

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A tüdőrák komplex megközelítése: onkogén
jelátviteli mechanizmusok és innovatív
képalkotó eljárások a személyre szabott
diagnosztika szolgálatában**

Dr. Makai Attila

Témavezető: Dr. Lontay Beáta



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2026

A tüdőrák komplex megközelítése: onkogén jelátviteli mechanizmusok és innovatív képalkotó eljárások a személyre szabott diagnosztika szolgálatában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Makai Attila általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája (Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája Doktori program) keretében

Témavezető: Dr. Lontay Beáta egyetemi docens

Az értekezés bírálói:

Dr. Bognár Zita, PhD

Dr. Fülöp Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László az MTA doktora

tagok: Dr. Sztretye Mónika Tünde PhD

Dr. Urbán László PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” Épület Tanterme
2026. június 26., 13 óra

Bevezetés

A tüdőrák diagnosztikájának és kezelésének kihívásai napjainkban

Epidemiológia

A tüdőrák a leggyakoribb daganatok közé tartozik világszerte, 2018-ban az összes új eset ~12%-át (~2,09 millió) tette ki. Férfiaknál a prosztatarák után, nőknél az emlőrák után a második leggyakoribb daganat volt. Magyarországon 2024-ben a hörgőrák incidenciája 36,6 százezrelék volt (3506 új beteg), a tüdőrák prevalenciája 203 százezrelék, azaz 19 486 regisztrált beteg. Az ötéves túlélés alacsony igen alacsony átlagosan 19%, de szövettani típusonként eltérő, azaz nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) esetén 23%, kissejtes tüdőrák (SCLC) esetén 6%. A hazai mortalitás 2023-ban 83,9 százezrelék (8050 haláleset) volt, az Észak-magyarországi régiókban különösen magas incidenciát és mortalitást figyeltek meg.

Szűrés

Magyarországon a tüdőrákos betegek jelentős része (2018-ban 35,1 %) IV. stádiumban kerül diagnosztizálásra, ami részben a daganat gyors növekedésével magyarázható. Emiatt az éves lakossági szűrés napjainkban nem megoldható, a rizikócsoportok (alacsony dóziszú CT) LDCT-szűrése terjedt el. Hazánkban még ez irányú fejlesztések zajlanak a HUNCHEST program keretében.

Szövettani típusok

A WHO 2015-ös szövettani klasszifikációját használjuk napjainkban is, mely a morfológia mellett molekuláris vizsgálatok alapján határozza meg a tüdőrák altípusait. A tüdőrák két fő típusa az SCLC (15%) és az NSCLC (85%). Az NSCLC leggyakoribb altípusai az adenocarcinoma (ADC) (38,5%), a laphám carcinoma (SCC) (20%) és a nagysejtes carcinoma (3%). Az ADC perifériás elhelyezkedésű, mirigyes, papillaris struktúrákat és mucintermelést mutat, míg az SCC centrális, keratinképződés jellemzi. A nagysejtes carcinoma alacsony differenciáltságú, nincsenek keratin- vagy mirigyirhám jellegű

tulajdonságai. A kissejtes carcinoma kis, ovális sejtekből áll, magas mitotikus aktivitással és gyors metasztatizálásra hajlamos, a legrosszabb prognózisú tüdődaganat.

Etiológia

A tüdőrák legfőbb ismert oka a dohányzás, az esetek körülbelül 85%-ában. A cigarettafüst több mint 4000 vegyületet tartalmaz, ezek közül legalább 70 karcinogén, például a policiklusos aromás szénhidrogének, melyek DNS-károsodást és epigenetikai változásokat okoznak. A dohányzás és a levegőszennyezés oxidatív stresszt indukál, krónikus gyulladást vált ki többféle gyulladási jelátviteli útvonalon keresztül. Bizonyos genetikai tényezők, például a Glutathion S-transferáz Mu 1 null genotípus, fokozzák a tüdőrák kockázatát dohányosokban. Az azbeszt-expozíció is hozzájárul a hörgőrák kialakulásához, dohányzással kombinálva szinergista hatást fejt ki, jelentősen növelve a kockázatot. A radon expozíciónak szintén etiológiai szerepe van, a hörgőrákos esetek körülbelül 7%-áért felelős.

Pathogenezisben szerepet játszó genetikai eltérések

A carcinogenezis többlépcsős folyamat, mely során genetikai változások a normális sejteket malignussá alakítják. A daganaton belüli heterogenitás felgyorsítja a tumor evolúcióját és a gyógyszerrezisztencia kialakulását. Gyakori eltérések a sejtciklus szabályozó gének mutációi (TP53, RB1) és deléciók (3p, 9p, p16), valamint a c-MYC amplifikáció, melyek fokozott sejtosztódáshoz, apoptózis-gátláshoz és metasztatizáció létrejöttéhez vezetnek. Az NSCLC-ben fontos „driver” és „druggable” mutációk főként adenocarcinomában fordulnak elő: KRAS (20–30%, p.G12C ~13%), EGFR (10–20%, főként exon 19 deléció és 21 L858R), BRAF (1,5–4,5%), ALK (~5%), ROS1 (1–2%), NTRK (0,2%) és RET (1–2%). HER2 mutációk ritkán, de NSCLC-ben is előfordulnak, célzott kezelésre alkalmasak.

A pathogenezisben szerepet játszó epigenetikai eltérések

A daganatos transzformáció során számos jelátviteli folyamat elemének aktivitása módosul, amely döntően a fehérjék poszttranszlációs módosításainak változásaiban – köztük acetiláció, metiláció, foszforiláció és ubiquitináció – nyilvánul meg. E módosítások közül napjainkban kiemelt kutatási terület a fehérje metiláció, amely hiszton- és nem-hiszton fehérjéken egyaránt alapvető szerepet játszik a transzkripció, az RNS-anyagcsere és a DNS-károsodás-javítás kontrolljában. A foszforiláció a legjelentősebb szabályozó PTM, amely enzimek és receptorok működését, továbbá a sejtosztódást és proliferációt koordinálja; a kinázaktivitás zavarai számos tumorban megfigyelhetők.

A **hisztonfehérjék** a kromatin alapvető szerkezeti elemei, amelyek N- és C-terminális módosításai döntően befolyásolják a DNS kondenzációját és a génexpressziót. A kromatin szerkezeti lazulásával járó aktiváló módosítások – például acetiláció és bizonyos demetilációs események – a génexpresszió fokozódását eredményezik, míg a metiláció és deacetiláció általában represszív hatású. A tüdődaganatokban fokozott H3K4-metilációt írtak le, amely a kóros transzkripciós programmal függ össze; a folyamatot végző SETD1A metiltranszferáz gátlása xenograft-modellekben a tumorműködés csökkenését eredményezi.

A protein-arginin-metiltranszferázok (PRMT1–9) az arginin oldalláncok metilációjáért felelősek, közülük a PRMT5 a II-es típusba tartozik, és szimmetrikus dimetilarginin létrehozásával mind hisztonokat, mind nem-hiszton fehérjéket módosít. A PRMT5 metiltranszferáz aktivitását a MEP50-nel alkotott komplex biztosítja, funkciói közé tartozik a TP53 gén transzkripciós gátlása és számos proliferációs folyamat szabályozása. A PRMT5 aktivitása több poszttranszlációs módosítás révén finoman hangolt: egyes foszforilációk (pl. JAK2-függők) gátolják, míg a Thr80 oldallánc foszforilációja igazoltan fokozza az enzim hiszton metilációs aktivitását.

Ugyancsak aktiváló hatású lehet a K63-kötésű ubiquitináció, amelyet a TRAF6 E3 ubiquitin-ligáz közvetít.

A PRMT5 negatív szabályozásának egyik legfontosabb modulátora a szerin/treonin-specifikus **miozin foszfatáz (MP)**, amely három alegységből – a katalitikus PP1c alegységből, a célpont-meghatározó MYPT1-ből és egy kis szabályozó alegységből – áll. Az MP daganatellenes hatását részben a retinoblasztóma fehérje defoszforilálásán, részben pedig a PRMT5 aktiváló foszforilációinak eltávolításán keresztül fejt ki, ezáltal csökkentve a PRMT5 metiltranszferáz-aktivitását. Az MP működését a MYPT1 foszforilációs állapota szabályozza: a Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációja – elsősorban ROK és más kinázok által – gátolja az MP-t, míg a Ser695 foszforilációja (PKA/PKG által) ezt a gátló hatást ellensúlyozza.

A MYPT1 foszforilációs állapotát nemcsak kinázok, hanem foszfatázok is befolyásolják. A PP2A képes eltávolítani a Thr696 gátló foszforilációját, ezáltal fokozva az MP aktivitását. Ehhez hasonlóan működik a Mg^{2+}/Mn^{2+} -függő protein-foszfatáz 1B (**PPM1B**) is, amely szintén defoszforilálja a MYPT1 Thr696 oldalláncát, így közvetve növeli az MP aktivitását. A PPM1B több jelátviteli út, köztük a MAPK, az NF- κ B és a TGF- β szabályozója, stabilitását mikroRNS-ek és foszforiláció-vezérelt degradáció befolyásolják. Számos tumorban a PPM1B csökkent expresszióját írták le, amely fokozott invázióval és metasztatikus potenciállal társul.

A **PPM1B/MP/PRMT5/hiszon út** működése jól szemlélteti, hogyan kapcsolódnak össze a foszforilációs és metilációs események az epigenetikai szabályozás és a tumorképződés során. A PPM1B hiánya a MYPT1 gátló foszforilációinak fennmaradását eredményezi, ami az MP aktivitásának csökkenéséhez vezet. Ez a PRMT5 aktiváló foszforilációinak tartós jelenlétét okozza, ami fokozott hiszonmetilációt és a tumorprogressziót elősegítő transzkripciós mintázatok kialakulását idézi elő. A rendszer így egy olyan, több szinten szabályozott jelátviteli tengelyt alkot, amelynek zavarai a tüdőrák

és más malignus daganatok epigenetikai hátterének fontos meghatározói lehetnek.

Diagnosztika

A daganatos betegek kivizsgálása során arra törekszünk, hogy az aktuális szakmai ajánlásoknak megfelelően elegendő adatot gyűjtsünk a legoptimálisabb kezelési terv felállításához, melyet multidiszciplináris onkoteam hoz meg. A döntéshozatalhoz szükséges alapvető információk a beteg performans statusa és funkcionális állapota, a daganat stádiuma a TNM rendszer szerint, valamint a pontos szövettani típus. A stádium pontos megállapításához elengedhetetlenek a képalkotó vizsgálatok, mint a CT, MRI és PET-CT.

A PET-CT a pozitronemissziós tomográfia és a CT kombinációjával egyszerre nyújt részletes anatómiai és funkcionális információt. Leggyakrabban 18F-FDG-t alkalmaznak tracerként, amely a fokozott metabolizmusú – gyakran daganatos – területeken halmozódik, így gyorsítva a diagnosztikát. A virtuális bronchoszkópia CT-alapú, nem invazív módszer, amely belső légúti képet szolgáltat, segítve a tumorok és légúti szűkületek pontos lokalizációját. Előnye a beavatkozásmentes ábrázolás és a mintavétel tervezésének támogatása, hátránya a nyálkahártya-megítélés és a direkt mintavétel hiánya. A PET-CT és a virtuális bronchoszkópia együttes alkalmazása tovább pontosítja a diagnosztikát: a PET-CT azonosítja a legaktívabb gócokat, a virtuális bronchoszkópia pedig bronchológiai nézőpontból segíti a lokalizációt. Ez optimalizálhatja a mintavételi stratégiát, javíthatja a bronchosópos technikák találati arányát és kiegészítő képalkotási információt biztosít.

A szövettani diagnózis megerősítésére elsőként a legkevésbé invazív bronchoszkópos mintavételt alkalmazzuk, szükség esetén transthoracalis tűbiopsziát vagy sebészi módszereket. A kezelés kockázatának minimalizálása érdekében fontos a kardiopulmonalis állapot pontos felmérése

légfúvós vizsgálatokkal és kardiológiai vizsgálatokkal. Bár a tumormarkerek önmagukban nem alkalmasak diagnózis felállítására, a követéshez és a terápiás terv kialakításához hasznosak. Korai stádiumban a PD-L1, EGFR és ALK biomarkerek vizsgálata alapvető, míg előrehaladottabb esetekben további célzott terápiák meghatározásához több egyéb biomarker tesztelése is szükséges.

Kezelés

Malignus daganatok kezelése során alapvetően három modalitás kombinációit használhatjuk: sebészet, sugárterápia, szisztémás kezelés. A daganatok stádiumbeosztása szerint három alapvető csoportra szokásos osztani a tüdődaganatokat: korai, lokálisan előrehaladott, és metasztatikus betegségekre. A korai NSCLC (I–IIIA) esetén a sebészeti kezelés prioritás, a gold standard a lobectomia VATS technikával, kis daganatnál a szövettani verifikáció gyakran a műtét során történik. A kiújulás kockázatának csökkentésére neoadjuváns kemoterápia és ICI alkalmazható, adjuváns kezelés pedig T2b-tumor vagy magasabb stádium esetén indokolt, driver mutáció esetén célzott terápiával kiegészítve. Sugárterápia elsősorban műtéti kontraindikáció esetén jön szóba, SBRT vagy PORT formájában. A lokálisan kiterjedt, nem reszekálható III-as stádiumban a standard kezelés kemo-radioterápia, kiegészítve konszolidáló ICI-vel vagy célzott kezeléssel. Mindezek mellett metasztatikus NSCLC-ben a kezelés palliatív, főként szisztémás terápia, palliatív sugárkezelés, vagy célzott terápia biomarker státusztól függően.

Célkitűzések

Korábbi vizsgálatok során bizonyítást nyert a PRMT5, az MP és a PPM1B enzimek szerepe különböző daganatos betegségek kialakulásában. Egymással való kölcsönhatásaik egy finoman hangolt foszforilációs útvonalat határoznak meg, mely egyensúlyának felborulása hozzájárul a malignus transzformációhoz. Bár a fehérjék kölcsönhatásai és szabályozó mechanizmusai már feltárással kerültek in vitro méhnyakráksejtekben, azonban a tüdődaganatban, illetve annak különböző szövettani típusaiban való összefüggéseik még nem kerültek leírásra. Ezen PPM1B/MP/PRMT5/Hisztin útvonal rendellenes működését vizsgáltuk munkánk során tüdődaganat esetében.

A mellkasi daganatok szövettani verifikációja sok esetben nehézségekbe ütközik, mivel a léziók gyakran nehezen hozzáférhetők. Emiatt a mintavételt támogató eszközök fejlesztése napjainkban is kiemelt jelentőségű. A képalkotás területén egy, a funkcionális virtuális bronchoszkópiát továbbfejlesztő vizsgálatban vettem részt.

Munkánk során az alábbi célkitűzéseink voltak:

- A PPM1B/MP/ PRMT5/ hisztin onkogén jelátviteli pálya elemeinek expressziós szintű elemzése.
- A PPM1B/MP/ PRMT5 enzimek aktivitását meghatározó foszforilációk és a hisztin dimetiláció elemzése.
- A PPM1B/MP/ PRMT5/ hisztin onkogén jelátviteli pálya expressziójának és aktivitásának összefüggése a betegek teljes túlélésével Kaplan-Meier módszer szerint.
- További célunk volt egy olyan dedikált funkcionális virtuális bronchoszkópia (fVB) protokoll kialakítása, mely egyszerre teszi lehetővé az anatómiai és a funkcionális információk megjelenítését, a légutak képeinek részletesebb és strukturáltabb megjelenítésével és rendelkezik a hdCT képek minőségével.

Anyagok és módszerek

Betegek

Vizsgálatunkba olyan betegeket vontunk be, akiknél tüdődaganat gyanúja miatt indult kivizsgálás, és az OTT műtéti kezelést javasolt. A beválasztás feltétele volt legalább 2 cm-es elváltozás jelenléte mellkasi CT-n. Összesen 38 beteget vontunk be vizsgálatunkba. A műtét előtti szövettani diagnózis nem volt kritérium, mivel több esetben csak a mintavétel után vált ismertté a pontos szövettan. A mérethatár kijelölésénél szempont volt, hogy a mintavétel ne veszélyeztesse a patológiai diagnózist, ezért túl kicsi daganatokból nem történt mintavétel. A műtétek a DEKK Sebészeti Intézet Mellkassebészeten zajlottak. A betegadatok gyűjtése 2019.12.11. és 2023.07.25. között történt, a Debreceni Egyetem által kiadott etikai engedély (34199-L/2019/EKU) szerint.

Mintavétel és szövettani minták

A szövetszövetmintákat a műtéti úton eltávolított lebenyből vagy szegmentből nyertük, a daganatból és a távoli, ép tüdőterületről egyaránt. A kontroll mintát mindig a daganat infiltrációs zónáján kívül vettük, figyelembe véve a szolid komponenst meghaladó mikroszkópos terjedést (90. percentilis: 12 mm; Grade 1: 13,0 mm, Grade 2: 9,7 mm, Grade 3: 4,4 mm). Mind a daganatos, mind a kontroll oldalról három-három minta készült: (1) friss, fagyasztott szövet Western blot vizsgálathoz; (2) szöveti mátrixba ágyazott, műtőben folyékony nitrogénnel fagyasztott, később -70 °C-on tárolt minta; (3) RNAlater-ben rögzített, -20 °C-on tárolt minta.

Fehérje extrakció

A szövetszövetminták (100 mg) homogenizálása RIPA pufferben történt (50 mM Tris pH 7,4, 0,2% nátrium-dezoxikolat, 0,2% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, proteáz- és foszfatázgátlókkal, 1 mM PMSF, 1 µM mikrocisztin-LR). A homogenizátumot TissueRuptorral jégen történt homogenizálás után 3000 g-on, 4 °C-on 5 percig centrifugáltuk, és a felülúszót gyűjtöttük. A

fehérjekoncentrációt Pierce BCA Protein Assay Kit-tel határoztuk meg (1:10 hígítás, ELISA-leolvasó 540 nm, BSA standard), az adatok elemzéséhez lineáris regressziót alkalmaztunk a GraphPad Prism szoftverrel.

Western blot analízis

A fehérjéket SDS-PAGE (4–20% Criterion gél, Bio-Rad) segítségével méret szerint választottuk szét, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk (100 V, 90 perc, Bio-Rad). A mintákat 1:5 arányban 6× SDS mintapufferrel hígítottuk, 100 °C-on 5 percig denaturáltuk, és 30 µg fehérjét vittünk fel gélenként. A membránokat 5% zsírszegény tejporral blokkoltuk PBST-ben, majd primer antitesttel inkubáltuk (90 perc szobahőmérsékleten vagy éjszakán át 4 °C-on), ezt követően HRP-konjugált szekunder antitesttel kezeltük. A jelzést WestemBright ECL szubsztráttal tettük láthatóvá, a képeket ChemiDoc Touch rendszerrel rögzítettük, GAPDH-t belső kontrollként alkalmazva.

RNS izoláció

A daganatból és kontroll tüdőszövetből teljes RNS-t izoláltunk TRIzol reagenssel (Life Technologies) a gyártó módosított protokollja szerint. A mintákat 200 µl TRIzolban homogenizáltuk Tissue Ruptorral, majd 200 µl kloroformmal kezelve 13 000 rpm-en, 4 °C-on 15 percig centrifugáltuk. Az RNS-t izopropanollal (500 µl) kicsapattuk, 13 000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk, majd a pelletet 75%-os etanolban átmostuk és 13 000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk. A végső pelletet 10 µl nukleázmentes vízben oldottuk, koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel mértük.

Reverz transzkripció és kvantitatív PCR (RT-qPCR)

Minden mintából 1 µg teljes RNS-ből cDNS-t szintetizáltunk Thermo Fisher készlettel, 37 °C-on 120 percig. A cDNS-t templátként használva kvantitatív PCR-t végeztünk 2× Xceed qPCR SYBR Green Master Mix-szel (Institute of Applied Biotechnologies) LightCycler 480 rendszeren (Roche), a következő hőciklusokkal: 95 °C 3 perc, majd 50 ciklus (95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 72 °C 90

s). A Cp-értékeket GAPDH és Cyclophilin A háztartási gének mértani átlagához normalizáltuk.

Immunhisztokémia

A vizsgálatokat tüdő SCC és ADC, valamint ugyanazon betegek egészséges tüdőszöveiteiből vett formalin-fixált, paraffinba ágyazott metszeteken végeztük. A paraffint xilollal távolítottuk el, majd lépcsőzetes alkoholos rehidrációt követtünk (100%, 96%, 70%). Antigén-feltárást nyomás alatt hevített citrát pufferben (pH 6,0) végeztünk, majd aspecifikus kötőhelyeket 1 órás 5%-os BSA blokkolással csökkentettünk. A metszeteket 48 órán át, 4 °C-on MYPT1, PRMT5 és PPM1B elsődleges antitestekkel (1:100 BSA/Triton X-100/PBS) kezeltük, ezt követően HRP-konjugált másodlagos antitesttel 1 óráig inkubáltuk. Az immunjeleket DAB szubsztráttal tettük láthatóvá, hematoxinilin-eozin ellenfestéssel, majd Leica mikroszkóppal és MC120 HD kamerával dokumentáltuk.

Immunfluoreszcens festés

A daganatos és kontroll tüdőszöveteket 4% paraformaldehidben fixáltuk, majd 40-60 µm-es metszeteket készítettünk vibrációs mikrotómmal. A metszeteket PBS és TBS oldatokban öblítettük, majd permeabilizáltuk és blokkoltuk normál szérum és Triton X-100 hozzáadásával. Ezután az elsődleges ellenanyagokkal (MYPT1, MYPT1^{pT853}, PRMT5, PRMT5^{pT80}) 24 órán át inkubáltuk, majd Alexa Fluor 488 és 546-konjugált másodlagos ellenanyagokkal 3 órán át jelöltük. A sejtmagokat DAPI-val festették, és a konfokális mikroszkóppal készített képeken az átfedő (co-localizált) pixelek intenzitását optimalizáltuk a jobb láthatóság érdekében.

Kaplan-Meier túlélési analízis

A teljes túlélést (OS) és betegségmentes túlélést (DFS) a betegek bevonásától 2024. júliusig hónapokban határoztuk meg. Kaplan-Meier görbéken ábráztuk a túlélést szövettani altípus és molekuláris marker expresszió (MYPT1, PRMT5, H2A, PPM1B), foszforilációs (MYPT1^{pT853}, PRMT5^{pT80})

és dimetilációs (H2A) státusz alapján. A betegeket minden paraméter esetén a kohorsz mediánja szerint „magas” és „alacsony” csoportba soroltuk. A túlélési különbségeket log-rank (Mantel–Cox) teszttel elemeztük, $p < 0,05$ értéket tekintettünk szignifikánsnak.

Statisztikai analízis

Az immunblotok denzitometriáját ImageJ-vel végeztük, adatait GraphPad Prism 8-ban oszlopdiagramon ábráztuk (átlag $\pm$ SD, n =független ismétlés). Foszforilált fehérjéket a teljes fehérjéhez, teljes fehérjét GAPDH-hoz normalizáltuk. Két csoport összehasonlításához t-próbát, több csoport esetén ANOVA-t Tukey-tesztel alkalmaztunk; kiugró értékeket Grubbs-tesztel azonosítottuk, $p < 0,05$ szignifikáns.

Funkcionális virtuális bronchoszkópia: módszertani beállítások

A vizsgálatra történő beválogatásra PET/CT és hdCT vizsgálaton átesett betegek kerültek. A hdCT képeket Siemens Emotion 16, az ldCT és PET vizsgálatokat Philips GEMINI TF TOF 64 készülékkel készülték, <1 év különbséggel; a vizsgálati feltételek nem voltak standardizáltak. A virtuális bronchoszkópia elkészítéséhez a hdCT és ldCT képeket elastix algoritmussal történt, a PET képek ldCT-hez már regisztráltak voltak. A tüdőmaszk (lung-mask) szegmentálása M-SEGM algoritmussal történt, amely a -1000 és -400 HU közötti voxelokat választotta ki a hörgői légutak és parenchyma jelölésére. A légút szegmentációja GeoS 2.2 vagy saját region-growth alapú módszerekkel volt lehetséges, így a légutak egészen a szegmentális hörgők eredetéig modellezhetőek voltak.

A hörgőfa csontváz (súlypontok összessége) biztosítja a virtuális kamera navigációját és a bifurkációk pontos számlálását. A szegmentált voxelekből a marching cubes algoritmus 3D felületmodellt generált, a felületmodellhez. Az FDG-halmozást vetítése a transzbronchiális tű hatótávolságán belül, az érintett erek szegmentációjával történt. A regisztráció minőségét korábban radiológus ellenőrizte, ami szubjektív és időigényes volt; ezért bevezetésre

került egy numerikus paraméter, D, mely a regisztráció minőségét fejezte ki, a hdCT és ldCT lumenpontok távolságát jelentette mm-ben. Ennek korrelációja vizsgálata történt (nem)egyezőségi paraméterek esetén, melynek pozitív kimenetele objektíven értékelhetővé tette a regisztráció minőségét.

Eredmények és következtetések

A beválasztott betegek klinikai adatai

Vizsgálatunk során 38 beteg mintáit gyűjtöttük össze. Átlagosan 65 éves korosztály került be tanulmányunkba, férfi többséggel. Kevés kivételtől eltekintve dohányos betegeink voltak. Anamnesztikus adataik a napi gyakorlatunk során tapasztaltakat egyértelműen reprezentálta, jól tükrözte azokat a rutin kihívásokat, melyekkel nap, mint nap szembesülünk. A betegek stádiumának eloszlása azonban a T2 és N0 körül csoportosult, mert ez a betegcsoport egyrészt ideális műtéti kezelésre, másrészt daganatuk mérete már lehetővé tette mintavételünket, így technikai szempontból vizsgálatunk optimális célcsoportját alkották. A primer daganat szövettani típusait tekintve igen heterogén volt a vizsgált populáció, mivel a preoperatívén meghatározott szövettani eredmény nem volt kizárási kritérium a betegek beválasztásánál. További vizsgálatokat csak az ADC és SCC esetén végeztünk, összesen 31 beteg mintáin. A median OS 44 hónap volt az ADC betegek körében és 20 hónap volt a SCC betegeknél.

PPM1B expresszió szignifikánsan csökkent mind az ADC, mind az SCC mintákban.

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatain során azonosította a PPM1B fehérjét, ami az MP/PRMT5/hisztón jelátviteli útvonal felsőbb szabályozó elemeként írt le, mely a carcinogenezist tekintve új mechanizmust jelent a HeLa sejtek és méhnyakrák esetén. Western blot analízissel összehasonlítottuk az ADC, SCC és megfelelő kontroll mintáik relatív PPM1B expresszióját, mely során a tumoros mintákban szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges tüdőszövethez képest. Immunhisztokémiai vizsgálat során ugyanezen eltérést tapasztaltuk. RT-PCR vizsgálat során azonban az mRNS expresszió tekintetében már nem mutatkozott szignifikáns eltérés a tumoros és kontroll minták között. A fehérje expresszió és a túlélés kapcsolatának feltárása során

az ADC és SCC betegeket további két csoportra osztottuk: magas és alacsony PPM1B expressziós szintet mutató páciensek szerint. Kaplan-Meier analízis alapján az alacsonyabb PPM1B expressziót mutató betegek túlélése szignifikánsan rosszabb volt a magasabban expresszálókétól. Összességében az ADC-csoport betegek alapvetően jobb túlélési eredményeket mutattak az SCC-betegekhez képest. Az SCC-betegek körében a túlélési különbségek kevésbé voltak markánsak, ami arra utalhat, hogy ebben a csoportban más molekuláris mechanizmusok is hangsúlyosabb szerepet játszanak az ADC-vel összehasonlítva.

A miozin foszfatáz MYPT1 szabályozó alegységének expressziója emelkedett az ADC és SCC szövetekben.

Korábbi vizsgálatok során már fény derült az MP tumorszuppresszor szerepére, melyet azáltal tölt be, hogy defoszforilálja a PRMT5 aktiváló foszfo-Thr80 oldalláncát. A jelenséget HCC esetén figyelték meg, melyet tüdő adeno- és laphámcarcinomák esetén vizsgáltunk jelen munkánkban. Westem blot vizsgálat során a MYPT1 relatív expresszióját egyaránt magasabbnak találtuk mind az SCC, mind az ADC daganatos mintákban a kontroll szövetekhez képest, mely eltér a HCC esetén megfigyeltétől. A tumoros és egészséges tüdőszövetek közötti különbség mRNS expressziót tekintve még kifejezettebb volt RT-PCR vizsgálattal. Ez igen erős transzkripció aktivitásra utal, mely háttérében egy kompenzációs mechanizmus állhat. Eredményeinket IHC és immunfluoreszcens vizsgálatokkal is megerősítettük. A MYPT1 expressziójának összefüggését Kaplan-Meier módszer szerint vizsgáltuk, alacsonyan és magasán expresszáló csoportokra bontva az ADC és SCC betegeket. Mindkét daganat típus esetén a magasabb expressziós szint jelentette a túlélési előnyt az alacsony expressziós szinttel szemben.

A MYPT1 Thr⁸⁵³ gátló oldalláncának foszforilációja emelkedett a tüdőrákos szövetmintákban.

A MYPT1 Thr⁸⁵³ oldalláncon történő fokozott foszforilációja a MP holoenzim aktivitásának csökkenését okozza, ami a PRMT5 Thr80 aminosavmaradék defoszforilációjának csökkenéséhez vezet. A PRMT5 Thr80-oldallánc foszforilációja aktiváló hatású, így az MP gátlása a PRMT5 enzim aktivitásának növekedését okozza. Westem blot vizsgálat során kimutattuk, hogy a MYPT1^{pT853} foszforiláció mértéke szignifikánsan magasabb mindkét tumor esetén az egészséges tüdőszövetekhez képest. Továbbá összehasonlítva az ADC és SCC eredményeket, SCC-ben ezen gátló foszforiláció mértéke szignifikánsan magasabbnak bizonyult az ADC mintákéhoz képest. Az immunfluoreszcens jelölés során láthatóvá vált, hogy a MYPT1^{pT853} a tüdőrák szövetekben a sejtmagban is jelen van. A MYPT1^{pT853} és a betegek túlélése közötti kapcsolatot az előző szempontok szerint, Kaplan-Meier módszerrel vizsgálva, az alacsonyabb foszforilációs szintek jelentették mindkét szövettani típusú csoportban. A MYPT1 gátló foszforilációjának befolyása a túlélésre eredményeink szerint nagyobb volt, mint a fehérje relatív expressziója.

Emelkedett PRMT5 szint volt kimutatható az ADC és SCC mintákon.

A PRMT5 relatív expresszióját ugyancsak Westem blot segítségével vizsgáltuk. Eredményeink szerint mind az ADC, mind az SCC mintákban szignifikánsan megnövekedett PRMT5 fehérjeszint volt mérhető a megfelelő kontrollmintákhoz képest. Az eredmények megerősítésére a PRMT5 mRNS szinteket RT-qPCR-rel is meghatároztuk. Az ADC szövetekben szignifikáns emelkedést tapasztaltunk, míg az SCC mintákban nem szignifikáns változást. További elemzés céljából DAB immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk ADC és SCC metszeteken. Az ADC szövetein erősebb DAB-reakció volt látható. A PRMT5 tekintetében is összevettük a fehérjeexpressziót a teljes túléléssel. A Kaplan-Meier túlélési elemzés nem mutatott statisztikailag

szignifikáns összefüggést a PRMT5 expressziós szintjei (magas vagy alacsony) és a teljes túlélés között sem ADC, sem SCC tüdőrákos betegek esetében.

Az aktiváló PRMT5^{pT80} foszforiláció aránya, így a PRMT5 aktivitása nő az ADC és SCC mintákon.

A PRMT5 Thr80 oldalláncon történő, aktiváló foszforiláció PRMT5 expresszióhoz viszonyított arányát is vizsgáltuk Western blot segítségével. A mérések során az SCC és az ADC daganatszövetekben szignifikánsan magasabb foszforilációs szinteket találtunk a kontroll, egészséges megfelelőikhez képest, továbbá az SCC daganatos mintákban szignifikánsan magasabb foszforilációs szintnövekedés volt megfigyelhető az ADC mintákhoz képest. Az immunfluoreszcens festés tovább megerősítette a PRMT5 Thr80 oldalláncon megfigyelhető fokozott foszforilációt a daganatszövetekben, illetve kifejezett sejtmagi lokalizációjára és aktiváló foszforilációjára utal, ami a PRMT5 génexpresszióra gyakorolt hatását jelzi. Ezen poszttranszlációs módosítás összefüggését is megvizsgáltuk az túléléssel. Kaplan-Meier módszer alapján az előző vizsgálatokhoz hasonló módon csoportosítva a betegeket. Eredményeink alapján a magas foszforilációs szint jelentett szignifikáns túlélési hátrányt mindkét daganattípus esetén, ez azonban SCC esetén sokkal markánsabb volt, mint ADC betegeinket tekintve. Tehát a PRMT5 aktivitásának emelkedése rosszabb túlélési eredményekkel jár.

A hiszton fehérjék (H2A és H4) szimmetrikus dimetilációja fokozódik az ADC és SCC esetén.

A PPM1B/MP/PRMT5/H2A jelátviteli útvonal utolsó tagját, a H2A fehérje expressziójának és szimmetrikus dimetilációjának (DM) vizsgálatát is elvégeztük. Bár az egészséges tüdőszövet és tüdődaganatos minták között nem volt szignifikáns eltérés a hiszton fehérje expressziójában, de az ADC-mintákban az SCC-mintákhoz képest szignifikánsan magasabb expressziót

észleltünk. A Kaplan-Meier-analízis sem mutatott szignifikáns korrelációt a H2A-expresszió és a túlélés között egyik szövettani típus esetén sem. A H2A fehérje expressziójával ellentétben a génexpresszió aktivitásával korreláló H2A szimmetrikus dimetiláció nagy mértékű emelkedést mutatott az SCC- és ADC-daganatmintákban a megfelelő kontrollokhoz képest. Továbbá, az SCC-daganatok szignifikánsan magasabb DM-szintet mutattak az ADC-daganatokhoz képest, mely az általunk vizsgált útvonal egyensúly eltolódásának funkcionális következménye. Alacsony és magas dimetilációt mutató csoportokra is bontva a tumoros betegeket Kaplan-Meier analízis szerint mindkét daganattípus esetén az alacsonyabb dimetilációs szint jelentett túlélési előnyt.

A H2A vizsgálataihoz mellett elvégeztük a hiszton H4 expressziójának és szimmetrikus dimetilációjának elemzését is. A teljes H4-fehérje expresszióban nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes csoportok között (SCC, ADC és kontrolljaik) a H2A adatokhoz hasonlóan. Ugyanakkor a H4 szimmetrikus dimetilációja mindkét daganatos csoportban szignifikánsan magasabb volt a kontroll szövetekéhez képest.

A hiszton szimmetrikus dimetiláció génexpresszióra kifejtett hatásának közvetlen vizsgálatára az egyik jól jellemzett célgén, a tumorsuppresszor retinoblasztóma-fehérje (pRb) termékének expressziós szintjeinek változását is elemeztük a hiszton módosítások génexpresszióra gyakorolt hatásának, ezen keresztül az általunk vizsgált útvonal proto-onkogén szerepének igazolására. Western blot vizsgálat során a pRB fehérje szintje szignifikánsan csökkent a daganatos mintákban a hozzájuk tartozó kontroll szövetekéhez képest.

Az általunk vizsgált poszttranszlációs módosítások (PTM) mértékének összefüggéseit egy összevont Kaplan-Meier elemzés során is vizsgáltuk. Az alacsony poszttranszlációs módosítási szintekkel jellemzett ADC betegek

túlélése volt a legkedvezőbb, míg a magas poszttranszlációs módosítási szinteket mutató SCC-betegek túlélése volt a legrosszabb.

A funkcionális virtuális bronchoszkópia fejlesztésének eredményei

A tüdődaganatok diagnosztikájára irányuló kísérletek másik célja a funkcionális virtuális bronchoszkópia minőségének javítása volt az ldCT-hdCT képek pontosabb regisztrációjával. Ennek eredményeként a meglévő PET és hdCT vizsgálatokból intézményfüggetlenül is előállítható egy megbízható, funkcionális-morfológiai alapú virtuális bronchoszkópia, amely a mintavétel legalkalmasabb célterületeinek (pl. legaktívabb tumor-, nyirokcsomó-rész) azonosítását támogatja. A jó minőségű funkcionális VB feltétele a megfelelő ldCT-hdCT illesztés. A korábbi, radiológus által végzett ellenőrzés szubjektív volt, ezért célunk objektív, numerikus (dis)szimilitási mutató bevezetése volt. A vizsgált voxelalapú hasonlósági paraméterek közül csak a kölcsönös információ (MI) mutatott erős korrelációt a távolságon alapuló D minőségi mutatóval. Bootstrap alapú konfidencia intervallumokkal az MI alkalmasnak bizonyult az elfogadható és elégtelen regisztrációk elkülönítésére; a „nem megfelelő” tartományba eső értékek esetén új regisztráció szükséges. A módszer limitációja a kis betegszám volt.

Új megállapítások

1. A PPM1B/MYPT1/PRMT5/hiszton szignálút vonal egyes elemeinek vizsgálatával megállapítottuk, a poszttranszlációs módosítások egyensúlyának felborulása hozzájárul a tüdő adeno- és laphám carcinoma kialakulásához és progressziójához.
2. Kimutattuk, hogy a PPM1B expresszió szignifikánsan csökkent mind a tüdő adenocarcinóma, mind a laphám carcinoma esetén.
3. Megállapítottuk, hogy a MPYT1 relatív expressziója emelkedett tumoros mintákban.

4. Ezzel összhangban a MYPT1 Thr⁸⁵³ gátló oldalláncának foszforilációját is emelkedettnek találtuk a tüdőrákos szövetmintákban.
5. A jelátviteli útvonala következő elemének, a PRMT5-nek a relatív expressziója mindkét vizsgált szövettani típusú tüdőrákban szignifikánsan emelkedett volt.
6. Ezzel párhuzamosan az aktiváló PRMT5 pT80 foszforiláció arányát is szignifikánsan magasabbnak mértük mindkét tüdőrák szövettani altípusában, ami a PRMT5 aktivitásának fokozódását jelzi a daganatos szövetekben.
7. Kimutattuk, hogy a PRMT5 ismert szubsztrátjai a hiszton fehérjék (H2A és H4) szimmetrikus dimetilációja szignifikánsan emelkedett volt a tüdő adeno- és laphám daganatos mintákban, mely a génátírás repressziójára utal.
8. A jelátviteli útvonala eltéréseinek génrepressziót okozó hatását a jól ismert tumorsuppresszor, a retinoblasztóma fehérje vizsgálatával igazoltuk, melynek expressziója csökkentnek bizonyult a tumoros mintákban.
9. Az általunk vizsgált poszttranszlációs módosítások összevont túlélési elemzése alapján azon betegek túlélése volt kedvezőbb, akik daganatában ezen módosítások alacsonyabb szinten voltak jelen.
10. Az új, funkcionális virtuális bronchoszkópos módszer automatizált, magas felbontású CT-képek PET-felvételekkel történő fúzióján alapul, amely lényegesen jobb anatómiai tájékozódást tesz lehetővé. A módszer eltérő paraméterekkel, valamint különböző intézményekben készült CT-vizsgálatok felhasználására is alkalmas.

Összefoglalás

Összefoglalva, munkánk során a tüdőrák komplex megközelítése volt a célunk az onkogén jelátviteli mechanizmusok és innovatív képalkotó eljárások együttes vizsgálatával a személyre szabott diagnosztika szolgálatában. Tanulmányunk során megmutattuk, hogy a PPM1B/MP/PRMT5/hisztón onkogén jelátviteli útvonal szerepet játszik a tüdőrák kialakulásában és progressziójában. Ennek az útvonalnak a szabályozási zavara, melyet a PPM1B expressziójának csökkenése, a MYPT1 megnövekedett expressziója ellenére bekövetkező funkcionális inaktiválódása, a fokozott PRMT5-aktivitás, valamint a hisztón H2A metilációjának növekedése jellemez, új aspektusát tárja föl a tüdődaganat kialakulásában szerepet játszó molekuláris mechanizmusainak. Az ADC és SCC altípusok között megfigyelt különbségek rámutatnak a tüdőrák molekuláris heterogenitására, és reményeink szerint eredményeink a jövőben hozzájárulhatnak majd ahhoz, hogy a tüdőrák terápiás palettája és terápiás lehetőségei bővíthessenek.

A molekuláris mechanizmusok és lehetséges diagnosztikai lehetőségek mellett a képalkotó lehetőségeket is vizsgáltuk. A tüdőrák kivizsgálása során a betegeknél sok esetben történik kontrasztos mellkas CT és PET-CT vizsgálat is. A PET-CT során általában ldCT történik a sugárdózis csökkentése miatt. Egyetemünkön fejlesztett automatikus funkcionális virtuális bronchosopia, mely egyesíti a PET-, mind hdCT előnyeit, és retrospektív felvételeket használ, ezzel elkerülve a további sugárterhelést. A funkcionális információk segíthetik a mintavétel sikerességét, az erek ábrázolása a szövödmények kockázatát csökkentheti.

Publikációs jegyzék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/644/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Makai Attila

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Makai, A.**, Keller, I., Szalmás, A. F., Ungvári, Á., Horváth, D., Major, E., Enyedi, A., Takács, I., Lontay, B.: Decreased PPM1B Expression Drives PRMT5-Mediated Histone Modification in Lung Cancer Progression.
Biomolecules. 15, 1-18, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biom15111581>
IF: 4.8 (2024)
2. Opposits, G., Nagy, M., Barta, Z., Aranyi, S. C., Szabó, D., **Makai, A.**, Varga, I., Galuska, L., Trón, L., Balkay, L., Emri, M.: Automated procedure assessing the accuracy of HRCT-PET registration applied in functional virtual bronchoscopy.
EJNMMI Res. 11 (1), 1-13, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13550-021-00810-w>
IF: 3.434

További közlemények

3. Lieber, A., **Makai, A.**, Orosz, Z., Kardos, T., Susil, J. I., Tornyi, I., Bittner, N.: The role of immunotherapy in early stage and metastatic NSCLC.
Pathol. Oncol. Res. 30, 1-17, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/pore.2024.1611713>
IF: 2.3





4. Sebestyén, E., Major, N., Bodoki, L., **Makai, A.**, Balogh, I., Tóth, G., Orosz, Z., Árkosy, P., Vaskó, A., Hódosi, K., Szekanecz, Z., Szekanecz, É., Hungarian OncoRheumatology Network (HORN) initiative: Immune-related adverse events of anti-PD-1 immune checkpoint inhibitors: a single center experience.
Front Oncol. 13, 1-9, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2023.1252215>
IF: 3.5

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,034

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,234

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.12.16.

