

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A plazma C9 epitópok heterogenitásának vizsgálata

Tornyai Iлона

Témavezető: Prof. Takács László



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	8
2. Irodalmi áttekintés	10
2.1. A tüdőrák epidemiológiája világviszonylatban.....	10
2.2. A tüdőrák epidemiológiája Magyarországon	11
2.3. A tüdőrák szövettani osztályozása	12
2.4. A tüdőrák okai.....	13
2.4.1. Genetikai okok	13
2.4.1.1. Örökletes genetikai tényezők.....	13
2.4.1.2. De novo mutációk	14
2.4.2. Környezeti faktorok	16
2.4.2.1. Fizikai faktorok.....	16
2.4.2.2. Kémiai faktorok	17
2.4.3. Dohányzás.....	18
2.5. Szűrés.....	19
2.5.1. Szűrésre alkalmazható módszerek	19
2.5.2. Nemzetközi LDCT szűrőprogramok.....	20
2.5.3. HUNCHEST program.....	23
2.5.4. Törekvések a magas álpozitív eredmények csökkentésére.....	24
2.6. Biomarkerek.....	25
2.6.1. A biomarkerek általános jellemzése	25
2.6.2. A biomarkerek osztályozása	25
2.6.3. A biomarkerek fejlesztésének fázisai.....	25
2.6.4. A rák biomarkerek története	27
2.6.5. Az ideális rák biomarker	27
2.6.6. Tüdőrák biomarkerek.....	28
2.7. A fehérjék szerveződése	29
2.8. Proteom.....	30
2.9. Proteoformák.....	30
2.10. Epitópok.....	31

2.11.	A komplement kaszkád.....	32
2.12.	A fehérje epitóp profilírozás	34
3.	Célkitűzések	36
4.	Anyagok és módszerek.....	37
4.1.	Vizsgált betegcsoportok és feldolgozott minták	37
4.2.	Immunoprecipitáció	38
4.3.	SDS-PAGE	39
4.4.	Festés.....	39
4.4.1.	Coomassie festés.....	39
4.4.2.	Ezüstfestés.....	39
4.5.	Western blott.....	40
4.6.	Tömegspektrometria	41
4.6.1.	Mintaelőkészítés	41
4.6.2.	Tömegspektrometriai mérés.....	41
4.6.3.	Adatok elemzése	41
4.7.	Antitest biotinizálás	42
4.7.1.	Biotinizált antitest előállítása.....	42
4.7.2.	Biotinizált antitest validálása.....	42
4.8.	C9 epitóp teszt.....	43
4.9.	Statisztikai analízis.....	43
4.10.	Ábrázolás	43
5.	Eredmények	44
5.1.	Anti C9- antitestek kiválasztása és korábbi adatainak elemzése	44
5.2.	Az anti-C9 monoklonális antitestek validálása.....	45
5.2.1.	Validálás kereskedelmi forgalomba kapható C9-re.....	45
5.2.2.	C9 vizsgálata plazmában	46
5.3.	A C9-en lévő epitópok átfedésének vizsgálata	47
5.4.	A C9 epitóp-függő heterogenitásának fehérjekémiai analízise	51
5.4.1.	Epitóp heterogenitás fehérjekémiai analízise SDS-PAGE analízissel	51
5.4.2.	Epitóp heterogenitás fehérjekémiai analízise tömegspektrometriás analízissel.....	52
5.4.3.	Az LC-MS/MS eredmények adatanalízise	52
5.4.4.	C9 asszociált plazmafehérjék	57
6.	Megbeszélés.....	59

7.	Összefoglalás	62
8.	Summary	64
9.	Új megállapítások	66
10.	Irodalomjegyzék	67
11.	Tárgyszavak	80
12.	Köszönetnyilvánítás	81
	Függelék	82

Rövidítések jegyzéke

ALK	Anaplasztikus limfóma kináz	Anaplastic Lymphoma Kinase
APS	Ammónium-peroxo-diszulfát	Ammonium Peroxodisulfate
AUC	ROC görbe alatti terület	Area Under ROC Curve
BSI	Biosystems Immunolab Zrt.	Biosystems Immunolab Ltd.
C4A	Komplement faktor C4A	Complement Component 4A
C9	Komplement faktor C9	Complement Component 9
CCDC6	Tekercselt hélix domént tartalmazó 6	Coiled-coil domain containing 6
CDKN2A	Ciklin dependens kináz inhibitor 2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CDR	Komplementaritást meghatározó régió	Complementarity-Determining Region
CEA	Carcinoembrionalis antigén	Carcinoembryonic Antigen
COPD	Krónikus obstruktív tüdőbetegség	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CT	Komputertomográfia	Computed Tomography
Ctrl	Kontroll	Control
DAG	Diacil-glicerol	Diacylglycerol
DLCST	Dán tüdőrákszűrő program	Danish Lung Cancer Screening Trial
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGF	Epidermális növekedési faktor	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermális növekedési faktor receptor	Epidermal Growth Factor Receptor
EGR	Kibocsátott kipufogógáz újrakeringető	Exhaust Gas Recirculation
ELISA	Enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EML4	Echinoderm mikrotubulus-asszociált protein-like 4	Echinoderm Microtubule-Associated Protein-Like 4
EPA	Amerikai Környezetvédelmi Hivatal	Environmental Protection Agency (United States)
FGFR1	Fibroblaszt növekedési faktor receptor 1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FIG	Glioblasztómában fúziót mutató	Fused in Glioblastoma
GAM	Kecske anti-egér	Goat anti-mouse
GDP	Bruttó hazai termék	Gross Domestic Product
GLOBOCAN	A rákos megbetegedések globális statisztikáját tartalmazó adatbázis	Global Cancer Observatory
HABA	Hidroxi-azofenilbenzoészav	4-Hydroxyazobenzene-2-Carboxylic Acid
HAS	Nemzeti Egészségügyi Hatóság (francia)	French National Authority for Health
HCD	Magas energiájú kollíziós szétesés	Higher-energy Collisional

		Dissociation
HRNR	Hornerin	Hornerin
HRP	Tormaperoxidáz	Horseradish Peroxidase
HSP90AB1	Hősokkfehérje 90 alfa család B osztály 1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1
HSPA8	Hősokkfehérje 70 család A osztály 1	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 8
IARC	Nemzetközi Rákkutató Ügynökség	International Agency for Research on Cancer
ICD	Betegségek nemzetközi osztályozása	International Classification of Diseases
IP	Immunoprecipitáció	Immunoprecipitation
KEAP1	Kelch-szerű ECH-társított fehérje 1	Kelch Like ECH Associated Protein 1
KIF5B	Kinezin család 5B tagja	Kinesin Family Member 5B
KSH	Központi Statisztikai Hivatalon	Hungarian Central Statistical Office
LC	Tüdőrák	Lung Cancer
LC-MS	Folyadékkromatográfia - tömegspektrométer	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LDCT	Alacsony sugárdózisú CT	Low-Dose Computed Tomography
LDLRA	Alacsony denzitású lipoprotein receptor A	Low-Density Lipoprotein Receptor A
LLP	Liverpool tüdőrák project	Liverpool Lung Cancer Project
LRG1	Leucingazdag alfa-2-glikoprotein 1	Leucine-Rich Alpha-2-Glycoprotein 1
LUSI mAb	Német tüdarákszűrő program Monoklonális antitest	Lung Cancer Screening Intervention Monoclonal Antibody
MAC	Terminális komplex (Membrán támadó komplex)	Membrane Attack Complex
MACPF	Membrán támadó komplex/perforin	Membrane Attack Complex/Perforin
MASP	Mannóz kötő lektin asszociált szerin proteáz	Mannan-Binding Lectin Serine Protease
MS	Tömegspektrometria	Mass Spectrometry
NEAK	Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelő	National Health Insurance Fund of Hungary
NHIF	Országos Kórházbiztosítási Alap	National Health Insurance Fund
NLST	Nemzeti Tüdőrák Szűrőprogram (amerikai)	National Lung Screening Trial
NSCLC	Nem-kissejtes tüdőrák	Non-Small Cell Lung Cancer
NSE	Neuronspecifikus enoláz	Neuron-Specific Enolase
OD	Optikai denzitás	Optical Density
PBS	Foszfáttal pufferolt sóoldat	Phosphate-Buffered Saline
PEP	Fehérje epitóp profilírozás	Protein Epitope Profiling
PIK3	Foszfatidilinozitol-3-kináz	Phosphoinositide 3-Kinase

PKC	Protein kináz C	Protein Kinase C
PLCg	Foszfolipáz C gamma	Phospholipase C Gamma
ProGRP	Progasztrin-felszabadító peptid	Progastrin-releasing peptide
RLU	Relatív fényegység	Relative light unit
RLUmax	Maximális relatív fényegység	Maximum relative light units
ROC	Vevő működési karakterisztika görbe	Receiver Operating Characteristic curve
ROS1	ROS Protooncogén 1	ROS Proto-Oncogene 1
RP-HPLC	Reverz fázisú folyékkromatográfia	Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography
RPM	Percenkénti fordulatszám	Revolutions Per Minute
sbCIA	Kötődés-gátlási esszé	Single-binder capture inhibition assay
SCC	Laphámsejtrák antigén	Squamous Cell Carcinoma
SCLC	Kissejtes tüdőrák	Small Cell Lung Cancer
SDC4	Szindekán 4	Syndecan 4
SLC34A2	Oldottanyag-hordozó család 34 2-es tagja	Solute Carrier Family 34 Member 2
SMARCA4	SWI/SNF-hez kapcsolódó, mátrixhoz kötődő, aktinfüggő kromatin szabályozó, A alcsalád, 4-es tag	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4
SNP	Egy pontos nukleotid polimorfizmus	Single Nucleotide Polymorphism
SOLACE	A tüdőrákszűrés megerősítése Európában	Strengthening the Screening of Lung Cancer in Europe
SRC	Szelektív katalitikus redukciós rendszer	Selective Catalytic Reduction system
STK11	Szerin/Treonin kináz 11	Serine/Threonine Kinase 11
TEMED	Tetrametil-etilén-diamin	Tetramethylethylenediamine
THC	Tetrahidrokannabinol	Tetrahydrocannabinol
TMB	Tetrametil-benzidin	Tetramethylbenzidine
TNM	Tumor, nyirokcsomó, metasztázis (daganatok stádium beosztása)	Tumor Node Metastasis (Cancer Staging System)
TP53	Tumor protein p53	Tumor Protein P53
TRIM33	Háromrészes motívumot tartalmazó 33	Tripartite Motif Containing 33
TSP1	Thrombospondin-1	Thrombospondin 1
UKLS	Angol tüdőrákszűrő program	UK Lung Cancer Screening
VEGFR	Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WHO	Egészségügyi Világszervezet	World Health Organization

1. Bevezetés

A tüdőrák a legnagyobb mortalitású rákos megbetegedés, melyben évente több millióan halnak meg világszerte. Az ötéves túlélési arány 10-20% között mozog. A statisztikák szerint, európai viszonylatban Magyarországon volt a legmagasabb a tüdőrákban elhunytak aránya 2019-ben.

A betegek túlélését befolyásolja a betegség lehető legkorábbi stádiumú diagnosztizálása. Több, nagy nemzetközi szűrőprogram eredményeire alapozva, jelenleg a korai stádiumok kiszűrésére az alacsony dózisu CT (LDCT) képalkotás az ajánlott módszer. Bár több korai stádiumú tüdőrákos beteget szűrtek ki a programokban, az álpozitív eredmények száma minden vizsgálatban magas volt. Számos módszerrel próbálják csökkenteni ezt a magas arányt, például más képalkotó módszerekkel (mágneses rezonancia képalkotás), rizikófaktorokra épített algoritmusokkal, mesterséges intelligenciával, vagy biomarkerekkel.

A biotechnológia fejlődésével egyre szofisztikáltabb módszerek állnak rendelkezésünkre a biomarkerek fejlesztésére és validálására. Ma már nem csak mennyiségi, hanem minőségi jellemzőit is mérhetjük egy-egy biomarkernek.

Fehérjék szubprotein szinten vizsgálható epitópjai, és az epitópokon keresztül elkülöníthető proteoformák nagyságrendekkel növelhetik az egy génről keletkező proteoformák számát. Ennek oka, hogy a genomszekvencia alapján feltételezett fehérjeszám nem 20 000 körüli, hanem a variabilitás miatt, ennél jóval több. A fehérjék variációja hatással lehet a szerkezetre, ezáltal az epitópok struktúrájára és hozzáférhetőségére is.

Munkacsoportunk által létrehozott PlasmaScan és QuantiPlasma monoklonális könyvtárak használatával lehetőség nyílik egy fehérje több epitópjának a vizsgálatra, így a lehetséges proteoformák detektálására. A különböző proteoformák asszociálhatnak különböző patológias állapotokkal, így biomarker funkciót adva a proteoformát detektáló epitópnak.

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

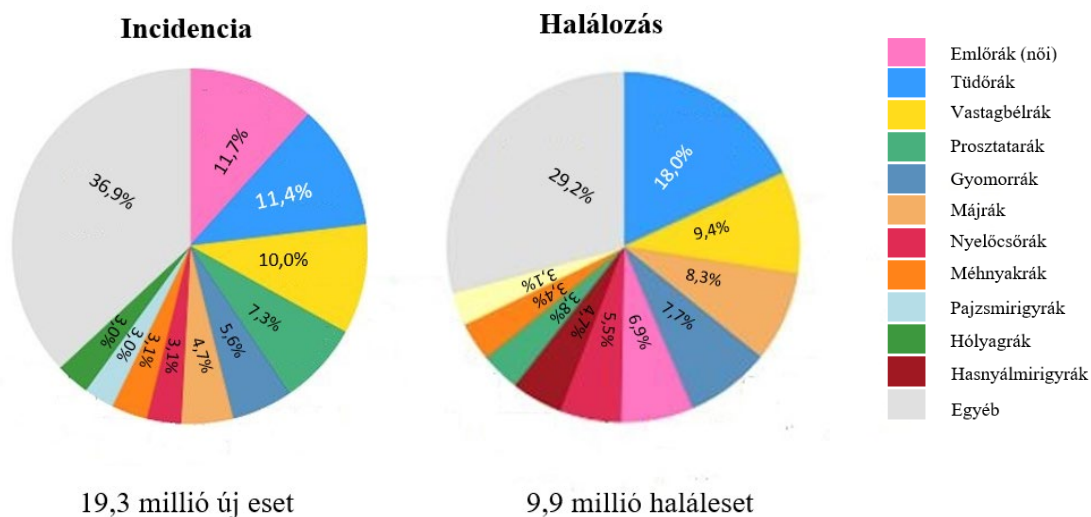
Munkám során a komplement C9 fehérje három epitópját vizsgáltam monoklonális antitestekkel kontroll és tüdőrákos mintákban. Eredményeinkkel szeretnénk hozzájárulni új, epitóp alapú C9 biomarkerekhez, melyek sikeres kiegészítői lehetnek a jelenlegi tüdőrák szűrési programoknak.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A tüdőrák epidemiológiája világviszonylatban

Isaac Adler 1912-ben írta meg az első angol nyelvű, teljes egészében a tüdőrákról szóló monográfiáját, melyben 374 esttanulmányt gyűjtött össze [1]. Habár ez a betegszám magasnak tűnik, valójában alacsonynak számít, figyelembe véve, hogy Adler 1912-ig összesen ennyit talált az addig megjelent szakirodalomban, amely a tüdőrákot igen ritka betegségnek tekintette. Adler volt az első, aki tanulmányában összefüggést fedezett fel a dohányzás és a tüdőrák között.

Manapság a betegségek között a rákos megbetegedések jelentik világszerte a legnagyobb klinikai, társadalmi és gazdasági terhet. A tüdőrák a világon, a második leggyakrabban diagnosztizált és a legnagyobb mortalitáshoz vezető ráktípus mind a két nemet figyelembe véve (1. ábra). A várható átlagos ötéves túlélés körülbelül 10-20% közötti, azok között, akiket 2010-2014 között diagnosztizáltak tüdőrákkal. Ez a mutató Japánban (33%), Izraelben (27%) és Koreában (25%) magasabb az átlagnál [2].



1. ábra: Az új diagnosztizált esetek és elhalálozások aránya a rákos megbetegedések között világviszonylatban [2] (Saját szerkesztés).

2019-ben a halálozások 55%-át 10 fő okra tudták visszavezetni. Ez a 10 fő ok világszerte 55,4 millió ember halálát okozta. A 10 fő ok közül 7 krónikus betegség volt, melyek az összes haláleset 74%-áért volt felelős. Ezen okok közé tartozik hatodik vezető okként - egyetlen ráktípusként - a hörgő és tüdő rosszindulatú daganatos elváltozásai (ICD-10:C34). Ez a rákos megbetegedés 2000-ben 1,2 millió, 2019-ben már 1,8 millió emberéletet követelt [3].

A bruttó hazai termék (GDP) alapján négy osztályba sorolják az országokat: alacsony, közepes, közepesen magas és magas jövedelmű országok. Az alacsony és közepes alacsony jövedelmű országokban nem szerepel az első tízben, viszont a közepesen magas (pl.: Magyarország) és magas jövedelmű országokban negyedik helyen áll a vezető halálok között a tüdőrák a WHO 2020-as adatai szerint [3].

2.2. A tüdőrák epidemiológiája Magyarországon

Európai viszonylatban, Magyarországon volt a legmagasabb a rákos megbetegedésekben elhunytak aránya (320,87 / 100 000 lakos) 2020-ban. Az Európai Unió átlag arány 242,24 / 100 000 lakos volt ugyanebben az évben [4]. A tüdőrákban elhunytak aránya a legmagasabb volt 2019-ben Magyarországon az európai országok között (84,4 / 100 000 lakos) [5].

Egy 2018-ben megjelent összefoglaló közleményben, melyben 40 európai országban a 25 leggyakoribb ráktípust vizsgálták, Magyarországon volt a legmagasabb a tüdőrák incidenciája (férfiaknál 111,6, nőknél 58,7 100 000 lakosra vonatkoztatva), és tüdőrák elhalálozási arány (férfiaknál 97,1, nőknél 44,3 100 000 lakosra vonatkoztatva) [6].

Egy 2019-ben megjelent magyar tanulmányban a Nemzeti Egészségbiztosítási Alapkezelő (NEAK) adatait használva a 2011-es és 2016-os időszakra számolva a tüdőrákban elhunytak aránya ennél jóval kevesebb volt [7]. A tanulmányba azok a betegek kerültek be, akiknél 2011. január 1. és 2016. december 31. között újonnan diagnosztizáltak tüdőrákot; kétszer megjelentek vizsgálatra 30 napon túl, de egy éven belül; a diagnózis felállításakor elmúltak 20 évesek; ha a beteg elhunyt a diagnózis felállítása után 60 nappal. A tanulmányból kizáró ok volt, ha a diagnózis felállítása utána 6 hónapon belül vagy 12 hónap után a tüdőrákon kívül más rákos megbetegedést is diagnosztizáltak; ha a beteg 6 hónapon belül vagy 12 hónap után a tüdőrák kezelésén kívül más rákterápiát is kapott. Ezeket a kritériumokat figyelembe véve 2011-ben 7158, míg 2016-ban 6996 új beteget regisztráltak az Országos Kórházbiztosítási Alap (NHIF) adatbázisba. A magyar tanulmány következtetései a következők voltak: ugyan a

kor szerint standardizált előfordulási arány magas az országban, de alacsonyabb, mint ahogy azt a Ferlay [6] tanulmányban mutatták mind a két nemnél; a kor szerint standardizált előfordulási arány a férfiaknál csökkenő, míg a nőknél emelkedő tendenciát mutat. A Ferlay tanulmányból számolt eredményekhez statisztikai modellekkel számolták ki a becsült előfordulási és halálozási arányokat a nemzeti rákregiszterekben publikált adatokból, ha azok elérhetőek voltak; ha pedig nem akkor megbecsülték az adatokat [6]. Mivel Magyarország nem jelentett nemzeti előfordulási adatokat a Ferlay tanulmány által vizsgált időszakban, így azt csak megbecsülték az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatait felhasználva a környező országok előfordulási és halálozási arányaiból. Ezen kívül, csak a halálozási adatok voltak elérhetőek a Központi Statisztikai Hivatalon (KSH) keresztül a magyarországi adatokból, melyek posztmortem vizsgálatokból származtak. Magyarországon nagyon magas a kórházi elhalálozás utáni boncolások száma [8]. A klinikai eredményekhez képest magasabb rákos előfordulási arányt lehet kimutatni a boncolás során [9]. A két tanulmány közötti különbség magyarázható az adatok gyűjtési módjának eltéréseivel és a kórházban történt elhalálozás utáni boncolások magas arányával.

Magyarországon, a vizsgált 2011-2016 közötti időszakban, magas a tüdőrákban elhunytak aránya (férfiaknál: 72,8; nőknél: 28,2 / 100 000 lakos) [7], de feltehetően nem olyan magas, mint ahogy a nemzetközi statisztikák mutatták (férfiaknál: 96,4, nőknél: 37,7 / 100 000 lakos) [6].

2.3. A tüdőrák szövettani osztályozása

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) jelenleg érvényben lévő irányelvei alapján tüdőrák két nagy szövettani csoportba sorolható: a nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) 85%-ban, a kissejtes tüdőrák (SCLC) 15%-ban fordul elő [10]. Az NSCLC morfológiai jegyei alapján tovább osztható nagyobb alcsoportokra: az adenokarcinómára, a laphámkarcinómára, nagysejtes karcinómára és egyéb típusú karcinómákra [11].

A betegség lefolyása és időtartama is egyénenként eltérhet, de jellemzően hosszú a kialakulás folyamata. Az NSCLC növekedése a nagyon gyors és a nagyon lassú növekedést is mutathat, sőt, akár a visszafejlődés is tapasztalható. Az adenokarcinóma növekedése lényegesen lassabb, mint a laphámsejtes karcinómáé. Egyes adenokarcinómák akár olyan térfogat-duplázódási időt is mutathatnak, amelyek kívül esnek a jelenleg elfogadott tartományon. A

rosszul differenciált daganatok általában gyorsabban növekedtek, mint a jól differenciált daganatok [12]. A korai stádiumban gyors tumor növekedése, a II. és III. stádiumban növekedése lassul vagy stagnál, majd a IV. stádiumban ismét felgyorsul. Mire a fizikai tünetek kialakulnak, addigra már számos mutáció következik be magában a tumoros sejtekben és a tumor mikrokönyezete is jelentősen megváltozik [13].

Jelenleg a TNM atlasz [14] által javasolt stádium besorolás alapján döntenek a tumorok besorolásáról, és a javasolt nemzetközi irányelvek helyi protokollokba való beépítése alapján, azok kezeléséről.

A tumorok komplex betegségek, kialakulásához egyaránt hozzájárulhatnak genetikai és környezeti tényezők is. A megfelelő kezelés kiválasztásához, de már a stádium besoroláshoz és szűréshez is fontos megértenünk a tüdőrák kialakulásának biológiáját.

2.4. A tüdőrák okai

2.4.1. Genetikai okok

Tumoros elváltozáshoz vezet a szomatikus sejtek DNS-ében bekövetkezett mutációk felhalmozódása. Nem minden elváltozás jelenik meg az összes tumoros sejtben. Jellemzően egy vagy annál több vezető mutáció, melyek a tumoros sejt túlélését segítik elő, található egy tumoros sejtben, de számuk típusonként 1 és 10 között változhat [15]. Az örökletes mutációk mellett (TP53, EGFR), szerzett mutációk (TP53, KRAS) is rizikó faktornak számít [16].

2.4.1.1. Örökletes genetikai tényezők

Örökletes genetikai tényezők befolyásolhatják egy-egy ráktípus előfordulását, ha az elsőfokú rokonok között már kettő vagy több eset is előfordult.

Több tanulmány is foglalkozik a tüdőrák családi halmozódásával. Az 125 000 egyént magába foglaló tanulmányban, akiket az 1952 és 1992 között utahi rákregiszter adatai alapján szűrték ki, arra a megállapításra jutottak, hogy szignifikánsan magasabb volt a tüdőrák családi kockázata. A tanulmányban szignifikáns családi halmozódást állapítottak meg nem csak tüdőrákra, de más, dohányzással összefüggő ráktípusokra is, mint például a gége-, száj- és

méhnyak rák [17]. Egy 2756 egyént magába foglaló izlandi tanulmányban, arra a megállapításra jutottak, hogy az elsőfokú rokonok között nagyobb volt a tüdőrák kialakulásának kockázata, mint másod- és harmadfokú rokonok között [18].

Egy másik genetikai tanulmányban kimutatták, hogy a tüdőrák előfordulásához családon belül egy ritka autoszómális gén is szerepet játszhat, mely Mendeli kodomináns öröklődését mutat [19].

Ezek a tanulmányok megerősítik, hogy a tüdőráknak genetikai öröklődése is valószínű.

2.4.1.2. De novo mutációk

A feltételezett családi halmozódáson túl az újonnan keletkező mutáció száma is jelentős lehet a tüdőrák szempontjából. A mutációk kialakulásában jelentős szerepet játszanak olyan környezeti tényezők, mint a légszennyezettség [20], vagy a dohányzás [21].

A medeli öröklésmentet mutató „egy” génben történt mutációk a tüdőrák okai között nagyon ritkán fordulnak elő. Ugyanakkor, több vizsgálat utal arra, hogy komplex, multigénes tényezők szerepet játszanak a betegség kialakulásában. Fontos megemlíteni a nikotinos acetilkolin-receptort, mivel két jelentős vizsgálat is kimutatta, hogy a 15p25-24-es régióban, a nikotinos acetilkolin-receptor alegységeket kódoló (CHRNA5, CHRNA3 és CHRNB4) gének közelében, egy tüdőrák érzékenyítő lókuszt találhatók [22, 23].

A leggyakoribb szomatikus mutációk közé tartoznak a tüdőrákban:

Onkogének:

- **a receptor tirozin kinázok:** fontos szerepük van a sejt-környezet közötti kommunikációban, a metabolizmus és a sejtproliferáció szabályozásában. Az EGFR (más néven HER2) homo- és heterodimer formákat hoz létre. A két forma más-más jelátviteli útvonalakt befolyásol. Homodimer formában a PLC γ -DAG-PKC vagy a Ras-GTP-Raf-Erk útvonalon, heterodimer formában (más HER receptorral párt alkotva) PIK3-Akt útvonalon fejt ki hatását [24].
- **a génátrendeződés következményei:** ALK – az EML4-ALK fúziós gének exonjaik átrendeződésével (leggyakoribb EML4 13-as exonja ALK 20 exonjához) [25]. ROS1 –

ROS1-SDC4/FIG/SLC34A2/CD74 fúziós gén [26]. RET – TRIM33/ KIF5B/ CCDC6 fúziós gén [27].

- **a génamplifikáció:** MET, FGFR1. A MET amplifikációja rossz prognózist feltételez [28]. A FGFR1 a laphámkarcinómákra jellemző [29].

- **Egyéb tirozin kinázok** a jelátviteli folyamatok közben: KRAS mutációk a betegek 15-25%-ben mutatható ki [30], BRAF [31] típusú mutációkban gyakori a V600E és a D594G aminosav csere.

Tumor szupresszor gének:

- **TP53:** a leggyakrabban mutálódó gén a különböző ráktípusokban, így a tüdőrákban is [32].
- **STK11:** az adenokarciómák 10%-ban mutatható ki, gyakoribb a dohányzók között [33].
- **CDKN2A:** az egyik leggyakoribb funkcióját elvesztő gén a tumoros elváltozásokban, ezek közül is a tüdőrákban fordul elő legtöbbször [34].
- **KEAP1:** a tüdőrákok 20-30%-ban fordul elő [35].
- **SMARCA4:** a nem-kissejtes tüdőrákban 10%-ban fordul elő [36].

Leggyakoribb vezető mutációk szövettani csoportosítás szerint [37]:

Adenokarcinóma: EGFR (érzékeny mutáció, rezisztens mutáció), KRAS (mutáció), ALK (ALK fúzió), c-met (overexpresszió, mutáció), AKT/PI3K (amplifikáció, mutáció), PTEN (deléció/metiláció), ROS-1 (génátrendeződés), BRAF.

Laphámkarcinóma: c-met (overexpresszió, mutáció), VEGFR (overexpresszió), P53/BCL (Bcl-2 overexpresszió).

Nagysejtes: c-met (mutáció).

Kissejtes: c-met (overexpresszió, mutáció).

Egy TNM alapján azonos csoportba sorolt tüdőrákon belül sokféle vezető mutáció lehetséges, sokféle kombinációban. Ezek a vezető mutációk eltérő jelátviteli útvonalon keresztül (JAK-STAT3, RAS/MEK/ERK, PI3K/AKT) befolyásolhatják a tumor túlélését, növekedését és migrációját.

Ezért nem meglepő, hogy az azonos besorolású altípusok nem feltétlenül reagálnak egyformán a kemoterápiákra. Az eddigi csoportosítás alapján történő rendszerezésük ezért megkérdőjelezhető.

A technológia fejlődésével egyre jobban elérhetővé válnak olyan eszközök, melyek elősegítik a molekuláris klasszifikációt és így a személyre szabott orvoslást is.

A kezelések szempontjából a tumor genetikai meghatározásán kívül fontos, hogy mindez a kezelés kezdetéhez képest a lehető leghamarabb történjen meg, mivel a tumorok gyors genetikai mutációra képesek.

A molekuláris biotechnológia új korszakot hoz a NSCLC precíziós terápiájában. A jelátviteli útvonalak és vezető gének feltérképezésével a gyógyszerek egyre változatosabbá válnak, ezzel lehetőséget teremtve a hatékonyabb kezelésre [38].

2.4.2. Környezeti faktorok

A tüdőrák kialakulását befolyásoló környezeti faktorok lehetnek fizikai faktorok (ionizáló sugárzások, légköri szállópor), kémiai faktorok (pl. azbeszt, dioxinok, fémek), és egyéb ipari vagy háztartási szennyező anyagok, valamint az aktív és passzív dohányzás [39].

2.4.2.1. Fizikai faktorok

A természetes háttérsugárzás számos forrásból származhat. Eredhet a talajból, a vízből, a levegőből. A levegőben természetesen előforduló radon az egyik fő forrása a természetes háttérsugárzásnak. A természetes háttérsugárzás önmagában alacsony rizikót jelent a tüdőrákra, viszont a különböző foglalkozási körökben (pl. bányászok) emelkedett radon kitettség és a tüdőrák között összefüggést találtak [40].

A radon a legfőbb oka a nem dohányzók körében a tüdőrák kialakulásának az Amerikai Környezetvédelmi Hivatal (EPA) becslése szerint [41].

A szállóport kémiai összetételtől függetlenül nagyság szerint csoportosítják, és a koncentrációjuktól függően minősítik egészségügyi szempontból. Az egészségre veszélyes nagyságúak a 10 (por, pollen, penész) és 2,5 mikron (égéstermékek, szerves anyagok, fémek)

méretű részecskék. Ha a 10 mikron méretű részecskék koncentrációja két egymást követő napon meghaladja a határértéket ($100\mu\text{g}/\text{m}^3$), az önkormányzatok kötelesek szmogriadót elrendelni. A 10 mikronnál kisebb részecskék a felső légutakat irritálják. A 2,5 mikron méretű részecskék méretükből adódóan akár a tüdőig is eljuthatnak, irritálják a szemet, köhögést okozhatnak [42].

Összefüggést találtak a sokáig emelkedett 2,5 mikron nagyságú részecske tartalmú levegőben élők és a tüdőrákos megbetegedések mortalitása között (valamint a szívkoszorúér-betegség, a sztrók, a COPD között is) [43].

A dízelautók kipufogógázát Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (IARC) 1992-ben karcinogénnek minősítette [44]. A dízeles autók kipufogógázában korom és különböző gázok elegye található. Szigorú szabályozások vannak napjainkban a dízeles autókban keletkező kipufogógázok utókezelésére. Ilyen szabályozó rendszerek: a nyomásszabályozó rendszer, a folyamatszensorok, a részecskeszűrővel ellátott katalizátor, SCR-rendszer, és az EGR szelep is. Mindezen szabályozók ellenére több európai nagyvárosban a közeljövőben ki fogják tiltani az ilyen motorral rendelkező autókat.

2.4.2.2. Kémiai faktorok

Számos publikáció alátámasztotta már a peszticidekben megtalálható klóramfenikol, dioxin és a fenoxisav származékok tüdőre gyakorolt karcinogén hatását [45].

A természetben megtalálható azbeszt (magnézium-szilikát) jó hőszigetelő, ellenálló és olcsó. A belőlük készült termékeket főleg hőszigetelésre használták. Az aszbesztből készült termékek elöregedésével viszont a belőlük porladó azbeszt a levegőbe, majd onnan a tüdőbe kerülhet. Karcinogén hatású anyag nem csak tüdőrákot, de hashártya-daganatot [46] és mezotelómát is okozhat [47].

A 2018-as GLOBOCAN felmérés szerint az összes rákos megbetegedés 11,6%-át a tüdőrák tette ki. Ennek 80%-át a dohányzás következményének tulajdonították [48].

A marihuána a leggyakrabban fogyasztott tudatmódosító szerek közé tartozik. Néhány európai országban és amerikai államban legálisan fogyasztható. Fogyasztása közben hasonló anyagok is felszabadulnak, mint dohányzás közben. Éppen emiatt vizsgálták a marihuána fogyasztása és a tüdőrák kialakulásának rizikóját. A vizsgálat során összefüggést találtak, amelyben a

THC hatására malignus sejtproliferáció indult meg sejtenyészetben [49], egér modellben pedig tumor növekedését okozta [50]. Átfogó tanulmányban vizsgálták emberekre gyakorolt hatását, melyben megállapították, hogy az eddigi eredmények alapján, nincs egyértelmű összefüggés a tüdőrák kialakulása és a marihuána fogyasztása között [51].

2.4.3. Dohányzás

A dohányárakban lévő nikotin önmagában nem karcinogén, de a cigaretta szívása közben keletkező körülbelül 55 egyéb vegyületet az Egészségügyi Világszervezet Nemzetközi Rákkutató Ügynöksége viszont annak nyilvánította [52].

A dohányzás a tüdőrák legnagyobb rizikófaktora. A rizikó növekszik az elszívott szálakkal és a dohányzással töltött évekkel [53]. Bár ez az összefüggés régóta ismert [54], a dohányzás mértéke mégis csak kismértékben csökkent. Szimulációs modellekkel felmérték, hogy 2015 és 2065 között az Egyesült Államokban a tüdőrák mortalitási arányát 79%-kal lehetne csökkentette a dohányzás visszaszorításával [55]. A WHO adatai alapján 2020-ban a világ lakosságának 22,3%-a dohányzott: a férfiak 36,7%-a, a nők 7,8%-a. Megközelítőleg 38 millió kiskorú (13-15 év) dohányzik jelenleg. Európában jelenleg a nők 30%-a dohányzik, ez a felmérésben résztvevő régiók között a legmagasabb [56]. A dohányzás következtében olyan egyéb súlyos megbetegedések is kialakulhatnak, mint a szív- és érrendszeri megbetegedések vagy a COPD.

A COPD 238 millió embert érintett [57], és 2010-ben a harmadik leggyakoribb halálok volt világszerte [58]. A betegségre jellemző a légutak funkciócsökkenése és a tüdő gyulladós állapota. Mivel ezt a betegséget is a dohányzás okozhatja, sokan a tüdőrák előszobájának tartják, bár tudományosan csak az bizonyítható, hogy a tüdőrák ötször gyakrabban fordul elő olyanok esetében, akiknek egyéb légúti problémáik vannak [59].

A tüdőrák azoknál az egyéneknél is jelentős számban fordul elő, akik soha nem dohányoztak. Olyan emberek sorolhatók ebbe a kategóriába, akik életük során nem szívtak el 100 szál cigarettát. Olyan faktorok játszanak főbb szerepet, mint a légszennyezés, passzív dohányzás, munkahelyi kitettség vagy genetikai elváltozások. Egy francia tanulmányban tüdőrákos megbetegedések, az otthoni és munkahelyi passzív dohányzás miatt, a férfiaknál 17,15%-ánál, míg a nőknél 68,75%-ánál alakult ki [60]. A légszennyezésnek köszönhető halálozások miatt már több pert is indítottak világszerte [61].

A dohányzás súlyos népegészségügyi probléma. A következtében kialakuló betegségek megelőzésében a társadalmi szintű edukáció lenne a legfontosabb.

A rendszeres szűrővizsgálatokkal kiemelhetőek a még korai stádiumú, vagy tünetmentes betegek.

2.5. Szűrés

A rákos megbetegedések korai stádiumban való diagnosztizálása évekkel hosszabbíthatja meg egy-egy beteg életét. Az 5 éves túlélési arány nem-kissejtes tüdőrák esetében lokális fázisban 65%, míg távoli metasztázist képző fázisban 9%. Az 5 éves túlélési arány kissejtes tüdőrák esetében lokális fázisban 30%, míg távoli metasztázist képző fázisban 3% [62].

A tüdőrák kezelése szempontjából nagyon fontos a betegség felfedezésének időpontja. A betegség korai stádiumában (I., II., IIIA) a betegség még műtéti és kemo-radio, illetve immunterápiával kezelhető. A késői (IIIB, IV) szakaszban leginkább a daganatot kisebbitő, és a metasztázisokat akadályozó kezeléseket végeznek. Ilyenkor már a tünetenyhítés áll a középpontban.

Mivel panaszok csak későn jelentkeznek, de a korai stádiumú tüdőrák kezelési eredményei lényegesen jobbak, mint a későié, ezért a tünetmentes egyéneknél a tüdőrák korai felismerése érdekében végzett tevékenység, szűrés kritikus jelentőségű a betegség mortalitásának csökkentésében.

2.5.1. Szűrésre alkalmazható módszerek

A mellkasröntgennel végzett szűrés, bár alacsony extra sugárterhelést jelent a szűrésen résztvevők számára, nem a leghatékonyabb módja a nem calcifikálódott szöveti részek vizsgálatára, használatával nem sikerült a tüdőrák-specifikus mortalitás lényeges csökkenését elérni [63].

A nemzetközi evidenciák szerint, jelenleg a tüdőrák korai stádiumban való kiszűrésére ajánlott módszer az alacsony sugárdózisú CT (LDCT) vizsgálat [64], bár az LDCT 1,5 (0,2 – 2,36) mSv sugárterhelést jelent a vizsgáltak számára (készülék beállítástól és típustól függően) [65], és a 3-4 mm-től nagyobb nodulosokat képes detektálni.

2.5.2. Nemzetközi LDCT szűrőprogramok

Az amerikai Nemzeti Tüdőrák Szűrőprogram (NLST) keretében, 2002 és 2004 között, vizsgálták a mellkasröntgennel és az LDCT-vel történő szűrés hatékonyságát. A programban 54 454 főt vontak be, akik közül 26 732 főt röntgennel, 26 722 főt pedig LDCT-vel vizsgáltak meg. A programban a pozitív eredmények közül az LDCT esetében 96,4%-ban, míg a mellkasröntgen esetében 94,5%-ban bizonyultak álpozitívnak [66]. Az LDCT csoportban 649 főnél, akik pozitív LDCT szűrési eredményt kaptak, más módszerekkel is (hörgőtükrözéssel, tübiopsziával, egyéb módszerekkel) is igazolták a pozitív diagnózist. Az LDCT csoportban, a CT negatív eredményt kapott résztvevők között, 44 esetben diagnosztizáltak tüdőrák (LC) pozitív esetet. A mellkasröntgennel szűrt csoportban, akik pozitív eredményt kaptak, 279 főnél igazolták a tüdőrák. A negatív eredményt kapott mellkasröntgennel szűrt csoportban 137 főnél lett tüdőrák pozitív az eredmény. Az LDCT csoportban a valódi pozitív eredmények között többségében voltak a korai IA és IB stádiumban (61,6%) diagnosztizált tüdőrákos esetek. A vizsgálat eredményeként (2 év alatt) 20%-kal csökkent a mortalitás az LDCT-vel szűrtek körében a mellkasröntgennel szűrtekhez képest [66].

Ezzel szinte párhuzamosan Európában 2003-ban indult a holland NELSON program, melyben 7557 résztvevőt szűrtek LDCT-vel (8265 fő kontroll mellett). A vizsgálat során a felfedezett nodulusokat térfogatuk alapján kategorizálták, majd a vizsgálat során a nodulusok térfogatonövekedését figyelték a következő szűrési körökben. A programban résztvevőket az első szűréstől számított első és második évben vizsgálták, majd később kiterjesztették a vizsgálatot a negyedik és hatodik évre is. A NLST vizsgálat során kapott a magas álpozitív eredményeket szerették volna csökkenteni, így a kérdéses eseteket, ebben a vizsgálatban 3 hónapos újabb CT szűrés követte. Ezzel a módszerrel sikerült 64,3%-ra csökkenteni az álpozitív eredményeket. A vizsgálat eredményeként a férfiaknál 24%-kal, a nőknél 33%-kal csökkent a mortalitás [67].

Az olasz DANTE klinikai vizsgálat 2001 és 2006 közötti eredményeit 2009-ben publikálták. 1276 főn végeztek LDCT szűrést (1196 fő kontroll mellett) négy éven keresztül minden évben. A további során 60 főnél (4,7%) találtak tüdőrákot az LDCT-vel szűrt csoportban, 34 főnél (2,8%) a kontroll csoportban (akiknél csak éves általános orvosi szűrővizsgálatot végeztek). Az LDCT csoportban 33 (2,6%) főnél mutatták ki a korai (I.) stádiumú elváltozást, míg a kontroll csoportban 12 (1,0%) főnél. A késői (IV.) stádiumban a két vizsgálati módszer eredménye közel azonos volt. Az LDCT és a kontroll csoportban is 17 (1,3%) – 17 (1,4%)

betegét azonosítottak. A DANTE vizsgálatba csak 60 év fölötti dohányzó, vagy korábban erős dohányos férfiakat vontak be [68].

A szintén olasz ITALUNG tanulmányba, 2004 és 2006 között, 1406 fő LDCT szűrését végezték el (1593 fő kontroll mellett). Az előző tanulmánytól eltérően ebben a tanulmányban mindkét nemet vizsgálták 55 és 69 év között. A vizsgálat időtartalma szintén 4 év volt, évenkénti CT vizsgálattal. A kontroll csoport, a NELSON tanulmányhoz hasonlóan, nem kapott mellkasröntgen szűrést, csak általános vizsgálatban részesültek. A vizsgálati protokoll alapján a 1406 fős LDCT csoport 30,3%-a (426 fő) bizonyult LC pozitívnek, 21 esetben valóban diagnosztizáltak tüdőrákot, melyek 47,6%-a volt I. stádiumú [69].

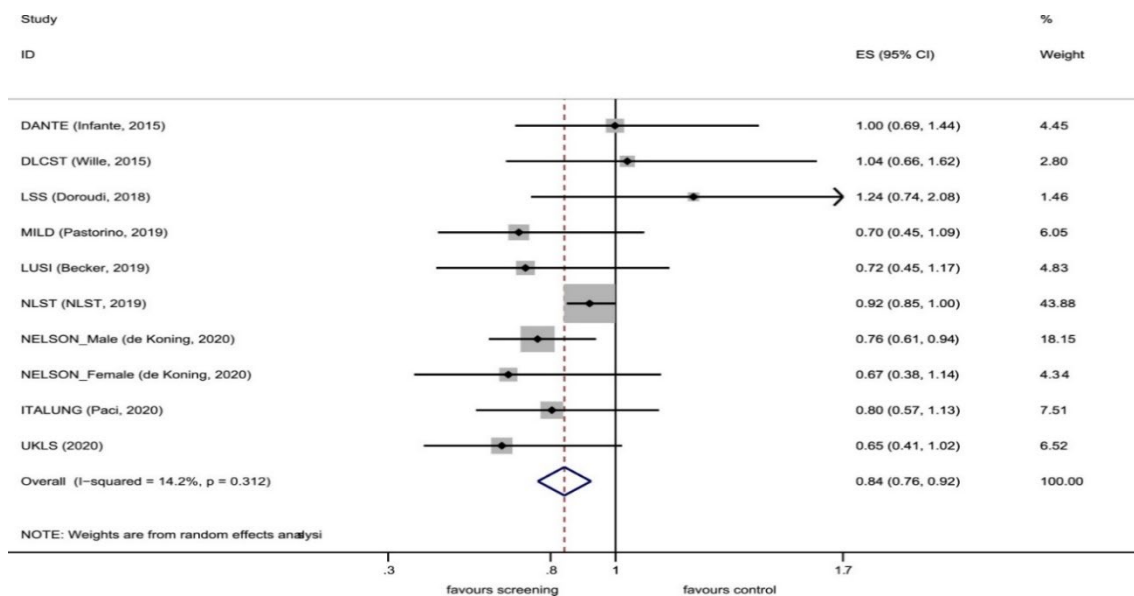
A dán DLCST vizsgálat során, 2004 és 2006 között, 2052 fő LDCT szűrését végezték el (2052 fő kontroll mellett), melyben a nem, kor és dohányzási szokások egyformán oszlottak el a két csoportban. A vizsgálat felépítése a NELSON tanulmánnyal egyezett meg. Az első szűrés során 179 főnél feltételeztek LDCT-vel pozitívítást, melyből 162 esetben az eredmény álpozitív volt. Összesen 17 tüdőrákos esetet találtak, melynek 53% I. stádiumú volt [70].

Az angol UKLS vizsgálatba, 55 és 75 év közötti, a Liverpool Lung Cancer program (LLP) alapján, magas rizikócsoportba tartozó (5 éven belül 5% esély arra, hogy tüdőrák alakuljon ki) személyek közül válogatták ki, az LDCT és a kontroll csoportot. Az LLP rizikó modellben figyelembe vették a nemet, a dohányzási szokásokat, a foglalkozási azbeszt kitettséget, az egyéb tumorok meglétét, a tüdőgyulladás meglétét és a tüdőrák előzetes előfordulást a vizsgált személy családjában. Az adatokból olyan multivariáns logisztikus regressziós modellt alkottak, mellyel személyre szabottan prediktálták a tüdőrák kialakulásának kockázatát [71]. Az UKLS tanulmány során, 2011 és 2013 között, 1994 főt vizsgáltak LDCT-vel (2027 fő kontroll mellett). A NELSON tanulmányhoz hasonlóan, felfedezett nodulosok térfogat növekedését követték. Három hónap után újabb LDCT vizsgálat következett, ha nodulus átmérője 5-9,9 mm közé esett. A többi olyan esetben, ahol ez a méret kisebb volt 1 éves LDCT szűrés következett. A vizsgálat során vizsgálták a különböző szövettani kategóriába sorolható tüdőrák típusok (NSCLC és SCLC) térfogat növekedésének idejét is. Főleg a 15-49 mm³ nagyságú nodulusoknál, mert ezek a NESLON tanulmányban még negatív eredményű besorolást kaptak. Megállapították, hogy a kissejtes tüdőrák (SCLC) térfogat duplázódási ideje 3x gyorsabb volt, ezért az 1 éves LDCT követéssel már a nem gyógyítható fázisban detektálták a tumort. Az LLP modell és az LDCT kombinációjával próbálták így a többéves LDCT vizsgálatok számát lecsökkenteni egy évre [72]. A tanulmányban résztvevők közül az

LDCT csoportban, 42 esetben (2,1%) állapítottak meg tüdőrákot, melyből 28 esetben I. stádiumú volt [73].

A német LUSI tanulmányban is, a NELSON tanulmány mintájára, két csoportot alakítottak ki (LDCT csoport, 2029 fő, és kontroll csoport, 2023 fő). A csoportokban a nemek, a kor és a dohányzási szokások közel azonosak voltak. Az LDCT csoportot 5 éven át (2007-2012), évente szűrték LDCT-vel (ha nem kaptak kérdéses vagy pozitív eredményt vizsgálat során). Eredményeikben arról számoltak be, hogy ugyan csökkent a mortalitás az LDCT csoportban a nőknél, férfiaknál azonban nem. Összesen 13 esetben diagnosztizáltak a férfiaknál kissejtes tüdőrákot (8 esetben a kontroll csoportból, 5 esetben az LDCT csoportból), míg a nőknél 1 esetben (a kontroll csoportból). Ez talán a férfiak körében gyakrabban előforduló kissejtes tüdőrák diagnózisával magyarázható, bár az esetszám ennek megítélésre ebben a tanulmányban kevés [74].

Számos további klinikai vizsgálat indult, melyek hosszú távú vizsgálati eredményei már elérhetőek és összehasonlíthatóak. Kilenc klinikai vizsgálat eredménye bizonyította, hogy az LDCT-vel való tüdőrák szűrés hosszútávon csökkentette a tüdőrák okozta halálozást (2. ábra). Mára számos országban indítottak nemzeti LDCT szűrőprogramokat világszerte. A pozitív eredmények ellenére továbbra is vannak olyan országok, ahol ezt a programot nem indították el. Franciaországban a Nemzeti Egészségügyi Hatóság (HAS) szerint a tüdőrák olyan gyorsan fejlődik, hogy nehéz korai stádiumban diagnosztizálni. További problémaként vetették fel a vizsgálat során leadott extra sugárterhelést és a sok álpozitív eredményt. Svájcban csak helyi programokat indítottak eddig, hogy felmérjék egy esetleges nemzeti szűrőprogram megvalósíthatóságát [75].



2. ábra: Nemzetközi LDCT klinikai vizsgálatok tüdőrák mortalitás eredményeinek összehasonlítása [76]. A metaanalízisbe felhasznált vizsgálatok eredményeinek átlaga az LDCT-vel való szűrések mortalitásra való pozitív hatását mutatja.

Európai LDCT tüdőrák szűrőprogram indult 10 ország, köztük Magyarország, részvételével 2023 áprilisában SOLACE néven. Céljuk a magas rizikócsoportha tartozó lakosok szűrése. Fókuszba helyezték azoknak a csoportoknak az elérését is, akiknek problémát jelent eljutni egy-egy szűrővizsgálatra [77].

2.5.3. HUNCHEST program

Az első nagyobb tüdőrák szűrőprogramok után elindultak a kisebb nemzeti szűrőprogramok is. Magyarországon a 2014-ben elindított HUNCHEST program keretében a lakossági szűrés kivitelezhetőségét mérik ingyenes CT vizsgálat során. A HUNCHEST I. (2014-2018) program keretében 739, 50 és 79 év közötti jelentkező szűrését végezték el az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetben. 392 fő nem COPD-s, nem dohányzó került a kontrollcsoportba, 179 fő nem COPD-s, de dohányzó, 30 fő COPD-s, de nem dohányzó és 138 fő dohányos és COPD-s vizsgálatát végezték el. A vizsgálatban résztvevők között 38 főnél találtak malignus elváltozást. A pozitív eredményű betegek közül 26 esetben álpozitív eredményt mutatott a CT vizsgálat. 701 főnek pedig negatív volt az eredménye [78]. A HUNCHEST I. program eredményei a nemzetközi vizsgálatok eredményeit tükrözik.

A HUNCHEST-II az eddigi legnagyobb LDCT-szűrőprogram Magyarországon (2019. szeptember 9. és 2022. január 1. között). Az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet koordinálásával, az országban 18 helyszínen végeztek szűrést (10 klinikai központban és 8 megyei központban). Összesen 4215 fős, 50 és 75 év közötti, legalább 25 csomagévnyi dohányzási előzményekkel rendelkező magas kockázatú egyént választottak ki szűrésre. Az eredményeket a térfogat növekedése és térfogat-duplázódási ideje alapján értékelték. A vizsgálatba bevontak a kiindulási LDCT vizsgálat után még két évig egy-egy szűrésen vettek részt. A negatív és a nem egyértelmű tesztek aránya az alapvizsgálatnál 74,2%, illetve 21,7% volt, míg a pozitív LDCT-eredmények előfordulása 4,1% volt. Összességében 76 tüdőrákos beteget diagnosztizáltak a szűrési körök során (a résztvevők 1,8%-a), közülük 62 beteget (1,5%) már az első szűrési körben azonosítottak. A pozitív tesztek általános pozitív prediktív értéke 58% volt. A szűréssel felfedezett rosszindulatú daganatok többsége I. stádiumú tüdőrák volt (60,7%), és az összes eset közül csak 16,4%-ot lehetett IV. stádiumú betegségként besorolni [79].

2.5.4. Törekvések a magas álpozitív eredmények csökkentésére

Az LDCT szűrések során magas álpozitív eredmények számát csökkenteni kell. Egyrészt a vizsgálatban résztvevők a pozitív eredmény miatti félelmének csökkentésére, másrészt a CT vizsgálatok költséghatékonyabbá tétele miatt. A rizikócsoportok meghatározhatók a különböző rizikófaktorok figyelembevételével [80]. Ezzel szűkítve a szűrésre irányítandók számát. Az egyre modernebb CT berendezések mellett, már a mesterséges intelligencia is segítségünkre lehet egy-egy lelet elemzésében [81].

Próbálkozások vannak más képalkotó eljárások (például az MR) tüdőrák szűrésre való használhatóságára. Egy metaanalízis 10 olyan vizsgálatot dolgozott fel, melyekben MR-rel vizsgálták a nodulosokat (LDCT referencia mellett). Az analízis során azt találták, hogy az MR vizsgálat érzékenysége – a 8-10 mm-es nodulosok tartományában – megközelítette az LDCT érzékenységét [82].

A képalkotó módszerek mellett, rendelkezésünkre állnak olyan folyadékbiopsziás tesztek, melyek kiegészítői lehetnek az LDCT vizsgálatoknak. Ez a minimálisan invazív mintavételi eljárás lehetővé teszi a rendszeres követést, nem jelent extra sugárterhelést, és a mintavétel

akár egy háziorvosi rendelőben is elvégezhető. A különböző mintákból származó biomarkerek segítségével információt nyerhetünk a vizsgált személy fizikai állapotáról.

2.6. Biomarkerek

2.6.1. A biomarkerek általános jellemzése

Definíció szerint minden olyan anyag, struktúra vagy folyamat lehet biomarker értékű a testben (vagy annak származékában), melynek jelzés értéke van normálisan vagy abnormálisan zajló folyamatokról, illetve terápiás válaszokról [83].

2.6.2. A biomarkerek osztályozása

A biomarkerek osztályozása többféle módon történhet. Az analit alapján lehet fehérje, nukleinsav (DNS, mRNS, miRNS, lncRNS), metabolit, szénhidrát, lipid, de keringő tumorsejt is. Biomarker mérés különböző testfolyadékok vagy más mintákból történhet, így vérből (plazma vagy szérum), vizeletből, nyálból, kilégzett levegőből és székletből is. Ezek közül leggyakrabban a vérminták biomarker vizsgálata történik, de jelentős irodalma van a vizelet, széklet biomarkernek, és a kilégzett levegő illékony szerves anyag koncentrációjának is. A biomarkerek különböző felhasználási területei közé tartozik a szűrés, a betegség osztályozása, a diagnózis elősegítése, a betegség lefolyásának követése, a prognózis megjósolása, valamint a személyre szabott terápia megállapítása. Emellett a biomarkerek segíthetnek a terápiás hatás és mellékhatások előrejelzésében, a kezelés hatására kialakult változások követésében, a terápia hatásosságának valós idejű értékelésében és a klinikai végpontok meghatározásában [84].

2.6.3. A biomarkerek fejlesztésének fázisai

A biomarker fejlesztésnek öt fázisát különböztetjük meg. A felfedező fázist, a kvalifikációs fázist, a verifikációs fázist, a validációs fázist és a klinikai használati fázisokat különíthetjük el. Az első fázisban, a kontroll és a beteg mintákat hasonlítják össze. Az előkísérletek során kiválogatnak olyan markereket, melyek potenciális biomarkerek lehetnek. A második, kvalifikációs fázisban a kiválogatott biomarkerek szintjét mérik meg a kontroll és a beteg

mintákban nagy kohorszokon, több centrumból. Ezt a vizsgálatot a felfedezési fázis adatai alapján végzett esetszám becslés, és statisztikai erő előrejelzés előzi meg [85]. Mindezek alapján már meg lehet határozni az adott biomarker hatékonyságát, szenzitivitását és specificitását, és ezen adatok alapján felvett ROC (Receiver Operating Characteristic) görbét, melyek a valódi pozitív, valódi negatív, álpozitív és álnegatív értékekből számolhatóak ki (3. ábra). Ezek a mérőszámok a biomarkerek egyik legfontosabb jellemzői.

		Betegség		
		Jelen van	Nincs jelen	Teljes
Biomarker	Pozitív	a (Valódi pozitív)	b (Álpozitív)	a+b
	Negatív	c (Álnegatív)	d (Valódi negatív)	c+d
Teljes		a+c	b+d	a+b+c+d

3. ábra: Biomarkerek jellemző számadatai [86] (saját szerkesztésben).

Prevalencia: $(a+c) / (a+b+c+d)$

Szenzitivitás: $a / (a+c)$

Specificitás: $d / (b+d)$

Pozitív predikcis érték: $a / (a+b)$

Negatív predikciós érték: $d / (c+d)$

Pontosság: $(a+d) / (a+b+c+d)$

Pozitív valószínűségi arány: szenzitivitás / (1-specificitás)

Negatív valószínűségi arány: (1-szenzitivitás) / specificitás

Diagnosztikai esethányados: pozitív valószínűségi arány/negatív valószínűségi arány

A ROC görbe a negatív és pozitív eredmények (bináris határozó) diagnosztikai képességét mutatja a klasszifikációt meghatározó határértékek függvényében [86]. A ROC görbe alatti

területet az AUC (Area under the Receiver Operating Curve) értékkel határozzák meg, az AUC értékét gyakran használják a pontosság (accuracy) jellemzésére.

A harmadik, verifikációs fázisban az előző fázisban vizsgált biomarkerek specificitásának igazolása történik nagyobb számú beteg és illesztett kontroll mintán, gyakran követéses vizsgálatban is. A negyedik fázis során már meghatározhatóak a detektálási határértékek. Az ötödik, utolsó fázisban már felmérhetőek a költségek, és ebben a fázisban történik a különböző protokollokkal való összehasonlítás is [85].

2.6.4. A rák biomarkerek története

Az első rákhoz köthető biomarkert Henry Bence Jones fedezte fel 1847-ben. Vizsgálatai során vizeletből hődenaturálással mutatta ki azt a fehérjét (22-24 kDa), amely nagy mennyiségben volt jelen mielóma multiplexben szenvedő betegeknél [87]. Az FDA 1988-ban egy olyan immundiagnosztikai tesztet engedélyezett (mielóma, limfóma és Waldenstrom makroglobulinémia diagnosztika céljára), melynek alapja a Bence-Jones fehérje kimutathatósága volt. Sir Michael Foster 1867-ben emelkedett szérum amiláz szintet mért hasnyálmirigy tumoros betegek vizeletében [88]. Az 1971-ben kifejlesztett szendvics-ELISA módszer [89] segítségével a biomarkerek használata a klinikai gyakorlatban is beépíthető lett. 1975-ben George Köhler és César Milstein kidolgozták a hibridóma technikát, mellyel immunizált egerekből először nyertek monoklonális antitesteket (mAb). 1984-ben ezért a felfedezésükért Nobel-díjat kaptak [90]. A molekuláris biológiai módszerek fejlődésével egyre többféle analitot és gyorsabb módszereket tudunk alkalmazni már rutinlaborokban is.

2.6.5. Az ideális rak biomarker

Az ideális (tumor) biomarkerrel szemben számos kritériumot állítottak fel. Legyen magas a szenzitivitása és a specificitása. Legyen magas a pozitív és negatív prediktív értéke. Különböztesse meg 100%-os pontossággal az egészséges és a tumoros betegeket. Különböztesse meg a tumoros és nem tumoros állapotot és mutasson pozitív korrelációt a tumor térfogata és mérete között. Jelezze előre a kiújulást és legyen prognosztikus értéke. Tudja a tumort korai stádiumában jelezni. Legyen tumorra specifikus vagy legyen univerzális marker. Legyen könnyen kimutatható és jelezzen minden változást, ami a betegben kezelés

után végbemegy. Legyen standardizálható. Ezen összes feltételnek eddig egyetlen egy tumormarker sem tudott 100%-ban megfelelni.

Kiváló diagnosztikai értékű biomarkernek számít, ha [86]:

- pontossága $> 0,90$
- pozitív valószínűségi aránya > 10
- negatív valószínűségi aránya $< 0,1$
- AUC $> 0,90$

Jó diagnosztikai értékű biomarkernek számít, ha [86]:

- pontossága $0,75-0,90$
- pozitív valószínűségi aránya $5-10$
- negatív valószínűségi aránya $0,1-0,2$
- AUC $0,75-0,90$

Rossz diagnosztikai értékű biomarkernek számít, ha [86]:

- pontossága $0,50-0,75$
- pozitív valószínűségi aránya $1-5$
- negatív valószínűségi aránya $0,2-1$
- AUC $0,50-0,75$

Nincs diagnosztikai értéke a biomarkernek, ha [86]:

- pontossága $0,50$
- pozitív valószínűségi aránya 1
- negatív valószínűségi aránya 1
- AUC $0,50$

2.6.6. Tüdőrák biomarkerek

Tüdőrák specifikus biomarkerek származhatnak vérből, bronchoalveoláris mosásból, nyálból, pleura folyadékból és a kilélegzett levegő szerves anyag tartalmából.

A leggyakrabban klinikumban használt tüdőrák biomarkerek a protein biomarkerek. Jóllehet ezek nem kifejezetten tüdőrák specifikusak, de információ értékük van a betegséggel kapcsolatban. A CYFRA21-1, egy citokeratin 19 fragmens, nem kissejtes tüdőrák

biomarkereként használják. Szenszitivitása 43%, specificitása 89% [91]. A CEA, carcinoembionális antigén, nem kissejtes tüdőrák biomarkereként is használják, a gyomor, hasnyálmirigy, emlő és végbél tumorok mellett. Szenszitivitása 90,2%, specificitása 89,9% [92]. Az SCC, laphámsejtrák antigén, használható laphámsejtrák és nem kissejtes tüdőrák biomarkereként is. Szenszitivitása 15-55% közötti [93]. Az NSE, neuronspecifikus enoláz, kissejtes tüdőrák biomarkereként használják. Szenszitivitása 23,3 %, specificitása 97,8% [94]. ProGRP, progastrin-releasing peptide, szintén kissejtes tüdőrákban használt biomarker. Szenszitivitása 86%, specificitása 78% [95]. EGFR, epidermális növekedési faktor, szérumszintje használható adenokarcinóma, laphámkarcinóma és kissejtes tüdőrák biomarkereként. Szenszitivitása 71,3%, specificitása 80% [96].

A legtöbbet használt fehérje biomarkerek kívül, a genomika fejlődésével egyéb markerek is rendelkezésre állnak. A miRNS (mir-34, mir-660, mir-140-5p, mir-28-3p, mir-30c, mir-92a, mir-21, mir-126, mir-210, mir-386-5p) [97], az epigenetikai markerek bizonyos géneken (p16, MGMT, RASSF1A, DAPK, PAX5a, SHOX2, BRMS1, Septin 9, TMEFF2), és a keringő tumor sejtek [98].

Különböző anyagcsere-útvonalak metabolitjai is lehetnek biomarkerek. Qi és munkatársai vérplazmából nyert metabolitok (palmitinsav, heptadekánsav, 4-oxoprolin, ornitin, tridekánsav) segítségével tudták elkülöníteni multivariáns modellezéssel a kontroll és tüdőrákos mintákat, valamint a tüdőrákos minták különböző stádiumait [99].

2.7. A fehérjék szerveződése

A fehérjék háromdimenziós formájukban látják el funkciójukat a sejtekben. A teljes fehérje szerkezet négy szinttel jellemezhető: elsődleges, másodlagos, harmadlagos és negyedleges struktúrákkal. Az elsődleges struktúra a fehérje lineáris aminosav szekvenciája. A másodlagos struktúra a szekvenciák hélixbe, lemezbe és hurokba rendezett formáival jellemezhetőek. A harmadlagos szerkezet egy peptidláncra vonatkozó háromdimenziós struktúra. A negyedleges szerkezet a több fehérje láncot magába foglaló háromdimenziós szerkezet [100].

2.8. Proteom

A genetikai információ, az epigenetikai változásokat és a *de novo* mutációkat kivéve, egy életen át érintetlen marad. Ezzel ellentétben a proteom folyamatosan változik és reagál a belső és külső környezeti változásokra [101, 102].

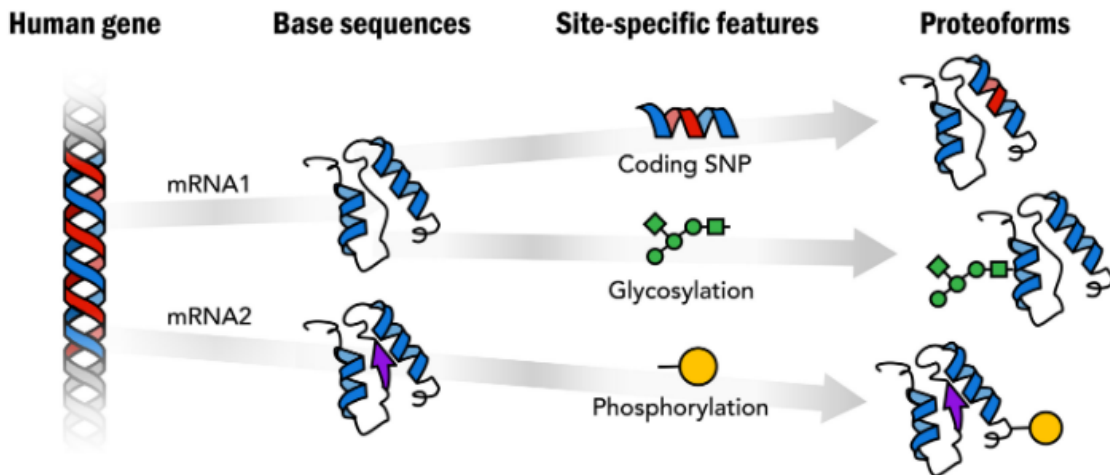
A proteomot korábban szoros értelemben a genom protein ekvivalenseként definiálták [103], de ezt a definíciót napjainkra specifikálták a vizsgált biológiai anyag, adott időben expresszálandó fehérjéinek összességére [104].

A proteom a protein variánsok, proteoformák összessége.

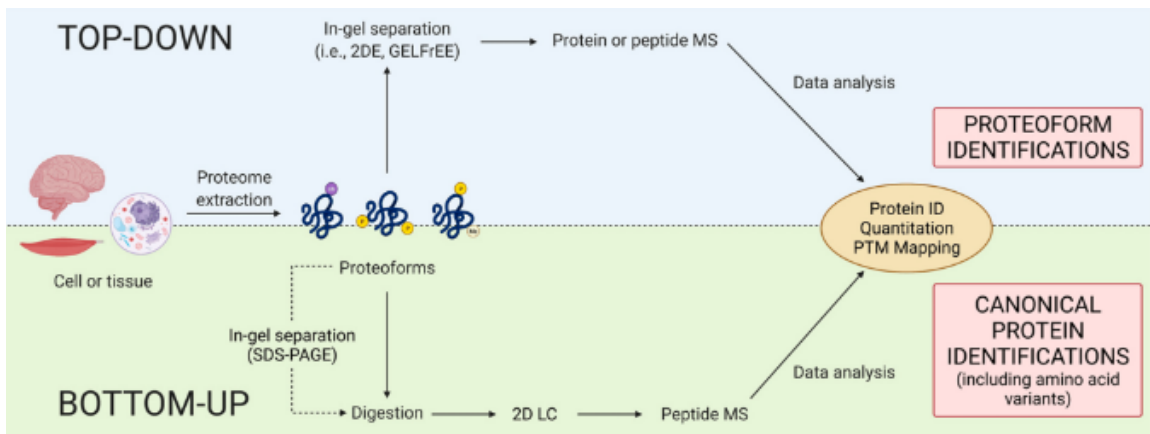
A humán proteinek számát nehéz meghatározni, mivel a kódoló gének számában (~19 000 - 20 000) sincs jelenleg egyetértés. Annyi bizonyos, hogy a proteoformák összessége több nagyságrenddel nagyobb, mint a humán fehérjét kódoló gének száma [105]. Az alternatív transzlációs kezdés [106], az alternatív terminációs helyek [107], az alternatív splicing [108], a SNP-ek [109], a poszttranszlációs módosítások [110], és a degradáció [111] tovább módosíthatják az átírható fehérjék számát. Mindezeket figyelembe véve egy génről akár 100 féle fehérje is keletkezhet [104], így a lehetséges proteoformák száma milliós nagyságrendű lehet.

2.9. Proteoformák

A Human Proteoform Project program keretében a proteoformák analízisét integrálják. Olyan új technológiákat dolgoznak ki, melyek képesek detektálni a különböző proteoformákat. A fehérjéknek nem csak a szekvenciáját lehet detektálni (bottom-up), hanem intakt formában megőrizve több információt nyerhetünk (top-down), és így el lehet különíteni a különböző proteoformákat is (4. ábra). A bottom-up megközelítést használva poszttranszlációs módosulásokat is detektálhatunk (5. ábra), melyek akár biológiai funkcióváltozást is okozhatnak.



4.ábra: top-down és bottom-up proteomikai megközelítés tömegspektrometriás méréssel [112].



5.ábra: egy génről keletkező potenciális proteoformák [113].

2.10. Epitópok

A fehérje epitópok az antigének, illetve fehérjék harmadlagos és negyedleges szerkezetében rejlő olyan, leggyakrabban (nem lineárisan kapcsolódó aminosav láncot képviselő) háromdimenziós fehérje-felületi aminosav rendeződések, amit az antitestek és a T-sejt receptor komplementer struktúrái, az antigén kötőhelyük révén felismernek [114]. Az epitópok 6-12 aminosavat foglalhatnak magukban. Fontos, hogy az epitópok egyes aminosav komponensei gyenge kölcsönhatásokkal, leggyakrabban gyenge hidrogén kötéssel

kapcsolódnak az ellenanyag molekula antigén kötőhelyéhez a komplementaritást meghatározó régióhoz (CDR régió).

A fehérje epitópok hozzáférhetősége (például az antitest számára) változhat a fehérje szekvencia harmadlagos és negyedleges szerkezetének módosulása, vagy a komplexekben a partner fehérjék összetételének változása miatt [110]. A harmadlagos és negyedleges szerkezet, valamint a komplexek összetételének módosulása az adott fehérje funkciójának módosulásával járhat. Feltételezzük, hogy globális szinten is az epitópok dinamikájának követésével a proteoformák és kapcsolt funkcióik is, legalább részben feltárhatóak.

A jelenleg használt proteomikai technológiák, a legelterjedtebb tömegspektrometriás módszerek és az affinitás proteomikai módszerek, sem tudják a proteom változásait globális szinten követni, azaz nem alkalmasak egyszerre nyomon követni a fehérjék variabilitását és a variánsok mennyiségét is. A fehérjék különböző változatai különböző epitópokat mutathatnak. Az epitópok variabilitását okozhatja többek között: alternatív splicing, alternatív transzkripció start, alternatív lánctermináció, degradáció, poszttranszlációs módosulások, és a fehérje komplexek kompozíciós változásai. A változások módosíthatják az epitópok hozzáférhetőségét, és feltételezhető, hogy a fehérje epitópjainak dinamikus változásai a fehérje funkció változásait is jelezhetik. Az egyes epitópok jelenléte vagy hiánya összefüggésbe hozható adott fiziológias vagy patológias körülmények között fennálló funkcionális kapcsolatokkal. Feltételezhetően az epitóp dinamika profilírozásával a biomarkerek és a változásokhoz kötött funkciók is megközelíthetőek.

Munkám során a plazma C9 fehérje három, tüdőrák biomarker tulajdonság szempontjából eltérően viselkedő epitópjait vizsgáltam fehérje-biokémiai módszerekkel.

2.11. A komplement kaszkád

A komplement rendszer nemcsak a veleszületett és a természetes immunitás felügyeleti rendszere, hanem számos egyéb funkcióval is rendelkezik is, mint például az apoptotikus sejtek eltakarítása [115], a homeosztázis fenntartása a szöveti regeneráció elősegítésével [116], lokális epitél sejt védelem [117], együttműködés a Toll-like receptorokkal a citokin termelésben [118], összeköti veleszületett és szerzett immunválaszokat [119], és T sejt szabályozást [120].

A komplement rendszer több mint 40 szolubilis fehérjéből áll, melyek a vérben és egyéb testfolyadékokban keringenek. Ezek a fehérjék inaktív zimogén formában vannak jelen, majd belépnek a különböző aktivációs szignálokra (direkt patogén vagy indirekt antitest) komplement kaskád rendszerbe. A komplement rendszert három útvonalon keresztül lehet aktiválni: a klasszikus, a lektin, és az alternatív útvonalon [121]. A klasszikus útvonal IgG, IgM vagy mintázatfelismerő molekulák, például a pentraxinok, indítják el a komplement C1q fehérjén keresztül. A C1s, amely a komplement C1 komplex része, hasítja a komplement C4-et (C4) C4a-ra és C4b-re. A C4b hasítja a komplement C2-t (C2) C2a és C2b fragmentekre. Ezek a hasított elemek alkotják komplement C3 (C3) konvertázt (C4bC2b) [122]. A lektin útvonalon a mannózt kötő lektin és a fikolin szénhidrát mintázatokat ismer fel és a mannóz kötő lektin asszociált szerin proteázzal (MASP) összeállva elindítják a kaskádot. A MASP-2 hasítani tudja a C2-t és C4-et is, míg a MASP-1 csak a C2-t [123]. Az alternatív útvonal spontán aktiválódik komplement C3 (C3) hatására, melyet a komplement faktor B és D szabályoz, és C3bBb C3 konvertázt hoz létre. Mind a két típusú C3 konvertáz hasítja a C3-at C3a-ra és C3b-re. A C3b segítségével a C3 konvertáz (C4b2b3b, C3bBb3b) új funkcióhoz jut, és képes lesz hasítani a komplement C5-öt (C5). Komplement aktiválódás közben C3a, C5a és C4a anafilatoxinok szabadulnak fel. A C3a és C5a szerkezetükben (α és β láncok, inter és intra diszulfid hídral) és funkcióikban (kemotaxis, platelet aktiváció, regeneráció, mieloid sejt aktiváció) is nagyon hasonlóak. Míg a C4a szerkezetében (α , β és γ láncokból áll, inter és intra diszulfid hidakkal) és funkciójában (antimikrobiális funkció) is különbözik [124].

A komplement faktor H az alternatív útvonalat szabályozza az újonnan keletkezett C5 konvertáz lebontásával. A komplement faktor I mind a három útvonalat képes szabályozni (olyan kofaktorok segítségével, mint a faktor H, CD46, C4b kötő fehérje) [125] a hasított C3b és C4b degradációjával. A C5 hasítható C5a és C5b fragmentekre. A C5b komplexet alkothat a C6, C7 és C8 komplement fehérjékkel, és a membránba ékelődve a komplement C9 (C9) pórusformáló fehérjékkel, része a terminális komplexnek (MAC, membrane attack complex) [122].

A C9 fehérjék 22 szimmetrikus monomerből álló komplexet alkotnak, amely a C5b678 komplexhez kötődik és egy 120 Å átmérőjű, gyűrű alakú lyukat képes ütni a patogén membránján. A C9-nek négy fő doménje van: az N-terminális thrombospondin-1 (TSP1) domén, alacsony denzitású lipoprotein receptor asszociált domén (LDLRA), membrán támadó komplex/perforin (MACPF) domén és az epidermális növekedési faktor (EGF) domén. A C9 nem tartalmaz külön membránkötő domént, ezért a plazmában keringve asszociálódik a többi

MAC résszel [126]. A C9 monomerek a MACPF doménon keresztül kapcsolódnak össze. A szignál nélküli MAC kialakulását védi az extracelluláris chaperonok (vitronectin, clusterin) szolubilis MAC komplexekhez kötődése [127].

A C9 termelődhet májban [128] monocitákban és dendritikus sejtekben [129] is.

2.12. A fehérje epitóp profilírozás

A mindennapi klinikai gyakorlatban már használnak genom és transzkriptom szekvenálási tesztek. Ugyanakkor globális fehérjeprofilírozási technológia nem érhető el, annak ellenére, hogy a fehérje funkció megértése globális profilírozáson keresztül fontos ürt töltene be [130]. A fehérjéket, mint a leggyakoribb biomarker típust, széleskörűen használják a fiziológiástól eltérő állapotok vizsgálatára. Habár a fehérjék vizsgálata is adhat információt elváltozások detektálására, a fehérje-egység alatti epitóp vizsgálatok erre érzékenyebb megoldást is kínálhatnak.

A fehérjék minden variánsa, illetve variációja hatással lehet a fehérje harmadlagos és negyedleges szerkezetére, valamint az epitópok hozzáférhetőségére is. A fehérje epitóp profilírozás (PEP) során az epitópok dinamikája monoklonális antitest könyvtár (QuantiPlasma Library) és az egy mAb-ot felhasználó kötődés-gátlási ELISA rendszer (sbCIA) segítségével mértük [131, 132]. Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy egy-egy fehérje epitópjai tüdőrák asszociáció szempontjából biomarker értékkel rendelkeznek, és ezek nem egyforma irányúak, azaz tapasztaltunk pozitív, negatív és neutrális asszociációt is [132].

A PEP-hez használt QuantiPlasma mAb könyvtárat (koncentrációra és immunogenicitásra is) normalizált humán plazmával, mint immunogénnel állították elő, ezzel biztosítva azt, hogy a mAb-ok természetes antigén determinánsokat ismerjenek fel [133]. A létrejött hibridómák válogatása azzal a céllal történt, hogy az sbCIA rendszerben működő mAb-okat kiválasszák, azaz a kötődés mértéke lineáris összefüggést mutasson a plazmahígítással [132]. A szelekción átesett hibridómák klónozása után termeltethetőek a monoklonális antitestek *in vitro* és *in vivo*. A monoklonális antitestek egy-egy epitóppal reagálnak, így egy-egy fehérjéhez több epitóp is társítható. Becsléseink szerint a PlasmaScan könyvtárban körülbelül 3 epitóp/fehérje található, körülbelül 100 plazmafehérjére vonatkozóan. A PEP technikával a fehérjéknek nemcsak a mennyisége, hanem a minőségi változásai is nyomon követhetők különböző állapotokban [132]. A PEP a fehérje epitópok sokaságát vizsgálja a globalitásra törekedve, a

ma használatos globális proteomikai eljárásokkal ellentétben, szubprotein szinten, az epitópok szintjén.

Egy korábbi közleményben a szendvics ELISA módszerrel detektált leucingazdag alfa-2-glikoprotein 1 (LRG1) fehérje tüdőrák asszociációját mutatták ki [133], majd kimutatásra került, hogy az LRG1 immunkomplexek egyes elérhető epitópjai nem egy formán asszociálnak tüdőrákkal [131]. Ez a megfigyelés hívta fel a figyelmet a szubprotein, epitóp alapú vizsgálatok széleskörű kiterjesztésének lehetőségére.

Szélesebb körben az epitópokat és rákbetegség kapcsoltságukat, a PlasmaScan könyvtár sbCIA esszéiben is működő frakciójának (~ 380 mAb), a QuantiPlasma könyvtár PEP során történő alkalmazásával vizsgáltuk. Eredményeink szerint, a C9 molekulára vonatkozóan, egyes anti-C9 specifikus mAb-ok, illetőleg az általuk felismert epitópok különböző módokon asszociáltak a tüdőrákkal (neutrális [BSI0449], pozitív [BSI0639], illetve negatív [BSI0581]) [132]. Ennek a jelenségnek a molekuláris proteomikai vizsgálatát tűztem ki célul.

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

3. Célkitűzések

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

Céljaim jelen kutatásban az alábbiak voltak:

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

A kezdeti hipotézismentes kutatás eredményei vezettek a további célkitűzésekhez:

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

4. Anyagok és módszerek

4.1. Vizsgált betegcsoportok és feldolgozott minták

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

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

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

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

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

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

4.2. Immunoprecipitáció

Az immunoprecipitációhoz Dynabeads™ Protein G (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mágneses gyöngyöket használtunk. Minden monoklonális antitestéhez (mAb) 50 µl Protein G-t használtunk, melyet 200 µl W&B (Wash and Bindig) pufferrel (0,1 M Na₂HPO₄·12H₂O [VWR, Lutherworth, Leicestershire, Egyesült királyság], 0,05% Tween [Sigma, St. Louis, MO, USA], pH 8,2) előmostunk.

A mágneses gyöngyök előkészítése után, 75 µg mAb-ot, 200 µl W&B pufferban hígítva, hozzáadtunk a már előmosott gyöngyökhöz. Szobahőmérsékleten inkubáltuk keverőn 5 RPM sebességű forgatás közben. Ezután a gyöngyöket 200 µl PBS pufferrel (123 mM NaCl [Spektrum 3D, Debrecen, Magyarország], 3,16 mM KH₂PO₄ [Riedel-de Haën, Seelze, Németország], 10,45 mM Na₂HPO₄·2H₂O [Riedel-de Haën, Seelze, Németország]), majd 200 µl desztillált vízben hígított 0,2M-os trietanol-aminnal is lemostuk. Az utolsó mosási fázis után 200 µl frissen készített 20 mM-os 0,2 M-os trietanolaminban hígított DMP-t (Dimethyl Pimelidate [Thermo Scientific, Waltham, MA, USA]) adtunk a mágneses gyöngyökhöz, majd 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten keverőn 5 RPM forgási sebességgel. A felülúszók eltávolítása után 200 µl 0,2 M-os desztillált vízben hígított monoteanolamint (Sigma, St. Louis, MO, USA) adtunk a gyöngyökhöz és 15 percig inkubáltuk keverőn 5 RPM forgási sebességgel. Majd a felülúszó eltávolítása után a gyöngyöket háromszor mostuk 200 µl PBS pufferrel.

Az antitest kötődése után, gyöngyökhöz rögzített mAb-okhoz hozzáadtuk a 200 µl plazma mintát, 200 µl PBS pufferben hígítva, 100 µl 20x-os proteáz inhibitorral (1 tableta proteáz inhibitor [SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablet, Sigma, St. Louis, MO, USA] 20 ml desztillált vízben feloldva) keverve. Az így előkészített mixet egy éjszakán át, keverőn, 4 °C-on inkubáltuk.

Az antigén-antitest kötődését követően, másnap centrifugálás és a felülúszó eltávolítása után, a gyöngyöket háromszor mostuk 200 µl PBS pufferrel. A felülúszó eltávolítása után, 100 µl PBS pufferben a gyöngyöket átpipettáztuk tiszta Eppendorf csövekbe. A felülúszó eltávolítása után, a gyöngyökhöz 50 mM-os (desztillált vízben hígított, pH 2,5) 50 µl glicin (Sigma, St. Louis, MO, USA) oldatot adtunk és inkubáltuk szobahőmérsékleten 10 percig. Az eluátumot átpipettáztuk tiszta Eppendorf csőbe, melybe már előre 10 µl 1 M-os Tris oldatot ([Sigma, St. Louis, MO, USA] pH 9,0) tettünk.

4.3. SDS-PAGE

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

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

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

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

4.4. Festés

4.4.1. Coomassie festés

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

4.4.2. Ezüstoffestés

A géleket a Coomassie festés után ezüstoffestéssel is megfestettük. A „destainnel” színtelenített géleket 20 percig fixáltuk 50% metanolt és 5% ecetsavat tartalmazó oldatban. Majd 20 percig 50% metanolt tartalmazó oldatban tovább áztattuk. 10 perc áztatás következett ultraszűrt vízben. Az 1 perces 1,27 mM-os Na₂S₂O₃ (Sigma, St. Louis, MO, USA) oldatban történő érzékenyítés után 2x1 percig ultraszűrt vízben öblítettük le a gélt. A festés 0,1%-os AgNO₃ (Sigma, St. Louis, MO, USA) oldatban 20 percig tartott, majd újra 2x1 perces ultraszűrt vizes öblítés következett. Az előhívás intenzív rázatás közben 2%-os Na₂CO₃-ot (Sigma, St. Louis, MO, USA) és 0.04% formaldehidet (Sigma, St. Louis, MO, USA) tartalmazó oldatban

végeztük a megfelelően diszkrimináló szín denzitás eléréséig. A reakció leállítása 5%-os ecetsavban 3-5 perc alatt zajlott. Az ezüstoffestett géleket 1%-os ecetsav (Scharlab, Debrecen, Hungary) oldatban 4 °C-on tároltuk.

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

4.5. Western blott

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

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

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

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

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

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

4.6. Tömegspektrometria

4.6.1. Mintaelőkészítés

A teljes plazma mintákat C9 specifikus (BSI0449, BSI0581, BSI0639) protein G borított mágneses gyöngyökhöz (átlagos mérettartománya 50 nm, MACS[®] Technology, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Németország) kovalensen kötött antitestekkel immunoprecipitáltuk, majd a gyöngyökön tripszinnel emésztettük.

4.6.2. Tömegspektrometriai mérés

A tripszinnel emésztett alikvotokat LC-MS/MS rendszerbe vezettük. RP-HPLC (Waters, Milford, MA, USA) készüléket kapcsolunk Orbitrap-Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tömegspektrométerhez.

Az adatok gyűjtéséhez az MS1 alapján a 20 legintenzívebb, többszörösen töltött prekursorion került fragmentálásra MS2-ben, magas energiájú ütközésindukált disszociációs [Higher-energy C-trap Dissociation (HCD)] technikát alkalmazva.

4.6.3. Adatok elemzése

A nyers adatokat csúcslista típusú adatokká konvertáltuk Proteome Discoverer (v 1.4) program (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével, majd ezt a listát összevetettük a SwissProt adatbázissal (555426 proteint tartalmazó, 2017.09.19.-es verzió).

Az összevetéshez Protein Prospector (v.5.15.1) szoftvert (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk a következő paraméterekkel: enzim: tripszin maximum két kihagyott hasítóhely; tömegpontosság: 5 ppm a prekursorionra és 10 ppm a fragmentumokra; fix módosítások: cisztein karbamidometiléződés; változó módosítások: *N*-terminális acetilációja, metionin oxidáció, *N*-terminális glutamin ciklizációja, szerin/teronin/tirozin foszforilláció, maximum két variábilis módosítás volt megengedett peptidenként. Az elfogadási kritérium *E*-értéke 0,01 volt proteinek és 0,05 volt peptidek azonosítására.

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

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

4.7. Antitest biotinilálás

4.7.1. Biotinilált antitest előállítása

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

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

4.7.2. Biotinilált antitest validálása

A biotiniláltsági fokot HABA - Pierce Biotin Quantitation Kittel (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) végeztük. A 4 °C-on tárolt HABA premixet szobahőmérsékletre hagytuk melegedni, majd 100 µl ultraszűrt vízben feloldottuk. A feloldott HABA-t 96 nyílású ELISA lemezre vittük (160 µl PBS + 20 µl HABA / nyílás). FLUOstar OPTIMA (BMG LabTech, Durham, NC, USA) ELISA lemez olvasón beolvastuk a nyílások abszorbancia (OD) értékét. Majd 20-20 µl biotinilált mintát rámértünk a HABA-t tartalmazó nyílásokra. Összeszuszpendáltuk és újramértük az OD értékét az olvasón. A kiértékeléshez a Thermo Scientific oldalán lévő HABA Calculator programot használtuk. (<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/protein-biology/protein-labeling-crosslinking/protein-labeling/biotinylation/biotin-quantitation-kits/aba-calculator.html>)

A biotinilált antitestek koncentrációját BCA Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével mértük meg. BCA mérésnél egy előre elkészített kalibrációs sor mellé, 96 nyílású lemezen 5-5 µl mintát viszünk fel nyílásonként, 5 µl 1 mg/ml IgG standardot is használva. A mintákat és a standardot is 5x-re hígítjuk PBS oldattal. A kitben lévő A és B

komponenseket 50:1 arányban kevertük és 200-200 μ l-t ramértünk a lemezre, majd 15 percig inkubáltuk 37°C-on. A lemez abszorbancia értékeit a FLUOstar OPTIMA ELISA (BMG LabTech, Durham, NC, USA) olvasóban történő beolvasás után kaptuk meg.

4.8. C9 epitóp teszt

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

4.9. Statisztikai analízis

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

4.10. Ábrázolás

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

5. Eredmények

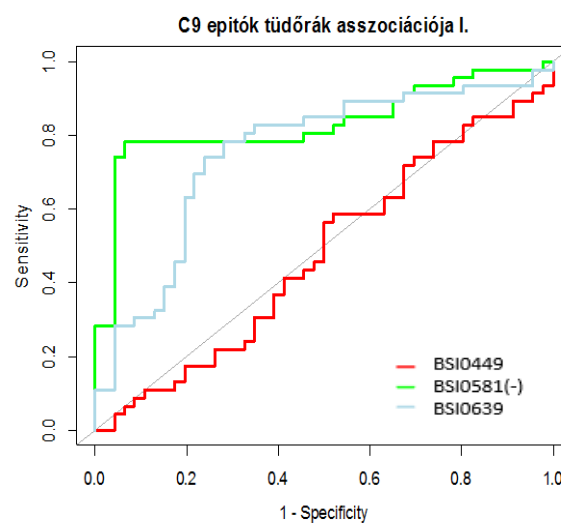
5.1. Anti C9- antitestek kiválasztása és korábbi adatainak elemzése

Korábbi méréseink eredményei szerint, egy-egy fehérje epitópjai tüdőrák asszociáció szempontjából eltérő biomarker értékkel rendelkeznek, és ezek nem szükségszerűen egyforma irányúak, azaz tapasztaltunk pozitív, negatív és neutrális asszociációt is [132].

Az egyik ilyen vizsgált fehérje a plazma C9. A BSI QuantiPlasma könyvtárban 12 darab C9-et felismerő mAb található.

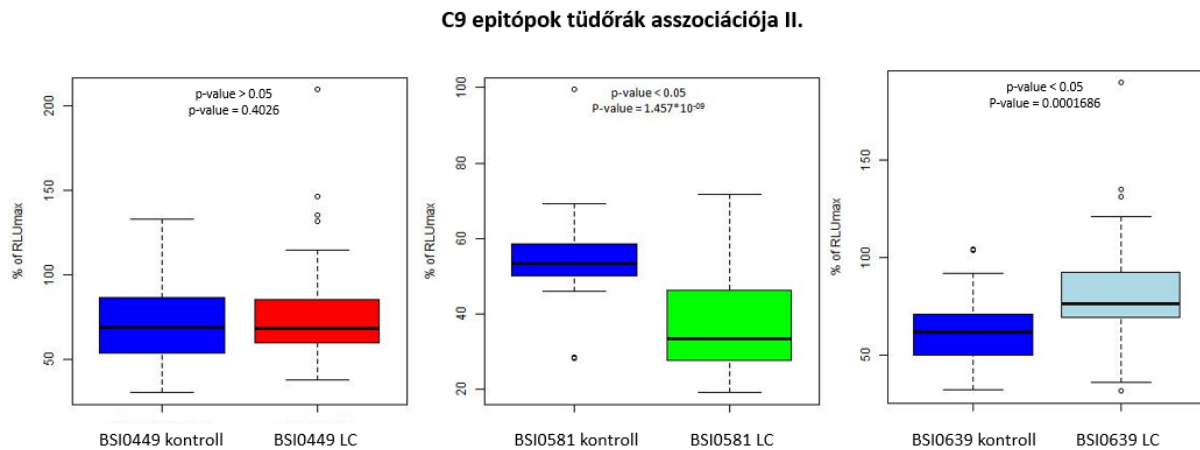
Ezek közül választottunk ki hármat további vizsgálatra, az epitópok mAb-okkal vizsgált asszociációja alapján. Volt neutrális egy C9 epitóp, amely nem tett különbséget tüdőrákos és nem tüdőrákos minták között. Voltak olyan epitópok is, amelyek különbözően viselkedtek tüdőrákos és kontroll egyének vérplazma mintáival való asszociáció szempontjából, azaz pozitívan vagy negatívan kapcsolódtak hozzájuk; ezek közül egyet-egyét választottunk ki.

Az adatokat újra elemezve ROC görbén (6. ábra) az asszociáció meglétét, illetve hiányát láthatóvá tettük.



6. ábra: A kiválasztott három mAb által definiált epitópok tüdőrák asszociációjának vizsgálata ROC görbékkel szemléltetve. (Az ábra, a Lazar és munkatársai közleményében [132] már szereplő adathalmaz felhasználásával készült). A ROC analízishez felhasznált RLU% adatok tüdőrákos és kontroll egyének vérplazma mintáinak sbCIA méréséből származnak Radox Evidence Investigator műszeren mérve. A BSI449 epitóp jól láthatóan neutrális, a BSI0581 és BSI0639 epitópok asszociációt mutatnak tüdőrákkal.

A jobb érthetőség kedvéért, és a statisztikai kiértékelés miatt is az egyes epitópok mért RLU_{max}%-os adatait dobozdiagram ábrázolással is bemutatjuk a statisztikai analízis eredményével együtt (Student fele kétmintás-t próba) (7. ábra).



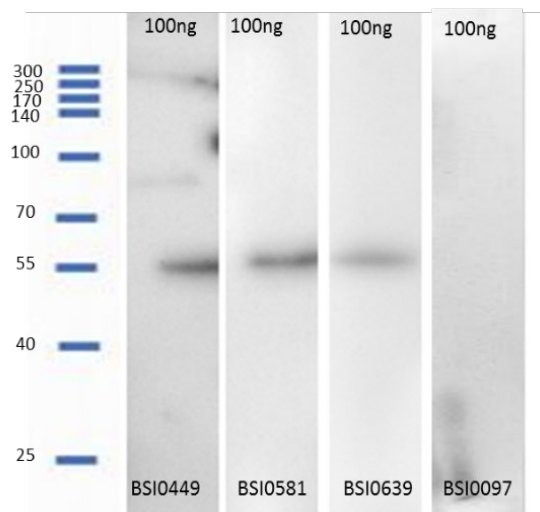
7. ábra: A kiválasztott három mAb tüdőrák asszociációjának vizsgálata dobozdiagram ábrán szemléltetve. Az ordináta az sbCIA rendszerben a Randox Evidence Investigator biocsip array műszeren mért RLU%-os értékére vonatkozik. A p-értékeket kétmintás t-próbával határoztuk meg [132].

Statisztikai elemzés után a BSI0581 epitóp és BSI0639 epitóp kontroll és tüdőrákos minták között szignifikáns volt a különbség, míg a BSI0449 epitóp esetében nem.

5.2. Az anti-C9 monoklonális antitestek validálása

5.2.1. Validálás kereskedelmi forgalomba kapható C9-re

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



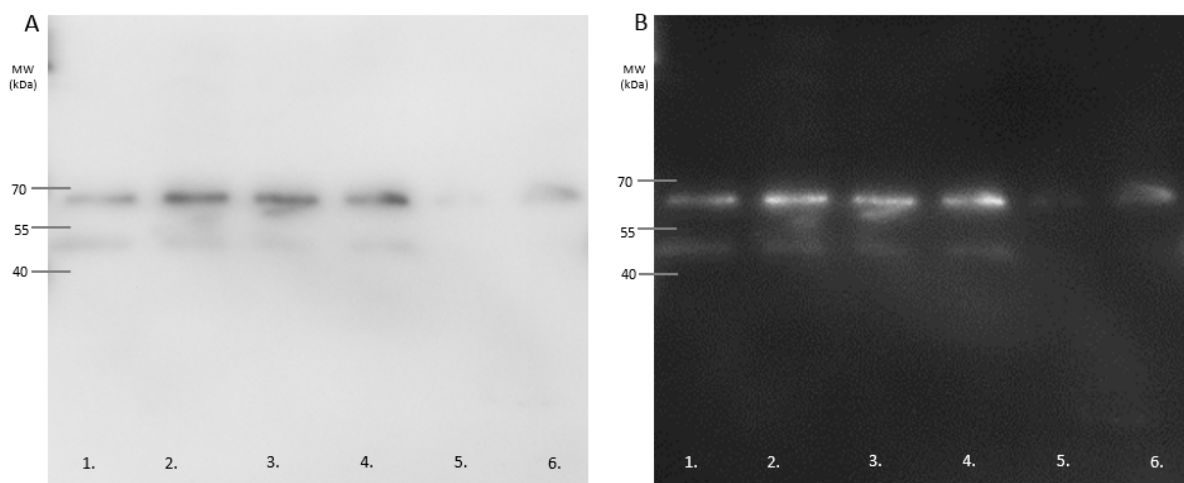
8. ábra: BSI anti-C9 mAb-ok validálása kereskedelmi forgalomban kapható C9 fehérjével [134].

Mind a három anti-C9 fehérje felismerte a C9 fehérjét ~55 kDa tartományban, míg egy másik, negatív kontroll antitest, ami albumin specifikus (BSI0097), nem ismerte fel a C9-et (8. ábra). A preparátum nem tartalmaz teljes C9 molekulát; a felismert C9 valószínűleg egy degradált forma lehet [135], mivel a teljes hosszúságú C9 molekulatömege 63,173 kDa.

5.2.2. C9 vizsgálata plazmában

Miután validáltuk a BSI anti-C9 mAb-okat, ezek segítségével immunoprecipitáltunk kontroll és tüdőrákos poolozott teljes plazmát. A poolok 167 kontroll és 207 tüdőrákos beteg mintáit tartalmazták.

Az immunoprecipitátumokban vizsgáltuk, a C9 fehérje jelenlétét. Az immunoprecipitált kontroll és tüdőrákos mintákat SDS-PAGE után Western blottal ellenőriztük. A Western blotthoz BSI0449:BSI0639 1:1 arányú elegyét használtuk. A BSI0581 korábbi Western blott kísérletek során nem működött teljes plazmát használva. Másodlagos antitestként GAM-HRP-t használtunk 2500x hígításban (9. ábra).



9. ábra: Immunoprecipitált (IP) kontroll (Ctrl) és tüdőrákos (LC) minták Western blott képe.

A: lumineszcens fényvel történt előhívással, B: UV fényvel történt előhívással. 1. sáv: BSI0449 IP Ctrl plazma minta. 2. sáv: BSI0449 IP LC plazma minta. 3. sáv: BSI0581 IP Ctrl plazma minta. 4. sáv: BSI0581 IP LC plazma minta. 5. sáv: BSI0639 IP Ctrl plazma minta. 6. sáv: BSI0639 IP LC plazma minta [134].

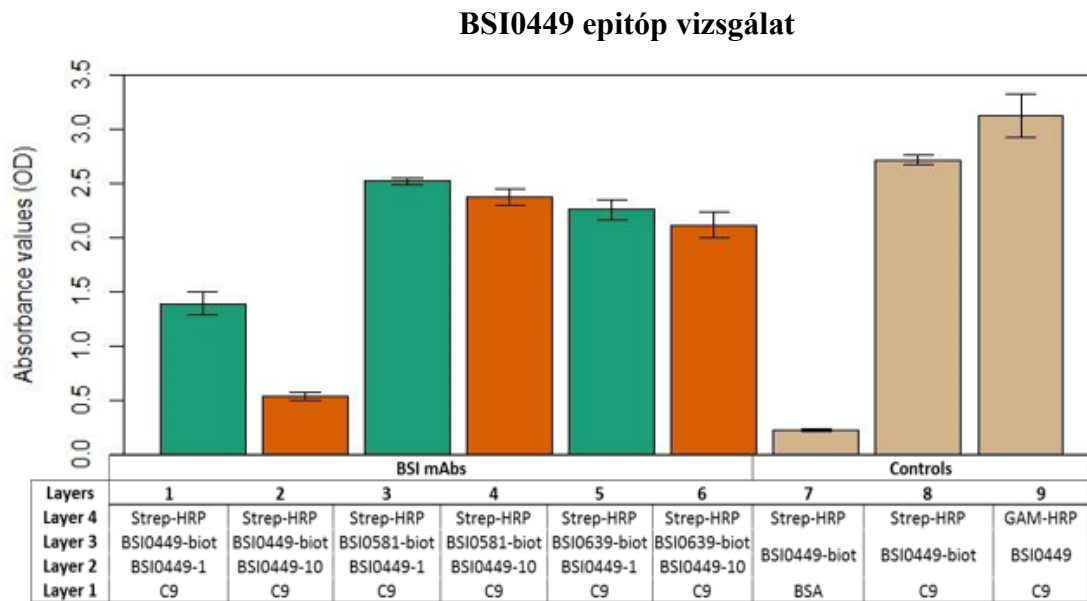
Az eredmények alapján a kiválasztott mAb-ok a vérplazmában is felismerték a C9-et, körülbelül 52 kDa és 68 kDa körüli tartományban. Ezek a formák valószínűleg a korábban detektált degradált C9, valamint a poszttranszlációs módosulásokkal rendelkező teljes hosszúságú plazma C9-et mutatják.

5.3. A C9-en lévő epitópok átfedésének vizsgálata

Kötődés kompetíciós ELISA tesztet végeztem, hogy megvizsgáljam, a három anti-C9 specifikus mAb különböző epitópokat ismer-e fel. Ebben a kísérletben a 96 nyílású lemezt tisztított, kereskedelmi forgalomban kapható C9-cel burkoltam. Erre következő réteggént a nem biotinizált BSI anti-C9 (BSI0449, BSI0581, BSI0639) ellenanyagok következtek különböző koncentrációkban (1 µg/ml és 10 µg/ml). A második antitest a biotinizált antitest (BSI0449, BSI0581, BSI0639) volt, 1 µg/ml koncentrációban. (Az antitestek biotinizálását is a laborban végeztem. A biotinizáltsági fokot HABA tesztel, az antitest koncentrációt BCA tesztel ellenőriztem.)

Az első kísérlet során az elsődleges, nem biotinizált antitest a BSI0449 volt, különböző koncentrációkban. Negatív kontrollként C9 helyett marha szérumalbumin rétegzést

használtam. Pozitív kontrollként a C9 fehérjét közvetlenül a biotinilált anti-C9 mAb-bal detektáltam. Technikai kontrollként a C9-re nem biotinilált antitestet tettem, majd erre kötöttem rá a GAM-HRP-t (10. ábra). A kontrollhoz viszonyított jelintenzitás szignifikanciáját táblázatban foglaltam össze (1. táblázat). Ezt a kísérletet elvégeztük a BSI0581-es (11. ábra, 2. táblázat) és a BSI0639-es (12. ábra, 3. táblázat) mAb-ok esetében is.

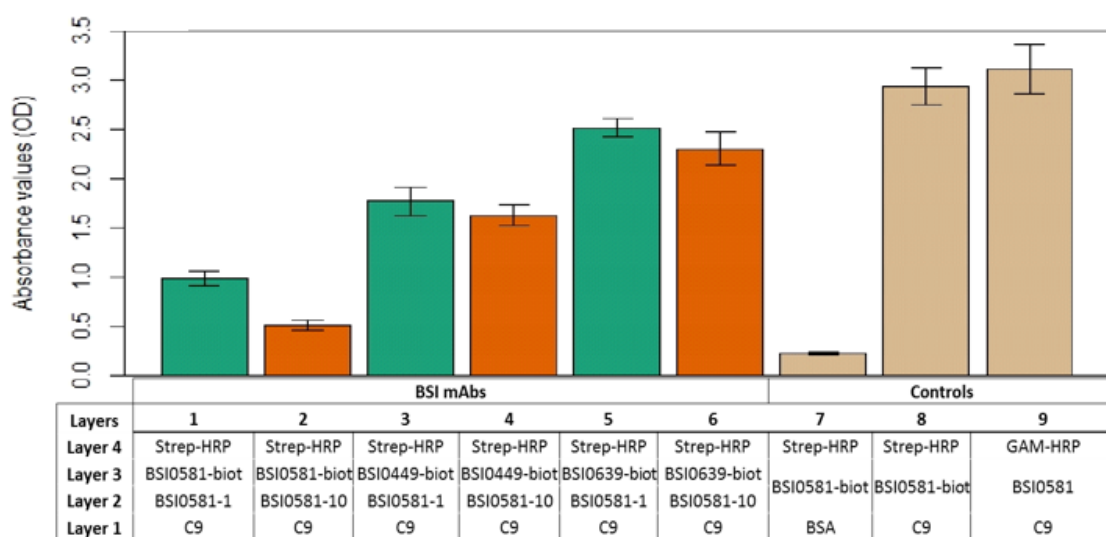


10. ábra: BSI0449 mAb által felismert epitóp kompetíciós ELISA vizsgálata [134].

1. táblázat: BSI0449 mAb által felismert epitóp jelintenzitásának kontrollhoz viszonyított szignifikancia értékei. (Piros színnel kiemelve a nem szignifikáns érték.)

	BSI0449_1µl+BSI0449_biot	BSI0449_10µl+BSI0449_biot	BSI0449_1µl+BSI0581_biot	BSI0449_10µl+BSI0581_biot	BSI0449_1µl+BSI0639_biot	BSI0449_10µl+BSI0639_biot	BSA+BSI0449_biot	C9+BSI0449_biot
BSI0449_1µl+BSI0449_biot		0,0001974	7,69E-05	1,26E-05	2,23E-05	0,0001055	0,0001645	0,008822
BSI0449_10µl+BSI0449_biot			3,15E-10	1,10E-06	4,11E-06	3,57E-05	0,0001181	0,00481
BSI0449_1µl+BSI0581_biot				0,02836	0,005988	0,00439	4,46E-08	0,7898
BSI0449_10µl+BSI0581_biot					0,09774	0,01422	6,85E-06	0,3297
BSI0449_1µl+BSI0639_biot						0,1148	1,40E-05	0,1659
BSI0449_10µl+BSI0639_biot							5,05E-05	0,07924
BSA+BSI0449_biot								0,003907
C9+BSI0449_biot								

BSI0581 epitóp vizsgálat

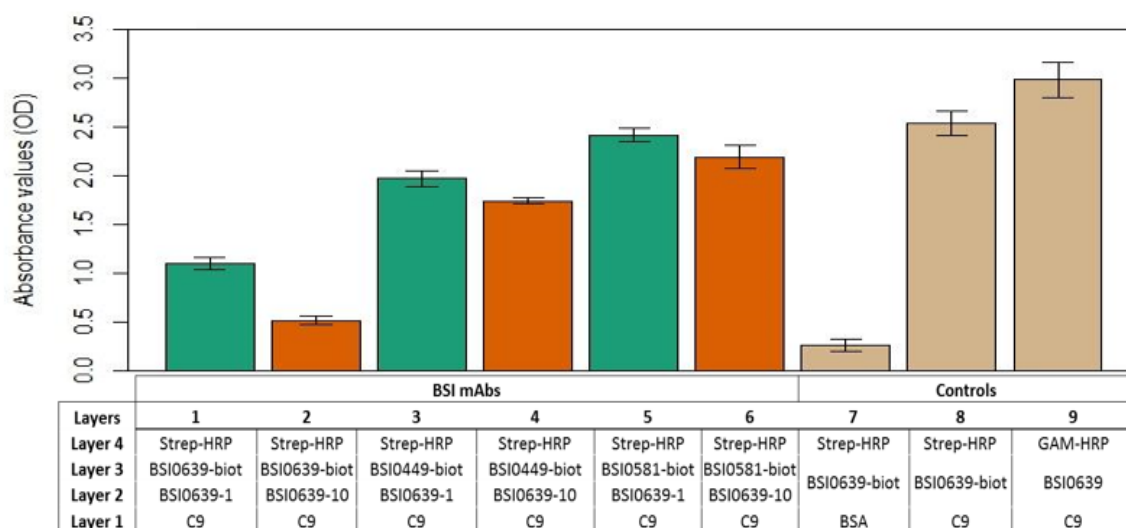


11. ábra: BSI0581 mAb által felismert epitóp kompetíciós ELISA vizsgálata [134].

2. táblázat: BSI0581 mAb által felismert epitóp jelintenzitásának kontrollhoz viszonyított szignifikancia értékei. (Piros színnel kiemelve a nem szignifikáns érték.)

	BSI0581_1μl+BSI0581_biot	BSI0581_10μl+BSI0581_biot	BSI0581_1μl+BSI0449_biot	BSI0581_10μl+BSI0449_biot	BSI0581_1μl+BSI0639_biot	BSI0581_10μl+BSI0639_biot	BSA+BSI0581_biot	C9+BSI0581_biot
BSI0581_1μl+BSI0581_biot		8,12E-05	0,004346	0,0001063	1,87E-06	0,0001135	9,81E-05	0,001322
BSI0581_10μl+BSI0581_biot			0,001322	2,03E-05	2,55E-06	7,77E-05	0,0006838	0,001225
BSI0581_1μl+BSI0449_biot				0,2351	0,002546	0,006891	0,002484	0,001413
BSI0581_10μl+BSI0449_biot					2,59E-05	0,001006	6,40E-05	0,001914
BSI0581_1μl+BSI0639_biot						0,09963	1,65E-05	0,03854
BSI0581_10μl+BSI0639_biot							0,0001146	0,009527
BSA+BSI0581_biot								0,001459
C9+BSI0581_biot								

BSI0639 epitóp vizsgálat



12. ábra: BSI0639 mAb által felismert epitóp kompetíciós ELISA vizsgálata [134].

3. táblázat: BSI0639 mAb által felismert epitóp jelintenzitásának kontrollhoz viszonyított szignifikancia értékei. (Piros színnel kiemelve a nem szignifikáns érték.)

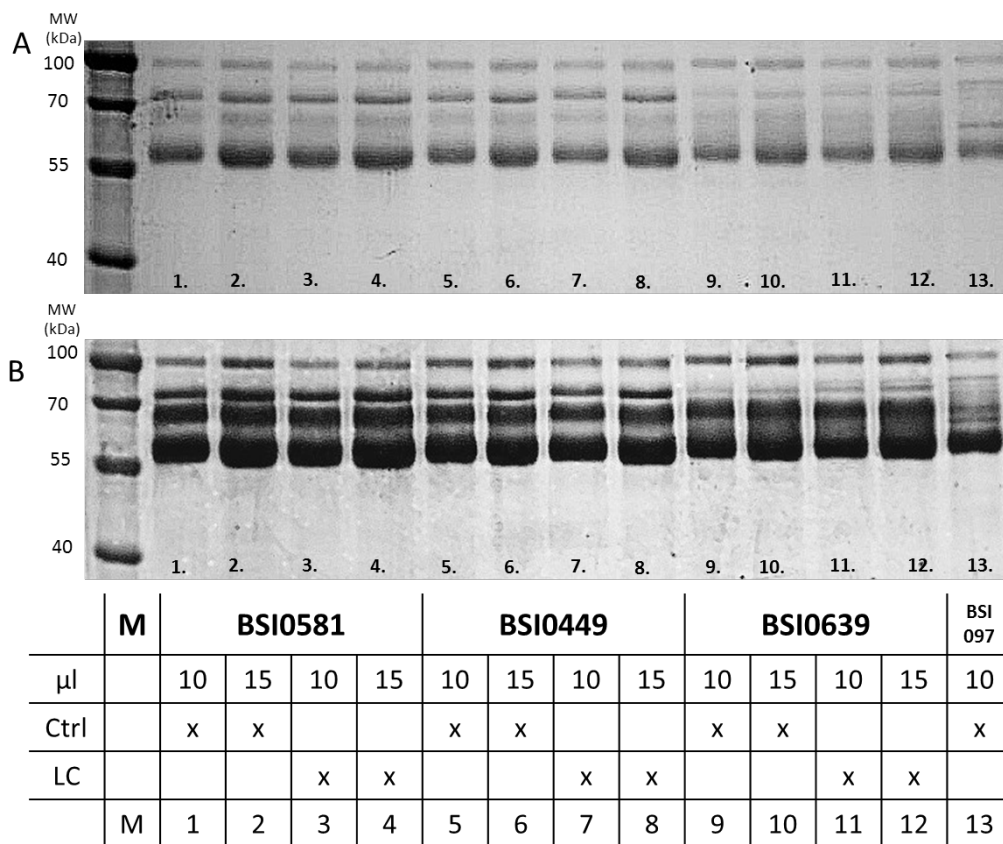
	BSI0639_1μl+BSI0639_biot	BSI0639_10μl+BSI0639_biot	BSI0639_1μl+BSI0449_biot	BSI0639_10μl+BSI0449_biot	BSI0639_1μl+BSI0581_biot	BSI0639_10μl+BSI0581_biot	BSA+BSI0639_biot	C9+BSI0639_biot
BSI0639_1μl+BSI0639_biot		1,01E-05	4,24E-06	1,36E-05	1,80E-07	4,69E-05	0,00414	2,24E-05
BSI0639_10μl+BSI0639_biot			2,09E-06	8,17E-09	2,19E-07	2,91E-05	0,06491	2,07E-05
BSI0639_1μl+BSI0449_biot				0,00593	0,0001577	0,02695	0,0001871	0,0006429
BSI0639_10μl+BSI0449_biot					5,00E-05	0,003544	0,008432	0,0006855
BSI0639_1μl+BSI0581_biot						0,0235	0,0002032	0,1695
BSI0639_10μl+BSI0581_biot							1,90E-05	0,007626
BSA+BSI0639_biot								9,74E-06
C9+BSI0639_biot								

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

5.4. A C9 epitóp-függő heterogenitásának fehérjekémiai analízise

5.4.1. Epitóp heterogenitás fehérjekémiai analízise SDS-PAGE analízissel

Megvizsgáltam, hogy van-e összefüggés az epitópokkal összefüggésbe hozható molekuláris heterogenitás és a biomarker érték között. Ehhez először a három anti-C9 mAb-bal (BSI0449, BSI0581, BSI0639) precipitáltam kontroll és tüdőrákos plazmákat. Az immunoprecipitátumokat, redukáló SDS-PAGE gélben, különböző térfogatban vittem fel (10 μ l és 15 μ l), majd a géleket Coomassie G-250 és ezüstfestéssel is megfestettem (13. ábra).



13. ábra: A poolozott kontroll és tüdőrákos plazmaminták immunoprecipitátumainak (IP) vizsgálata anti-C9 mAb-okkal (BSI0449, BSI0581, BSI0639). A: kontroll és tüdőrákos plazma anti-C9 IP-je SDS-PAGE-en Coomassie G-250 festéssel. B: kontroll és tüdőrákos plazma anti-C9 IP-je SDS-PAGE-en ezüstfestéssel. A minták felviteli sorrendje és típusa a kép alatti magyarázó táblázaton látható [134].

A BSI0449 és BSI0581 mAb-bal immunoprecipitált minták között látszólag nem volt jelentős különbség. A BSI0639 mAb-bal immunoprecipitált mintákon ~70 kDa tartományban lévő sáv halványabb, a tüdőrákos mintákon két egymástól elkülönülő sáv is látható.

5.4.2. Epitóp heterogenitás fehérjekémiai analízise tömegspektrometriás analízissel

Mivel az SDS-PAGE felbontása nem volt elegendő a koprecipitált fehérjék közötti különbségek kimutatásához (kivéve a C9 molekulásúlyú fehérjét), a mintákat tovább vizsgáltuk LC-MS/MS technológiával.

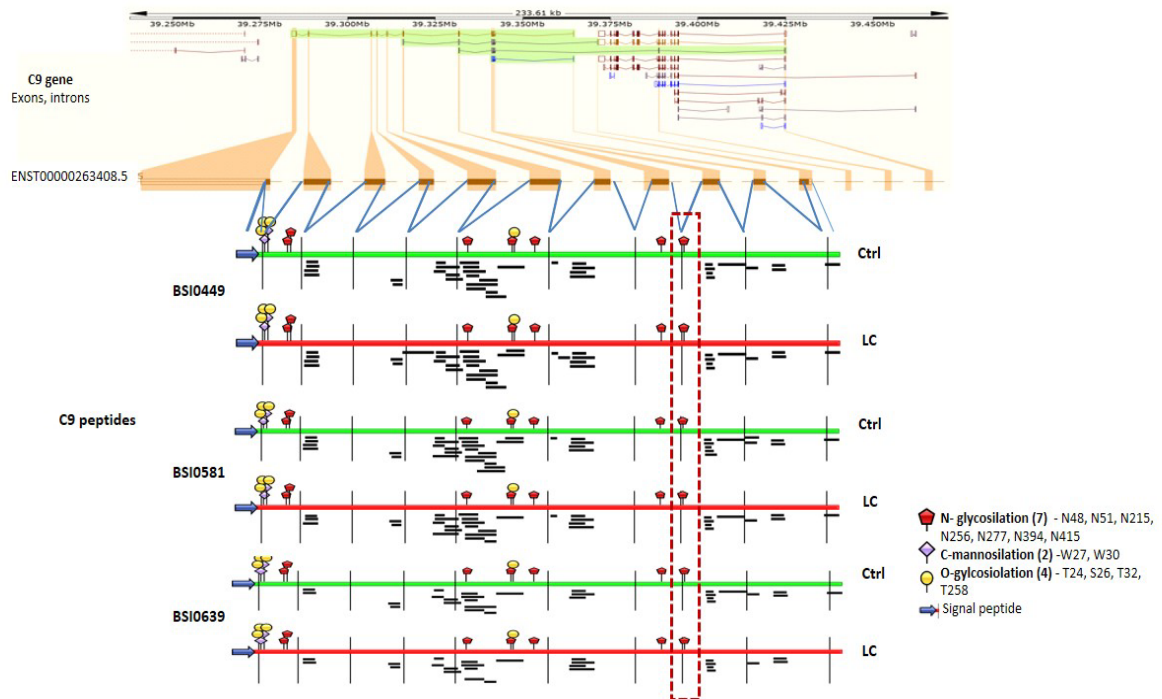
A gyöngyökre anti-C9 mAb-okkal (BSI0449, BSI0581, BSI0639) kihorgonyozott C9-et és asszociált fehérjéit tripszinnel leemésztették le a gyöngyökről. A tripszinnel emésztett alikvotokat tömegspektrometriás analízissel elemezték a Szegedi Biológia Kutatóközpont Proteomikai Laborjában.

A vizsgálat igazolta, hogy az anti-C9 mAb-ok reagálnak C9-cel, mivel az emésztett peptidek alikvotjainak 3-13%-a C9 volt és a C9-re vonatkozóan ez 30-45%-os C9 lefedettséget eredményezett. Más fehérjékre vonatkozóan az adatok nem voltak ilyen jók.

5.4.3. Az LC-MS/MS eredmények adatanalízise

Az epitópok különböző viselkedése olyan genetikai módosulásoknak is köszönhető lehetne, mint az alternatív splicing, illetve az alternatív translációs kezdő vagy stop hely. Megvizsgáltam, hogy az észlelt epitóp különbségek ezen C9 kódoló kapacitásra visszavezethető strukturális genetikai változásoknak köszönhetőek-e, visszatérkeztem a különböző mAb-okkal kapott MS peptideket az Ensembl adatbázisban található C9 struktúrára (ENST00000263408.5) (14. ábra).

A C9 poszttranszlációs módosulásait publikációkból [136, 137] és a UniProt adatbázisból kerestem ki. A keresés során 7 különböző pozícióban (48, 51, 215, 256, 277, 394, 415) volt N-glikoziláció, 2 pozícióban C-mannoziláció (27, 30), és 4 pozícióban O-glikoziláció (24, 26, 32, 258).

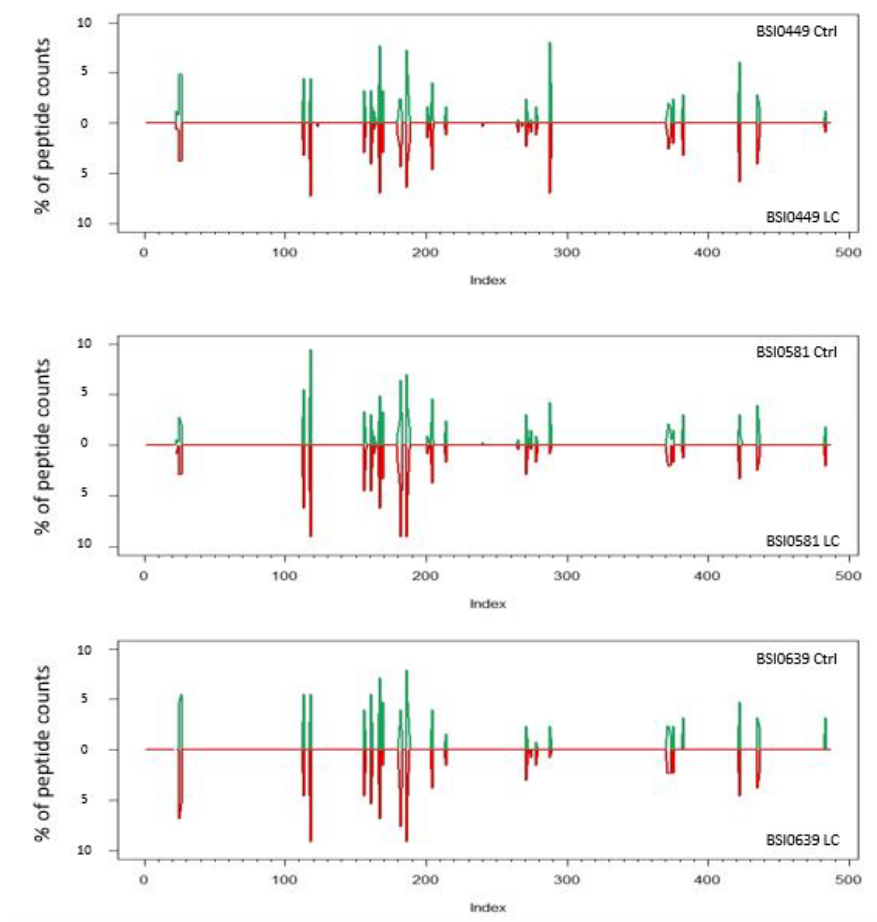


14. ábra: Az ábrán a C9 exon-intron struktúrája látható, melyre visszatérképeztük a MS analízisből kapott C9 peptideket. A zöld vonal a kontroll mintákat, a piros vonal a tüdőrákos mintákat jelöli. Az ábrán feltüntettük a szignál peptidet és a különböző helyeken található glikozilációs módosulásokat is [134].

A mintáikból minden esetben hiányoztak a szignál peptidok, mivel a C9 plazmában keringő, vagyis szekretált C9 volt. Az MS peptidek eloszlása hasonló volt.

A kapott peptidek számát is összevetettük a különböző kontroll és tüdőrákos mintákban (15. ábra). A PeptideAtlas-ban található összes C9 peptidet kigyűjtöttem (478 darab) [Human 2022-01 verzió], majd ezeket a peptidek kezdő pozíciói szerint sorba állítottam. Az így rendezett peptidek mindegyike kapott egy sorszámot (index). Ez a sorszám van a 15. ábra x-tengelyén feltüntetve. A PeptideAtlas-ból kigyűjtött fehérjék indexszámaihoz igazítottam a C9 MS peptidjeinket.

A C9 MS peptidek összevetéséből nem látszik jelentős különbség a különböző minták között.

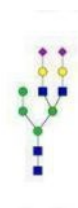






15. ábra: A C9 MS peptidek százalékos eloszlása a különböző mintákban. Zöld színnel a kontroll, piros színnel a tüdőrákos minták eredményei láthatóak. A csúcsok magassága az adott peptid százalékos eloszlását jelöli.

Az epitópok variabilitása poszttranszlációs módosulásnak is köszönhető, ezért a C9 MS peptideken különböző glikozilációs mintákat kerestünk. A UniProt adatbázisban és a különböző publikációkban talált poszttranszlációs módosulásokat az 14. ábrán is feltüntettem. Vizsgálatunk során csak a 415 pozícióban lévő N-glikozilációt (14. ábra, 16. ábra) találtuk meg, viszont ezt minden mintában.



HexNAc₄NeuAc₂



16. ábra: A 415 pozícióban megtalált antennás glikán szerkezete. [3-deoxi-nomulosonic acids (NeuAc) , Hexóz (galaktóz) , HexNAc (GlyNAc) , Hexóz (mannóz) 

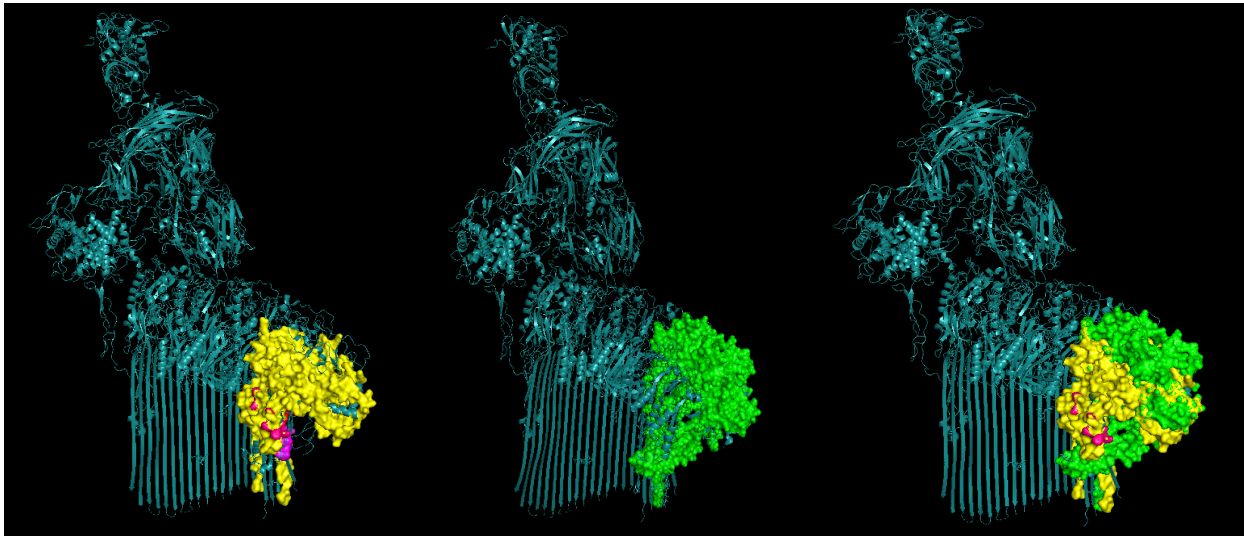
A talált glikozilációs helyet egy nem módosított „erős” peptidre normalizálva különbségeket találtunk a glikoziláltság arányában a kontroll és a tüdőrákos mintákban (4. táblázat).

4. táblázat: A táblázat a C9 fehérje 415-ös pozíciójában antennás HexNAc₄NeuAc₂ glikán szerkezetével rendelkező peptid normalizált intenzitását és kontroll/LC arányát mutatja [134].

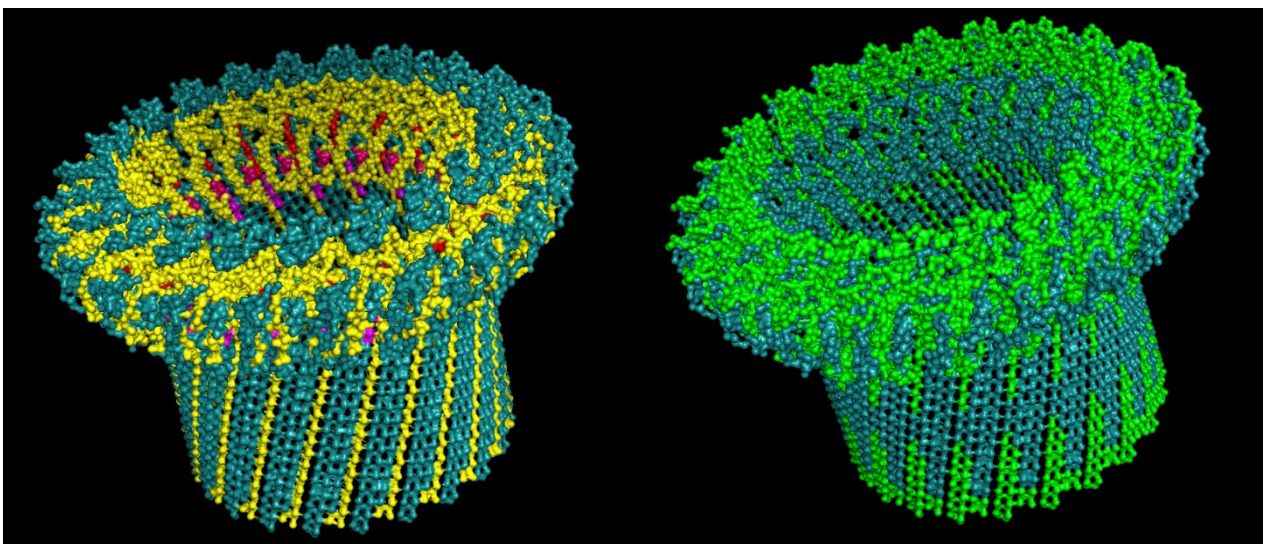
Minta	Normalizált intenzitás	Kontroll/LC 415 aránya
BSI0449 Ctrl	0,67	1,25
BSI0449 LC	0,54	
BSI0581 Ctrl	1,02	4,88
BSI0581 LC	0,21	
BSI0639 Ctrl	1,00	5,83
BSI0639 LC	0,17	

A kapott peptideket különböző háromdimenziós C9 szerkezetekre is visszatérképeztük (17. ábra, 18. ábra). A 17. ábra első harmadában láthatóak azok a peptidek melyek a mi kísérletünk MS eredményeiből kaptunk. Sárgával jelöltük azokat, melyeket a PeptideAtlas-ban is megtaláltunk. Kísérletünk során találtunk olyan peptideket, melyek nem szerepeltek a PeptideAtlas-ban ezeket lila, illetve piros színekkel jelöltük. Az ábra középső részén láthatóak zölddel azok a peptidek, melyeket mi nem találtunk meg, de a PeptideAtlas adatbázisban

szerepelnek. Az ábra harmadik harmadában látható együtt a megtalált és a mi kísérleteinkből hiányzó peptidek.



17. Ábra: A kísérleteink során kapott és a PeptideAtlas-ban talált peptidek elhelyezkedése a szolubilis komplexben lévő C9 dimeren (PDB: 7NYC). (Sárga, lila és piros színekkel a kísérleteinkből származó peptidek. Zöld színnel csak a PeptideAtlas-ban megtalált peptidek.)



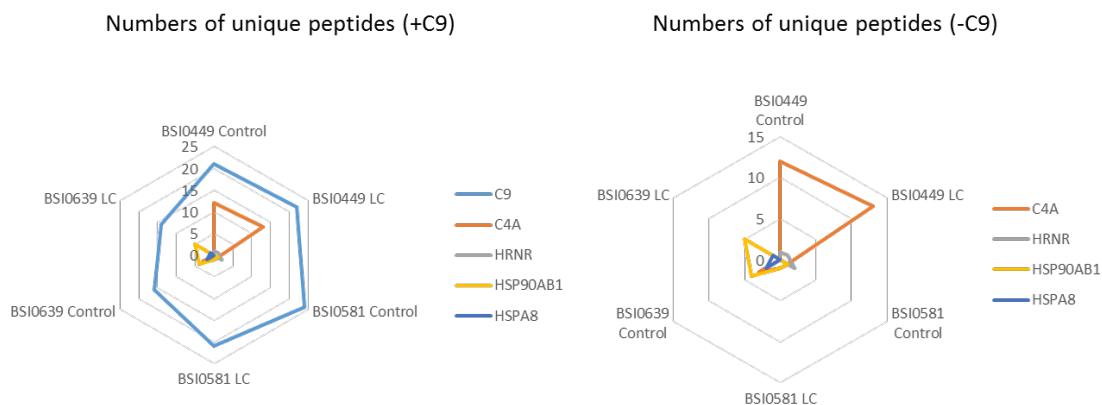
18. ábra: A kísérleteink során kapott és a PeptideAtlas-ban talált peptidek elhelyezkedése a gyűrűvé záródott C9 komplexen, 22 C9 alegység, formán (PDB: 5FMW) látható. (A kísérleteinkből származó peptidek sárga, lila és piros színekkel vannak jelölve, míg a PeptideAtlas-ban található peptidek zöld színnel vannak ábrázolva.)

A peptideket visszatérképeztük egy gyűrűvé zárult C9 szerkezetre is. A 18. ábra első felén láthatóak a kísérleteink során kapott peptidek, a második felében azok a peptidek melyek a PeptideAtlas-ban szerepelnek, de mi nem találtuk meg.

Mind a két szerkezeti képen jól látható, hogy felszínen lévő, más fehérjéhez kapcsolódási pontként szolgáló fehérjéket nem találtunk meg.

5.4.4. C9 asszociált plazmafehérjék

A fehérje komplexek dinamikusan változhatnak különböző fiziológiás állapotokban. Ezek a különböző fehérje-fehérje kölcsönhatás változások epitópokat takarhatnak el vagy tehetnek elérhetővé. Ennek vizsgálatára elemeztük a C9-cel asszociált fehérjéket. A C9-hez a kísérletek során összesen 78 különböző fehérje koprecipitálódott, különböző összetételben. Ezek közül kiválasztottuk azt a négyet, melyekben a kontroll és tüdőrákos mintában legalább két peptidnyi különbség volt a különböző anti-C9 mAb-okkal vizsgálva (5. táblázat). Radar diagramon (19. ábra) ábrázoltuk ezt a négy fehérjét C9-cel együtt, illetve anélkül.



19. ábra: A C9 fehérje, illetve a négy fehérje kiválasztott egyedi peptidjeinek eloszlása radar diagramon ábrázolva. Az ábra bal oldalán a C9 fehérjével, az ábra jobb oldalán a C9 fehérje nélkül [134].

5. táblázat: A táblázatban szerepel a C9 fehérje egyedi peptideinek száma, valamint az általunk kiválasztott négy fehérje egyedi peptideinek száma és lefedettsége a különböző MS mintákban. [134].

Minták	C9		C4A			HRNR			HSP90AB1			HSPA8		
	Egyedi peptid szám	Peptide Count	Egyedi peptid szám	Peptide Count	Fedettség %	Egyedi peptid szám	Peptide Count	Fedettség %	Egyedi peptid szám	Peptide Count	Fedettség %	Egyedi peptid szám	Peptide Count	Fedettség %
BSI0449 Ctrl	21	312	12	48	10,7	1	2	0,8	0	0	0	0	0	0
BSI0449 LC	22	509	13	64	13	1	4	0,8	0	0	0	0	0	0
BSI0581 Ctrl	24	491	3	1	1,3	2	7	1,7	1	4	1,9	0	0	0
BSI0581 LC	21	332	3	1	1,3	0	0	0	1	4	1,9	0	0	0
BSI0639 Ctrl	16	139	6	3	4,4	1	1	0,8	4	14	7,7	2	7	3,4
BSI0639 LC	14	135	0	0	0	0	0	0	5	14	9,8	1	2	1,9

A radar diagramról és a táblázatról is látható, hogy a plazma C9-hez a vizsgált koprecipitált fehérjék különböző mértékben asszociálódnak. A BSI0449 kontroll és LC minta is erősen C4A asszociált, míg a BSI0639 LC mintában nem találtunk C4A peptidet. A hornerint (HRNR) nem találtuk meg a BSI0581 és BSI0639 LC mintákban. HSP90AB1 peptideket nem találtunk a BSI0449-es mintákban, míg erősebben asszociált a BSI0639-es mintákkal. HSPA8 peptideket csak a BSI0639-es mintákban találtunk.

6. Megbeszélés

Az epitomika a munkacsoportunk által elsőként leírt omaikai tudomány, amely proteinek dinamikus epitóp változásait vizsgálja egészséges és különböző patológiás állapotokban. Extenzív és globális PEP technológiával a vizsgálható epitópok száma, biomarker értéke és funkció relevanciája szélesebb körben is kiterjeszhető lesz. Munkám az első lépés ebben az irányban.

Az eddigi felfedezett vérplazma epitomikai biomarkerek diagnosztikai célra vagy betegkövetésre is alkalmasak lehetnek. Nem jelentenek majd extra sugárterhelést a betegek számára, és kivitelezésük sem igényel nagyobb gépparkot és anyagi befektetést. Az eddigi LDCT-vel végzett klinikai szűrővizsgálatok alapján megállapítható, hogy a nagyszámú álpozitív eredmények csökkentése szükséges. Erre különböző rizikófaktorokat alkalmazva algoritmusokat lehet kidolgozni, bevethető a mesterséges intelligencia és mindez kiterjeszhető a biomarkerekre, illetve az ezeket is magába foglaló multivariáns index megközelítésekre.

Az általunk vizsgált C9 fehérje, a veleszületett immunrendszer komplement kaszkád részének az utolsó eleme, a terminális komplex része. A terminális komplexben polimerizálódik és csatlakozik az előzetes kialakult C5b-C6-C7-C8 komplexhez. A C9 a plazmában monomer formájában kering. A polimerizációtól a keringésben a clusterin és a vitronectin védi meg [138, 139].

A C9 fehérjét korábban már azonosították gyomor-, tüdő-, és végbélrák biomarkereként [140-142]. Ezekben a publikációkban csak a C9 fehérje mennyiségi jelenlétét vizsgálták.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatait alapján a QuantiPlasma mAb könyvtárból kiválasztottunk három olyan anti-C9 antitestet, melyek sbCIA vizsgálat alapján, különböző módon asszociálnak tüdőrákos plazma mintákkal [132]. A profilírozott epitópok között, volt, amelyik neutrálisan, pozitívan vagy negatívan asszociált a kísérletek során tüdőrákos plazma mintákkal.

Munkánk során a C9 eddig nem publikált epitóp függő molekuláris heterogenitását vizsgáltuk kontroll és tüdőrákos plazmamintákon. Megpróbáltuk megérteni a korábban felfedezett, eltérő asszociációt mutató, jelenség okait.

Először validáltuk az anti-C9 mAb-okat kereskedelmi forgalomban kapható C9 fehérjével. Ennek során Western blottal bebizonyosodott, hogy mind a három kiválasztott anti-C9 mAb felismeri a C9 fehérjét. Ugyan a kapott molekulásúly alatta volt az irodalmi értéknek, ezért feltételezzük, hogy degradáció [135] érte a tiszta C9-et vagy gyártás, vagy tárolás során. Miután validáltuk antitestjeinket, megvizsgáltuk az epitópok függetlenségét kompetitív ELISA módszerrel. A három vizsgált epitóp közel független egymástól, de a BSI449 epitóp ellenanyag kötése kismértékben befolyásolja a másik két epitóp elérhetőségét vagy/és struktúráját.

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

Két irányba folytattuk tovább a kísérleteket. Tömegspektrometriás vizsgálattal megvizsgáltuk a precipitált peptidek segítségével épített C9 molekula modelleket, a 415-ös pozíció N-glikozilációját, és a koprecipitált fehérjéket minden epitópra és mindkét mintatípusra vonatkozóan.

A C9-nek számos poszttranszlációs módosulását találtuk publikációkban [136, 137] és a Uniprot adatbázisban. Ezekből a módosulásokból mi csak a 415-ös helyen található N-glikozilációt találtuk meg, ezt viszont minden mintában. Ezt a pozíciót tartalmazó peptidet egy nem módosított, minden mintában jelenlévő C9 peptidhez normalizálva azt kaptuk, hogy ugyan ez a 415-ös pozícióban N-glikozilált peptid minden mintában jelen van, viszont más arányban. A BSI0449-es mintákban a kontroll és tüdőrákos mintákban közel azonos volt az arány, míg a BSI0581 és BSI0639 esetében közel 5x nagyobb volt az N-glikoziláltsági arány a kontroll javára. A koprecipitált fehérjéket vizsgálva megállapítottuk, hogy ezek aránya más

és más antitestenként, és kontroll – tüdőrák viszonylatban is. Ezek alapján arra következtetünk, hogy a C9 különböző proteoformáit találtuk meg a kiválasztott anti-C9 antitestekkel (6. táblázat). Bár az asszociáció más fehérjékkel nem tartozik a proteoformákat egymástól megkülönböztető faktorok közé, az egyszerűség kedvéért mégis az alábbi táblázatban együtt tárgyaljuk őket. Feltételezzük, hogy a 2a és 2b formák olyan variánsokat képviselnek, melyek stressz vagy malignus elváltozás hatására keletkeznek a sejtben. A C9 fehérje különböző helyeken is termelődhet [128, 129], akár ez is forrása lehet a különböző proteoformáinak.

	Epitóp / mAb	C4A asszociáció	C4A LC vs. Kontroll	HSP90AB1 asszociáció	HSP90AB1 LC vs. Kontroll	415 gly	415 gly LC vs. Kontroll
Proteoforma 1	BSI 449+	igen	nincs különbség, magas peptidszám	-	-	nincs különbség	LC neutralális
Proteoforma 2a	BSI 581+	igen	nincs különbség, alacsony peptidszám	igen	nincs különbség	különbség, magas a kontrollban	LC asszociált
Proteoforma 2b	BSI 581+	igen	nincs különbség, alacsony peptidszám	igen	nincs különbség	különbség, alacsony az LC mintákban	LC asszociált
Proteoforma 3a	BSI 639+	igen	csak a kontrollban	igen	nincs különbség	különbség, magas a kontrollban	LC asszociált
Proteoforma 3b	BSI 639+	nem	-	igen	nincs különbség	különbség, alacsony az LC mintákban	LC asszociált

6. táblázat: A feltételezett C9 proteoformák [134].

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

7. Összefoglalás

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

Korábban kutatásaink során, protein epitóp profilírozással végzett vizsgálatokban felfedeztük, hogy a fehérjék epitópjai eltérő módon asszociálhatnak tüdőrákos plazában az antitestekkel. Munkacsoportunk korábbi kutatásait folytatva, a C9 fehérje epitópjait vizsgáltam. Kiválasztottunk a QuantiPlasma könyvtárából három olyan anti-C9 antitestet (BSI0449, BSI0581, BSI0639), melyekkel eltérő módon asszociáltak az epitópok tüdőrákos mintákban (semlegesen, negatívan és pozitívan). A jelenség biokémiai okát vizsgáltam munkám során.

Az anti-C9 antitesteket először validáltuk Western blottal. Később vizsgáltuk a három C9 epitóp egymástól való függetlenségét. Az epitópok nagymértékben függetlenek voltak egymástól. Tömegspektrometriás módszerrel kontroll és tüdőrákos mintákból immunprecipitált minták C9 fehérjéit vizsgálva megállapítottuk, hogy a C9 peptid eloszlás közel azonos volt, ezért nem valószínű, hogy a különbségek oka a C9 szerkezetében lehet. Ezután a C9 koprecipitált fehérjéit elemeztük. A kiválasztott antitestjeinkkel immunoprecipitált mintákat SDS-PAGE-n vizsgáltuk. A kapott mintázat minden mintában közel azonos volt. Tömegspektrometriás módszerrel elemeztük a koprecipitált fehérjéket is. Olyan fehérjéket választottunk ki, amelyeknél a kontroll és tüdőrákos minták között legalább két peptidre vonatkozóan volt eltérés. Három olyan fehérjét találtunk, amelyek nem csak az antitestek között, hanem kontroll és tüdőrákos minták között is eltérést mutattak. A C4A erősen asszociált a BSI0449 mintákkal, a BSI0639-es tüdőrákos mintában nem volt jelen. A HSP90AB1 a BSI0639-es mintákkal asszociált erősen és a BSI0449-es mintákban nem volt jelen. A HSPA8 pedig csak a BSI0639-es mintákban volt jelen. A C9 fehérje 415-ös pozíciójában lévő N-glikozilációs heterogenitást találtuk. Annak ellenére, hogy jelen volt minden mintában, a 415-N-glikoziláció arányaiban mutatott eltérés kontroll és tüdőrákos mintákban a BSI0581 és BSI0639 epitópok pozitív feltételezett proteoformák esetében. Ezekben 5x több volt a glikozilált peptid a kontroll mintákban. A BSI0449 esetében a két állapot között nem volt eltérés.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a C9 fehérjének több proteoformája is van. Ezek a proteoformák különböző epitópokon keresztül vizsgálhatóak. A különböző proteoformáknak és a velük koprecipitált fehérjéknek többek között, jelentős biomarker értékük lehet tüdőrákban. Munkám elsőként nyújt biokémiai magyarázatot az epitóp megközelítés biológiai jelentőségére.

8. Summary

The technology development of our days allow for an increasingly sophisticated understanding of proteins. Describing the proteoforms of proteins and associating them with different states lead to a deeper understanding of protein functions. This knowledge can also be used to expand the biomarker function of proteins.

In our previous research, through protein epitope profiling studies, we discovered that protein epitopes can associate with lung cancer in distinct ways. Continuing the previous research of our workgroup, I investigated the epitopes of the C9 protein. We selected three anti-C9 antibodies (BSI0449, BSI0581, BSI0639) from the QuantiPlasma library, and found that the epitopes in lung cancer samples showed varying associations (neutral, negative and positive). During my work, I investigated the biochemical basis of this phenomenon.

We first validated the anti-C9 antibodies using Western blot. Subsequently, we examined the independence of the three epitopes from each other. The epitopes were largely independent of each other. Using mass spectrometry, we examined the C9 protein from immunoprecipitated samples of control and lung cancerous plasma. We found that the distribution of tryptic peptides was nearly identical, suggesting that the observed differences are unlikely to originate from the structural difference of C9 variants or proteoforms. Subsequently, we analyzed the co-precipitated proteins of C9. We examined the immunoprecipitated samples using SDS-PAGE with our selected antibodies. The obtained pattern was nearly identical in all samples. We also analyzed the co-precipitated proteins using mass spectrometry. We selected proteins that showed at least two peptide differences between the control and lung cancer samples. We then identified three proteins that exhibited differences not only among the antibodies but also between the control and lung cancer samples. C4A strongly associated with BSI0449 samples and it was absent in the BSI0639 lung cancer sample. HSP90AB1 exhibited a strong association with the BSI0639 samples and was absent in the BSI0449 samples. On the other hand, HSPA8 was present only in the BSI0639 samples. Investigating the N-glycans; at position 415 of C9, we found N-glycosylation in all samples. Although 415-glycosylation was present in all samples, there were differences in the ratio of the 415-N-glycosylation between control and lung cancer samples of BSI0581 and BSI0639. In these cases, the glycosylated peptide was about 5 times more abundant in the control samples. In case of BSI0449, there was no difference between the two states.

Our results suggest that the C9 protein has multiple proteoforms. These proteoforms can be examined through different epitopes. The various proteoforms and the co-precipitated proteins may hold biomarker potential and further biological understanding with respect to lung cancer.

My work is the first to provide molecular proof to demonstrate the biological value of epitope-based proteome analysis.

9. Új megállapítások

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

10. Irodalomjegyzék

1. Adler, I. Primary malignant growths of the lungs and bronchi. Longmans, Green, and Company, New York, 1912.
2. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **2021**, *71*, 209-49.
3. WHO. The top 10 causes of death. [Utoljára módosítva: 2020.12.09.] Elérhető: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [Letöltve: 2024.07.15]
4. Eurostat. Causes of death statistics. [Utoljára módosítva: 2024.03.24.] Elérhető: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Causes_of_death_statistics [Letöltve: 2024.07.15.]
5. Eurostat. Cancer statistics - specific cancers. [Utoljára módosítva: 2024.07.10.] Elérhető: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Cancer_statistics_-_specific_cancers#Lung_cancer [Letöltve: 2024.07.10.]
6. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Dyba, T.; Randi, G.; Bettio, M., et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European journal of cancer* **2018**, *103*, 356-387
7. Bogos, K.; Kiss, Z.; Gálffy, G.; Tamási, L.; Ostoros G.; Muller, V., et al. Revising incidence and mortality of lung cancer in Central-Europe: An epidemiology overview from Hungary. *Frontiers in oncology* **2019**, *9*, 1-8.
8. European Health Information Gateway. WHO Europe. Report on Autopsy Rate of for Hospital Deaths. [Utoljára módosítva: 2023.10.04.] Elérhető: https://gateway.euro.who.int/en/indicators/hfa_544-6400-autopsy-rate-for-hospital-deaths/visualizations/#id=19639&tab=graph [Letöltve: 2024.07.15.]
9. Karwinski, B.; Svendsen, E.; Hartveit, F. Clinically undiagnosed malignant tumours found at autopsy. *Apmis* **1990**, *98*, 496-500.
10. Nicholson, A.G.; Tsao, M.S.; Beasley, M.B.; Borczuk, A.C.; Brambilla, E.; Cooper, W.A.; et al. The 2021 WHO classification of lung tumors: impact of advances since 2015. *Journal of Thoracic Oncology* **2022**, *17*, 362-87.

11. Schabath, M.B.; Cote, M.L. Cancer progress and priorities: lung cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* **2019**, *28*, 1563-79.
12. Mackintosh, J.A.; Marshall, H.M.; Yang, I.A.; Bowman, R.V.; Fong, K.M. A retrospective study of volume doubling time in surgically resected non-small cell lung cancer. *Respirology* **2014**, *19*, 755-62.
13. Tan, W.; Jain, A.; Takano, A.; Newell, E.W.; Iyer, N.G.; Lim, W.; et al. Novel therapeutic targets on the horizon for lung cancer. *The Lancet Oncology* **2016**, *17*, 347-362.
14. Brierley, J.D.; Gospodarowicz, M.K.; Wittekind, C. TNM classification of malignant tumours. 8th edition, John Wiley & Sons, 2017, Oxford, UK.
15. Martincorena, I.; Raine, K.M.; Gerstung, M.; Dawson, K.J.; Haase, K.; Van Loo, P.; et al. Universal patterns of selection in cancer and somatic tissues. *Cell* **2017**, *171*, 1029-41.
16. Musolf, A.M.; Simpson, C.L.; De Andrade, M.; Mandal, D.; Gaba, C.; Yang, P.; et al. Familial lung cancer: a brief history from the earliest work to the most recent studies. *Genes* **2017**, *8*, 1-13.
17. Goldgar, D.E.; Easton, D.F.; Cannon-Albright, L.A.; Skolnick, M.H. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **1994**, *86*, 1600-8.
18. Jonsson, S.; Thorsteinsdottir, U.; Gudbjartsson, D.F.; Jonsson, H.H.; Kristjansson, K.; Arnason, S.; et al. Familial risk of lung carcinoma in the Icelandic population. *Jama* **2004**, *292*, 2977-83.
19. Sellers, T.A.; Bailey-Wilson, J.E.; Elston, R.C.; Wilson A.F.; Elston, G.Z.; Ooi, W.L.; et al. Evidence for mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **1990**, *82*, 1272-9.
20. Hill, W.; Lim, E.L.; Weeden, C.E.; Lee, C.; Augustine, M.; Chen, K.; et al. Lung adenocarcinoma promotion by air pollutants. *Nature* **2023**, *616*, 159-67.
21. Yoshida, K.; Gowers, K.H.; Lee-Six, H.; Chandrasekharan, D.P.; Coorens, T.; Maughan, E.F.; et al. Tobacco smoking and somatic mutations in human bronchial epithelium. *Nature* **2020**, *578*, 266-72.
22. Thorgeirsson, T.E.; Geller, F.; Sulem, P.; Rafnar, T.; Wiste, A.; Magnusson, K.P.; et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* **2008**, *452*, 638-42.

23. Hung, R.J.; McKay, J.D.; Gaborieau, V.; Boffetta, P.; Hashibe, M.; Zaridze, D.; et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* **2008**, *452*, 633-7.
24. Paez, J.G.; Janne, P.A., Lee, J.C.; Tracy, S.; Greulich, H.; Gabriel, S.; et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **2004**, *304*, 1497-1500.
25. Kwak, E.L.; Bang, Y.; Camidge, D.R.; Shaw, A.T.; Solomon, B. Maki, R.G.; et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine* **2010**, *363*, 1693-1703.
26. Bergethon, K.; Shaw, A.T.; Ou, S.H.; Katayama, R.; Lovly, C.M.; McDonald, N.T.; et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *Journal of clinical oncology* **2012**, *30*, 863-870.
27. Drilon, A.; Wang, L.; Hasanovic, A.; Suehara, Y.; Lipson, D.; Stephens, P.; et al. Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discovery* **2013**, *3*, 630-635.
28. Onozato, R.; Kosaka, T.; Kuwano, H.; Sekido, Y.; Yatabe, Y., Mitsudomi, T. Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers. *Journal of Thoracic Oncology* **2009**, *4*, 5-11.
29. Heist, R.S.; Mino-Kenudson, M.; Sequist, L.V.; Tammireddy, S.; Morrissey, L.; Christiani, D.C.; et al. FGFR1 amplification in squamous cell carcinoma of the lung. *Journal of thoracic oncology* **2012**, *7*, 1775-1780.
30. Karachaliou, N.; Mayo, C., Costa, C.; Magrí, I., Gimenez-Capitan, A.; Molina-Vila, M.A.; et al. KRAS mutations in lung cancer. *Clinical lung cancer* **2013**, *14*, 205-214.
31. Kobayashi, M.; Sonobe, M.; Takahashi, T.; Yoshizawa, A.; Ishikawa, M.; Kikuchi, R.; et al. Clinical significance of BRAF gene mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Research* **2011**, *31*, 4619-4623.
32. Takahashi, T.; Nau, M.M.; Chiba, I.; Birrer, M.J.; Rosenberg RK, Vinocour M, et al. P53: a Frequent Target for Genetic Abnormalities in Lung Cancer. *Science* **1989**, *246*, 491-494.
33. Sanchez-Cespedes, M.; Parrella, P.; Esteller, M.; Nomoto, S.; Trink, B.; Engles, J.M.; et al. Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Research* **2002**, *62*, 3659-3662.

34. Shapiro, G.I.; Edwards, C.D.; Kobzik, L.; Godleski, J.; Richards, W., Sugarbaker, D.J.; et al. Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Research* **1995**, *55*, 505-509.
35. Singh, A.; Misra, V.; Thimmulappa, R.K.; Lee, H.; Ames, S.; Hoque, M.O.; et al. Dysfunctional KEAP1–NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Medicine* **2006**, *3*, 1865-1876.
36. Medina, P.P.; Romero, O.A.; Kohno, T.; Montuenga, L.M.; Pio, R.; Yokota, J.; et al. Frequent BRG1/SMARCA4–inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Human mutation* **2008**, *29*, 617-622.
37. Wood, S.L.; Pernemalm, M.; Crosbie, P.A.; Whetton, A.D. Molecular histology of lung cancer: from targets to treatments. *Cancer treatment reviews* **2015**, *41*, 361-75.
38. Xu, J.; Tian, L.; Qi, W.; Lv, Q.; Wang, T. Advancements in NSCLC: From Pathophysiological Insights to Targeted Treatments. *American Journal of Clinical Oncology* **2024**, *47*, 291-303.
39. Shankar, A.; Dubey, A.; Saini, D.; Singh, M.; Prasad, C.P., Roy, S., et al. Environmental and occupational determinants of lung cancer. *Translational lung cancer research* **2019**, *8*, 31-49.
40. Krewski, D.; Lubin, J.H.; Zielinski, J.M.; Alavanja, M.; Catalan, V.S.; William Field, R.; et al. A combined analysis of North American case-control studies of residential radon and lung cancer. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **2006**, *69*, 533-597.
41. EPA: Health risk of radon. [Utoljára mdsítva: 2024.02.27.] Elérhető: <https://www.epa.gov/radon/health-risk-radon> [Letöltve: 2024.07.15.]
42. Zhang, Z.; Zhu, D., Cui, B.; Ding, R.; Shi, X.; He, P. Association between particulate matter air pollution and lung cancer. *Thorax* **2020**, *75*, 85-7.
43. Burnett, R.T.; Pope, C.A.; Ezzati, M.; Olives, C.; Lim, S.S.; Mehta, S.; et al. An integrated risk function for estimating the global burden of disease attributable to ambient fine particulate matter exposure. *Environ Health Perspect* **2014**, *122*, 397-403.
44. Silverman, D.T. Diesel exhaust causes lung cancer: now what? *Occupational and environmental medicine* **2017**, *74*, 233-4.
45. Kogevinas, M.; Becher, H.; Benn, T.; Bertazzi, P.A.; Boffetta, P.; Bueno-de-Mesquita, H.; et al. Cancer mortality in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and dioxins an expanded and updated international cohort study. *American journal of epidemiology* **1997**, *145*, 1061-1075.

46. National Center for Environmental Assessment. Office of Research and Development (NCEA). US Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS) on Asbestos. [Utoljára módosítva 2014.08.12.] Elérhető: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/1026_summary.pdf [Letöltve: 2024.07.15.]
47. Hodgson, J.T.; Darnton, A. The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. *Annals of occupational hygiene* **2000**, *44*, 565-601.
48. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **2018**, *68*, 394-424.
49. Hart, S.; Fischer, O.M.; Ullrich, A. Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer research* **2004**, *64*, 1943-1950.
50. Zhu, L.X.; Sharma, S.; Stolina, M.; Gardner, B.; Roth, M.D.; Tashkin, D.P.; et al. Δ -9-Tetrahydrocannabinol inhibits antitumor immunity by a CB2 receptor-mediated, cytokine-dependent pathway. *The Journal of Immunology* **2000**, *165*, 373-80.
51. Mehra, R.; Moore, B.A.; Crothers, K.; Tetrault, J.; Fiellin, D.A. The association between marijuana smoking and lung cancer: a systematic review. *Archives of internal medicine* **2006**, *166*, 1359-1367.
52. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. [Utoljára módosítva: 2024.07.05] Elérhető: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/> [Letöltve: 2024.07.15.]
53. Mattson, M.E.; Pollack, E.S.; Cullen, J.W. What are the odds that smoking will kill you? *American journal of public health* **1987**, *77*, 425-31.
54. US Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service. In: Summary of the reports of Surgeon General's Advisory Committee on smoking and health. Smoking and health: Report of the advisory committee to the surgeon general of the Public Health Service. 1964, Washington, USA.
55. Jeon, J.; Holford, T.R.; Levy, D.T.; Feuer, E.J.; Cao, P.; Tam, J.; et al. Smoking and lung cancer mortality in the United States from 2015 to 2065: a comparative modeling approach. *Annals of internal medicine* **2018**, *169*, 684-93.

56. World Health Organization. Tobacco use falling: WHO urges countries to invest in helping more people to quit tobacco. [Utoljára módosítva: 2021.11.16] Elérhető: <https://www.who.int/news/item/16-11-2021-tobacco-use-falling-who-urges-countries-to-invest-in-helping-more-people-to-quit-tobacco> [Letöltve: 2024.07.15.]
57. GOLD. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease - 2018 Report. Elérhető: http://goldcopd.org/wp-content/uploads/2017/11/GOLD-2018-v6.0-FINAL-revised-20-Nov_WMS.pdf [Letöltve:2024.07.15.]
58. Burney, P.G.; Patel, J.; Newson, R.; Minelli, C.; Naghav, M. Global and regional trends in COPD mortality, 1990–2010. *European Respiratory Journal*. **2015**, *45*, 1239-47.
59. Young, R.P.; Hopkins, R.J. Link between COPD and lung cancer. *Respiratory medicine* **2010**, *104*, 758-9.
60. Clément-Duchêne, C.; Vignaud, J.M.; Stoufflet, A.; Bertrand, O.; Gislard, A.; Thiberville, L.; et al. Characteristics of never smoker lung cancer including environmental and occupational risk factors. *Lung Cancer* **2010**, *67*, 144-50.
61. Reuters. South African government sued over coal and industrial air pollution. [Utoljára módosítva: 2019.06.10.] Elérhető: <https://www.reuters.com/article/us-safrica-coal/south-african-government-sued-over-coal-and-industrial-air-pollution-idUKKCN1TB1Q7> [Letöltve: 2024.07.15.]
62. American Cancer Society: Lung Cancer Survival Rates. [Utoljára módosítva: 2024.01.24.] Elérhető: <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html> [Letöltve: 2024.07.15.]
63. Fujikawa, A.; Takiguchi, Y.; Mizuno, S.; Uruma, T.; Suzuki, K.; Nagao, K.; et al. Lung cancer screening—comparison of computed tomography and X-ray. *Lung Cancer* **2008**, *61*, 195-201.
64. Krist, A.H.; Davidson, K.W.; Mangione, C.M.; Barry, M.J.; Cabana, M.; Caughey, A.B.; et al. Screening for lung cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Jama* **2021**, *325*, 962-70.
65. Pozzessere, C.; von Garnier, C.; Beigelman-Aubry, C. Radiation exposure to low-dose computed tomography for lung cancer screening: should we be concerned? *Tomography* **2023**, *9*, 166-177.
66. National Lung Screening Trial Research Team. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *New England Journal of Medicine* **2011**, *365*, 395-409.

67. van Klaveren, R.J.; Oudkerk, M.; Prokop, M.; Scholten, E.T.; Nackaerts, K.; Vernhout, R.; et al. Management of lung nodules detected by volume CT scanning. *New England Journal of Medicine* **2009**, *361*, 2221-9.
68. Infante, M.; Cavuto, S.; Lutman, F.R.; Brambilla, G.; Chiesa, G.; Ceresoli, G.; et al. A randomized study of lung cancer screening with spiral computed tomography: three-year results from the DANTE trial. *American journal of respiratory and critical care medicine* **2009**, *180*, 445-53.
69. Pegna, A.L.; Picozzi, G.; Mascalchi, M.; Carozzi, F.M.; Carrozzi, L.; Comin, C.; et al. Design, recruitment and baseline results of the ITALUNG trial for lung cancer screening with low-dose CT. *Lung cancer* **2009**, *64*, 34-40.
70. Pedersen, J.H.; Ashraf, H.; Dirksen, A.; Bach, K.; Hansen, H.; Toennesen, P.; et al. The Danish randomized lung cancer CT screening trial—overall design and results of the prevalence round. *Journal of Thoracic Oncology* **2009**, *4*, 608-14.
71. Cassidy, A.; Myles, J.P.; van Tongeren, M.; Page, R.D.; Liloglou, T.; Duffy, S.W.; et al. The LLP risk model: an individual risk prediction model for lung cancer. *British journal of cancer* **2008**, *98*, 270-6.
72. Baldwin, D.R.; Duffy, S.W.; Wald, N.J.; Page, R.; Hansell, D.M.; Field, J.K. UK Lung Screen (UKLS) nodule management protocol: modelling of a single screen randomised controlled trial of low-dose CT screening for lung cancer. *Thorax* **2011**, *66*, 308-13.
73. Field, J.K.; Duffy, S.W.; Baldwin, D.R.; Brain, K.E.; Devaraj, A.; Eisen, T.; et al. The UK Lung Cancer Screening Trial: a pilot randomised controlled trial of low-dose computed tomography screening for the early detection of lung cancer. *Health technology assessment* **2016**, *20*, 1.
74. Becker, N.; Motsch, E.; Trotter, A.; Heussel, C.P.; Dienemann, H.; Schnabel, P.A.; et al. Lung cancer mortality reduction by LDCT screening—Results from the randomized German LUSI trial. *International journal of cancer* **2020**, *146*, 1503-13.
75. Poon, C.; Haderi, A.; Roediger, A.; Yuan, M. Should we screen for lung cancer? A 10-country analysis identifying key decision-making factors. *Health Policy* **2022**, *126*, 879-888.
76. Field, J.K.; Vulkan, D.; Davies, M.P.; Baldwin, D.R.; Brain, K.E.; Devaraj, A.; et al. Lung cancer mortality reduction by LDCT screening: UKLS randomised trial results and international meta-analysis. *The Lancet Regional Health—Europe* **2021**, *10*, 1-11.
77. The pioneering Strengthening the screening of Lung Cancer in Europe (SOLACE) project has now been launched. [Utoljára módosítva: 2023.04.18.] Elérhető:

2024.07.15.]

78. Kerpel-Fronius, A.; Monostori, Z.; Solymosi, D.; Markóczy, Z.; Rojkó, L.; Kovács, G. Kezdeti tapasztalatok a HUNCHEST–alacsony dózisé CT-tüdőrákszűrési pilotprogrammal. *Orvosi Hetilap* **2018**, *159*, 1741-6.
79. Kerpel-Fronius, A.; Megyesfalvi, Z.; Markóczy, Z.; Solymosi, D.; Csányi, P.; Tisza, J.; et al. HUNCHEST-II contributes to a shift to earlier-stage lung cancer detection: final results of a nationwide screening program. *European Radiology* **2024**, *34*, 3462-3470.
80. Wu, Z.; Tan, F.; Xie, Y.; Tang, W.; Wang, F.; Xu, Y.; et al. A strategy to reduce the false-positive rate after low-dose computed tomography in lung cancer screening: A multicenter prospective cohort study. *Cancer Medicine* **2023**, *12*, 14781-14793.
81. Grenier, P.A.; Brun, A.L.; Mellot, F. The potential role of artificial intelligence in lung cancer screening using low-dose computed tomography. *Diagnostics* **2022**, *12*, 1-13.
82. Cavion, C.C.; Altmayer, S.; Forte, G.C.; Feijó Andrade, R.G.; Hochegger, D.Q.D.R.; Zaguini Francisco, M.; et al. Diagnostic Performance of MRI for the Detection of Pulmonary Nodules: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Radiology: Cardiothoracic Imaging* **2024**, *6*, 230241.
83. Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers—a general review. *Current protocols in pharmacology* **2017**, *76*, 9-23.
84. Amur, S.; LaVange, L.; Zineh, I.; Buckman-Garner, S.; Woodcock, J. Biomarker qualification: toward a multiple stakeholder framework for biomarker development, regulatory acceptance, and utilization. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2015**, *98*, 34-46.
85. Pepe, M.S.; Etzioni, R.; Feng, Z.; Potter, J.D.; Thompson, M.L.; Thornquist, M.; et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **2001**, *93*, 1054-61.
86. Ray, P.; Manach, Y.L.; Riou, B.; Houle, T.T.; Warner, D.S. Statistical evaluation of a biomarker. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* **2010**, *112*, 1023-40.
87. Bence-Jones, H. Papers on Chemical Pathology. Lecture III. *Lancet* **1847**, *2*, 269-272.
88. Foster, M. Notes on amylolytic ferments. *Journal of Anatomy and Physiology* **1867**, *1*, 107-113.

89. Engvall, E.; Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *The Journal of Immunology* **1972**, *109*, 129-135.
90. Owens, S.M. Monoclonal antibodies. In: *Biologics to Treat Substance Use Disorders* 2016, Springer, Switzerland.
91. Okamura, K.; Takayama, K.; Izumi, M.; Harada, T.; Furuyama, K.; Nakanishi, Y. Diagnostic value of CEA and CYFRA 21-1 tumor markers in primary lung cancer. *Lung cancer* **2013**, *80*, 45-9.
92. Arrieta, O.; Villarreal-Garza, C.; Martínez-Barrera, L.; Morales, M.; Dorantes-Gallareta, Y.; Peña-Curiel, O.; et al. Usefulness of serum carcinoembryonic antigen (CEA) in evaluating response to chemotherapy in patients with advanced non small-cell lung cancer: a prospective cohort study. *BMC cancer* **2013**, *13*, 1-7.
93. Greenberg, A.K.; Lee, M.S. Biomarkers for lung cancer: clinical uses. *Current opinion in pulmonary medicine* **2007**, *13*, 249-55.
94. Wang, B.; He, Y.J.; Tian, Y.X.; Yang, R.N.; Zhu, Y.R.; Qiu, H. Clinical utility of haptoglobin in combination with CEA, NSE and CYFRA21-1 for diagnosis of lung cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention* **2014**, *15*, 9611-4.
95. Kim, H.R.; Oh, I.J.; Shin, M.G.; Park, J.S.; Choi, H.J.; Ban, H.J.; et al. Plasma proGRP concentration is sensitive and specific for discriminating small cell lung cancer from nonmalignant conditions or non-small cell lung cancer. *Journal of Korean Medical Science* **2011**, *26*, 625.
96. Miura, N.; Nakamura, H.; Sato, R.; Tsukamoto, T.; Harada, T.; Takahashi, S.; et al. Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer. *Cancer science* **2006**, *97*, 1366-73.
97. Cho, W.C. Promises and challenges in developing miRNA as a molecular diagnostic tool for lung cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **2011**, *11*, 763-6.
98. Rykova, E.Y.; Ponomaryova, A.A.; Zaporozhchenko, I.A.; Vlassov, V.V.; Cherdyntseva, N.V.; Laktionov, P.P. Circulating DNA-based lung cancer diagnostics and follow-up: looking for epigenetic markers. *Translational Cancer Research* **2018**, *7*, S153-70.
99. Qi, S.A.; Wu, Q.; Chen, Z.; Zhang, W.; Zhou, Y.; Mao, K.; et al. High-resolution metabolomic biomarkers for lung cancer diagnosis and prognosis. *Scientific Reports* **2021**, *11*, 11805.

100. Sun, P.D.; Foster, C.E.; Boyington, J.C. Overview of protein structural and functional folds. *Current protocols in protein science* **2004**, *35*, 1-189
101. Thorvaldsen, S.; Ytterstad, E. Environmental adaptation of proteins: Regression models with simple physicochemical properties. *Computational Biology and Chemistry* **2009**, *33*, 351-6.
102. Breker, M.; Gymrek, M.; Moldavski, O.; Schuldiner, M. LoQAtE—Localization and Quantitation Atlas of the yeast proteome. A new tool for multiparametric dissection of single-protein behavior in response to biological perturbations in yeast. *Nucleic acids research* **2014**, *42*, 726-30.
103. Jungblut, P.R.; Holzhütter, H.G.; Apweiler, R.; Schlüter, H. The speciation of the proteome. *Chemistry Central Journal* **2008**, *2*, 1-10.
104. Ponomarenko, E.A.; Poverennaya, E.V.; Ilgisonis, E.V.; Pyatnitskiy, M.A.; Kopylov, A.T.; Zgoda, et al. The size of the human proteome: the width and depth. *International journal of analytical chemistry* **2016**, *2016*, 1-7.
105. Aebersold, R.; Agar, J.N.; Amster, I.J.; Baker, M.S.; Bertozzi, C.R.; Boja, E.S.; et al. How many human proteoforms are there? *Nature chemical biology* **2018**, *14*, 206-14.
106. Kochetov, A.V.; Sarai, A.; Rogozin, I.B.; Shumny, V.K.; Kolchanov, N.A. The role of alternative translation start sites in the generation of human protein diversity. *Molecular Genetics and Genomics* **2005**, *273*, 491-496.
107. Palma, M.; Lejeune, F., 2021. Deciphering the molecular mechanism of stop codon readthrough. *Biological Reviews* **2021**, *96*, 310-329.
108. Sinitcyn, P.; Richards, A.L.; Weatheritt, R.J.; Brademan, D.R.; Marx, H.; Shishkova, E.; et al. Global detection of human variants and isoforms by deep proteome sequencing. *Nature Biotechnology* **2023**, *14*, 206-14.
109. Sachidanandam, R.; Weissman, D.; Schmidt, S.C.; Kakol, J. M.; Stein, L.D.; Marth G.; et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* **2001**, *409*, 928-33.
110. Walsh, C.T.; Garneau-Tsodikova, S.; Gatto, G.J. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 7342-72.
111. Sorokin, A.V.; Kim, E.R.; Ovchinnikov, L.P. Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Moscow)* **2009**, *74*, 1411-42.
112. Carbonara, K.; Andonovski, M.; Coorssen, J.R. Proteomes are of proteoforms: embracing the complexity. *Proteomes* **2021**, *9*, 1-38.

113. Smith, L.M.; Agar, J.N.; Chamot-Rooke, J.; Danis, P.O.; Ge, Y.; Loo, J.A.; et al. The human proteoform project: defining the human proteome. *Science advances* **2021**, *7*, 1-8.
114. Van Regenmortel, M.H. The concept and operational definition of protein epitopes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* **1989**, *323*, 451-66.
115. Flierman, R.; Daha, M.R. The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology* **2007**, *212*, 363-70.
116. Markiewski, M.M.; DeAngelis, R.A.; Strey, C.W.; Foukas, P.G.; Gerard, C.; Gerard, N.; et al. The regulation of liver cell survival by complement. *The journal of Immunology* **2009**, *182*, 5412-8.
117. Sahu, S.K.; Ozantürk, A.N.; Kulkarni, D.H.; Ma, L.; Barve, R.A.; Dannull, L.; et al. Lung epithelial cell-derived C3 protects against pneumonia-induced lung injury. *Science immunology* **2023**, *8*, 1-19.
118. Zhang, X.; Kimura, Y.; Fang, C.; Zhou, L.; Sfyroera, G.; Lambris, J.D.; et al. Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. *Blood* **2007**, *110*, 228-36.
119. Dempsey, P.W.; Allison, M.E.; Akkaraju, S.; Goodnow, C.C.; Fearon, D.T. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* **1996**, *271*, 348-50.
120. Kemper, C.; Atkinson, J.P. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **2007**, *7*, 9-18.
121. Merle, N.S.; Church, S.E.; Fremeaux-Bacchi, V.; Roumenina, L.T. Complement system part I—molecular mechanisms of activation and regulation. *Frontiers in immunology* **2015**, *6*, 1-30.
122. Murphy, K.; Weaver, C.; Berg, L. The complement system and innate immunity. In: Twitchell B, Bressack CB eds. *Janeway's Immunobiology 10th*, New York: W. W. Norton & Company, Inc., 2022; 169-215.
123. Chen, C.B.; Wallis, R. Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 26058-65.
124. Barnum, S.R. C4a: an anaphylatoxin in name only. *Journal of innate immunity* **2015**, *7*, 333-9.

125. Nilsson, S.C.; Sim, R.B.; Lea, S.M.; Fremeaux-Bacchi, V.; Blom, A.M. Complement factor I in health and disease. *Molecular immunology* **2011**, *48*, 1611-20.
126. Dudkina, N.V.; Spicer, B.A.; Reboul, C.F.; Conroy, P.J.; Lukoyanova, N.; Elmlund, H.; et al. Structure of the poly-C9 component of the complement membrane attack complex. *Nature communications* **2016**, *7*, 1-6.
127. Hadders, M.A.; Bubeck, D.; Roversi, P.; Hakobyan, S.; Forneris, F.; Morgan, B.P.; et al. Assembly and regulation of the membrane attack complex based on structures of C5b6 and sC5b9. *Cell reports* **2012**, *1*, 200-7.
128. Zhou, Z.; Xu, M.J., Gao, B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cellular & molecular immunology* **2016**, *13*, 301-15.
129. Lubbers, R.; Van Essen, M.F.; Van Kooten, C.; Trouw, L.A. Production of complement components by cells of the immune system. *Clinical & Experimental Immunology* **2017**, *188*, 183-94.
130. Álvarez, M.B.; Edfors, F.; von Feilitzen, K.; Zwahlen, M.; Mardinoglu, A.; Edqvist, P.H.; et al. Next generation pan-cancer blood proteome profiling using proximity extension assay. *Nature Communications* **2023**, *14*, 4308.
131. Lázár, J.; Kovács, A.; Tornyai, I.; Takács, L.; Kurucz I. Detection of leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 containing immunocomplexes in the plasma of lung cancer patients with epitope-specific mAbs. *Cancer Biomarkers* **2022**, *34*, 113-22.
132. Lazar, J.; Antal-Szalmas, P.; Kurucz, I.; Ferenczi, A.; Jozsi, M.; Tornyai, I.; et al. Large scale plasma proteome epitome profiling is an efficient tool for the discovery of cancer biomarkers. *Molecular & Cellular Proteomics* **2023**, *22*, 1-20.
133. Guergova-Kuras, M.; Kurucz, I.; Hempel, W.; Tardieu, N.; Kadas, J.; Malderez-Bloes, C.; et al. Discovery of lung cancer biomarkers by profiling the plasma proteome with monoclonal antibody libraries. *Molecular & Cellular Proteomics* **2011**, *10*, 1-14.
134. Tornyai, I.; Lazar, J.; Pettko-Szandtner, A.; Hunyadi-Gulyas, E.; Takacs, L. Epitomics: Analysis of Plasma C9 Epitope Heterogeneity in the Plasma of Lung Cancer Patients and Control Subjects. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24*, 14359.
135. Stanley, K.K; Kocher, H.P.; Luzio, J.P.; Jackson, P.; Tschopp, J. The sequence and topology of human complement component C9. *EMBO Journal* **1985**, *4*, 375-82.
136. Franc, V.; Yang, Y.; Heck, A.J. Proteoform profile mapping of the human serum complement component C9 revealing unexpected new features of N-, O-, and C-glycosylation. *Analytical chemistry* **2017**, *89*, 3483-91.

137. Yang, W.; Ao, M.; Hu, Y.; Li, Q.K.; Zhang, H. Mapping the O-glycoproteome using site-specific extraction of O-linked glycopeptides (EXoO). *Molecular systems biology* **2018**, *14*, 1-12.
138. Tschopp, J.; Chonn, A.; Hertig, S.; French, L.E. Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. *Journal of immunology* **1993**, *151*, 2159-65.
139. Menny, A.; Lukassen, M.V.; Couves, E.C.; Franc, V.; Heck, A.J.; Bubeck, D. Structural basis of soluble membrane attack complex packaging for clearance. *Nature Communications* **2021**, *12*, 1-11.
140. Chong, P.K.; Lee, H.; Loh, M.C.; Choong, L.Y.; Lin, Q.; So, J.B.; et al. Upregulation of plasma C9 protein in gastric cancer patients. *Proteomics* **2010**, *10*, 3210-21.
141. Narayanasamy, A.; Ahn, J.M.; Sung, H.J.; Kong, D.H.; Ha, K.S.; Lee, S.Y.; et al. Fucosylated glycoproteomic approach to identify a complement component 9 associated with squamous cell lung cancer (SQLC). *Journal of proteomics* **2011**, *74*, 2948-58.
142. Chantaraamporn, J.; Champattanachai, V.; Khongmanee, A.; Verathamjamras, C.; Prasongsook, N.; Mingkwan, K.; et al. Glycoproteomic analysis reveals aberrant expression of complement C9 and fibronectin in the plasma of patients with colorectal cancer. *Proteomes* **2020**, *8*, 1-19.

11. Tárgyszavak

Tárgyszavak: epitomika, komplement C9, epitóp profilírozás, epitóp heterogenitás, proteoformák, biomarker, tüdőrák

Keywords: epitomics, complement C9, epitope profiling, epitope heterogeneity, proteoforms, biomarker, lung cancer

12. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



Nyilvántartási szám: DEENK/367/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 53,2

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

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

Debrecen, 2024.06.17.

