



## Buzás Krisztina MTA doktori értekezésének értékelése

Buzás Krisztina „Daganatok kommunikációs stratégiái az immunrendszer válaszainak tükrében” című értekezésének fő célkitűzése a daganatok és a tumor mikrokörnyezet rendkívül komplex interakciójának, kommunikációjának molekuláris szintű megértése. A tumor/sztróma interakciók vizsgálata a tumor immunológia egyik legforróbb területe, a kommunikációban résztvevő jelpályák feltárása a jelenleg használt terápiás eljárások robbanásszerű fejlődésével kecsegtet. A kísérletek jelentős része a makrofágok és más sztróma sejtek átprogramozásának, repolarizációjának lehetőségeit vizsgálja.

Az értekezés három fő részből áll. Az *első részében* a szerző a Toll-like receptorok tumor-mikrokörnyezetre gyakorolt hatásait ismerteti, a bakteriális mintázat-felismerő receptorok makrofág-polarizációra gyakorolt hatásának vizsgálatán keresztül.

A vizsgálatokat egy IV. stádiumú metasztatikus melanómában szenvedő beteg váratlan gyógyulása inspirálta. A beteg a kemoterápia ideje alatt súlyos bakteriális fertőzésen esett át, majd gyógyulását követően a metasztázisok visszafejlődtek. A jelenség beható vizsgálatára Buzás Krisztina csoportja in vivo metasztázis modellt állított be, majd kimutatta, hogy tumoros egerekben Chlamydomyces pneumoniae fertőzés hatására szignifikánsan csökken a tüdő metasztázisok száma, és az egerek túlélése jelentős mértékben javul. A lassabb tumornövekedés a sztróma repolarizációját követő T-sejt infiltráció eredménye. A bakteriális fertőzés jótékony hatása T-sejt hiányos egerekben nem volt megfigyelhető. A csoport szakértelmét, kreativitását bizonyítja, hogy a sztróma repolarizációját, az M2/M1 tranzíciót a sejtpopulációk előzetes tisztítása nélkül sikerült bizonyítani.

A dolgozat *második részében* a TLR receptorok aktivációjának hatására több sejtípusban is termelődő IL-24 citokin tumorellenes hatásainak vizsgálatába kapunk betekintést, szintén a tumor/sztróma interakció aspektusából vizsgálódva. A szerző és munkacsoportja az IL-24 immunsejtekre gyakorolt kemotaktikus hatásait vizsgálja in vitro és in vivo rendszerekben. Kimutatták, hogy az IL24, G fehérje kapcsolt receptoron keresztül JAK- és MEK-kináz függő módon, in vitro és in vivo is képes a myeloid sejtek migrációját fokozni, ezzel újabb terápiás célpontokat azonosítva a melanóma és más típusú daganatok gyógyításához.

A mű *harmadik*, központi részében, a tumor mikrokörnyezet új, kevésbé ismert kommunikációs formájának rejtelseibe kapunk betekintést, nagy szakértelemmel tervezett, interdiszciplináris kísérletsorozat eredményeképpen. A vezikuláris információtranszfer tumorprogresszióban játszott szerepét vizsgálva a szerző kimutatta, hogy

- a melanóma sejtek által kibocsátott exoszómák képesek a malignus transzformációt kísérő génextpresszióhoz hasonló genetikai program beindítására szöveti őssejtekben. Elsőként mutatták ki a PD1 checkpoint gátló receptor indukcióját melanóma eredetű exoszómákkal kezelt őssejtekben. Ez a megfigyelés nyújt mélyebb betekintést a



melanóma terápiájában széles körben használt PD1 és PDL-1 specifikus ellenanyagok hatásmechanizmusának részleteibe.

- A különböző típusú tumorsejtekből származó exoszómák transzkriptom és proteom analízisével egyes tumortípusok esetében lehetővé vált a tumoreredetű exoszóma signature felállítása, ami alkalmas lehet a tumoros betegek vérminta-alapú azonosítására és a tumor progresszió/relapszus nyomonkövetésére is. Így derült fény arra, hogy a glioblasztóma multiforme betegek szérumban az exoszómák alacsony MMP-9 metalloproteináz szintje prognosztikus marker lehet, illetve alkalmas lehet a malignus a elváltozások biopszia nélkül történő diagnosztizálására.
- Hasonlóan fontos megfigyelés, hogy környezeti stressz, például kemoterápiás szerek (Doxorubicin) vagy reaktív oxigénradikálok (fényindukált Ag-TiO<sub>2</sub>) jelenlétében a melanóma és nazofaringeális karcinóma (NPC) eredetű exoszómák száma jelentősen emelkedik, proteom és mikroRNS profiljuk megváltozik, tumorprogressziót segítő képességük csökken, mi több, a célsejtekben a sejtciklust G1 fázisban megállítják. Ezen eredmények direkt klinikai alkalmazása a tumorprogresszió nyomonkövetésére vagy a terápia hatékonyságának ellenőrzésére elérhetőnek tűnik.
- Mivel a klinikai laboratóriumokban a szérumból eredetű exoszómák proteomikai analízise nem megoldott, a kutatócsoport beállított egy Raman-spektroszkópia alapú diagnosztikai módszert, melynek segítségével szérumból izolált exoszómák vizsgálatával jelenleg 80%-os hatékonysággal képesek a központi idegrendszeri tumorokat a szöveti kép alapján felállított betegcsoportba sorolni.

Buzás Krisztina hosszú évek óta példaértékű tudatossággal vizsgálja a tumor és tumor-asszociált sztróma közötti kommunikáció mechanizmusait. Gondolkodásának középpontjában végig a sztróma tumor-progressziót támogató mechanizmusainak megértése állt. Az értekezés eredményei alapján egyértelmű, hogy az exoszómák a tumor/sztróma kommunikáció dinamikusan változó, kiemelkedően fontos szereplői, melyek szérumban megfigyelhető kivételes stabilitásuk miatt hatalmas klinikai potenciált hordoznak. Fontosnak tartom, hogy a disszertáció eredményei korszerű, jól definiált in vitro rendszerek, in vivo állatmodellek és klinikai minták együttes felhasználásával születtek. A modellek analízise a sejtbiológia, a molekuláris immunológia, a transzkriptomika a proteomika és a bioinformatika korszerű módszereinek kombinációjával történt.

Az értekezés a lehető legnagyobb igényességgel készült. Elütéseket alig tartalmaz, nyelvezete szabatos, az idegen szavak használata a szakmai szövegben nem zavaró. A mű szerkezete arányos, a háttérinformációk a bevezetés részben tankönyvekre emlékeztető didaktikai alaposággal íródtak. Az ábrák szépek, jól érthetőek, ábramagyarázattal megfelelően ellátottak. A módszereket leíró rész megfelelően részletes.

Buzás Krisztina tudományos teljesítménye és tudományometriai adatai jelentősen meghaladják az MTA-doktora fokozat megszerzéséhez szükséges követelményeket. Közleményeinek (48) összesített impakt faktora 200 feletti, az ezekre kapott független idézetek száma 3873, H indexe 18.

Fontos megemlíteni, hogy Buzás Krisztina publikációi közül 19 első vagy utolsószerzős közlemény (41%), így egyéni szerepe a munkában nem kétséges.

A bemutatott eredményeket újként fogadom el. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk szigorú bírálati rendszerrel működő, magas impaktú nemzetközi folyóiratokban jelentek meg, melyekben korábban, megjelent adatok közlése nem megengedett.



#### **Az értekezéssel kapcsolatos észrevételeim a következők:**

- Annak ellenére, hogy az idegen szavak használata tudományos szövegben elfogadott, a néhány angol nyelvről fordított kifejezésénél javaslatot tettem a szó magyar megfelelőjének használatára. Javaslatomat az eredeti szöveg megfelelő helyein feltüntettem.
- A 8. oldalon, mivel mintázatfelismerésről van szó, „antigén ingerek” helyet helyesebb a mikrobák vagy mikroorganizmusok kifejezés használata.
- Hasonlóképpen, a 28. oldalon, a célkitűzések részben a „bakteriális antigének” helyett a bakteriális mintázatok kifejezés használatát javaslom.
- Az egyébként ábrákkal gazdagon ellátott bevezetésben, az IL-10 citokin család jellemzése részben az információátadást segítené egy ábra, bár az immunológiával foglalkozó szakemberek számára a szöveg jelen formájában is könnyen érthető, tanulható.
- A 31. oldalon, a CT és MR képeken nyilakkal lehetne jelezni a tumorok pontos helyét.
- A Módszerek részben, az in vivo tumormodell leírásánál (91. oldal) nem találtam a fertőzéshez használt *Chlamydomydia pneumoniae* kolóniaszámát.
- A 71. oldalon a 22. ábra szignifikancia értékeit a megfelelő kontrollokhoz képest kell megadni. Az Ag-TiO<sub>2</sub> sEV mintákat nem a negatív Ctrl mintákkal, hanem az Ag- Ctrl sEV célszerű összehasonlítani.

#### **Az értekezéssel kapcsolatos kérdéseim a következők:**

- Léteznek-e olyan egérmodellek, melyekben az exoszómák képződése gátolt, vagy erősen csökken, és ha igen, in vivo tumormodellekben csökken-e ezekben az egerekben az áttétek képződésének valószínűsége?
- A *Chlamydomydia pneumoniae* kezelés kiváltja-e az egér vagy humán makrofágok M1-szerű polarizációját *in vitro*?
- Történtek-e további kísérletek a *Chlamydomydia pneumoniae* fertőzést követően a tumorokba infiltráló CD3+( $\gamma\delta$ , iNKT, CD4+) sejtek további karakterizálására?
- Vannak-e adatok arról, hogyan befolyásolja az IL-24 jelenléte a tumorsejtek által termelt exoszómák hatását mezenchimális és/vagy tumor őssejtekre?
- 40. oldal: Mi lehet az oka annak, hogy amíg a kontrollként használt CCL2 kemokin leukocita migrációt indukál *in vitro*, hasonló indukciót az *in vivo* modellben nem láttak?
- Az adatok egyértelműen bizonyítják, hogy a tumor-eredetű exoszómák onkogén programot indukálnak a sztróma egyes elemeiben. Vannak-e arra vonatkozó kísérleti adatok, hogy az *in vitro* differenciáltatott vagy az esetlegesen *in vivo* képződött M1 szerű fenotípust mutató makrofágok által termelt exoszómák képesek felülni a sztróma (pl mezenchimális őssejtek, makrofágok) tumorprogressziót elősegítő programját?
- A bevezetésben és az eredmények részben is említésre kerül, hogy az exoszómák számára a vér-agy gát átjárható. Mennyire előrehaladott a CNS tumorok terápiája mesterségesen létrehozott, egyénre szabott vagy általánosan használható exoszóma-szerű részecskék felhasználásával?

**Össességében elmondható,** hogy Buzás Krisztina munkája nemzetközi szinten is jelentős új ismeretekkel gyarapította tudásunkat az exoszómák tumor/sztróma kommunikációban játszott szerepét illetően, mind az alapkutatás, mind az alkalmazott onkoimmunológia területén. A tekintélyes mennyiségű, további bioinformatikai analízisre alkalmas adat egész biztosan további fejlesztési stratégiák alapjául szolgál majd a jövőben. Buzás Krisztina munkáját igen magas szintűnek értékelem, a dolgot nyilvános vitára alkalmasnak tartom, az MTA-doktora cím megadását a legmesszebbmenően támogatom.

Debrecen, 2024, február 4.



Lányi Árpád