

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Makai Attila

**A TÜDŐRÁK KOMPLEX MEGKÖZELÍTÉSE: ONKOGÉN
JELÁTVITELI MECHANIZMUSOK ÉS INNOVATÍV
KÉPALKOTÓ ELJÁRÁSOK A SZEMÉLYRE SZABOTT
DIAGNOSZTIKA SZOLGÁLATÁBAN**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Makai Attila

Témavezető: Dr. Lontay Beáta



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	3
Bevezetés.....	5
Irodalmi áttekintés.....	7
A tüdőrák diagnosztikájának és kezelésének kihívásai napjainkban.....	7
Epidemiológia.....	7
Szűrés	9
Szövettani típusok	9
Etiológia	13
Pathogenezisben szerepet játszó genetikai eltérések.....	15
Pathogenezisben szerepet játszó epigenetikai eltérések	19
Hisztonok.....	20
Protein arginin metiltranszferáz enzimek, a PRMT5.....	21
Miozin foszfatáz (MP).....	24
Mg ²⁺ -függő 1 B protein foszfatáz (PPM1B).....	26
A PPM1B/MP/PRMT5/hiszton útvonal összefoglalása	28
Diagnosztika.....	29
Kezelés	36
Célkitűzések	38
Anyagok és módszerek.....	39
Antitestek.....	39
Betegek.....	40
Mintavétel és szövettani minták	41
Fehérje extrakció	41
Western blot analízis	42
RNS izoláció.....	42
Reverz transzkripció kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR).....	43
Immunhisztokémia	44
Immunfluoreszcens festés.....	45
Kaplan-Meier túlélési analízis	46
Statisztikai analízis	46
Funkcionális virtuális bronchoszkópia: módszertani beállítások	47
Eredmények.....	50
A beválasztott betegek klinikai adatai	50

PPM1B expresszió szignifikánsan csökkent mind az ADC, mind az SCC mintákban.....	54
A MYPT1 Thr ⁸⁵³ gátló oldalláncának foszforilációja emelkedett a tüdőrákos szövetmintákban.....	60
Emelkedett PRMT5 szint az ADC és SCC mintákban.....	62
Az aktiváló PRMT5 ^{pT80} foszforiláció aránya, így a PRMT5 aktivitása nő az ADC és SCC mintákban.....	65
A hiszton fehérjék (H2A és H4) szimmetrikus dimetilációja fokozódik az ADC és SCC esetén.	67
A funkcionális virtuális bronchoszkópia fejlesztésének eredményei	73
Diskusszió.....	76
Új megállapítások.....	85
Összefoglalás.....	86
Summary	87
Tárgyszavak (Keywords)	88
Köszönetnyilvánítás	89
Hivatkozások.....	90
Függelék.....	101

Rövidítések

ADC	adenocarcinoma
ALK	anaplasztikus limfóma kináz
CEA	karcinoembrionális antigén
CYFRA 21-1	cytokeratin 19 fragments
DFS	disease free survival/eseménymentes túlélés
DM	szimmetrikus dimetilációjának
EBUS	endobronchialis ultrahang
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EML4	echinoderm microtubule-associated protein-like/tüskésbőrűek mikrotubulus-asszociált fehérjéjéhez hasonló
EGF	Epidermal Growth Factor/epidermális növekedési faktor
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
EKG	elektrokardiogram
EMT	epiteliális-mezenchimális átmenet
ESMO	European Society for Medical Oncology
FEV1	forszírozott kilégzési térfogat az 1. másodpercben
FDG	18F-fluorodeoxyglucose/18F-fluorodezoxiglükóz
fVB	funkcionális virtuális bronchoszkópia
GAPDH	gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
HCC	hepatocellularis carcinoma
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
ICI	immunellenőrző pont-gátló/immuncheckpoint-inhibitor
IHC	immunhisztokémia
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue
KRT	kemo-radioterápia
LDCT	alacsony dózisú komputertomográfia
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MEP50	metiloszóma protein 50
MI	kölcsönös információ
MP	miozin foszfatáz
MSC	mediastinoscopia
MYPT1	miozin foszfatáz szabályozó alegység 1
NF- κB	nukleáris faktor- κ B/nuclear factor- κ B
NSCLC	nem kissejtes tüdőrák/non-small cell lung cancer
NSE	neuron specifikus enoláz
NTRK	neurotrophic tyrosine receptor kinase
OS	teljes túlélés/overall survival
OTT	multidiszciplináris onkológiai team
PAH	policiklusos aromás szénhidrogén
PD-L1	programmed death ligand 1/programozott halál ligand 1
PET-CT	pozitron emissziós tomográfia-computer tomográfia
PORT	post-operative radiotherapy/műtétet követő sugárkezelés
PP1C	protein-foszfatáz-1 katalitikus alegység (miozin foszfatáz alegysége)
PPM1B	Mg ²⁺ -függő protein-foszfatáz 1B
PRMT5	protein arginin metiltranszferáz 5
ProGRP	progastrin-releasing peptide/progastrin felszabadító fehérje
PTM	poszttranszlációs módosítás

RB1	retinoblasztóma gén
RET	rearranged during transfection
ROK	RhoA-associaált protein kináz
ROS1	c-ros oncogene 1
SAM	S-adenozil-metionin
SBRT	Stereotactic Body Radiation Therapy/ sztereotaxiás testbesugárzás
SDS-PAGE	nátrium dodecil szulfát – Poliakrilamid gélelektroforézis
SCC	squamous cell carcinom/laphámcarcinoma
SCLC	small cell lung cancer/kissejtes tüdőrák
UH	ultrahang vizsgálat
TMB	tumor mutációs terheltség/tumor mutation burden
TTB	transztorakális tübiopszia
VATS	video asszisztált thoracoszkópia
VB	virtuális bronchoszkópia

Bevezetés

Napjainkban a tüdőrák az egyik legmagasabb incidenciát mutató daganattípus (Thandra és mtsai, 2021). Annak ellenére, hogy a diagnosztika és a kezelés terén is rendkívüli fejlődés tapasztalható, az elmúlt években a tüdőrák öt éves túlélése csak kevésbé mutat emelkedést (Siegel és mtsai, 2019). A szerény túlélés oka összetett lehet. A tüdőrák alacsony radiológiai kettőződési ideje mindenképpen hozzájárulhat ehhez, valamint az is, hogy klinikai tüneteket is inkább csak előrehaladott állapotban okoz (Usuda és mtsai, 1994). Ilyen tulajdonságokkal rendelkező daganattípus esetén a szűrés rendkívül nehezen megoldható, kiterjesztett lakossági szűrése jelenünkben lehetetlen (Pastorino és mtsai, 2019). Hazánkban a betegek 35,1 %-a már a diagnózis pillanatában metasztatikus betegségben szenved (Kenessey és mtsai, 2024).

A korábbi évtizedek kitartó kutatómunkájának köszönhetően világossá vált, hogy a rosszindulatú daganatok kialakulásában nemcsak szomatikus mutációknak van szerepe, hanem az epigenetikai szabályozás rendellenességeinek, finom egyensúlyának felborulásának is. Ezek közül egyik metiláció, mely a hiszton fehérjéken is végbe mehet (Du és mtsai, 2021). A protein arginin metiltranszferáz 5 (PRMT5) a hiszton fehérjék arginin oldalláncainak szimmetrikus dimetilációját katalizálja, mely általában gének transzkripciója szempontjából repressziót jelent, sok esetben a tumorsuppresszor génekét, többek között a TP53-ét vagy a retinoblasztómáét (Motolani és mtsai, 2021). Kutatócsoportunk korábbi munkája során bizonyította, hogy a PRMT5 egyik Thr80 oldallancának foszforilációja növeli az enzim aktivitását, ennek defoszforilációja a miozin foszfatáz (MP) által csökkenti az aktivitását. Az MP szabályozó alegységét (MYPT1) számos protein kináz enzim foszforilálhatja, ami csökkenti az MP aktivitását. Ezt az útvonalat hepatocellularis carcinoma (HCC) sejtekben figyelték meg (Sipos és mtsai, 2017). Az MP gátló foszforilációit a Mg^{2+} -függő protein-foszfatáz 1B (PPM1B) enzim képes defoszforilálni, visszaadva indirekt tumorelles hatását. Ezen enzim

expressziója daganatokban, például cervix carcinomában csökken, mely hozzájárulhat a daganatképződéshez (Keller és mtsai, 2025).

Számos technikai fejlesztésnek köszönhetően a tüdőrák diagnosztika sokat fejlődött, azonban a kivizsgálása még mindig elég hosszúra nyúlhat (Marc Malovrh és Adamic, 2024). A tüdőbiopsziák kivitelezése sokszor nehézségekbe ütközik. Egyes elváltozások nehezen hozzáférhetők, és a szövettani diagnózishoz gyakran csak magas kockázatú beavatkozásokkal juthatunk, mint például a transthoracalis tübiopszia (TTB). Ezért a mintavételeket segítő fejlesztések iránt a tüdőgyógyászat igénye állandó. A szövettani mintavételek közül a lekisebb rizikóval a bronchoszkópia jár, így kézenfekvő, hogy ezen módszer a találati arányának növelése mindenképpen célszerű. Ezt mind a pozitron emissziós tomográfia-computer tomográfia (PET-CT), mind a virtuális bronchoszkópia (VB) elősegítheti. Vizsgálatok már korábban is irányultak arra, hogy e két technika egyesítése jelentősen asszisztálhatja a bronchológus munkáját (Herbrik és mtsai, 2011). Egy olyan vizsgálatban is volt alkalmam részt venni, mely a PET-CT alapú virtuális bronchoscopos technika továbbfejlesztésével foglalkozott.

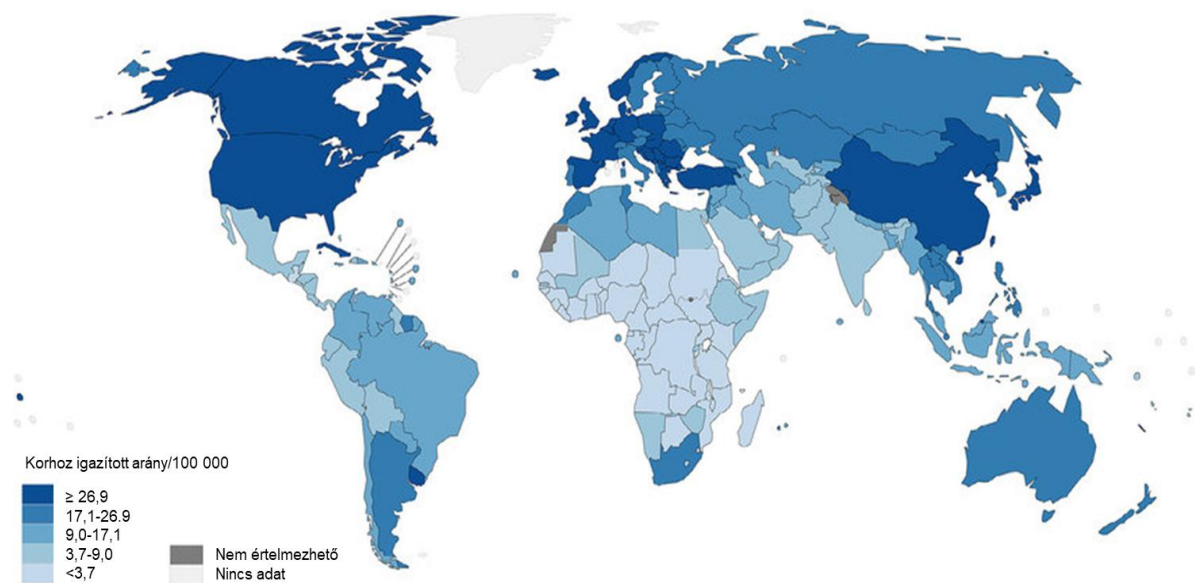
Munkánk célja tehát az volt, hogy a PPM1B/MP/PRMT5/Hisztón útvonal daganat keletkezésében betöltött szerepét a tüdődaganatok esetében is megvizsgáljuk. Reményeink szerint ezen útvonal a jövőben diagnosztikus markerek vagy terápiás célpontok fejlesztésének alapja lehet. További célkitűzésünk volt a funkcionális virtuális bronchoszkópia során a HDCT-PET regisztráció pontosságának objektív és automatizált validációjának fejlesztése.

Irodalmi áttekintés

A tüdőrák diagnosztikájának és kezelésének kihívásai napjainkban

Epidemiológia

A tüdőrák az egyik legelterjedtebb daganat típus világszerte. 2018-ban az összes frissen diagnosztizált rosszindulatú daganat körülbelül 12%-át tette ki, ami kb. 2,094 millió új esetet jelentett globálisan (1. ábra). A férfiak körében a tüdőrák volt a második leggyakrabban diagnosztizált daganattípus, körülbelül 1,369 millió esettel, a prosztatatarák után. A nőknél szintén a második leggyakoribb volt, megközelítőleg 725 000 esettel, az emlőrák után (Thandra és mtsai, 2021).



1. ábra: Becsült, kor szerint standardizált incidencia arányok (világviszonylatban). 2020-ban, tüdőrák, mindkét nem, minden életkorban. Az adatok forrása: GLOBOCAN 2020; Graph production: IARC (<http://gco.iarc.fr/today>) Word Health Organization.

A tüdőrákos megbetegedések gyakorisága földrajzilag nem homogén. Az európai adatok is ezt mutatják: például Közép- és Kelet-Európában a férfiaknál 100000 lakosra vetítve 49,3 új esetet diagnosztizáltak, míg az észak-európai nőknél ez az érték csaknem fele, 26,9 új eset/100000 lakos volt (Schabath és Cote, 2019). Ezek az adatok elsősorban nagyságrendi

Hazánkban 2024-ben a hörgőrák incidenciája 36,6 szízezrelék volt, 3506 új beteget regisztráltak, eloszlása vármegyénként a 2. ábrán látható. A tüdőrák prevalenciája 2024-ben 203 szízezrelék volt, mely 19486 regisztrált beteget jelentett (Korányi Bulletin, 1. szám, Tüdőrák fejezet, 2025).



A rendelkezésre álló modern kezelési lehetőségek, mint például az immunellenőrzőpont-gátlók (ICI) és a célzott terápiák, ellenére a tüdőrákos betegek túlélése rendkívül rossz. Az általános túlélési arány körülbelül 19%, azonban jelentős különbség van az egyes altípusok között: a nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) esetében 23%, míg a kissejtes tüdőrák (SCLC) esetében mindössze 6% (Siegel és mtsai, 2019).

8

Tüdőrák fejezet 2025). Hazai halálozási adataink magasabbak a nyugat-európai országokhoz viszonyítva (Bogos és mtsai, 2019).

Szűrés

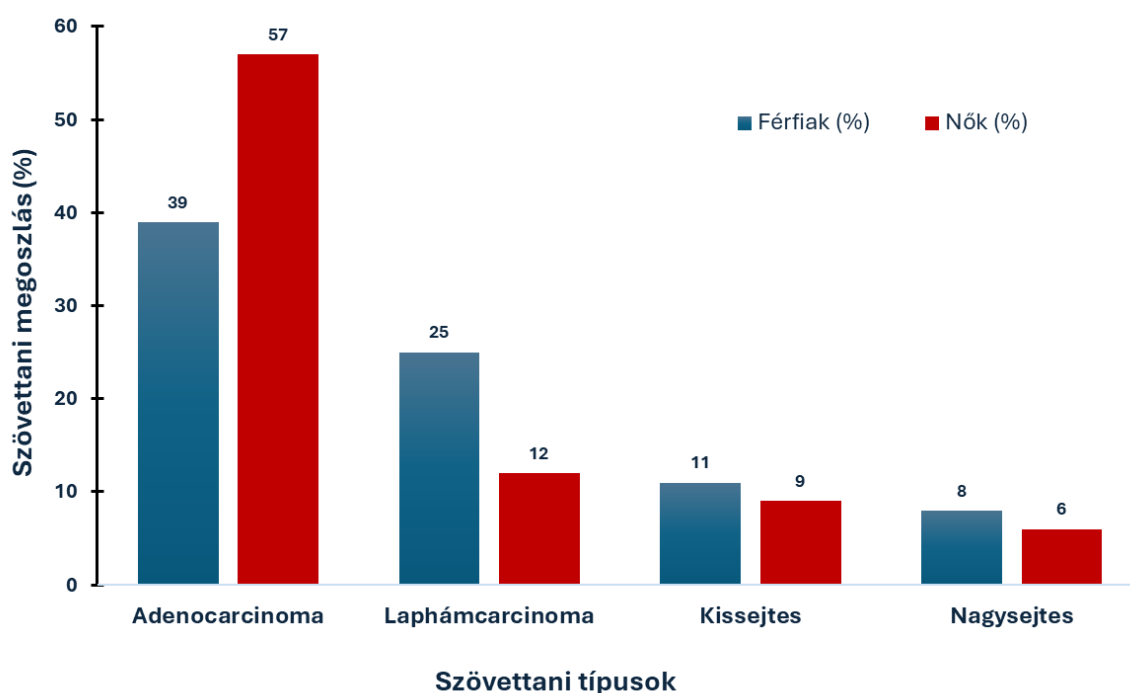
Magyarországon a betegek jelentős része IV. stádiumban kerül felfedezésre, ezt pontosabban 2018-ban 35,1%-nak találták egy tanulmány során (Kenessey és mtsai, 2024). Ennek egyik oka lehet a tüdőrák rendkívül gyorsan növekvő tulajdonsága, radiológiai kettőződési ideje 30 és 500 nap között változhat (Usuda és mtsai, 1994). A fentiekből következik, hogy az éves szintű lakossági szűrés nem megoldható. A rizikócsoportok szűrése történik alacsony dózisú CT-vel (LDCT), azonban ez sem mindenütt rutinszerű, hazánkban is még a kialakítása zajlik a HUNCHEST program keretein belül (Kerpel-Fronius és Bogos, 2024). A mortalitást csökkentő eredményességéről igen eltérőek egyes kutatócsoportok véleményei. Egy német kutatócsoport például nem talált jelentős halálozást csökkentő hatást az LDCT-szűrés esetében az ötéves időszak alatt (Becker és mtsai, 2020). Ezzel szemben a European Society for Medical Oncology (ESMO) munkacsoport MILD vizsgálata szerint az LDCT-szűrés 39%-kal csökkentette a tüdőrák által okozott halálozást (Pastorino és mtsai, 2019).

Szövettani típusok

Napjainkban a WHO által 2015-ben kiadott szövettani klasszifikációja van még érvényben, mely a 2004-es kiadás felülvizsgálata. Jelentős újítása volt, hogy az egyes altípusokat nem csak a morfológia, hanem molekuláris biológiai vizsgálatok alapján különítik el (Travis és mtsai, 2015).

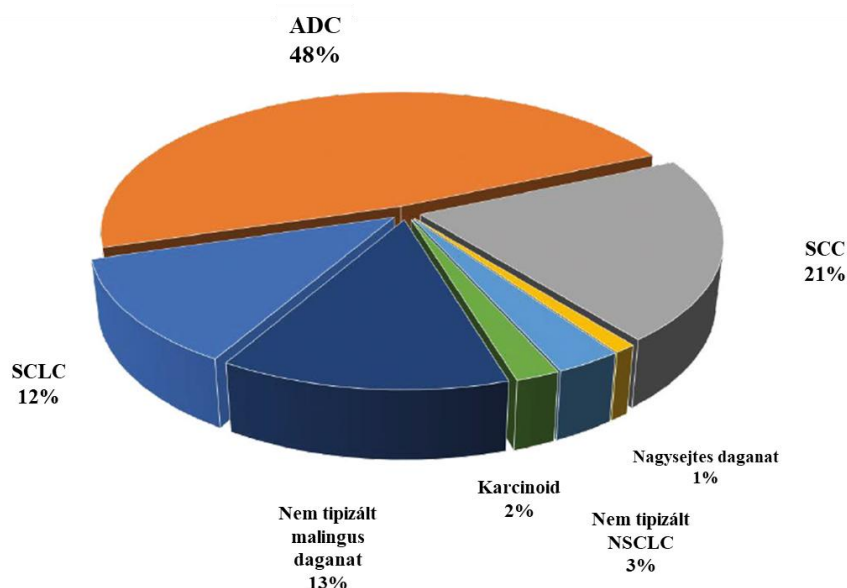
A szövettani klasszifikáció részletes bemutatása jelen munka kereteit meghaladná, így csupán a főbb csoportokat kerülnek összefoglalásra. A tüdőrák két fő típusra osztható: kissejtes tüdőrákra (SCLC), mely az esetek kb. 15%-át, és nem kissejtes tüdőrákra (NSCLC), mely a

tüdőrákos esetek 85%-t jelenti. Az NSCLC leggyakoribb szövettani altípusai közé tartozik az adenocarcinoma, a laphámsejtes carcinoma és a nagysejtes carcinoma. A 2020-as GLOBOCAN adatok szerint az új esetek 39%-a adenocarcinoma, 25%-a laphámcarcinoma, 11%-a kissejtes, 8%-a nagysejtes carcinoma volt a férfiak körében. Nők esetében az új esetek 57%-a volt adenocarcinoma, 12%-a laphámcarcinoma, 9%-a kissejtes és 6%-a nagysejtes carcinoma volt (Zhang és mtsai, 2023). Az adatokat a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra: A tüdőrák szövettani típusainak megoszlása. A főbb szövettani típusok megoszlása látható százalékos arányban megadva. A kék oszlopok a férfiak, a piros a nőkre vonatkozó arányokat jelenítik meg. Az adatok 2020-as Globocan adatok új eseteire vonatkoznak. Az ábra a forrásként felhasznált folyóirat cikk eredményei alapján készült Microsoft Excel program segítségével. (Zhang, Y., S. Vaccarella, E. Morgan, M. Li, J. Etcheberry, E. Chokunonga, S. S. Manraj, B. Kamate, A. Omonisi and F. Bray (2023). "Global variations in lung cancer incidence by histological subtype in 2020: a population-based study." *Lancet Oncol* 24(11): 1206-1218.)

A hazai adatok a szövettani típusok megoszlásáról kissé eltérnek a globális adatoktól. Ezt a 4. ábra szemlélteti. A tüdőrák főbb szövettani típusainak metszeteit a 5. ábra mutatja.



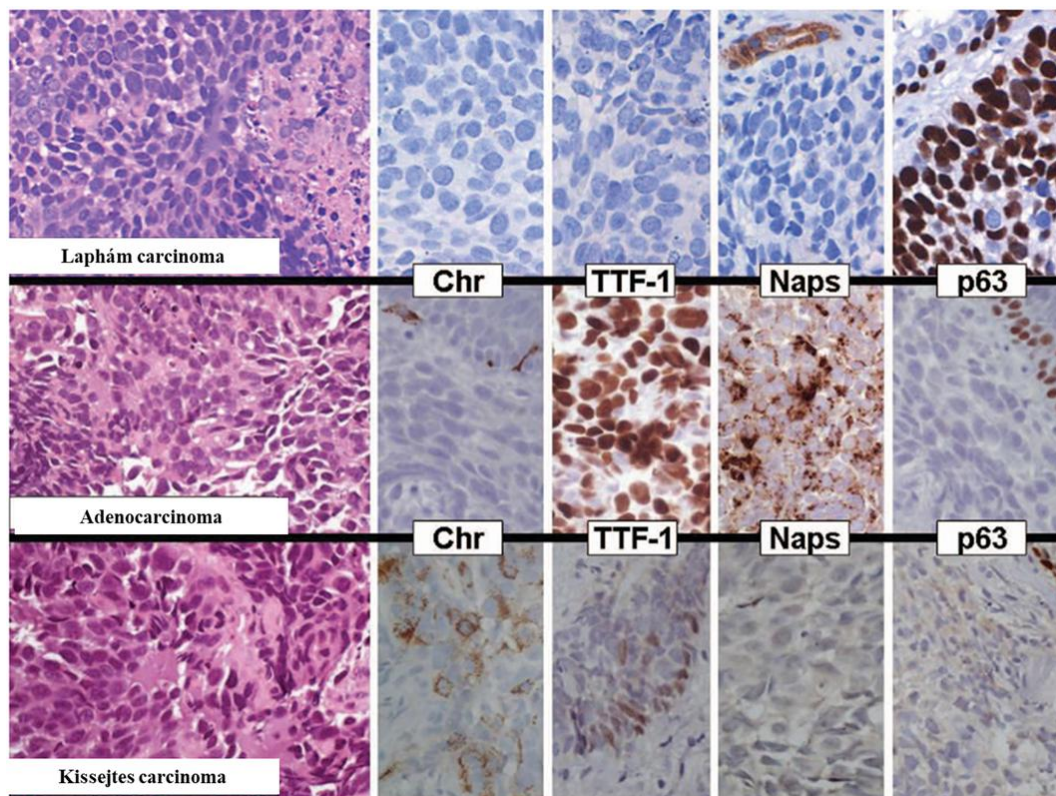
4. ábra Az új esetek sejttípus szerinti megoszlása a 2024-es adatok alapján, a *Korányi Bulletin* 2025. 1. számában szereplő ábra. ADC: adenocarcinoma (48%), SCC: laphám carcinoma (21%), SCLC: kissejtes carcinoma (12%), Nem tipizált malignus daganat 13%, a tüdő karcinoid daganatai 2%, Nem tipizált NSCLC: nem tipizált nem kissejtes tüdőrák 3% és Nagysejtes daganat 1%.

Az adenocarcinoma (ADC) mirigyeket, papilláris struktúrákat és tömöttebb mucin termelő részeket tartalmaz. A mucint PAS (perjódsav-Schiff) festéssel is ki lehet mutatni. Általában a tüdőmező periferiás részein jellemző megjelenésük. Ezen típusú daganat terjedhet az interstitium inváziója, károsítása nélkül az alveolaris felszínnel párhuzamosan, a tüdőstruktúra mentén, lepidikusan. Hegesedésre hasonlító jeleket is mutathat, mely esetben nem egyértelmű, hogy korábbi hegesedésről van-e szó vagy a daganat okozza-e (Losonczy és mtsai, 2020).

A szövettani diagnosztika során figyelembe kell venni azt is, hogy az adenocarcinomáknak lehet mucint nem termelő, vagyis szolid típusa, melyet morfológiailag nehéz megkülönböztetni néhány laphám carcinómától, így a differenciáldiagnosztika szempontjából szükség van immunhisztokémiai vizsgálatra (IHC) is. Az adenocarcinomára jellemző markerek a Thyroid Transcription Factor-1 (TTF1) és a Napsin A (Travis és mtsai, 2015).

A laphám carcinomát jellemzi a keratinképződés és intercellularis junkciók (tüskék). Általában centrális elhelyezkedésűek. A tüődaganatok között a legkevésbé agresszív típus (Losonczy és mtsai, 2020). Három fő típusa van a keratin termelő, a nem keratin termelő és a

basaloid típus. A nem keratin termelő forma a szövettani diagnosztika során IHC vizsgálat is szükséges a pontos diagnózis felállításához. Jellemző markerei a p40 és a p63 (Travis és mtsai, 2015).



5. ábra: A főbb szövettani típusok metszetei, a differenciáldiagnosztikához szükséges markerekkel. Az egyes típusokra jellemző markerek kombinációit a szövegben részleteztük. A kép forrása: Rossi, G., Pelosi, G., Barbareschi, M., Graziano, P., Cavazza, A., & Papotti, M.G. (2013). Subtyping Non-Small Cell Lung Cancer. *International Journal of Surgical Pathology*, 21, 326 - 336. (Rossi és mtsai, 2013)

Az SCLC apró, ovális, kevés citoplazmával rendelkező sejtekből áll, melyek fészkekben helyezkednek el egymás mellett, mitózis is gyakran látható. Zabszemekhez is hasonlították a sejtek megjelenését. A legrosszabb prognózisú daganatok közé tartozik, intenzív metasztatizáló hajlammal. Kezelés nélkül medián túlélése 3 hónap (Losonczy és mtsai, 2020). Az aktuális szövettani klasszifikáció szerint high grade neuroendocrin tumornak felel. Az alacsonyabb grádusú neuroendocrin tumoroktól való elkülönítésben a Ki 67 proliferációs index a legnagyobb segítség (Travis és mtsai, 2015).

A nagysejtes carcinoma morfológiát tekintve nem mutat elszarusodást, mirigy irányú differenciáltságot, valamint nyáktermelést sem. Jelentősen nagy a citoplazma nagysága és

prominensek a sejtmagvak (Losonczy és mtsai, 2020). Az alacsonyan differenciált típusú daganatok, úgynevezett null-immunfenotípusúak, tehát nem rendelkeznek pneumocytá (pl. Thyroid Transcription Factor-1), laphám (pl. p40), sem neuroendocorin IHC markerekkel (pl. chromogranin, synaptophysin, CD56) (Travis és mtsai, 2015).

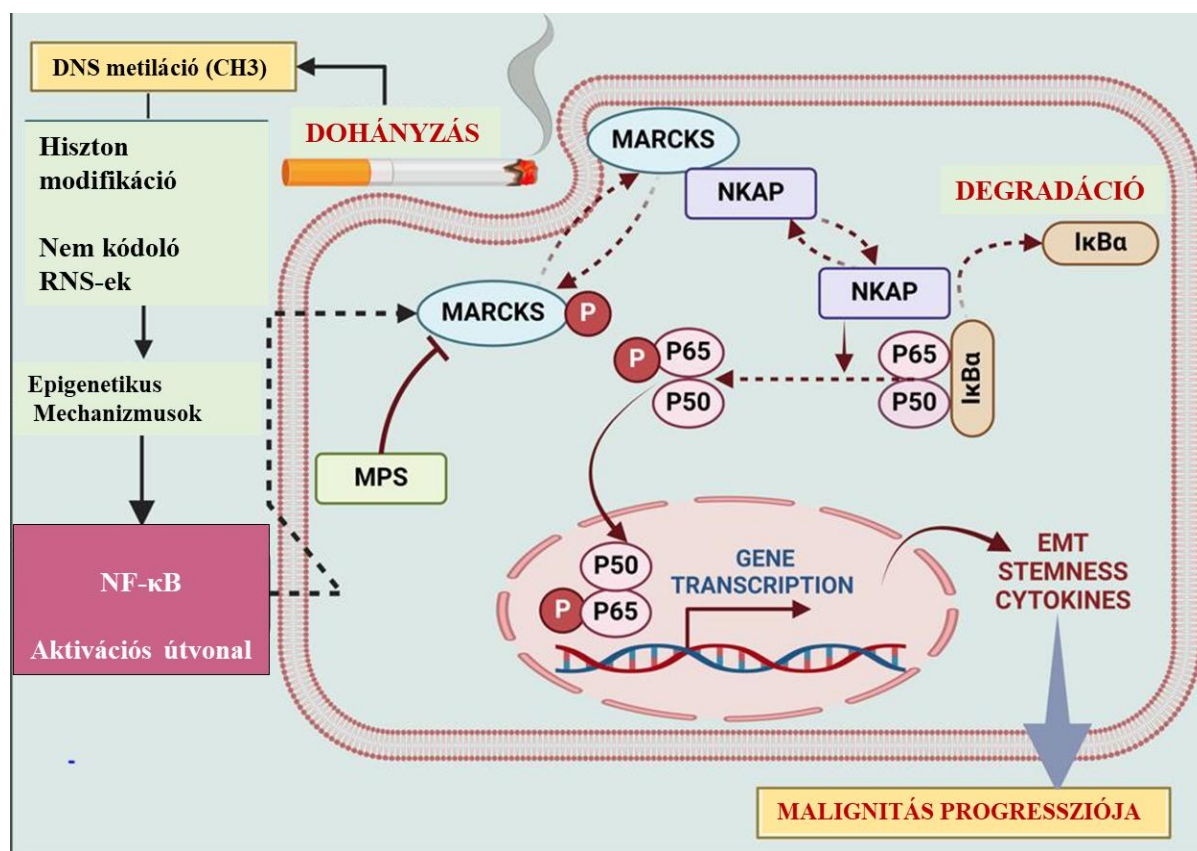
Etiológia

A tüdőrák fő etiológiai tényezője mai legjobb tudásunk szerint a dohányzás, az esetek 85%-ában lehet etiológiai tényezőnek tekinteni (de Sousa és Carvalho, 2018). Ez megelőzhető és elkerülhető ok lenne, ennek ellenére világszerte a lakosság átlagosan naponta 15 milliárd szál cigarettát szív el. A cigarettafüst körülbelül 4000 kémiai anyagot tartalmaz, melyek közül legalább 70 karcinogén, így számos mechanizmus útján járul hozzá a tüdőrák kialakulásához (Losonczy és mtsai, 2020). Közülük igen ismertek már a policiklusos aromás szénhidrogén molekulák, melyek reaktív metabolitokká történő átalakulását követően reakcióba lépnek a DNS-el génmutációkat okozva például a TP53 génben, de DNS metiláción, a hiszton módosításokon keresztül is hozzájárulnak a carcinogenezishez (Berg és mtsai, 2023). A szennyezett levegő belégzése útján is találkozunk rengeteg karcinogén anyaggal (Berg és mtsai, 2023).

Az általuk okozott oxidatív stressz során reaktív oxigén molekulák keletkeznek, melyek DNS-károsodást okoznak, amely gyulladásos jelátviteli kaszkádokat indít be, későbbiekben krónikus gyulladást okozva és tartva fenn (Addissouky és mtsai, 2024). Az egyik ilyen az nukleáris faktor kappa B (NF- κ B) útvonal, melynek működése kifejezett fokozódik dohányosokban (6. ábra).

Az NF- κ B jelátviteli út aktiválódásának szerteágazó epigenetikai hatásai lehetnek. Az egyik ilyen a DNS-metiláció mintázatának megváltozása, amely az NF- κ B és a DNS-metiltranszferázok közötti kölcsönhatás következménye lehet. Ennek során tumorszuppresszor

gének hipermetilációja és onkogének hipometilációja alakulhat ki. Az NF- κ B továbbá fokozhatja a hiszton-acetilációt bizonyos génpromótereken, ezáltal növelve proinflammatorikus citokinek és más onkogén tényezők expresszióját. Emellett az NF- κ B számos olyan mikroRNS expresszióját is modulálhatja, amelyek onkogénként működnek. Példaként említhető a miR-21 fokozott expressziója, amely tumorszuppresszor gének (pl. PTEN) downregulációját eredményezi, ezáltal fokozva a sejtek proliferációs képességét. (Thapa és mtsai, 2024)



6. ábra: Az NF- κ B útvonal aktiválódása dohányzás hatására, mely hozzájárul a tüdőrák kialakulásához. NF- κ B: nukleáris faktor kappa B, MARCKS: myrisztoilezett alanin-gazdag C-kináz szubsztrát, NKAP: NF- κ B aktiváló fehérje, I κ B α : kappa B gátló alfa, P50/P65: az NF- κ B komplex alegységei, MPS-peptid: MARCKS-foszforiláció gátló peptid, EMT: epiteliális-mezenchimális átmenet, CH₃ / DNS-metiláció: DNS-metiláció, ncRNS: nem kódoló RNS-ek. (Thapa és mtsai, 2024)

A myrisztoilezett alanin-gazdag C-kináz szubsztrát (MARCKS) és az NF- κ B aktiváló fehérje (NKAP) fehérjék szabályozó szerepe van a kappa B gátló alfa (I κ B α) lebomlásában, melyet foszforilációjuk és kölcsönhatásaik révén segítenek elő. Mindez lehetővé teszi az NF- κ B alegységek (p50 és p65) sejtmagba jutását, ahol komplex formájában génátírást indítanak el. A

folyamat következménye az epiteliális-mezenchimális átmenet (EMT) és az összejt-szerű tulajdonságok fokozódása és különféle citokinek termelése. Ezek a változások együttesen hozzájárulnak a malignus transzformációhoz és a tüdőrák progressziójához (Thapa és mtsai, 2024).

A dohányfüst közvetlen károsító hatásai mellett bizonyos genetikai hajlamosító tényezőknek is lehet jelentőségük. Az egyik ilyen a Glutathion S-transferáz Mu 1 gén deléciója (ún. null genotípus), mely fennállása esetén a dohányfüstnek való kitettség jelentősen növeli a tüdőrák kialakulásának kockázatát (Y. Wang és mtsai, 2023).

Az azbesztexpozíció is jól ismert etiológiai tényező a malignus mesothelioma esetén, azonban a hörgőrák kialakulásában is jelentős szerepe van (van Zandwijk és mtsai, 2024). Dohányzással együttes fennállása a karcinogenezisben szinergista hatású, a hörgőrák megjelenésének kockázatát 100-szorosára is emelheti (Kwak és mtsai, 2022). A radon expozíció a tüdőrák etiológiai tényezői közé tartozik, egy kanadai tanulmány szerint a hörgőrák incidenciájának akár 7%-át is kiteheti (Villeneuve és mtsai, 2024).

Pathogenezisben szerepet játszó genetikai eltérések

A carcinogenezis egy többlépcsős, összetett folyamat, mely során az etiológiai tényezők hatására olyan változások mennek végbe az egészséges sejtekben (pl. genetikai mutációk sokasága), melyek végül malignus transzformációt okoznak. Ugyanazon daganaton belüli genetikai heterogenitás, mely akár 30% is lehet, nagyban elősegíti/felgyorsíthatja a tumor evolúcióját és a gyógyszer rezisztencia kialakulását is (Jamal-Hanjani és mtsai, 2017).

Legismertebb és legrégebben kutatott eltérések a sejtciklus szabályozó gének mutációinak szerepe a carcinogenezisben. A TP53 gén által kódolt p53 fehérje szekvenciaspecifikus transzkripciós faktor, működésének eredménye lehet a sejtciklus megállítása és a károsodott DNS javítása, apoptózis (sejthalál), sejttöredés, anyagcsere-változások vagy autofágia is. A klasszikus tumorszuppresszor funkciók elvesztése mellett mindkét mutáció típus képes

funkciónyeréses fenotípusokat is előidézni, elindítani a tumoros transzformációt (Gibbons és mtsai, 2014).

A másik legismertebb és a tüdőrák szempontjából jelentős eltérés a retinoblasztóma tumorsuppresszor gén (RB1) mutációja. Az RB1 mutációt az NSCLC-s betegek 8,2%-ánál azonosították, rossz prognózist jelent. Ezzel szemben az SCLC-s betegcsoportban az RB1 mutáció az esetek 75%-ában volt jelen (Bhateja és mtsai, 2019).

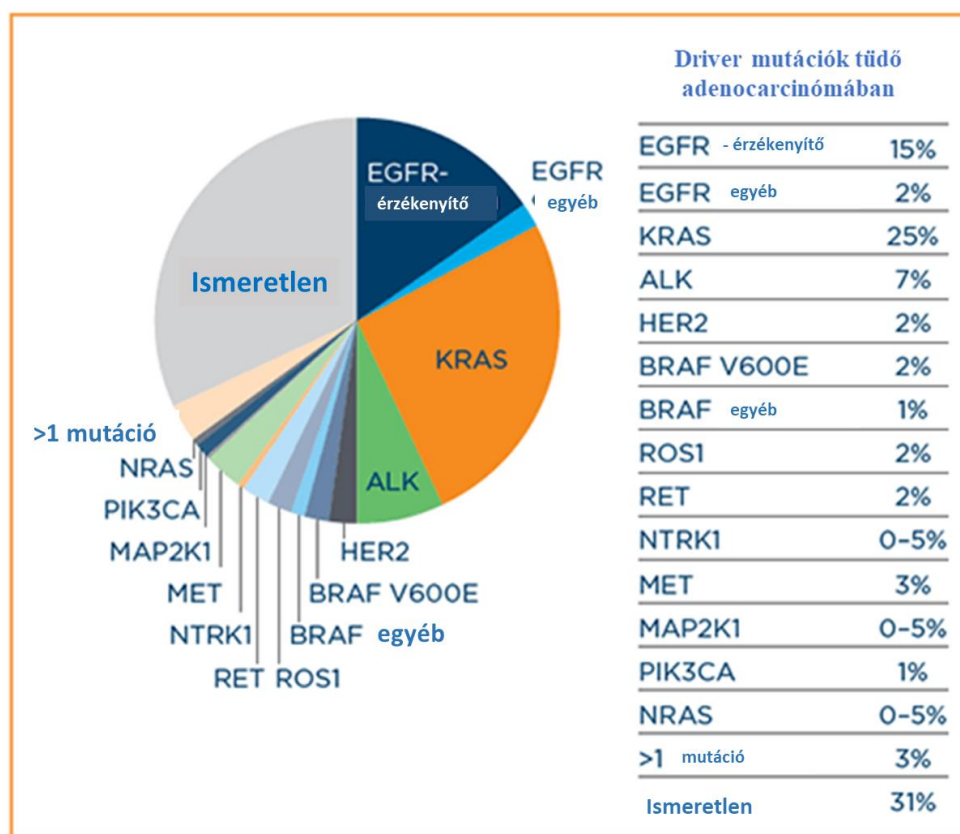
Tüdőrákokban gyakori a 3p deléció is, mely érinti a FHIT tumorsuppresszor gént is, ennek következtében az általa kódolt fehérje gyakran inaktiválódik NSCLC esetén. A 9p deléciók is gyakoriak hörgőrák esetén. Például ciklin-függő kináz gátló fehérjéket kódoló génekben (pl. p15, p16). A p16 tumorsuppresszor gén inaktivációja inkább NSCLC-ben megfigyelhető, SCC esetén szinte sohasem (Losonczy és mtsai, 2020).

A c-MYC klasszikus protoonkogén által kódolt transzkripciós faktorként működő fehérjének a normális sejtekben rengeteg sejtosztódásra és fejlődésre vonatkozó hatása van. Amennyiben mutáció következik be, ez általában fokozott expressziót jelent, már kétszeres szintnél is megfigyelhető a korlátlan sejtosztódás. Szerepe van továbbá gyógyszer rezisztencia (pl. efflux-pumpa mechanizmus) kialakításában és a metasztázis képzésben is (Wallbillich és Lu, 2023).

A tumorban napjainkban már lehetséges a szomatikus mutációk összességének meghatározása, ezt tumor mutációs terheltségnek nevezzük (TMB). NSCLC esetén ez az érték magas lehet, ez sokféle neoantigén keletkezésével jár, mely prognosztikus markere az immun-checkpoint inhibitor terápiák (pl. PD-1, PD-L1 gátlók) sikerességnek (Sholl és mtsai, 2020).

A fentiekben tárgyalt eltérések mellett vannak még fontos mutációk, melyek nagyban hozzájárulnak a hörgőrák kialakulásához és növekedéséhez. Tekintettel arra, hogy mutációkkal rendelkező betegek már törzskönyvezett célzott terápiát kaphatnak, ezeket „druggable” mutációknak nevezzük. Általában „driver” mutációk is, mivel a daganat növekedés

előidőzésében és fenntartásában kulcsszerepet játszanak, ők a fő hajtóerő ez esetben, driverei a folyamatnak (7. ábra). A carcinogenezisben betöltött szerepük alapján ezek a gének mind protoonkogének. Ezen mutációk inkább az adenocarcinómák esetén gyakoriak, illetve inkább ebben a szövettani típusban van terápiás konzekvenciájuk (Fois és mtsai, 2021).



7. ábra: Driver mutációk megoszlása a tüdő adenocarcinómában. K-RAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue; EGFR: epidermális növekedési faktor receptor; ALK: anaplastic lymphoma kinase; BRAF: B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; ROS1: c-ROS oncogene 1; RET: REarranged during Transfection; NTRK1: NeuroTrophic Tyrosine Receptor Kinase 1; MET: Mesenchymal-Epithelial Transition; MAP2K1: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1; PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha; NRAS: Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog. Forrás: <https://www.lungevity.org/lung-cancer-basics/types-of-lung-cancer>

A leggyakoribb a Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue (KRAS) aktiváló mutációi, 20-30%-ban fordulnak elő, közülük a KRAS p.G12C pontmutációja a leggyakoribb NSCLC-ben, és körülbelül az esetek 13%-ában fordul elő az adenocarcinómákban (Jänne és mtsai, 2022; Skoulidis és mtsai, 2021).

A második leggyakoribb az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) gén aktiváló mutációi NSCLC esetén a kaukázusi betegek 10-20%-ánál, valamint az ázsiai betegek legalább 50%-ánál fordulnak elő. Két mutáció, a 19-es exon deléciói és a 21-es exonban található L858R, gyakran úgynevezett „klasszikus” EGFR mutációként ismert, az EGFR mutációk körülbelül 85%-át teszik ki. A fennmaradó 15%-ot az ún. ritka mutációk alkotják ezek közé tartoznak pontmutációk, deléciók és inszerciók az EGFR gén 18-25. exonjaiban (pl. S768I, L861Q és G719X pontmutációk). A célzott terápia mellett gyakran alakulnak ki rezisztencia mutációk, a leggyakoribb a T790M kialakulása (kb. 60%-ban) (Harrison és mtsai, 2020).

Aktiváló BRAF-mutációkat NSCLC betegek 1,5-4,5%-ánál mutatnak ki (Abdayem és Planchard, 2022).

Az NSCLC-ben szenvedő betegek körülbelül 5%-ánál fordul elő ALK (anaplastic lymphoma kinase) átrendeződés, transzlokációi során többféle fúziós gén alakulhat ki. Az egyik ilyen az EML4-ALK fúziós fehérje, mely alapvető szerepet játszik a tüdőparenchyma rosszindulatú átalakulásában (Lengyel és mtsai, 2023).

A c-ros oncogene 1 (ROS1) protoonkogén tirozin-receptor kináz aktivitású fehérjét kódol. A ROS1-et érintő génátrendeződések konstitutívan aktív fúziós onkoproteinekhez vezethetnek. Ritka mutációk, NSCLC tumorok 1-2%-ában vannak jelen (Drilon és mtsai, 2022).

A neurotrophic tyrosine receptor kinase (NTRK) fúziók szerepe az NSCLC- ben 2018. óta ismert, ezek tirozin-kináz receptorokat kódolnak. Az NTRK gének összeolvadásának következményeként létrejövő onkoproteinek ligandum független, konstitutív aktivációval rendelkeznek. Az NTRK 0,2% előfordulású tüdőrákban (Harada és mtsai, 2021).

RET (rearranged during transfection) protoonkogén, mely transzmembrán tirozin-kináz fehérjéket kódol, kóros működés pontmutáció vagy fúzió által jelenik meg. Ritka előfordulású, 1-2%-ban van jelen (Spitaleri és mtsai, 2024).

Fontos megemlíteni a human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) mutációt is, mely szintén szerepet játszik a tüdőrák kialakulásában. Bár a mutáció ritkább, mint emlőrák esetén, célzott terápiás lehetőség elérhető azoknál a betegeknél, akik ezt a mutációt hordozzák. (B. T. Li és mtsai, 2022).

gén	carcinogenezisben betöltött szerep
TP53	tumorsuppresszor
retinoblasztóma (RB1)	tumorsuppresszor
FITH (3p deléció)	tumorsuppresszor
p16 (9p deléció)	tumorsuppresszor
c-MYC	protoonkogén
driver mutációk (K-RAS, EGFR, BRAF, ALK, ROS1, NTRK, RET, HER2)	protoonkogének

1. táblázat: A pathogenezisben szerepet játszó gének carcinogenezisben betöltött szerepének összefoglalása. Az egyes gének tulajdonságai a szövegben részletezve.

Pathogenezisben szerepet játszó epigenetikai eltérések

A daganatos transzformáció közben számos jelátviteli esemény zajlik, amelyeket a poszttranszlációs módosítások (PTM) átfogó rendszere szabályoz, ezek leggyakrabban acetilációk, metilációk, foszforilációk és ubiquitinációk lehetnek (Swain és mtsai, 2019).

A fehérjék metilációjának szerepe igen intenzíven kutatott terület napjainkban. Mind a hiszton fehérjék (Markouli és mtsai, 2021), mind a nem-hiszton fehérjék metilációjának fontos szerepe van transzkripció és az RNS-anyagcsere szabályozásában, valamint a DNS-károsodás javításának koordinálásában (Swain és mtsai, 2019).

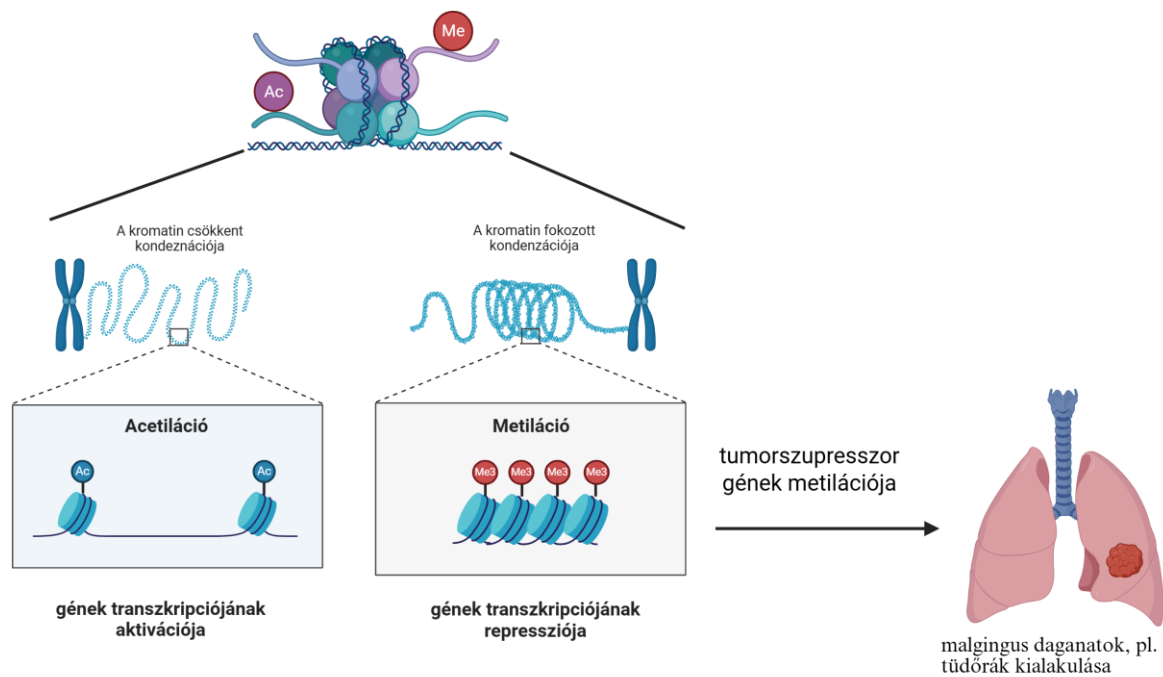
A fehérjék foszforilációja az egyik legjelentősebb PTM, fontos sejtszintű szabályozó mechanizmus. Számos enzim és receptor működése foszforilációs és defoszforilációs események által módosítható. Jelentős szerepük van a fehérjeszintézis, a sejtosztódás, a

jelátvitel, a sejtnövekedés, a fejlődés és a sejtöregedés szabályozásában. A kináz enzimek overexpressziója vagy működésbeli hibája számos betegségben, főként daganatokban megfigyelhető (Swain és mtsai, 2019).

Hisztionok

A hisztonok a kromatin felépítésében részt vevő fehérjék fő csoportját alkotják. Két fő típusuk van, core és linker hisztonok. Ezeket szerkezetük és funkciójuk alapján csoportosíthatunk (Cheema és Ausió, 2015). A core hiszton fehérjék (H2A, H2B, H3 és H4) 100-140 aminosavból állnak, melyek szerkezetileg hiszton redő doménbe rendeződnek (histone fold domain, HFD), ezt belső rendezetlenséget mutató N- és C- terminális régiók határolnak. A H3 és H4 fehérjék esetén a C-terminális régiók rövidek (3-8 aminosavból állnak). Ezen hisztonok köré 200 bázispár hosszú DNS tekeredik, létrehozva a nukleosómát (Cheema és Ausió, 2015). A nukleosómák a kromatin szálon belül linker DNS-szakaszon keresztül kapcsolódnak egymáshoz, melyekhez a linker hisztonok (H1 család) kapcsolódnak, 200-400 aminosavból álló fehérjék. Fontos szerepük van a kromatinszál térbeli feletekerekedésének szabályozásában (Cheema és Ausió, 2015). Tehát a DNS és a kromatin megfelelő hajtogatódása a hisztonok épségétől, stabilizálásától és kondenzációjától függ. A fokozott kondenzáció a génrepressziót jelent, míg a csökkent kondenzáció a génaktivációval jár együtt (Markouli és mtsai, 2021).

Ez a folyamat nagymértékben függ a poszttranszlációs módosításoktól, melyek a hisztonfehérjék N- és C-terminálisain vagy a DNS-en mennek végbe (8. ábra). A hiszton módosítások általában lehetnek aktiváló vagy represszív (gátló) típusúak, attól függően, hogyan hatnak a génexpresszióra. Az aktiváló hiszton módosítások közé tartozik elsősorban az acetiláció, a demetiláció, valamint bizonyos esetekben egyes hisztonok metilációja is. Ezzel szemben a represszív módosítások közé sorolható a metiláció, a dezacetiláció, és ritkábban a demetiláció is (Markouli és mtsai, 2021).



8. ábra A poszttranszlációs módosítások hatása a daganatképződésre. Az ábra felső részén a nukleoszómát alkotó hiszton fehérjék két gyakori poszttranszlációs módosítás látható (Ac: acetiláció; Me: metiláció). A hisztonok acetilációja a kromatin állományban csökkent mértékű kondenzációt jelent, így a génátírás aktivációját okozza. Ezzel szemben a metiláció a kromatin állomány kondenzációjának fokozódását okozza, így a génátírásra represszív hatású. (Az ábra a BioRender felületén készült.)

A hiszton metiláció szerepét a hörgőrák pathogenezisben is vizsgálták korábban. Bizonyították, hogy a hiszton 3 lizinének 4-es pozíciójában történő metilezés (H3K4me) szintje emelkedett tüdődaganatokban, mely összefüggésbe hozható a kóros transzkripciós szabályozással. Megállapították, hogy a SEDTA1A, a H3K4me3 metiltranszferáz egyik komponense, expressziója magasabb a tüdőrákokban. Csendesítését végző kísérlet során a tumor növekedés ütemének csökkenését tapasztalták, melyet xenografton végeztek (Du és mtsai, 2021).

Protein arginin metiltranszferáz enzimek, a PRMT5

Az arginin metiláció egy igen gyakori poszttranszlációs módosítás, amely mind a sejtmagban, mind a citoplazmában található fehérjéken létre jöhet. A folyamatot egy enzimes család, a fehérje-arginin-metiltranszferázok (PRMT-k) katalizálják. Eddig kilenc PRMT enzimet azonosítottak emberi sejtekben: PRMT1, 2, 3, 4 (co-activator-associated arginine

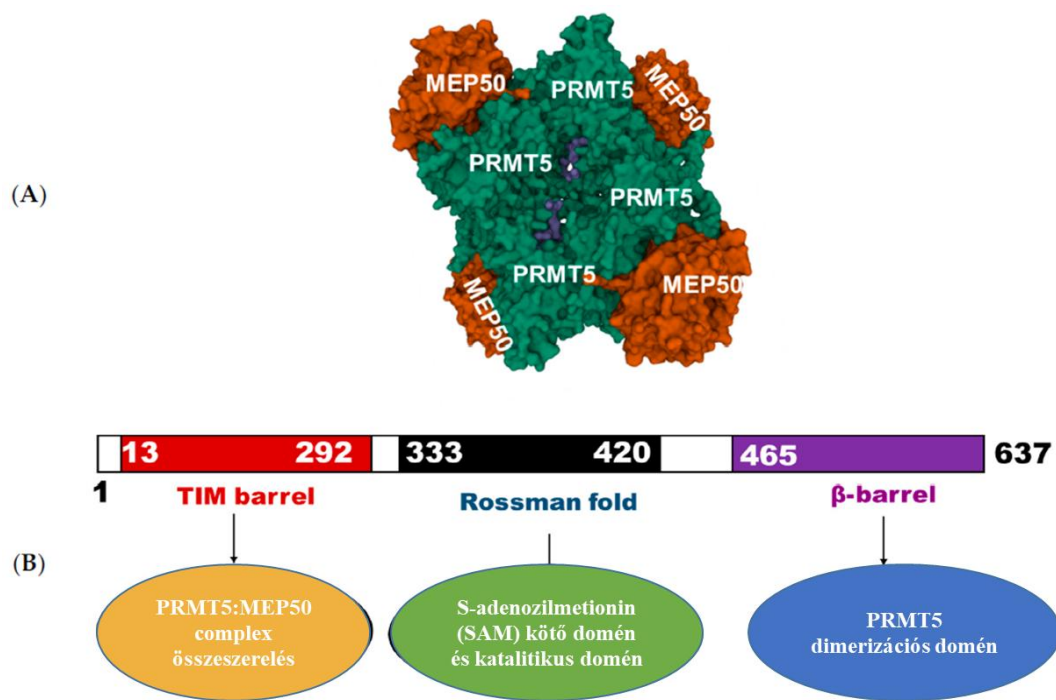
methyltransferase1, CARM1), 5, 6, 7, 8 és 9 (F-box only protein 11, FBXO11) (Motolani és mtsai, 2021).

A PRMT enzimek 4 csoportba sorolhatók (I-IV-ig), attól függően, hogy az általuk katalizált reakcióban milyen a beépülő metilarginin típusa. I, II és III-as típusúak S-adenozilmetioninból visznek át metilcsoportokat a célfehérje arginin oldalláncának terminális ω -guanidin nitrogénjére, míg a IV-es típusú PRMT az arginin belső (δ) guanidin nitrogénjét metilálja, így monometilarginin keletkezik (Motolani és mtsai, 2021).

A protein arginin metiltranszferáz 5 (PRMT5) enzim a II-es típusú PRMT fehérjék közé tartozik. Hasonlóan az I-es típusú PRMT enzimekhez, először monometilálja az arginin oldalláncot, így ω -NG-monometilarginin (MMA) keletkezik, mint köztes termék. Ezt követően a II-es típusú PRMT-k (PRMT5, PRMT7 és PRMT9) a szimmetrikus ω -NG, N'-G-dimetilarginin (SDMA) előállítását végzik (Motolani és mtsai, 2021).

Antonyssamy és munkatársai fedezték fel az emberi PRMT5 első kristályszerkezetét. 637 aminosavból áll, 435 kDa tömegű heterooktamer komplexet alkotva csatlakozik a metiloszóma protein 50-hez (MEP50). A PRMT5 belső tetramerét 4 MEP 50 molekula veszi körül a PRMT5 N-terminálisaihoz kötődve, ez stabilizálja a PRMT5 komplexet és segíti a metiltranszferáz aktivitását (9. ábra). Ehhez a komplexhez további partnerfehérjék is csatlakoznak. A PRMT5:MEP50 komplex összeállítását a szerkezet első eleme, egy N-terminális TIM-barrel domén segíti. Ezt a Rossman-fold domén követi, mely az (SAM) kötésért és a katalitikus aktivitásért felelős (Antonyssamy és mtsai, 2012). A C-terminális β -barrel domén végzi a PRMT5 dimerizációját, így alakul ki a komplex belső tetramere (Motolani és mtsai, 2021).

A PRMT5 számos folyamatban vesz részt, mint a sejtek növekedése, fejlődése differenciálódása, kromatin szabályozása, transzláció stb. Az egyik ilyen folyamat a TP53 gén transzkripciójára gyakorolt represszív hatása, melyet a hiszton fehérjék szimmetrikus dimetilációján keresztül okoz (Motolani és mtsai, 2021). Tehát a TP53 gén által kódolt fehérje



9. ábra: (A) Az emberi PRMT5 kristályszerkezete, a MEP50-el alkotott heterooktamer komplexben. (B) A PRMT5 strukturális és funkcionális doménjei (Motolani és mtsai, 2021).

tölt be központi szerepet a sejtciklus-ellenőrzésben, a DNS-károsodásra adott válasz létrejöttében és az apoptózis elindításában (Gibbons és mtsai, 2014). Emellett a PRMT5 nem-hiszton fehérjék módosítására is képes befolyásolva azok működését, például a p53-ét is, így több mechanizmus útján is szerepet játszik a daganatsejtek proliferációjában és transzformációjában (Cai és mtsai, 2021). A karcinogenezisben betöltött szerepe vitathatatlan, intenzív kutatások irányulnak a kezelésben való felhasználhatóságára is. Mind a sejtvonalakon, mind a xenograftokon végzett vizsgálatok ígéretesek voltak (Bajbouj és mtsai, 2021; Kong és mtsai, 2017). Jelenleg már Fázis I/II klinikai vizsgálatok során is tesztelik a PRMT5 gátlók daganatellenes hatékonyságát (Motolani és mtsai, 2021).

A PRMT5 aktivitása főképpen poszttranszlációs módosításokon keresztül történik számos útvonalon keresztül. Az egyik ilyen folyamat az ubiquitináció. A TRAF6 E3-ubiquitin ligázként katalizálja a PRMT5 nem-proteolitikus, K63-kapcsolt ubiquitinációját, ami a PRMT5-re aktiváló hatást fejt ki (Liu és mtsai, 2023).

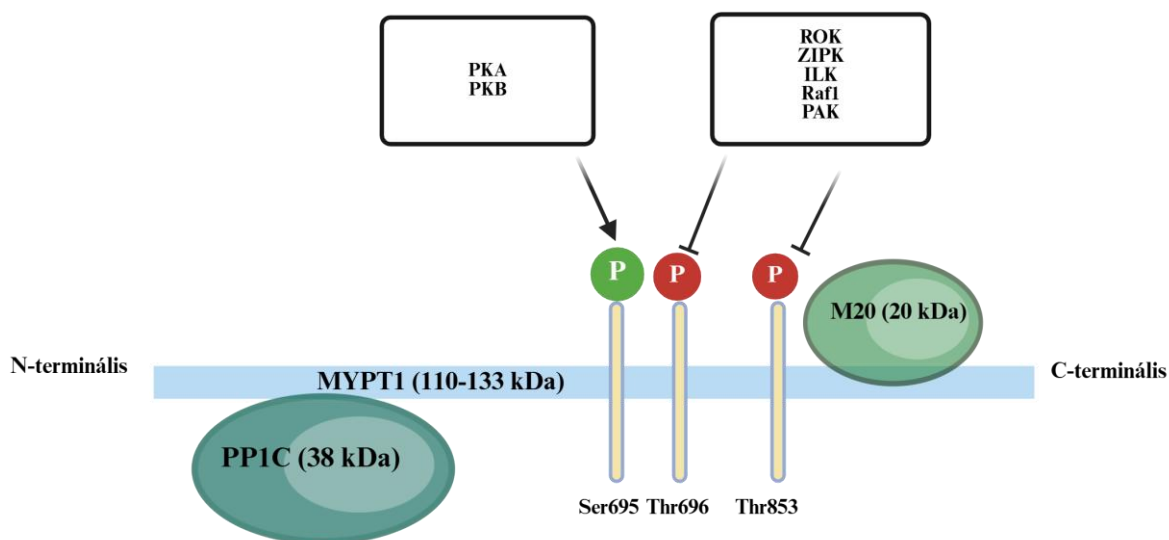
A leginkább vizsgált folyamat a foszforiláció. Egy vizsgálat során azt találták, hogy mind a JAK2 (Janus kinase 2), illetve ennek onkogén mutációt hordozó JAK2(V617F) változata képes foszforilációs módosításokat végrehajtani a PRMT5-ön. Ezen módosítás a PRMT5 MEP50-el való kölcsönhatását megszakítja, így metiltranszferáz aktivitását jelentősen csökkenti (Liu és mtsai, 2011). Érdekességgéppen megemlítendő, hogy a Cyclin D1/CDK4 kináz által végzett MEP50-foszforiláció viszont fokozta a PRMT5/MEP50 komplex hisztonmetilációs aktivitását (Aggarwal és mtsai, 2010). A PRMT5 Thr80 oldalláncon történő foszforilációja viszont bizonyítottan növeli a PRMT5 aktivitását, a H4 hisztonon végzett szimmetrikus dimetilációját illetően (Börzsei és mtsai, 2022). Ezt a jelenséget humán hepatocellularis carcinoma esetén is tapasztalták, mely tanulmány során a miozin foszfataz (MP), szabályozó szerepére is fény derült. A MP által katalizált a PRMT5 Thr80 oldalláncon történő defoszforilációjával a PRMT5 aktivitása csökken (Sipos és mtsai, 2017).

Miozin foszfataz (MP)

Az MP holoenzim egy szerin/treonin specifikus foszfataz, szerkezetét a 10. ábrán mutatjuk be. Három alegységből áll: egy 38 kDa méretű protein-foszfataz-1 katalitikus alegységből (PP1c); egy 110–133 kDa méretű miozin-kötő alegységből (miozin-foszfataz célpont alegység-1, vagyis MYPT1) és egy 20/21 kDa méretű alegységből (Kiss és mtsai, 2019).

A PP1c felelős a katalitikus aktivitásért, a MYPT1 a defoszforilációs folyamatban célzó szerepet tölt be, mivel miozinhoz is kapcsolódik, ezáltal a PP1c-t a foszforilált MLC20 aminosav-maradványok felé irányítja. PP1c-nek 3 fő izoformája ismert (α , β/δ , γ 1), a MYPT1 kizárólag a PP1c β/δ izoformával lép kölcsönhatásba (Kiss és mtsai, 2019).

Az MP enzimnek számtalan funkciója van az emberi szervezetben. Közülük munkánk szempontjából daganatellenes hatása emelendő ki. Egyrészt képes közvetlenül defoszforilálni a retinoblasztóma fehérjét, ezáltal aktiválva azt. Másrészt a már említettek szerint szabályozza a PRMT5 működését is (Kiss és mtsai, 2019).



10. ábra: A mizon foszfatáz (MP) szerkezetének sematikus ábrázolása és működésének foszforiláció általi szabályozása. A MP egy protein-foszfatáz-1 (PP1C) alegységből, egy szabályozó - miozin-foszfatáz célpont alegység-1 (MYT1) és egy M20 alegységből épül fel. A MP aktivitását gátló foszforilációkat piros, aktiváló foszforilációját zöld színnel jelöltük. A foszforilációkat végző kináz enzimeket az ábra tetején látható boxokban soroljuk fel. ROK: Rho asszociált kináz; ZIPK: Zipper-Interacting Protein Kinase; ILK: Integrin-Linked Kinase; Raf1: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma 1; PAK: p21-activated kinase; PKA: protein kináz A; PKB: protein kináz B. Az ábra a BioRender felületén készült.

Az MP aktivitásának gátlásában a MYPT1 C-terminális régiójának szerepe kiemelkedő. A Thr696 és Thr853 foszforilációja gátolja az MP működését, melyeket elsősorban a ROK (RhoA asszociált kináz) katalizálja, de más kinázok is elvégezhetik. Mindkét oldallánc foszforilációja külön-külön is képes az MP holoenzim gátlására. Ezek a foszforilációk olyan konformációs változásokat idéznek elő, melyek a gátló régiót a szubsztrátkötő hasadékhoz és a PP1c katalitikus központjához közelítik (Kiss és mtsai, 2019).

Érdekes módon azonban a MYPT1 Ser695 oldalláncának PKA- vagy PKG-függő foszforilációja ellentétes hatású a Thr696 foszforilációjával, így képes ellensúlyozni az MP számára a ROK- vagy más MYPT1-kötő kinázok által közvetített gátló foszforilációs hatást (Wooldridge és mtsai, 2004). A fentiekben leírtak mellett az MP szabályozása rendkívül sokszínű, számtalan kölcsönhatás befolyásolhatja a MYPT1-en keresztül az enzim működését (Kiss és mtsai, 2019).

Az MP működésének szabályozása az előbbieken említett kinázok mellett foszfatáz enzimek által is lehetséges. Egy feltáró tanulmány bizonyította, hogy a protein foszfatáz-2A (PP2A) enzim képes a MYPT1 Thr696 oldalláncán lévő, gátló hatású foszforiláció megszüntetésével az MP aktivitását növelni, melyet endotheliális nitrogén-oxid szintáz szabályozásában bizonyítottak, mint lényeges elemet (Bátori és mtsai, 2017).

Tömegspektrometriás vizsgálatok segítségével azonosították a Mg^{2+}/Mn^{2+} -függő protein-foszfatáz 1B-t (PPM1B) mint a MYPT1 interakciós partnerét (Horváth és mtsai, 2017). Egy frissebb tanulmány megfigyelése szerint a PP2A-hoz hasonlóan a Mg^{2+} -függő 1B protein-foszfatáz (PPM1B) is képes defoszforilálni a miozin-foszfatáz MYPT1 szabályozó alegységét, a Thr696 és Thr853 gátló foszforilációnak helyet adó oldalláncokon, mely az MP aktivitásának növekedéséhez vezet. A jelenséget HeLa sejtekben és humán méhnyakrák szövettani mintákban írták le (Keller és mtsai, 2025) (Kiss és mtsai, 2019).

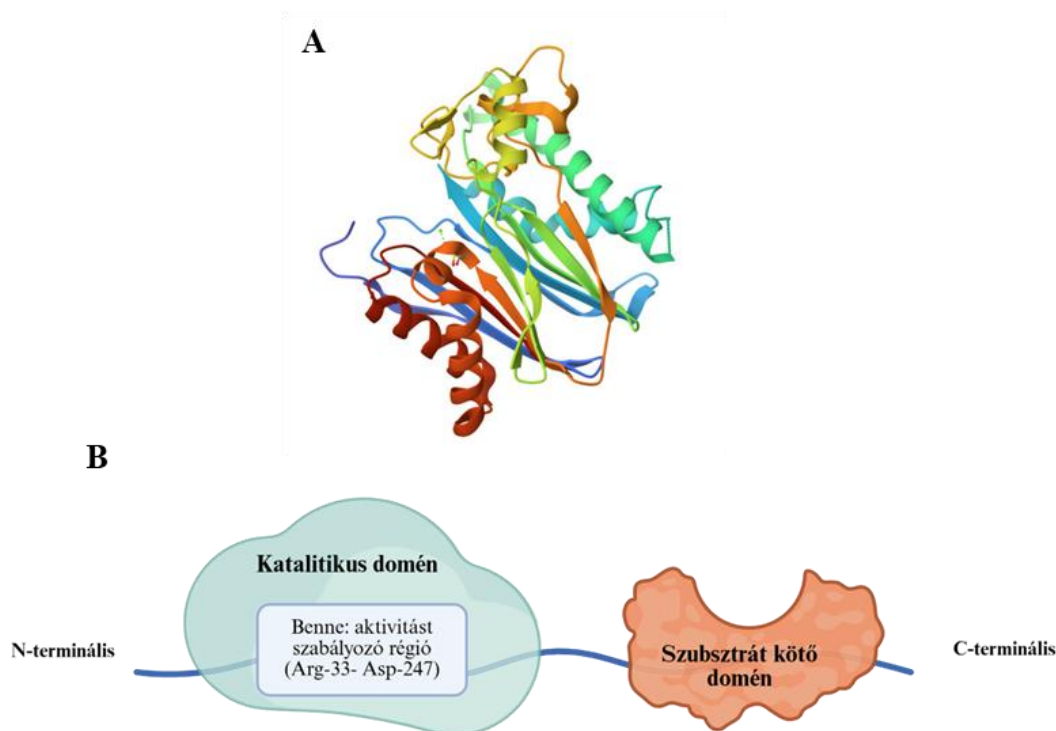
Mg^{2+} -függő 1 B protein foszfatáz (PPM1B)

A PPM1B a PPM szupercsaládhoz tartozik, ami Mg^{2+}/Mn^{2+} -függő monomerikus foszfatázokat foglal magában (Lu és mtsai, 2020). Az emberi PPM1B gén a 2-es kromoszómán helyezkedik el. Öt izoformája van, a két fő izoforma, a PP2C β 1 és PP2C β 2, melyek a különböző szövetekben fordulnak elő, a vázizomban és a szívben nagyobb mennyiségben.

Egyetlen alegységből épül fel, az N-terminális katalitikus domén 310 aminosavból áll, hat α -hélixet és 11 β -redő struktúrát tartalmaz (11. ábra). Az Arg-33-tól Asp-247-ig terjedő szakasz az enzim aktivitásának szabályozó régiója. A C-terminális régió 169 aminosavból áll, a szubsztrát fehérjék felismeréséért és megkötéséért felelős, és szerin/treonin foszfatáz aktivitással rendelkezik (Li és mtsai, 2023).

A PPM1B működése, transzkripciója számos úton szabályozható. Néhány mikroRNS csökkenti a PPM1B génexpresszióját a 3' UTR-hez (nem kódoló régió) való kötődéssel. Emellett a PPM1B Ser195 aminosavszármazékon történő foszforilációja előidéz az enzim

destabilizálását az ubiquitin-függő proteaszómális lebontási útvonal révén. Ezen két fent említett szabályozás csak két kiragadott példa (Li és mtsai, 2023).



11. ábra: A PPM1B szerkezete. (A) Az emberi PPM1B szerin/treonin-foszfataz doménjének kristályszerkezete. (Forrás: <https://www.rcsb.org/structure/2P8E>). **(B)** A PPM1B szerkezetének sematikus ábrázolása. Egyetlen alegységből áll, az egyes doméneket az illusztráció kedvéért választottunk el egymástól. Az N-terminális katalitikus domén az Arg-33-tól Asp-247-ig terjedő szakaszán az enzim aktivitásának szabályozó régióját tartalmazza. A C-terminális régió a szubsztrát fehérjék felismeréséért és megkötéséért felelős, szerin/treonin foszfataz aktivitással rendelkezik. Az ábra a Biorender felületen készült.

A PPM1B több jelátviteli útvonal szabályozásában is részt vesz. Ezek közül az egyik a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonal, melynek szerepe van a sejtsztódásban, differenciálódásban, gyulladásos folyamatok szabályozásában, apoptózisban is. Más útvonalak közé tartozik az NF- κ B és TGF- β jelátvitel is (Li és mtsai, 2023).

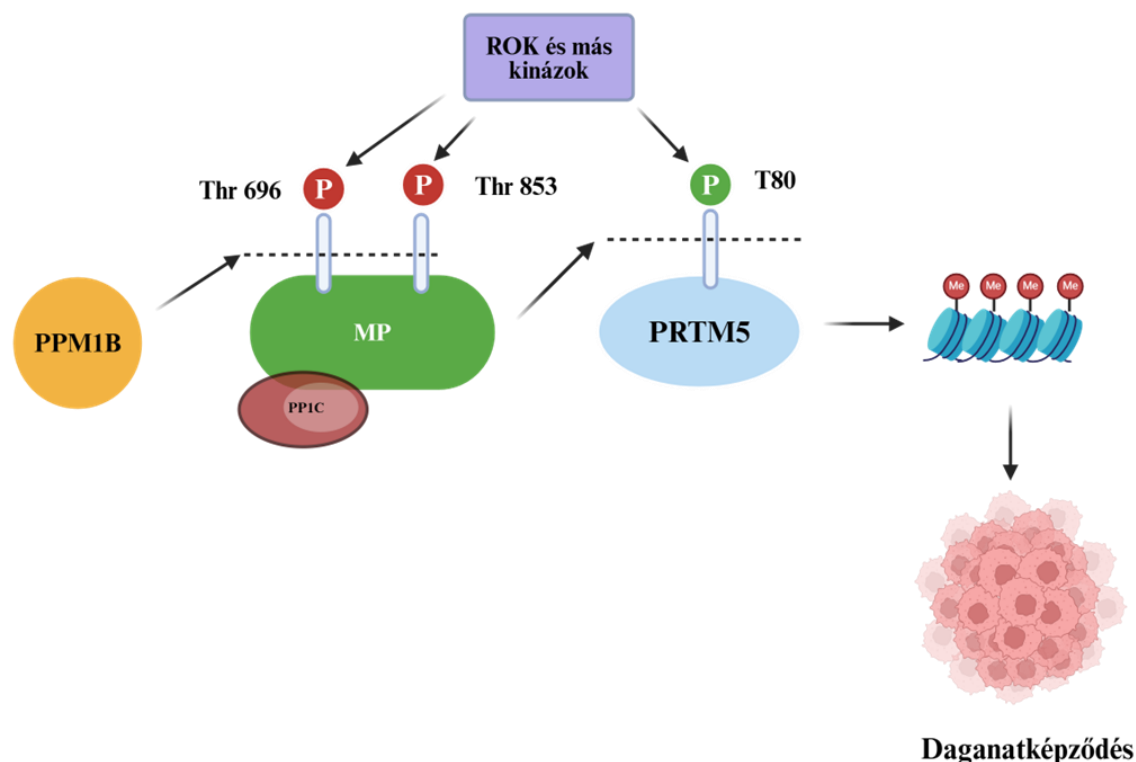
A miozin foszfatazzal való kapcsolatára ebben a fejezetben csak utalunk, mivel ez már korábban említésre került (Keller és mtsai, 2025).

A fentiek alapján látható, hogy a PPM1B szerepe az emberi szervezetben összetett, így nem meglepő, hogy több betegséggel való kapcsolatát is vizsgálták, mint az atherosclerosis, neurodegeneratív betegségek, daganatok (Li és mtsai, 2023).

A malignus daganatok kialakulásában betöltött szerepét több szolid tumor esetén is tanulmányozták. Az emlőrákban feltárt mechanizmus a PPM1B a Rho guanin-nukleotid disszociációs inhibitor 1 fehérje Ser174 oldalláncát defoszforilálva gátolja az epidermális növekedési faktor (EGF) működését, ami így nem képes a RhoA, Rac1 és CDC42 aktiválására. Mindez csökkenti a daganatos sejtek inváziós és metasztatizáló képességét (Cho és mtsai, 2018). Kutatás történt colorectalis, hólyag és hepatocellularis daganatokban is. A vizsgálatok során a PPM1B hiányát fedezték fel, melyet általában fokozott degradáció vagy transzkripció gátlás okozott (Li és mtsai, 2023).

A PPM1B/MP/PRMT5/hisztin útvonal összefoglalása

A hisztinok fokozott metiláltsága és rosszindulatú daganatok, köztük a tüdőrák, kialakulása között egyértelmű összefüggés mutatkozik (Du és mtsai, 2021). A hisztinok szimmetrikus dimetilációjának katalizálása a PRMT5 enzim egyik funkciója (Motolani és mtsai, 2021). A PRMT5 T80 helyen történő foszforilációja bizonyítottan növeli a PRMT5 aktivitását (Börzsei és mtsai, 2022). Ezen foszforilációt több kináz enzim is végezheti. A PRMT5 aktiváló foszforilációját az MP képes megszüntetni, ezáltal csökken a PRMT5 aktivitása (Sipos és mtsai, 2017). Az MP aktivitásának csökkenése következik be szabályozó alegységének (MYPT1) a Thr696 és Thr853 oldalláncok gátló hatású foszforilációja által, melyet szintén többféle kináz enzim végezhet (Kiss és mtsai, 2019). Az említett oldalláncokat a PPM1B enzim is képes defoszforilálni, ezáltal növelve az MP aktivitását (Keller és mtsai, 2025). Különböző daganatok esetén megfigyelték a PPM1B csökkent koncentrációját is (Li és mtsai, 2023). A 12. ábrán foglaljuk össze a folyamatot.



12. ábra: A PPM1B/MP/PRTM5/hisztin út vonal összefoglalása. A magyarázat a szövegben. A zöld színnel jelölt foszfát (P) csoportok az aktiváló, a piros színnel jelöltek gátló foszforilációt jelentenek, szövegesen jelölve, hogy melyik oldalláncon történt a módosítás. PPM1B: Mg^{2+} -függő 1B protein-foszfataáz; MP: miozin foszfataáz; MYPT1: miozin-foszfataáz célpont alegység-1; PRMT5: protein-arginin metiltranszferáz 5; ROK: R-asszociált kináz. Az ábra a Biorender felületén készült.

Diagnosztika

A kivizsgálás folyamata során arra törekszünk, hogy megfelelő adatokhoz jussunk a betegről és betegségéről egyaránt, mely az aktuális szakmai ajánlásoknak megfelelő, optimális kezelési tervet felállításához szükséges. Az onkológia szakmában ezeket a döntéseket multidiszciplináris onkológiai team (OTT) hozza meg. A személyre szabott kezelési terv felállításához a következő adatok ismerete alapvető: a beteg funkcionális állapota, performans státusza, a daganat stádiuma (TNM szerint) és a pontos szövettan. A kivizsgálás folyamata azonban ennél a gyorsan progrediáló betegségnél túlságosan hosszú is lehet. Hazánkban 2011-2016 közötti időszakban végzett vizsgálat szerint átlagosan 64,5 nap telik el az első kezelésig (Kiss és mtsai, 2021). Egy frissebb tanulmány szerint, melyet Szlovéniában folytattak a

háziiorvosi beutalástól az OTT döntéshozatalig átlagosan 50,8 nap is eltelik (Marc Malovrh és Adamic, 2024).

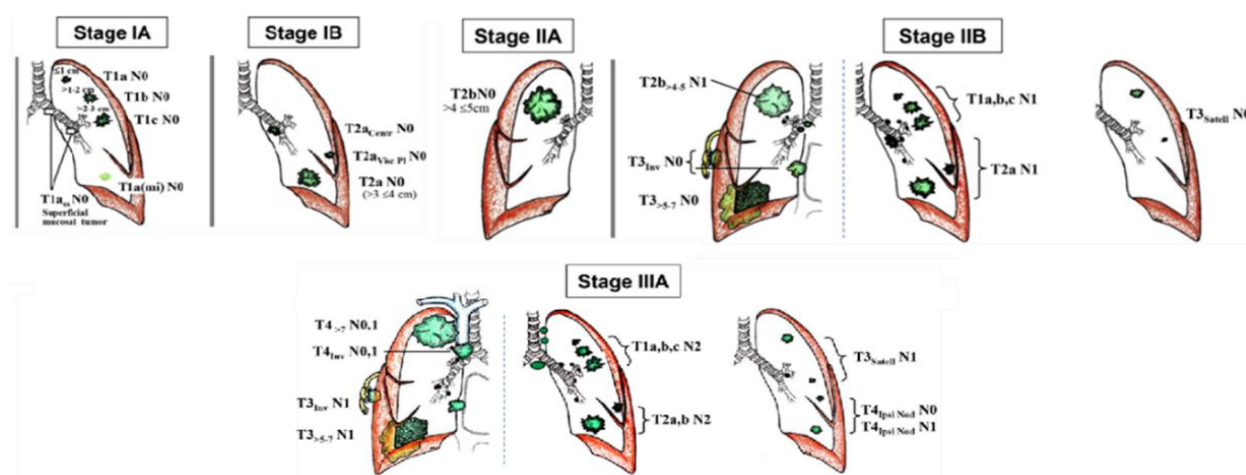
A betegek performans státuszát skálák alapján tudjuk meghatározni. A legismertebb az ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) skála, mely szerint az ECOG 0 beteg a teljesen önellátó, a 4-es az egész napot az ágyban töltő beteg (Kumar és mtsai, 2024). A másik leggyakrabban használt skála az onkológiában a Karnofsky index (Zhou és mtsai, 2024). A két skála által használt pontrendszer eltérő, de vizsgálat már irányult arra is, hogyan feleltethetők meg egymásnak. Ez a szakmán belüli kommunikáció szempontjából fontos (Prasad és mtsai, 2018).

A kardiopulmonális státusz felmérés elengedhetetlen mind a kivizsgáláshoz, mind a kezeléshez. Az ESMO (European Society for Medical Oncology) ajánlása alapján légzésfunkciós vizsgálat, lehetőleg testplethysmographia javasolt, mivel FEV1 (forszírozott kilégzési térfogat az 1. másodpercben) és diffúziós kapacitás mérése egy mellkasi műtét előtt kötelező. Az EKG (elektrokardiogram) vizsgálat mindenképpen kötelezően elvégzendő, lehetőségként ajánlott az echocardiographia vagy szükség esetén a komplex kardiológiai vizsgálat is (Zer és mtsai, 2025).

A malignus daganatok stádiumát TNM (tumor, node, metastasis) rendszer alapján határozzuk meg a tumor szövettani típusát is figyelembe véve. Tartalmazza a daganat helyi kiterjedését (T), a regionális nyirokcsomók érintettségét (N), valamint a távoli áttétekről (M) is információval szolgál. Napjainkban a TNM 9 a legújabb kiadás, azonban az általunk végzett munkában még az akkor érvényben lévő TNM 8 alapján került meghatározásra betegeink stádiuma (Goldstraw és mtsai, 2016).

A 13. ábra szemléletesen mutatja be, hogyan változik a tumor mérete és a regionális nyirokcsomó érintettsége az egyes stádiumokban. Segít annak a vizualizációjában is, hogy ugyanazt a stádium besorolást kapó betegségek esetében igen eltérő tumoros gócot láthatunk.

A forrásként használt cikkben minden stádiumot bemutatnak, azonban a jelen munkában csak a korai, potenciálisan reszekálható stádiumokat mutatjuk be, mivel vizsgálatunkba ezen betegcsoport került bevonásra. A korai stádiumok (IA, IB) kis méretű, nyirokcsomó-mentes tumorokat jelentenek, míg a magasabb stádiumok (IIA, IIB, IIIA) már regionális nyirokcsomó érintettséggel járnak, amelyek jelentősen befolyásolják a kezelési döntést (Detterbeck és mtsai, 2017).



13. ábra: A korai tüdőrák stádiumai grafikusán szemléltetve. Az eredeti ábrából kizárólag a korai stádiumok szerepelnek. Az ábra azt szemlélteti, hogy az egyes TNM stádiumok tumoros fókuszok kombinációt tartalmazhatják. (Detterbeck és mtsai, 2017)

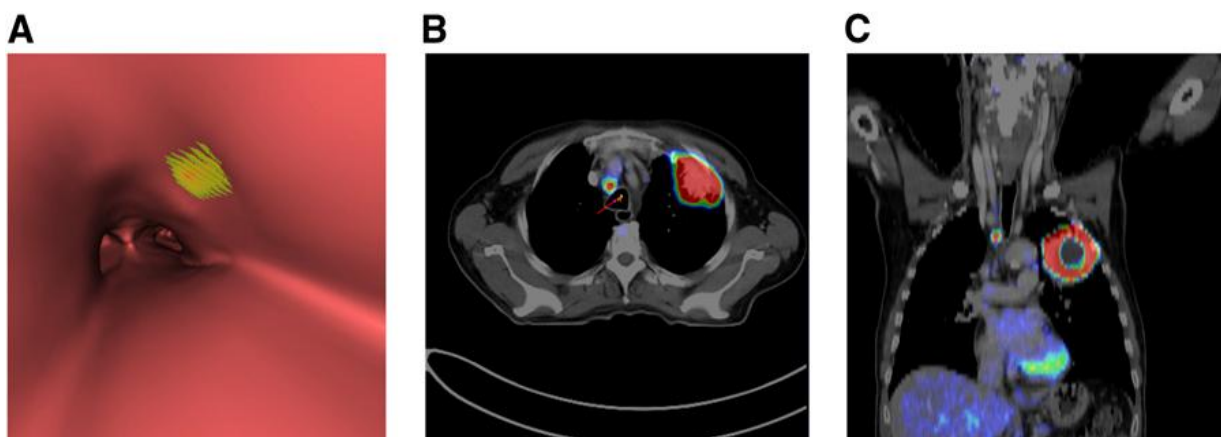
A stádium pontos meghatározása képalkotó vizsgálatokkal lehetséges. Az ESMO ajánlása szerint mellkasi és felső hasi CT, a koponyáról az MR vizsgálat javasolt, de ha ez rutinszerűen nem elérhető, akkor a koponya CT is elfogadható. Ezeket csontszcintigráfiával ki lehet egészíteni a csontáttek felkutatására. Még pontosabb staginget jelent, ha a betegről pozitron emissziós tomográfia-computer tomográfia (PET-CT) készül, mely a csontáttek szempontjából még érzékenyebb a szcintigráfiánál. Lokális kezelések esetén, mint a műtét vagy a kemo-radioterápia (KRT) előtt napjainkban már elengedhetetlen a PET-CT vizsgálat (Zer és mtsai, 2025).

A PET-CT egy fúziós képalkotó technika, mely egyesíti a (PET) pozitron emissziós tomográfia és a CT (computer tomográfia) előnyeit, mely részletes anatómia és funkcionális képalkotás egyben. A leggyakrabban használt tracer a ^{18}F -fluorodezoxiglükóz (FDG), amely

felhalmozódik a magas metabolikus aktivitású területeken. A PET-CT megjelenésével jelentősen felgyorsult a diagnosztika és a biomarkerek vizsgálata is (Guo és mtsai, 2022).

Egy másik technika, mely szintén hasznos lehet a kivizsgálás során, a virtuális bronchoszkópia. Ennek során a meglévő CT felvételtől szoftver generálja a konvencionális bronchoszkópiára hasonlító képsorozatot, mely trachea, főhörgők és kisebb hörgők lumenét rajzolja ki belülről. Mint minden vizsgálómódszernek, ennek is vannak előnyei és hátrányai. Előnye az, hogy invazivitás nélkül kaphatunk információt a légutak belsejéről, illetve a tumorok légutakhoz való viszonyáról. Főhörgőt vagy tracheát teljesen vagy részlegesen lezáró elváltozás esetén az akadály hosszáról, az elváltozás „mögé látva”, amikor a bronchoszkóp nem lenne elvezethető a nagyobb mértékű szűkület mellett. A hátránya az, hogy endoszkóp nem kerül bevezetésre a légutakba, így sem a nyálkahártya megítélését, sem a szövettani mintavételt vagy intervenciót nem teszi lehetővé. A bronchoszkópos beavatkozások tervezéséhez azonban rendkívül hasznos lehet komplikált esetekben. Egy tanulmány során azt találták, hogy a virtuális bronchoszkópia alkalmazása a perifériás mintavételek tervezése során javította a találati arány becslésének pontosságát, azonban ez a tumor átmérőjétől is függött (Kitamura és mtsai, 2022).

A két fenti technika együttes alkalmazása még jobb eredményeket adhat. (14. ábra) Ennek során a PET-CT megmutatja, hogy melyik lézió metabolikusan aktív, a virtuális bronchoszkópia pedig az elváltozás helyzetét endobronchialis szemszögből (hörgőfalhoz való elhelyezkedés, távolság, pozíció megítélése). A PET információból származó metabolikus aktivitás alapján tehát kiválaszthatjuk a leginkább aktív gócokat, nyirokcsomó áttéteket, így EBUS (endobronchialis ultrahang) vizsgálat is sikeresebb lehet, kiegészítve az ultrahangos vezérlést (Herbrik és mtsai, 2011).



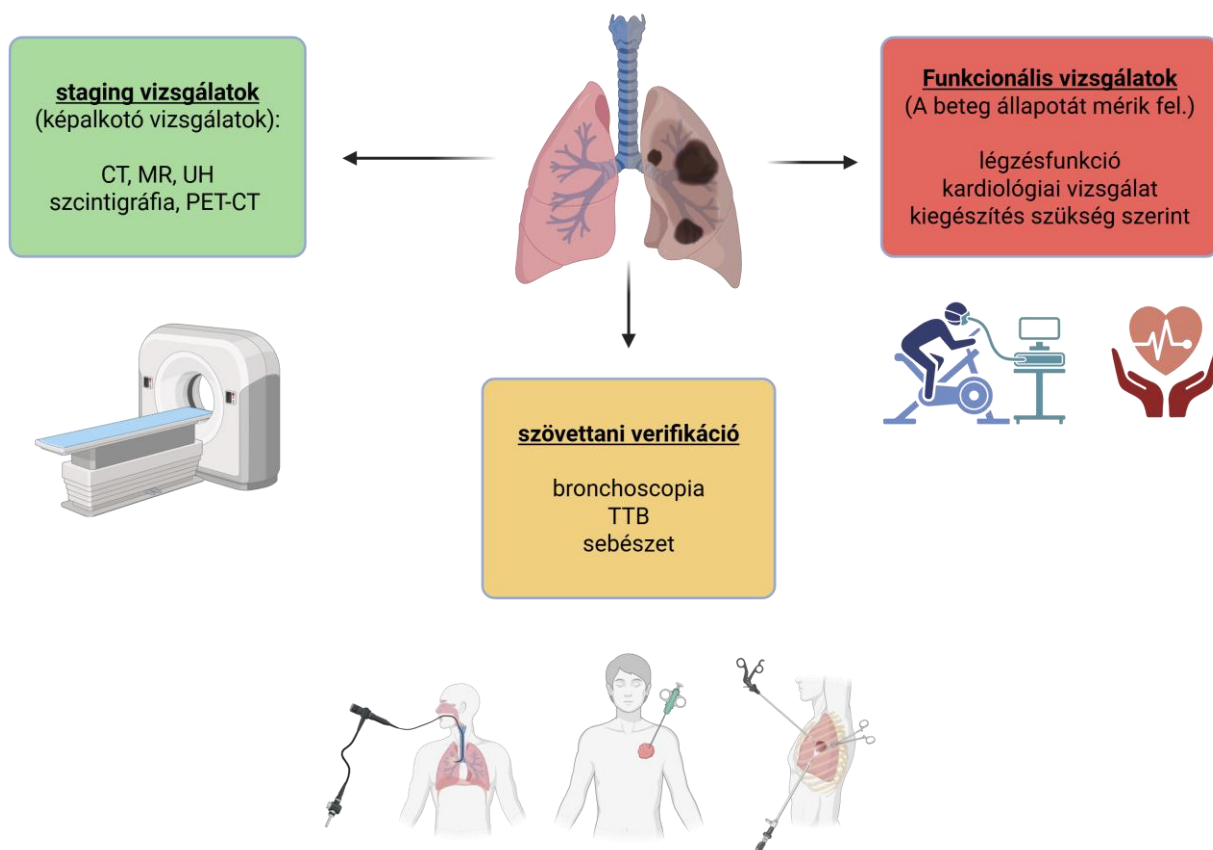
14. ábra: A PET-CT alapú virtuális bronchoszkópia bemutatása. A. Virtuális bronchoszkópia során látott nyirokcsomó képe, lokalizációja a hörgőfalhoz viszonyítva. **B és C** képen a PET-CT egy-egy axiális és coronalis szelet látszik. (Herbrik és mtsai, 2011)

A tüdőrák szövettani verifikációjában elsőként a szövődmények szempontjából a legalacsonyabb kockázatú módszert igyekszünk alkalmazni, mely a bronchoszkópia. Az endoszkóppal látható elváltozásokból kimetszők vagy cytológiai kefék segítségével vehetünk szövettani mintát. Az ettől perifériásabb elváltozások, vagy a tumorosan érintett mediastinalis nyirokcsomókból valamilyen tájékozódást segítő eszközt is alkalmaznunk kell, hogy elérjük a daganatot. Ilyen például az EBUS (endobronchialis ultrahang) technika, mely napjainkban a mediastinalis nyirokcsomó staging gold standarja. Használhatunk emellett röntgen átvilágítót, navigációs bronchoszkópot is. A fenti technikák kombinálásával a találati árny nagyban növelhető (Roşu és mtsai, 2025). Természetesen a technika robbanásszerű fejlődése a bronchológia területét is érinti, a robot - asszisztált bronchoszkópia formájában (Tung és mtsai, 2024).

Amennyiben bronchoszkópia útján nem sikerült verifikálni a folyamatot, a transthoracalis tübiopszia (TTB) is egy lehetőség. A beavatkozás során core biopszia történik CT, ritkábban ultrahang (UH) vezérelve a perifériás daganatgyanús elváltozásból (Balbi és mtsai, 2025).

Sebészi mintavételre általában akkor kerül sor, ha a fenti módszerek egyikével sem sikerül megfelelő mennyiségű vagy minőségű szövettani mintához jutni. Ekkor minimál invazív sebészeti technika ajánlott VATS (video asszisztált thoracoszkópia) során (Jiang és He, 2018). Egy másik sebészi technika, melyet a daganatos folyamat igazolására használhatunk az MSC (mediastinoszkópia). Fontos módszer volt a mediastinalis staging során, azonban a rutin staginghez már inkább az EBUS ajánlott, mivel sokkal kisebb a szövődmények kockázata (Jiang és He, 2018).

A tüdőrák kivizsgálása a 15. ábrán került bemutatásra sematikusán, a részletes bemutatás ezen munka kereteit meghaladná, a részletes leírás az ajánlásokban (pl. ESMO) található.



15. ábra: A tüdőrák diagnosztikájának egyszerűsített áttekintése. A staging vizsgálata az ábrán felsorolt képalkotó modalitásokból állnak. A funkcionális vizsgálatok a beteg állapot és rizikó felmérését szolgálják, egyes elemei a szövettani verifikációt megelőzik, azonban a három boxban látható vizsgálatokat igyekezzük párhuzamosan végezni a kivizsgálási idő csökkentése érdekében. A szövettani verifikáció során rendkívül fontos a jó minőségű minta vétele. Az ábra a Biorender felületén készült.

A tüdődaganat gyanú esetében is alkalmazhatunk tumormarker vizsgálatokat (2. táblázat). Ezen daganattípus esetén azonban önmagukban sajnos nem alkalmazhatók a diagnózis felállítására, a szövettani verifikációt nem helyettesítik, azonban a kivizsgálási irány megadásában segíthetnek, illetve a követés során hasznosak lehetnek, viszont itt sem helyettesíthetik a CT általi követést (Stieber és mtsai, 2006).

Szövettani típus	Terápia előtt	Terápia után, követés
Ismeretlen	CYFRA 21-1, CEA, NSE, ProGRP	Műtét után vagy kiterjedt betegség esetén követés
Adenocarcinoma	CYFRA 21-1, CEA	CYFRA 21-1 és/vagy CEA
Laphám carcinoma	CYFRA 21-1, CEA, SCCA	CYFRA 21-1, CEA, SCCA
Nagysejtes carcinoma	CYFRA 21-1 és CEA	CYFRA 21-1 és/vagy CEA
Kissejtes carcinoma	NSE és ProGRP	NSE és/vagy ProGRP

2. Táblázat: Ajánlások a tumormarkerek használatára a tüdőrák szövettani típusai és alkalmazási formái szerint. CEA, carcino embryonic antigen; CYFRA 21-1, cytokeratin 19 fragments; NSE, neuron specific enolase; ProGRP, progastrin-releasing peptide; SCCA, squamous cell carcinoma antigen

Jelenleg a minimum tesztelendő biomarkerek korai tüdőrák esetén a PD-L1 (programozott halál ligand 1), az EGFR és az ALK, mivel nagy szerepük van a perioperatív terápiás terv felállításához. A biomarker státusz alapján meghatározott gyógyszerek javasolhatók, melyek száma folyamatosan bővül. (Zer és mtsai, 2025). A metasztatikus vonalon a terápiás lehetőségek száma nagyobb, így a szakmai ajánlások több biomarker tesztelését határozzák meg. A korábban említett teszteket ROS1, BRAF (V600E), K-RAS meghatározásokkal kell kiegészíteni. A centrumok sokkal több lehetőséggel rendelkeznek, így olyan ritkább mutációk meghatározása is a napi rutin része, melyekre törzskönyvezett célzott terápia adható. Tehát, amennyiben lehetőség van rá, tesztelendők az NTRK, RET, HER2, MET mutációk is (Hendriks és mtsai, 2023b).

Kezelés

Mint ahogy a korábbiakban már bemutatottuk, a kezelés meghatározásához szükséges ismerni a beteg általános és funkcionális állapotát, a daganat stádiumát (TNM szerint) és szövettani eredményt a fent felsorolt biomarkerekkel együtt annak érdekében, hogy a lehetséges kezelési modalitások közül (sebészet, sugárterápia, szisztémás kezelés) kiválaszthassuk a legideálisabbat, vagy ezek kombinációját. Az ajánlások szerint a kezelést a TNM alapján három nagy kategória szerint határozzuk meg általában, korai, lokálisan kiterjedt, nem reszekálható és metasztatikus csoportok alapján.

A korai NSCLC kezelésében (I-IIIa stádium) prioritás a sebészeti megoldás, célja az R0 reszekció. A gold standard műtéti típus a lobectomia és a radikális nyirokcsomó disszekció, de <2 cm-e tumor méretnél a teljes túlélést nem befolyásolja, ha műtét kevésbé kiterjesztett, vagyis a szegmentectomia is elegendő lehet. A preferált műtéti technika a video asszisztált thoracoszkópia (VATS). A kisebb méretű daganatok esetén nem mindig történik szövettani verifikáció a műtét előtt, ami jelenleg elfogadott, amennyiben a malignitás alapos gyanúja fennáll (Jiang és mtsai, 2025).

A kiújulás kockázata, illetve a műtéti kiterjesztés csökkentése érdekében neoadjuváns kezelést alkalmazhatunk a műtét előtt. Ez lehet kemoterápiás vagy sugárkezelés is (Zer és mtsai, 2025). A neoadjuváns, illetve a perioperatív kezelések egyik újdonsága lett az elmúlt években az (immuncheckpoint-inhibitor) ICI hozzáadása a kemoterápiához. A neoadjuvánsan alkalmazott ICI kemoterápiával kombinálva kb. 20%-ban eredményezett komplett pathológiai válasz (a műtéti anyagban nem találtak élő tumor sejtet) és további kb. 30%-ban majdnem teljes pathológiai válasz (a műtéti anyagban a tumor kevesebb mint 10%-ban tartalmaz élő tumorsejtet összehasonlítva a necrosis és stroma méretével) (Lieber és mtsai, 2024).

A helyi kezelési technikák fejlődésének ellenére is a tüdőrák kiújulásának aránya R0 reszekció mellett is 25-50%. Az adjuváns kezelésre már a 4 cm-es tumorméret felett (T2b),

illetve ettől magasabb stádiumtól szükség van. Ez általában kemoterápiát jelentett, azonban a perioperatív immunterápia hozzáadása jelentősen javíthatja a túlélési eredményeket (Zer és mtsai, 2025). A driver mutációkkal rendelkezők esetében is lehetőségünk van a kemoterápiát kiegészíteni, a metasztatikus vonalon már jól bevált célzott terápiákkal. Az egyik az EGFR aktiváló mutációval rendelkező betegek esetén adható az adjuváns kemoterápia után osimertinib kezelés (Wu és mtsai, 2020). A másik az ALK átrendeződés esetén az adjuváns alectinib kezelés (Wu és mtsai, 2024).

Ebben a stádiumban a sugárterápia akkor jön szóba, ha műtét nem lehetséges. A preferált technika az SBRT (Stereotactic Body Radiation Therapy), vagy utókezelésként PORT (post-operative radiotherapy) formájában alkalmazandó (Zer és mtsai, 2025).

A lokálisan kiterjedt NSCLC kezelése (nem reszekálható III-as stádium) a kemo-radioterápia (KRT) a standard kezelés, mely napjainkban többféle konszolidáló kezeléssel igyekeznek kiegészíteni. PD-L1>1%-os expresszió esetén ICI terápiával, EGFR mutáció esetén a megfelelő célzott terápiára is van lehetőség. ALK átrendeződés esetén is folynak a vizsgálatok az konszolidáló kezelést illetően (Zer és mtsai, 2025).

A metasztatikus NSCLC kezelésében csak palliatív intenciójú kezeléseket alkalmazhatunk. Ez a legtöbb esetben valamilyen szisztémás kezelés, illetve palliatív dózisé sugárkezelés lehet. Amennyiben driver mutáció igazolódott a kivizsgálás során, az mindig prioritást élvez a kezelés során. Kezelhető driver mutáció hiányában ICI vagy kemoterápia+ICI az elsődlegesen választandó, amennyiben nincs kontraindikációja (Hendriks és mtsai, 2023a, 2023b).

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 határoz meg, mely egyensúlyának felborulása hozzájárul a malignus transzformációhoz. Bár a fehérjék kölcsönhatásai és szabályozó mechanizmusaik már feltárássra 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 (Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Orvosi Képalkotó Intézet).

Munkánk során az alábbi célkitűzéseink voltak:

- A PPM1B/MP/ PRMT5/ hiszton onkogén jelátviteli pálya elemeinek expressziós szintű elemzése.
- A PPM1B/MP/ PRMT5 enzimek aktivitását meghatározó foszforilációk és a hiszton dimetiláció elemzése.
- A PPM1B/MP/ PRMT5/ hiszton 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 képének részletesebb és strukturáltabb megjelenítésével és rendelkezik a hdCT képek minőségével.

Anyagok és módszerek

Antitestek

A felhasznált antitesteket a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat. A felhasznált Antitestek.				
Antitest	Gyártó	Katalógusszám	Antitest típusa	Hígítás WB-hoz
MYPT1	BD Transduction Laboratories (USA)	612165	Egér, monoklonális	1:500
Foszfo-MYPT1 (Thr853)	Merck-Millipore (Darmstadt, Németország)	36-003	Nyúl, monoklonális	1:500
PRMT5	Merck-Millipore (Darmstadt, Németország)	07-405	Nyúl, monoklonális	1:1000
Foszfo-PRMT5 (Thr80)	Abmart Inc (Kína)	Sipos et al.	Nyúl, monoklonális	1:500
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology (USA)	sc-47724	Egér, monoklonális	1:5000
PPM1B	Abnova (Taiwan)	H00005495-B01P	Egér, monoklonális	1:350
H2A	Merck-Millipore (Darmstadt, Németország)	07-746	Nyúl, monoklonális	1:1000
Dimetil-H2A	Merck-Millipore (Darmstadt, Németország)	07-413	Nyúl, monoklonális	1:500
H4	Cell Signalling Technology (Massachusetts, USA)	L64C1	Egér, monoklonális antitest	1:1000
Dimetil-H4	Merck-Millipore (Darmstadt, Németország)	07-947	Nyúl, monoklonális antitest	1:500
pRB	Santa Cruz Biotechnology (USA)	sc-377539	Egér, monoklonális antitest	1:1000
β -actin	Santa Cruz Biotechnology (USA)	sc-47778	Nyúl, monoklonális antitest	1:500
egér IgG	Cell Signaling Technology (USA)	#7076	HRP-konjugált poliklonális, nyúl	1:5000
nyúl IgD	Sigma-Aldrich (Németország)	A0545	HRP-konjugált poliklonális nyúl	1:5000

Betegek

Vizsgálatunkba olyan betegeket válogattunk be, akiknél tüdődaganat gyanú miatt indult kivizsgálás, melyet követően a tüdő OTT vagy a továbbiakban műtéti kezelést javasolt. Ezt követően az aneszteziológiai vizsgálat során a műtétet elvégezhetőnek tartották, és a betegek már műtéti előjegyzése is volt. A műtéti előjegyzés alapján választottuk ki azokat a betegeket, akiknek legalább 2 cm-es árnyéka volt mellkas CT szerint. A preoperatív szövettani verifikáció nem volt beválasztási kritérium, tehát több esetben a mintavétel után derült ki a pontos szövettan. A daganat mérethatárának kijelölését az vezette, hogy figyelembe kellett vennünk, hogy a beteg pathológiai diagnózisát nem veszélyeztetheti a mintavétel, így túl kicsi daganatokból nem vehettünk mintát.

A műtéteket a Debreceni Egyetem Sebészeti Intézet Mellkassebészeten végezték. A betegadatok gyűjtése 2019.12.11-2023.07.25-ig történt a GDPR szabályokat betartva, a Debreceni Egyetem által kiadott etikai engedély (34199-L/2019/EKU) szerint.

Összesen 38 beteg mintáit gyűjtöttük össze ebben a vizsgálatban, és elemeztük a klinikai adataikat. A nemek megoszlását tekintve 12 nő (33%) és 26 férfi beteg (67%) volt. A nők átlagéletkora 63,92 év, míg a férfiaké 65,81 év volt. Az egész populációt tekintve csak 2 beteg nem dohányzott, egyebekben átlagosan 26,42 csomagév dohányzás volt feltárható a betegek anamnézis felvétele során. Onkológiai szempontból a vizsgálatunkba bevonás előtt három beteg primer tumora került előzetesen eltávolításra. Egy ADC betegünknel történt emlődaganat, egy betegnél történt korábban colon tumor eltávolítása (az ő szövettana a vizsgálatunk során colon adenocarcinoma áttétének igazolódott), további egy betegünk esetében szintén colon carcinoma miatt történt műtét, azonban az ő szövettana a mi vizsgálatunkban primer tüdő adenocarcinoma lett. Neoadjuváns kezelést vizsgálatunk előtt három betegünk kapott, egy ADC és két SCC beteg. A betegek között nem volt olyan, akinek megelőzően primer tüdődaganata lett volna, így recidiva gyanús beteg nem került be a vizsgálatba.

Mintavétel és szövettani minták

A szövetmintákat a sebészeti beavatkozás eredményeképpen eltávolított lebenyből vagy szegmentből vettük. Mintavétel történt magából a daganatból és az egészséges tüdőszövetből is. Ez utóbbit az eltávolított lebeny vagy szegment lehető legtávolabbi pontjáról vettük, mindenképp a daganat infiltrációs zónáján kívüli területről, mely során figyelembe vettük, a daganatok átlagosan várható, a szolid komponenst meghaladó, mikroszkópos terjedését is. Egy vizsgálat során, melyben a korai tüődaganatokat vizsgálták, azt találták, hogy a mikroszkópos terjedés 90. percentilise 12,0 mm volt grádustól függően (Grade 1: 13,0 mm, Grade 2: 9,7 mm, Grade 3: 4,4 mm) (Grills és mtsai, 2007).

Daganatos és kontroll mintából is 3-3 történt levételre: 1.) Friss fagyasztott szövet Western blottra 2.) Szöveti mátrixba ágyazott szövet, melyek folyékony nitrogénbe kerültek még a műtőben, a mintákat ezután -70 °C-on tároltuk. 3.) RNS later-ben elhelyezett mintákat -20 °C-on tároltunk.

Fehérje extrakció

A biopsziák tömegmérését követően a fehérjét RIPA pufferrel (50 mM Tris (pH 7,4), 0,2% nátrium-dezoxikolat, 0,2% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 1% Triton X-100, és 1 mM EDTA, kiegészítve 1× proteáz gátló koktéllal, 1× foszfatáz gátló koktéllal, 1 mM fenilmetilszulfonil-fluoriddal és 1 µM mikrocisztin-LR-rel) tártuk fel 100 mg szövethez 1000 µl puffer hozzáadásával. A szövetdarabokat TissueRuptor készülékkel homogenizáltuk jégen, majd 3000 g, 4 °C-on 5 percig centrifugáltuk. A felülúszókat (szövet lizátumok) Eppendorf-csövekbe mértük át. A fehérjekoncentrációkat a Pierce BCA Protein Assay Kit-tel mértük meg (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) (Lontay és mtsai, 2012). A teljes sejtlizátumok fehérjekoncentrációját 1:10 hígításban a BCA-módszerrel határoztuk meg, ELISA-leolvasóval 540 nm-en, BSA-t használva standardként. Az adatok elemzésére GraphPad Prism (GraphPad

Software, LLC, USA) szoftvert használtunk, lineáris regressziót alkalmazva határoztuk meg a fehérjekoncentrációt (mg/ml).

Western blot analízis

A fehérjék szétválasztása méret szerint történt SDS-PAGE segítségével a Laemmli által (1970) leírt módon, 4-20%-os előre öntött Criterion géleken (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. (Lontay és mtsai, 2004)

A Western blot analízishez a fehérje lizátumokat 1:5 arányban 6× SDS mintapufferrel hígítottuk, majd 100 °C-on 5 percig denaturáltuk 100 °C-on. Minden mintából 30 µg fehérjét vittünk fel SDS-PAGE gélre. A fehérjéket elektroforetikus úton transzferáltuk nitrocellulóz membránra BioRad transzfer egységgel (Bio-Rad Laboratories, USA), 100 V-on, 90 percig, BioRad hűtőegységek (Bio-Rad Laboratories, USA) használatával (Murányi és mtsai, 1998). A membrán blokkolásához 5% zsírszegény tejport alkalmaztunk PBS-ben, amely 0,05% Tween 20-at tartalmazott (PBST). A blokkolás után a membránokat PBST oldattal mostuk 3x 5 percig, majd primer antitestekkel inkubáltuk 90 percig szobahőmérsékleten, vagy egy éjszakán át 4°C-on, amit HRP-konjugált szekunder antitestekkel való kezelés követett (3. táblázat). A fehérjesávokat a WesternBright ECL kemilumineszcens szubsztráttal (Advansta Inc., San Jose, CA, USA) tettük láthatóvá, és a képeket a ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA) készülékkel rögzítettük, és azokat Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories, USA) segítségével elemeztük. A kvantitatív Western blotokhoz gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz-t (GAPDH) használtunk belső kontrollként.

RNS izoláció

A teljes RNS-t a daganatokból, illetve a kontroll tüdőszövetből izoláltuk TRIzol reagens (Life Technologies, Carlsbad, CA) segítségével, a gyártó módosított protokollja szerint. A mintákat 200 µl TRIzol-ban homogenizáltuk TissueRuptor homogenizátor segítségével. A

sejtlizátumokat 200 µl kloroformmal kezeltük, majd 13000 rpm-en, 4 °C-on centrifugáltuk 15 percig. Az RNS-t tartalmazó fázishoz 500 µl izopropanolt mértünk hozzá, és a keveréket ismét 13000 rpm-en centrifugáltuk, 4 °C-on 10 percig. Az így kapott pelletet 75%-os etanolban átmostuk, majd ismét centrifugáltuk 13000 rpm-en, 4 °C-on 5 percig. A végső pelletet 10 µl nukleázmentes vízben oldottuk. Az RNS koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel mértük (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Reverz transzkripció kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

A reverz transzkripciót 1 µg teljes RNS felhasználásával végeztük minden mintából, cDNS szintéziskészlet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével, 37°C-on, 120 percen keresztül. Az így kapott cDNS-t templátként használtuk a kvantitatív PCR-ben, melyet a 2× Xceed qPCR SYBR Green Master Mix segítségével (Institute of Applied Biotechnologies, Prága–Strašnice, Csehország) végeztünk. A primer szekvenciák a 4. táblázatban találhatók. A PCR-amplifikáció LightCycler 480 rendszeren (Roche Applied Science, Penzberg, Németország) zajlott le, a következő hőciklus-beállításokkal: kezdeti denaturáció 95 °C-on 3 percig, majd 50 ciklus 95 °C-on 3 másodpercig, 60 °C-on 30 másodpercig, és 72 °C-on 90 másodpercig. A C_p -értékeket a GAPDH és a Cyclophilin A housekeeping gének mértani átlagához viszonyítva normalizáltuk.

4. táblázat: qPCR analízishez használt primer szekvenciák és jellemzőik

Gén	Írány	Szekvencia 5'→3'	Koncentráció reakciónként	T _m
Humán GAPDH	Előremenő	AGCCTCAAGATCAGCAATG	0,4 µM	52,6°C
Humán GAPDH	Visszamenő	ATGGACTGTGGTCATGAGTCCTT	0,4 µM	57,9°C
Humán Cyclophilin A	Előremenő	GTCTCCTTTGAGCTGTTTGCAGAC	0,4 µM	58,2°C
Humán Cyclophilin A	Visszamenő	CTTGCCACCAGTGCCATTATG	0,4 µM	56,7°C
Humán MYPT1	Előremenő	CAACAACCCTGACTACAACTAC	0,4 µM	60,0°C
Humán MYPT1	Visszamenő	TCTCCTTCTTTCTCCTCTTCTCT	0,4 µM	60,7°C
Humán PRMT5	Előremenő	CGGAGAAGGGCAGACTA	0,4 µM	52,4°C
Humán PRMT5	Visszamenő	CAATTTCAAGAGCCACTGC	0,4 µM	58,6°C
Humán PPM1B	Előremenő	GACTGAATCCCATAGAGAAA	0,4 µM	48,8°C
Humán PPM1B	Visszamenő	GCACCCAAAGTATCGCCAGAA	0,4 µM	57,8°C

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat tüdő planocelluláris- és adenocarcinómákból származó és ugyanazon betegek egészséges tüdőszövetéből vett kontroll szövetmintákon végeztük, melyekből formalinban fixált, paraffinba ágyazott metszetek készültek. Ezeket szilánnal bevont tárgylemezre helyeztük, majd levegőn történő száradás után frissen készített 1-4%-os paraformaldehid-oldattal TPBS-ben (Tris-pufferlt sóoldat) 1-10 percig fixáltuk.

A metszeteket kétszer 10 percig xilollalban inkubáltuk a paraffin eltávolításának céljából. Ezután lépcsőzetes alkoholos rehidrációt végeztünk szobahőmérsékleten az alábbi séma szerint: 100%-os etanol 2x5 percig, 96%-os etanol 1x5 percig, 70%-os etanol 1x5 percig, végül desztillált víz 1x5 percig. Az antigén feltárása nyomás alatt hevített kamrában történt, ezt követően a metszeteket alkoholos kezelés után citrát pufferbe (11 mM, pH 6,0) tettünk, melyet 29,4 g nátrium-citrát és 2,1 g citromsav 1000 ml desztillált vízben való feloldásával készítettünk el. Az aspecifikus kötőhelyek blokkolása céljából a metszeteket 1 órán át 5%-os szarvasmarha szérum albumin (BSA) oldattal inkubáltuk, melyet 1x TBST-ben hígítottunk. A metszeteket 48 órás inkubálást követően 4°C-on MYPT1, PRMT5 és PPM1B ellenes elsődleges antitestekkel kezeltük (3. táblázat), melyet 1:100 arányban hígítottunk BSA/Triton X-100/PBS oldatban. A továbbiakban torna peroxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitestekkel (3. táblázat) 1 órán

keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk a metszeteket, majd az immunjeleket DAB (3,3'-diaminobenzidin) szubsztrát segítségével tettük láthatóvá, mely a torna peroxidáz enzimmel történő barna színű csapadékot eredményezett. A színreakciót PBS-ben (pH 7,4) DAB- oldattal, sötétben, 5-10 perces inkubálással végeztünk, melyet mikroszkóppal követtünk. A reakciót desztillált vízzel történő öblítéssel állítottuk le. A 3,3'-diaminobenzidin (DAB) szubsztráttal való munka során a megfelelő laboratóriumi biztonsági előírásokat betartva, elszívófülkében történt a kísérlet. Az ellenfestést hematoxin-eozinnal végeztük. A kromogén jel kifejlődését Leica mikroszkóppal és Leica MC120 HD kamerával felszerelt rendszerrel vizualizáltunk (Leica Microsystems, Németország).

Immunfluoreszcens festés

A daganatos szövetekből (laphám és adenocarcinoma) és a hozzájuk tartozó, kontroll (egészséges) tüdőszövetből származó mintákat 4%-os paraformaldehid (PFA) oldatba helyeztük 4 órára 4 °C-on. A fixálás a szövetek 0,1 M foszfátpufferben (PBS; pH 7,4) történő mosása következett, majd 40-60 µm vastagságú metszetek készültek vibrációs mikrotómmal (Microm International GmbH, Walldorf, Németország). A metszetek öblítése elsőként PBS-ben, majd Tris-pufferes sóoldatban (TBS, pH 7,4) történt 10 percig. Az immunjelölést szabadon úszó metszeteken végeztük. A blokkolás és permeabilizálás TBS-ben, 10% normál borjúsérum és 0,1% Triton X-100 hozzáadásával történt (1 óra, 4 °C-on). Ezután a mintákat TBS-ben 1% normál ló- vagy kecskesérum és 0,1% Triton X-100 jelenlétében hígított elsődleges ellenanyagokkal (MYPT1, MYPT1^{pT853}, PRMT5 és PRMT5^{pT80}) (3. táblázat) inkubáltuk 24 órán át, 4 °C-on.

Az elsődleges ellenanyag-inkubáció után a metszeteket TBS-ben öblítettük, majd Alexa Fluor 488 és 546-konjugált egér, illetve nyúl IgG ellen termeltetett másodlagos ellenanyagokkal inkubáltuk TBS-ben, 1% normál lószérum és 0,1% Triton X-100 tartalommal 3 órán át. Ezután

a metszeteket ismét TBS-ben mostuk (3. táblázat). A sejtmagokat DAPI-val (4',6-diamidino-2-fenilindol; kék fluoreszcencia) festettük.

A képkalkotás a Leica SP8 konfokális mikroszkóp (Leica Microsystems, Németország) 40X-es objektívjével történt. A társfestett (co-lokalizált) pixelek jobb láthatósága érdekében az átfedési (overlay) képeken a zöld és piros csatornák intenzitását optimalizáltuk. Az optimalizálás során az egyik csatorna (zöld vagy piros) minden pixelének intenzitási értékét megszoroztuk egy azonos számmal, annak érdekében, hogy a módosított intenzitás maximum értéke megegyezzen a másik csatorna maximális értékével.

Kaplan-Meier túlélési analízis

A teljes túlélés (OS) és a betegségmentes túlélés (DFS) a betegek bevonásától 2024. júliusáig került meghatározásra, melyeket hónapokban adtunk meg. Az eredményeket Kaplan-Meier görbéken ábrázoltuk a szövettani altípus és a molekuláris marker expressziója alapján. A laphám (SCC, piros) és adenocarcinómás (ADC, fekete) betegeket a MYPT1, PRMT5, H2A és PPM1B relatív expressziós szintje, valamint a MYPT1^{pT853} és PRMT5^{pT80} relatív foszforilációs státusza, illetve a H2A szimmetrikus dimetilációja alapján csoportosítottuk. Minden molekuláris paraméter esetében a betegeket „magas” és „alacsony” csoportba soroltuk, melyhez az egész kohorsz medián értékét vettük határértéknek. A csoportok közötti túlélési különbségeket log-rank (Mantel-Cox) teszttel elemeztük, a $p < 0,05$ értéket vettük statisztikailag szignifikánsnak. A log-rank teszt statisztikáját a khi-négyzet eloszlás alapján interpretáltuk.

Statisztikai analízis

Az immunblotok denzitometriai analízisét az ImageJ szoftverrel végeztük (NIH, Bethesda, MD, USA). A kvantitatív adatokat oszlopdiagramokon ábrázoltuk, melyeket a GraphPad Prism 8 szoftverrel készítettük (GraphPad Software, San Diego, CA, USA); és a statisztikai elemzéshez is ezt a szoftvert használtuk. A foszforilált fehérjeszinteket a hozzájuk tartozó teljes

fehérjeszintekhez viszonyítva normalizáltuk, és relatív értékeként adtuk meg. A teljes fehérjeexpressziót a GAPDH betöltési kontrollhoz normalizáltuk, és szintén relatív értékeként ábráztuk. Az adatokat oszlopdiaagrammon ábráztuk, ahol egy oszlop az átlagot $\pm$ szórás (SD) jelöli, az „n” pedig a független biológiai ismétlések számát jelenti. Két csoport összehasonlításához párosítatlan, kétoldali t-próbát alkalmaztunk, míg két csoportnál többet érintő elemzésekhez egy- vagy two-way ANOVA-t, Tukey-féle többszörös összehasonlító próbával. A kiugró értékeket a Grubbs-teszt alapján azonosítottuk és kizártuk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Funkcionális virtuális bronchoszkópia: módszertani beállítások

A módszer kidolgozása során tüdőgyógyász/bronchológusként a betegek kiválasztásában, a betegadatok gyűjtésében, a konvencionális bronchoszkópia végzésében, a hörgő anatómia egyeztetésében vettem részt. A bronchoszkópia során szerzett tapasztalataim megosztásával segítettem a hörgőrendszerben való tájékozódásban, mely kritikus a virtuális bronchoszkópia rekonstrukciója során. A munka során a készülő képi modellekről konzultáltunk.

Tüdődaganat irányú kivizsgáláson áteső betegek közül 22 beteg (11 nő és 11 férfi) került beválasztásra, akiknél PET/CT és hdCT vizsgálat történt. A hdCT képek Siemens Emotion 16 készülékkel (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Németország) készültek, azonban előfordult, hogy egyes betegek hdCT vizsgálatai nem Klinikánkon, hanem másik intézetben, eltérő berendezéssel történtek. Az ldCT és PET vizsgálatokat Philips GEMINI TF TOF 64 PET/CT készülékkel (Koninklijke Philips N.V., Amszterdam, Hollandia) történtek. Az ldCT és hdCT képalkotás kevesebb mint 1 év eltéréssel történt. A vizsgálati feltételek nem voltak standardizálva, gondolva itt a betegek eltérő pozíciójára, légzésfázisára.

A virtuális bronchoszkópia elkészítéséhez a hdCT és ldCT képek regisztrációjára volt szükség, mely elastix algoritmussal történt. A funkcionális információ (PET képek) már eleve regisztrálva voltak a ldCT-hez. A regisztráció eredményét radiológus ellenőrizte. A megfelelő

regisztrációhoz szegmentált hdCT tüdőkép elkészítésére volt szükség az M-SEGM algoritmus segítségével, mely a -1000 és -400 HU közötti intenzitású voxelokat választotta ki, ezek képviselik a hörgői légutakat és a parenchymát. A folyamat első lépéseként a tüdőkép nem szegmentált voxelok intenzitása a nulla, míg a szegmentált voxelok az egy értéket kapták, így létrehozva egy tüdőmaszkot („lung-mask”). Ezután a tüdőmaszk intenzitásértékeinek és az ldCT vagy hdCT voxel intenzitásainak szorzataként álltak elő a tüdőmaszkolt ldCT és hdCT képek, ezekkel történt a regisztráció. A működő tüdőmaszk létrehozásához az elastix mellé egy speciális alkalmazás kifejlesztése történt, mely eltávolít minden nagyobb megszakítást, és hozzáadja a mediastinális voxelokat a tüdőmaszkhoz. A hörgőfa szegmentálása az ldCT és hdCT képekről módosított GeoS 2.2 Microsoft szoftverrel (Microsoft Corporation, USA), vagy alternatívaként saját (Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Orvosi Képkalkotó Intézet - Nukleáris Medicina Nem Önálló Tanszék), region-growth alapú szegmentáló módszerrel (multi-SEGmentation: M-SEGM, a M3I keretrendszer része) történt, mely egy voxelintenzitás-alapú iteratív eljárás, mely még fejlesztés alatt van. Az M-SEGM alkalmazásával lehetővé vált a hdCT légsőfa szegmentálása egészen a szegmentális hörgők eredetéig.

A légúti fa és felületmodell a szegmentált légúti voxelekből, szeletenként meghatározott súlypontok összességéből, más néven csontvázból épül föl. A hörgőcsontváz lehetővé teszi, hogy egy virtuális kamera könnyen bejárja a hörgőfát, megfigyelve a légút szerkezetét és működését. A hörgőfa ágaképződési pontjainak száma, mint pontosan meghatározott anatómiai helyek, szintén könnyen megszámlálható a csontváz segítségével. A hörgőfa szegmentáció eredménye bemenetként szolgált a marching cubes algoritmushoz, mely háromdimenziós felületmodellt generált (nagyszámú háromszöggel) a légút burka mentén. A felületmodell háromszögeinek száma egy háló egyszerűsítő algoritmussal csökkenthető volt. A szöveti anyagcserét jelző FDG-halmozás merőlegesen került a 3D felületmodellre, a felülettől

legfeljebb 10 mm távolságra lévő voxelokat tartalmazta, mely a transzbronchiális tű hatótávolsága. Az érintett erek is szegmentálásra kerültek.

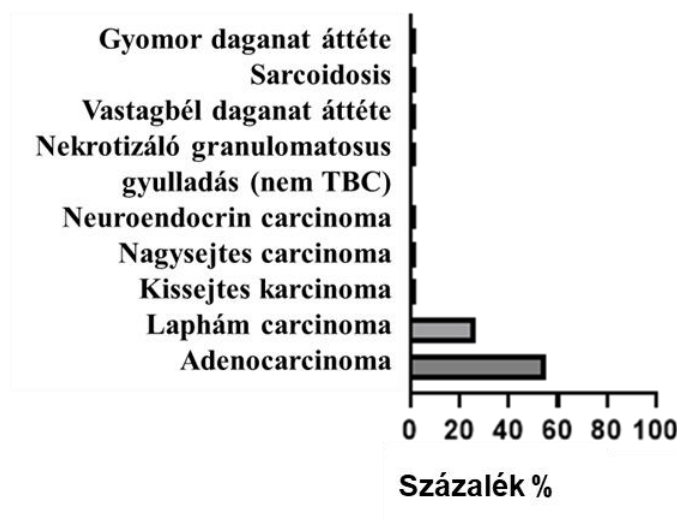
A regisztráció ellenőrzését eredetileg egy radiológus szakértő végezte, azonban ez a döntés gondos, időigényes munkát igényelt, és személyfüggő, szubjektív is, emiatt egy gyorsabb, objektív módszerre volt szükség. Bevezetésre került egy numerikus paraméter, a D-pontszám, mely a regisztráció minőségét jellemzi. Ezt 25 különböző távolságtípusú mennyiségből állt össze, melyek valódi mm-ben mért távolságokon alapultak. Egy orvosi képalkotásban jártas szakember azonosította a bifurkációt, a fő, lebenyi és szegmentális hörgők eredési pontjait, megjelölte az összes lumen középpontját a hdCT-n, majd ellenőrizte a pontok helyzetét ldCT esetében is. A légcső és főhörgők esetén a lumen középpontok távolsága mm-ben került meghatározásra a regisztrált hdCT és ldCT képpárok között. Minden kisebb hörgő esetében ellenőrzésre került, hogy a hdCT-n megjelölt pont a megfelelő ldCT hörgő lumenben van-e. Ha igen, az adott távolságtípus értéke 1 lett, egyébként 0. A cél az ldCT és hdCT kép-párok (nem)egyezőségét azonosítása volt, hogy egy numerikus érték kiszámítható legyen, mely hat paraméterből áll: Pearson korrelációs együttható, kölcsönös információ (MI), normalizált kölcsönös információ, Kullback-Leibler divergencia, L1 norm, L2 norm négyzet. Az objektív regisztrációs minőség létrehozásához abszolút távolságokat kerültek meghatározásra a regisztrált képek megfelelő pontjai között, megvizsgálva azt, hogyan korrelálnak a (nem)egyezőség paraméterei és a regisztráció minőségének mértéke a koherens ldCT és hdCT képpárok esetében. Közeli és alacsony korrelációk elfogadható, illetve nem megfelelő regisztrációkra utaltak.

Eredmények

A beválasztott betegek klinikai adatai

A szövettani megoszlást tekintve a 38 betegről gyűjtött daganatos minták közül a leggyakoribb az adenocarcinoma volt (21 beteg, 55,26%), ezt követte a laphám daganat (10 beteg, 26,31%). Tekintettel arra, hogy nem minden betegnek volt a sebészeti beavatkozás előtt lehetőség a szövettani igazolásra, így az NSCLC daganatokon kívül számos más szövettani eredménnyel is találkoztunk vizsgálatunk során. Ezek a következők voltak: kissejtes carcinoma, nagysejtes carcinoma, neuroendocrin carcinoma, vastagbél daganat áttéte, gyomor daganat áttéte, nekrotizáló granulomatosis gyulladás, mely nem felelt meg TBC-nek, valamint sarcoidosis. A továbbiakban csak az NSCLC szövettannal rendelkező betegek mintáit dolgoztuk föl. A további szövettani megoszlást a 5. táblázatban és a 16. ábrán mutatjuk be.

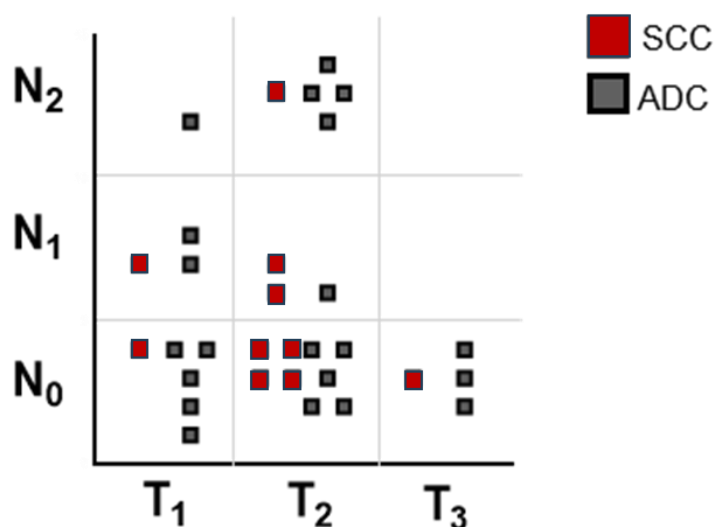
5. táblázat: A műtétet követő szövettani megoszlás		
Szövettani típus	Az érintett betegek száma	Százalékos arány (%)
Adenocarcinoma	21	55,26
Laphám carcinoma	10	26,31
Kissejtes carcinoma	1	2,63
Nagysejtes carcinoma	1	2,63
Neuroendocrin carcinoma	1	2,63
Nekrotizáló, granulomatosis gyulladás (nem TBC-nek véleményezték)	1	2,63
Vastagbél daganat áttéte	1	2,63
Sarcoidosis	1	2,63
Gyomordaganat áttéte	1	2,63



16. ábra A szövettani megoszlás grafikus ábrázolása. Y tengelyen az egyes szövettani típusok, az x tengelyen a százalékos megoszlás látható.

A klinikai adatok gyűjtése során a patológiai stádiumok is meghatározásra kerültek, az akkor érvényben lévő TNM 8. kiadás alapján (Asamura és mtsai, 2015). Az egyes stádiumok megoszlását az 6. táblázatban mutatjuk be részletesebben, illetve grafikusan a 17. ábrán is látható.

6. táblázat: a patológiai stádiumok megoszlása TNM 8. kiadása szerint		
Patológiai stádium	Betegek száma	Százalékos arány (%)
T1bN0M0	2	5,26
T1cN0M0	5	13,16
T1cN1M0	3	7,89
T1cN0M0	1	2,63
T2aN0M0	9	23,68
T2aN2M0	3	7,89
T2bN0M0	2	5,26
T2bN1M0	3	7,89
T2bN2M0	2	5,26
T3N0M0	4	10,53
TNM nem került meghatározásra, mivel nem tüdődaganatos minta	4	10,53

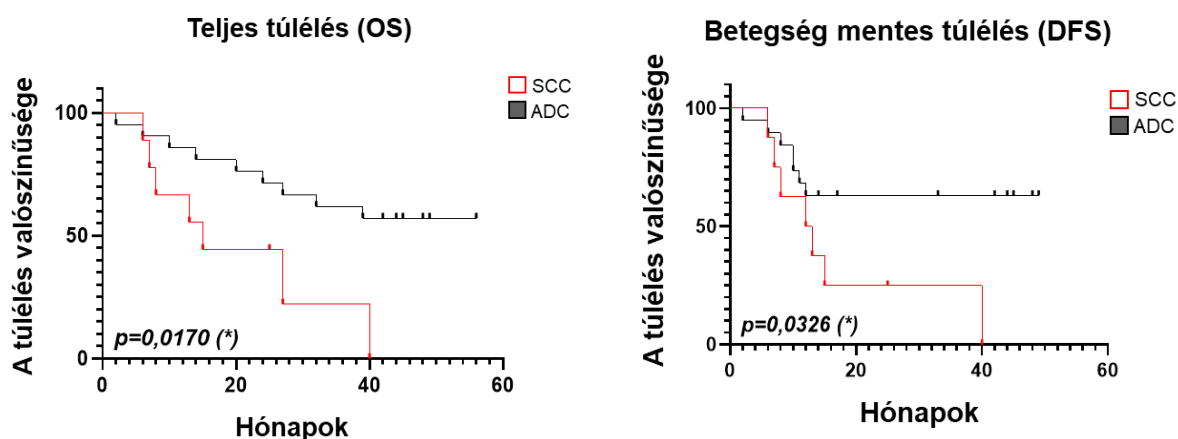


17. ábra. Az egyes patológiai stádiumok megoszlása szórásdiagrammon ábrázolva. T (T1-T3) és N (N1-N3) kategóriák eloszlását mutatja a szövettani altípusok (SCC és ADC) szerint. Az ábrán az M kategóriát nem tüntettük fel, mivel ez egyik beteg esetében sem volt releváns, betegeinknek távoli áttéte nem volt.

A T kategóriák között a T2 volt a leggyakoribb (17 beteg – 54,84%), ezt követték a T1-es tumorok (10 beteg – 32,26%) és legkevesebben a T3 méretű tumorral rendelkezők voltak (4 beteg – 12,91%). A betegek jelentős részének nem igazolódott nyirokcsomó metasztázisa, így 19 betegnél (61,29%) N0 kategória került megállapításra. 6 beteg (19,35%) esetén hilaris ipszilateralis nyirokcsomó került véleményezésre, ez N1 kategóriát jelentett, valamint további 6 (19,35%) beteg esetében sajnos már ipszilateralis mediastinalis nyirokcsomó áttét is látszott a patológiai feldolgozás során, ez N2 besorolást jelentett. Az N2-es betegek nagy részének T2-es primer tumora volt. A daganatok grádus szerinti megoszlása a következő volt: G1 3 beteg esetén (8,82%), G2 18 beteg esetében (52,94%) és G3 13 esetben (34,21%). A vizsgált populációban néhány daganat rendelkezett csak terápiás célpontot képző, driver mutációval. 3 beteg esetében találtak ALK mutációt és 1 esetben EGFR aktiváló mutációt (ez 19-es deléción volt).

A túlélési adatokat is elemeztük, melyek korrelációit az egyes fehérjék expressziójával is a későbbiekben összevetettünk. A teljes túlélés vizsgálata a klinikai onkológiában a gold

standard, hiszen minden erőfeszítésünk leginkább azt célozza, hogy betegeink minél hosszabban túléljék betegségüket, természetesen a legjobb elérhető életminőségben. (Blumenthal és mtsai, 2015) A korai tüdőrákban szenvedő betegek esetében, akik R0 reszekción estek át az esemény/betegség mentes túlélés (DFS), tehát a recidiváig vagy halálig eltelt idő is rendkívül fontos (Yue és mtsai, 2022). A túlélési adatok a 18. ábrán láthatóak.

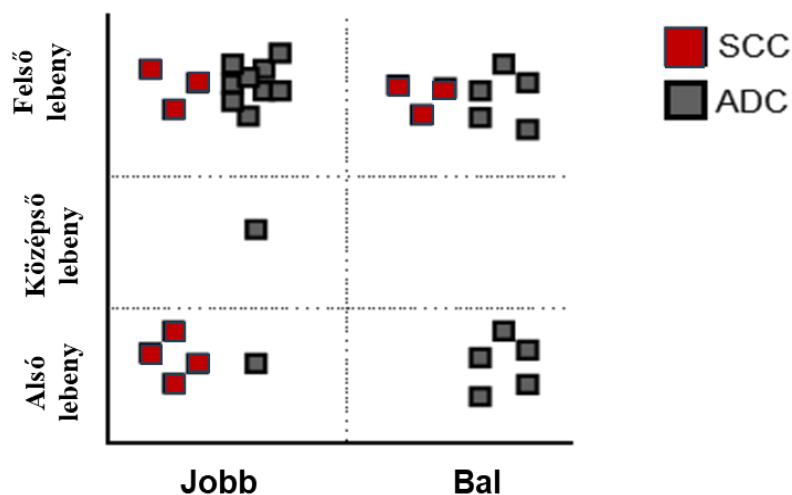


18. ábra. Kaplan-Meier túlélési görbéken láthatók a betegek teljes túlélése (OS) és betegségmentes túlélése (DFS). A túlélési valószínűséget az idő (hónapokban, a vizsgálatba való bevonástól számítva) függvényében. ADC fekete, SCC piros színnel ábrázolva. A túlélési görbék statisztikai összehasonlítása log-rank (Mantel-Cox) teszttel történt. A szignifikáns eltéréseket csillaggal jelöltük, ahol $*p < 0,05$. A log-rank teszt statisztikája megközelítőleg a Khi-négyzet értékének felel meg.

A median OS 44 hónap volt az adeoncarcinómás betegek körében és 20 hónap volt a laphám carcinómás betegnél ($p=0,0170$). A medián DFS 17 hónap volt az adenocarcinoma és 14 hónap a laphám carcinómás betegek körében ($p=0,0326$). Mind az OS mind a DFS az adenocarcinómás betegek esetén volt kedvezőbb. Az adatgyűjtés időszaka alatt a 38 betegből 13 veszítette életét (34,21%), 15 beteg (39,47%) életben van és nem recidivált, valamit a további még életben lévő 10 beteg (26,31%) recidivált.

A tumorok elhelyezkedését is összehasonlítottuk. A nemzetközi szakirodalomnak megfelelően a legtöbb esetben jobb felső lebenyi kiindulású volt a folyamat, 12 beteg esetében, mely 39%-ot jelentett (Mazzone és Lam, 2022). 8 betegnél a daganat bal felső lebenyi elhelyezkedésű volt (26%). Egy beteg esetében jobb középső lebenyben fedeztük fel a daganatot

(3%). A jobb és bal alsó lebenyi elhelyezkedést 5-5 beteg esetén tapasztaltunk (16-16%). A 19. ábrán látható az elhelyezkedés megoszlásának grafikus ábrázolása, melyen az adenocarcinomás és laphám carcinomás eseteket is elkülönítettük.



19.ábra: A daganatok lebeny szerinti elhelyezkedése. A sötét színű pontok az adenocarcinómák (ADC és A), a piros pontok a laphám carcinómák (SCC és P). 1 pont 1 betegnek/tumornak felel meg.

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

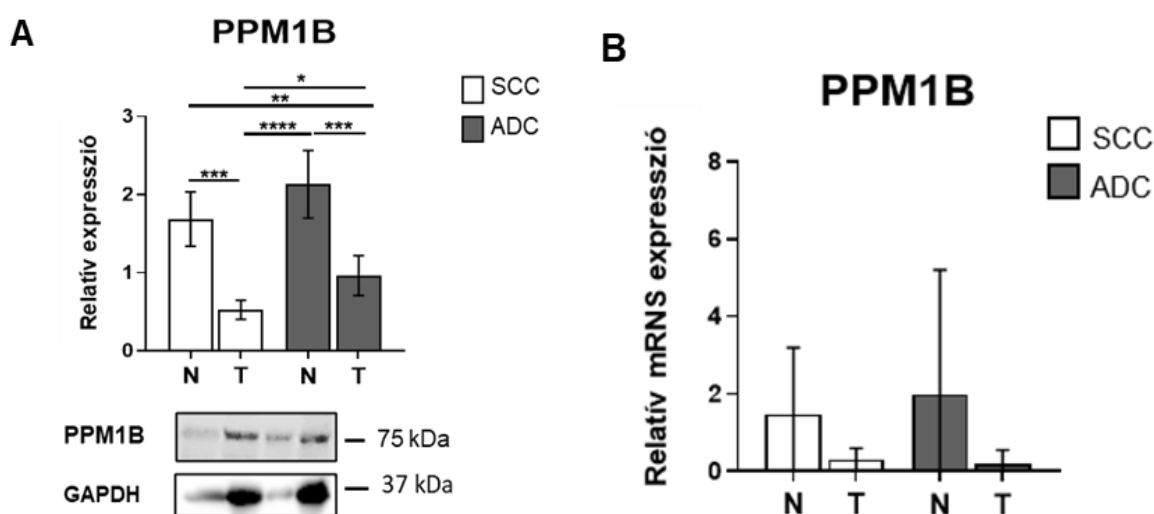
Vizsgálatunk során 38 operált betegminta közül további elemzéseket a leggyakoribb szövettani altípusokon, az adenocarcinoma (55,26%) és laphámsejtes carcinoma (26,31%) mintákon végeztünk.

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatait során azonosította a PPM1B fehérjét, ami a MP/PRMT5/hisztin jelátviteli útvonal felsőbb szabályozójának igazolódott, mely a carcinogenezist tekintve új mechanizmust jelent a HeLa sejtek és méhnyakrák esetén. (Keller és mtsai, 2025)

Az ADC és SCC szövetmintákat, illetve az ugyanabból a betegből vett egészséges tüdőszövetmintákkal összehasonlítva vizsgáltuk semi-quantitatív Western blot analízissel. A vizsgálat során anti-PPM1B primer antitestet és GAPDH belső kontrollt alkalmaztunk.

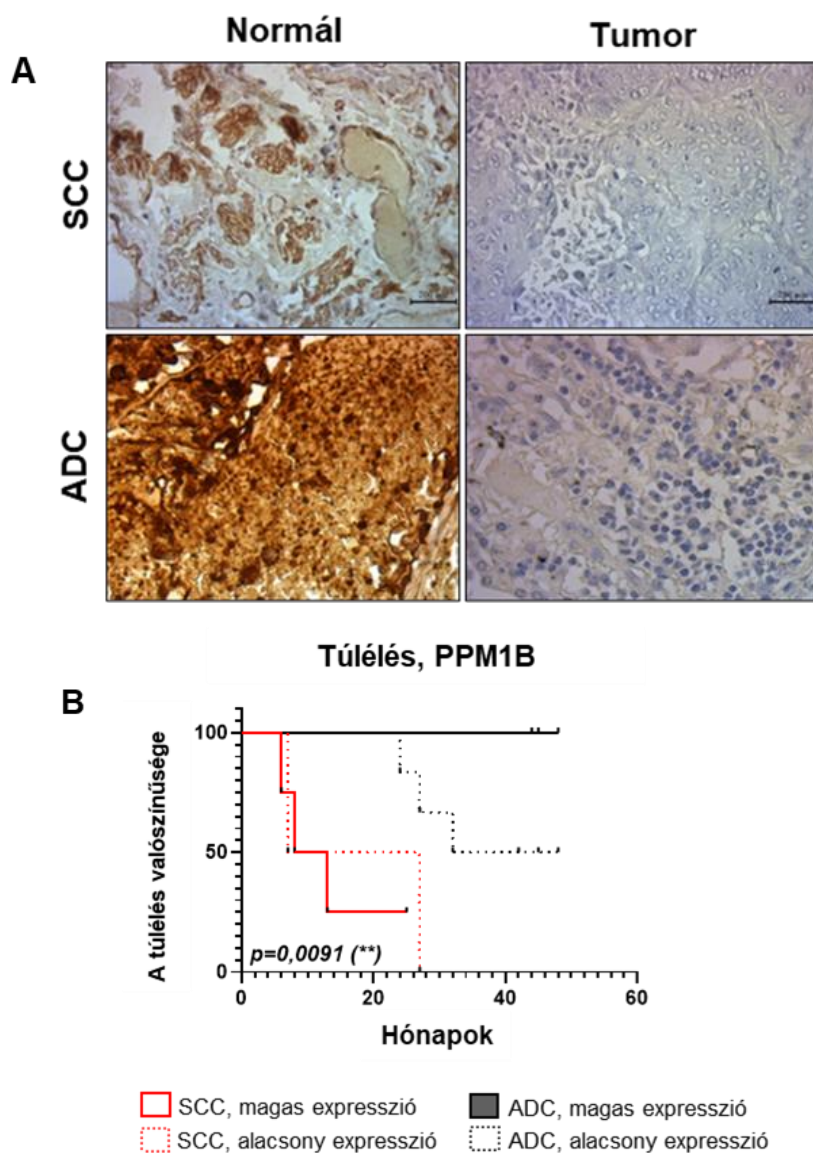
A 20. ábra A panelje mutatja a PPM1B relatív fehérje expressziót, ahol a PPM1B expresszió csökkenését tapasztaltuk mindkét daganattípus esetében a saját kontroll mintákkal összehasonlítva. Az SCC minták esetén 69%-os csökkenést (0,31-szoros érték; $p=0,0009$), míg ADC szövetekben 55%-os csökkenést (0,45-szoros érték; $p=0,0003$) tapasztaltunk. Összehasonlítva a két daganattípust az SCC szövetekben a PPM1B expresszió 46%-kal volt kevesebb (0,54-szoros érték; $p=0,029$) az ADC minták átlagos expressziós szintjéhez képest.

Eredményeink megerősítéséhez RT-PCR analízist alkalmaztunk, azonban a PPM1B mRNS expresszióját tekintve (20. ábra B panel) statisztikailag szignifikáns különbség az mRNS szintek között nem volt kimutatható.



20. ábra: A PPM1B fehérje és mRNS relatív expressziója laphámcarcinoma (SCC) és adenocarcinoma (ADC) tüdődaganatos mintákban. (A) ADC és SCC daganatokból (T jelzéssel ellátott oszlopok) és a hozzájuk tartozó tüdőszövetekből (N jelzéssel ellátott oszlopok) származó fehérje lizátumok SDS-PAGE elválasztását követő Western blot vizsgálata történt anti-PPM1B antitest használatával. GAPDH-t használtunk belső kontrollként. A PPM1B relatív fehérjeexpresszióját oszlopdiagramok szemléltetik (átlag $\pm$ SD, csoportonként $n=5-7$). A statisztikai szignifikancia szintje: $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**), $p<0,001$ (***), $p<0,0001$ (****). **(B)** A PPM1B mRNS expressziójának ADC, SCC tu moros és kontroll minták RT-PCR-rel történő meghatározása. A Cp-értékeket a GAPDH és a Cyclophilin A háztartási génekhez normalizáltuk, és relatív expressziós értékeként ábráztuk. Az oszlopok elnevezése megegyezik A panelen alkalmazottakkal. Az eredményeket oszlopdiagramokon ábráztuk (átlag $\pm$ SD, csoportonként $n=3-4$). A több csoport közötti statisztikai összehasonlításokat egyutas vagy kétutas ANOVA-val, majd Tukey-féle többszörös összehasonlítási teszttel végeztük; két csoport összehasonlítása párosítatlan, kétoldali t-tesztel történt.

Vizsgálati eredményeinket immunhisztokémiai vizsgálattal is alátámasztottuk SCC, ADC és az egészséges tüdőszöveti mintákon egyaránt, ezeken jól látható a PPM1B expresszió különbsége. A normál szövetekben erősebb volt a DAB jel, mint a daganatos mintákban, ami az egészséges tüdőszövetekben lévő magasabb a PPM1B expresszióra utal (21. ábra A panel).



21. ábra: A PPM1B expressziójának összefüggése a túléléssel laphámkarcinoma (SCC) és adenocarcinoma (ADC) tüdődaganatos mintákban. (A) Reprezentatív immunhisztokémiai képek DAB-festett (barna színreakció) SCC, ADC daganat és a megfelelő egészséges kontroll tüdőszövetekről, anti-PPM1B elsődleges antitest alkalmazásával. Méretarány: 200 μ m. (B) Kaplan-Meier túlélési görbék az SCC vagy ADC betegek teljes túléléséről, a PPM1B expressziós szintjei alapján. A túlélés valószínűségét az idő (hónapokban megadva, a vizsgálatba való belépéstől számítva) függvényében. SCC: piros; ADC: fekete színekkel jelölve, alacsony vagy magas PPM1B expressziós szint alapján tovább bontva (a teljes kohorsz mediánértékét használva) láthatók. A túlélési görbéket log-rank (Mantel-Cox) teszttel hasonlítottuk össze. A statisztikailag szignifikáns különbségeket $p (<0,01)$ (**) -al jelöltük. A log-rank teszt statisztikája közelíti a Khi-négyzet eloszlást.

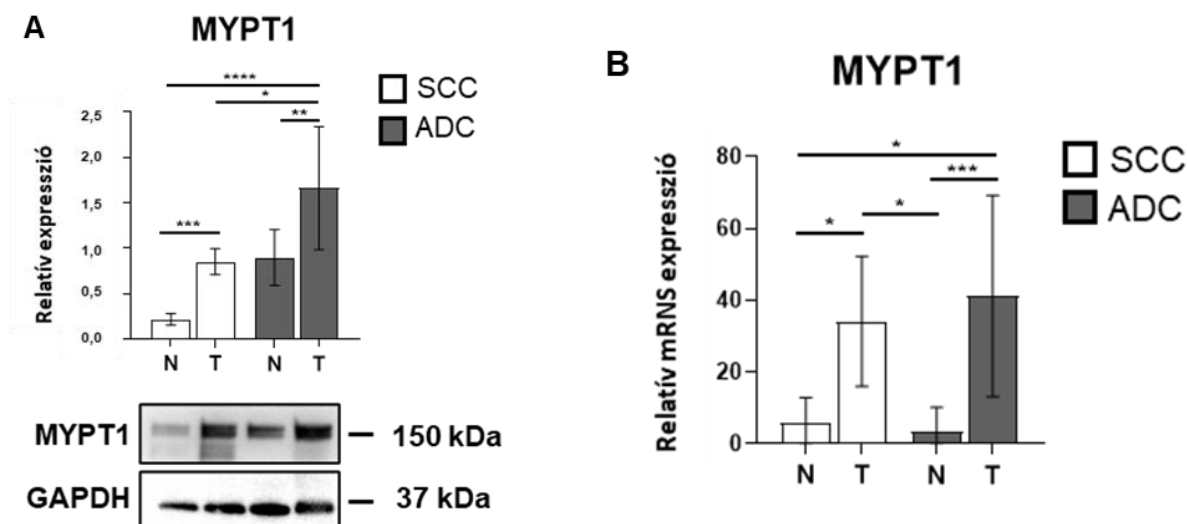
A PPM1B expressziójának prognosztikai szerepét is fel kívántuk mérni. Az SCC és ADC szövettani altípusú betegeket a teljes betegcsoport medián PPM1B expressziója szerint tovább bontottuk alacsony- és magasan expresszáló alcsoportokra. Kaplan-Meier túlélési analízist használtuk a kérdés megválaszolására. A számítások alapján szignifikáns összefüggést találtunk az OS, a daganat típusa (SCC vagy ADC) és a PPM1B relatív expressziója között ($p=0,0091$) (21. ábra B panel). Az alcsoportok között a PPM1B-t magasan expresszáló ADC betegeknél figyeltük meg a leghosszabb medián túlélést (45 hónap), őket követték az alacsonyan expresszáló ADC betegek (37 hónap). Szignifikáns túlélési különbséget találtunk az SCC és ADC magasan expresszáló csoportjai között is ($p=0,04$). Mindkét SCC alcsoport rövidebb OS-t mutatott. A medián OS 17 hónap volt az alacsonyan expresszáló, és 10,5 hónap volt a magasan expresszáló SCC csoportban.

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

A PPM1B-által szabályozott jelátviteli útvonal következő eleme a MYPT1, a MP szabályozó alegysége. Korábbi vizsgálatok során már fény derült a MP tumorsuppresszor szerepére, melyet azáltal tölt be, hogy defoszforilálja a PRMT5 aktiváló foszfo-Thr80 helyét. A jelenséget HCC esetén figyelték meg (Sipos és mtsai, 2017). Tanulmányunk során ezen szabályozási mechanizmus jelenlétét vizsgáltuk tüdő adeno- és laphámcarcinomák esetén.

A MYPT1 fehérje expressziója egyaránt növekedett mind az SCC, mind az ADC daganatos mintákban: SCC esetén 3,93-szorosára ($p=0,0002$), míg ADC esetén 1,96-szorosára ($p=0,003$) a kontroll szövetekhez képest (22. ábra A panel). Emellett az SCC daganatos mintákban a MYPT1 expresszió 51%-kal alacsonyabb volt (0,49-szoros érték; $p=0,02$) az ADC-s betegek daganatos szöveteihez képest. A MYPT1 mRNS expresszióját kvantitatív RT-PCR-rel módszerrel határoztuk meg. (22. ábra B panel) 12,11-szoros ($p=0,0008$) és 5,68-szoros

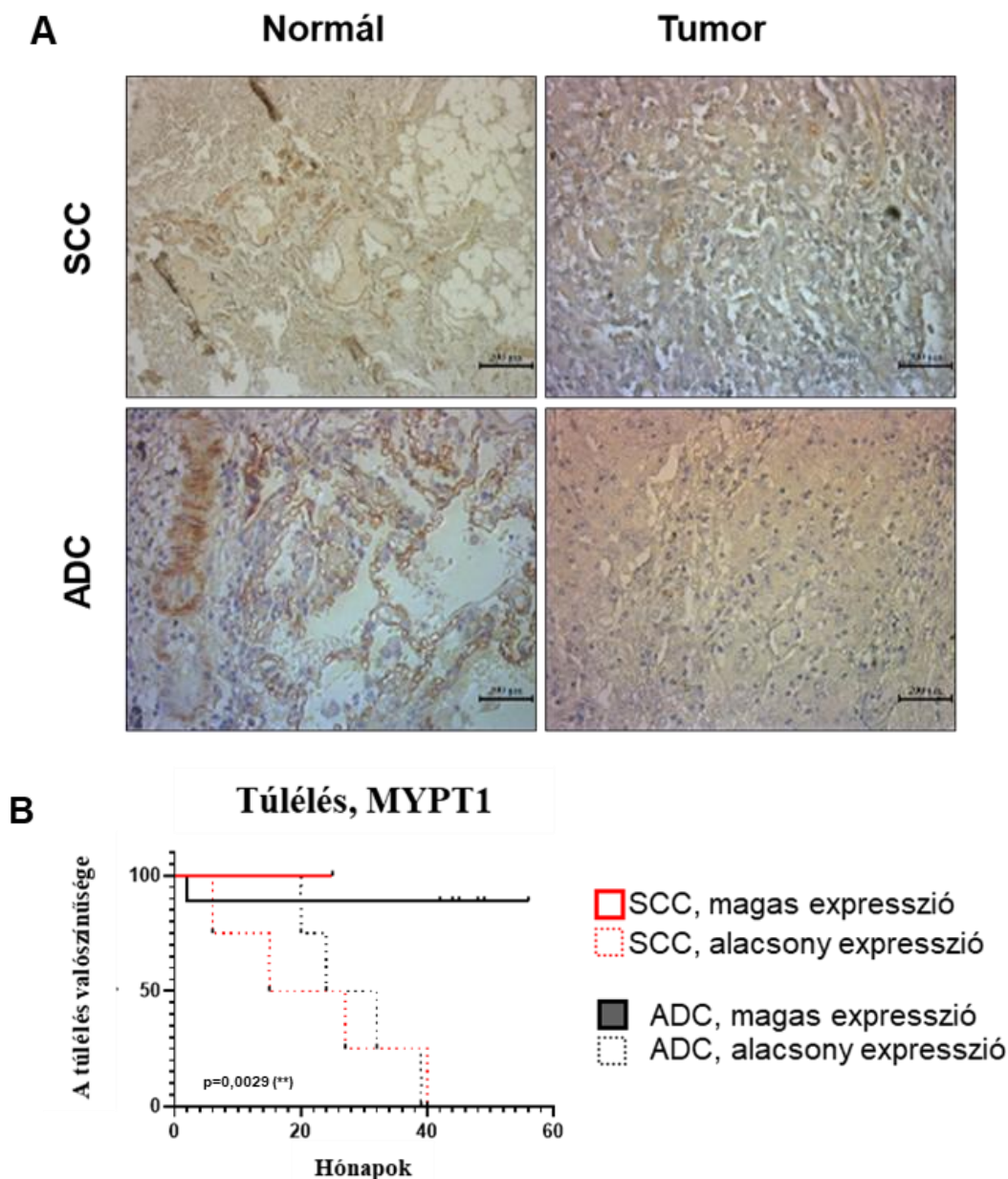
($p=0,0334$) növekedés volt látható ADC és SCC szövetekben a megfelelő kontroll mintákhoz képest. Az ADC daganatos szövetekben a MYPT1 mRNS expressziója 6,86-szor magasabb volt, mint az SCC-s betegek kontroll szöveiben ($p=0,016$), míg az SCC szövetekben 10,03-szor magasabb volt, mint az ADC-s betegek kontroll szöveiben ($p=0,05$).



22. ábra. A MYPT1 fehérje és mRNS relatív expressziója tüdő laphám- (SCC) és adenocarcinoma (ADC) esetén. (A) SCC és ADC szövetekből, valamint ezek kontroll szöveiből származó fehérjekivonatokat SDS-PAGE elválasztást követően Western blot módszerrel vizsgáltuk anti-MYPT1 antitest segítségével, GAPDH belső kontroll mellett. Az eredmények oszlopdiagramokon ábrázoltuk, az átlag $\pm$ SD értékekkel ($n=8-19$). A fehér oszlopok a SCC (T) és a megfelelő kontroll (N), a fekete oszlopok az ADC (T) és a megfelelő kontroll (N) szövetek eredményeit mutatják. (B) A MYPT1 mRNS relatív expresszióját RT-PCR-rel határoztuk meg ADC és SCC és kontroll szövetmintákon. A Cp értékeket a GAPDH és Cyclophilin A háztartási génekhez igazítottuk, az eredményeket oszlopdiagramon ábrázoltuk (átlag $\pm$ SD, $n=3-10$). A csoportok közötti különbségeket egy- vagy kétutas ANOVA és Tukey-féle post hoc teszt, illetve párosítatlan kétoldali t -teszt segítségével értékeltük. Statisztikai szignifikanciaszintek: (*) $p<0,05$, (**) $p<0,01$, (***) $p<0,001$, (****) $p<0,0001$.

A 23. ábra A paneljén az SCC, ADC és normál szövetek IHC képeit mutatjuk be, melyeket MYPT1-re teszteltünk. A DAB jelintenzitása mindkét kontroll szövetcsoportban hasonlóan erős volt. A daganatos szövetekben a MYPT1 festődés szintén erős volt. ADC esetén kifejezettebb jelintenzitás látszott, mint az SCC szövetekben, ami magasabb MYPT1 fehérjeszintre utal ADC szövetekben. Ezt az eredményt megerősítette a MYPT1 (zöld) immunfluoreszcens festése is, DAPI-val (kék) társítva a sejtmagok festésére (28. ábra B panelje).

Kaplan-Meier túlélési analízis segítségével vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a MYPT1 expresszió és az OS között (23. ábra B panelje). Az előző fejezethez hasonlóan az SCC és ADC betegcsoportokat magasan és alacsonyan MYPT1 fehérjét expresszáló csoportokra osztottuk,



23. ábra. A MYPT1 expressziójának összefüggése a túléléssel tüdő laphám- (SCC) és adenocarcinoma (ADC) esetén. (A) Reprezentatív DAB-alapú immunhisztokémiai képek MYPT1 festéssel SCC és ADC tumoros, valamint egészséges kontroll szöveteikből. Méretarány: 200 μ m. (B) Kaplan-Meier túlélési görbék SCC és ADC betegek körében, MYPT1 expresszió alapján. Az időt hónapokban adtuk meg a bevételestől számítva. A betegeket szövettani típus szerint (SCC: piros; ADC: fekete), a MYPT1 expressziót a mediánérték alapján alacsonyan és magasan expresszáló csoportok szerint ábrázoltuk. A túlélési különbségeket log-rank teszttel értékeltük (** $p<0,01$). A teszt statisztikája a Khi-négyzet eloszláshoz közelít.

az egész kohorsz medián relatív expressziós szintje alapján. A log-rank teszt szignifikáns összefüggést mutatott a túlélés és a MYPT1 expresszió között ($p=0,003$). Az ADC betegek MYPT1-et magasan expresszáló alcsoportjának medián OS értéke 45 hónap volt, míg az alacsonyan expresszáló csoporté 28 hónap. Az SCC csoportban az alacsonyan és magasan expresszáló alcsoportok esetén a medián OS értékei 21 és 25 hónap volt ($p=0,006$).

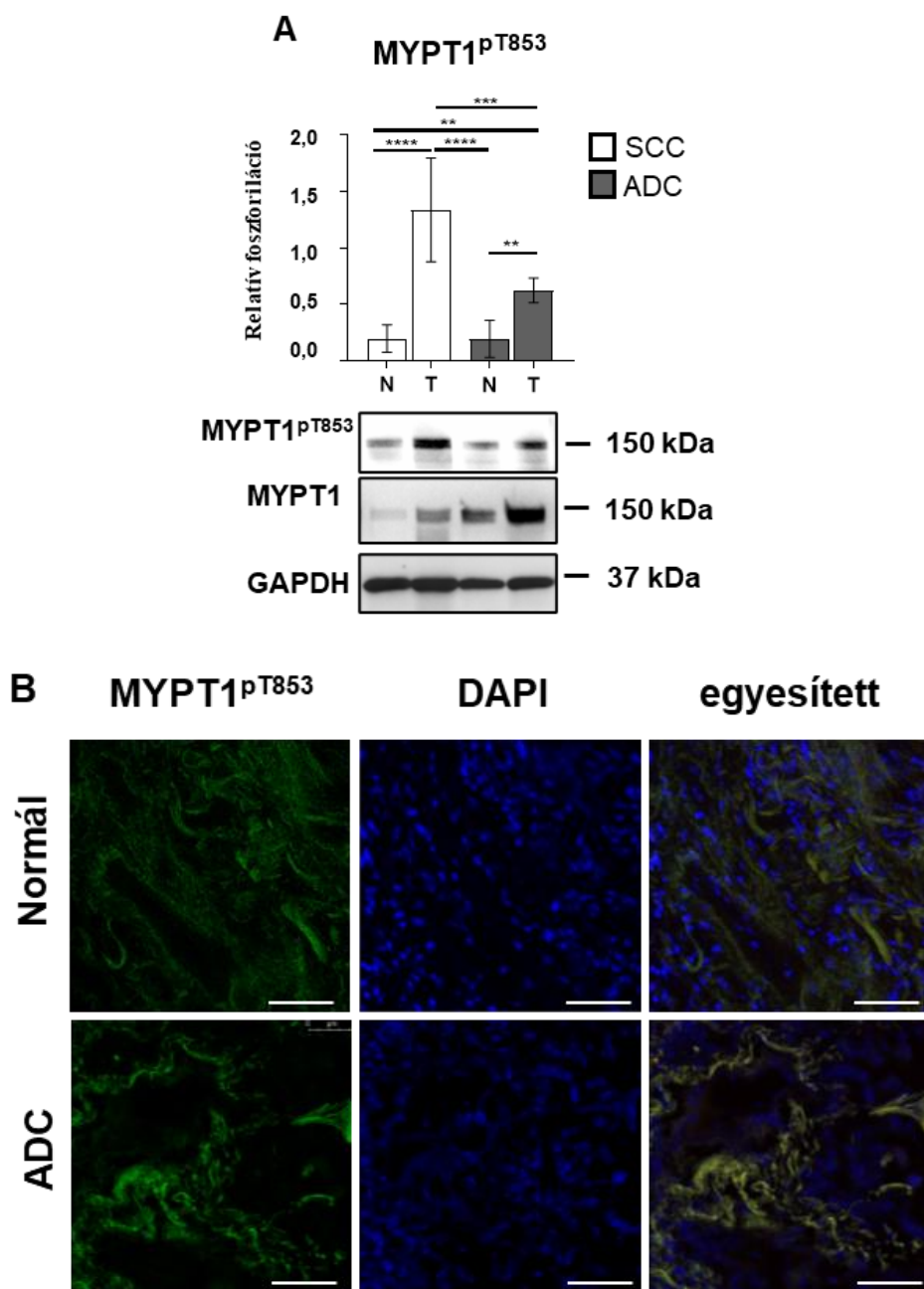
A MYPT1 Thr⁸⁵³ gátló oldalláncának foszforilációja emelkedett a tüdőrákos szövetmintákban

A MYPT1 Thr⁸⁵³ oldalláncon történő fokozott foszforilációja az MP holoenzim aktivitásának csökkenését okozza (Gao és mtsai, 2016; Hartshorne és mtsai, 1998), ami a PRMT5 Thr80 aminosavmaradék defoszforilációjának csökkenéséhez vezet. Tekintettel arra, hogy az előbb említett PRMT5 Thr80-oldallánc foszforilációja aktiváló hatású, az MP gátlása a PRMT5 enzim aktivitásának növekedését okozza (Sipos és mtsai, 2017).

Az előző vizsgálatokhoz hasonlóan itt is értékeltük a MYPT1 Thr⁸⁵³ oldalláncon történő relatív foszforiláció mértékét (24. ábra A panelje). Elemzésünk során azt találtuk, hogy a MYPT1 Thr⁸⁵³ foszforilációjának aránya 6,89-szoros, szignifikánsan növekedést mutatott az SCC tumoros szöveiteiben, illetve 6,98-szoros növekedést az adenocarcinomás (ADC) betegek kontroll, egészséges tüdőszöveiteihez képest ($p<0,0001$). Az ADC tumoros szövetekben 3,25-szoros növekedés volt megfigyelhető a MYPT1^{pT853} relatív foszforilációjában a kontrollszövetekhez képest ($p=0,0055$). A fentiek is alátámasztják az összefüggést a MYPT1 gátló foszforilációja és a tumor kialakulása között. A két típusú tumoros minta értékei között is találtunk különbséget, mégpedig, hogy az ADC és SCC tumoros mintákban a MYPT1^{pT853} foszforiláció jelentősebb volt az SCC tumorokban, 2,147-szeres növekedéssel az ADC-hez képest ($p = 0,0004$).

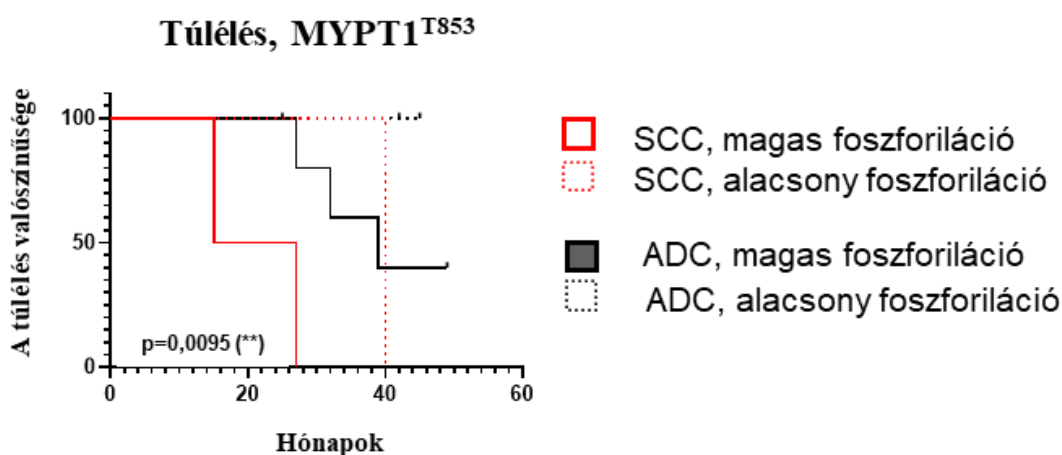
A MYPT1^{pT853} immunfluoreszcens jelölése során az látszott, hogy a tumoros és kontroll szövetekben a MYPT1^{pT853} jel igen intenzív az ADC daganat sejtekben, és átfedésben van a

magfestésre használt DAPI magfestéssel (kék), ami arra utal, hogy a MYPT1^{pT853} a tüdőrákszövetekben a sejtmagban is jelen van. (24. ábra B panelje)



24. ábra. A MYPT1 foszforilációja tüdő laphám (SCC) és adenocarcinoma (ADC) esetén. (A) SCC és ADC mintákból és a hozzájuk tartozó nem daganatos tüdőszövetek fehérjekivonatait Western blot módszerrel vizsgáltunk anti-MYPT1^{pT853} antitestet alkalmazva. A foszforilációs szintet a teljes MYPT1 expresszióhoz viszonyítottuk. Az eredményeket oszlopdiagrammon mutatjuk be (átlag $\pm$ SD, $n = 3-18$). A fehér oszlopok a SCC (T) és saját kontroll (N), a fekete oszlopok az ADC (T) és kontrolljaik (N) eredményeit jelenti. Statisztikai elemzés egy- vagy kétutas ANOVA-val, Tukey-féle többszörös összehasonlítással történt, valamint párosítatlan kétmintás t-tesztet használtunk. Szignifikanciaszintek: (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$. **(B)** MYPT1^{pT853} immunfluoreszcens festése Alexa Fluor 488-al (zöld) történt a tumoros és kontrollszöveteken; a sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük. Méretarány: 100 μ m

A teljes túlélés (OS) és a MYPT1^{pT853} relatív foszforilációs szintje közötti összefüggést Kaplan-Meier-féle túlélési analízissel vizsgáltunk ADC és SCC betegek esetében ($p=0,0095$) (25. ábra). Az ADC-betegek medián OS-e a magas foszforilációt mutató csoportban 39 hónap, míg az alacsony foszforilációs csoportban 45 hónap volt. Az SCC-betegek esetében a magas foszforilációjú csoport medián túlélése 21 hónap, míg az alacsony foszforilációjú csoporté 25 hónap volt. Az SCC és ADC magas foszforilációs csoportjainak túlélési eredményeit összevetettük log-rank teszt segítségével, és szignifikáns különbséget találtunk ($p=0,0344$). Ez azt jelenti, hogy a túlélést befolyásolja a MYPT1 Thr853 helyén bekövetkező foszforilációja, összhangban a szövettani altípussal. Kijelenthetjük tehát, hogy a jobb túlélés, az alacsonyabb MYPT1 foszforiláció és a fokozott MP aktivitás között erős kapcsolat van.

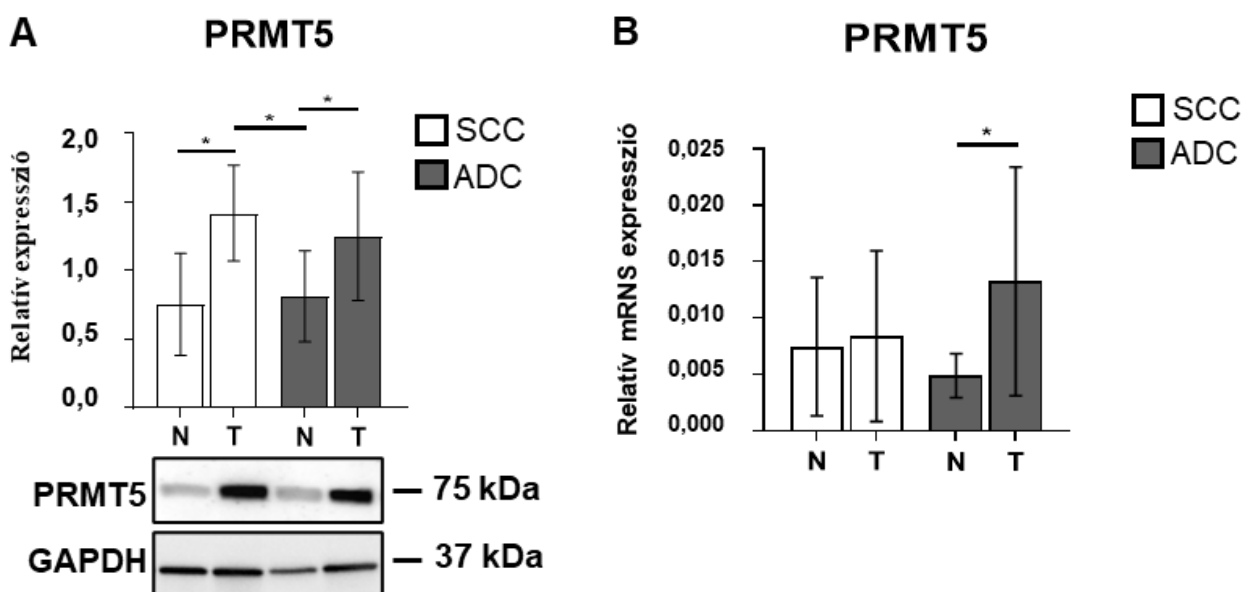


25. Ábra. A MYPT1 foszforilációja és annak összefüggése a túléléssel tüdő laphám (SCC) és adenocarcinoma (ADC) esetén. SCC és ADC betegek Kaplan-Meier túlélési görbéi, a MYPT1^{pT853} foszforilációs szint szerint. A túlélést a vizsgálatba való bevonástól számoltuk, hónapokban adtuk meg. A betegeket szövettani típus (SCC: piros; ADC: fekete) és foszforilációs szint (alacsony/magas) szerinti csoportokat ábrázoltunk. A különbségeket log-rank teszt segítségével értékeltük (** $p<0,001$). A teszt statisztikája közelíti a Khi-négyzet eloszlást.

Emelkedett PRMT5 szint az ADC és SCC mintákon.

A PRMT5 expressziójának mérését ADC és SCC és ugyanazon betegek tumormentes tüdőszövetekből készült fehérje lizátumokon vizsgáltunk (26. ábra A panelje). Eredményeink szerint mind az ADC, mind az SCC mintákban szignifikánsan megnövekedett PRMT5

fehérjeszint volt mérhető a megfelelő kontrollmintákhoz képest. ADC esetén 1,54-szoros ($p=0,02$) és SCC mintákon 1,88-szoros ($p=0,042$) emelkedést tapasztaltunk.



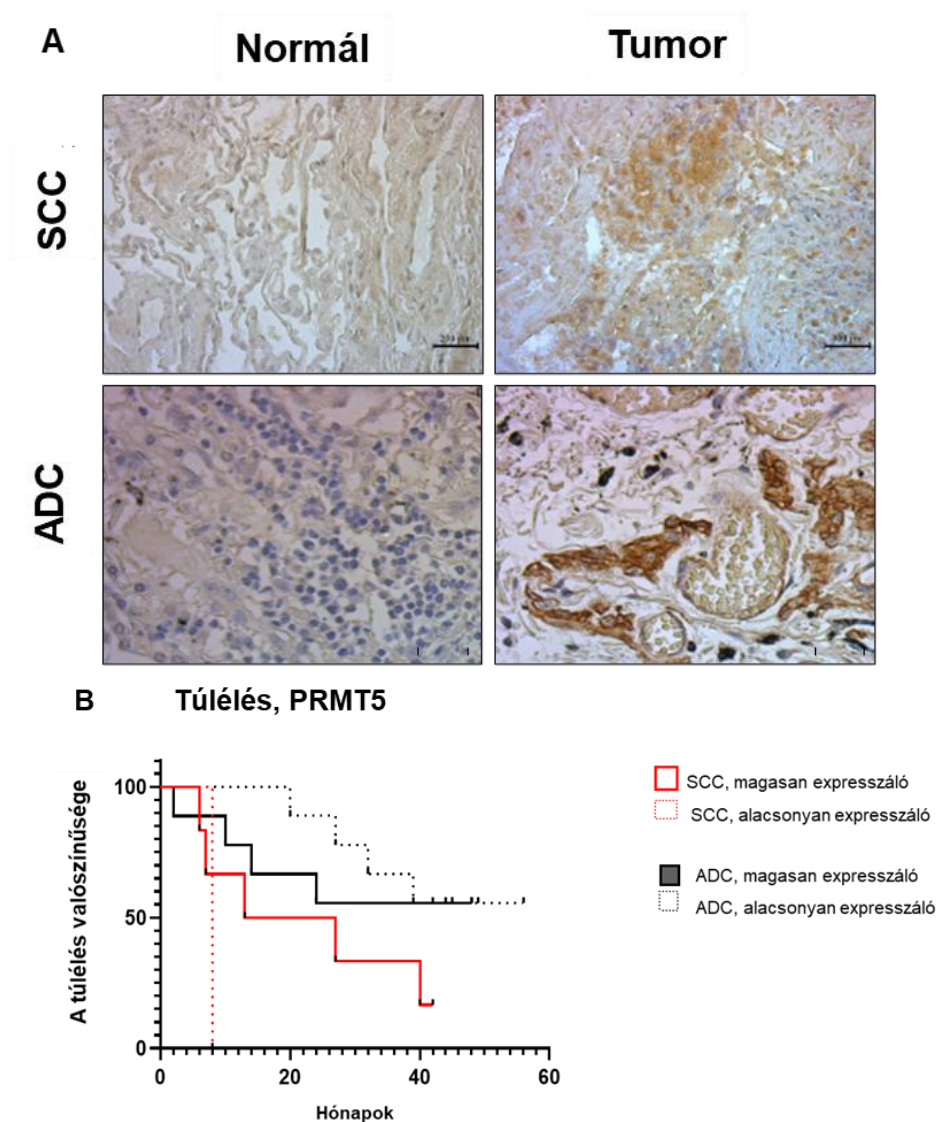
26. Ábra. A PRMT5 fehérje és mRNS relatív expressziója tüdő laphám- (SCC) és adenocarcinoma (ADC) esetén. (A) ADC és SCC mintákból, valamint azok megfelelő kontrolljaiból készült teljes fehérjelizátumokkal SDS-PAGE elválasztását követően Western blot vizsgálat történt. A vizsgálat során anti-PRMT5 antitestet és GAPDH belső kontrollt használtunk. A kvantifikált fehérjeszintek oszlopdiagramként ábrázoltunk, az egyes csoportok esetén átlag $\pm$ SD formában ($n = 5-16$). A fehér oszlopok a SCC (T) és kontrolljaik (N), a fekete oszlopok az ADC (T) és kontrolljaik (N) eredményeit mutatják. **(B)** A PRMT5 mRNS expressziójának vizsgálata RT-PCR-rel történt az ADC és SCC daganatos mintáiban, valamint az ugyanazon betegek nem daganatos tüdőszövetében. A Cp értékeket a GAPDH és Cyclophilin A háztartási génekhez normalizáltuk. Az eredményeket oszlopdiagram formájában jelentettük meg. (átlag $\pm$ SD, $n = 3-8$). A csoportok statisztikai összehasonlítását egy- vagy kétutas ANOVA-val, majd Tukey-féle többszörös összehasonlító teszttel végeztük; a páronkénti összehasonlításokon párosítatlan kétoldali t -tesztet végeztünk, ahol $p < 0,05$ esetén az eltérés szignifikánsnak tekinthető (*).

Az eredmények megerősítésére a PRMT5 mRNS szinteket RT-qPCR-rel is meghatároztuk (26. ábra B panelje). Az ADC szövetekben 2,71-szoros emelkedést tapasztaltunk ($p=0,04$), míg az SCC mintákban nem szignifikáns változás.

A PRMT5 expressziójának daganatban történő változásainak további elemzésére DAB immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk ADC és SCC metszeteken (27. ábra A panelje). Az ADC szövein 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 (27. ábra B panelje).



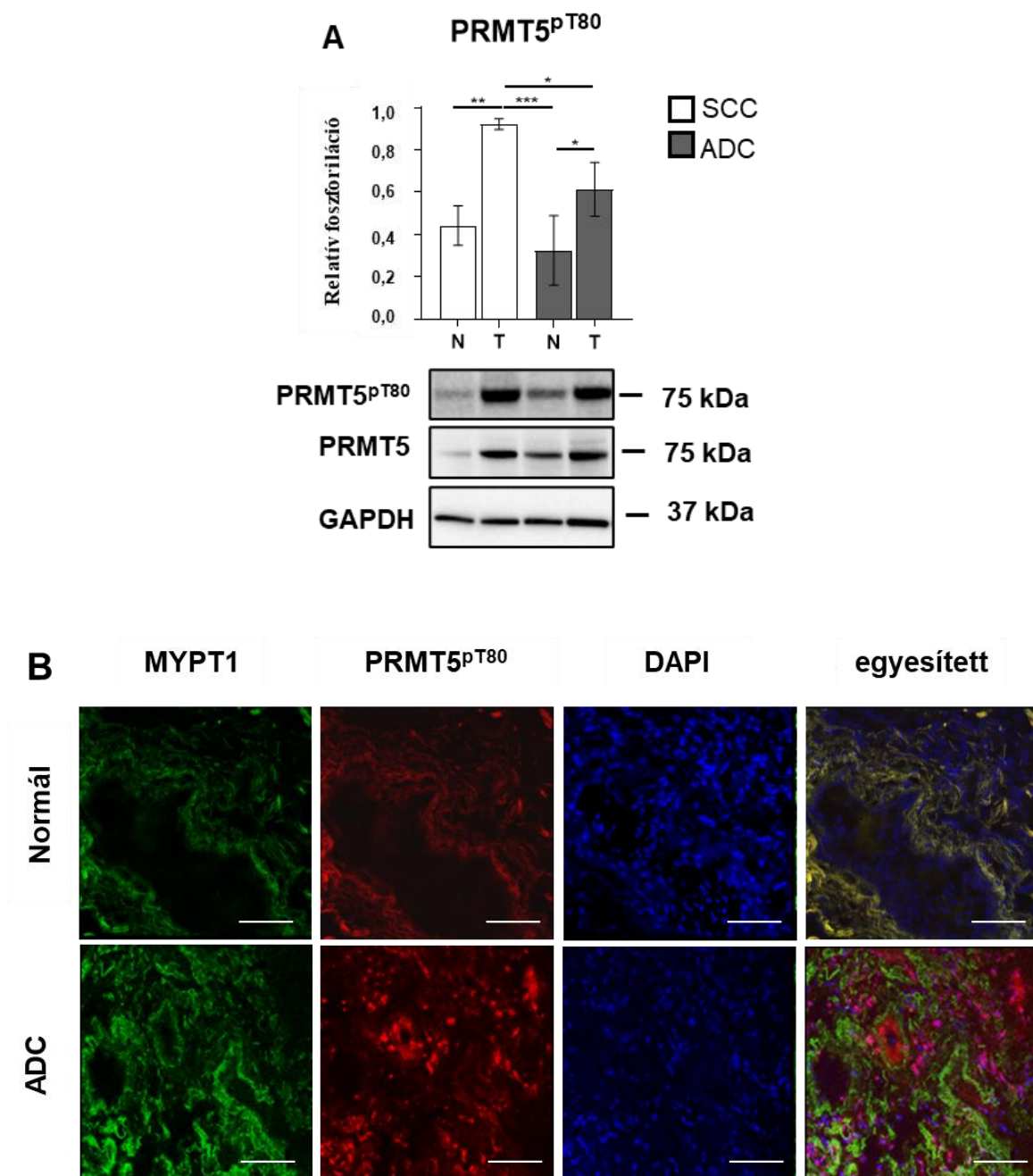
27. Ábra. A PRMT5 relatív expressziójának összefüggése a túléléssel tüdő laphám- (SCC) és adenocarcinoma (ADC) esetén. (A) Reprezentatív immunhisztokémiai (DAB) festett képek PRMT5 kimutatására SCC és ADC páciensek daganatos és kontrollszöveiteiből. Méretarány: 200 μ m. (B) Kaplan-Meier görbék, melyek az ADC és SCC betegek teljes túlélését ábrázolják a PRMT5 expresszió alapján. Az időt hónapokban adtuk meg, a vizsgálatba való beválasztástól számítva. A betegeket szövettani altípus szerint (SCC: piros; ADC: fekete), majd ezen belül a teljes kohorsz medián expressziós értéke alapján alacsonyan és magasan PRMT5 expresszáló csoportokra osztva.

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

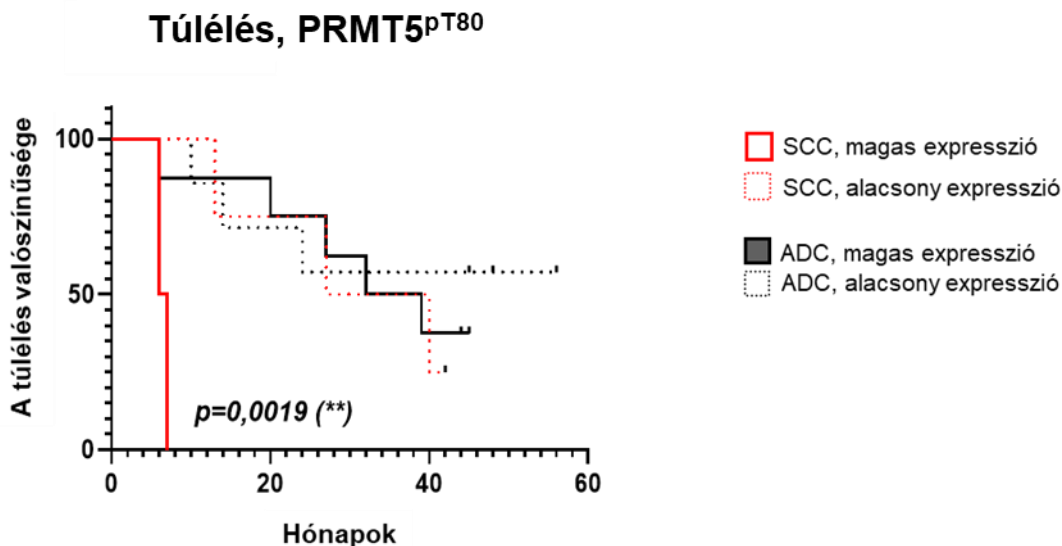
A PRMT5 Thr80 oldalláncon történő, aktiváló foszforiláció PRMT5 expresszióhoz viszonyított arányát is vizsgáltuk. Western blot vizsgálat során az SCC és az ADC daganatszövetekben szignifikánsan magasabb foszforilációs szinteket találtunk a kontroll, egészséges megfelelőikhez képest, 2,08-szoros ($p=0,003$), illetve 1,89-szoros ($p=0,013$) növekedéssel (28. ábra A panelje). Az SCC daganatos mintákban 1,5-szeres ($p=0,03$) foszforilációs szintnövekedés volt megfigyelhető az ADC mintákhoz képest.

Az immunfluoreszcens festés további megerősítést jelentett a PRMT5 Thr80 oldalláncon megfigyelhető fokozott foszforilációt a daganatszövetekben (28. ábra B panelje). Az összevont képeken a PRMT5^{pT80} (piros) és a DAPI (kék) festés együttes megjelenése (lila) a PRMT5 kifejezett sejtmagi lokalizációjára és aktiváló foszforilációjára utal, ami a PRMT5 génexpresszióra gyakorolt hatását jelzi.

A Kaplan-Meier túlélési elemzést a PRMT5^{pT80} esetében is elvégeztük, mely a 29. ábrán látható. Vizsgálatunk során szignifikáns összefüggést találtunk a daganattípus (SCC vagy ADC), a PRMT5^{pT80} foszforiláció szintje (magas vagy alacsony) és a beteg túlélése között ($p=0,002$). Különösen nagy különbséget fedeztünk föl az SCC betegek körében. A magas foszforilációval rendelkező csoport medián túlélése 6,5 hónap volt, míg az alacsony foszforilációjú csoporté 33,5 hónap. Az ADC-s betegek magas foszforilációjú csoportjában a medián túlélés 35,5 hónap volt, míg az alacsony foszforilációs csoportban ez 45 hónapot jelentett. A log-rank teszt az SCC és ADC betegek között, akiknél magas PRMT5^{pT80} foszforiláció volt jelen, szignifikáns különbséget mutatott az OS-ben ($p=0,018$), míg az SCC magas és alacsony PRMT5^{pT80} foszforilációjú csoportjai között is jelentős túlélési különbség volt megfigyelhető ($p=0,018$), ami egyértelműen jelzi a PRMT5 aktivitás és a rosszabb túlélési eredmények közötti összefüggést.



28. ábra. A PRMT5 Thr80 relatív foszforilációja tüdő laphám- (SCC) és adenocarcinoma (ADC) esetén. (A) SCC és ADC daganatos minták, és azok megfelelő kontroll mintákból készült fehérjelizátumok Western blot analízise, anti-PRMT5pT80 antitest alkalmazásával. A foszforiláció intenzitását a teljes PRMT5 expresszióhoz normalizáltuk. Az eredményeket oszlopdiagram formájában mutatjuk be, ahol minden oszlop az átlag $\pm$ SD értékét mutatja ($n = 3-15$ csoportonként). A fehér oszlopok az SCC (T) és kontroll (N), a fekete oszlopok az ADC (T) és kontroll (N) minták eredményeit mutatja. A csoportok közötti különbségeket egy- vagy kétutas ANOVA, majd Tukey-féle post hoc teszt segítségével értékeltük többszörös összehasonlítás esetén, valamint párosítatlan kétmintás t-tesztel páronkénti összehasonlítás esetén. A statisztikai szignifikancia szintjei: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. (B) Immunfluoreszcens festés MYPT1 (zöld, Alexa Fluor 488) és PRMT5pT80 (piros, Alexa Fluor 546) jelöléssel daganatos és kontrollmintákon. A sejtmagokat ellenfestése DAPI-val (kék) történt. Méretarány: 100 μ m.

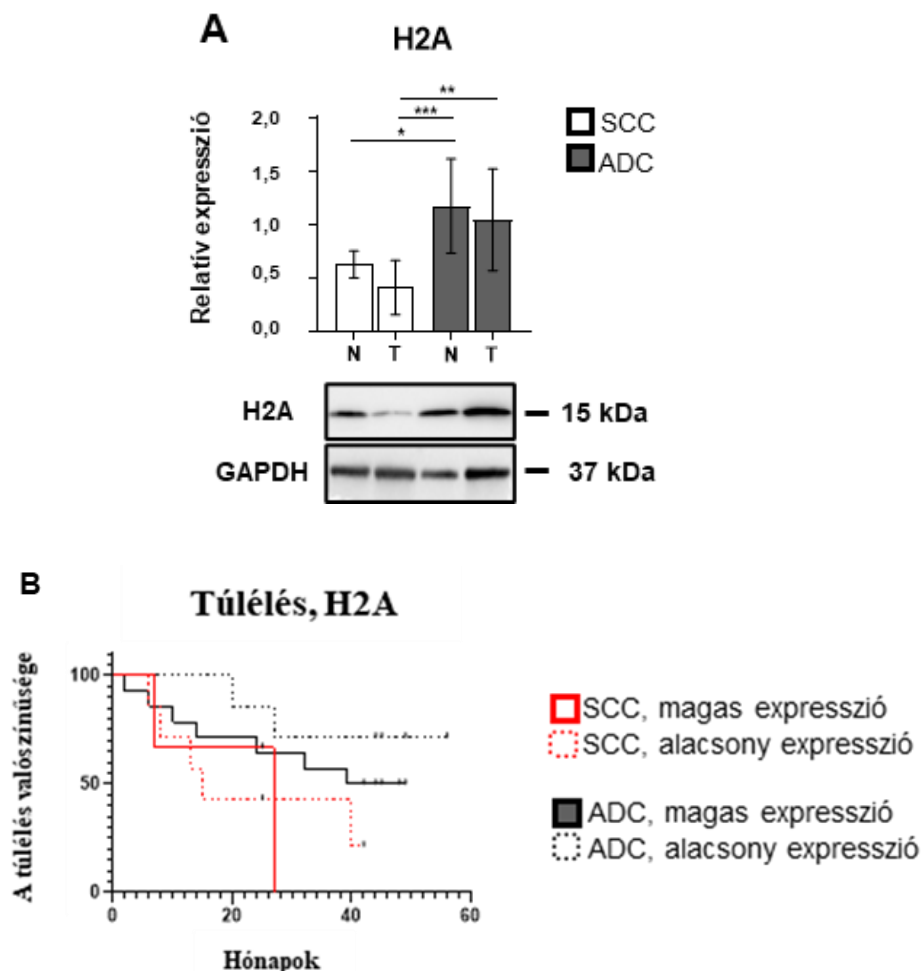


29. ábra. A PRMT5 Thr80 foszforilációjának hatása a teljestúlélésre tüdő laphám- (SCC) és adenocarcinoma (ADC) Kaplan-Meier túlélési görbék mutatják SCC és ADC betegek teljes túlélését a PRMT5^{pT80} foszforiláció szintje szerint. Az időt a vizsgálatba való bevonástól számítva, hónapokban fejeztük ki. A betegeket szövettani típus szerint (SCC: piros; ADC: fekete) csoportosítottuk, majd mindegyik csoporton belül alacsony vagy magas foszforilációs szint alapján további alcsoportokba osztottuk, a teljes populáció medián foszforilációs értéke alapján. A túlélési eloszlásokat log-rank (Mantel-Cox) teszttel hasonlítottuk össze. A statisztikailag szignifikáns különbségeket dupla csillag jelzi (**; $p < 0,01$). A teszt statisztikája közelítőleg a Khi-négyzet eloszlást követi.

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 a két különböző szövettani mintán (ADC és SCC) eltérő expressziót tapasztaltunk. 2,54-szoros ($p=0,005$), szignifikánsan magasabb H2A-expresszió-emelkedést észleltünk az ADC-mintákban az SCC-mintákhoz képest (30. ábra A panelje).

A Kaplan-Meier-analízis nem mutatott szignifikáns korrelációt a H2A-expresszió és a túlélés között egyik szövettani típus esetén sem. (30. ábra B panelje)

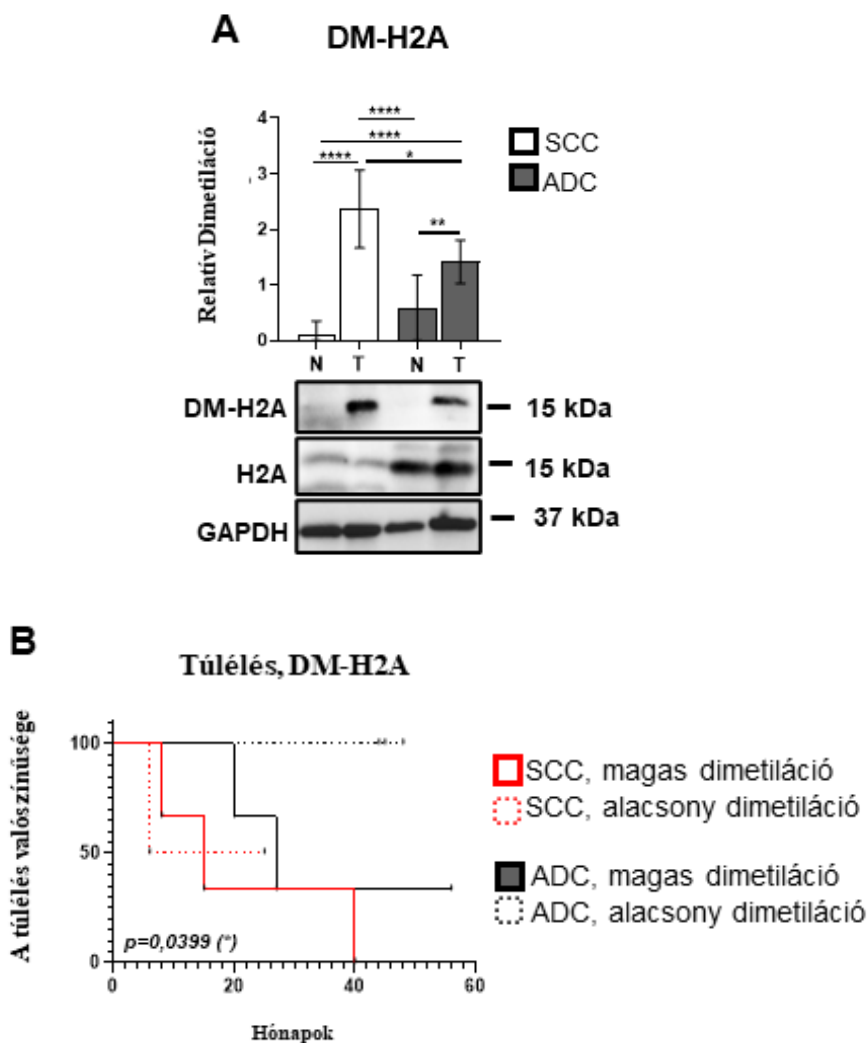


30. ábra: A H2A fehérje relatív expressziójának összefüggése a teljes túléléssel. (A) Az SCC és ADC és a hozzájuk tartozó kontroll tüdőszövetekből származó fehérje-lizátumokat Western blot segítségével vizsgáltuk, anti-H2A antitest felhasználásával. A teljes fehérje szinteket a GAPDH-hoz normalizáltuk. A kvantitatív adatokat oszlopdiagramokon ábrázoltuk. A fehér oszlopok az SCC (T) és kontroll (N), a fekete oszlopok az ADC (T) és kontroll (N) minták eredményeit mutatja. Az átlag $\pm$ SD formájában ($n = 3-20$ csoportonként). A csoportok közötti összehasonlításokra egy- vagy kétutas ANOVA-val, majd Tukey-féle post hoc analízist használtunk, a páronkénti összehasonlításokat párosítatlan, kétmintás t-próbával végeztük. A szignifikancia küszöbértékei a következők voltak: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), és $p < 0,001$ (***). **(B)** A Kaplan-Meier görbék a tüdődaganatos betegek OS-ét ábrázolják a H2A-expressziójának mértéke alapján. Az időt a vizsgálatba való bevonástól számítva, hónapokban adtuk meg. A betegeket szövettani altípus szerint különböztettük meg (SCC: piros; ADC: fekete), majd a teljes adathalmaz mediánértékét határértékként alkalmazva alacsony és magas expressziós arányt mutató csoportokat határoztunk meg. A túlélési görbék közötti különbségeket log-rank (Mantel-Cox) módszerrel teszteltük. A log-rank teszt statisztikája közelítőleg Khi-négyzet (Chi-square) eloszlást követ.

A H2A fehérje expressziójával ellentétben a génexpresszió aktivitásával korreláló H2A szimmetrikus dimetiláció 24,74-szoros ($p < 0,0001$), illetve 2,49-szoros ($p = 0,0015$) emelkedést mutatott az SCC- és ADC-daganatmintákban a megfelelő kontrollokhoz képest (31. ábra A

panelje). Továbbá, az SCC-daganatok szignifikánsan magasabb DM-szintet mutattak az ADC daganatokhoz képest, 1,66-szoros különbséggel ($p=0,017$).

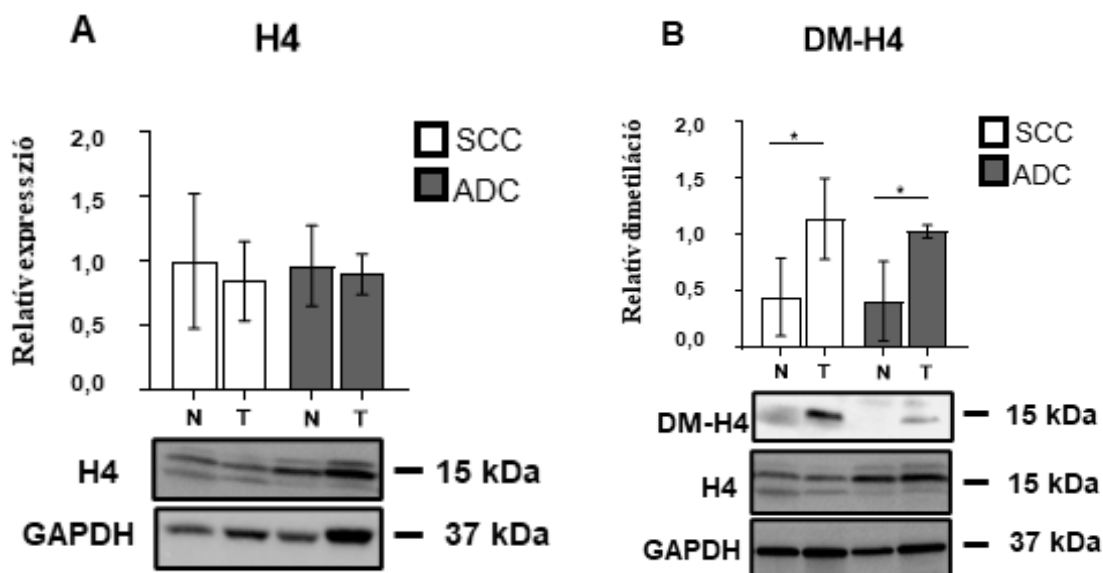
A Kaplan-Meier-analízis szerint a H2A-fehérjék szimmetrikus dimetilálációjának szintje szignifikáns összefüggést mutat a túléléssel ($p=0,04$) (31. ábra B panelje). Az SCC betegek



31. ábra a H2A fehérjék relatív relatív dimetiláltságának összefüggése a teljes túléléssel. (A) Az SCC és ADC és a hozzájuk tartozó kontroll tüdőszövetekből származó fehérje-lizátumokat Western blot segítségével vizsgáltuk, anti-szimmetrikusan dimetilált H2A (DM-H2A) antitest felhasználásával. A teljes fehérje szinteket a GAPDH-hoz normalizáltuk. A kvantitatív adatokat oszlopdiagramokon ábrázoltuk. A fehér oszlopok az SCC (T) és kontroll (N), a fekete oszlopok az ADC (T) és kontroll (N) minták eredményeit mutatja. Az átlag $\pm$ SD formájában ($n = 3-20$ csoportonként). A csoportok közötti összehasonlításokra egy- vagy kétutas ANOVA-val, majd Tukey-féle post hoc analízist használtunk, a páronkénti összehasonlításokat párosítatlan, kétmintás t -próbával végeztük. A szignifikancia küszöbértékei a következők voltak: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), és $p < 0,0001$ (****). (B) A Kaplan-Meier görbék a tüdődaganatos betegek OS-ét ábrázolják a H2A dimetiláltságának mértéke alapján. Az időt a vizsgálatba való bevonástól számítva, hónapokban adtuk meg. A betegeket szövettani altípus szerint különböztettük meg (SCC: piros; ADC: fekete), majd a teljes adathalmaz mediánértékét határértékként alkalmazva alacsony és magas dimetilációs arányt mutató csoportokat határoztunk meg. A túlélési görbék közötti különbségeket log-rank (Mantel-Cox) módszerrel teszteltük. A statisztikailag szignifikáns összefüggéseket ($p < 0,05$) csillag (*) jelöli. A log-rank teszt statisztikája közelítőleg Khi-négyszet (Chi-square) eloszlást követ.

esetében a medián túlélés 15,5 hónap volt az alacsony DM-szintű csoportban, és 15 hónap magas DM-szintű csoportban. Az ADC betegeknél az alacsony DM-szint esetén 45, a magas DM-szint esetén 27 hónap volt a medián OS.

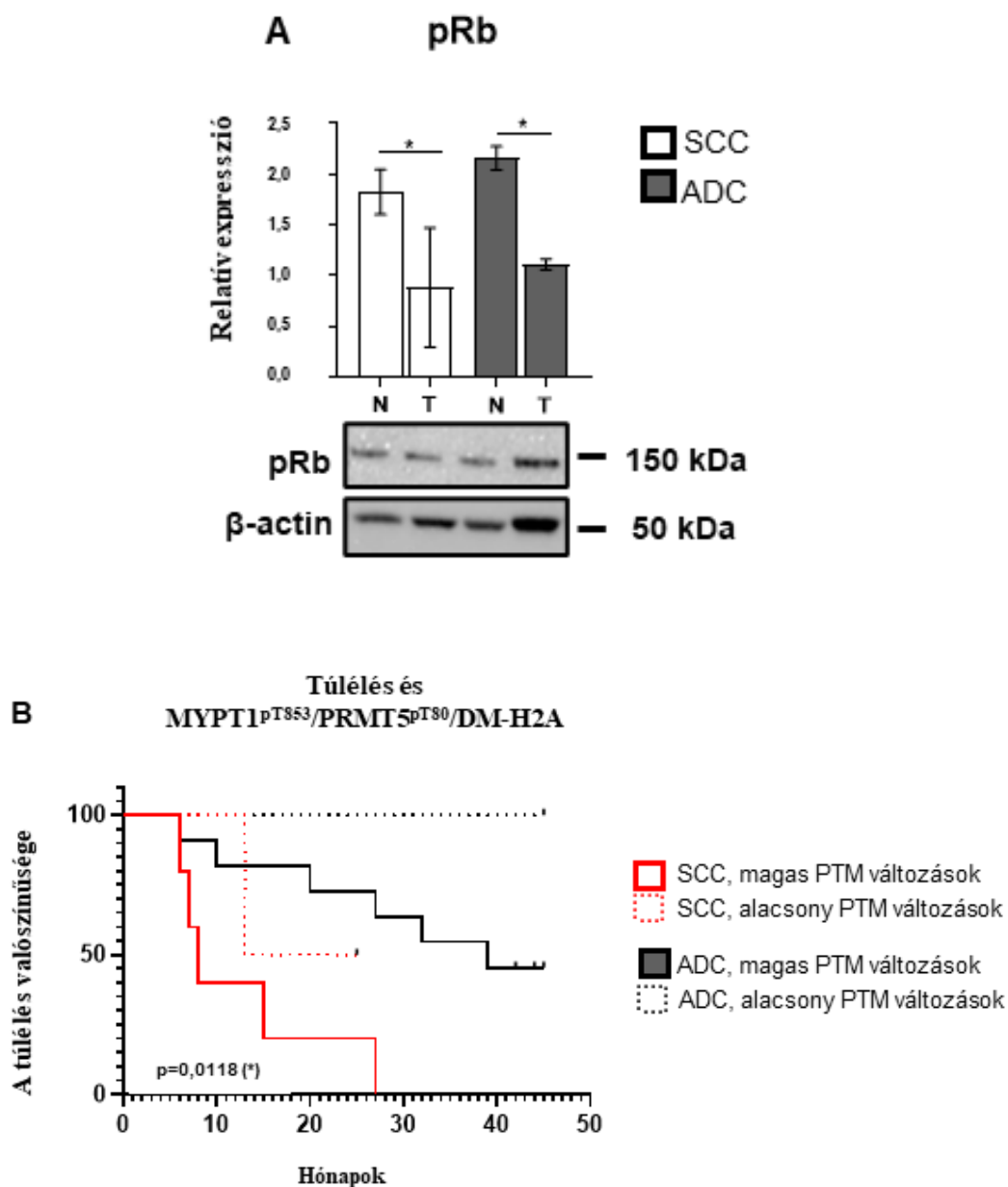
A PPM1B/MP/PRMT5 proto-onkogén tengely downstream elemekre gyakorolt hatásának további feltárása érdekében, a H2A vizsgálataihoz mellett elvégeztük a hiszton H4 expressziójának és szimmetrikus dimetilálciójának elemzését is (32. ábra). A teljes H4-fehérje expresszióban nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes csoportok között (SCC, ADC és kontrolljaik) a H2A adatokhoz hasonlóan (32. ábra A panelje). Ugyanakkor a H4 szimmetrikus dimetilációja az SCC mintákon megközelítőleg 2,55-szorosára emelkedett ($p=0,05$) a megfelelő kontroll mintákhoz képest (32. ábra B panelje). Hasonlóképpen, az ADC és kontrollszövetek esetében a H4 szimmetrikus dimetilálciójának megközelítőleg 2,50-szoros ($p=0,0325$) emelkedését mutatta a daganatmintákban a megfelelő kontrollokhoz képest (32. ábra B panelje).



A hiszton szimmetrikus dimetiláció génextpresszióra kifejtett hatásának közvetlen vizsgálatára az egyik jól jellemzett célgén, a tumorsuppresszor retinoblasztóma gén fehérje (pRb) termékének expressziós szintjeinek változását is elemeztük. A hiszton módosítások génextpresszióra gyakorolt hatásának, ezen keresztül az általunk vizsgált útvonal proto-onkogén szerepének igazolása céljából (33. ábra A panelje).

A pRb-fehérje expresszióját SCC, ADC, illetve a hozzájuk tartozó kontrollszövet Western blot analízisével határoztuk meg. A pRb-fehérje szintje jelentősen csökkent az SCC mintákban, 2,06-szoros mértékben ($p=0,011$) a kontrollokhoz viszonyítva. Az ADC mintákon 1,94-szoros csökkenést tapasztaltunk ($p=0,0145$).

Az általunk vizsgált proto-onkogén útvonal működési zavarainak klinikai jelentőségét keresve egy összevont Kaplan-Meier túlélés vizsgálatot is végeztünk az egyes betegcsoportok közötti túlélési különbségek összevetésére (33. ábra B panelje). A betegeket szövettani altípus, majd a MYPT1^{pT853} és PRMT5^{pT80} foszforilációs poszttranszlációs módosítások, illetve a H2A szimmetrikus dimetilációs szint szerint, konzisztensen alacsony vagy inkonzisztensen magas, tovább csoportosítottuk. A log-rank teszt szignifikáns különbséget mutatott az alacsony csoportok teljes túlélése között ($p=0,01$). Az alacsony poszttranszlációs módosítási szintekkel jellemzett ADC betegek túlélése volt a legkedvezőbb (medián túlélés 45 hónap), míg a magas poszttranszlációs módosítási szinteket mutató SCC-betegek túlélése volt a legrosszabb (medián túlélés 15 hónap).



33. ábra: (A) a pRB fehérje relatív expressziója. Az SCC és ADC és a hozzájuk tartozó kontroll tüdőszövetekből származó fehérje-lizátumokat Western blot segítségével vizsgáltuk, anti-retinoblasztóma protein (pRB) antitest felhasználásával. A teljes pRB-szinteket β aktinhez normalizáltuk. A kvantitatív adatokat oszlopdiagramokon ábrázoltuk. A fehér oszlopok az SCC (T) és kontroll (N), a fekete oszlopok az ADC (T) és kontroll (N) minták eredményeit mutatja. Az átlag $\pm$ SD formájában ($n = 3-20$ csoportonként). A csoportok közötti összehasonlításokra egy- vagy kétutas ANOVA-val, majd Tukey-féle post hoc analízist használtunk, a páronkénti összehasonlításokat párosítatlan, kétmintás t-próbával végeztük. A szignifikancia küszöbértéke $p < 0,05$ (*). **(B)** A vizsgált poszttranszlációs módosítások hatása a teljes túlélésre. Kaplan-Meier görbén ábrázoltuk a teljes túlélést a MYPT1^{pT853} és PRMT5^{pT80} foszforiláció, és a H2A dimetiláció poszttranszlációs módosításai (PTM) alapján csoportosítva. Az időt a bevonástól számított hónapokban fejeztük ki. Szöveti altípus szerint is csoportosítottunk (SCC: piros; ADC: fekete), majd a teljes adathalmaz mediánértékét határértékként alkalmazva alacsony és magas PTM-értékű alcsoportokat határoztunk meg. A túlélési görbék közötti különbségeket log-rank (Mantel-Cox) módszerrel vizsgáltuk. A statisztikailag szignifikáns összefüggéseket ($p < 0,05$) csillag (*) jelöli. A log-rank teszt statisztikája közelítőleg Khi-négyzet (Chi-square) eloszlást követ.

Vizsgálatunk eddigi eredményei rávilágítottak arra, hogy a poszttranszlációs módosítások fontos szerepet töltenek be a tumorbiológiában. Míg ezen biokémiai folyamatok vizsgálata a tumor növekedése és a túlélés szempontjából szolgáltatnak új információkat, a mindennapi diagnosztikában és a személyre szabott terápia tervezésében továbbra is kiemelt szerepe van a részletgazdag, jó minőségű képalkotó technikáknak.

Tevékenységem másik célja volt, hogy részt vegyek egy olyan technika kialakításában, amely tovább javíthatja a bronchoszkópos beavatkozások tervezhetőségét és biztonságosságát. Ennek megfelelően a következő fejezetben a funkcionális virtuális bronchoszkópia módszerének kidolgozását és alkalmazhatóságát ismertetem.

A funkcionális virtuális bronchoszkópia fejlesztésének eredményei

A módszer kidolgozása során tüdőgyógyász/bronchológusként a betegek kiválasztásában, a betegadatok gyűjtésében, a konvencionális bronchoszkópia végzésében, a hörgő anatómia egyeztetésében vettem részt. A bronchoszkópia során szerzett tapasztalataim megosztásával segítettem a hörgőrendszerben való tájékozódásban, mely kritikus a virtuális bronchoszkópia rekonstrukciója során. A munka során a készülő képi modellekkel kapcsolatban konzultáltunk, hogy a jövőbeni bronchoszkópos mintavételek tervezését mennyire segíti a létrehozott a képanyag.

A kutatásunk célja egy olyan protokoll kialakítása volt, mely ötvözi a PET funkcionális információit a magas felbontású CT anatómiai információjával, elősegítve a tüdőrák kivizsgálását a már meglévő vizsgálatok alapján, kerülve az ismétlődő sugárterhelést.

A (nem)egyezőség paramétereinek számítása az összes voxel felhasználásával is kiszámítható (α módszer), ezen maszkok egyáltalán nem kerültek alkalmazásra. Csökkentett voxel mennyiséggel is történt számítás, a β módszer, mely mindkét CT típus esetén ugyanannak a „működő maszknak” a használatát tette lehetővé. A γ módszer esetén a szegmentált légút egy

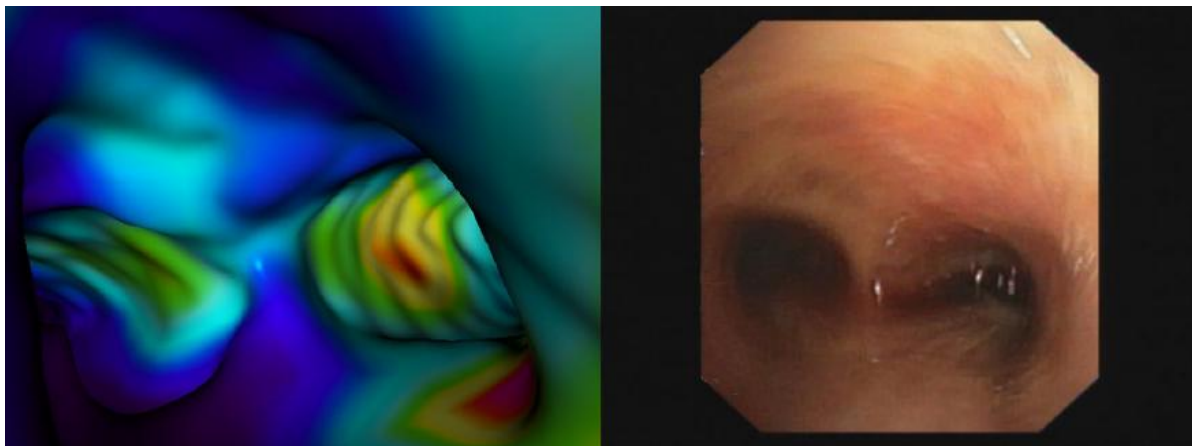
módosított változata szolgál maszkként, mely a kiterjesztett eredeti légutat annak határán túl 10 mm távolságban ábrázol. Mindkét CT típus képeinek esetén külön-külön került alkalmazásra.

A távolságmérő mutatók meghatározása összetett volt. A milliméterben mért paraméterek egységesítése volt szükséges a következő szabályok szerint: 1-es értéket kapott, ha a két típusú CT hörgőközepontjai közötti távolság kisebb, mint a hörgő átmérőjének 10%-a ($\leq 1,8$ mm a légcsőnél, $\leq 1,22$ mm a főhörgőknél). 0,5 értéket kapott, ha ez a távolság a hörgő átmérőjének 10–20%-a ($[1,8; 3,6]$ mm a légcsőnél, $[1,22; 2,44]$ mm a főhörgőknél). 0-nak felelt meg, ha a távolság meghaladja a hörgő átmérőjének 20%-át ($> 3,6$ mm a légcsőnél, $> 2,44$ mm a főhörgőknél). A regisztráció minőségét D szám fejezte ki, ez a távolságtípusú mennyiségek súlyozott összege. A súlyszorzót a légcsőre, főhörgők, lebenyi hörgők, szegment hörgőkre és szubszegment hörgők 16, 7, 3, 1, illetve 1 értéket kaptak. A D pontszám jellemzi tehát a megfelelő anatómiai pontok távolsági viszonyát, így fejezve ki a regisztráció minőségét.

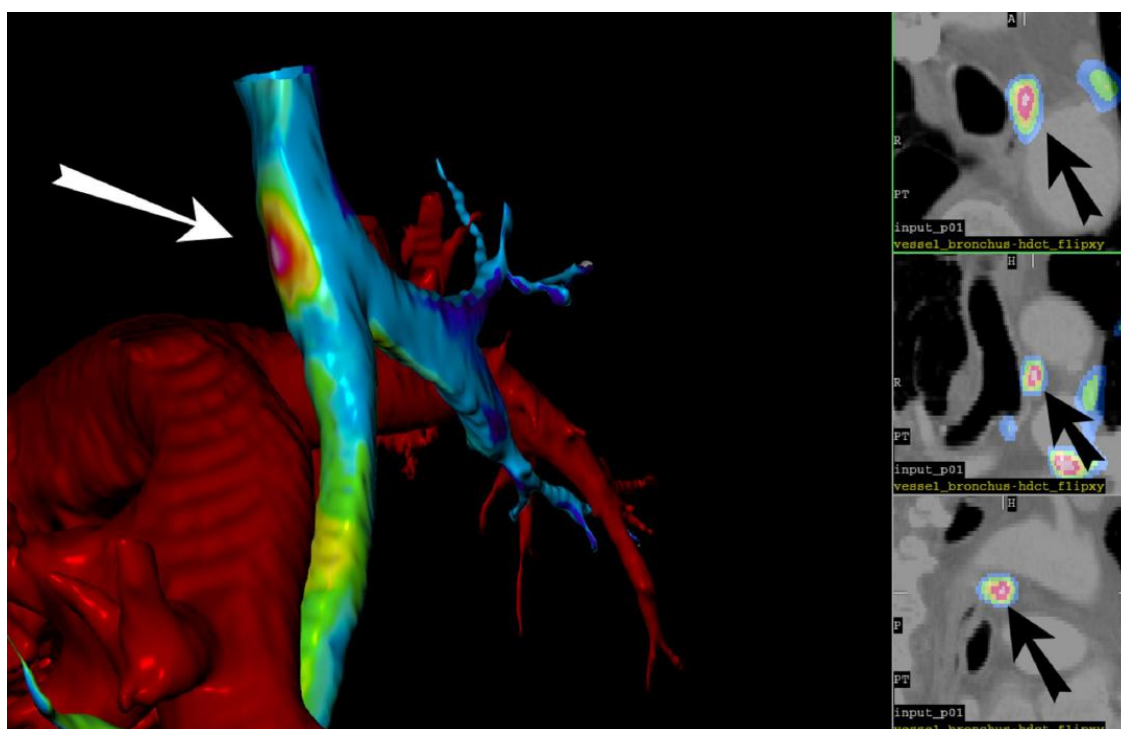
A korreláció elemzés történt Lineáris modell alapú regressziós számításokkal, MASS R-csomag segítségével, melynek célja a D pontszámmal korrelációt mutató (nem)egyezőségi paraméterek keresése volt. Az elemzés alapján csupán a kölcsönös információ (MI) mutatta a legszorosabb korrelációt az anatómia alapú távolságmérőkkel.

Konfidencia intervallumok meghatározása során a vizsgálat célja volt annak megállapítása volt, hogy a kölcsönös információ (MI) numerikus értéke alkalmas-e arra, hogy az ldCT-hdCT tüdőképpárok regisztrációjának elfogadhatósága meghatározható legyen. Ez az alacsony mintaszám miatt bootstrap statisztikai módszerrel volt lehetséges. A vizsgált populációban két alcsoport került meghatározásra a regisztráció minősége alapján. Külön bootstrap MI eloszlást készült az elfogadható (15 alany) és elégtelen (7 alany) alcsoportokra. Az MI értéke képpárfüggő, és mintánként változik, melynek ingadozást konfidencia intervallumokkal lehet jellemezni. Ezek alapján az elégtelen regisztrációk 95%-os konfidencia intervalluma: $[0,15; 0,22]$. Az elfogadható regisztrációk 95%-os konfidencia intervalluma: $[0,28; 0,37]$. Az

elutasítást jelzi 95%-os biztonsággal, ezzel támogatva a radiológus döntését. Amennyiben az MI érték 0,22 és 0,28 között van, az új regisztrációra volt szükség. A következő ábrákon a fentiekben leírt módszer eredményeképpen létrejött képeket mutatjuk be. (34. és 35. ábra)



34. ábra. Az ábra bal oldalán funkcionális virtuális bronchoszkópos kép látható, mely a bifurkációs pont vizualizációját mutatja. A szegmentált légcső határozza meg a geometriai formát, a textúra a légcső külső felszínétől 10 mm-en belül elhelyezkedő pixeleken felhalmozódott radioaktivitásból származik. Az ábra jobb oldalán a valódi endoszkópos kép látható ugyanarról a régióról.

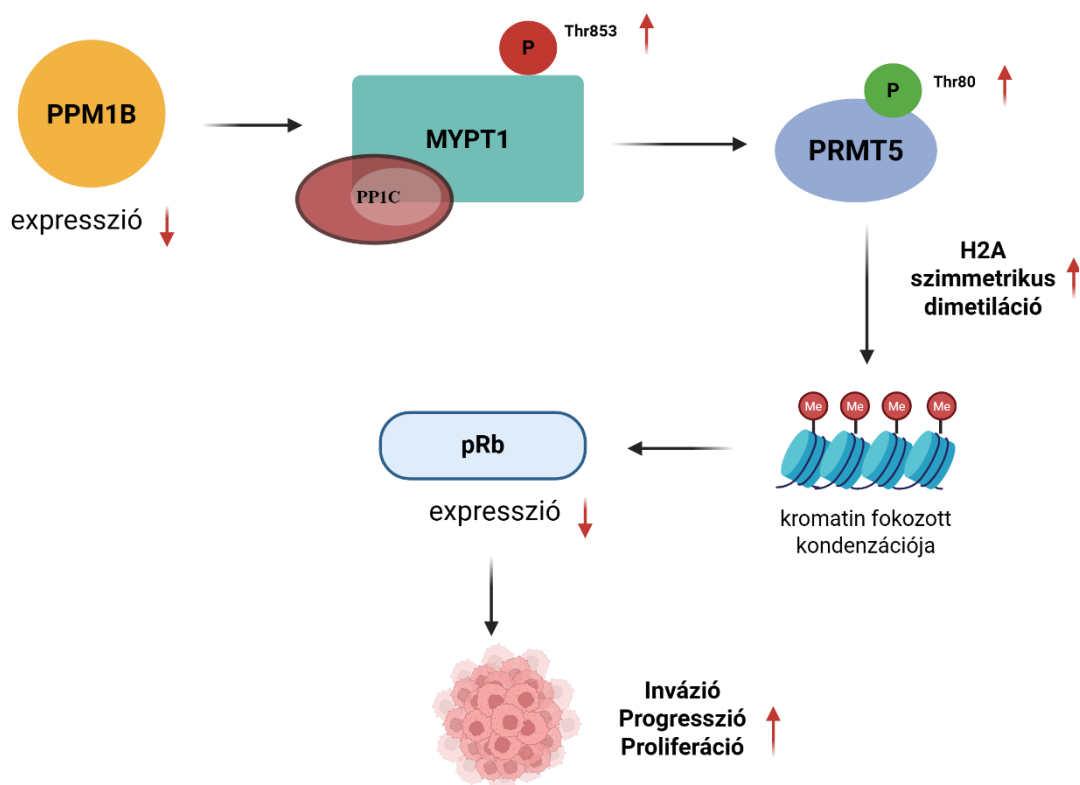


35. ábra. Az ábra bal oldalán a légúti fa és a vérerek vizualizációja látható kívülről. A fehér nyíllal jelölt elváltozás környezetében készített ortogonális metszetek az ábra jobb oldalán láthatók. Az elváltozásban megjelenő, vetített FDG-halmozás ábrázolása spektrális skálán történt.

Diszkusszió

Kutatásunk során a PPM1B/PRMT5 onkogén jelátviteli útvonal vizsgálatát és új funkcionális Virtuális bronchoszkópia (fVB) módszer fejlesztését végeztük.

A tüdőrák kivizsgálásának optimalizálására egy átfogó elemzést végeztünk, mely során humán tüdődagatanatos szövetekben a PPM1B/MP/PRMT5/hisztin jelátviteli útvonal jelenlétét vizsgáltuk, amely összefoglalása a 36. ábrán látható.



36. ábra: A PPM1B/MYPT1/PRMT5/H2A útvonal összefoglalása a daganatsejtben. A zöld színnel jelölt foszfát (P) csoportok az aktiváló, a piros színnel jelöltek gátló foszforilációt jelentenek, szövegesen jelölve, hogy melyik oldalláncon történt a módosítás. Összefoglalva a folyamatot: A daganatos sejtben a PPM1B expressziója csökken. Szubsztrátjának (MYPT1) gátló foszforilációja túlsúlyba kerül, emiatt a PRMT5 aktiváló foszforilációjának aránya emelkedik. Mindezek következtében a hisztin fehérjék (H2A) szimmetrikus dimetilációjának szintje emelkedik, ami a kromatin fokozott kondenzációjával jár. Ez represszív hatást gyakorolhat egyes tumorsuppresszor gének transzkripciójára. Esetünkben a retinoblasztóma-fehérje szint mérésével indirekt módon vizsgáltuk a folyamatot. A tumorsuppresszor fehérje expressziója csökken, így tumoros propagáció fokozódik. Me: metiláció. A piros nyilak jelölik a változás irányát, azaz lefelé mutató nyíl az adott folyamat mértékének csökkenését, a felfelé mutató a növekedését mutatják. PPM1B: Mg^{2+} -függő 1B protein-foszfátáz; MYPT1: miozin foszfátáz szabályozó alegység-1; PP1c: a miozin foszfátáz katalitikus alegysége PRMT5: protein arginin metiltransferáz 5; pRB: retinoblasztóma fehérje. Az ábra a BioRender felületén készült.

Egy új onkogén mechanizmus feltárásán dolgoztunk, mely során az ADC és SCC szövettani altípusokat is megkülönböztettük. Vizsgálatunk eredményei szerint e jelátviteli útvonal zavara hozzájárul a tüdőrák kialakulásához, mely epigenetikai módosításokon keresztül a tumorszuppresszor gének expressziójának elnyomásával történik.

Az általunk vizsgált útvonal első tagja, a PPM1B potenciálisan tumorszuppresszor szerepet tölthet be tüdődaganatok esetén, melyre több eredményünk is utal. A fehérje expressziója mindkét szövettani típus (SCC és ADC) esetén szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollként alkalmazott, normál tüdőszövethez képest. Szembeötlő volt a különbség az SCC esetén, mivel ott 46%-os csökkenést tapasztaltunk (0,54-szoros érték; $p=0,029$) az ADC-hez képest, mely a 20. ábra A paneljén látható. Ezen eredményekkel a teljes túlélési (OS) adatok is korrelálnak, miszerint a PPM1B-t alacsonyan expresszáló daganattal rendelkező betegek OS-e szignifikánsan alacsonyabb volt a magas expressziójú csoporthoz képest. A két szövettani típus esetén is eltérő túlélési eredményeket kaptunk. Az ADC betegek túlélése esetében ez 45 hónap volt a 37 hónappal szemben. Az SCC esetén a különbség kevésbé volt kifejezett, azonban a legrosszabb túlélők az alacsony expressziót mutató SCC-s betegek közül kerültek ki, így ezen daganattípus kialakulása/progressziója esetén valószínűleg más molekuláris mechanizmusok lehetnek túlsúlyban. Szignifikáns különbség volt az ADC és SCC betegek túlélése között a magas PPM1B-expressziójú csoportban ($p=0,04$) (21. ábra B panelje). Újabb kutatások során is hasonló eredmények születtek, illetve a PPM1B tumorszuppresszor szerepét szintén felvetették gyomor adenocarcinoma (R. Li és mtsai, 2022) és emlődaganat esetén is (Cho és mtsai, 2018; Du és mtsai, 2023), továbbá cervix carcinomában is tapasztalták a PPM1B expressziójának csökkenését (Keller és mtsai, 2025; Li és mtsai, 2023). A fehérje expresszióban tapasztalt különbségek mellett meglepő módon az mRNS szintek között nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes csoportok között (20. ábra A panelje), melyet más tanulmányok során is megfigyeltek (Keller és mtsai, 2025; Li és mtsai, 2023). Ennek több oka

is feltételezhető, mint például a mikroRNS szabályozás (Jansson és Lund, 2012), egyes fehérje lebontási útvonalak (Chen és mtsai, 2002), transzlációs kontrollmechanizmusok (Truitt és Ruggero, 2016). Továbbá emlőrák esetén azt is megfigyelték, hogy a pleckstrin-2 által elősegített PPM1B fokozott lebontása elősegíti a TGF- β által mediált inváziót és metasztázis képzést. (Du és mtsai, 2023)

Vizsgálataink során a kutatócsoportunk korábbi munkájából HCC daganatban tapasztaltakat vizsgáltuk meg tüdődaganatok esetén. Azonban a HCC daganat vizsgálatainak eredményeivel ellentétben, a tüdőrákban a MYPT1 fehérje és mRNS expresszió szignifikánsan emelkedettnek találtuk mind SCC, mind ADC daganatokban, kontrolljaikkal összehasonlítva (22. ábra A és B panel). Ez arra utal, hogy az MP aktivitását szabályozó mechanizmusok tüdőrákban eltérnek a HCC esetén tapasztaltaktól. A MYPT1 mRNS-expresszió 12-szeres az ADC és 5,68-szoros SCC esetén, ami erős transzkripciós aktivációra utal. Ennek hátterében kompenzációs mechanizmus állhat, melyet a fokozott onkogén jelátvitel indukál. Mivel a PPM1B a MYPT1 aktivitását annak gátló Thr853 és Thr696 aminosavmaradékainak defoszforilációja útján szabályozza (Keller és mtsai, 2025), a PPM1B hiánya tartós MYPT1-foszforilációt, ezáltal csökkent MP aktivitást és fokozott PRMT5 aktivációt okoz. Ezen folyamatok epigenetikai úton a tumorsuppresszor gének csendesítéséhez vezetnek, elősegítve ezáltal a tumor képződést. A korábbi, HCC esetén végzett vizsgálatok szerint a MYPT1 tumorsuppresszorként működik a PRMT5-aktivitás szabályozásán keresztül (Sipos és mtsai, 2017), azonban a MYPT1 foszforiláció jelentős növekedése a Thr853 oldalláncon arra utal, hogy a fehérje aktivitása jelentősen csökken a daganatos sejtekben (24. ábra A panelje). A MYPT1 gátló foszforilációját számos kináz enzim (pl. ROK) katalizálhatja, így a MP nem tudja hatékonyan defoszforilálni szubsztrátjait, többek között a PRMT5 enzimet sem. A daganatok sejtek így kerülhetik meg ezt a tumorsuppresszor útvonalat.

A túlélési adatokat tekintve a MYPT1 expressziója, foszforilációs állapota szignifikánsan befolyásolja a túlélést (23. ábra B panelje és 25. ábra). Mindkét szövettani típus esetén az alacsony MYPT1 foszforilációt mutató csoportoknál láttunk jobb teljes túlélési eredményeket (SCC esetén 25 hónap, ADC esetén 45 hónap), mely különbség statisztikailag szignifikáns volt ($p=0,034$), míg a magas foszforilációjú csoportok esetén szerényebb eredményeket kaptunk (SCC: 21 hónap, ADC: 39 hónap). Ennek fényében elmondható tehát, hogy a túlélés szempontjából a MYPT1 foszforilációs állapotának nagyobb jelentősége van a prognózis becslése szempontjából, mint a fehérje teljes mennyiségének. Az alacsony MYPT1 foszforilációt mutató ADC betegek túlélése volt a legjobb vizsgálatunk során, így az ő prognózisuk eredményeink alapján jobbnak mondható a többi csoporttal szemben. Eredményeink alátámasztják tehát, hogy a MYPT1 gátló foszforilációjának túlsúlyba kerülése összefüggésbe hozható a daganatképződéssel, melyet már más daganatok esetén is vizsgáltak (Liang és mtsai, 2018; Wang és Sun, 2018). Elmondható az is, hogy a MYPT1 expressziójának csökkenése nem egyértelműen állt összefüggésben a daganatképződéssel, azonban a Thr853 helyen történő foszforiláció emelkedése igen, mely részben magyarázható a PPM1B által szabályozott MP működéssel.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a PRMT5 onkogén szerepet tölthet be a tüdőrák esetén, melyet fokozott expresszióján és a Thr80 oldalláncon történő aktiváló foszforilációjának fokozódása révén ér el. Az ADC és SCC szövetekben egyaránt látszott az emelkedett PRMT5-expresszió, melyet már más vizsgálatokban is leírtak korábban több daganattípus esetén is (Kiss és mtsai, 2019; Motolani és mtsai, 2021; H. Wang és mtsai, 2023; Wolf, 2009). Egy metaanalízis során, kb. 15000 beteg adatait elemezve, is erre a következtetésre jutottak. Eszerint a PRMT5 különböző tumorokban mérhető magasabb fehérje szintjei mérhetők, és ezek kedvezőtlen túléléssel jártak máj-, hasnyálmirigy- emlő- és tüdődaganatokban (Liang és mtsai, 2021). A saját munkánkban a PRMT5 és a túlélés esetén nem találtunk szignifikáns összefüggést,

mely a kis mintaszám miatt lehetett. Tumoros mintákon jelentős PRMT5 Thr80 foszforiláció-növekedést mértünk (28. ábra A panelje), mely megnövekedett aktivitásra utal, hiszen ez a foszforilációs esemény ismert módon fokozza a PRMT5 metiltranszferáz aktivitását. A PRMT5^{pT80}-foszforiláció mérésének klinikai jelentősége lehet, mivel összefüggést találtunk az OS adatokkal is (29. ábra). A magas PRMT5^{pT80} foszforilációs szintet mutató SCC betegek esetén jelentősen alacsony OS értéket kaptunk (6,5 hónap) az alacsony foszforilációs szintet mutatókéhoz képest (33,5 hónap), ennek fényében a jövőben ez a módosulás potenciális prognosztikai biomarkerré és terápiás célponttá válhat reményeink szerint. Az ADC-betegek esetében az OS adatok közötti különbség kevésbé volt markáns, de szignifikánsak bizonyult (magas foszforilációjú csoport: 35,5 hónap, alacsony foszforilációjú csoport: 45 hónap). Tehát ezekből arra lehet következtetni, hogy a PRMT5^{pT80} aktiváló foszforilációjának szerepe az SCC szövettani típus kialakulása esetén kritikusabb, ezt alátámasztja az is, hogy a magas PRMT5^{pT80} foszforilációval rendelkező SCC és ADC betegek között is jelentős különbség mutatkozott OS-ben. Immunfluoreszcens vizsgálatok során egyértelműen látszott a PRMT5 és a PRMT5^{pT80} sejtmagi elhelyezkedése (28. ábra B panelje), mely összefügg hiszton metiltranszferáz funkciójával, és alátámasztja annak epigenetikai génszabályozásban betöltött szerepét.

A PRMT5 fokozott működésének downstream eredménye, a hiszton H2A szimmetrikus dimetilációja, mindkét általunk vizsgált daganat típusban nagy mértékben növekedett (31. ábra A panelje). A H2A-expresszió az ADC kontrollszövetekben volt a legmagasabb (30. ábra A panelje), azonban a H2A dimetilációs szintjének emelkedésével ADC betegek esetén jelentősen csökkent túlélést tapasztaltunk adataink alapján. A hiszton H2A szimmetrikus dimetilációja, mint az általunk vizsgált útvonal egyensúly eltolódásának funkcionális következménye, hatalmas mértékben fokozódott a daganatszövetekben, ami a PRMT5 fokozott enzimatisz aktivitását jelenti in vivo. A különösen figyelemre méltó, 24,74-szoros növekedés SCC-ben és 2,49-szoros növekedés ADC-ben, mely egyértelművé teszi, hogy az általunk azonosított

jelátviteli útvonal eltérései ténylegesen, funkcionális downstream következményekben nyilvánulnak meg. Ez a hiszton módosítás ismertén a génexpresszió csökkenéséhez vezet, különösen a tumorsuppresszor gének csökkent kifejeződéséhez. Ennélfogva a kapcsolat a PRMT5 fokozott működése és az onkogenezis között igen valószínű. A H2A (31. ábra A panelje), illetve a H4 (32. ábra B panelje) dimetilációjának mértéke eltérő volt a különböző szövettani altípusok között, ami a tumortípusok eltérő molekuláris sajátosságait jelentheti. A változás SCC-ben nagyobb mértékű volt, mint ADC-ben, ami utalhat arra, hogy az SCC kialakulása során inkább epigenetikai elnémítási mechanizmusok játszanak szerepet, míg az ADC-k esetében más onkogén mechanizmusok nagyobb szerepet kaphatnak.

A tumoros szövetmintákon alacsony pRb tumorsuppresszor-expressziót tapasztaltunk (33. ábra A panelje), ami közvetett bizonyítékot szolgáltat a hiszton szimmetrikus dimetilációjára, ezáltal megerősítést nyer az MP/PRMT5-útvonalhoz kapcsolódó génexpressziót gátló hatás, melyet Sipos és munkatársai korábban HCC esetén már sugalltak. Ezen megfigyelésünket az OS adatok is alátámasztják, melyek elemzése során a H2A-dimetiláció erősebb prognosztikai jelentőségűnek bizonyult SCC-betegek eseténben, mint ADC-betegekben.

Kutatásunk során egy új, onkogén jelátviteli tengelyt vizsgáltunk a tüdőrákban, ennek során az SCC és ADC altípusok eltérő molekuláris környezetét tártuk föl. Eredményeink új lehetőségeket jelenthetnek a biomarker-fejlesztés és akár terápiás beavatkozások terén is, ebből a szempontból különösen fontosnak tartottuk a PPM1B-t. Ezen enzim csökkent expressziója egy olyan molekuláris eseményláncolatot indíthat el, mely a tumorsuppresszor gének csendesítéséhez és ezáltal tumorprogresszióhoz vezethet, így a PPM1B funkciójának helyreállítása vagy tumorsuppresszor-aktivitásának kifejeződést fokozó terápiák fejlesztésének alapját képezheti. A PRMT5 esetében már több PRMT5-gátló jelenleg is klinikai vizsgálat alatt áll (Hwang és mtsai, 2021). A PRMT5^{pT80} mint prognosztikai biomarkerként való azonosítása, különösen SCC esetében, alkalmas lehet kockázatelemzésre, esetleg bizonyos

terápiás optimalizálásra is. Hu és munkatársai kimutatták, hogy a PRMT5 gátlása (shRNS-sel vagy farmakológiai úton) lassítja a tumorprogressziót, és fokozza a PD-L1 expressziót, így fokozza az immunellenőrzőpont-gátlók hatását (Hu és mtsai, 2021), ezáltal a jövőben lehetőség nyílhat komplexebb terápiák fejlesztésére is. A MYPT1^{pT853} és PRMT5^{pT80} foszforilációjáért felelős kinázok célzása potenciális terápiás lehetőséggé válhat, az onkogén útvonal megszakítása által.

A beteganyagunk eredményei (dohányzási anamnézis, átlagéletkor, szövettani megoszlás, túlélés) 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. Tekintettel a betegbevonásra, kutatásunk egyik limitációja, hogy hiányoznak belőle az igen kis méretű (T1-es stádiumú) és az igen kiterjedt (irreszekábilis III-as és IV-es stádiumú betegek) méretű daganatok. Igen érdekes lenne kiterjeszteni vizsgálatunkat a magasabb stádiumú betegekre is. Tanulmányunk másik, még jelentősebb limitációja a viszonylag kis mintaszám, mely egyértelmű összefüggést mutat az onkogén jelátviteli útvonal elemeinek poszttranszlációs módosulásaival, elsősorban feltáró jelentőségű, és további, nagyobb betegcsoportokon végzett vizsgálatokat igényel az eredmények megerősítésére.

Alkalmam volt részt venni egy további vizsgálatban, mely során a funkcionális virtuális bronchoszkópia minőségének javításával foglalkoztak. Az ld és hd CT képek regisztrációjának fejlesztése és a regisztráció ellenőrzésének automatizálhatósága volt a cél. Ezzel egy olyan módszer látott napvilágot, mely a gyakorlatban könnyen alkot egy hdCT és PET információ alapú virtuális bronchoscopiát a beteg már meglévő képalkotó vizsgálataiból, melyek akár nem

is egy intézményben történtek, mely igen gyakran előfordul és igen nagy fennakadásokat okozhat a beteg kivizsgálása során.

A módszer kidolgozása során tüdőgyógyász/bronchológusként a betegek kiválasztásában, a betegadatok gyűjtésében, a konvencionális bronchoszkópia végzésében, a hörgő anatómia egyeztetésében vettem részt. A bronchoszkópia során szerzett tapasztalataim megosztásával segítettem a hörgőrendszerben való tájékozódásban, mely kritikus a virtuális bronchoszkópia rekonstrukciója során. A munka során a készülő képi modellekkel kapcsolatban konzultáltunk, hogy a jövőbeni bronchoszkópos mintavételek tervezését mennyire segíti a létrehozott a képanyag.

A széles körben elterjedt voxel-alapú virtuális bronchoszkópia hatékonyságát növeli, ha lehetőség van azt funkcionális (PET vizsgálattal kiegészítve) voxel-alapú virtuális bronchoszkópiaként generálni, mivel a részletes morfológiát metabolikus, azaz funkcionális elemzéssel is kiegészítjük. Ez segíthet abban, hogy a tumor legviabilisabb részéről vegyünk mintát, vagy több góc/nyirokcsomó esetén a legaktívabból, növelve ezzel a mintavétel sikerességét. Olyan algoritmusok is léteznek (Bauer és Steiner, 2007), amelyek a két 3D képet (hdCT-PET és digitalizált bronchoszkópos felvétel) egyetlen, összevont képen tesz láthatóvá. A jó minőségű funkcionális virtuális bronchoszkópiához elengedhetetlen az ldCT és hdCT képek regisztrációja, ehhez egy transzformációs mátrixra van szükség, hogy a PET és hdCT képek anatómiaiailag helyesen illeszkedjenek egymáshoz.

Az első regisztrációkat radiológus bírálta el az irányban, hogy a regisztráció elfogadható volt-e, ez szubjektív és nehezen skálázható volt. Olyan megoldásra volt szükség, mely objektíven jellemezte a regisztráció minőségét, ehhez a nem(egyezés) numerikus értékkel való kifejezése elengedhetetlen. Amennyiben az adatok között szoros korreláció volt, a szoftveres eljárás helyettesíthette a radiológus általi elbírálást a ldCT és hdCT regisztrációk esetében.

Korábbi tanulmányok során azt találták, hogy a regisztrációs hibák megbízható jelentéséhez a távolság alapú hibákat kell elemezni (Rohlfing, 2012). A D egy távolság alapú jellemzése a regisztrált képpárok pontjainak, így egy vele korreláló paraméter is hasonló jellemzést ad. A D kiszámítása nagyon munkaigényes, így a szoftveres eljárás egyszerűbb lehet, de minőségbiztosításban ez alatt marad. A szoftveres eljárás létrehozásához olyan paraméterek kiválasztása képezte a módszer alapját, melyek a képek voxeleinek intenzitásadatainak hasonlóságát (minél nagyobb, annál jobb) és különbözőségét (minél kisebb, annál jobb) írják le. Ezek voltak a Pearson korrelációs együttható, a kölcsönös információ (MI), normalizált kölcsönös információ (NMI), Kullback–Leibler divergencia, L1 normát és L2 norm négyzet. Azonban csak egyetlen esetben volt szoros a korreláció, ami arra utal, hogy a (nem)egyezőségi paraméterek eltérően értelmezik a hasonlóság és különbözőség fogalmát.

A kategorizálás elvégezhető konfidencia intervallumok segítségével is. Azok a regisztrációk, melyek MI értéke az „a” vagy „b” konfidencia intervallumba esnek, elfogadható vagy nem elfogadhatóként értékelődnek. Amennyiben az értékek a „b” intervallumba esnek, azt jelentik, hogy a regisztráció nem megfelelő és szigorúbb feltételek mellett kell újra elvégezni. A módszer hátránya és jelentős limitációja, hogy bármilyen képalkotó berendezés, szegmentáció vagy regisztrációs protokoll változás esetén újra kell számítani a konfidencia intervallumokat. Ezen módszer megfelelő körülmények között megbízható és reprodukálható keretet biztosít a regisztráció minőségének objektív értékelésére.

Kutatásunk eredményeképpen az új onkogén útvonal feltárása és a funkcionális virtuális bronchoszkópos módszer fejlesztése egyaránt hozzájárulhat a tüdőrák diagnosztikus és terápiás tárházának bővítéséhez, segítve küzdelmünket egy emberek millióinak életét követelő betegség ellen.

Új megállapítások

1. A PPM1B/MYPT1/PRMT5/hisztin 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 adenocarcinoma, mind a laphám carcinoma esetén.
3. Megállapítottuk, hogy a MYPT1 relatív expressziója emelkedett tumoros mintákban.
4. Ezzel összhangban a MYPT1 Thr⁸⁵³ gátló oldalláncának foszforilációját is emelkedettnek találtuk a tüdőrákos szövetmintákban.
5. A jelátviteli út vonal 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 hisztin fehérjék (H2A és H4) szimmetrikus dimetilációja szignifikánsan emelkedett volt a tüdő adeno- és laphám daganatos mintákban, mely a génátírás repressziójára utal.
8. A jelátviteli út vonal eltéréseinek génrepressziót okozó hatását a jól ismert tumorszupresszor, 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/hisztin 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 hisztin 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 bronchoszkópia, 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 szövődmények kockázatát csökkentheti.

Summary

In summary, our work aimed to approach lung cancer in a comprehensive manner by examining a new oncogenic signaling pathway and an innovative imaging technic in the service of personalized diagnostics. In our study, we demonstrated that the PPM1B/MP/PRMT5/histone signaling pathway plays a role in the development and progression of lung cancer.

Disregulation of this pathway (the reduced expression of PPM1B, functional inactivation of MYPT1 despite its elevated expression, elevated PRMT5 activity, and increased methylation of histone H2A) reveals new mechanism of lung cancer development. The differences between the adenocarcinoma (ADC) and squamous cell carcinoma (SCC) subtypes further highlight the molecular heterogeneity of lung cancer, and we hope that our results may, in the future, contribute to lung cancer treatment.

In addition to molecular mechanisms and potential diagnostic approaches, we also explored imaging possibilities. During the diagnostic process of lung cancer patients usually undergo contrast enhanced CT and PET-CT examination. The automated functional virtual bronchoscopy developed at our university combines the advantages of both PET and high-resolution CT while using retrospective scans, thereby avoiding additional radiation exposure. Using of functional information may enhance the success rate of tissue sampling, while vascular visualization could help to reduce the risk of complications.

Tárgyszavak (Keywords)

Tárgyszavak:

PPM1B

MYPT1

PRMT5

Hisztónok (H2A, H4)

Foszforiláció

Dimetiláció

Tüdőrák

Adenocarcinoma

Laphám carcinoma

Keywords:

PPM1B

MYPT1

PRMT5

Histon (H2A, H4)

Phosphorylation

Dimethylation

Lung cancer

Adenocarcinoma

Squamous cell carcinoma

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Lontay Beátának az elmúlt évek során tanúsított türelméért, segítségéért és szakmai iránymutatásáért.

Köszönöm Dr. Virág László professzor úrnak, intézetünk igazgatójának, hogy lehetővé tette, hogy PhD éveimet az Orvosi Vegytani Intézetben tölthessem.

Köszönöm kollégáimnak, Andikának és Ágotának a mintagyűjtés és labor munka során nyújtott technikai segítségüket, végtelen kedvességüket.

Köszönöm kedves hallgatótársaimnak: Horváth Daninak, Keller Ilkának, Major Evelinnek, Szalmás Fanninak, Ungvári Ádámnak a rengeteg segítséget és támogatást.

Köszönöm a Mellkassebészeti dolgozóinak, hogy segítettek a mintavételek során a logisztikában, technikai megvalósításában, kiemelten Dr. Takács István Tanár Úrnak és Fekete Mariannak.

Köszönöm Dr. Opposits Gábornak és az Orvosi Képző Intézet (Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar), hogy vizsgálatukban részt vehettem.

Köszönöm a Tüdőklinika dolgozóinak a támogatását munkám során.

Hálás vagyok családomnak a támogatásukért, türelmükért a munka elkészültének időszaka alatt.

Munkánkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal FK125043 és K143533 számú pályázatai, valamint a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karának Kutatási Alapja támogatta.

Hivatkozások

- Abdayem, P., & Planchard, D. (2022). Ongoing progress in BRAF-mutated non-small cell lung cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*, 20(11), 662-672.
- Addissouky, T. A., El Sayed, I. E. T., Ali, M. M. A., Wang, Y., El Baz, A., Elarabany, N., & Khalil, A. A. (2024). Oxidative stress and inflammation: elucidating mechanisms of smoking-attributable pathology for therapeutic targeting. *Bulletin of the National Research Centre*, 48(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s42269-024-01174-6>
- Aggarwal, P., Vaites, L. P., Kim, J. K., Mellert, H., Gurung, B., Nakagawa, H., Herlyn, M., Hua, X., Rustgi, A. K., McMahon, S. B., & Diehl, J. A. (2010). Nuclear Cyclin D1/CDK4 Kinase Regulates *CUL4* Expression and Triggers Neoplastic Growth via Activation of the PRMT5 Methyltransferase. *Cancer Cell*, 18(4), 329-340. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.08.012>
- Antonysamy, S., Bonday, Z., Campbell, R. M., Doyle, B., Druzina, Z., Gheyi, T., Han, B., Jungheim, L. N., Qian, Y., Rauch, C., Russell, M., Sauder, J. M., Wasserman, S. R., Weichert, K., Willard, F. S., Zhang, A., & Emtage, S. (2012). Crystal structure of the human PRMT5:MEP50 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(44), 17960-17965. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209814109>
- Asamura, H., Chansky, K., Crowley, J., Goldstraw, P., Rusch, V. W., Vansteenkiste, J. F., Watanabe, H., Wu, Y. L., Zielinski, M., Ball, D., & Rami-Porta, R. (2015). The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the N Descriptors in the Forthcoming 8th Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 10(12), 1675-1684. <https://doi.org/10.1097/jto.0000000000000678>
- Bajbouj, K., Ramakrishnan, R. K., Saber-Ayad, M., Omar, H. A., Saheb Sharif-Askari, N., Shafarin, J., Elmoselhi, A. B., Ihmaid, A., AlHaj Ali, S., Alalool, A., Abdullah, R., & Hamid, Q. (2021). PRMT5 Selective Inhibitor Enhances Therapeutic Efficacy of Cisplatin in Lung Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 6131. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/11/6131>
- Balbi, M., Righi, L., Culasso, N. C., Bignoli, M., Senkeev, R., Garello, L. F., Carota, D., Sobrero, S., Novello, S., & Veltri, A. (2025). CT-guided transthoracic needle biopsy: How we do it. *Eur J Radiol*, 184, 111994. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2025.111994>
- Bátori, R., Bécsi, B., Nagy, D., Kónya, Z., Hegedűs, C., Bordán, Z., Verin, A., Lontay, B., & Erdődi, F. (2017). Interplay of myosin phosphatase and protein phosphatase-2A in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and nitric oxide production. *Scientific Reports*, 7(1), 44698. <https://doi.org/10.1038/srep44698>
- Bauer, T. L., & Steiner, K. V. (2007). Virtual Bronchoscopy: Clinical Applications and Limitations. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 16(2), 323-328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soc.2007.03.005>
- Becker, N., Motsch, E., Trotter, A., Heussel, C. P., Dienemann, H., Schnabel, P. A., Kauczor, H. U., Maldonado, S. G., Miller, A. B., Kaaks, R., & Delorme, S. (2020). Lung cancer

- mortality reduction by LDCT screening-Results from the randomized German LUSI trial. *Int J Cancer*, 146(6), 1503-1513. <https://doi.org/10.1002/ijc.32486>
- Berg, C. D., Schiller, J. H., Boffetta, P., Cai, J., Connolly, C., Kerpel-Fronius, A., Kitts, A. B., Lam, D. C. L., Mohan, A., Myers, R., Suri, T., Tammemagi, M. C., Yang, D., & Lam, S. (2023). Air Pollution and Lung Cancer: A Review by International Association for the Study of Lung Cancer Early Detection and Screening Committee. *Journal of Thoracic Oncology*, 18(10), 1277-1289. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2023.05.024>
- Bhateja, P., Chiu, M., Wildey, G., Lipka, M. B., Fu, P., Yang, M. C. L., Ardeshtir-Larijani, F., Sharma, N., & Dowlati, A. (2019). Retinoblastoma mutation predicts poor outcomes in advanced non small cell lung cancer. *Cancer Medicine*, 8(4), 1459-1466. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cam4.2023>
- Blumenthal, G. M., Karuri, S. W., Zhang, H., Zhang, L., Khozin, S., Kazandjian, D., Tang, S., Sridhara, R., Keegan, P., & Pazdur, R. (2015). Overall Response Rate, Progression-Free Survival, and Overall Survival With Targeted and Standard Therapies in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: US Food and Drug Administration Trial-Level and Patient-Level Analyses. *Journal of Clinical Oncology*, 33(9), 1008-1014. <https://doi.org/10.1200/jco.2014.59.0489>
- Bogos, K., Kiss, Z., Gálffy, G., Tamási, L., Ostoros, G., Müller, V., Urbán, L., Bittner, N., Sárosi, V., Vastag, A., Polányi, Z., Nagy-Erdi, Z., Vokó, Z., Nagy, B., Horváth, K., Rokszin, G., Abonyi-Tóth, Z., & Moldvay, J. (2019). Revising Incidence and Mortality of Lung Cancer in Central Europe: An Epidemiology Review From Hungary. *Front Oncol*, 9, 1051. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01051>
- Börzsei, R., Bayarsaikhan, B., Zsidó, B. Z., Lontay, B., & Hetényi, C. (2022). The Structural Effects of Phosphorylation of Protein Arginine Methyltransferase 5 on Its Binding to Histone H4. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11316. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/19/11316>
- Cai, C., Gu, S., Yu, Y., Zhu, Y., Zhang, H., Yuan, B., Shen, L., Yang, B., & Feng, X.-H. (2021). PRMT5 Enables Robust STAT3 Activation via Arginine Symmetric Dimethylation of SMAD7. *Advanced Science*, 8(10), 2003047. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/advs.202003047>
- Cheema, M. S., & Ausió, J. (2015). The Structural Determinants behind the Epigenetic Role of Histone Variants. *Genes*, 6(3), 685-713. <https://www.mdpi.com/2073-4425/6/3/685>
- Chen, G., Gharib, T. G., Huang, C. C., Taylor, J. M., Misek, D. E., Kardia, S. L., Giordano, T. J., Iannettoni, M. D., Orringer, M. B., Hanash, S. M., & Beer, D. G. (2002). Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics*, 1(4), 304-313. <https://doi.org/10.1074/mcp.m200008-mcp200>
- Cho, H. J., Kim, J. T., Lee, S. J., Hwang, Y. S., Park, S. Y., Kim, B. Y., Yoo, J., Hong, K. S., Min, J. K., Lee, C. H., Lim, J. S., Yoon, S. R., Choi, I., Choe, Y. K., & Lee, H. G. (2018). Protein phosphatase 1B dephosphorylates Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor 1 and suppresses cancer cell migration and invasion. *Cancer Lett*, 417, 141-151. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.002>

- de Sousa, V. M. L., & Carvalho, L. (2018). Heterogeneity in Lung Cancer. *Pathobiology*, 85(1-2), 96-107. <https://doi.org/10.1159/000487440>
- Detterbeck, F. C., Boffa, D. J., Kim, A. W., & Tanoue, L. T. (2017). The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest*, 151(1), 193-203. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.10.010>
- Dr. Bogos, K., & Dr. Ostoros, G. (2025). Tüdörák. *Korányi Bulletin* 1. szám, 32-41.
- Drilon, A., Chiu, C. H., Fan, Y., Cho, B. C., Lu, S., Ahn, M. J., Krebs, M. G., Liu, S. V., John, T., Otterson, G. A., Tan, D. S. W., Patil, T., Dziadziuszko, R., Massarelli, E., Seto, T., Doebele, R. C., Pitcher, B., Kurtsikidze, N., Heinzmann, S., & Siena, S. (2022). Long-Term Efficacy and Safety of Entrectinib in ROS1 Fusion-Positive NSCLC. *JTO Clin Res Rep*, 3(6), 100332. <https://doi.org/10.1016/j.jtocrr.2022.100332>
- Du, L., Li, J., Tian, Y., & Feng, R. (2023). Pleckstrin-2-promoted PPM1B degradation plays an important role in transforming growth factor- β -induced breast cancer cell invasion and metastasis. *Cancer Sci*, 114(6), 2429-2444. <https://doi.org/10.1111/cas.15791>
- Du, M., Gong, P., Zhang, Y., Liu, Y., Liu, X., Zhang, F., & Wang, X. (2021). Histone methyltransferase SETD1A participates in lung cancer progression. *Thoracic Cancer*, 12(16), 2247-2257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1759-7714.14065>
- Fois, S. S., Paliogiannis, P., Zinellu, A., Fois, A. G., Cossu, A., & Palmieri, G. (2021). Molecular Epidemiology of the Main Druggable Genetic Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 612. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/2/612>
- Gao, N., Chang, A. N., He, W., Chen, C. P., Qiao, Y. N., Zhu, M., Kamm, K. E., & Stull, J. T. (2016). Physiological signalling to myosin phosphatase targeting subunit-1 phosphorylation in ileal smooth muscle. *J Physiol*, 594(12), 3209-3225. <https://doi.org/10.1113/jp271703>
- Gibbons, D. L., Byers, L. A., & Kurie, J. M. (2014). Smoking, p53 Mutation, and Lung Cancer. *Molecular Cancer Research*, 12(1), 3-13. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.Mcr-13-0539>
- Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W. E., Nicholson, A. G., Groome, P., Mitchell, A., & Bolejack, V. (2016). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 11(1), 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.09.009>
- Grills, I. S., Fitch, D. L., Goldstein, N. S., Yan, D., Chmielewski, G. W., Welsh, R. J., & Kestin, L. L. (2007). Clinicopathologic analysis of microscopic extension in lung adenocarcinoma: defining clinical target volume for radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 69(2), 334-341. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.03.023>
- Guo, H., Xu, K., Duan, G., Wen, L., & He, Y. (2022). Progress and future prospective of FDG-PET/CT imaging combined with optimized procedures in lung cancer: toward precision medicine. *Ann Nucl Med*, 36(1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s12149-021-01683-8>

- Harada, G., Santini, F. C., Wilhelm, C., & Drilon, A. (2021). NTRK fusions in lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer*, 161, 108-113. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2021.09.005>
- Harrison, P. T., Vyse, S., & Huang, P. H. (2020). Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol*, 61, 167-179. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.09.015>
- Hartshorne, D. J., Ito, M., & Erdödi, F. (1998). Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil*, 19(4), 325-341. <https://doi.org/10.1023/a:1005385302064>
- Hendriks, L. E., Kerr, K. M., Menis, J., Mok, T. S., Nestle, U., Passaro, A., Peters, S., Planchard, D., Smit, E. F., Solomon, B. J., Veronesi, G., & Reck, M. (2023a). Non-oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 34(4), 358-376. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.12.013>
- Hendriks, L. E., Kerr, K. M., Menis, J., Mok, T. S., Nestle, U., Passaro, A., Peters, S., Planchard, D., Smit, E. F., Solomon, B. J., Veronesi, G., & Reck, M. (2023b). Oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 34(4), 339-357. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.12.009>
- Herbrik, M., Treffert, J., Geiger, B., Riegger, C., Hartung, V., Rosenbaum-Krumme, S. J., Forsting, M., Antoch, G., & Heusner, T. A. (2011). Diagnostic Accuracy of Virtual ¹⁸F-FDG PET/CT Bronchoscopy for the Detection of Lymph Node Metastases in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Journal of Nuclear Medicine*, 52(10), 1520-1525. <https://doi.org/10.2967/jnumed.111.092593>
- Horváth, D., Tamás, I., Sipos, A., Darula, Z., Bécsi, B., Nagy, D., Iván, J., Erdödi, F., & Lontay, B. (2017). Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate neurotransmitter release by regulating SNAP-25 of SNARE complex. *PLoS One*, 12(5), e0177046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177046>
- Hu, R., Zhou, B., Chen, Z., Chen, S., Chen, N., Shen, L., Xiao, H., & Zheng, Y. (2021). PRMT5 Inhibition Promotes PD-L1 Expression and Immuno-Resistance in Lung Cancer. *Front Immunol*, 12, 722188. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.722188>
- Hwang, J. W., Cho, Y., Bae, G. U., Kim, S. N., & Kim, Y. K. (2021). Protein arginine methyltransferases: promising targets for cancer therapy. *Exp Mol Med*, 53(5), 788-808. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00613-y>
- Jamal-Hanjani, M., Wilson, G. A., McGranahan, N., Birkbak, N. J., Watkins, T. B. K., Veeriah, S., Shafi, S., Johnson, D. H., Mitter, R., Rosenthal, R., Salm, M., Horswell, S., Escudero, M., Matthews, N., Rowan, A., Chambers, T., Moore, D. A., Turajlic, S., Xu, H., . . . Swanton, C. (2017). Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 376(22), 2109-2121. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJMoa1616288>
- Jänne, P. A., Riely, G. J., Gadgeel, S. M., Heist, R. S., Ou, S.-H. I., Pacheco, J. M., Johnson, M. L., Sabari, J. K., Leventakos, K., Yau, E., Bazhenova, L., Negrao, M. V., Pennell,

- N. A., Zhang, J., Anderes, K., Der-Torossian, H., Kheoh, T., Velastegui, K., Yan, X., . . . Spira, A. I. (2022). Adagrasib in Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring a KRAS^{G12C} Mutation. *New England Journal of Medicine*, 387(2), 120-131. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJMoa2204619>
- Jansson, M. D., & Lund, A. H. (2012). MicroRNA and cancer. *Mol Oncol*, 6(6), 590-610. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.09.006>
- Jiang, B., Thacker, J., & Towe, C. W. (2025). Evolving surgical standards in early-stage non-small cell lung cancer: A review of sublobar resections and future perspectives. *AIMS Medical Science*, 12(3), 279-291. <https://doi.org/10.3934/medsci.2025019>
- Jiang, L., & He, J. (2018). Recent developments in minimally invasive surgery for biopsy of small pulmonary nodules. *J Thorac Dis*, 10(Suppl 7), S905-s908. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.01.08>
- Keller, I., Ungvári, Á., Major, E., Horváth, D., Kónya, Z., Tóth, E., Erdődi, F., Kiss, A., & Lontay, B. (2025). Magnesium-dependent-protein phosphatase 1B regulates the protein arginine methyltransferase 5 through the modulation of myosin phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 301(2), 108107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.108107>
- Kenessey, I., Parrag, P., Dobozi, M., Szatmári, I., Wéber, A., Nagy, P., & Polgár, C. (2024). The epidemiology of lung cancer in Hungary based on the characteristics of patients diagnosed in 2018. *Sci Rep*, 14(1), 20064. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-70143-w>
- Kerpel-Fronius, A., & Bogos, K. (2024). HUNCHEST projects—advancing low-dose CT lung cancer screening in Hungary [Review]. *Pathology and Oncology Research*, Volume 30 - 2024. <https://doi.org/10.3389/pore.2024.1611635>
- Kiss, A., Erdődi, F., & Lontay, B. (2019). Myosin phosphatase: Unexpected functions of a long-known enzyme. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1866(1), 2-15. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.07.023>
- Kiss, Z., Bogos, K., Tamási, L., Ostoros, G., Müller, V., Urbán, L., Bittner, N., Sárosi, V., Vastag, A., Polányi, Z., Nagy-Erdei, Z., Knollmayer, K., Várnai, M., Nagy, B., Horváth, K., Rokszin, G., Abonyi-Tóth, Z., Barcza, Z., Moldvay, J., . . . Vokó, Z. (2021). Increase in the Length of Lung Cancer Patient Pathway Before First-Line Therapy: A 6-Year Nationwide Analysis From Hungary. *Pathol Oncol Res*, 27, 1610041. <https://doi.org/10.3389/pore.2021.1610041>
- Kitamura, A., Tomishima, Y., Imai, R., Nishimura, N., Okafuji, K., Ro, S., Jinta, T., & Tamura, T. (2022). Findings of virtual bronchoscopic navigation can predict the diagnostic rate of primary lung cancer by bronchoscopy in patients with peripheral lung lesions. *BMC Pulmonary Medicine*, 22(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s12890-022-02071-2>
- Kong, G. M., Yu, M., Gu, Z., Chen, Z., Xu, R. M., O'Bryant, D., & Wang, Z. (2017). Selective small-chemical inhibitors of protein arginine methyltransferase 5 with anti-lung cancer activity. *PLoS One*, 12(8), e0181601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181601>

- Kumar, D., Neeman, E., Zhu, S., Sun, H., Kotak, D., & Liu, R. (2024). Revisiting the Association of ECOG Performance Status With Clinical Outcomes in Diverse Patients With Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 22(2 d). <https://doi.org/10.6004/jnccn.2023.7111>
- Kwak, K., Kang, D., & Paek, D. (2022). Environmental exposure to asbestos and the risk of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Occupational and Environmental Medicine*, 79(3), 207-214. <https://doi.org/10.1136/oemed-2020-107222>
- Lengyel, C., De Mello, R., Tajima, C., & Zia, V. (2023). Advancements of ALK inhibition of non-small cell lung cancer: a literature review. *Translational Lung Cancer Research*. <https://doi.org/10.21037/tlcr-22>
- Li, B. T., Smit, E. F., Goto, Y., Nakagawa, K., Udagawa, H., Mazières, J., Nagasaka, M., Bazhenova, L., Saltos, A. N., Felip, E., Pacheco, J. M., Pérol, M., Paz-Ares, L., Saxena, K., Shiga, R., Cheng, Y., Acharyya, S., Vitazka, P., Shahidi, J., . . . Jänne, P. A. (2022). Trastuzumab Deruxtecan in *HER2*-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 386(3), 241-251. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJMoa2112431>
- Li, R., Dou, J., Bai, T., Cai, B., & Liu, Y. (2022). Protein Phosphatase PPM1B Inhibits Gastric Cancer Progression and Serves as a Favorable Prognostic Biomarker. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 30(5), 366-374. <https://doi.org/10.1097/pai.0000000000001012>
- Li, Z., Chen, R., Li, Y., Zhou, Q., Zhao, H., Zeng, K., Zhao, B., & Lu, Z. (2023). A comprehensive overview of PPM1B: From biological functions to diseases. *European Journal of Pharmacology*, 947, 175633. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175633>
- Liang, Y., Zhuo, Y., Lin, Z., Jiang, F., Dai, Q., Lu, J., Dong, W., Zhu, X., Han, Z., & Zhong, W. (2018). Decreased Expression of MYPT1 Contributes to Tumor Angiogenesis and Poor Patient Prognosis in Human Prostate Cancer. *Curr Mol Med*, 18(2), 100-108. <https://doi.org/10.2174/1566524018666180705111342>
- Liang, Z., Liu, L., Wen, C., Jiang, H., Ye, T., Ma, S., & Liu, X. (2021). Clinicopathological and Prognostic Significance of PRMT5 in Cancers: A System Review and Meta-Analysis. *Cancer Control*, 28, 10732748211050583. <https://doi.org/10.1177/10732748211050583>
- Lieber, A., Makai, A., Orosz, Z., Kardos, T., Isaac, S. J., Tornyi, I., & Bittner, N. (2024). The role of immunotherapy in early-stage and metastatic NSCLC. *Pathol Oncol Res*, 30, 1611713. <https://doi.org/10.3389/pore.2024.1611713>
- Liu, F., Zhao, X., Perna, F., Wang, L., Koppikar, P., Abdel-Wahab, O., Harr, M. W., Levine, R. L., Xu, H., Tefferi, A., Deblasio, A., Hatlen, M., Menendez, S., & Nimer, S. D. (2011). JAK2V617F-Mediated Phosphorylation of PRMT5 Downregulates Its Methyltransferase Activity and Promotes Myeloproliferation. *Cancer Cell*, 19(2), 283-294. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.020>

- Liu, L., Yin, S., & Gan, W. (2023). TRAF6 Promotes PRMT5 Activity in a Ubiquitination-Dependent Manner. *Cancers*, 15(9), 2501. <https://www.mdpi.com/2072-6694/15/9/2501>
- Lontay, B., Pál, B., Serfőző, Z., Kőszeghy, Á., Szűcs, G., Rusznák, Z., & Erdődi, F. (2012). Protein phosphatase-1M and Rho-kinase affect exocytosis from cortical synaptosomes and influence neurotransmission at a glutamatergic giant synapse of the rat auditory system. *J Neurochem*, 123(1), 84-99. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07882.x>
- Lontay, B., Serfőző, Z., Gergely, P., Ito, M., Hartshorne, D. J., & Erdődi, F. (2004). Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells. *Journal of Comparative Neurology*, 478(1), 72-87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cne.20273>
- Losonczy, G., Müller, V., Horváth, G., & Tamási, L. (2020). In *Pulmonológia* (pp. 629-703).
- Lu, Z., Xiao, P., Zhou, Y., Li, Z., Yu, X., Sun, J., Shen, Y., & Zhao, B. (2020). Identification of HN252 as a potent inhibitor of protein phosphatase PPM1B. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(22), 13463-13471. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jcmm.15975>
- Marc Malovrh, M., & Adamic, K. (2024). Unravelling the lung cancer diagnostic pathway: identifying gaps and opportunities for improvement. *Radiol Oncol*, 58(2), 268-278. <https://doi.org/10.2478/raon-2024-0025>
- Markouli, M., Strepkos, D., Basdra, E. K., Papavassiliou, A. G., & Piperi, C. (2021). Prominent Role of Histone Modifications in the Regulation of Tumor Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2778. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/5/2778>
- Mazzone, P. J., & Lam, L. (2022). Evaluating the Patient With a Pulmonary Nodule: A Review. *Jama*, 327(3), 264-273. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.24287>
- Motolani, A., Martin, M., Sun, M., & Lu, T. (2021). The Structure and Functions of PRMT5 in Human Diseases. *Life (Basel)*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/life11101074>
- Pastorino, U., Silva, M., Sestini, S., Sabia, F., Boeri, M., Cantarutti, A., Sverzellati, N., Sozzi, G., Corrao, G., & Marchianò, A. (2019). Prolonged lung cancer screening reduced 10-year mortality in the MILD trial: new confirmation of lung cancer screening efficacy. *Ann Oncol*, 30(7), 1162-1169. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz117>
- Prasad, K. T., Kaur, H., Muthu, V., Aggarwal, A. N., Behera, D., & Singh, N. (2018). Interconversion of two commonly used performance tools: An analysis of 5844 paired assessments in 1501 lung cancer patients. *World J Clin Oncol*, 9(7), 140-147. <https://doi.org/10.5306/wjco.v9.i7.140>
- Rohlfing, T. (2012). Image similarity and tissue overlaps as surrogates for image registration accuracy: widely used but unreliable. *IEEE Trans Med Imaging*, 31(2), 153-163. <https://doi.org/10.1109/tmi.2011.2163944>

- Rossi, G., Pelosi, G., Barbareschi, M., Graziano, P., Cavazza, A., & Papotti, M. (2013). Subtyping non-small cell lung cancer: relevant issues and operative recommendations for the best pathology practice. *Int J Surg Pathol*, 21(4), 326-336. <https://doi.org/10.1177/1066896913489346>
- Roșu, S.-M., Mitroi, D. M., Catană, O. M., Biciușcă, V., Stan, S. I., Mahler, B., Parliteanu, O.-A., Mirea, A. A., & Bălțeanu, M. A. (2025). Flexible Bronchoscopy and Non-Small-Cell Lung Cancer Staging: A Narrative Review of Modern Techniques for Optimized Clinical Decision-Making. *Journal of Clinical Medicine*, 14(16), 5773. <https://www.mdpi.com/2077-0383/14/16/5773>
- Schabath, M. B., & Cote, M. L. (2019). Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 28(10), 1563-1579. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.Epi-19-0221>
- Sholl, L. M., Hirsch, F. R., Hwang, D., Botling, J., Lopez-Rios, F., Bubendorf, L., Mino-Kenudson, M., Roden, A. C., Beasley, M. B., Borczuk, A., Brambilla, E., Chen, G., Chou, T. Y., Chung, J. H., Cooper, W. A., Dacic, S., Lantuejoul, S., Jain, D., Lin, D., . . . Longshore, J. W. (2020). The Promises and Challenges of Tumor Mutation Burden as an Immunotherapy Biomarker: A Perspective from the International Association for the Study of Lung Cancer Pathology Committee. *J Thorac Oncol*, 15(9), 1409-1424. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.05.019>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7-34. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Sipos, A., Iván, J., Bécsi, B., Darula, Z., Tamás, I., Horváth, D., Medzihradzsky, K. F., Erdődi, F., & Lontay, B. (2017). Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate arginine methylation by the regulation of protein arginine methyltransferase 5 in hepatocellular carcinoma cells. *Scientific Reports*, 7(1), 40590. <https://doi.org/10.1038/srep40590>
- Skoulidis, F., Li, B. T., Dy, G. K., Price, T. J., Falchook, G. S., Wolf, J., Italiano, A., Schuler, M., Borghaei, H., Barlesi, F., Kato, T., Curioni-Fontecedro, A., Sacher, A., Spira, A., Ramalingam, S. S., Takahashi, T., Besse, B., Anderson, A., Ang, A., . . . Govindan, R. (2021). Sotorasib for Lung Cancers with *KRAS* p.G12C Mutation. *New England Journal of Medicine*, 384(25), 2371-2381. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJMoa2103695>
- Spitaleri, G., Trillo Aliaga, P., Attili, I., Del Signore, E., Corvaja, C., Pellizzari, G., Katrini, J., Passaro, A., & de Marinis, F. (2024). Non-Small-Cell Lung Cancers (NSCLCs) Harboring RET Gene Fusion, from Their Discovery to the Advent of New Selective Potent RET Inhibitors: “Shadows and Fogs”. *Cancers*, 16(16), 2877. <https://www.mdpi.com/2072-6694/16/16/2877>
- Stieber, P., Hatz, R., Holdenrieder, S., Molina, R., Nap, M., Pawel, J., Schalhorn, A., Schneider, J., & Yamaguchi, K. (2006). National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumor Markers in Lung Cancer. *Tumor Biology*, 27.

- Swain, P. K., Verma, R. J., Bajpai, J., Desai, A. P., Prabhakaran, V., & Sharma, B. S. (2019). Post-translational Modifications (PTMs), from a Cancer Perspective: An Overview. *Oncogen*, 2(3). <https://doi.org/10.35702/onc.10012>
- Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J. S., & Barsouk, A. (2021). Epidemiology of lung cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*, 25(1), 45-52. <https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829>
- Thapa, R., Moglad, E., Goyal, A., Bhat, A. A., Almalki, W. H., Kazmi, I., Alzarea, S. I., Ali, H., Oliver, B. G., MacLoughlin, R., Dureja, H., Singh, S. K., Dua, K., & Gupta, G. (2024). Deciphering NF-kappaB pathways in smoking-related lung carcinogenesis. *Excli j*, 23, 991-1017. <https://doi.org/10.17179/excli2024-7475>
- Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, L. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., & Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*, 10(9), 1243-1260. <https://doi.org/10.1097/jto.0000000000000630>
- Truitt, M. L., & Ruggero, D. (2016). New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nat Rev Cancer*, 16(5), 288-304. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.27>
- Tung, K. H., Yendamuri, S., & Seastedt, K. P. (2024). Adoption of the Robotic Platform across Thoracic Surgeries. *Journal of Clinical Medicine*, 13(19), 5764. <https://www.mdpi.com/2077-0383/13/19/5764>
- Usuda, K., Saito, Y., Sagawa, M., Sato, M., Kanma, K., Takahashi, S., Endo, C., Chen, Y., Sakurada, A., & Fujimura, S. (1994). Tumor doubling time and prognostic assessment of patients with primary lung cancer. *Cancer*, 74(8), 2239-2244. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19941015\)74:8<2239::aid-cncr2820740806>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19941015)74:8<2239::aid-cncr2820740806>3.0.co;2-p)
- van Zandwijk, N., Frank, A. L., Reid, G., Dimitri Røe, O., & Amos, C. I. (2024). Asbestos-Related lung Cancer: An underappreciated oncological issue. *Lung Cancer*, 194, 107861. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2024.107861>
- Villeneuve, P. J., Morrison, H. I., & Lane, R. (2024). Updated Analysis of Radon Exposure and Lung Cancer Mortality in the Cohort of Newfoundland Fluorspar Miners (1950-2016). *Radiat Res*, 202(1), 59-69. <https://doi.org/10.1667/rade-23-00114.1>
- Wallbillich, N. J., & Lu, H. (2023). Role of c-Myc in lung cancer: Progress, challenges, and prospects. *Chin Med J Pulm Crit Care Med*, 1(3), 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.pccm.2023.07.001>
- Wang, F., & Sun, Y. (2018). Overexpression of Myosin Phosphatase Target Subunit 1 (MYPT1) Inhibits Tumor Progression and Metastasis of Gastric Cancer. *Med Sci Monit*, 24, 2508-2517. <https://doi.org/10.12659/msm.906852>

- Wang, H., Yang, L., Liu, M., & Luo, J. (2023). Protein post-translational modifications in the regulation of cancer hallmarks. *Cancer Gene Ther*, 30(4), 529-547. <https://doi.org/10.1038/s41417-022-00464-3>
- Wang, Y., Yang, Q., & Zheng, L. (2023). Association of oxidative stress, programmed cell death, GSTM1 gene polymorphisms, smoking and the risk of lung carcinogenesis: A two-step Mendelian randomization study [Original Research]. *Frontiers in Physiology*, Volume 14 - 2023. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1145129>
- Wolf, S. S. (2009). The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell Mol Life Sci*, 66(13), 2109-2121. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0010-x>
- Wooldridge, A. A., MacDonald, J. A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M. A., Hartshorne, D. J., & Haystead, T. A. (2004). Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem*, 279(33), 34496-34504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405957200>
- Wu, Y.-L., Dziadziuszko, R., Ahn, J. S., Barlesi, F., Nishio, M., Lee, D. H., Lee, J.-S., Zhong, W., Horinouchi, H., Mao, W., Hochmair, M., Marinis, F. d., Migliorino, M. R., Bondarenko, I., Lu, S., Wang, Q., Lohmann, T. O., Xu, T., Cardona, A., . . . Solomon, B. J. (2024). Alectinib in Resected *ALK*-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 390(14), 1265-1276. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJMoa2310532>
- Wu, Y.-L., Tsuboi, M., He, J., John, T., Grohe, C., Majem, M., Goldman, J. W., Laktionov, K., Kim, S.-W., Kato, T., Vu, H.-V., Lu, S., Lee, K.-Y., Akewanlop, C., Yu, C.-J., Marinis, F. d., Bonanno, L., Domine, M., Shepherd, F. A., . . . Herbst, R. S. (2020). Osimertinib in Resected *EGFR*-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 383(18), 1711-1723. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJMoa2027071>
- Yue, D., Liu, W., Chen, C., Zhang, T., Ma, Y., Cui, L., Gu, Y., Bei, T., Zhao, X., Zhang, B., Bai, Y., Romero, A., Xu-Welliver, M., Wang, C., Zhang, Z., & Zhang, B. (2022). Circulating tumor DNA predicts neoadjuvant immunotherapy efficacy and recurrence-free survival in surgical non-small cell lung cancer patients. *Transl Lung Cancer Res*, 11(2), 263-276. <https://doi.org/10.21037/tlcr-22-106>
- Zer, A., Ahn, M. J., Barlesi, F., Bubendorf, L., De Ruysscher, D., Garrido, P., Gautschi, O., Hendriks, L. E., Jänne, P. A., Kerr, K. M., Mascaux, C., Mitsudomi, T., Peters, S., Rolfo, C., Sacher, A., Senan, S., Ugalde, P., & Leighl, N. B. (2025). Early and locally advanced non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 36(11), 1245-1262. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2025.08.003>
- Zhang, Y., Vaccarella, S., Morgan, E., Li, M., Etcheberria, J., Chokunonga, E., Manraj, S. S., Kamate, B., Omonisi, A., & Bray, F. (2023). Global variations in lung cancer incidence by histological subtype in 2020: a population-based study. *Lancet Oncol*, 24(11), 1206-1218. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(23\)00444-8](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(23)00444-8)

Zhou, J., Ye, D., Zhang, S., Ding, J., Zhang, T., Chen, Z., Xu, F., Ren, S., & Hu, Z. (2024). The impact of Karnofsky performance status on prognosis of patients with hepatocellular carcinoma in liver transplantation. *BMC Gastroenterology*, 24(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s12876-024-03161-7>

Függelék



**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., Tornyai, 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.

