

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A plazma C9 epitópok heterogenitásának vizsgálata

Tornyai Ilona

Témavezető: Prof. Dr. Takács László



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2024

A plazma C9 epitópok heterogenitásának vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Tornyai Ilona**

okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris
Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola keretében

Témavezető: Prof. Dr. Takács László

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Prókai László, az MTA doktora

Dr. Megyesfalvi Zsolt, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

tagok: Prof. Dr. Prókai László, az MTA doktora

Dr. Megyesfalvi Zsolt, PhD

Prof. Dr. Csósz Éva, az MTA doktora

Prof. Dr. Sarkadi Balázs, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme

2025. február 3. 14:00

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

A tüdőrák a legnagyobb mortalitású rákos megbetegedés, melyben évente több millióan halnak meg világszerte. Az ötéves túlélési arány 10-20% között mozog. A statisztikák szerint, európai viszonylatban Magyarországon volt a legmagasabb a tüdőrákban elhunytak aránya 2019-ben. A betegek túlélését befolyásolja a betegség lehető legkorábbi stádiumú diagnosztizálása. Több, nagy nemzetközi szűrőprogram eredményeire alapozva, jelenleg a korai stádiumok kiszűrésére az alacsony dózisu CT (LDCT) képalkotás az ajánlott módszer. Bár több korai stádiumú tüdőrákos beteget szűrtek ki a programokban, az álopozitív eredmények száma minden vizsgálatban magas volt. Számos módszerrel próbálják csökkenteni ezt a magas arányt, például más képalkotó módszerekkel (mágneses magrezonancia képalkotás), rizikófaktorokra épített algoritmusokkal, mesterséges intelligenciával, vagy biomarkerekkel. A biotechnológia fejlődésével egyre szofisztikáltabb módszerek állnak rendelkezésünkre a biomarkerek fejlesztésére és validálására.

Munkacsoportunk által elindított új irány, az epitomika; a fehérjék epitópokon keresztül történő megközelítése, ennek egyik stratégiája az epitóp profilírozás, azaz a fehérjék szubprotein szinten vizsgálható epitópjainak, és az epitópokon keresztül elkülöníthető proteoformák feltárása. Mindez nagyságrendekkel megemelheti az ismert egy génről keletkező és vizsgálható proteoformák számát, mert a genomszekvencia alapján feltételezett fehérjeszám nem 20 000 körüli, hanem a variabilitás miatt, ennél jóval több. A fehérjék variációja hatással lehet a szerkezetre, ezáltal az epitópok struktúrájára és hozzáférhetőségére is.

Munkacsoportunk által korábban létrehozott epitomikai eszköztár, a PlasmaScan és QantiPlasma monoklonális könyvtárakat használva lehetőség nyílik egy-egy fehérje több epitópján keresztüli vizsgálatára, ezáltal proteoformák detektálására. A különböző proteoformák asszociálhatnak különböző patológiás állapotokkal, így biomarker funkciót adva többek között a proteoformá(ka)t detektáló epitóp(ok)nak.

Dolgozatom irodalmi áttekintő részében megvizsgálom a tüdőrák epidemiológiáját, formáit és kialakulásának lehetséges okait, az eddig elvégzett szűrővizsgálatok eredményeit. A nemzetközi LDCT szűrővizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy szükséges lenne a CT alapú szűrést más módszerekkel is kiegészíteni a jobb eredmények érdekében. Ilyen kiegészítő módszer lehet a biomarker vizsgálat, melynek új irányvonala az epitomikai megközelítés, a fehérje epitóp profilírozás.

Munkám során a komplement C9 fehérje három epitópját vizsgáltam monoklonális antitestekkel kontroll és tüdőrákos mintákban. Eredményeinkkel szeretnénk hozzájárulni olyan

új, epitóp alapú plazmafehérje biomarkerekhez (például C9 biomarkerek), melyek sikeres kiegészítői lehetnek a jelenlegi tüdőrák szűrési programoknak.

1.1. A tüdőrák epidemiológiája világviszonylatban

Isaac Adler 1912-ben írta meg az első angol nyelvű, teljes egészében a tüdőrákról szóló monográfiáját, melyben 374 esettanulmányt gyűjtött össze. Habár ez a betegszám magas, de mégis alacsonynak tekinthető annak tükrében, hogy Adler 1912-ig összesen ennyit talált az addig megjelent szakirodalomban, mely a tüdőrákot igen ritka betegségnek tekintette. Adler volt az első, aki tanulmányában összefüggést fedezett fel a dohányzás és a tüdőrák között. Manapság a betegségek között a rákos megbetegedések jelentik világszerte a legnagyobb klinikai, társadalmi és gazdasági terhet. A tüdőrák a világon, a második leggyakrabban diagnosztizált és a legnagyobb mortalitáshoz vezető ráktípus mind a két nemet figyelembe véve. A várható átlagos ötéves túlélés körülbelül 10-20% közötti, azok között, akiket 2010-2014 között diagnosztizáltak tüdőrákkal. Ez a mutató az átlagnál magasabb Japánban (33%), Izraelben (27%) és Koreában (25%).

2019-ben a halálozások 55%-át 10 fő okra tudták visszavezetni. Ez a 10 fő ok világszerte 55,4 millió ember halálához vezetett. A 10 fő ok közül 7 krónikus betegség volt, melyek az összes haláleset 74%-áért volt felelős. Ezen okok közé tartozik hatodik vezető okként - egyetlen ráktípusként - a hörgő és tüdő rosszindulatú daganatos elváltozásai (ICD-10:C34). Ez a rákos megbetegedés 2000-ben 1,2 millió, 2019-ben már 1,8 millió emberéletet követelt.

1.2. A tüdőrák epidemiológiája Magyarországon

Európai viszonylatban, Magyarországon volt a legmagasabb a rákos megbetegedésekben elhunytak aránya (320,87 / 100 000 lakos) 2020-ban. Az Európai Unió átlag arány 242,24 / 100 000 lakos volt ugyanebben az évben. A tüdőrákban elhunytak aránya a legmagasabb volt 2019-ben Magyarországon az európai országok között (84,4 / 100 000 lakos). Egy 2018-ben megjelent összefoglaló közleményben, melyben 40 európai országban a 25 leggyakoribb ráktípust vizsgálták, Magyarországon volt a legmagasabb a tüdőrák incidenciája (férfiaknál 111,6; nőknél 58,7 / 100 000 lakosra vonatkoztatva), és tüdőrák elhalálozási arány (férfiaknál 97,1; nőknél 44,3 / 100 000 lakosra vonatkoztatva). Egy 2019-ben megjelent magyar tanulmányban a Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelő (NEAK) adatait használva a 2011-es

és 2016-os időszakra számolva a tüdőrákban elhunytak aránya ennél jóval kevesebb volt. A tanulmányba olyan betegek kerültek be, akiknél i) 2011. január 1. és 2016. december 31. között újonnan diagnosztizáltak tüdőrákot; ii) kétszer megjelentek vizsgálatra 30 napon túl, de egy éven belül iii) a diagnózis felállításakor elmúltak 20 évesek; iv) ha a beteg elhunyt a diagnózis felállítása után 60 nappal. A tanulmányból kizáró ok volt i) ha a diagnózis felállítása utána 6 hónapon belül vagy 12 hónap után a tüdőkáron kívül más rákos megbetegedést is diagnosztizáltak; ii) ha a beteg 6 hónapon belül vagy 12 hónap után a tüdőrák kezelésén kívül más rákterápiát is kapott. Ezeket a kritériumokat figyelembe véve 2011-ben 7158, míg 2016-ban 6996 új beteget regisztráltak az Országos Kórházbiztosítási Alap (NHIF) adatbázisba. A magyar tanulmány következtetései a következők voltak: i) ugyan a kor szerint standardizált előfordulási arány magas az országban, de alacsonyabb, mint ahogy azt Ferlay 2018-as összefoglaló tanulmányában mutatták; ii) a kor szerint standardizált előfordulási arány a férfiaknál csökkenő, míg a nőknél emelkedő tendenciát mutat. A Ferlay tanulmányból számolt eredményekhez statisztikai modellekkel számolták ki a becsült előfordulási és halálozási arányokat a nemzeti rákregiszterekben publikált adatokból, ha azok elérhetőek voltak; ha pedig nem akkor megbecsülték az adatokat. Mivel Magyarország nem jelentett nemzeti előfordulási adatokat a Ferlay tanulmány által vizsgált időszakban, így azt csak megbecsülték az Egészségügyi világszervezet (WHO) adatait felhasználva a környező országok előfordulási és halálozási arányaiból. Ezen kívül, csak a halálozási adatok voltak elérhetőek a Központi Statisztikai Hivatalon (KSH) keresztül a magyarországi adatokból, melyek posztmortem vizsgálatokból származtak. Magyarországon nagyon magas a kórházi elhalálozás utáni boncolások száma. A klinikai eredményekhez képest magasabb rákos előfordulási arányt lehet kimutatni a boncolás során. A két tanulmány közötti különbség magyarázható az adatok gyűjtési különbségeiből és magas kórházban történt elhalálozás utáni boncolások arányával. Magyarországon, a vizsgált 2011-2016 közötti időszakban, magas a tüdőrákban elhunytak aránya (férfiaknál: 72,8; nőknél: 28,2 / 100 000 lakos), de feltehetően nem olyan magas, mint ahogy a nemzetközi statisztikák mutatták (férfiaknál: 96,4; nőknél: 37,7 / 100 000 lakos).

1.3. A tüdőrák szövettani osztályozása

A tüdőrák a WHO irányelvei alapján két fő szövettani csoportra osztható: nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC), amely az esetek 85%-ában fordul elő, és kissejtes tüdőrák (SCLC), amely az esetek

15%-át teszi ki. Az NSCLC további alcsoportokra bontható, mint az adenokarcinóma, laphámkarcinóma, nagysejtes karcinóma és más típusok. A betegség lefolyása egyénenként változó, az NSCLC növekedési üteme nagyon gyors és nagyon lassú között változhat, sőt visszafejlődés is előfordulhat. Az adenokarcinóma lassabban növekszik, mint a laphámsejtes karcinóma. A rosszul differenciált daganatok gyorsabban nőnek, mint a jól differenciáltak. A tumorok növekedési üteme stádiumonként változik: a korai stádiumban gyorsabb, a II. és III. stádiumban lassul vagy stagnál, majd a IV. stádiumban ismét felgyorsul. A tumor besorolásához és kezeléséhez a TNM atlasz által javasolt stádiumbesorolást alkalmazzák. A tüdőrák komplex betegség, amelynek kialakulásában genetikai és környezeti tényezők is szerepet játszanak. A megfelelő kezelés kiválasztásához fontos megérteni a tüdőrák biológiáját.

1.4. A tüdőrák okai

1.4.1. genetikai okok

A tüdőrák kialakulásában szerepet játszó tényezőket három csoportra lehet osztani; (i) tüdőrákot hajlamosító egygénese mendeli öröklődést mutató defektusok (ii) a tüdőrákra hajlamosító többgénese polimorfizmusok, (iii) a daganatban keletkező mutációk, melyek a daganat növekedéséért közvetlenül felelősek.

- i. Hajlamosító egygénese defektusok: a DNS javító és más génekben keletkezett mutációk nagyon ritkán, de részt vehetnek a tüdőrák kialakulásában.
- ii. Hajlamosító többgénese polimorfizmusok: többek között a 15p25-24-es régióban található nikotinos acetilkolin-receptor polimorfizmusai (CHRNA5, CHRNA3 és CHRNB4) együtt más génekben lévő variánsok érzékenyítő lókuszaik lehetnek a tüdőráknak. A tüdőrákkal asszociált öröklődő variánsok együttes előfordulása felelős a tüdőrák családi halmozódásáért.
- iii. Daganatban keletkező mutációk, melyek a daganat növekedéséért közvetlenül felelősek: Az onkogének közé tartoznak a receptor tirozin kinázok, például az EGFR, az ALK, a ROS1 és a RET, valamint a génamplifikációval érintett gének, mint a MET és az FGFR1. További tirozin kinázok, például a KRAS és a BRAF, szintén gyakoriak. A tumor szupresszor gének közé tartozik a TP53, amely a leggyakrabban mutálódó gén a tüdőrákban, valamint az STK11, a CDKN2A, a KEAP1 és a SMARCA4. A vezető mutációk szövettani csoportosítása szerint az adenokarcinómákban gyakori az EGFR, a KRAS, az ALK, a c-met, az AKT/PI3K, a PTEN, a ROS-1 és a BRAF mutáció. A laphámkarcinómákban gyakori a c-met, a

VEGFR és a P53/BCL mutáció, míg a nagysejtes és kissejtes tüdőrákban szintén a c-met mutáció dominál. Ezek a mutációk eltérő jelátviteli útvonalakon keresztül befolyásolják a tumor túlélését és növekedését, ami megnehezíti az azonos besorolású altípusok egységes kezelését. Egy tumoros sejtben egytől tíz kritikusan meghatározó „vezető” mutáció lehet jelen, amelyek a sejt túlélését segítik.

1.4.2. Környezeti faktorok

A tüdőrák kialakulását számos környezeti tényező befolyásolja, beleértve a fizikai és kémiai faktorokat, valamint a dohányzást. A fizikai tényezők közé tartozik a természetes háttérsugárzás, különösen a radon, amely a nem dohányzók körében a tüdőrák legfőbb oka az Amerikai Környezetvédelmi Hivatal szerint. A légszennyezés, például a 10 és 2,5 mikron méretű részecskék szintén növelik a tüdőrák kockázatát, különösen hosszú távú kitettség esetén. A dízel autók kipufogógázait is karcinogénnek minősítették. A kémiai faktorok közé tartoznak a peszticidekben található klóramfenikol, dioxin és fenoxisav származékok, valamint az azbeszt, amely tüdőrákot és egyéb daganatos megbetegedéseket okozhat. A dohányzás a tüdőrák legnagyobb rizikófaktora, mivel a cigarettában található égéstermékek karcinogén hatásúak. A dohányzás visszaszorításával jelentősen csökkenthető lenne a tüdőrák mortalitási aránya. Bár a marihuána fogyasztása és a tüdőrák közötti kapcsolat nem egyértelmű, egyes kutatások szerint a THC hatására malignus sejtproliferáció indulhat meg. A dohányzás különösen nagy népegészségügyi probléma, mivel más súlyos betegségeket is okoz, például a szív- és érrendszeri betegségeket és a COPD-t. A passzív dohányzás és a légszennyezés szintén jelentős kockázati tényezők. A megelőzésben kulcsfontosságú a társadalmi edukáció és a rendszeres szűrővizsgálatok.

1.5. Tüdőrák szűrés

A tüdőrák korai diagnosztizálása jelentősen növelheti a betegek túlélési esélyeit. Nem-kissejtes tüdőrák esetében az 5 éves túlélési arány a betegség lokális fázisában 65%, míg távoli metasztázisok kialakulása esetén csak 9%. Kissejtes tüdőrák esetében ezek az arányok 30%, illetve metasztázisok esetén már csak 3%. A betegség korai felismerése különösen fontos, mert ekkor a műtéti és kemo-radio, valamint immunterápiás kezelések még hatékonyak lehetnek, míg késői stádiumban a kezelés fő célja a daganat csökkentése és a tünetek enyhítése.

A szűrés kritikus jelentőségű a tüdőrák mortalitásának csökkentésében, mivel a korai stádiumú tüdőrák kezelési eredményei lényegesen jobbak. A mellkasröntgen nem a leghatékonyabb módszer a tüdőrák szűrésére. Jelenleg a nemzetközi ajánlások szerint az alacsony sugárdózisú

CT (LDCT) vizsgálat a legjobb módszer a korai stádiumú tüdőrák kimutatására, bár ez a módszer is sugárterheléssel jár.

1.5.1. Nemzetközi szűrőprogramok

A tüdőrák korai felismerése érdekében végzett nagy nemzetközi szűrőprogramok eredményei jelentős előrelépéseket mutatnak. Az amerikai Nemzeti Tüdőrák Szűrőprogram (NLST) keretében (54 454 főt vontak be, melyek közül 26 732 főt röntgennel, 26 722 főt pedig LDCT-vel vizsgáltak meg) végzett kutatások szerint a mellkasröntgen és az alacsony dózisu CT (LDCT) vizsgálatok összehasonlítása során az LDCT csoportban 20%-kal csökkent a mortalitás. A holland NELSON programban (7557 résztvevőt szűrtek LDCT-vel, 8265 fő kontroll mellett) a nodulusok térfogatának követésével az álpozitív eredmények 64,3%-ra csökkentek; a férfiaknál 24%-kal, a nőknél 33%-kal csökkent a halálozás. Az olasz DANTE klinikai vizsgálatban (1276 főt végeztek LDCT szűrést, 1196 fő kontroll mellett) az LDCT szűrés során a résztvevők 4,7%-ánál, míg a kontroll csoportban 2,8%-ánál találtak tüdőrákot. Az ITALUNG tanulmányban (1406 fő LDCT szűrését végezték el, 1593 fő kontroll mellett) az LDCT szűrt csoport 30,3%-a bizonyult LC pozitívnak, és 21 esetben diagnosztizáltak tüdőrákot, melyek közel fele I. stádiumú volt. A dán DLCST vizsgálatban (2052 fő LDCT szűrését végezték el, 2052 fő kontroll mellett) 17 tüdőrákos esetet találtak, amelyek több mint fele I. stádiumú volt. Az angol UKLS vizsgálatban (1994 főt vizsgáltak LDCT-vel, 2027 fő kontroll mellett) az LDCT csoportban 42 esetben állapítottak meg tüdőrákot, melyek kétharmada I. stádiumú volt. A német LUSI tanulmányban (2029 főt vizsgáltak LDCT-vel, 2023 fő kontroll mellett) az LDCT szűrés a nőknél csökkentette a mortalitást, de a férfiaknál nem mutatott szignifikáns különbséget. Általánosan megállapítható, hogy az LDCT szűrés hatékonyabb a mellkasröntgennél a tüdőrák korai felismerésében és a mortalitás csökkentésében.

1.5.2. HUNCHEST program

Az első nagyobb tüdőrák szűrőprogramok után Magyarországon is elindultak nemzeti szűrőprogramok. A HUNCHEST I. programban (2014-2018) 739 jelentkezőt szűrtek az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetben, ahol a résztvevők közül 38 főnél találtak malignus elváltozást, és 26 esetben álpozitív eredményt mutatott a CT. A program eredményei megegyeznek a nemzetközi vizsgálatok eredményeivel. A HUNCHEST II. program (2019-2022) volt Magyarország legnagyobb LDCT-szűrőprogramja, amelyben 4215 magas kockázatú egyént választottak ki. A vizsgálat során 76 tüdőrákos beteget diagnosztizáltak, közülük 62-t

az első szűrési körben. A szűréssel felfedezett rosszindulatú daganatok többsége I. stádiumú volt, és csak 16,4%-uk volt IV. stádiumú.

1.6. Törekvések a magas álpozitív eredmények csökkentésére

Az LDCT szűrések során fontos csökkenteni a magas álpozitív eredmények számát, hogy mérsékeljék a résztvevők félelmét és növeljék a költséghatékonyságot. A rizikócsoportok meghatározása különböző rizikófaktorok figyelembevételével segíthet szűkíteni a szűrésre irányítottak körét. Az egyre modernebb CT berendezések és a mesterséges intelligencia is hozzájárulhat a leletek pontosabb elemzéséhez. Bár vannak próbálkozások más képalkotó eljárások, például az MR, használatára is mert ez nem jelent sugárterhelést, vizsgálatok kimutatták, hogy MR vizsgálatok érzékenysége megközelíti az LDCT-ét a 8-10 mm-es nodulusok esetében. Emellett folyadékbiopsziás tesztek is kiegészíthetik az LDCT vizsgálatokat, melyek minimálisan invazívak, nem járnak extra sugárterheléssel, és a vérvétel háziorvosi rendelőben is elvégezhető. Ezek a tesztek biomarkerek segítségével nyújtanak információt a vizsgált személy fizikai állapotáról.

1.7. Biomarkerek

A biomarkerek azon anyagok, melyek jelzik a normális vagy abnormális biológiai folyamatokat, terápiás válaszokat, illetve betegségek jelenlétét. Osztályozhatóak fehérjék, nukleinsavak, metabolitok és egyéb molekulák alapján, és különböző testfolyadékokból vagy más mintákból mérhetőek, mint például vér, vizelet, nyál, kilégzett levegő és széklet. Felhasználásuk széles spektrumot ölel fel, beleértve a szűrést, diagnózist, prognózist, terápia személyre szabását és hatékonyságának monitorozását. A biomarkerek fejlesztése öt fázisban zajlik: felfedezés, kvalifikáció, verifikáció, validáció és klinikai használat. Az ideális rák biomarker magas szenzitivitással, specificitással, pozitív és negatív prediktív értékkel rendelkezik, szűrési alkalmazás esetén képes a tumor korai stádiumban történő detektálására, és egyéb alkalmazások során prognosztikai és terápiás értékeket is biztosít. A biomarkereknek a modern molekuláris biológiai és immunológiai módszerek fejlődésével egyre nagyobb szerepük van a klinikai diagnosztikában és terápiás döntéshozatalban. Manapság a legtöbb biomarker egy vagy multiplatform alapú sokváltozós betegség-rizikó meghatározó érték.

A tüdőrák biomarkerek számos különböző biológiai mintából származhatnak, mint például vér, bronchoalveoláris mosás, nyál, pleura folyadék és kilégzett levegő. A leggyakrabban használt biomarkerek közé tartoznak a fehérje és a nukleinsav alapú biomarkerek. A fehérje alapú biomarkerek például a CYFRA21-1, CEA, SCC, NSE, ProGRP és EGFR. Ezek közül néhány

specifikus a tüdőrák típusaira, míg mások más daganatokban is megtalálhatóak. Például a CYFRA21-1 és CEA nem kissejtes tüdőrákban használt biomarkerek, míg az NSE és ProGRP kissejtes tüdőrák esetén alkalmazhatóak. Emellett használják a genomikai markereket is (cfDNA, miRNS, epigenetikai markerek). A legnagyobb remények a GRAIL/Illumina Galleri teszthez fűződtek, ami egy multi-rák liquid biopszia, amely az ismert daganat mutációkra fókuszál, a keringő szabad DNS vizsgálatával. Metabolit biomarkerek (pl. palmitinsav, heptadekán sav) is potenciális biomarkerek lehetnek, amelyek segíthetnek a tüdőrák korai diagnózisában és kezelésében.

1.8. A proteom

A fehérjék háromdimenziós struktúrájukban látják el funkciójukat a sejtekben, amelyet négy szinten lehet leírni: elsődleges, másodlagos, harmadlagos és negyedleges struktúra. Az elsődleges struktúra a fehérje lineáris aminosav sorrendje. A másodlagos struktúra hélixeket, lemezeket és hurkokat tartalmaz. A harmadlagos struktúrák a peptidláncok háromdimenziós elrendeződését mutatják, míg a negyedleges struktúrák több fehérjelánc összekapcsolódását írják le. A proteom fogalma a genetikai információk mellett a proteoformák változatosságára is kiterjed, amelyek száma sokkal nagyobb lehet, mint a humán fehérjéket kódoló gének száma. A proteom változatosságát génről géntre változó poszttranszlációs módosulások, alternatív transzlációs kezdések, terminációs helyek, splicing és egyéb faktorok befolyásolják.

1.9. Epitópok

A fehérje epitópok háromdimenziós szerkezetű aminosav rendeződések a fehérjék felületén. Ezeket az immunrendszer komponensei (antitestek, T-sejt receptorok) felismerik az antigén kötőhelyeken keresztül. Az epitópok általában 6-12 aminosavat foglalnak magukban, és gyenge kölcsönhatásokkal kapcsolódnak az antitestekhez. Az epitópok szerkezete és hozzáférhetősége változhat a fehérje harmadlagos és negyedleges szerkezetének változása, valamint a fehérje komplexek összetételének változása miatt. Ezek a változások befolyásolhatják az epitópok funkcionális kapcsolatait és a fehérjék biológiai szerepét. A proteomikai technológiák jelenleg nem képesek globálisan követni a fehérjék változékonyságát és proteoformáit, de fontos eszközök a fehérjék változatosságának tanulmányozásában. A fehérje epitópok dinamikus változásai kapcsolatba hozhatók bizonyos fiziológiás vagy patológiás körülményekkel, és potenciálisan biomarkerek vagy funkcionális változások indikátorai lehetnek.

1.10. A komplement kaszkád

A komplement rendszer egy összetett, a veleszületett, természetes immunitás része, több mint 40 szolubilis fehérjéből áll. A komplement rendszer számos funkciót lát el, mint például egyes patogén baktériumok, vírussal fertőzött és apoptotikus sejtek eltakarítása, a szöveti homeosztázis fenntartása és a természetes immunválasz szabályozása. A rendszer három útvonalon aktiválódhat: a klasszikus, lektin és alternatív útvonalon keresztül. Az aktiváció során képződik a C3 konvertáz, amelyek a C3-at C3a-ra és C3b-re hasítja. A C3b szerepet játszik a C5 konvertáz kialakításában, ami C5 hasításához vezet C5a és C5b fragmentekre. A C5b komplexet képez a C6, C7 és C8 fehérjékkel, amely a membránba ékelődve a C9 fehérjéket vonzza, képezve a membrán támadó komplexet (MAC). A C9-es fehérjék gyűrű alakú lyukat ütnek a patogén baktérium vagy pl. a vírussal fertőzött sejt membránjába, ami így szerepet játszik a patogén elpusztításában.

A C9-es fehérjék 22 szimmetrikus monomerből álló komplexet alkotnak, a C5b678 komplexhez kötődnek és egy 120 Å átmérőjű, gyűrű alakú lyukat képesek ütni a patogén membránján. A C9-nek négy fő doménje van: az N-terminális thrombospondin-1 (TSP1) domén, alacsony denzitású lipoprotein receptor asszociált domén (LDLRA), membrán támadó komplex/perforin (MACPF) domén és az epidermális növekedési faktor (EGF) domén. A C9 nem tartalmaz külön membránkötő domént, ezért a plazmában keringve asszociálódik a többi MAC résszel. A C9 monomerek a MACPF doménon keresztül kapcsolódnak össze. A szignál nélküli MAC kialakulását védi az extracelluláris chaperonok (vitronectin, clusterin) szolubilis MAC komplexekhez kötődése. A C9 termelődhet májban monocitákban és dendritikus sejtekben is.

1.11. A fehérje epitóp profilírozás

A mindennapi klinikai gyakorlatban már használnak genom és transzkriptom szekvenálási tesztek. Ugyanakkor globális fehérjeprofírozás technológia nem érhető el, annak ellenére, hogy a fehérje funkció megértése globális profilírozáson keresztül fontos ürt töltene be. A fehérjéket, mint a leggyakoribb biomarker típust, széleskörűen használják a fiziológiától eltérő állapotok vizsgálatára. Habár, a fehérjék vizsgálata is adhat információt elváltozások detektálására, a fehérje-egység alatti epitóp vizsgálatok erre érzékenyebb megoldást kínálhatnak. A fehérjék minden variánsa, illetve variációja hatással lehet a fehérje harmadlagos és negyedleges szerkezetére, valamint az epitópok hozzáférhetőségére is. A fehérje epitóp profilírozás (PEP) során az epitópok dinamikája monoklonális antitest könyvtár (QuantiPlasma

Library) felhasználásával és az egy mAb-ot felhasználó kötődés-gátlási ELISA rendszerben (sbCIA) lettek mérve. Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy egy-egy fehérje epitópjai tüdőrák asszociáció szempontjából biomarker értékkel rendelkeznek, és ezek nem szükségszerűen egyforma irányúak, azaz tapasztaltunk pozitív, negatív és neutrális asszociációt is. A PEP-hez használt QuantiPlasma mAb könyvtárat (koncentrációra és immunogenicitásra is) normalizált humán plazmával, mint immunogénnel állították elő, ezzel biztosítva többek között azt is, hogy a mAb-ok természetes antigén determinánsokat ismerjenek fel. A létrejött hibridómák válogatása azzal a céllal történt, hogy az sbCIA rendszerben működő mAb-okat kiválasszák, azaz a kötődés mértéke lineáris összefüggést mutasson a plazma hígítással. A szelekción átesett hibridómák klónozása után termeltethetőek a monoklonális antitestek *in vitro* és *in vivo*. A monoklonális antitestek egy-egy epitóppal reagálnak, így egy-egy fehérjéhez több epitóp is társítható. Becsléseink szerint a PlasmaScan és QuantiPlasma könyvtárakban körülbelül 3 epitóp/fehérje található, körülbelül 100 plazmafehérjére vonatkozóan. A PEP technikával a fehérjéknek nemcsak a mennyisége, hanem a minőségi változásai is monitorozható különböző állapotokban. A PEP a fehérje epitópok sokaságát vizsgálja a globalitásra törekedve, a ma használatos globális proteomikai eljárásokkal ellentétben, szubprotein szinten, az epitópok szintjén. Egy korábbi közleményben a szendvics ELISA módszerrel detektált leucingazdag alfa-2-glikoprotein 1 (LRG1) fehérje tüdőrák asszociációját mutatták ki, majd kimutatásra került, hogy az LRG1 immunkomplexek egyes elérhető epitópjai nem egy formán asszociálnak tüdőrákkal. Ez a megfigyelés hívta fel a figyelmet a szubprotein, epitóp alapú vizsgálatok széleskörű kiterjesztésének lehetőségére. Szélesebb körben az epitópokat és rákbetegség kapcsoltóságukat, a PlasmaScan könyvtár sbCIA esszéiben is működő frakciójának (~ 380 mAb), a QuantiPlasma könyvtárnak PEP során történő alkalmazásával vizsgáltuk. Eredményeink szerint, a C9 molekulára vonatkozóan, egyes anti-C9 specifikus mAb-ok, illetőleg az általuk felismert epitópok különböző módokon asszociáltak a tüdőrákkal (neutrális [BSI0449], pozitív [BSI0639], illetve negatív [BSI0581]). Ennek a jelenségnek a molekuláris proteomikai vizsgálatát tűztem ki célul.

Munkám során az egy fehérjére vonatkozó és megfigyelt epitóp heterogenitás jelenség molekuláris hátterére kerestem választ a C9 fehérje epitópjain keresztül.

2. Célkitűzések

Kezdeti hipotézismentes kutatásaim során a C9 epitópok segítségével, szubprotein szinten tüdőrák asszociált epitóp-biomarkereket kerestünk, és vizsgáltunk annak érdekében, hogy a PEP technológia hatékonyságát a C9 példáján keresztül bizonyíthassuk.

Céljaim jelen kutatásban az alábbiak voltak:

1. Korábbi kutatási eredményeink adatainak statisztikai elemzése. Anti-C9 antitestek kiválasztása.
2. A kiválasztott anti-C9 mAb-ok tisztítása és validálása. A kiválasztott mAb-ok kereskedelmi forgalomban kapható C9 fehérjével való validálása, antigén-felismerés és technikai validáció Western blott kísérletekben.
3. A C9-en lévő epitópok átfedésének vizsgálata, azaz válasz keresése arra vonatkozóan, hogy vizsgált epitópok egymástól függetlenek-e?
4. A C9 epitóp függő heterogenitásának fehérjekémiai analízise:
 - a. SDS PAGE módszerrel tüdőrákos és kontroll egyének vérplazma keverékeinek felhasználásával,
 - b. a fenti minták LC-MS/MS vizsgálata az egyes epitópokon keresztüli immunoprecipitáció segítségével.

A kezdeti hipotézis mentes kutatás eredményei vezettek a további célkitűzésekhez:

5. Az LC-MS/MS eredmények adatanalízise, elsősorban a C9 szerkezetére, a 415-ös pozícióban lévő N-glikozilációra, és a C9 asszociált más plazmafehérjékre vonatkozóan.
6. Az adatanalízis alapján kapott eredmények felhasználásával történő C9 proteoformákra, C9 interaktomra, és a PEP technológia szubprotein szintű vizsgálati hatékonyságára vonatkozó hipotézis építés.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Vizsgált betegcsoportok és feldolgozott minták

A poolozott kontroll minták 167 egészséges donortól származtak. A mintavétel során mindenki kitöltötte a beleegyező nyilatkozatot. A mintavételt a DE Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta (DE OEC RKEB/IKEB), 3049-2009, 3140-2010 számú engedélyekkel.

A poolozott betegminták 207 késői stádiumú (IV. stádium) tüdőrákos betegből származtak, azonban szövettani szempontból nem voltak homogén csoportba sorolhatóak. A mintavételre a Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT TUKEB) engedélyével történt, 11739/2014/EKU, 107/2014 and 417/2014 számú engedélyekkel.

A vizsgálatban Magyarország különböző centrumai vettek részt, beleértve a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikáját, a Szegedi Orvostudományi Egyetem Pulmonológiai Klinikáját, a Debreceni Orvostudományi Egyetem Pulmonológiai Klinikáját, valamint a Borsod-Abaúj-Zemplén Vármegyei Központi Kórház Pulmonológiai Osztályát.

A vizsgálat során meghatároztuk a tüdőrákos betegek beválasztási és kizárási kritériumait. A beválasztási kritériumok közé tartozott a szövettanilag diagnosztizált tüdőrák, amelyet stádiumbeosztással is alátámasztottak; a vizsgálatban résztvevők életkora 45 és 75 év között volt; továbbá a dohányzási előzmények között legalább 15 csomagév szerepelt. A kizárási kritériumok közé tartozott más rákos megbetegedés az elmúlt 5 évben (kivéve a nem metasztatikus bőrrák); az aktív krónikus betegség; a steroid kezelés; valamint az aktív tuberkulózis és néhány egyéb aktív fertőző betegség.

A kontrollcsoport összeállításához egészséges egyének, szűrővizsgálatra érkező páciensek, valamint kórházi dolgozók és azok hozzátartozói kerültek bevonásra. Annak érdekében, hogy a választott kontrollcsoport valóban megfelelő legyen, klinikai vizsgálatokkal, LDCT-vel, mellkasi röntgenvizsgálattal, biomarkerek elemzésével és laboratóriumi vizsgálatokkal igazolták azok alkalmasságát.

A levett EDTA-s mintákat 4 °C-on centrifugáltuk, majd a plazmát -70 °C-on tároltuk felhasználásig.

3.2. Immunoprecipitáció

Az immunoprecipitációhoz Dynabeads™ Protein G (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mágneses gyöngyöket használtunk. Minden monoklonális antitestéhez (mAb) 50 µl Protein G-t használtunk, melyet 200 µl W&B (Wash and Bindig) pufferrel (0,1 M Na₂HPO₄·12H₂O

[VWR, Lutherworth, Leicestershire, Egyesült királyság], 0,05% Tween [Sigma, St. Louis, MO, USA], pH 8,2) előmostunk. A mágneses gyöngyök előkészítése után, 75 µg mAb-ot, 200 µl W&B pufferban hígítva, hozzáadtunk a már előmosott gyöngyökhöz. Szobahőmérsékleten inkubáltuk keverőn 5 RPM sebességű forgatás közben. Ezután a gyöngyöket 200 µl PBS pufferrel (123 mM NaCl [Spektrum 3D, Debrecen, Magyarország], 3,16 mM KH₂PO₄ [Riedel-de Haën, Seelze, Németország], 10,45 mM Na₂HPO₄·2H₂O [Riedel-de Haën, Seelze, Németország]), majd 200 µl desztillált vízben hígított 0,2M-os trietanol-aminnal is lemostuk. Az utolsó mosási fázis után 200 µl frissen készített 20 mM-os 0,2 M-os trietanolaminban hígított DMP-t (Dimethyl Pimelimidate [Thermo Scientific, Waltham, MA, USA]) adtunk a mágneses gyöngyökhöz, majd 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten keverőn 5 RPM forgási sebességgel. A felülúszók eltávolítása után 200 µl 0,2 M-os desztillált vízben hígított monoteanolamint (Sigma, St. Louis, MO, USA) adtunk a gyöngyökhöz és 15 percig inkubáltuk keverőn 5 RPM forgási sebességgel. Majd a felülúszó eltávolítása után a gyöngyöket háromszor mostuk 200 µl PBS pufferrel. Az antitest kötődése után, gyöngyökhöz rögzített mAb-okhoz hozzáadtuk a 200 µl plazma mintát, 200 µl PBS pufferben hígítva, 100 µl 20x-os proteáz inhibitorral (1 tableta proteáz inhibitor [SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablet, Sigma, St. Louis, MO, USA] 20 ml desztillált vízben feloldva) keverve. Az így előkészített mixet egy éjszakán át, keverőn, 4 °C-on inkubáltuk. Az antigén-antitest kötődését követően, másnap centrifugálás és a felülúszó eltávolítása után, a gyöngyöket háromszor mostuk 200 µl PBS pufferrel. A felülúszó eltávolítása után, 100 µl PBS pufferban a gyöngyöket átpipettáztuk tiszta Eppendorf csövekbe. A felülúszó eltávolítása után, a gyöngyökhöz 50 mM-os (desztillált vízben hígított, pH 2,5) 50 µl glicin (Sigma, St. Louis, MO, USA) oldatot adtunk és inkubáltuk szobahőmérsékleten 10 percig. Az eluátumot átpipettáztuk tiszta Eppendorf csőbe, melybe már előre 10 µl 1 M-os Tris oldatot ([Sigma, St. Louis, MO, USA] pH 9,0) tettünk.

3.3. SDS-PAGE

Az SDS-PAGE-hez redukáló géleket használtunk. A 12%-os szeparáló gél elkészítéséhez 4,9 ml desztillált vizet, 2,4 ml Proseive (Lonza, Basel, Svájc) oldatot, 2,5 ml 1,5 M-os 8,8 pH-jú Tris oldatot, 100 µl 10%-os SDS (Sigma, St. Louis, MO, USA) oldatot, 100 µl ammónium-peroxo-diszulfátot (APS [Sigma, St. Louis, MO, USA]), és 5 µl tetrametil-etilén-diamint (TEMED [Thermo Scientific, Waltham, MA, USA]) használtunk. Az inkubálási idő 45 perc volt.

Az 5%-os fésűs gél elkészítéséhez 3,75 ml desztillált vizet, 500 µl Proseive (Lonza, Basel, Svájc) oldatot, 650 µl 1M-os 6,8 pH-jú Tris oldatot, 50 µl 10%-os SDS oldatot, 50 µl APS-t, és 5 µl TEMED-et használtunk.

A mintákat 6x (pH 6,8) brómfenol-kék (Sigma, St. Louis, MO, USA) festőanyagot tartalmazó futtató pufferban vittük fel a géltre, 10 perces 95 °C-os denaturálás után.

A 10x7 cm-es gélek elkészítése után 8,4 pH-jú futtató pufferban (SDS, glicin és Tris-t tartalmaz) 1-1,5 órán át 130 V-on futtattuk a géleket.

3.4. Festés

3.4.1. Coomassie festés

Futtatás után a géleket festőkádban 1 órán át Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma, St. Louis, MO, USA) festékoldatban áztattuk. A festés után színtelenítő oldattal (50%-os etanol-metanol [Scharlab, Debrecen, Hungary] 1:1 arányú keveréke) színtelenítettünk.

3.4.2. Ezüst festés

A géleket a Coomassie festés után ezüstoffestéssel is megfestettük. A „destainnel” színtelenített géleket 20 percig fixáltuk 50% metanolt és 5% ecetsavat tartalmazó oldatban. Majd 20 percig 50% metanolt tartalmazó oldatban tovább áztattuk. 10 perc áztatás következett ultraszűrt vízben. Az 1 perces 1,27 mM-os Na₂S₂O₃ (Sigma, St. Louis, MO, USA) oldatban történő érzékenyítés után 2x1 percig ultraszűrt vízben öblítettük le a gélt. A festés 0,1%-os AgNO₃ (Sigma, St. Louis, MO, USA) oldatban 20 percig tartott, majd újra 2x1 perces ultraszűrt vizes öblítés következett. Az előhívás intenzív rázatás közben 2%-os Na₂CO₃-ot (Sigma, St. Louis, MO, USA) és 0.04% formaldehidet (Sigma, St. Louis, MO, USA) tartalmazó oldatban végeztük a megfelelően diszkrimináló szín denzitás eléréséig. A reakció leállítására 5%-os ecetsavban 3-5 perc alatt zajlott. Az ezüstoffestett géleket 1%-os ecetsav (Scharlab, Debrecen, Magyarország) oldatban 4 °C-on tároltuk.

A festett gélekről a képeket GelLogic 2200Pro (Carestream, Rochester, NY, USA) készülékkel rögzítettük digitálisan.

3.5. Western blot

Az Western blotthoz redukáló géleket használtunk. A 12%-os szeparáló gél elkészítéséhez 4,9 ml desztillált vizet, 2,4 ml Proseive (Lonza, Basel, Svájc) oldatot, 2,5 ml 1,5 M-os 8,8 pH-jú Tris oldatot, 100 µl 10%-os SDS oldatot, 100 µl ammónium-peroxo-diszulfátot (APS), és 5 µl tetrametil-etilén-diamint (TEMED) használtunk. Az inkubálási idő 45 perc volt.

Az 5%-os fésűs gél elkészítéséhez 3,75 ml desztillált vizet, 500 µl Proseive oldatot, 650 µl 1M-os 6,8 pH-jú Tris oldatot, 50 µl 10%-os SDS oldatot, 50 µl APS-t, és 5 µl TEMED-et használtunk.

Az elkészült 10x7 cm-es gélekre 6x, merkaptó-etanol és brómfenol-kéket tartalmazó, loading pufferrel vittük fel a mintákat 10 perces 95 °C-os inkubálás után. Körülbelül 1-1,5 óra 130 V-on való futtatás után, a géleket blottoló kazettába tettük. A blottoló kazettán belül a rétegek a következő sorrendben szerepeltek: 1. szivacs, 2. szűrőpapír, 3. membrán, 4. gél, 5. szűrőpapír, 6. szivacs. A fehérjék membrán blottolása 1 órán át 150 V-on jeges hűtés mellett történt.

A blottolás után a membránt blokkoló pufferban (6,25 mM polivinil-pirrolidon, 18,8 mM NaCl, 50 ml PBS-Tween) 4 °C-on, egy éjszakán át, horizontális keverőn blokkoltuk. A következő napon blokkoló pufferban hígított primer antitesttel inkubáltuk a membránt 4 °C-on egy éjszakán át, majd 5x10 percig mostuk PBS-Tween-t tartalmazó oldatban. A másodlagos antitesttel 1 órán át inkubáltuk a membránt szobahőmérsékleten. A membránt 5x10 percig mostuk PBS-Tween-t tartalmazó oldatban.

Az előhíváshoz Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) kétkomponensű oldatot használtunk 1:1 arányban.

A képeket GelLogic 2200Pro (Carestream, Rochester, NY, USA) készülékkel rögzítettük lumineszcens és UV megvilágítást használva.

3.6. Tömegspektrometria

3.6.1. Mintaelőkészítés

A teljes plazma mintákat C9 specifikus (BSI0449, BSI0581, BSI0639) antitesteken immunoprecipitáltuk protein G mágneses gyöngyökhöz kötve, melyek átlagos mérettartománya 50 nm (MACS® Technology, Miltenyi, Németország), majd elválasztó oszlopban tripszinnel leemésztettük a fehérjéket a gyöngyökről.

3.6.2. Tömegspektrometriás mérés

A tripszinnel emésztett alikvotokat LC-MS/MS rendszerbe vezettük. RP-HPLC (Waters, Milford, MA, USA) készüléket kapcsoltunk Orbitrap-Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tömegspektrométerhez. Az adatok gyűjtéséhez az MS1 alapján a 20 legintenzívebb, többszörösen töltött prekursorion került fragmentálásra MS2-ben, magas energiájú ütközésindukált disszociációs [Higher-energy C-trap Dissociation (HCD)] technikát alkalmazva.

3.7. Adatok elemzése

A nyers adatokat csúcslista típusú adatokká konvertáltuk Proteome Discoverer (v 1.4) program (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével, majd ezt a listát összevetettük a SwissProt adatbázissal (555426 proteint tartalmazó, 2017.09.19.-es verzió). Az összevetéshez Protein Prospector (v.5.15.1) szoftvert (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk a következő paraméterekkel: enzim: tripszin maximum két kihagyott hasítóhely; tömegpontosság: 5 ppm a prekuzoionra és 10 ppm a fragmensionokra; fix módosítások: cisztein karbamidometileződés; változó módosítások: N-terminális acetilációja, metionin oxidáció, N-terminális glutamin ciklizációja, szerin/teronin/tirozin foszforilláció, maximum két variábilis módosítás volt megengedett peptidenként. Az elfogadási kritérium E-értéke 0,01 volt proteinek és 0,05 volt peptidek azonosítására.

Az adatokban N-glikozilációra kerestünk NXT|S, X≠P motívumokon.

A 415 pozícióban lévő N-glikozilációt egy erős, nem módosított, teljesen emésztett, és minden mintában jelenlevő peptidre (LSPIYNLVPVK) normalizáltuk. (Megjegyzés: a tömegspektrometirás kísérletek a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban készültek.)

3.8. Antitest biotinizálás

3.8.1. Biotinilált antitest előállítása

1 mg antitesthez 26,6 µl 10 mM-os EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin-t (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) adtunk. 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten keverés közben.

A biotinilált antitestet Zeba™ Spin Desalting Columns (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével tisztítottuk meg. Az oszlop hegyét letörtük, 15 ml-es centrifugacsőbe helyeztük és 2 percig, 20 °C-on, 1000 g fordulatszámon centrifugáltuk. Az oszlopot áthelyeztük tiszta 15 ml-es csőbe felmértük rá a biotinizálható ellenanyag mintát és 100 µl ultraszűrt vizet. A mintát tartalmazó oszlopot újracentrifugáltuk 2 percig, 20 °C-on, 1000 g fordulatszámon. Az így kapott átfolyó tartalmazta a biotinilált antitesteket.

3.8.2. Biotinilált antitest validálása

A biotinizáltsági fokot HABA - Pierce Biotin Quantitation Kittel (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) végeztük. A 4 °C-on tárolt HABA premixet szobahőmérsékletre hagytuk melegedni, majd 100 µl ultraszűrt vízben feloldottuk. A feloldott HABA-t 96 nyílású ELISA lemezre vittük (160 µl PBS + 20 µl HABA / nyílás). FLUOstar OPTIMA (BMG LabTech, Durham, NC, USA) ELISA lemez olvasón beolvastuk a nyílások abszorbancia (OD) értékét.

Majd 20-20 µl biotinizált mintát rámértünk a HABA-t tartalmazó nyílásokra. Összeszuszpendáltuk és újramértük az OD értékét az olvasón. A kiértékeléshez a Thermo Scientific oldalán lévő HABA Calculator programot használtuk. (<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/protein-biology/protein-labeling-crosslinking/protein-labeling/biotinylation/biotin-quantitation-kits/aba-calculator.html>)

A biotinizált antitestek koncentrációját BCA Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével mértük meg. BCA mérésnél egy előre elkészített kalibrációs sor mellé, 96 nyílású lemezen 5-5 µl mintát viszünk fel nyílásonként, 5 µl 1 mg/ml IgG standardot is használva. A mintákat és a standardot is 5x-re hígítjuk PBS oldattal. A kitben lévő A és B komponenseket 50:1 arányban kevertük és 200-200 µl-t rámértünk a lemezre, majd 15 percig inkubáltuk 37°C-on.

A lemez abszorbancia értékeit a FLUOstar OPTIMA ELISA (BMG LabTech, Durham, NC, USA) olvasóban történő beolvasás után kaptuk meg.

3.9. C9 epitóp teszt

A C9 epitópok átfedését 96 nyílású ELISA (Costar3690, Corning, NY, USA) lemezen teszteltük kompetíciós esszében. A 96 nyílású lemezre 2 µg C9 (Sigma, St. Louis, MO, USA) fehérjét tartalmazó 30 µl karbonátos burkoló puffert (15 mM Na₂CO₃ [Riedel-deHaren, Seelze, Németország], 35 mM NaHCO₃ [Riedel-deHaren, Seelze, Németország], pH 9,6) mértünk fel lyukanként, majd egy órán át 37°C-on inkubáltuk. Ezután a lemezt kétszer mostuk PBS-Tween oldattal. A következő lépésben 60 µl BSA-PBS-Tween (BSA: Sigma, St. Louis, MO, USA) oldattal blokkoltuk a lemezt 30 percig 37 °C-on. Majd a lemezt háromszor megmostuk PBS-Tween oldattal. A lemezre különböző, nem biotinizált, blokkoló pufferban, hígított C9 antitesteket (BSI0449, BSI0581, BSI0639), 1 és 10 µg/ml-s koncentrációban vittünk fel és inkubáltuk 1 órán át 37 °C-on. Ezután a lemezt kétszer mostuk PBS-Tween oldatban, majd rámértünk 1 µg/ml koncentrációjú, 30 µl, blokkoló pufferban oldott különböző C9 antitesteket és 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Ezután háromszor mostuk a lemezt és rámértünk 5000x blokkoló pufferban hígított Streptavidin-HRP-t (Southern-Biotech, Birmingham, AL, USA) a 30 perces inkubáláshoz. A lemezt négyszer mostuk. A lemezre 30 µl egykomponensű TMB (Sigma, St. Louis, MO, USA) oldatot mértünk és 1-2 perc után a reakciót 4N H₂SO₄ (Merck, Darmstadt, Németország) oldattal leállítottuk. A lemezen az abszorbancia értéket 450 nm-en olvastuk be a FLUOstar OPTIMA (BMG LabTech, Durham, NC, USA) lemez olvasóval.

3.10. Statisztikai analízis

A statisztikai analíziseket R platformon végeztem. A p-értékeket a kétmintás t-próbával számítottam ki ($\alpha = 0,05$) a normalitási teszt (Shapiro–Wilk) után. A pROC R csomag segítségével készültek a ROC görbék.

3.11. Ábrázolás

Az ábrákat R platformon, excelben, IBS illusztrátorral (version 1.0), illetve Pymol (1.7.4.4. Edu) programokkal készítettem.

4. Eredmények

4.1. Anti C9- antitestek kiválasztása és korábbi adatainak elemzése

Korábbi méréseink eredményei szerint, egy-egy fehérje epitópjai tüdőrák asszociáció szempontjából eltérő biomarker értékkel rendelkeznek, és ezek nem voltak egyforma irányúak, azaz tapasztaltunk pozitív, negatív és neutrális asszociációt is. Az egyik ilyen vizsgált fehérje a plazma C9 volt. A BSI QuantiPlasma könyvtárban 12 darab C9-et felismerő mAb található. Ezek közül választottunk ki hármat további vizsgálatra, az epitópok mAb-okkal vizsgált asszociációja alapján. Volt neutrális egy C9 epitóp, amely nem tett különbséget tüdőrákos és nem tüdőrákos minták között. Voltak olyan epitópok is, amelyek különbözően viselkedtek tüdőrákos és kontroll egyének vérplazma mintáival való asszociáció szempontjából, azaz pozitívan vagy negatívan kapcsolódtak hozzájuk, ezek közül egyet-egyét választottam ki. Statisztikai elemzés után a BSI0581 epitóp és BSI0639 epitóp kontroll és tüdőrákos minták között szignifikáns volt a különbség, míg a BSI0449 (neutrális) epitóp esetében nem.

4.2. Az anti-C9 monoklonális antitestek validálása

4.2.1. Validálás kereskedelmi forgalomba kapható C9-re

Kísérleteinket a BSI által termelt mAb-okkal végeztük, ezért vizsgálatunk első célja a kiválasztott BSI antitestek validálása volt Western blottal előzetes tisztaság vizsgálatok után. Az előzetesen kiválasztott anti-C9 2 mg/ml-s mAb-okat, (BSI0449, BSI0581, BSI0639) 200x-os hígításban használtuk, PBS pufferben hígítva, primer antitestként a kereskedelmi forgalomban kapható C9 fehérje (Sigma) felismerésére. Másodlagos antitestként GAM-HRP-t használtunk 2500x hígításban.

Mind a három anti-C9 fehérje felismerte a C9 fehérjét ~55 kDa tartományban, míg egy másik, negatív kontroll antitest, ami albumin specifikus (BSI0097), nem ismerte fel a C9-et. A preparátum nem tartalmaz teljes C9 molekulát; a felismert C9 valószínűleg egy degradált forma lehet, mivel a teljes hosszúságú C9 molekulatömege 63,173 kDa.

4.2.2. C9 vizsgálata plazmában

Miután validáltuk a BSI anti-C9 mAb-okat, ezek segítségével immunoprecipitáltunk kontroll és tüdőrákos poolozott teljes plazmát. A poolok 167 kontroll és 207 tüdőrákos beteg mintáit tartalmazták. Az immunoprecipitátumokban vizsgáltuk, a C9 fehérje jelenlétét. Az immunoprecipitált kontroll és tüdőrákos mintákat SDS-PAGE után Western blottal ellenőriztük. A Western blotthoz BSI0449:BSI0639 1:1 arányú elegyét használtuk. A BSI0581 korábbi Western blott kísérletek során nem működött teljes plazmát használva. Másodlagos

antitestként GAM-HRP-t használtunk 2500x hígításban. Az eredmények alapján a kiválasztott mAb-ok a vérplazmában is felismerték a C9-et, körülbelül 52 kDa és 68 kDa körüli tartományban. Ezek a formák valószínűleg a korábban detektált degradált C9, valamint a poszttranszlációs módosulásokkal rendelkező teljes hosszúságú plazma C9-et mutatják.

4.3. A C9-en lévő epitópok átfedésének vizsgálata

Kötődés kompetíciós ELISA tesztet végeztem, hogy megvizsgáljam, a három anti-C9 specifikus mAb különböző epitópokat ismer-e fel. Ebben a kísérletben a 96 nyílású lemezt tisztított, kereskedelmi forgalomban kapható C9-cel burkoltam. Erre következő réteggént a nem biotinilált BSI anti-C9 (BSI0449, BSI0581, BSI0639) ellenanyagok következtek különböző koncentrációkban (1 µg/ml és 10 µg/ml). A második antitest a biotinilált antitest (BSI0449, BSI0581, BSI0639) volt, 1 µg/ml koncentrációban. (Az antitestek biotinilálását is a laborban végeztem. A biotiniláltsági fokot HABA teszttel, az antitest koncentrációt BCA teszttel ellenőriztem.) Az első kísérlet során az elsődleges, nem biotinilált antitest a BSI0449 volt, különböző koncentrációkban. Negatív kontrollként C9 helyett marha szérumalbumin rétegzést használtam. Pozitív kontrollként a C9 fehérjét közvetlenül a biotinilált anti-C9 mAb-bal detektáltam. Technikai kontrollként a C9-re nem biotinilált antitestet tettem, majd erre kötöttem rá a GAM-HRP-t. Ezt a kísérletet elvégeztük a BSI0581-es és a BSI0639-es mAb-ok esetében is.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a vizsgált epitópok függetlenek egymástól, de a BSI0449 mAb a BSI0581-es és a BSI0639-es epitóp elérhetőséget is kismértékben ugyan, de befolyásolja. Feltételezésünk szerint molekuláris átrendeződés indukciója útján.

4.4. A C9 epitóp függő heterogenitásának fehérjekémiai analízise

4.4.1. Epitóp heterogenitás fehérjekémiai analízise SDS-PAGE analízissel

Megvizsgáltam, hogy van-e összefüggés az epitópokkal összefüggésbe hozható molekuláris heterogenitás és a biomarker érték között. Ehhez először a három anti-C9 mAb-bal (BSI0449, BSI0581, BSI0639) precipitáltam kontroll és tüdőrákos plazmákat. Az immunoprecipitátumokat, redukáló SDS-PAGE gélen, különböző térfogatban vittem fel (10 µl és 15 µl), majd a géleket Coomassie G-250 és ezüsfestéssel is megfestettem. A BSI0449 és BSI0581 mAb-bal immunoprecipitált minták között látszólag nem volt jelentős különbség. A BSI0639 mAb-bal immunoprecipitált mintákon ~70 kDa tartományban lévő sáv halványabb, a tüdőrákos mintákon két egymástól elkülönülő sáv is látható.

4.4.2. Epitóp heterogenitás fehérjekémiai analízise tömegspektrometriás analízissel

Mivel az SDS-PAGE felbontása nem volt elegendő a koprecipitált fehérjék közötti különbségek kimutatásához (kivéve a C9 molekulásúlyú fehérjét), a mintákat tovább vizsgáltuk LC-MS/MS technológiával. A gyöngyökre anti-C9 mAb-okkal (BSI0449, BSI0581, BSI0639) kihorgonyozott C9-et és asszociált fehérjéit tripszinnel leemésztették le a gyöngyökről. A tripszinnel emésztett alikvotokat tömegspektrometriás analízissel elemezték a Szegedi Biológia Kutatóközpont Proteomikai Laborjában. A vizsgálat igazolta, hogy az anti-C9 mAb-ok reagálnak C9-cel, mivel az emésztett peptidek alikvotjainak 3-13%-a C9 volt és a C9-re vonatkozóan ez 30-45%-os C9 lefedettséget eredményezett.

4.5. Az LC-MS/MS eredmények adatanalízise

Az epitópok különböző viselkedése olyan genetikai módosulásoknak is köszönhető lehetne, mint az alternatív splicing, illetve az alternatív translációs kezdő vagy stop hely. Megvizsgáltam, hogy az észlelt epitóp különbségek ezen C9 kódoló kapacitásra visszavezethető strukturális genetikai változásoknak köszönhetőek-e, visszatérképeztem a különböző mAb-okkal kapott MS peptideket az Ensembl adatbázisban található C9 struktúrára (ENST00000263408.5). A C9 poszttranszlációs módosulásait publikációkból és az UniProt adatbázisból kerestem ki. A keresés során 7 különböző pozícióban (48, 51, 215, 256, 277, 394, 415) volt N-glikoziláció, 2 pozícióban C-mannoziláció (27, 30), és 4 pozícióban O-glikoziláció (24, 26, 32, 258). A mintáinkból minden esetben hiányoztak a szignál peptidek, mivel a C9 plazmában keringő, vagyis szekretált C9 volt. Az MS peptidek eloszlása hasonló volt. A kapott peptidek számát is összevetettük a különböző kontroll és tüdőrákos mintákban. A PeptideAtlas-ban található összes C9 peptidet kigyűjtöttem (478 darab) [Human 2022-01 verzió], majd ezeket a peptidek kezdő pozíciói szerint sorba állítottam. Az így rendezett peptidek mindegyike kapott egy sorszámot (index). A PeptideAtlas-ból kigyűjtött fehérjék index számához igazítottam a C9 MS peptidjeinket. Az indexelés után a C9 MS peptidek összevetéséből nem látszik jelentős különbség a különböző minták között. Az epitópok variabilitása poszttranszlációs módosulásnak is köszönhető, ezért a C9 MS peptideken különböző glikozilációs mintákat kerestünk. Vizsgálatunk során csak a 415-ös pozícióban lévő N-glikozilációt találtuk meg, viszont ezt minden mintában. A talált glikozilációs helyet egy nem módosított „erős” peptidre normalizálva különbségeket találtunk a glikoziláltság arányában a kontroll és a tüdőrákos mintákban. A kapott peptideket különböző háromdimenziós C9 szerkezetekre is visszatérképeztük. A szerkezeti képekre való visszatérképezés után, jól látható,

hogy felszínen lévő, más fehérjéhez kapcsolódási pontot jelenthető fehérjéket nem találtunk meg.

4.6. C9 asszociált plazmafehérjék

A fehérje komplexek dinamikusan változhatnak különböző fiziológiás állapotokban. Ezek a különböző fehérje-fehérje kölcsönhatás változások epitópokat takarhatnak el vagy tehetnek elérhetővé. Ennek vizsgálatára, elemeztük a C9-cel asszociált fehérjéket. A C9-hez a kísérletek során összesen 78 különböző fehérje koprecipitálódott, különböző összetételben. Ezek közül kiválasztottuk azt a négyet, melyekben a kontroll és tüdőrákos mintában legalább két peptidnyi különbség volt a különböző anti-C9 mAb-okkal vizsgálva. A plazma C9-hez a vizsgált koeprecipitált fehérjék különböző mértékben asszociálódnak. A BSI0449 kontroll és LC minta is erősen C4A asszociált, míg a BSI0639 LC mintában nem találtunk C4A peptidet. A hornerint nem találtuk meg a BSI0581 és BSI0639 LC mintákban. HSP90AB1 peptideket nem találtunk a BSI0449-es mintákban, míg erősebben asszociált a BSI0639-es mintákkal. HSPA8 peptideket csak a BSI0639-es mintákban találtunk.

5. Megbeszélés

Az epitomika a munkacsoportunk által elsőként leírt omaikai tudomány terület, amely proteinek dinamikus epitóp változásait vizsgálja egészséges és különböző patológiás állapotokban. Extenzív és globális PEP technológiával a vizsgálható epitópok száma, biomarker értéke és funkció relevanciája szélesebb körben is kiterjeszhető lesz. Munkám az első lépés ebben az irányban. Az eddigi felfedezett vérplazma epitomikai biomarkerek diagnosztikai célra vagy betegkövetésre is alkalmasak lehetnek. Nem jelentenek majd extra sugárterhelést a betegek számára, és kivitelezésük sem igényel nagyobb gépparkot és anyagi befektetést. Az eddigi LDCT-vel végzett klinikai szűrővizsgálatok alapján megállapítható, hogy a nagyszámú álpozitív eredmények csökkentése szükséges. Erre különböző rizikófaktorokat alkalmazva algoritmusokat lehet kidolgozni, bevethető a mesterséges intelligencia és mindez kiterjeszhető a biomarkerekre, illetve az ezeket is magába foglaló multivariáns index megközelítésekre.

Az általunk vizsgált C9 fehérje, a veleszületett immunrendszer komplement kaskád részének az utolsó eleme, a terminális komplex része. A terminális komplexben polimerizálódik és csatlakozik az előzetes kialakult C5b-C6-C7-C8 komplexhez. A C9 a plazmában monomer formájában kering. A polimerizációtól a keringésben a clusterin és a vitronectin védi meg.

A C9 fehérjét korábban már azonosították gyomor-, tüdő-, és végbélrák biomarkereként. Ezekben a publikációkban, csak az „összes” C9 fehérje jelenlétét vizsgálták.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai alapján a QuantiPlasma mAb könyvtárból kiválasztottunk három olyan anti-C9 antitestet, melyek sbCIA vizsgálat alapján, különböző módon asszociálnak tüdőrákos plazma mintákkal. A profilírozott epitópok között, volt, amelyik neutrálisan, volt, amelyik pozitívan vagy negatívan asszociált a kísérletek során tüdőrákos plazma mintákkal.

Munkánk során a C9 eddig nem publikált epitóp függő molekuláris heterogenitását vizsgáltuk kontroll és tüdőrákos plazmamintákon. Megpróbáltuk megérteni a korábban felfedezett, eltérő asszociációt mutató, jelenség okait. Először validáltuk az anti-C9 mAb-okat kereskedelmi forgalomban kapható C9 fehérjével. Ennek során Western blottal bebizonyosodott, hogy mind a három kiválasztott anti-C9 mAb felismeri a C9 fehérjét. Ugyan a kapott molekulásúly alatta volt az irodalmi értéknek, ezért feltételezzük, hogy degradáció érte a tiszta C9-et vagy gyártás, vagy tárolás során. Miután validáltuk antitestjeinket, megvizsgáltuk az epitópok függetlenségét kompetitív ELISA módszerrel. A három vizsgált epitóp közel független egymástól, de a BSI449 epitóp ellenanyag kötése kismértékben befolyásolja a másik két epitóp elérhetőségét vagy/és struktúráját. A C9 fehérje vizsgálatához először immunoprecipitáltuk a plazma C9-et a

különböző antitesteken keresztül. A kapott immunoprecipitátumot SDS-PAGE-en futtattuk és megfestettük Commassie Blue, majd ezüst festéssel. A kapott eredmény alapján megállapítottuk, hogy a kapott mintázat közel azonos volt. Talán a BSI0639 esetében volt több sáv. Ez annak is köszönhető, hogy a BSI0639 kevesebb C9-et precipitált, így a sávok jobban el tudtak különülni. Ezt az is alátámasztja, hogy a C9-et Western blottal vizsgálva az immunoprecipitált mintákban is halványabb volt a kapott sáv a BSI0639 esetében. A C9 heterogenitását vizsgáltuk tömegspektrometriás módszerrel is. A kapott peptideket visszatérképeztük a C9-es fehérjére. Eredményünk közel azonos peptideloszlást mutatott minden esetben. Ebből arra következtetünk, hogy a vizsgált mintákban a C9 struktúrája azonos lehet. Mivel a C9 szerkezete nagy valószínűséggel azonos a mintákban, ezzel nem lehet megmagyarázni a kutatást elindító megfigyelést, vagyis az eltérő epitóp asszociációt a kontroll és tüdőrákos mintákban.

Két irányba folytattuk tovább a kísérleteket. Tömegspektrometriás vizsgálattal megvizsgáltuk a precipitált peptidek segítségével épített C9 molekula modelleket, a 415-ös pozíció N glikozilációját, és a koprecipitált fehérjéket minden epitópra és mindkét mintatípusra vonatkozóan. A C9-nek számos poszttranszlációs módosulását találtuk publikációkban és az Uniprot adatbázisban. Ezekből a módosulásokból mi csak a 415-ös helyen található N-glikozilációt találtuk meg, ezt viszont minden mintában. Ezt a pozíciót tartalmazó peptidet egy nem módosított, minden mintában jelenlévő C9 peptidhez normalizálva azt kaptuk, hogy ugyan ez a 415-ös pozícióban N-glikozilált peptid minden mintában jelen van, viszont más arányban. A BSI0449-es mintákban a kontroll és tüdőrákos mintákban közel azonos volt az arány, míg a BSI0581 és BSI0639 esetében közel 5x nagyobb volt az N-glikoziláltsági arány a kontroll javára. A koprecipitált fehérjéket vizsgálva megállapítottuk, hogy ezek aránya más és más antitestenként, és kontroll – tüdőrák viszonylatban is. Ezek alapján arra következtetünk, hogy a C9 különböző proteoformáit találtuk meg a kiválasztott anti-C9 antitestekkel. Bár az asszociáció más fehérjékkal nem tartozik a proteoformákat egymástól megkülönböztető faktorok közé, az egyszerűség kedvéért mégis az alábbi táblázatban együtt tárgyaljuk őket. Feltételezzük, hogy a 2a és 2b formák olyan variánsokat képviselnek, melyek stressz vagy malignus elváltozás hatására keletkeznek a sejtben. A C9 fehérje, különböző helyeken is termelődhet, akár ez is forrása lehet a különböző proteoformáinak.

Eredményeink alátámasztják azt az elméletet, mely szerint különböző proteoformák léteznek. Ezeknek a proteoformáknak és az epitóp elérhetőséget befolyásoló komplex képződésnek biomarker értékük is lehet.

6. Összefoglalás

Napjaink technológiai lehetővé teszik a fehérjék egyre szofisztikáltabb megismerését. A fehérjék proteoformáinak leírása és különböző állapotokhoz való társítása, a fehérjék funkcióinak mélyebb megértéséhez vezet. Többek között, a tudás felhasználható az egyes proteinek biomarker funkcióinak bővítésére.

Korábban kutatásaink során, protein epitóp profilírozással végzett vizsgálatokban felfedeztük, hogy a fehérjék epitópjai eltérő módon asszociálhatnak tüdőrákos plazában az antitestekkel. Munkacsoportunk korábbi kutatásait folytatva, a C9 fehérje epitópjait vizsgáltam. Kiválasztottunk a QuantiPlasma könyvtárából három olyan anti-C9 antitestet (BSI0449, BSI0581, BSI0639), melyekkel eltérő módon asszociáltak az epitópok tüdőrákos mintákban (semleges, negatívan és pozitívan). A jelenség a biokémiai okát vizsgáltam munkám során. Az anti-C9 antitesteket először validáltuk Western blottal. Később vizsgáltuk a három C9 epitóp egymástól való függetlenségét. Az epitópok nagymértékben függetlenek voltak egymástól. Tömegspektrometriás módszerrel kontroll és tüdőrákos mintákból immunoprecipitált minták C9 fehérjéit vizsgálva megállapítottuk, hogy a C9 peptid eloszlás közel azonos volt, ezért nem valószínű, hogy a különbségek oka a C9 szerkezetében lehet. Ezután a C9 koprecipitált fehérjéit elemeztük. A kiválasztott antitestjeinkkel immunoprecipitált mintákat SDS-PAGE-n vizsgáltuk. A kapott mintázat minden mintában közel azonos volt. Tömegspektrometriás módszerrel elemeztük a koprecipitált fehérjéket is. Olyan fehérjéket választottunk ki, amelyeknél a kontroll és tüdőrákos minták között legalább két peptidre vonatkozóan volt eltérés. Három olyan fehérjét találtunk, amelyek nem csak az antitestek között, hanem kontroll és tüdőrákos minták között is eltérést mutattak. A C4A erősen asszociált a BSI0449 mintákkal, a BSI0639-es tüdőrákos mintában nem volt jelen. A HSP90AB1 a BSI0639-es mintákkal asszociált erősen és a BSI0449-es mintákban nem volt jelen. A HSPA8 pedig csak a BSI0639-es mintákban volt jelen. A C9 fehérje 415-ös pozíciójában lévő N-glikozilációs heterogenitást találtuk. Annak ellenére, hogy jelen volt minden mintában, a 415-N-glikoziláció arányaiban mutatott eltérés kontroll és tüdőrákos mintákban a BSI0581 és BSI0639 epitópok pozitív feltételezett proteoformák esetében. Ezekben 5x több volt a glikozilált peptid a kontroll mintákban. A BSI0449 esetében a két állapot között nem volt eltérés.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a C9 fehérjének több proteoformája is van. Ezek a proteoformák különböző epitópokon keresztül vizsgálhatóak. A különböző proteoformáknak és a velük koprecipitált fehérjéknek többek között, jelentős biomarker értékük

lehet tüdőrákban. Munkám elsőként nyújt biokémiai magyarázatot az epitóp megközelítés biológiai jelentőségére.

7. Új megállapítások

1. Különböző epitópokon keresztül precipitált C9 fehérjék különbséget mutatnak LC és kontroll plazmában.
2. A visszatérképezett C9 peptidjeinek eloszlása azonos molekuláris szerkezetet sugall a különböző epitópokon keresztül precipitált C9 formák között LC és kontroll plazmában.
3. A koprecipitált fehérjék minőségi és mennyiségi különbségeket mutatnak a kontroll és LC plazma között. (eltérés a térbeli kapcsoltságban)
4. A C9 N-glikozilációs aránya a 415. pozícióban jelentős eltérést mutat a kontroll és LC plazma között.

8. Tárgyszavak

Epitomika, komplement C9, epitóp profilírozás, epitóp heterogenitás, proteoformák, biomarker, tüdőrák

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, prof. dr. Takács Lászlónak, amiért tudásával segítette munkám az elmúlt évek során.

Köszönettel tartozom a Biosystems Immunolab Zrt. munkatársainak a laboratóriumi munkában nyújtott segítségükért és a munkám anyagi háttérének biztosításáért.

Köszönettel tartozom a Humángenetikai Tanszék korábbi vezetőjének prof. dr. Nagy Bálintnak, és jelenlegi vezetőjének prof. dr. Balogh Istvánnak, valamint a Tanszék összes dolgozójának, hogy kérdéseimmel mindig fordulhattam hozzájuk.

Köszönettel tartozom a Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola korábbi vezetőjének prof. dr. Tózsér Józsefnek, és jelenlegi vezetőjének prof. dr. Balogh Istvánnak, hogy kutatómunkám a doktori iskola keretein belül folytathattam.

Köszönöm a Szegedi Biológiai Kutatóközpont munkatársainak a tömegspektrometriás vizsgálatoknál és elemzéseknél nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom az Adatintenzív és Nyílt tudomány Ösztöndíj program oktatóinak a tőlük kapott tudásért.

Szeretnék köszönetet mondani prof. dr. Horváth Ildikónak, a mindig segítőkész hozzáállásáért.

Szeretnék köszönetet mondani dr. Furka Andreának, hogy tudásával mindig támogatta munkám az évek során.

Köszönöm dr. Gellén Gabriellának és (dr.) Hoffka Gyulának a szakmai és baráti támogatásukat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani Édesanyámnak és barátaimnak a biztatásukért, a türelmükért és a szeretetükért.

10. Publikációk



**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/367/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tornyai Ilona
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tornyai, I.**, Lázár, J., Pettkó-Szandtner, A., Hunyadi-Gulyás, É., Takács, L.: Epitomics: Analysis of Plasma C9 Epitope Heterogeneity in the Plasma of Lung Cancer Patients and Control Subjects.
Int. J. Mol. Sci. 24 (18), 1-13, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241814359>
IF: 5.6 (2022)
2. Lázár, J., Kovács, A. L., **Tornyai, I.**, Takács, L., Kurucz, I.: Detection of leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1-containing immunocomplexes in the plasma of lung cancer patients with epitope-specific mAbs.
CBM. 34 (1), 113-122, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CBM-210164>
IF: 3.1

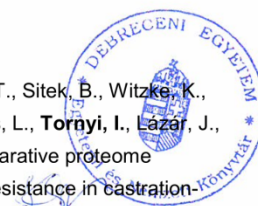
További közlemények

3. Kostyál, L., **Tornyai, I.**, Furka, A.: A szarkopénia mérése komputertomográfiával és jelentősége onkológiai betegeknél.
Klin. Onkol. 11 (1), 82-86, 2024.
4. Sárközi, A., **Tornyai, I.**, Békési, E., Horváth, I.: Co-Morbidity Clusters in Post-COVID-19 Syndrome.
J Clin Med. 13 (5), 1-14, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm13051457>
IF: 3.9 (2022)
5. **Tornyai, I.**, Horváth, I.: Role of Complement Components in Asthma: a Systematic Review.
J Clin Med. 13 (11), 1-14, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm13113044>
IF: 3.9 (2022)





6. Lieber, A., Makai, A., Orosz, Z., Kardos, T., Susil, J. I., **Tornyai, I.**, Bittner, N.: The role of immunotherapy in early stage and metastatic NSCLC.
Pathol. Oncol. Res. "Accepted by Publisher", 2024.
IF: 2.8 (2022)
7. **Tornyai, I.**, Árkosy, P., Horváth, I., Furka, A.: A new perspective on the proper timing of radiotherapy during CDK4/6 inhibitor therapy in patients with "bone-only" metastatic breast cancer.
Pathol. Oncol. Res. 29, 1-8, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/pore.2023.1611369>
IF: 2.8 (2022)
8. Kostyál, L., **Tornyai, I.**, Sebők, G., Furka, A.: A szarkopénia mérésének radiológiai lehetőségei: Növelhető az onkoterápia hatásossága.
Med. Tribune. 9, 15-16, 2023.
9. Csizmarik, A., Nagy, N., Keresztes, D., Váradi, M., Bracht, T., Sitek, B., Witzke, K., Puhr, M., **Tornyai, I.**, Lázár, J., Takács, L., Kramer, G., Sevcenko, S., Maj-Hes, A., Hadaschik, B., Nyirády, P., Szarvas, T.: Comparative proteome and serum analysis identified FSCN1 as a marker of abiraterone resistance in castration-resistant prostate cancer.
Prostate Cancer Prostatic Dis. [Epub ahead of print], 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41391-023-00713-y>
IF: 4.8 (2022)
10. Lázár, J., Antal-Szalmás, P., Kurucz, I., Ferenczi, A., Józsi, M., **Tornyai, I.**, Müller, M., Fekete, J. T., Lamont, J., FitzGerald, P., Gall-Debreceni, A., Kádas, J., Vida, A., Tardieu, N., Kieffer, Y., Jullien, A., Guergova-Kuras, M., Hempel, W., Kovács, A. L., Kardos, T., Bittner, N., Csánky, E., Szilasi, M., Losonczy, G., Szondy, K., Gálffy, G., Csada, E., Szalontai, K., Somfay, A., Malka, D., Cottu, P., Bogos, K., Takács, L.: Large-scale plasma proteome epitome profiling is an efficient tool for the discovery of cancer biomarkers.
Mol. Cell. Proteomics. 22 (7), 1-18, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcpro.2023.100580>
IF: 7 (2022)
11. **Tornyai, I.**, Furka, A.: Új biomarkerek a tüdőrákok diagnosztikájában: Lehetőség a tüdőrákok korai felismeréséhez.
Med. Tribune. 9, 9-10, 2023.
12. Keresztes, D., Csizmarik, A., Nagy, N., Módos, O., Fazekas, T., Bracht, T., Sitek, B., Witzke, K., Puhr, M., Sevcenko, S., Kramer, G., Shariat, S., Küronya, Z., Takács, L., **Tornyai, I.**, Lázár, J., Hadaschik, B., Lászik, A., Szűcs, M., Nyirády, P., Szarvas, T.: Comparative proteome analysis identified CD44 as a possible serum marker for docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer.
J. Cell. Mol. Med. 26 (4), 1332-1337, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.17141>
IF: 5.3





13. Furka, A., Nagy, Z., Szabó, I., Fekete, G., Kelemen, Á., Bolobás, G., Sebők, G., Molnár, T., Árvai, J., **Tornyai, I.**, Kostyál, L., Révész, J., Hauser, P.: Full Body Surface Coverage with Water-Equivalent Bolus as Novel Technique for Total Body Irradiation before Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pediatric Acute Lymphoid Leukemia.
Children. 9 (11), 1-10, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/children9111740>
IF: 2.4
14. Csizmarik, A., Keresztes, D., Nagy, N., Bracht, T., Sitek, B., Witzke, K., Pühr, M., **Tornyai, I.**, Lázár, J., Takács, L., Kramer, G., Sevcenko, S., Maj-Hes, A., Jurányi, Z., Hadaschik, B., Nyirády, P., Szarvas, T.: Proteome profiling of enzalutamide-resistant cell lines and serum analysis identified as marker of resistance in castration-resistant prostate cancer.
Int. J. Cancer. 151 (8), 1405-1419, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.34159>
IF: 6.4
15. Furka, A., Simkó, C., Kostyál, L., Szabó, I., Valikovics, A., Fekete, G., **Tornyai, I.**, Oross, E., Révész, J.: Treatment Algorithm for Cancerous Wounds: a Systematic Review.
Cancers (Basel). 14 (5), 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers14051203>
IF: 5.2

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 53,2

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,7

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

Debrecen, 2024.06.17.

