolyásoló bakteriális eredetű antigének hatását.
2. Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a bakteriális antigénekkel is indukálható, anti-tumorális hatásáról is ismert interleukin-24 immunsejtekre gyakorolt kemotaktikus működését.
3. Kísérleteink során arra kerestük a választ, megváltoznak-e a tumoros mikrokörnyezet bizonyos elemei daganatsejtek által termelt vezikulák hatására. Célul tűztük ki a melanóma exoszómák PD-1 expresszióra gyakorolt hatásának leírását. Megvizsgáltuk, történik-e a daganatok környezetében található sejteken extracelluláris vezikulák által vezérelt onkogén átprogramozás.
4. Célunk volt a mikrokörnyezeti stresszoroknak a vezikulák molekuláris mintázatára gyakorolt hatásának leírása.
5. Megvizsgáltuk a mikrokörnyezeti stresszorok nyomása alatt termelődő extracelluláris vezikulákra adott sejtbiológiai válaszokat.
6. Tanulmányoztuk a központi idegrendszeri tumorok molekuláris ujjlenyomatának megjelenését a perifériás vérben, különös tekintettel az MMP-9-re.
7. Célul tűztük ki a központi idegrendszeri tumorok extracelluláris vezikula alapú diagnosztikájának fejlesztését.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÖSSZEFOGLALÁSUK

Kutatásaim során munkatársaim segítségével a tumoros mikrokörnyezet különböző alkotóelemeinek a működését vizsgáltam. Mint tudjuk, a daganatok egy nagyon komplex, rendkívül hatékonyan együttműködő sejtközösséget alkotnak, amely közösség tagjai igen intenzív kommunikációt folytatnak egymás között mind a tumorokat alkotó elemekkel, mind pedig a szűkebb és tágabb értelemben vett környezetükkel. Ezek az egymással kommunikáló elemek, legyenek azok szolubilis vagy partikuláris természetűek, mind hozzájárulnak a tumorok sikeréhez. Minden egyes jelátviteli esemény része lehet annak az immunszerkesztési láncolatnak, amely az esetek jelentős részében a daganatok túléléséhez és növekedéséhez vezethet, hiszen sikerrel kerülik el az immunrendszerünk védekezésének különböző rétegeit. Ahogyan egész testünket, a daganatot is érhetik és érik is különböző hatások, amelyek időnként a tumorokon belüli egyensúly megbomlásához, illetve akár a tumorsejtek pusztulásához is vezethetnek.

A bemutatott munkánk során elsőként az immunrendszerünk olyan elemei kerültek a kísérletek középpontjába, amelyek TLR ligandumokkal, mint a külső vagy belső mikrokozmoszunk résztvevőiből származó molekulákkal befolyásolhatóak és részesei lehetnek akár az antitumorális immunválaszoknak is.

Ezen folyamatokat célzó kísérleteink során bebizonyítottuk a következőket:

- A *Chlamydophila pneumoniae* hőinaktiváció után is képes a daganatot infiltráló makrofágok polaritásának megváltoztatására.
- Az inaktivált *C. pneumoniae* által indukált változások jelentős mennyiségű M1 polarizációs állapothoz tartozó citokin és kemokin termelődését idézik elő.
- Az inaktivált *C. pneumoniae* hatására a melanóma tüdőáttéteinek csökkenése következik be az immunkompetens állatokban.

Figyelembe véve a kísérleteink dolgozatban ismertetett menetét, arra a következtetésre jutottunk, hogy a szaporodásra nem képes, hőinaktivált *C. pneumoniae* szuszpenzióban található, lázkeltésre nem alkalmas TLR ligandumok képesek a tumorokat jellemzően infiltráló, tumor támogató M2 típusú makrofágok polaritását az M1, antitumorális irányba eltolni. Ez a hatás és az intenzív antitumorális citokinek és kemokinek termelődése a már kialakult daganatok visszafejlődéséhez is vezethet az immunkompetens állatmodellekben.

A daganatellenes hatásokat tovább vizsgálva, a TLR ligandumokkal indukálható IL-24-nek az immunsejtekre gyakorolt hatásait tanulmányoztuk.

- Munkánk során megállapítottuk, hogy az IL-24 képes az immunsejtek attraktálására mind *in vitro* mind *in vivo* körülmények között. Az IL-24-nek kemotaktikus és kemokinetikus hatását bizonyítottuk a humán monocitákra vonatkozóan.
- *In vivo* az IL-24 kemotaktikus hatással bír a monocitákra, illetve neutrofil granulocitákra vonatkozóan.
- Bizonyítottuk, hogy az IL-24 kemotaktikus jelátvitele G fehérje kapcsolt receptoron keresztül történik és egyúttal a MAPK és JAK jelátviteli útvonalak is érintettek.

A TLR ligandumok és szolubilis faktorok tumoros mikrokörnyezetben való immunmodulációs hatásainak vizsgálata során kerültek a látóterünkbe az igen élénk kommunikációs útvonalak partikuláris szereplői, a kis extracelluláris vezikulák (sEV).

- Bebizonyítottuk, hogy a melanóma sejtek által kibocsájtott extracelluláris vezikulák a daganatszövet résztvevőinek tekintett, illetve a testszerte megtalálható mezenchimális őssejtekben (MSC) egy onkogén átprogramozást képesek elindítani.
- A melanóma sejtek extracelluláris vezikulái az MSC-kben mind mRNS, mind fehérje szinten olyan útvonalak és molekulák kifejeződését indítják el, amelyek a melanóma sejtekre jellemzőek, ilyenek a migrációs kapacitás élénkülése, a daganatszövet növekedése és áttétképzési hajlandóságának emelkedése.

Az sEV-k tehát igen hatékony információhordozók, a bennük található molekuláris összetétel változása nagy valószínűséggel a befogadó sejtek biológiáját és viselkedését is képes lehet megváltoztatni. Felmerül a kérdés, ha olyan kritikus változásokat képesek előidézni, mint egy szöveti őssejtben elindított onkogén program, vajon a környezeti stresszorok vagy akár a daganatterápiák milyen hatást gyakorolnak a vezikuláris tartalomra és ezáltal a kiváltott sejtes válaszokra.

- Kísérleteink során azt találtuk, hogy a környezeti stresszorok hatására nem csak a termelődő sEV-k mennyisége, de molekuláris összetétele is szignifikáns mértékben változik meg, a miRNS és fehérje tartalom tekintetében.
- A stresszorok nyomása alatt képződő sEV-k befolyásolják a sejtciklust, elősegítik a daganatsejtek migrációját, megváltoztatják a mikroszövet-képzési kapacitást.

Mivel az sEV-k minden testfolyadékban megtalálhatóak és a szolubilis biomarkerekhez képest stabilak, a napjainkban egyre nagyobb népszerűségnek örvendő folyadékbiopsziák ideális célpontjaivá válhatnak. Különösen igaz ez abban az esetben, ha a nehezen hozzáférhető

központi idegrendszeri tumorokról (CNS) beszélünk. Megfigyeléseink során azt tapasztaltuk, hogy az sEV-k segítségével elkülöníthetjük egymástól a daganatos betegségekben szenvedő páciensek különböző csoportjait. Kísérleteink során arra a következtetésre jutottunk, hogy az sEV-k komplex analízisével sokkal nagyobb hatékonysággal és biztonsággal vagyunk képesek a betegcsoportok megállapítására, mintha egyedi molekulákat vizsgálnánk.

- Bebizonyítottuk, hogy a CNS daganatokban szenvedő betegek szérumából izolált sEV-k alkalmasabbak a proteomikai elemzésen alapuló klasszifikációra, mint a teljes szérum minták. Szérumból izolált sEV-k vizsgálatával sikerült egy olyan fehérjét, az MMP-9-et azonosítanunk, amely a glioblasztómában (GBM) szenvedő betegek esetében prognosztikus értékkel bírhat.
- Az sEV-k Raman spektroszkópiája segítségével igen magas, 80% feletti szenzitivitással és specificitással tudjuk a CNS tumorokban szenvedő betegeket a szövettani diagnózison alapuló csoportokba sorolni.

Az sEV-k és más extracelluláris vezikulák jelentősége az intercelluláris kommunikációban több szinten jelenik meg:

- A vezikulák nem a sejtek hulladéklerakói, a molekuláris tartalom jelentős része irányítottan kerül a membráncsomagokba.
- A molekuláris tartalom összetételét komplex sejtélettani változások határozzák meg, így az egyedi molekulák jelátvivő szerepe elveszik, helyette a különböző komponensek egymáshoz viszonyított aránya válik meghatározóvá.
- A kettős foszfolipid réteg által határolt struktúrák minden eddig ismert módozatnál hatékonyabb információtranszfert valósítanak meg, hiszen beltartalmukat megvédik az enzimatikus hasításoktól vagy roncsoló mechanikai hatásoktól.

Véleményem szerint különlegesen érdekessé teszi az EV-k útján történő molekuláris információtranszfert az a megközelítés, mely szerint a vezikuláris transzport egy lehetséges magyarázata annak, hogyan válhat egy lokális, patológiás folyamat szisztémás betegséggé. Az sEV-k Raman spektroszkópiai vizsgálata megtanított bennünket arra, hogy a folyadékbiopsziás vizsgálatok esetében nem kizárólag az „egy betegség-egy molekula” megközelítés lehet az üdvözítő. Munkáinkban nem az egyedi molekulákat, ellenben a kis méretű extracelluláris vezikulákat tekintettük az információ új egységének. Az sEV-k komplexitása mintegy jelerősítőként szerepel vizsgálatainkban, nem keresünk egyedi molekulákat, hanem a teljes molekuláris tartalommal és azok arányának felszínre hozásával próbáljuk meg leírni az emberi test patofiziológiai állapotát.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Célkitűzéseink megválaszolásához alkalmazott módszerek legfontosabb munkafolyamatainak, logikájának és a kísérleteinkben felhasznált néhány speciális eljárásnak ismertetése.

4.1 A makrofág polarizáció vizsgálatának kísérletes modelljei

Munkánk során arra kerestük a választ, hogyan befolyásolhatják bakteriális eredetű antigének a tumort infiltráló makrofágok polaritását.

Etikai engedélyek: Minden állatkísérletet a nemzeti (1998. XXVIII; 40/2013) és az európai (2010/63/EU) állatetikai irányelveknek megfelelően végeztünk. A kísérleti jegyzőkönyveket az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Állatkísérleti és Etikai Bizottsága és az Országos Állatkísérleti és Etikai Bizottság hagyta jóvá (engedélyszám: XVI./03521/2011.).

Egérmodell: B16F1 melanómasejteket (ECACC) intravénásan ($1x10^5$ sejt/100 µl) adtunk 6-8 hetes nőstény, immunkompetens C57BL/6 vagy immunhiányos NOD/Scid IL2rg null (NSG) egereknek (Charles River Laboratories). Egy héttel a tumorsejtek beadása után az egereket Hep2 sejtekben (CCL-23, ATCC) szaporított *C. pneumoniae* CWL-029 törzzsel (VR-029, ATCC) kezeltük. A *C. pneumoniae*-t és a Mock kontrollt (feldolgozott Hep2 sejtek) 30 percig 90˚C-on hőinaktiváltuk. Az egereket nátrium-pentobarbitállal (7,5 mg/ml) enyhén szedáltuk, és a tumorsejtek injektálása után 7, 9, 11, 14 és 16 nappal intranazálisan 1×10^6 IFU *C. pneumoniae*-vel kezeltük. Az immunhiányos egerek fizikai állapota rendkívül gyorsan romlott, az állatokat a harmadik kezelést követő 14. napon elaltattuk. E modell különleges előnyei a következők: (i) a melanómasejtek farokvénába oltását követő 7 napon belül látható tüdőtumor-metasztázisok alakulnak ki, anélkül, hogy más szervekbe jelentős mértékben terjednének; (ii) a *C. pneumoniae* tüdőspecifikus, intracelluláris kórokozó, amely jelentős mértékben kolonizálja még a tüdőmetasztázisokat is. Az inhalációs kezelést követően 3 állatot/csoport elaltattunk, és a tüdejüket fehérje-, mRNS- és szövettani elemzéshez begyűjtöttük. A fennmaradó egerek 4. (14. nap) és 5. (16. nap) kezelést is kaptak, ebben az esetben a túlélést követtük nyomon. A végponton az állatokat elaltattuk, eltávolítottuk a tüdejüket, és 3 független személy megszámolta a felszíni metasztázisok számát.

Citokinek és kemokinek kimutatása: A citokinek és kemokinek detekcióját klasszikus immunológiai módszerekkel, specifikus antitestek használatával, illetve qPCR segítségével végeztük.

C. pneumoniae kimutatása a beteg primer tumorából PCR segítségével: a DNS-t a formalinban rögzített, paraffinba ágyazott (FFPE) mintákból a Nucleospin® FFPE DNS-kit (Macherey-Nagel) segítségével extraháltuk. A páciens szövettani mintáját érintő kísérletet a Nemzeti és Regionális Etikai Bizottság VI-R-039/01840-2/2012; 25363/2012/EKU; 448/PI/2012 számú etikai engedélyének megfelelően végeztük. A kísérleti jegyzőkönyveket a Nemzeti és Regionális Etikai Bizottság jóváhagyta (engedélyszám: MCC-INTER-001).

4.2 Az IL-24 immunaktiváló hatásának vizsgálata

Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a bakteriális antigénekkel is indukálható, anti-tumorális hatásáról ismert interleukin-24 immunsejtekre gyakorolt kemotaktikus működését.

Migrációs vizsgálatok: Az *in vitro* kemotaxis vizsgálatokhoz a mikro-Boyden kamrákat és szabványos polikarbonát track-etch (PCTE) membránokat (5 µm pórusméretű) használtunk a felső lyukakba helyezett sejtek elkülönítésére a kemoattraktánsokkal hígított kemotaxis közegtől. A neutrofileket 60, míg a monocitákat 90 percig inkubáltuk, majd a membránt eltávolítottuk, a sejtoldalt letöröltük, és a vándorolt sejteket tartalmazó membránt H&E-vel megfestettük. A membránon átjutott, tehát a vándorló, H&E-vel festett sejtek számát mikroszkóppal határoztuk meg 400-szoros nagyításban. A kemotaktikus indexet úgy számítottuk ki, hogy az indukált migráció során megszámlált sejtek számát elosztottuk a spontán migráció során megszámlált sejtek számával. A vizsgálatokat legalább hatszor megismételtük. A statisztikai elemzést GraphPad Prism segítségével végeztük el.

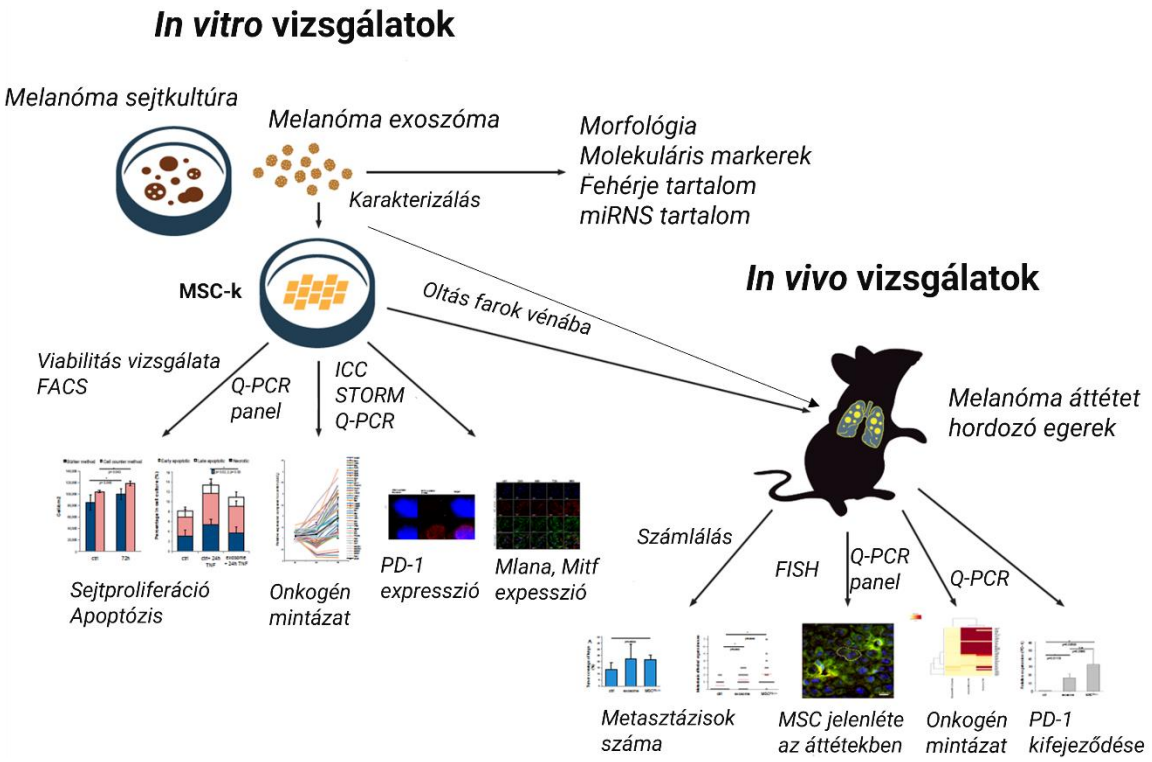
A „sakktábla" kemokinézis vizsgálathoz a monocitákat 37 °C-on előkezeltük rekombináns IL-24-gyel a jelzett koncentrációkban 30 percig, mielőtt a mikro-Boyden-kamra felső lyukaiba töltöttük volna őket. A GiCPR jelátvitelének gátlására 100 ng/ml pertussis toxint (List Biological Laboratories) használtunk. 50 µM AG490-et (Calbiochem) használtunk a JAK család inhibitoraként és 50 µM U0126-ot (Sigma) a MEK1 és a MEK2 inhibitoraként. A tápfolyadékban szuszpendált sejteket a specifikus koncentrációjú inhibitorokkal 30 percig kezeltük 37 °C-on vízfürdőben.

Egér légzsák modell: Protokollunk Sironi et al. módszerén alapszik. A tesztegerek hátfelszínén szőrzet leborotválása után szubkután 3 ml levegőt fecskendeztünk, hogy légzsákot formáljunk. A 3. napon a folyamatot 2,5 ml levegővel ismételtük a légzsák stabilizálása céljából. A 6. napon 1 ml steril HBSS (w/o Ca^{2+}/Mg^{2+}) kontroll mellett HBSS-ben oldott hatóanyagot, CCL2-t, valamint IL-24-t fecskendeztünk a légzsákokba. 24 h elteltével az egereket CO_2-dal elaltattuk és a légzsákokban megjelenő leukocitákat összegyűjtöttük. Minden kezelési csoport 5 állatot

tartalmazott, a CCL2 esetén 5, míg az IL-24 esetén 4 kísérletet végeztünk. Az adatokat átlag +SEM értékben ábrázoltuk és kétmintás Student-féle t-próbával elemeztük a GraphPad Prism szoftver segítségével.

4.3 A melanóma-eredetű vezikulák vizsgálata

Kísérleteink során arra kerestük a választ, megváltoznak-e a tumoros mikrokörnyezet bizonyos elemei daganatsejtek által termelt vezikulák hatására. Célul tűztük ki a melanóma exoszómák PD-1 expresszióra gyakorolt hatásának leírását. Megvizsgáltuk, történik-e a daganatok környezetében található sejteken extracelluláris vezikulák által vezérelt onkogén átprogramozás. A munkafolyamat az **1. ábrán** követhető nyomon.



1. ábra. Kísérleti elrendezés a mezenchimális őssejtek melanóma exoszómákkal történő átprogramozásának vizsgálatára.

Etikai engedélyek: A C57BL/6N egereket (Charles River Laboratories) kórokozómentes körülmények között tartottuk, a kísérleteket a 1998. XXVIII.; 40/2013 és a 2010/63/EU állatetikai irányelvekkel összhangban végeztük. A kísérleti jegyzőkönyveket jóváhagyta az MTA-SZBK Állatkísérleti és Etikai Bizottsága és a Magyar Nemzeti Állatkísérleti és Etikai Bizottság (engedélyezési számok: CSI/01/3929-4/2017 és CSI/01/3929-4/2017).

Egérmodell az exoszómális kezeléshez: A B16F1 melanómasejteket intravénásan (1×10^5 sejt/100 µl) adtuk 6-8 hetes nőstény egereknek. Az egereknek intravénásan kontroll puffert (100 µl), exoszómával exponált MSC-ket (1×10^5 sejt/100 µl) vagy exoszómákat (40 µg/100 µl) adtunk be 7, 8, 9, 10 és 11 nappal a tumorbefecskendezés után. Egy héttel az első MSC/exoszóna injekció után 3 állatot/csoport túlaltattunk, a tüdejüket eltávolítottuk, lefényképeztük és -80 °C-on tároltuk a további fehérje, mRNS- és szövettani elemzéshez. A kísérletben tartott egereket további 10 napig figyeltük. A végponton az állatokat elaltattuk, és a tumor áttéteket a tüdejükben, illetve testszerte vizsgáltuk, az érintett szerveket begyűjtöttük szövettani elemzés céljából. A kísérleteket 3 alkalommal ismételtük.
Tumor lefedettség: A tüdő daganatos lefedettségét ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg. Megmértük a tumorok és az egészséges régiók területét, és meghatároztuk a tumorlefedettség százalékos arányát. Az SD-t és a p-értékeket a Microsoft Excel programban számoltuk ki.

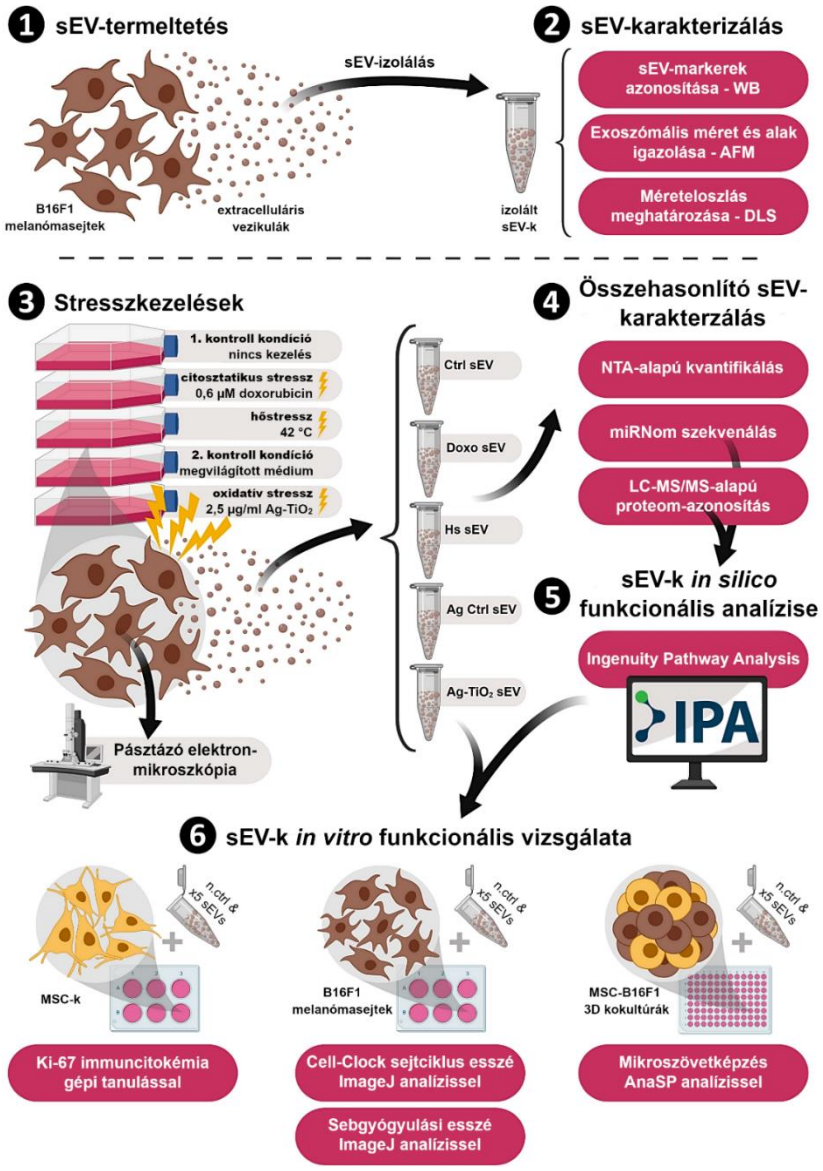
Az áttétekkel kapcsolatos érátmérő kvantitatív meghatározása: A natív állatok tüdejéből 4 µm-es kriosztátmetszeteket készítettünk szilanizált tárgylemezekre, majd Fix&Perm A-B oldattal (Thermo Fisher Scientific) fixáltuk. A metszeteket hematoxilinnal ellenfestettük, mostuk és fedőlemezre helyeztük. A metszeteket automata diaszkennerrel (3DHistech) digitalizáltuk, a 3DHISTECH Pannoramic Viewer (3DHistech) szoftver segítségével. A szigorú tumorhatárt gondosan megjelöltük, majd megmértük az erek átmérőjét.

Exoszóma izolálás és jellemzés: Az exoszómákat Peinado és munkatársai protokolljának adaptálásával izoláltuk melanóma sejtek felülúszójából. A B16F1 felülúszókat legyűjtöttük, kiegészítettük proteáz inhibitor koktéllal (Roche), az sEV-ket differenciál centrifugálással és szűréssel izoláltuk (780 × g 5 perc 4 °C; 3900 × g 15 percig 4 °C; szűrés 0,2 µm-es membránon (Millipore); 150.000 × g (T-1270) 60 min 4 °C). A pelletet kétszer mostuk, majd DPBS-ben reszuszpendáltuk és -80 °C-on tároltuk. Az exoszómális fehérjék koncentrációját Pierce BCA Protein assay kit (Thermo Fischer Scientific) segítségével határoztuk meg, majd AFM-mel és/vagy SEM-mel, NTA-val és Western blottal jellemeztük.

PD-1 meghatározások: A PD-1 fehérje kimutatása Western blot technikával, anti-PD-1 mouse monoklonális ellenanyag segítségével történt (Biolegend). qPCR-hez a specifikus primer próbák az online Roche Universal Probe Library Assay Design Center használatával lettek tervezve. A PD-1 immunfluoreszcens kimutatásához elsődleges ellenanyagként anti-PD-1 (Biolegend), másodlagos ellenanyagként Alexa Fluor 647 konjugált anti-rat ellenanyagot (Jackson ImmunoResearch Laboratories) használtunk.

A dSTORM szuperrezolúciós kísérletet egy egyedi gyártású invertált Nikon Eclipse Ti-E vázon alapuló inverz mikroszkópon végeztük. Az összes dSTORM képet 647 nm-es gerjesztési hullámhosszú EPI-megvilágítással készítettük el (Nikon 647 nm, 300 mW). A képeket egy Andor iXon3 897 BV EMCCD digitális fényképezőgéppel (512 × 512 pixel, 16 µm-es pixelmérettel) készítettük. A felvett képhalmazokat a rainSTORM lokalizációval értékeltük, elemeztük, vizualizáltuk. A többszínű összevont képeket ImageJ szoftverrel hoztuk létre.

Célunk volt továbbá leírni a mikrokörnyezeti stresszoroknak a vezikulák molekuláris mintázatára gyakorolt hatását és megvizsgáltuk a mikrokörnyezeti stresszorok nyomása alatt termelődő extracelluláris vezikulákra adott sejtbiológiai válaszokat. A munkafolyamat a **2. ábrán** követhető nyomon.



2. ábra. Melanóma sEV-k vizsgálatának kísérleti elrendezése.
Jelmagyarázat: n.ctrl: negatív kontroll, x5 sEVs: 5-féle sEV-kezelés.

Stresszkörülmények: A B16F1 sejtkultúrákat öt különböző módon kezeltük EV-mentesített FBS-tartalmú közegben 72 órán keresztül. A kontroll csoport csak friss tápfolyadékot kapott. Citosztatikus stressz gyanánt a sejteket 0,6μM doxorubicinnel kezeltük, a hőstresszelt sejteket 42 °C-on inkubáltuk 2 órán át minden 24 órában (összesen 3 alkalommal), az oxidatív stressznek kitett sejteket 2,5 μg/ml Ag-TiO_2-vel kezeltük fotokatalízist kiváltó megvilágítás mellett. A fotoreaktív Ag-TiO_2 nanorészecskéket alacsony nyomású higanylámpával indukáltuk ($\lambda \geq 360$ nm, GCL303T5/4 típus, LightTech). Minden csoportban 72 órás felülúszókat gyűjtöttünk, 6 párhuzamos sejttenyészetből, ezeket összevontuk és elvégeztük az sEV izolálást.

A mikroszövetek előállítása és analízise: MSC/MEF és B16F1 sejtek 1:1 arányú keverékét 96-lyukú GravityPLUS függőcsepp lemezekre (InSphero) ültettük sEV- vagy DPBS-tartalmú mediumban (5.000 sejt/40 μl/lyuk). A mikroszövetek kialakulását 72 h-n át követtük, majd azokat egy Axiovert S100 mikroszkópra (Zeiss) szerelt Nikon D5000 fényképezőgéppel fotóztuk. A mikroszövetek morfológiai paramétereit az AnaSP szoftverrel számszerűsítettük. A kísérletet 3 alkalommal ismételtük meg.

4.4. A keringő vezikulák diagnosztikai potenciáljának vizsgálata

Jelen kísérletsorozatban tanulmányoztuk a központi idegrendszeri tumorok molekuláris ujjlenyomatának megjelenését a perifériás vérben, és célul tűztük ki a központi idegrendszeri tumorok extracelluláris vezikula alapú diagnosztikájának fejlesztését.

Beteg kohorsz: A keringő vezikulák diagnosztikai potenciáljának vizsgálatához összesen 222, a Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinikáján, 2015 márciusa és 2018 januárja között kezelt beteg vérmintáit elemeztük. A daganat-asszociált mintákat glioblastoma multiforme (GBM), meningeóma (M) és nem kissejtes tüdőrákból származó agyi metasztázisban (BM) szenvedő betegektől nyertük, a gerincvelő porckorongsérvben (nem daganatos CNS betegség) szenvedő betegek szolgáltak kontrollként. (Etikai engedélyek: 51450-2/2015/EKU (0411/15), Orvosi Kutatási Tanács, Tudományos és Kutatási Etikai Bizottság, Budapest; 121/2019-SZTE, Szegedi Tudományegyetem, Humán Vizsgálatok Felügyelő Bizottsága, Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Szeged).

Szérum minták előkészítése, sEV izolálás: A perifériás vér szobahőmérsékleten (RT) történő 1 órás alvadását követően az sEV izolálást a szérummintákból differenciál-centrifugálással végeztük (20 perc 3000× g-nél, 10 °C-on; 30 perc 10.000× g-nél, 4 °C-on; 70 perc 100.000× g-nél, 4 °C-on). Az utolsó centrifugálási lépés után a pelletet Dulbecco foszfáttal pufferelt sóoldatban (DPBS) reszuszpendáltuk, és a további feldolgozásig -80 °C-on tároltuk.

Az sEV minták jellemzése: Az sEV-k jellemzéséhez a "Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018" (MISEV 2018) című útmutatóban foglalt főbb javaslatokat és követelményeket követtük (Théry et al., 2018), a mintákat NTA, Western blot és TEM analíziseknek vetettük alá.

NTA: Az sEV-ket részecskementes DPBS-ben hígítottuk, és 532 nm-es lézerrel ellátott NanoSight NS300 műszerrel (Malvern Panalytical Ltd.) elemeztük. Minden mintáról hat darab 60 s-os videót rögzítettünk állandó beállítások mellett, majd ezeket elemeztük, hogy információkat kapjunk a méreteloszlásról és a részecskekoncentrációról.

Westen blot analízis: A klasszikus EV-markereket Western blot-elemzéssel klasszifikáltuk NuPAGE-reagensek és egy XCell SureLock Mini-Cell System (Thermo Fisher Scientific) segítségével. A CD81, Alix és Calnexin markerek kimutatásához nyúlban termeltetett anti-humán CD5L, anti-humán CD81, anti-humán Alix és anti-humán Calnexin (Sigma-Aldrich) elsődleges antitesteket és HRP-konjugált anti-nyúl IgG (R&D Systems) másodlagos antitestet használtunk. A THP-1 sejtvonal (ATCC) lizátumát használtuk a Calnexin pozitív kontrolljaként.

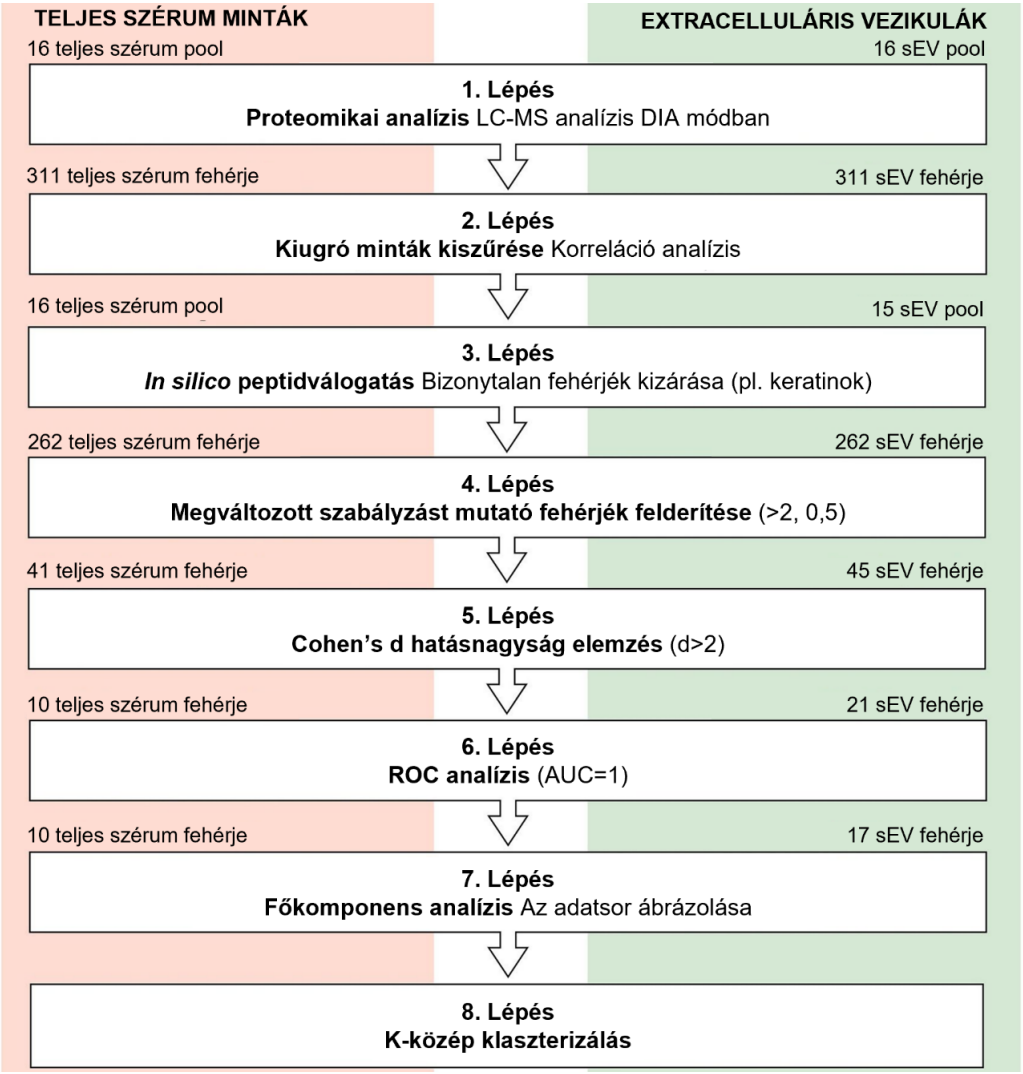
Transzmissziós elektron mikroszkópia: Az sEV morfológiájának vizsgálatához TEM-analízist végeztünk egy Tecnai G2 20 X-Twin típusú műszerrel (FEI, Hillsboro), 200 kV-os gyorsítófeszültségen. A TEM-mérésekhez a mintákat rácsra (200 mesh-es rézrácsokkal ellátott carbon filmre (CF200-Cu, Electron Microscopy Sciences, Hat-field, PA, USA) vittük fel, és festés vagy más fixáló eljárás nélkül szárítottuk.

Az LC-MS/MS vizsgálatokba bevont betegek: A központi idegrendszeri daganatokhoz kapcsolódó jellegzetes fehérje-ujjlenyomat vizsgálatába 96 mintát vontunk be a négy betegcsoportból (GBM, BM, M, CTRL). Mindegyik csoport 24 vegyes életkorú és nemű egyént tartalmazott (**1. táblázat**). Az egyénekből hat mintacsoportot hoztunk létre, így csoportonként négy párhuzamos mintát tudtunk vizsgálni. A vérmintákat egy nappal az idegsebészeti beavatkozás előtt vettük minden egyes tumoros esetben, és egyik beteg sem kapott sugár- vagy kemoterápiát a tumor reszekciója előtt.

1. táblázat. LC-MS/MS analízisek betegcsoportjainak jellemzése.

Beteg-csoportok	Minták száma	Életkor (év)			Nem	
		Tartomány	Átlag	Medián	Férfi (%)	Nő (%)
CTRL	24	20–81	52,9	50,5	9 (37,5)	15 (62,5)
GBM	24	33–82	64,9	67,0	13 (54,2)	11 (45,8)
BM	24	42–82	64,0	64,0	13 (54,2)	11 (45,8)
M	24	30–79	58,0	60,0	4 (16,7)	20 (83,3)

LC-MS-alapú proteomikai vizsgálatok és adatelemzésük: A folyamatábra (**3. ábra**) mutatja azt a munkamenetet, amely alapján központi idegrendszeri tumorok molekuláris ujjlenyomatának megjelenését viszgáltuk a perifériás vérben. Ebben az esetben a daganatok osztályozása a proteomikai eredmények alapján történt.



3. ábra. Proteomikai adatok elemzése a betegcsoportok klasszifikálására.

MMP-9 analízisekben vizsgált betegek: A Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinikáján kezelt 222 beteg szérummintáinak sEV izolátumát elemeztük (**2. táblázat**).

2. táblázat. MMP-9 vizsgálatok betegcsoportjainak jellemzése.

Beteg-csoportok	Betegek száma	Életkor (év)			Nem	
		Tartomány	Átlag	Medián	Férfi (%)	Nő (%)
CTRL	36	20–81	53,6	54	16 (44,4)	20 (55,6)
GBM	121	29–82	57,7	60	72 (59,5)	49 (40,5)
BM	37	42–82	62,8	64	21 (56,8)	16 (43,2)
M	28	30–79	58,6	60	5 (17,9)	23 (82,1)

ELISA vizsgálat az sEV-k MMP-9 koncentrációjára vonatkozóan: Standard görbe és két-két párhuzamos futtatása mellett az első lépésben 50 µl vizsgálati puffert és 50 µl mérési sztenderdet vagy 12-szeres hígítású mintákat adtunk a megfelelő lyukakba, majd a lemezeket lezártuk és szobahőmérsékleten 2 órán át inkubáltuk, miközben 200 fordulat/perc sebességgel rázattuk. Az inkubálás után a lemezeket négyszer mostuk mosópufferrel. Az első lépést további három inkubációs lépés követte, nevezetesen 100 µl humán MMP-9 detektáló antitest oldatot, 100 µl µL Avidin-HRP oldatot és 100 µL D szubsztrát oldatot adtunk minden egyes lyukba, és szobahőmérsékleten inkubáltuk 1 órán át, 30 percig, illetve 15 percig. A lemezeket négyszer mostuk mosópufferrel az egyes inkubációs eljárások között. Az utolsó lépést sötétben végeztük, majd a reakciót 100 µl oldat hozzáadásával leállítottuk; az abszorbanciát azonnal leolvastuk 450 nm-en és 570 nm-en egy asztali benchtop readerrel (Multiskan RC, Thermo Labsystems, Waltham, MA, USA).

Statisztikai analízisek az MMP-9 vizsgálatokhoz: A statisztikai tesztek elvégzése előtt az MMP-9 szintet a szérum sEV-k fehérjetartalmára normalizáltuk, ami azt jelenti, hogy az MMP-9 koncentrációt (ng/mL) elosztottuk az EV-ben dúsított izolátumok fehérjekoncentrációjával (ng/mL) minden minta esetében. Az összes analízis eredményét milliomodrészben (ppm) adtuk meg.

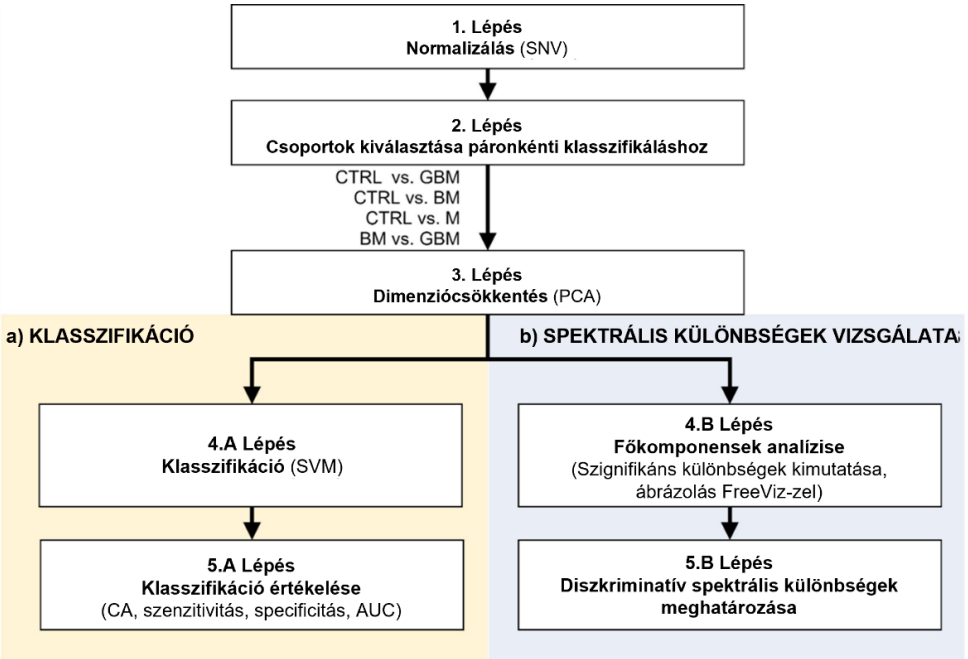
Raman spektroszkópiai elemzésekben vizsgált betegek: A szérumból származó sEV-k molekuláris tartalmának Raman-spektroszkópiai vizsgálatába a beteg kohorszból összesen 138 beteget vontunk be (**3. táblázat**).

3. táblázat. Spektroszkópiai vizsgálatok betegcsoportjainak jellemzése.

Beteg-csoportok	Betegek száma	Életkor (év)			Nem	
		Tartomány	Átlag	Medián	Férfi (%)	Nő (%)
CTRL	36	20–81	53,6	54	16 (44,4)	20 (55,6)
GBM	46	33–82	64,3	66	28 (60,9)	18 (39,1)
BM	28	42–82	63,5	62,6	18 (64,3)	10 (35,7)
M	28	30–79	58,6	60	5 (17,9)	23 (82,1)

Raman spektroszkópiai mérések: a sEV minták Raman spektrumának felvételét Senterra II (Bruker) mikroszkóppal végeztük visszaszórásos elrendezést alkalmazva. A mintákat kalcium-fluorid hordozóra cseppentettük, levegőn szárítottuk (RT). Minden mintát ugyanazokkal a konfigurációs paraméterekkel elemeztünk (névleges lézerteljesítmény: 12,5 mW; integrációs idő: 30 másodperc; interferométer felbontása: 1,5 cm^{-1}; gerjesztési hullámhossz: 532 nm.) A spektrumokat 50×-es optikai objektívvel (Olympus) gyűjtöttük, majd átlagolás előtt (5 spektrum/minta) alapvonal korrekciónak vetettük alá OPUS szoftver segítségével. A 801 cm^{-1} és 3100,5 cm^{-1} közötti spektrumtartományt használtuk a további elemzésekhez.

Az adatok transzformálása: az alapvonal korrekción átesett adatok normalizálását az SNV-módszerrel végeztük (**4. ábra**) Az SNV-vel normalizált spektrumokat PCA-val vizsgáltuk. Az adatok transzformálását az Orange 3.27.0 szoftver segítségével végeztük.



4. ábra. Az sEV-k molekuláris ujjlenyomatának spektroszkópiai megközelítése.
Rövidítések: AUC: area under the curve; CA: classification accuracy; SNV: standard normal variate; SVM: support-vector machine; PCA: principal component analysis.

Klasszifikáció: az osztályozó modell megalkotásához és teszteléséhez a négy betegcsoportot páronként hasonlítottuk össze (minden betegcsoportot a CTRL csoporthoz, valamint a BM és GBM csoportot). A minták osztályozását a lineáris SVM algoritmus segítségével végeztük el, mely során az adathalmazt tízszer ismételve 90:10 arányban osztottuk szét tanító- és teszthalmazra. Az SVM a teszthalmazba tartozó mintákat a csoporthoz tartozás pontszámával látta el (0-tó 1-ig).

Ahhoz, hogy a tesztmintákat be lehessen sorolni, meghatároztuk a csoporthoz tartozási pontszámok minimális küszöbértékét. A meghatározott küszöbérték feletti pontszámmal rendelkező tesztmintákat az adott célcsoportba soroltuk. Az osztályozás hatékonyságát a szenzitivitás, specificitás és a ROC-analízisből kapott AUC értékek alapján határoztuk meg. Az osztályozást és a hatékonyság értékelését az Orange 3.27.0 és a GraphPad Prism 8.4.3 szoftverek segítségével végeztük el.

Spektrális különbségek azonosítása: a kapott PC-k és a különböző betegcsoportok közötti korrelációt a FreeViz módszerrel határoztuk meg. A PC-k csoportonkénti statisztikai különbségeit Welch *t*-próbával elemeztük. A $p < 0{,}05$ értékeket szignifikánsnak tekintettük. A FreeViz vizsgálatot az Orange 3.78.0 szoftverrel végeztük.

5. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

- A *Chlamydophila pneumoniae* hőinaktiváció után is képes a daganatot infiltráló makrofágok polaritásának megváltoztatására, jelentős mennyiségű, M1 polarizációs állapothoz tartozó citokin és kemokin termelődését idézi elő. Ezen hatások következtében a melanóma tüdőáttéteinek csökkenése következik be az immunkompetens állatokban.
- Az IL-24 képes az immunsejtek attraktálására mind *in vitro* mind *in vivo* körülmények között, humán monocitákra kemotaktikus és kemokinetikus hatással bír.
- Bizonyítottuk, hogy az IL-24 kemotaktikus jelátvitele G fehérje kapcsolt receptoron keresztül történik és egyúttal a MAPK és JAK jelátviteli útvonalak is érintettek.
- Bebizonyítottuk, hogy a melanóma sejtek által kibocsájtott extracelluláris vezikulák a daganatszövet résztvevőinek tekintett, illetve a testszerte megtalálható mezenchimális őssejtekben onkogén átprogramozást képesek elindítani és mind mRNS, mind fehérje szinten olyan útvonalak és molekulák kifejeződését indítják el, amelyek a melanóma sejtekre jellemzőek.
- Kísérleteink során azt találtuk, hogy a környezeti stresszorok hatására nem csak a termelődő sEV-k mennyisége, de miRNS és fehérje összetétele is szignifikáns mértékben változik meg, ez által elősegítik a daganatsejtek migrációját, megváltoztatják a mikroszövet-képzési kapacitást.
- A CNS daganatokban szenvedő betegek szérumából izolált sEV-k alkalmasabbak a proteomikai elemzésen alapuló klasszifikációra, mint a teljes szérum minták. Szérumból izolált sEV-k vizsgálatával sikerült egy olyan fehérjét, az MMP-9-et azonosítanunk, amely a GBM-ben szenvedő betegek esetében prognosztikus értékkel bírhat.
- Ezen sEV-k Raman spektroszkópiája segítségével igen magas, 80% feletti szenzitivitással és specificitással tudjuk a CNS tumorokban szenvedő betegeket a szövettani diagnózison alapuló csoportokba sorolni.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindazok az eredmények, amelyeket ebben a dolgozatban bemutattam, csak egy kicsinyke részét képezik mindannak a sok sikernek és rengeteg kudarcnak, aminek eddigi kutatói pályafutásom során élvezője, vagy épp ellenkezőleg, elszenvedője voltam. Sem a jelenlegi doktori mű, sem a benne foglalt eredmények nem születhettek volna meg a családom, a férjem és a fiam, az édesanyám (†), az édesapám (†), a nagymamám (†) és a barátaim folyamatos, önzetlen támogatása és szeretete nélkül. Mindezekért nekik tartozom hálával.

Immunológus mentoraim közül elsőként Dr. Joost Oppenheimnek (†) és Dr. Zack Howardnak szeretném megköszönni azt, hogy megmutatták nekem, hogyan kell megalkuvás nélkül haladni a tudományos célom felé, álljon elém bármilyen természetű nehézség is. Köszönöm, hogy posztdoktori éveimet vezetésük alatt a Laboratory of Molecular Immunoregulation-ben tölthettem, a National Cancer Institute fredericki kampuszán.

Köszönöm egyetemi mentoraimnak, Prof. Mándi Yvettnek, Prof. Duda Ernőnek és Prof. Minárovits Jánosnak, hogy megmutatták nekem az immunológia szépségeit. Mind az immunológia alapjainak az elsajátítását, mind pedig a citokinek csodálatos világának a megismerését nekik köszönhetem.

Köszönettel tartozom Bíró Tamás professzor úrnak, hogy segített a saját tudományos utam keresésében, hogy mindig bíztatott és feltétel nélkül hitt bennem.

Köszönettel tartozom korábbi és jelenlegi PhD hallgatóimnak: Marton Annamáriának, Harmati Máriának és Gyukity-Sebestyén Edinának, Dobra Gabriellának, Bukva Mátyásnak, Böröczky Tímeának, akik fáradhatatlan munkájukkal megteremtették a jelenlegi munkacsoport működésének alapjait és hozzájárultak ezen dolgozat eredményeinek megszületéséhez. Külön köszönet illeti meg a technikai segítségért Pintér Lillát.

Köszönöm jelenlegi PhD hallgatóimnak, és tudományos diákköri hallgatóimnak a mindennapok apróbb és nagyobb feladatainak gyakorlati kivitelezését.

Hálás vagyok klinikus együttműködő partnereinknek, Prof. Klekner Álmosnak, Prof. Oláh Juditnak, Prof. Hideghéthy Katalinnak, Prof. Barzó Pálnak a klinikai kutatások során nyújtott segítségükért, támogatásukért.

Köszönöm Prof. Gácser Attilának és Dr. Horváth Péternek, hogy támogató, türelmes és megértő főnökeim voltak. Köszönöm Prof. Széll Márta rektorhelyettes asszony és Prof. Lázár György

dékán úr támogatását az MTA doktori értekezésem elkészítéséhez. Hálával tartozom mindazért az erőfeszítésért, amit Kemény Lajos professzor úrral közösen az Immunológiai Tanszék létrehozásáért tettek, és hogy alapító tanszékvezetőként én kaphattam lehetőséget a munkára.

Hálásan köszönöm az Immunológiai Tanszéken és a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban dolgozó minden munkatársamnak, hogy türelmükkel és megértésükkel, vagy technikai segítségükkel támogatták a munkámat.

6. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK, TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

6.1. Az értekezést megalapozó közlemények (tematikus sorrendben)

1. **Buzas, K**; Marton, A; Vizler, C; Gyukity-Sebestyen, E; Harmati, M; Nagy, K; Zvara, A; Katona, RL; Tubak, V; Endresz, V et al.
Bacterial sepsis increases survival in metastatic melanoma: Chlamydophila pneumoniae induces macrophage polarization and tumor regression.
JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY 136 : 4 pp. 862-865. , 4 p. (2016)
IF: 6,287
Összes idézettség: 9 Független idézettség: 7

2. **Buzas, K**; Oppenheim, JJ; Howard, OMZ.
Myeloid cells migrate in response to IL-24.
CYTOKINE 55 : 3 pp. 429-434. , 6 p. (2011)
IF: 3,019
Összes idézettség: 20 Független idézettség: 20

3. Marton, A; Vizler, C; Kusz, E; Temesfoi, V; Szathmary, Z; Nagy, K; Szegletes, Z; Varo, G; Siklos, L; Katona, RL; Tubak, V; Howard, OM; Duda, E; Minarovits, J; Nagy, K; **Buzas, K.**
Melanoma cell-derived exosomes alter macrophage and dendritic cell functions in vitro.
IMMUNOLOGY LETTERS 148 : 1 pp. 34-38. , 5 p. (2012)
IF: 2,337
Összes idézettség: 93 Független idézettség: 89

4. Gyukity-Sebestyén, E; Harmati, M; Dobra, G; Németh, IB; Mihály, J; Zvara, Á; Hunyadi-Gulyás, É; Katona, R; Nagy, I; Horváth, P; Bálind, Á; Szkalisity, Á; Kovács, M; Pankotai, T; Borsos, B; Erdélyi, M; Szegletes, Z; Veréb, ZJ; Buzás, EI; Kemény, L; Bíró, T; **Buzás, K.**
Melanoma-Derived Exosomes Induce PD-1 Overexpression and Tumor Progression via Mesenchymal Stem Cell Oncogenic Reprogramming.
FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 10 Paper: 2459 , 22 p. (2019)
IF: 5,085
Összes idézettség: 32 Független idézettség: 30

5. Harmati, M; Tarnai, Z; Decsi, G; Kormondi, S; Szegletes, Z; Janovak, L; Dekany, I; Saydam, O; Gyukity-Sebestyen, E; Dobra, G; Nagy, I; Nagy, K; **Buzas, K.**
Stressors alter intercellular communication and exosome profile of nasopharyngeal carcinoma cells.
JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY AND MEDICINE 46 : 4 pp. 259-266. , 8 p. (2017)
IF: 2,237
Összes idézettség: 39 Független idézettség: 33

6. Harmati, M; Gyukity-Sebestyen, E; Dobra, G; Janovak, L; Dekany, I; Saydam, O; Hunyadi-Gulyas, E; Nagy, I; Farkas, A; Pankotai, T; Ujfaludi, Z; Horvath, P; Piccinini, F; Kovacs, M; Biro, T; **Buzas, K.**
Small extracellular vesicles convey the stress-induced adaptive responses of melanoma cells.
SCIENTIFIC REPORTS 9 : 1 Paper: 15329 , 19 p. (2019)
IF: 3,998
Összes idézettség: 48 Független idézettség: 45

7. Dobra, G; Bukva, M; Szabo, Z; Bruszel, B; Harmati, M; Gyukity-Sebestyen, E; Jenei, A; Szucs, M; Horvath, P; Biro, T; Klekner, A; **Buzas, K.**
Small Extracellular Vesicles Isolated from Serum May Serve as Signal-Enhancers for the Monitoring of CNS Tumors.
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 21 : 15 Paper: 5359 , 20 p. (2020)
IF: 5,924
Összes idézettség: 13 Független idézettség: 11

8. Dobra, G; Gyukity-Sebestyen, E; Bukva, M; Harmati, M; Nagy, V; Szabo, Z; Pankotai, T; Klekner, A; **Buzas, K.**
MMP-9 as Prognostic Marker for Brain Tumours: A Comparative Study on Serum-Derived Small Extracellular Vesicles.
CANCERS 15: 3 p. 712 (2023)
IF: 6,575
Összes idézettség: 0 Független idézettség: 0

9. Bukva, M; Dobra, G; Gomez-Perez, J; Koos, K; Harmati, M; Gyukity-Sebestyen, E; Biro, T; Jenei, A; Kormondi, S; Horvath, P; Konya, Z; Klekner, A; **Buzas, K.**
Raman Spectral Signatures of Serum-Derived Extracellular Vesicle-Enriched Isolates May Support the Diagnosis of CNS Tumors.
CANCERS 13 : 6 Paper: 1407 , 19 p. (2021)
IF: 6,575
Összes idézettség: 4 Független idézettség: 3

6.2. Idegennyelvű közlemények a PhD fokozat megszerzése előtt (2005 december)

1. **Buzas, K**; Megyeri, K; Miczak, A; Fekete, A; Degre, M; Mandi, Y; Rosztoczy, I.
Different staphylococcal strains elicit different levels of production of T-helper 1-inducing cytokines.
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 51 : 3 pp. 371-384. , 14 p. (2004)
IF: -
Összes idézettség: 8 Független idézettség: 7

2. **Buzas, K**; Megyeri, K; Hogye, M; Csanady, M; Bogats, G; Mandi, Y.
Comparative study of the roles of cytokines and apoptosis in dilated and hypertrophic cardiomyopathies.
EUROPEAN CYTOKINE NETWORK 15 : 1 pp. 53-59. , 7 p. (2004)
IF: 1,747
Összes idézettség: 21 Független idézettség: 18

3. **Buzas, K**; Miczak, A; Degre, M; Megyeri, K.
Rubella virus infection dysregulates the pattern of p63 expression.
APMIS 112 : 10 pp. 656-662. , 7 p. (2004)
IF: 1,5
Összes idézettség: 4 Független idézettség: 2

4. Hogye, M; Mandi, Y; Csanady, M; Sepp, R; **Buzas, K**.
Comparison of circulating levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in hypertrophic cardiomyopathy and in idiopathic dilated cardiomyopathy.
AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY 94 : 2 pp. 249-251. , 3 p. (2004)
IF: 3,14
Összes idézettség: 60 Független idézettség: 60

6.3. A PhD fokozat megszerzése óta megjelent további idegennyelvű közlemények

1. Böröczky, T; Dobra, G; Bukva, M; Gyukity-Sebestyén, E; Hunyadi-Gulyás, É; Darula, Zs; Horváth, P; **Buzás, K**; Harmati, M.
Impact of Experimental Conditions on Extracellular Vesicles' Proteome: A Comparative Study.
LIFE-BASEL 13 : 1 p. 206 (2023)
IF: 3,253
Összes idézettség: 1 Független idézettség: 1

2. Diosdi, A; Hirling, D; Kovacs, M; Toth, T; Harmati, M; Koos, K; **Buzas, K**; Piccinini, F; Horvath, P.
A quantitative metric for the comparative evaluation of optical clearing protocols for 3D multicellular spheroids.
COMPUTATIONAL AND STRUCTURAL BIOTECHNOLOGY JOURNAL 19 pp. 1233-1243. , 11 p. (2021)
IF: 6,155
Összes idézettség: 2 Független idézettség: 1

3. Diosdi, A; Hirling, D; Kovacs, M; Toth, T; Harmati, M; Koos, K; **Buzas, K**; Piccinini, F; Horvath, P.
Cell lines and clearing approaches: a single-cell level 3D light-sheet fluorescence microscopy dataset of multicellular spheroids.
DATA IN BRIEF 36 Paper: 107090 , 9 p. (2021)
IF: -
Összes idézettség: 1 Független idézettség: 0

4. Grexa, I; Diosdi, A; Harmati, M; Kriston, A; Moshkov, N; **Buzas, K**; Pietiäinen, V; Koos, K; Horvath, P.
SpheroidPicker for automated 3D cell culture manipulation using deep learning.
SCIENTIFIC REPORTS 11 : 1 Paper: 14813 , 11 p. (2021)
IF: 4,997
Összes idézettség: 6 Független idézettség: 6

5. Harmati, M; Bukva, M; Boroczky, T; **Buzas, K**; Gyukity-Sebestyen, E.
The role of the metabolite cargo of extracellular vesicles in tumor progression.
CANCER AND METASTASIS REVIEWS 40 : 4 pp. 1203-1221. , 19 p. (2021)
IF: 9,237
Összes idézettség: 9 Független idézettség: 9

6. Peirsman, A; Blondeel, E; Ahmed, T; Anckaert, J; Audenaert, D; Boterberg, T; **Buzas, K**; Carragher, N; Castellani, G; Castro, F et al.
MISpheroID: a knowledgebase and transparency tool for minimum information in spheroid identity.

NATURE METHODS 18 : 11 pp. 1294-1303. , 10 p. (2021)
IF: 47,99
Összes idézettség: 14 Független idézettség: 8

7. Jenei, S; Tiricz, H; Szolomajer, J; Timar, E; Klement, E; Al, Bouni Mohamad Anas; L Rui, M; Kata, D; Harmati, M; **Buzas, K** et al.
Potent Chimeric Antimicrobial Derivatives of the Medicago truncatula NCR247 Symbiotic Peptide
FRONTIERS IN MICROBIOLOGY 11 Paper: 270 , 10 p. (2020)
IF: 5,64
Összes idézettség: 13 Független idézettség: 8

8. Decsi, G; Soki, J; Pap, B; Dobra, G; Harmati, M; Kormondi, S; Pankotai, T; Braunitzer, G; Minarovits, J; Sonkodi, I; Urban, E; Nemeth, IB; Nagy, K; **Buzas, K.**
Chicken or the Egg: Microbial Alterations in Biopsy Samples of Patients with Oral Potentially Malignant Disorders.
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 25 : 3 pp. 1023-1033. , 11 p. (2019)
IF: 2,826
Összes idézettség: 10 Független idézettség: 10

9. Körmöndi, S; Terhes, G; Pál, Z; Varga, E; Harmati, M; **Buzás, K**; Urbán, E.
Human Pasteurellosis Health Risk for Elderly Persons Living with Companion Animals.
EMERGING INFECTIOUS DISEASES 25 : 2 pp. 229-235. , 7 p. (2019)
IF: 6,259
Összes idézettség: 9 Független idézettség: 9

10. Majoros, H; Ujfaludi, Zs; Borsos, BN; Hudacsek, VV; Nagy, Z; Coin, F; **Buzas, K**; Kovács, I; Bíró, T; Boros, IM et al.
SerpinB2 is involved in cellular response upon UV irradiatio
SCIENTIFIC REPORTS 9 : 1 Paper: 2753 , 13 p. (2019)
IF: 3,998
Összes idézettség: 8 Független idézettség: 6

11. Hettmann, A; Demcsák, A; Bach, Á; Decsi, G; Dencs, Á; Pálinkó, D; Rovó, L; Terhes, G; Urbán, E**; Buzás, K** et al.
Prevalence and genotypes of human papillomavirus in saliva and tumor samples of head and neck cancer patients in Hungary.
INFECTION GENETICS AND EVOLUTION 59 pp. 99-106. , 8 p. (2018)
IF: 2,611
Összes idézettség: 6 Független idézettség: 5

12. Banati, F; Koroknai, A; Szenthe, K; Tereh, T; Hidasi, A; Bankuti, B; **Buzas, K**; Lemnitzer, F; Ruzsics, Zs; Szathmary, S et al.
Up-Regulation of Lamin A/C Expression in Epstein-Barr Virus Immortalized B Cells and Burkitt Lymphoma Cell Lines of Activated B Cell Phenotype.
JOURNAL OF MICROBIAL AND BIOCHEMICAL TECHNOLOGY 9 : 3 pp. 087-094. , 8 p. (2017)
IF: -
Összes idézettség:- Független idézettség: -

13. Harmati, M; Gyukity-Sebestyen, E; Dobra, G; Terhes, G; Urban, E; Decsi, G; Mimica-Dukic, N; Lesjak, M; Simin, N; Pap, B; Nemeth I.B; **Buzas, K**.
Binary mixture of Satureja hortensis and Origanum vulgare subsp. hirtum essential oils: in vivo therapeutic efficiency against Helicobacter pylori infection.
HELICOBACTER 22 : 2 Paper: e12350 , 7 p. (2017)
IF: 4,123
Összes idézettség: 14 Független idézettség: 13

14. Piccinini, F; Balassa, T; Szkalisity, A; Molnar, C; Paavolainen, L; Kujala, K; **Buzas, K**; Sarazova, M; Pietiainen, V; Kutay, U et al.
Advanced Cell Classifier: User-Friendly Machine-Learning-Based Software for Discovering Phenotypes in High-Content Imaging Data.
CELL SYSTEMS 4 : 6 pp. 651-655. , 5 p. (2017)
IF: 8,982
Összes idézettség: 44 Független idézettség: 32

15. Zsedenyi, A; Farkas, B; Abdelrasoul, GN; Romano, I; Gyukity-Sebestyen, E; Nagy, K; Harmati, M; Dobra, G; Kormondi, S; Decsi, G; Nemeth IB; Diaspro, A; Brandi, F; Beke, S; **Buzas, K.**
Gold nanoparticle-filled biodegradable photopolymer scaffolds induced muscle remodeling: in vitro and in vivo findings.
MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS 72 pp. 625-630. , 6 p. (2017)
IF: 5,08
Összes idézettség: 9 Független idézettség: 8

16. Lesjak, M; Simin, N; Orcic, D; Franciskovic, M; Knezevic, P; Beara, I; Aleksic, V; Svircev, E; **Buzas, K**; Mimica-Dukic, N.
Binary and Tertiary Mixtures of Satureja hortensis and Origanum vulgare Essential Oils as Potent Antimicrobial Agents Against Helicobacter pylori.
PHYTOTHERAPY RESEARCH 30 : 3 pp. 476-484. , 9 p. (2016)
IF: 3,092
Összes idézettség: 23 Független idézettség: 20

17. Marton, A; Kusz, E; Kolozsi, C; Tubak, V; Zagotto, G; **Buzas, K**; Quintieri, L; Vizler, C.
Vanillin Analogues o-Vanillin and 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde Inhibit NF kappa B Activation and Suppress Growth of A375 Human Melanoma.
ANTICANCER RESEARCH 36 : 11 pp. 5743-5750. , 8 p. (2016)
IF: 1,937
Összes idézettség: 20 Független idézettség: 20

18. **Buzas, K**; Kiss, A; Vizler, C.
Current approaches of tumor immunotherapy.
ACTA BIOLOGICA SZEGEDIENSIS 59 : Suppl. 1. pp. 69-82. , 14 p. (2015)
IF: -
Összes idézettség: - Független idézettség: -

19. Farkas, B; Zsedenyi, A; Gyukity-Sebestyen, E; Romano, I; Nagy, K; Diaspro, A; Brandi, F; **Buzas, K**; Beke, S.
Excimer laser-produced biodegradable photopolymer scaffolds do not induce immune rejection in vivo.
JOURNAL OF LASER MICRO NANOENGINEERING 10 : 1 pp. 11-14. , 4 p. (2015)
IF: 0,759
Összes idézettség: 5 Független idézettség: 1

20. Yanez-Mo, M; Siljander, PR; Andreu, Z; Zavec, AB; Borras, FE; Buzas, EI; **Buzas, K**; Casal, E; Cappello, F; Carvalho, J et al.
Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions.
JOURNAL OF EXTRACELLULAR VESICLES 4 Paper: 27066 (2015)
IF: ekkor még nincs, jelenleg 17,377
Összes idézettség: 2861 Független idézettség: 2599

21. Nagy, Z; Kovács, I; Török, M; Tóth, D; Vereb, G; **Buzás, K**; Juhász, I; Blumberg, PM; Bíró, T; Czifra, G.
Function of RasGRP3 in the formation and progression of human breast cancer.
MOLECULAR CANCER 13 : 1 Paper: 96 (2014)
IF: 4,257
Összes idézettség: 18 Független idézettség: 18

22. Decsi, G; Tarnai, Z; Zsedényi, A; **Buzás, K**; Nagy, K; Sonkodi, I; Minárovits, J.
A szájüregi laphámrák és praeblastomatosisai: a papillomavírus-fertőzés szerepe és a korai diagnózis lehetőségei [Oral carcinoma and its preblastomatoses: The role ofpapillomavirus infection and theprospects of early diagnosis.
LEGE ARTIS MEDICINAE 24 : (3) pp. 111-119. , 9 p. (2014)
Összes idézettség: 0 Független idézettség: 0

23. Juhasz, K; **Buzas, K**; Duda, E.
Importance of reverse signaling of the TNF superfamily in immune regulation.
EXPERT REVIEW OF CLINICAL IMMUNOLOGY 9 : 4 pp. 335-348. , 14 p. (2013)
IF: 3,342
Összes idézettség: 45 Független idézettség: 45

24. Ay, E; Banati, F; Mezei, M; Bakos, A; Niller, HH; **Buzas, K**; Minarovits, J.
Epigenetics of HIV Infection: Promising Research Areas and Implications for Therapy.
AIDS REVIEWS 15 : 3 pp. 181-188. , 8 p. (2013)
IF: 4,023
Összes idézettség: 25 Független idézettség: 20

25. Niller, HH; Banati, F; Nagy, K; **Buzas, K**; Minarovits, J.
Update on microbe-induced epigenetic changes: Bacterial effectors and viral oncoproteins as epigenetic dysregulators.
FUTURE VIROLOGY 8 : 11 pp. 1111-1126. , 16 p. (2013)
IF: 1
Összes idézettség: 5 Független idézettség: 5

26. Szenthe, K; Nagy, K; **Buzas, K**; Niller, HH; Minarovits, J.
MicroRNAs as Targets and Tools in B-Cell Lymphoma Therapy.
JOURNAL OF CANCER THERAPY 4 : 3 pp. 466-474. , 9 p. (2013)
IF: -
Összes idézettség: 1 Független idézettség: 0

27. Keseru, JS; Szabó, I; Gál, Z; Massidda, O; Mingoia, M; Kaszanyitzky, E; Jánosi, S; Hulvely, J; Csorba, A; **Buzás, K** et al.
Identification of β-lactamases in human and bovine isolates of Staphylococcus aureus strains having borderline resistance to penicillinase-resistant penicillins (PRPs) with proteomic methods.
VETERINARY MICROBIOLOGY 147 : 1-2 pp. 96-102. , 7 p. (2011)
IF: 3,327
Összes idézettség: 7 Független idézettség: 5

28. Qi, J; **Buzas, K**; Fan, HT; Cohen, JI; Wang, KN; Mont, E; Klinman, D; Oppenheim, JJ; Howard, OMZ.
Painful Pathways Induced by TLR Stimulation of Dorsal Root Ganglion Neurons.
JOURNAL OF IMMUNOLOGY 186 : 11 pp. 6417-6426. , 10 p. (2011)
IF: 5,788
Összes idézettség: 130 Független idézettség: 128

29. Hutamekalin, P; Farkas, AE; Orbok, A; Wilhelm, I; Nagyoszi, P; Veszelka, S; Deli, MA; **Buzas, K**; Hunyadi-Gulyas, E; Medzihradszky, KF et al.
Effect of nicotine and polyaromtic hydrocarbons on cerebral endothelial cells.
CELL BIOLOGY INTERNATIONAL 32 : 2 pp. 198-209. , 12 p. (2008)
IF: 1,619
Összes idézettség: 45 Független idézettség: 33

30. Birko, Z; Bialek, S; **Buzas, K**; Szajli, E; Traag, BA; Medzihradszky, KF; Rigali, S; Vijgenboom, E; Penyige, A; Kele, Z et al.
The secreted signaling protein factor C triggers the A-factor responseregulon in streptomyces griseus - Overlapping signaling routes.
MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS 6 : 7 pp. 1248-1256. , 9 p. (2007)
IF: 9,425
Összes idézettség: 19 Független idézettség: 9

31. Hofner, P; Seprenyi, G; Miczak, A; **Buzas, K**; Gyulai, Z; Medzihradszky, KF; Rouhiainen, A; Rauvala, H; Mandi, Y.
High mobility group box 1 protein induction by Mycobacterium Bovis BCG.
MEDIATORS OF INFLAMMATION 2007 Paper: 53805 (2007)
IF: 1,162
Összes idézettség: 11 Független idézettség: 10

32. Megyeri, K; **Buzas, K**; Miczak, A; Buzas, E; Kovacs, L; Seprenyi, G; Falus, A; Mandi, Y.
The role of histamine in the intracellular survival of Mycobacterium bovis BCG.
MICROBES AND INFECTION 8 : 4 pp. 1035-1044. , 10 p. (2006)
IF: 3,127
Összes idézettség: 11 Független idézettség: 11

33. **Buzas, K**; Megyeri, K.
Staphylococci induce the production of melanoma differentiation-associated protein-7/IL-24.
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 53 : (4) pp. 431-440. , 10 p. (2006)10 p. (2006)
IF: 0,870
Összes idézettség: 9 Független idézettség: 7

6.4. Öt legfontosabbnak tartott közlemény

1. **Buzas, K**; Oppenheim, JJ; Howard, OMZ.
Myeloid cells migrate in response to IL-24.
CYTOKINE 55 : 3 pp. 429-434. , 6 p. (2011)
IF: 3,019
Összes idézettség: 20 Független idézettség: 20

2. Marton, A; Vizler, C; Kusz, E; Temesfoi, V; Szathmary, Z; Nagy, K; Szegletes, Z; Varo, G; Siklos, L; Katona, RL; Tubak, V; Howard, OM; Duda, E; Minarovits, J; Nagy, K; **Buzas, K.**
Melanoma cell-derived exosomes alter macrophage and dendritic cell functions in vitro.
IMMUNOLOGY LETTERS 148 : 1 pp. 34-38. , 5 p. (2012)
IF: 2,337
Összes idézettség: 93 Független idézettség: 89

3. Gyukity-Sebestyén, E; Harmati, M; Dobra, G; Németh, IB; Mihály, J; Zvara, Á; Hunyadi-Gulyás, É; Katona, R; Nagy, I; Horváth, P; Bálind, Á; Szkalisity, Á; Kovács, M; Pankotai, T; Borsos, B; Erdélyi, M; Szegletes, Z; Veréb, ZJ; Buzás, EI; Kemény, L; Bíró, T; **Buzás, K.**
Melanoma-Derived Exosomes Induce PD-1 Overexpression and Tumor Progression via Mesenchymal Stem Cell Oncogenic Reprogramming.
FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 10 Paper: 2459 , 22 p. (2019)
IF: 5,085
Összes idézettség: 32 Független idézettség: 30

4. Harmati, M; Gyukity-Sebestyen, E; Dobra, G; Janovak, L; Dekany, I; Saydam, O; Hunyadi-Gulyas, E; Nagy, I; Farkas, A; Pankotai, T; Ujfaludi, Z; Horvath, P; Piccinini, F; Kovacs, M; Biro, T; **Buzas, K.**
Small extracellular vesicles convey the stress-induced adaptive responses of melanoma cells.
SCIENTIFIC REPORTS 9 : 1 Paper: 15329 , 19 p. (2019)
IF: 3,998
Összes idézettség: 48 Független idézettség: 45

5. Bukva, M; Dobra, G; Gomez-Perez, J; Koos, K; Harmati, M; Gyukity-Sebestyen, E; Biro, T; Jenei, A; Kormondi, S; Horvath, P; Konya, Z; Klekner, A; **Buzas, K.**
Raman Spectral Signatures of Serum-Derived Extracellular Vesicle-Enriched Isolates May Support the Diagnosis of CNS Tumors.
CANCERS 13 : 6 Paper: 1407 , 19 p. (2021)
IF: 6,575
Összes idézettség: 4 Független idézettség: 3

buzas.krisztina_52_23

Buzás Krisztina (Immunológia) tudományos és oktatói munkásságának összefoglalása
MTA VIII. Biológiai Tudományok Osztálya (2023.05.24)

Tudományos közlemények	Száma		Hivatkozások[1]	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk[2]	46			
teljes cikk[2], nemzetközi folyóiratban		40	3291	3646
teljes cikk, hazai idegen nyelvű folyóiratban		3	14	17
teljes cikk, hazai magyar nyelvű folyóiratban		1	0	0
teljes cikk, rövid közlemény		2	67	69
II. Könyvek	0			
a) Szakkönyv, tankönyv, szerzőként	0			
Szakkönyv, kézikönyv idegen nyelvű		0	0	0
Szakkönyv, kézikönyv magyar nyelvű		0	0	0
Felsőoktatási tankönyv		0	0	0
b) Szakkönyv szerkesztőként	0			
Szakkönyv, kézikönyv, idegen nyelvű		0		
Szakkönyv, kézikönyv, magyar nyelvű		0		
Felsőoktatási tankönyv		0		
III. Könyvfejezet, szaktanulmány	1			
Könyvfejezet idegen nyelvű		1	1	3
Könyvfejezet magyar nyelvű		0	0	0
Felsőoktatási tankönyvfejezet		0	0	0
IV. Konferenciaközlemények[3]	0		0	0
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	47		3373	3735
V. Egyéb tudományos	1			
Egyéb tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is		1	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		0	0	0
VI. Absztrakt	62		0	0
Összesített impakt faktor	202,433			
Idézettség száma[1]			3373	3735
Hirsch index[1]	17			

Speciális tudománymetriai adatok	Adat
Első szerzős folyóiratcikkek száma (az összes %-ban)[3]	7 (15,22%)
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma (az összes %-ban)	12 (26,09%)
Első és utolsó szerzőségű folyóiratcikkek impakt faktorai	63,706
Az utolsó tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2005) tudományos folyóiratcikkek összegzett impakt faktora az összes %-ban	96,84%
Magyar nyelven megjelent tudományos teljes folyóiratcikkek száma	1
Az utolsó 10 év tudományos teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	33
Impakt faktor összege	166,242
Folyóiratcikkek, 15-nél több szerzővel	5

Megjegyzések:
Azok a teljes ("in extenso") cikkek nem kerülnek a táblázatba, amelyek folyóiratának nem ismert a lektoráltsága.
1 A hivatkozások a disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül számolva.
2 A teljes (in extenso) folyóiratcikk
3 Az egy szerzős cikkeket is ideértve