

**Multiplex immunfenotipizálás krónikus obstruktív tüdőbetegségben és nem
kissejtes tüdőrákban**

Ph.D. értekezés

Gémes Nikolett

Témavezető: Dr. Szebeni Gábor János

Tudományos főmunkatárs

HUN-REN, Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

HUN-REN, Szegedi Biológiai Kutatóközpont



Szeged

2024

Tartalomjegyzék

I.	Rövidítések jegyzéke.....	4
II.	Bevezetés.....	7
II.1	Krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD)	10
II.1.1	A COPD tünetei.....	10
II.1.2	A COPD diagnosztikája.....	11
II.1.3	COPD és a gyulladás kapcsolata	11
II.1.4	A COPD epigenetikai vonatkozásai	12
II.2	Nem kissejtes tüdőrák (NSCLC).....	13
II.2.1	Az NSCLC genetikai altípusai.....	14
II.2.2	A tüdőrák epigenetikai szabályozása	15
II.3	COPD és a tüdőrák kapcsolata, molekuláris mechanizmusai	16
II.4	Technikai háttér.....	17
II.4.1	Egysejt-tömegcitometria (CyTOF)	17
II.4.2	Fluoreszcens aktivált sejtszortolás (FACS)	18
II.4.3	Luminex xMAP (MAGPIX®) technológia	19
II.4.4	MACE RNS szekvenálás:.....	21
III.	Célkitűzések.....	22
IV.	Anyagok és módszerek:	23
IV.1	Mintagyűjtés, etikai nyilatkozat	23
IV.2	Vizsgálati csoportok meghatározása CyTOF és Luminex méréshez.....	23
IV.3	Perifériás mononukleáris sejtek és vérplazma izolálás	24
IV.4	Sejtek felolvasztása CyTOF kísérletekhez.....	24
IV.5	PBMC minták antitest jelölése CyTOF kísérletekhez	25
IV.6	CyTOF mérés	26
IV.7	CyTOF adatfeldolgozás	27
IV.8	Sejtszortolás	29
IV.9	Minta előkészítés RNS szekvenáláshoz	30
IV.10	Plazmafehérjék kvantitatív meghatározása	30
IV.11	Minták csoportosítása a plazmafehérje koncentrációk alapján	31
IV.12	Statisztikai analízis	32
V.	Eredmények.....	33
V.1	Egysejt-tömegcitometriás multiplex immunfenotipizás terápia naiv, dohányos COPD-s és NSCL-s betegekben és dohányos kontrollokon	33
V.1.1	Fő immunsejt populációk.....	35
V.1.1.1	T-sejtek.....	36

V.1.1.2	NKT-sejtek:.....	42
V.1.1.3	NK-sejtek:	43
V.1.1.4	B-sejtek	45
V.1.1.5	Plazmablasztok:.....	47
V.1.1.6	Monociták:	48
V.1.1.7	CD11c ^{dim} sejtek:.....	49
V.2	A CD4+ EM és CD4+ CM T-sejtek transzkriptomikai vizsgálata	51
V.3	Immuno-onkológiai ellenőrzőpont mediátorok meghatározása vérplazma mintából.....	52
VI.	Diszkusszió	57
VII.	Irodalomjegyzék	61
VIII.	Összefoglaló.....	69
IX.	Summary	73
X.	Publikációs lista.....	77
XI.	Köszönetnyilvánítás.....	79

I. Rövidítések jegyzéke

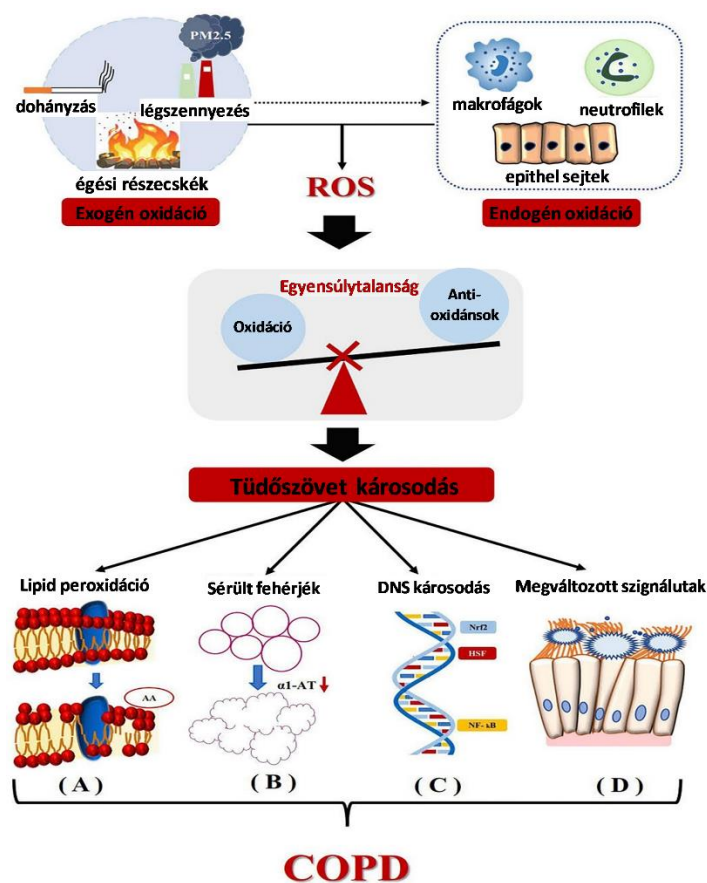
ACK	ammonium-chlorid-potassum	ammonium-klorid-kálium
AKT	protein kinase B	protein kináz B
ALK	anaplastic lymphoma kinase	anaplasztikus limfóma kináz
ANOVA	analysis of variance	variancia analízis
BAL	bronchoalveolar lavage	bronchoalveoláris mosás
BMP-4	bone morphogenic protein 4	csontmorfogénikus fehérje 4
BRAF	proto-oncogene B-Raf	protoonkogén B-Raf
CCR4	CC motif chemokine receptor 4	CC-motívumú kemokin receptor 4
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2a	ciklin-függő kináz inhibitor 2a
COPD	chronic obstructive lung disease	krónikus obstrukatív tüdőbetegség
CXCL1	CXC-motif chemokine ligand 1	CXC-motívumú kemokin ligand 1
CXCR3	CXC-motif chemokine receptor 3	CXC-motívumú kemokin receptor 3
CytoF	cytometry by time of flight	repülési idő alapú citometria
DMSO	dimethyl-sulfoxide	dimetil-szulfoxid
DNMT	DNA-methyltransferase	DNS-metiltranszferáz
E2F	early region 2 binding factor	korai régió kötő faktor 2
EGFR	epidermal growth factor receptor	epidermális növekedési faktor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	enzim-kötött immunoszorbens vizsgálat
EMT	epithelial–mesenchymal transition	epitheliális–mezenchimális átmenet
ERK	extracellular signal-regulated kinase	extracelluláris szignál-szabályozott kináz
FACS	fluorescence activated cell sorting	fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás
FBS	fetal bovine serum	magzati szarvasmarha szérum
FCS	flow cytometry standard	áramlási citometriai szabvány
FDR	false discovery rate	hamis felfedezési arány
FEV	forced expiratory volume	erőltetett kilégzési térfogat
FlowSOM	flow self-organizing map	áramlási önszerveződő térkép
GATA4	GATA binding protein 4	GATA-kötő fehérje 4
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor	gliasejtvonal eredetű neurotrofikus faktor
GITRL	glucocorticoid-induced TNF-related ligand	glükokortikoid-indukált TNF-kapcsolt ligand
GOLD	global initiative for chronic obstructive lung disease	globális kezdeményezés a krónikus tüdőbetegségekre

GST	glutathione-S-transferase	glutathion-S-transzferáz
HER-2	human epidermal growth factor receptor 2	humán epidermális növekedési faktor receptor 2
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1	intercelluláris adhézíós molekula 1
ICP	inductively coupled plasma	induktív csatolású plazma
IL-1R α	interleukin 1 receptor subunit alpha	interleukin 2 receptor alfa
IL-1 β	interleukin 1 beta	interleukin 1 béta
IL-8/CXCL8	interleukin 8/ CXC-motif ligand 8	interleukin 8/ CXC-motívumú ligand 8
I κ B	IkappaB kinase	IkappaB kináz
MACE	massive analysis of cDNA ends	cDNS végek tömeges elemzése
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogén-aktivált protein kináz
MC(s)	metacluster(s)	metaklaszter(ek)
MCSB	Maxpar cell staining buffer	Maxpar sejtfestő oldat
MGMT	O6-methylguanine-DNA methyltransferase	O6-metilguanin-DNS metiltranszferáz
MIG	monokine induced by interferon-gamma	interferon-gamma indukált monokin
MMP	matrix metalloproteinase	mátrix-metalloproteináz
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NES	normalized effect score	normalizált hatáspontszám
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	aktivált B-sejtek nukleáris kappa-könnyűlánc erősítője
NK-sejt	natural killer cells	természetes ölősejtek
NKT-sejt	natural killer T cells	természetes ölő T-sejtek
NRF2	nuclear factor erythroid-2 related factor 2	nukleáris faktor eritroid-2 kapcsolt faktor 2
NSCLC	non-small cell lung cancer	nem kissejtes tüdőrák
PBMC	peripheral mononuclear blood cell	perifériás mononukleáris vérsejt
PBS	phosphate-buffered saline	foszfát-pufferelt sóoldat
PD-1	programmed cell death protein 1	programozott sejthalál fehérje 1
PD-L2	programmed death-ligand 2	programozott sejthalál ligand 2
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase	foszfatidil-inozitol 3-kináz
PKC	protein kinase C	protein kináz C
RANTES	regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted	aktiváláskor szabályozott, normál T-sejtek által kifejezett és szekretált
RB	retinoblastoma	retinoblasztóma
RNOS	Reactive nitrogen-oxygen species	reaktív nitrogén-oxigén formák
ROS	Reactive oxygen species	reaktív oxigén formák
ROS1	ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase	ROS protoonkogén-1, receptor tirozin kináz
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute	sejtenyésztő médium
SCLC	small cell lung cancer	kissejtes tüdőrák
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	transzkripció jelátalakítója és aktivátora 3

TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3	T-sejt immunglobulin és mucin tartalmú protein-3
TNF- α	tumor necrosis factor alpha	tumor nekrosis faktor alfa
UMAP	uniform manifold approximation and projection for dimension reduction	egységes sokszoros közelítés és vetítés
UV	ultraviolet	ultraviola
WIF-1	Wnt inhibitory factor 1	Wnt inhibitor factor 1

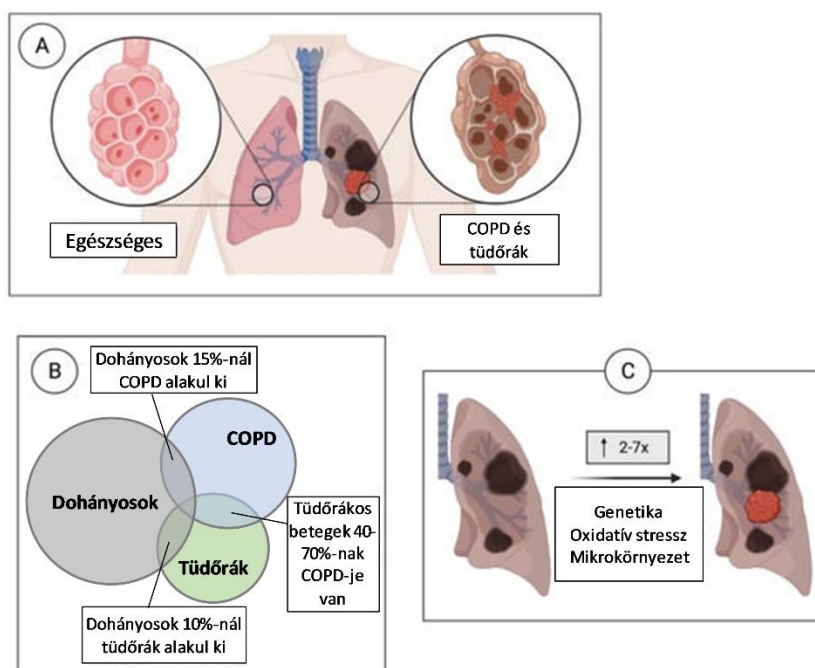
II. Bevezetés

A rákos megbetegedések mellett a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) is a vezető halálos megbetegedések egyike, melynek kialakulását átlagosan 80-90%-ban a dohányzás okozza [1]. A dohányzás gyakran vált ki légúti gyulladást, fokozza az oxidatív stresszt, amely szorosan összekapcsolódik a COPD és a tüdőrák patogenezisével. Egy 2022-ben megjelent tanulmány szerint 2019-ben 212,3 millió COPD-s megbetegedést és 3,3 millió halálesetet jelentettek világszerte [2]. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO, World Health Organization) felmérése alapján 2019-ben a COPD-s megbetegedés volt a harmadik vezető halálozási ok világszerte, 2020-ban továbbra is a COPD a harmadik, a tüdőrák pedig a hatodik helyen álltak [3], [4]. A COPD a dohányosok több, mint 50%-át érinti, a tüdőrák kialakulásának kockázata ötször magasabb légzési nehézséggel küzdő dohányosoknál és kétszer nagyobb COPD esetén, mint a normál tüdőfunkcióval rendelkezőknél [5], [6]. Jól ismert tény, hogy az oxidatív stressz szerepe kiemelt jelentőségű a COPD és a tüdőrák kialakulásában. A cigaretta körülbelül 10^{15} mennyiségű szabadgyököt tartalmaz, beleértve a reaktív nitrogén- és oxigénformákat (RNOS) is. Az RNOS számos mechanizmuson keresztül károsítja a sejteket, mint a DNS károsodás, lipidperoxidáció, aminosavak és enzimek kofaktorainak oxidációja [7], károsodott fehérjék képződése és a szignálutak megváltozása. (1. ábra, A-D). Ezenkívül széles körben ismert, hogy a dohányfüst számos rákkeltő anyagot tartalmaz (arzén, króm, nikkel, policiklikus aromás szénhidrogének arzenálja: krizén, metilkolantrén, dibenzantracén, dibenzakriden, stb.), melyek fokozzák az új mutációk felhalmozódását, ezáltal új mutációs mintázatok kialakulását, továbbá felelősek a gyulladásos környezet létrehozásáért, ami a későbbiekben tüdőrák kialakulásához vezethet [8] (1.C ábra).



1.ábra: A COPD kialakulásának oxidatív stressz által vezérelt mechanizmusa. A környezetből származó exogén (dohányfüst, légszennyezés, stb.) és endogén oxidáció (amelyeket az aktivált neutrofilek, alveoláris makrofágok és hámsejtek bocsátanak ki) ROS termelődéséhez vezetnek, és a tüdőszövet károsodását okozzák a fokozott lipidperoxidáció, fehérjekárosodás, DNS-károsodás és a jelátviteli útvonalak megváltozásán keresztül. (A) A lipidperoxidáció a sejtmembránban lévő foszfolipidek hidrolízisét illetve a sejtmembrán szerkezetének és áteresztőképességének megváltozását eredményezi. A foszforsav-molekulák hidrolízisével keletkező arachidonsav, annak metabolitjai, a tromboxán, a prosztaglandin E és a leukotrién C4 részt vesznek a gyulladásos folyamatban. (B) Az $\alpha 1$ -AT inaktíválása megbontja a proteáz és anti-proteáz közötti egyensúlyt, ami károsodást okoz az elasztinban, végül emphysema alakul ki. (C) A DNS-károsodás által indukált gyulladásos mediátorok génexpressziója fokozódik. (D) Az oxidatív stressz megváltoztatja a TNF- α által közvetített jelátviteli útvonalat, ami fokozott nyálkaszekrécióhoz és a csillósejtek diszfunkciójához vezet. ROS: reaktív oxigénfajták; AA: arachidonsav; $\alpha 1$ -AT: alfa-1-antitripszin; Nrf2: nuclear factor erythroid-2-related factor2; HSF: hő sokk faktor; NF- κ B: nukleáris faktor- κ B. (Forrás: He LX és mtsai, Front. Cell Dev. Biol., 8:585, 2020)

Egysejt-tömegspektrometria segítségével COPD-ben olyan neoantigéneket azonosítottak, melyek egyértelműen megerősítik azokat az epidemiológiai adatokat, amelyek a COPD-t a tüdőrák előfázisának tekintik. A neoantigének olyan antigének, melyek eltérnek a saját struktúráktól, így az immunrendszer számára felismerhetővé válnak. A tömegspektrometria lehetővé teszi a mutáns és normális peptidek arányának mérését, amelyek potenciálisan egy-egy betegséggel asszociáltak [9]. Mivel a dohányzás a tüdőrák kialakulásának egyik fő oka, a dohányzással összefüggő betegségek gyakran társbetegséggé jelentkeznek, mint a szív és érrendszeri megbetegedések és a COPD (2. ábra). A tüdőrákos betegek 40-70%-nál kimutatható COPD-re utaló tüdőkárosodás, amit a FEV1 (erőltetett kilégzési térfogat) érték alapján határoznak meg (2.B ábra). Továbbá, ismert tény, hogy a COPD-s betegeknél tapasztalható tüdőszövetek folyamatos gyulladása 2-7-szeresre növeli a tüdőrák kialakulásának kockázatát függetlenül a dohányzási előzményektől (2.C ábra) [10].



2. ábra: A COPD nagyobb kockázatot jelent a tüdőrák kialakulására. (A) A COPD és a tüdőrák szorosan összefüggő, tüdőt érintő betegségek. (B) A dohányosoknál a COPD és a tüdőrák között nagy az átfedés. Amíg a dohányosok bizonyos részhalmazában COPD vagy tüdőrák alakul ki, addig a tüdőrákos betegek jelentős részének (40-70%) COPD-je is van. (C) A COPD a dohányzási előzményektől függetlenül 2-7-szer nagyobb kockázatot jelent a tüdőrák kialakulására, ahol a lehetséges közös mechanizmusok a genetikai háttér, az oxidatív stressz és a mikrokörnyezeti tényezők. (Forrás: Aisling és mtsai., Int. J. Mol. Sci., 24(3), 2859, 2023)

II.1 Krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD)

A COPD a légzőrendszer krónikus, gyulladásos megbetegedése, melynek kialakulásáért felelős legfőbb kockázati tényezői az aktív vagy passzív dohányzás, bel- és kültéri szennyezőanyagoknak (toxikus gázzal, szénrel szennyezett levegő, szmog) való kitettség, allergének, foglalkozás általi kitettség (kemikáliák, por) egészségtelen táplálkozás, elhízás és a mozgásszegény életmód. Amíg a dohányzást a legfőbb kockázati tényezőnek tekintjük, addig a dohányosok csak 45-50%-a szenved COPD-ben [11], [12]. A COPD kialakulásának hátterében genetikai tényező is állhat, melyek közül a legismertebb az α -1-antitripszin deficiencia, ami a korán kialakuló tüdőtágulásért felelős [13], [14]. A krónikus légzőszervi megbetegedések 2017-ben 544 millió esetet jelentettek világszerte, amelyből 55,1% férfiaknál, 54,8%-ban pedig nők esetében fordult elő [15]. A COPD előfordulási gyakorisága Európában a felnőtt lakosság körében 15-20% között mozog [16].

II.1.1 A COPD tünetei

- légszomj, különösen fizikai aktivitás vagy megerőltetés során
- zihálás, légzés közben fellépő magas, sípoló hang a légutak szűkülete miatt
- köhögés, tartós és produktív (fokozott váladék és köpetürítés)
- fokozott nyálkatermelés, ami légzési nehézséget okoz ill. fokozza a légúti fertőzések kialakulását
- cianózis, kék vagy szürke bőrelszíneződés különösen az ajkak és a körmök körül a vér alacsony oxigénszintje miatt
- hordó alakú mellkas kialakulás a tüdőben megrekedt levegő miatt
- csökkent légzési hangok
- csökkent tüdőfunkció

Nem minden COPD-s betegnél jelentkezik az összes fizikai tünet, és egyes betegeknél a betegség súlyosságától függően további tünetek is kialakulhatnak. Így a COPD diagnózisát általában a kórtörténet, fizikális vizsgálat, tüdőfunkciós és képalkotó vizsgálatok együttes alkalmazásával állítják fel [17]. A COPD heterogén betegség, amely a betegség súlyosságának széles spektrumát képviseli a stabil állapottól egészen a súlyos exacerbációkig. A stabil COPD-t a tünetek jól kezelhetősége és a tüdő minimális hanyatlása jellemzi, míg az exacerbációra a 14 napot meghaladó és egyre súlyosbodó nehézlégzés és/vagy köhögés és köpetürítés jellemez, társult szapora légzéssel és/vagy

szapora szívdobogással, illetve légúti fertőzés vagy a légutakat ért légszennyezés vagy egyéb inzultus okozta helyi vagy szisztémás gyulladással jár [18].

II.1.2 A COPD diagnosztikája

A COPD-s megbetegedés legfontosabb kóros elváltozásai a kis légutak átalakulása, a hörgők falának megvastagodása, a tüdőparenchima destrukciója, ezáltal légzőfelület csökkenés következik be [19]. A képalkotó eljárások mellett az alapvető diagnosztikai módszer a spirometriás tüdőfunkciós vizsgálat. A spirometriát bronchodilatátor nélkül, majd bronchodilatátor után 30 perccel is elvégzik. A Globális Kezdeményezés a Krónikus Tüdőbetegségekre (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, GOLD) a posztbronchodilatációs FEV1 érték alapján a COPD-t 4 csoportba sorolja. Enyhe COPD-ben a FEV1 > 80 (GOLD 1), közepes COPD-ben a FEV1 50-80 (GOLD 2), súlyos COPD-ben a FEV1 30-50 (GOLD 3), nagyon súlyos COPD-ben a FEV1 < 30 (GOLD 4) [20]. A GOLD jelenlegi (2023) irányelve a COPD-t a következőképpen határozza meg: heterogén tüdőbetegség, melyet a légutak tartós, gyakran progresszív légáramlási károsodást okozó rendellenességei (bronchitis, bronchiolitis, tüdőtágulás) miatt kialakuló krónikus légúti tünetek (nehézlégzés, köhögés, fokozott nyálkatermelés, exacerbációk) jellemeznek [18].

II.1.3 COPD és a gyulladás kapcsolata

Széles körben ismert, hogy a COPD-ben létrejövő légúti gyulladás szisztémás gyulladással jár együtt, ami gyakran szív-és érrendszeri megbetegedéseket is okoz [21], viszont a perifériás immunrendszer szisztematikus vizsgálata COPD esetében még nem teljesen megoldott. A COPD során kialakuló gyulladás a terminális hörgőket és a tüdőparenchimát érinti, melyeket infiltráló makrofágok és CD8+ T-sejtek jelenléte jellemez. A makrofágok elsősorban a tüdőben vannak jelen, a citotoxikus CD8+ T-sejtek pedig perforinokat és TNF- α -t szabadítanak fel, így az alveoláris epithel sejtek apoptózisát okozzák. A makrofágok és a tüdősejtek IL-8/CXCL8-at és CXCL1-et termelnek, melyek a gyulladással válasz felerősítéséért felelősek azáltal, hogy több leukocitát toboroznak a vérből a gyulladás helyszínére. A dohányos COPD-s betegeknél a dohányzással összefüggő ICAM-1 – leukocita migrációban szerepet játszó adhézións fehérje – fokozódás is megfigyelhető a tüdő hámsejtjeiben [22]. COPD-ben a T-sejtek diszregulációja miatt emelkedett számú CD8+ és csökkent CD4+ T-sejtek figyelhetők meg. A T-sejtek kimerülésének következménye az effektor funkció elvesztése, ami a PD-

1 fokozott expresszióját eredményezi [23], [24]. Dendritikus sejtek is megtalálhatóak a légutak közelében, melyek elősegítik a veleszületett és adaptív immunitás aktiválódását. A gyulladás során citokinek, kemokinek, lipid mediátorok és növekedési faktorok szabadulnak fel a gyulladásban részt vevő dendritikus sejtekből, neurtofilekből, T-sejtekből, epithel és endothel sejtekből, illetve fibroblasztokból, így súlyosbítva a tüdő fibrótikussá alakulását [25].

II.1.4 A COPD epigenetikai vonatkozásai

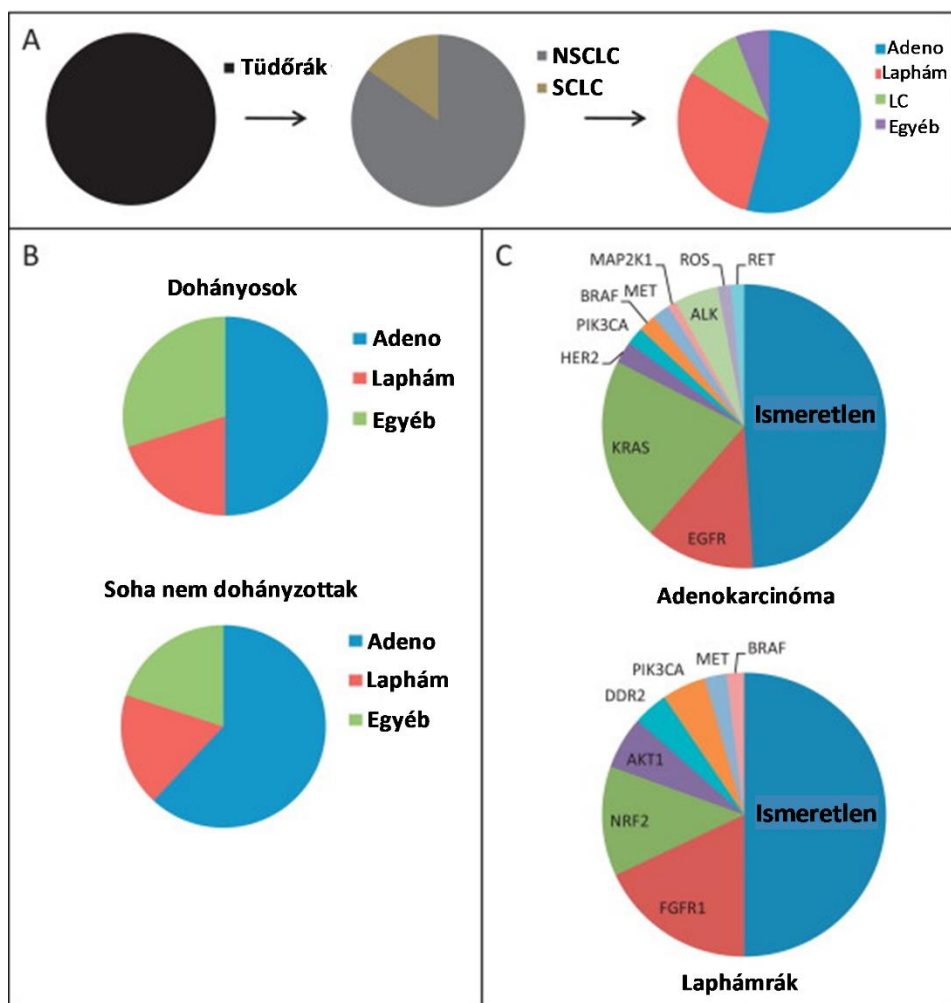
A COPD-s tüdőszövet és emphysema kialakításában szerepet játszó génpolimorfizmusok, mint az α 1-antitripszin [12], a TNF- α [13], a mátrix metalloproteinázok (MMP) [14] vagy a glutation-S-transzferáz (GST) régóta ismertek és összefüggést mutatnak az életkorral illetve a betegség súlyosságával, fenotípusával [26].

Az epigenetiekai módosítások közül elsősorban a hiszton-acetiláció és DNS-metiláció kapcsolódik a COPD kialakulásához. A hiszton-deacetiláz esszenciális szerepet betöltő enzim a COPD-ben jelen lévő proinflammatorikus citokinek expressziójának szabályzásában [27]. Azt is megfigyelték, hogy COPD-ben a hiszton-acetiláció/deacetiláció egyensúlyzavar áll fenn, ahol az egyensúly a hiszton-acetiláció felé tolódik el. Ez az egyensúlytalanság a nukleoszómák szerkezetének megváltozását, így az NF- κ B által szabályzott gyulladásos citokinek fokozott transzkripcióját okozza, ily módon szabályozva a gyulladásos gének kifejeződését, ami a COPD-s populáció génexpressziós profiljának megváltozásához vezet. A dohányzás hatására fokozódik az I κ B α degradációja, így az NF- κ B transzlokációja a sejtmagba folyamatossá válik [28].

A DNS-metiláció, jellemzően a CpG-szigetek metilációja, szövetspecifikus epigenetiekai módosításként van jelen, számos szakirodalmi adat áll rendelkezésünkre arról, hogy a COPD-vel összefüggő DNS-metiláció potenciális biomarkerként szolgálhat a betegség megelőzésében és diagnosztikájában [29], [30]. Így a köpetmintában lévő GATA4 metilációját a COPD korai markerének feltételezik, továbbá tumorszupresszor gének promóterének metilációs vizsgálatából kiderült, hogy a CDKN2A és MGMT metilációja szignifikánsan magasabb COPD-ben, valamint az IL-1- β 2 és WIF-1 hipermetilációját azonosították a COPD-ből a tüdőrákba való átmenet során [31], [32], [33].

II.2 Nem kissejtes tüdőrák (NSCLC)

A tüdőrák az egyik leggyakoribb tumoros megbetegedés, a halálesetek mintegy 13%-át okozza világviszonylatban. A tüdőrák heterogén betegségként definiálható, szövettanilag két fő csoportba sorolhatjuk: a tüdőrákos esetek 22%-át adó kissejtes tüdőrákra (SCLC) és nem kissejtes tüdőrákra (NSCLC). Az NSCLC szövettanilag tovább csoportosítható adenokarcinómára (40%), laphámrákra (30%) és nagysejtes karcinómára (8%) (3.A ábra) [34]. Az elmúlt néhány évtizedben drámai elmozdulás történt a tüdőrák szövettani formáinak tendenciájában, ugyanis az SCLC és laphámrák folyamatos csökkenése mellett ma már az adenokarcinóma a leggyakoribb altípus a dohányos és soha nem dohányzott betegpopulációban egyaránt (3.B ábra) [35]. A tüdőrák diagnózisával foglalkozó tanulmányok a tüdőrák indikátoraként a tartós köhögést és nehézlégzést írják le [36], [37]. Emellett a betegek több hónapon át tartó egyéb tüneteket is tapasztalhatnak, mint az étvágytalanság, fogyás, fáradtság, továbbá akár véres köhögés, mellkasi fájdalom, légszomj, megnagyobbodott nyirokcsomók, láz [38], [39]. Az NSCLC-s esetek 10%-a tünetmentes, így jelenlétüket mellkasi röntgenfelvétel során fedezik fel, vagy a tünetek megjelenése után diagnosztizálják [40], [41]. A kialakulásához vezető kockázati faktorok, mint a dohányzás, légszennyezés, munkahelyi kitettség, mozgásszegény életmód, helytelen táplálkozás és genetikai faktorok (p53 és EGFR mutációja) nagyrészt átfednek a COPD kialakulásában szerepet játszó faktorokkal [42], [43], [44].



3. ábra: A tüdőrák szövettani és molekuláris altípusai a tüdőrákos betegpopulációban. (A) A tüdőrák szövettani altípusainak felosztása: SCLC: kissejtes tüdőrák, NSCLC: nem kissejtes tüdőrák, melyen belül Adeno: Adenokarcinóma, Laphámrák, LC: Nagysejtes tüdőrák, és egyéb típusokat különböztetünk meg. (B) A szövettani altípusok eloszlása a dohányos és soha nem dohányzott betegcsoportokban. (C) Az adenokarcinóma és a laphámrák molekuláris altípusai. (Forrás: Pikor és mtsai, Lung Cancer, 82.2, 179-189, 2013)

II.2.1 Az NSCLC genetikai altípusai

Az onkogének szerepe a rákos megbetegedések kialakulásában régóta ismert. A HER-2 egy protoonkogén, mely receptor tirozin-kináz funkciót tölt be. A HER-2 mutációt hordozó NSCLC-t külön molekuláris altípusnak tekintik. A HER-2 aktiválódása 3 útvonalon történhet: génmutáció (1-4%), génamplifikáció (2-5%) és túlzott fehérje kifejeződés (2-30%) során. A HER-2 aktiválódásának következménye a receptor hiperaktivációja, mely a sejtproliferációt indukáló jelátviteli útvonalakat indít el, mint a MAPK, PI3K, AKT, PKC és STAT3 útvonalak [45]. Egy másik receptor tirozin-kináz, az EGFR mutációja főleg adenokarcinómára jellemző, a MAPK, PI3K, AKT jelátviteli

utak aktivációján keresztül elősegíti a tüdőtumорок növekedését és metasztázis képzését [46]. Az NSCLS-s betegek 3-5% BRAF mutációt hordoz, mely a RAF kináz családba tartozó szerin/treonin kináz. A MAPK-ERK útvonal aktiválásával kulcs szerepet játszik a sejtosztódásban, a sejtnövekedésben, a migrációban és a túlélésben [47]. A ROS1 protoonkogén, receptor tirozin-kináz aktivitással rendelkezik és nagymértékben kifejeződik a tüdőben. A ROS1 gént érintő kromoszóma átrendeződések okozzák a ROS1 hibás működését, mely az NSCLC 1-2%-ban fordul elő[48]. Az NSCLC-s betegek nagyjából 5%-ban ALK mutáció is előfordulhat legtöbbször a nem dohányos betegek között, ami a ROS1-hez hasonlóan, szintén kromoszóma átrendeződés eredményeként jött létre. Így az ALK kináz aktivációja konstitutív válik, ezáltal olyan lefelé irányuló jelátviteli utakat indít el, amelyek fokozzák a sejtosztódást és a túlélést [49], [50]. (3.C ábra)

II.2.2 A tüdőrák epigenetikai szabályozása

Számos genetikai és epigenetikai elváltozást tulajdonítanak a különböző tüdőrák altípusok kialakulásának és progressziójának [51]. Az SCLC-t gyakran a TP53 és RB tumorszupresszor gének inaktivációja, míg az NSCLC-t a TP53, CDKN2A tumorszupresszorok funkcióvesztéses mutációja jellemzi [52], [53]. Tüdőrákban jellemző epigenetikai változások a hisztonok poszttranszlációs módosításai, melyek közül DNS-metilációról valamint nem kódoló RNS expresszióról számoltak be. Például a normális tüdővel összehasonlítva a tumorok H4K5/H4K8 hiperacetilációt, H4K12/H4K16 hipoacetilációt és a H4K20me3 trimetilációjának elvesztését mutatják [54]. Az epigenetikai faktorok közül legjobban tanulmányozott mechanizmus a DNS-metiláció, amely a kromatinszerkezet, ezáltal a transzkripció faktorok kötőhelyének megváltozásán keresztül szabályozza a génkifejeződést [55]. A CpG-szigetek metilációját DNS-metiltranszfázok (DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b) végzik, például tumorszupresszor gének promóter régiójában, ami géncsendesítést eredményez. A tüdőrák egyes epigenetikai vonatkozásai nagyobb gyakorisággal fordulnak elő dohányosoknál, mert a DNMT1 expressziója emelkedést mutat tüdőrákos dohányosokban, ami összefügg a dohányzásra specifikus nitrózaminok jelenlétével, melyek csökkentik DNMT1 ubikvitinációját és proteoszóma általi degradációját. Ezenkívül a dohányzás által kiváltott gyulladás és reaktív oxigéngyökök fokozott létrejötté szintén a DNS-metiláció fokozódását eredményezi [56].

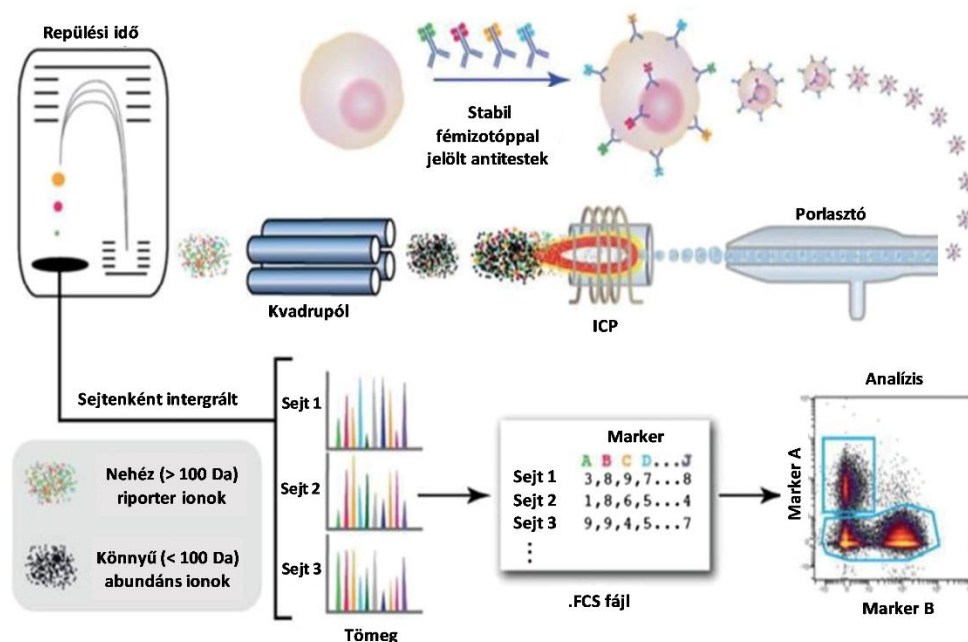
II.3 COPD és a tüdőrák kapcsolata, molekuláris mechanizmusai

A COPD és a tüdőrák számos közös aktivációs útvonallal rendelkezik, a gyulladás és a rák pedig szorosan összefügg. Mivel szinte minden rákos szövet gyulladást mutat, és számos gyulladásos megbetegedés hajlamosít a rák kialakulására, valószínűsíthető, hogy a COPD-ben jelen lévő krónikus gyulladás a tüdőrák kialakulásának egyik fő okozója [57]. Az oxidatív stressz egyértelműen összefüggésbe hozható a COPD-vel és az NSCLC-vel, hiszen a szöveti gyulladás az RNOS létrejöttének egyik legfontosabb forrása, az RNOS szintje pedig tartósan magas COPD-ben [58]. A gyulladás azonban a karcinogenezisben is szerepet játszik, így krónikus gyulladásban a citokinek aberráns jelátvittele a sejtek növekedését és differenciálódását, illetve az apoptózist is hibásan irányítja [59]. A krónikus gyulladás az NF- κ B transzkripciós faktor – a gyulladás indukálta karcinogenezis kulcsfontosságú résztvevője – túlzott kifejeződésével is együtt jár [60]. A COPD és a tüdőrák átfedése a dohányzás indukálta közös folyamatokon túlmenően közös genetikai hajlamon keresztül is megvalósulhat. Az epitheliális-mesenchimális átmenet (EMT), mely során a hámsejtek elvesztik polaritásukat és mobilis mesenchima sejtekké alakulnak, a COPD és tüdőrák közös jellemzője. Az EMT-re jellemző morfológiai változások mellett az EMT-ben résztvevő transzkripciós faktorok (Snail, Slug és Twist) és mesenchimális markerek (S100A4, Vimentin, Fibronectin és N-Cadherin) fokozott kifejeződését, míg az epitheliális markerek (E-Cadherin és Occludin) represszióját írták le COPD-ben [61]. A tumor-asszociált fibroblasztok szerepet játszanak az immunrendszer és a metabolikus folyamatok átprogramozásában, a tumor mikrokörnyezet létrehozásában, ECM komponenseket ill. angiogenezisben résztvevő faktorokat termelnek, így biztosítva a talajt a tumoros sejtek növekedéséhez, metasztázis képzéséhez és túléléséhez. A tumor-asszociált fibroblasztok a tumor progressziójának kulcsfontosságú résztvevőivé váltak [62].

II.4 Technikai háttér

II.4.1 Egysejt-tömegcitometria (CyTOF)

Az egysejt-tömegcitometria egy multiplex vizsgálati módszer, mely alkalmas a hagyományos áramlási citometria során használt 10-12 markernél magasabb, akár több, mint 40 antitest egyidejű vizsgálatára egysejt szinten. A hagyományos áramlási citometriához hasonlóan alkalmas sejtfelszíni és intracelluláris markerek monitorozására is. Azonban az áramlási citometriától eltérően, ahol az fluorofórokkal jelölt antitesteket alkalmazunk, majd fluoreszcencia intenzitást detektálunk, az egysejt-tömegcitometriában használt antitestek stabil fémizotóppal képeznek konjugátumokat, így a mérés során a fémizotópok atomi tömegét detektáljuk. További előnye, hogy míg a fluorofórok emissziós spektruma között nagy átfedést tapasztalhatunk, addig a nehézfém izotópok közötti áthallás, nincs vagy nagyon kis mértékű. A vizsgálat során a sejteket nehézfém izotóppal konjugált antitestek keverékével jelöljük. A sejtszuspenzió a porlasztón megy keresztül, ahol egysejtes cseppekké alakul. Az egysejt cseppek a porlasztóból az ICP-be kerülnek, ahol nagyjából 6000 K hőmérsékleten először vaporizálódnak, majd atomizálódnak, végül ionizálódnak. A folyamat végén minden egyes sejtről egy ionfelhő keletkezik, amely következő lépésként a kvadrupól szűrőbe kerül, ahol a 100 Da-nál kisebb, abundáns, főleg sejtből származó ionok kiszűrődnek, így csak a 100 Da-nál nagyobb, riporter ionok jutnak el a tömeg-analizátor egységbe, ami egy repülési idő kamrából és egy detektorból tevődik össze. A kamrában az ionok tömegük alapján elkülönülnek, majd egyesével jutnak el a detektorhoz, így információt kapunk a sejtenkénti izotópok mennyiségéről. Végül a számítógép a hagyományos áramlási citometriás fájlokkal megegyező, FCS kiterjesztésű fájlokat generál, amit különböző citometriás platformokon (Cytobank, Astrolabe, FlowJo, Kaluza, R program) lehet kiértékelni [63], [64]. Az egysejt-tömegcitométer részletes működési elvét a 4. ábra mutatja be.

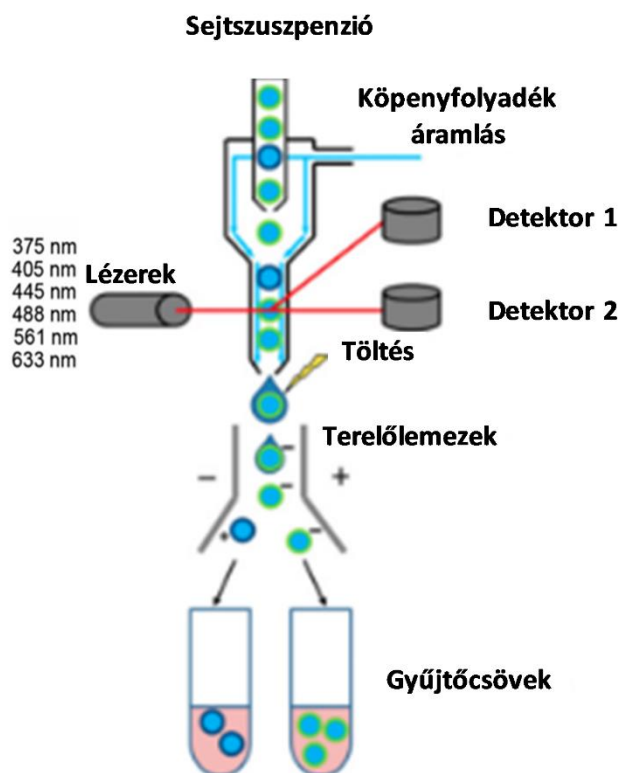


4. ábra: Az egysejt-tömegcitométer mérési elvének folyamata. A sejteket nehézfém izotóp-antitest konjugátumokat tartalmazó antitest keverékkel jelöljük, majd a sejtszuszpenziót a porlasztóba juttatjuk, ahol megtörténik a cseppképződés, így egy cseppben egy sejt lesz megtalálható. A cseppek az ICP-be kerülnek, ahol magas hőmérsékleten, több mint 6000 K porlasztódnak, atomizálódnak majd ionizálódnak. Az ICP-t az egysejtből származó ionfelhő hagyja el, amely a kvadrupólba kerül, ahol a 100 Da alatti ionok kiszűrődnek, így csak a nehézfém ionfelhő jut el a repülési idő egységhez, ahol tömeg szerint elválasztódnak, majd egyesével a detektorba csapódnak. A detektor minden fémizotópot egyesével számszerűsít sejtenként, melyből FCS fájl generálódik. (Forrás: Bendall és mstai, Trends Immunol., 33(7):323-32, 2012)

II.4.2 Fluoreszcens aktivált sejtszortolás (FACS)

A sejtszortolás folyamata során egy adott sejttípust különítünk el mérete, életképesség, extra- és/vagy intracelluláris fehérje expressziója alapján a mintában jelen lévő többi sejttípustól. A különböző vizsgálatokhoz gyakran nagymértékben tisztított, ismert fenotípusú sejtpopulációra van szükség, melyre a FACS a legmegfelelőbb technika. A FACS számos előnnyel rendelkezik a többi rendelkezésre álló módszerrel szemben, mivel képes ritka, vagy alacsony marker expresszióval rendelkező populációk elkülönítésére, továbbá intracelluláris markerek alapján is elkülönít sejtpopulációkat. A FACS folyamata során az antitesttel jelölt sejtek a készülék kapillárisaiban köpenyfoladékban haladnak, az áramlási sebesség megfelelő beállításával biztosítjuk, hogy egyszerre csak egy sejt haladjon el a lézer előtt. A detekciós rendszer a sejtek előre meghatározott fluoreszcens paramétereit alapján detektálja a fluoreszcens jelet. Amint egy

sejt áthalad a detektálási területen, a készülék a sejttáramlást egy 60-100 μm -es fűvókán keresztül cseppekre bontja úgy, hogy egy csepp egy sejtet tartalmazzon. A műszer töltéssel (pozitív vagy negatív) látja el a szortolni kívánt sejteket tartalmazó cseppeket, és egy elektrosztatikus terelőrendszeren keresztül a sejtek a megfelelő gyűjtőcsövekbe vagy többlyukú lemezre kerülnek [65]. A sejtszortolás folyamatát az 5. összefoglaló ábra mutatja be.

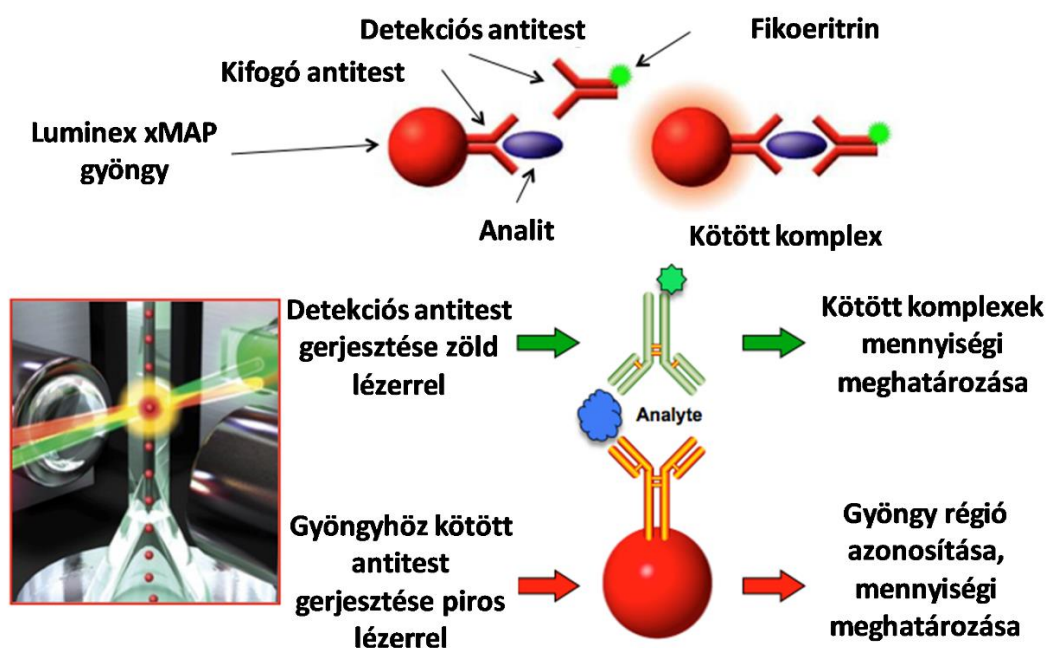


5. ábra: A fluoreszcensen aktivált sejtszortolás sematikus ábrája. A fluoreszcensen jelölt sejtek a készülék mintavivő kapilláris csövében, köpenyolyadékban egyesével haladnak el a lézer előtt. A fluoreszcens jelet a detektorok rögzítik, majd a sejtek egy 60-100 μm -es fűvókán keresztül haladva egy sejtet tartalmazó cseppekké alakulnak. A műszer töltéssel látja el a cseppeket, melyek az elektrosztatikus terelőlemezek között a megfelelő gyűjtőcsőbe kerülnek. (Forrás: Gross és mtsai, Int J Mol Sci., 16:16897-16919, 2016)

II.4.3 Luminex xMAP (MAGPIX®) technológia

Vérszérum vagy vérplazma minták, szöveti homogenizátumok és sejtkultúrák felülúszójának multiplex fehérje (citokinek, kemokinek, növekedési faktorok, immun ellenőrzőpont fehérjék, egyéb szolubilis markerek, stb) koncentrációjának meghatározására a Luminex xMAP (MAGPIX®) technológia bizonyult a

legalkalmasabbnak, melyben a multiplexálás hatákonysága és az ELISA – egy mintából egyszerre egy fehérje koncentrációja mérhető – érzékenysége és pontossága egyszerre jelenik meg. A mérés során egyetlen mintából akár több, mint 40 protein egyidejű detekciója lehetséges. A multiplex tulajdonság azon alapszik, hogy a méréshez olyan mágneses gyöngyöket alkalmaznak, amelyek különböző mennyiségű vörös vagy infravörös fluoreszcens festéket tartalmaznak, így meghatározásra kerül a gyöngyrégió, míg a felületüket pedig analit specifikus antitesttel vonják be, melyek kifogják a mintából a vizsgált proteineket. Az analitok kimutatása egy specifikus biotinilált ellenanyag, amely az analit egy másik epitópjához kötődik, és sztreptavidin-fikoeritrin konjugátum hozzáadásával történik. Ezáltal lehetővé válik, hogy a különböző antitesttel bevont gyöngyök keverékét használjuk egy vizsgálaton belül. Az xPONENT™ szoftver a gyöngyöket a vörös vagy infravörös fluoreszcencia intenzitás alapján különbözteti meg, az analitot pedig a fikoeritrin fluoreszcencia intenzitásán keresztül detektálja (6.ábra). Az így kapott analit-fikoeritrin medián értékekből kiszámítható a mintában lévő vizsgált proteinek mennyisége [66].



6. ábra: A Luminex xMAP (MAGPIX®) készülék mérési elve. A multiplex méréshez eltérő mennyiségű vörös vagy infravörös fluoreszcens festéket tartalmazó, az analitra specifikus antitesttel bevont mágneses gyöngyöket alkalmaznak. Az így kifogott analitokat biotinilált, analit-specifikus detekciós antitestek keverékével azonosítják, majd sztreptavidin-fikoeritrin hozzáadásával teszik detektálhatóvá a létrejött kötött komplexeket. A gyöngyhöz kötött antitesteket piros lézerrel gerjesztik, majd a létrejött vörös fluoreszcencia intenzitás alapján a

gyöngyrégiók azonosíthatóvá válnak, számuk pontos meghatározásra kerül. A zöld lézer a fikoeritrin gerjesztéséért felel, az így kapott fluoreszcencia intenzitásból a kötött komplexek mennyisége határozható meg. (Forrás: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/luminex-bead-based-immunoassays-drive-immunoassays-towards-higher-content-biomarker-discovery>)

II.4.4 MACE RNS szekvenálás:

A MACE (Massive analysis of cDNA ends) szekvenálás egy újfajta megközelítésből végzett RNS szekvenálási módszer, ami a transzkripteknek csak a 3' végét szekvenálja, így a még részben lebomlott RNS-ek is elemezhetőek vele degradációs torzítás nélkül. Röviden, a folyamat során az mRNS-ekről átírt t cDNS-t mágneses gyöngyökkel tisztítják, majd a cDNS-t random 50-500 bázispáros fragmentumokra bontják. Mivel a szekvenálás során csak egy transzkript bázis/leolvasás történik, ezért a rövid és ritka transzkriptek már 10-20-szor alacsonyabb szekvenálási mélységgel azonosíthatók, mint a teljes hosszúságú RNS szekvenálás esetén, így hosszalapú normalizálásra sincs szükség [67]. Vizsgálatainkhoz a mintaelőkészítést és az RNS szekvenálást a GenXPro GMBH (Frankfurt am Main, Németország) végezte.

III. Célkitűzések

A Ph.D. munkám fő célkitűzése a dohányzás immunrendszerre gyakorolt hatásának vizsgálata, vagyis a perifériás immunrendszer multiplex, összehasonlító vizsgálata, beleértve a fő immunsejt populációk és plazmafehérjék összehasonlító vizsgálatát, illetve transzkriptomikai elemzését dohányos, egészséges kontrollok; dohányos, stabil és exacerbáló COPD-s valamint dohányos, NSCLC-s terápia naiv csoportokban.

1. A kontrollokból és betegekből származó perifériás mononukleáris sejtek immunfenotipizálása egysejt-tömegcitometriával.
2. Fő immunsejt populációk, valamint további alpopulációik meghatározása felügyelet nélküli klaszterező algoritmussal, eloszlásuk összehasonlítása a vizsgálati csoportok között.
3. A klaszterezés során definiált fő immunsejt populációk 29 sejtfelszíni marker expressziójának meghatározása és csoportok közötti összehasonlítása.
4. A CD4+ centrális memória (CM) és CD4+ effektor memória (EM) T-sejtek transzkriptomikai analízise RNS szekvenálással.
5. A kontrollok egyénekből és betegekből származó vérplazma minták 17 különböző immun-onkológiai ellenőrzőpont fehérje koncentrációjának meghatározása Luminex xMAP (MAGPIX®) technológiával.

IV. Anyagok és módszerek:

IV.1 Mintagyűjtés, etikai nyilatkozat

Kísérletinkhez négy vizsgálati csoportot határoztunk meg, melyek a következők voltak: (1) Dohányos, egészséges kontroll csoport (DK), akiknél krónikus betegség és rendszeres gyógyszerhasználat nem áll fenn. (2) Dohányos, stabil COPD-s betegek (stCOPD) ismert tüdőrákos megbetegedés nélkül a GOLD irányelv szerint kiválasztva. (3) Dohányos, terápia naiv, akut exacerbáló COPD-s egyének (exCOPD) ismert tüdőrákos elváltozás nélkül a GOLD irányelv szerint kiválasztva, akik esetében a vérvétel a glükokortikoid kezelés megkezdése előtt történt. Az exCOPD csoportot alkotó egyének esetén fokozott légszomj, köhögés, köpetürítés (minőségben és mennyiségben egyaránt) figyelhető meg, mely tünetek miatt az egyének orvosi ellátásban részesültek a nemzetközi irányelvekben meghatározottak szerint. ([68]) (4) Dohányos, terápia naiv, nem kissejtes tüdőrákos betegek csoportja (NSCLC). A vérvétel a kemoterápia megkezdése előtt történt. Az exacerbáció alatt bakteriális vagy vírusos fertőzés jelenlétének vizsgálata nem történt. A vérminták gyűjtése 2018. december - 2019 decembere között, a COVID-19 járvány kialakulás előtt valósult meg. Az alanyok a vizsgálatban való bevonás előtt írásos és szóbeli tájékoztatást kaptak, majd írásos beleegyezésüket adták a részvételbe. A vizsgálatot a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően végezték, az alkalmazott protokollt (Immunfenotipizálás COPD-ben és tüdőrákban) a Nemzeti Népegészségügyi Központ Etikai Bizottsága hagyta jóvá a 33815-7/2018/EÜIG azonosító kóddal.

Vizsgálatainkhoz az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetben diagnosztizált COPD-s és NSCLC-s betegektől 20 ml vénás vér lett gyűjtve K₂EDTA-s vérvételi csőben (Becton Dickinson), melyből a perifériás mononukleáris vérsejtek (PBMC) és vérplazma izolálása történt. A betegekhez korban és nemből egyező, önkéntes kontrolloktól is a betegcsoporttal megegyező mennyiségű vért gyűjtöttünk. A vér feldolgozása, az izolált PBMC és vérplazma minták archiválása, majd kísérletekben való felhasználása anonim módon, kódolva történt. A kísérletek során felhasznált humán minták megsemmisítésre kerültek.

IV.2 Vizsgálati csoportok meghatározása CyTOF és Luminex méréshez

A CyTOF kísérletekhez a következő vizsgálati csoportokat határoztuk meg: (1) dohányos, egészséges kontroll (ismert betegség valamint rendszeres gyógyszeres kezelés nélkül (n=9), (2) dohányos, stabil COPD (n=8), (3) dohányos, szteroidkezelés előtt álló

exacerbáló COPD betegcsoport (n=8), dohányos, terápia naiv (kemoterápiás és/vagy immunterápiás kezelés nélküli) nem kis Sejtes tüdőrákos betegek csoportja (n=8).

A Luminex mérés vizsgálati csoportjai a következő egyénekből tevődtek össze: (1) dohányos, egészséges kontrollok (n=9), dohányos, stabil COPD (n=11), dohányos, szteroidkezelés előtt álló exacerbáló COPD (n=13), dohányos, terápia naiv nem kis Sejtes tüdőrákos betegek (n=13).

IV.3 Perifériás mononukleáris sejtek és vérplazma izolálás

A vérvétel után a 20 ml K₂EDTA-val alvadésgátolt vénás vért 1:1 arányban hígítottunk PBS-sel (Merck), majd az így kapott mintát Ficollt tartalmazó Leucosep csőbe (Greiner Bio-One) öntöttük és 800 x g, a féket kikapcsolva, gradiens centrifugálással frakcionáltuk. A kialakult plazma frakcióból 10 x 200 µl-t 1,5 ml-es centrifugacsövekbe (Greiner Bio-One) pipettáztunk, majd további felhasználásig -80°C-on tároltuk. A PBMC gyűrűt 15 ml-es falcon csőbe pipettáztuk, PBS-sel 15 ml-re kiegészítettük, majd 350 x g, 5 percig centrifugáltuk. A felülúszó leöntése után, ha a pellet piros vagy halványpiros színű volt, 2 ml ACK vörösvérsejt lízis pufferben (ACK: 0,15M NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0,1mM Na₂EDTA, pH 7,3, Merck, Germany) felszuszpendáltuk, majd 2 perc szobahőmérsékleten történő inkubálást követően 15 ml-re egészítettük ki PBS-sel és centrifugáltuk 350 x g, 5 percig, szobahőmérsékleten. A felülúszó eltávolítása után a mintát még kétszer mostuk 10 ml PBS-sel és centrifugáltuk 350 x g, 5 percig. A sejtek életképességét és a sejtszámot Tripánkék (Capricorn Scientific) festéssel és Bürker-kamrás (Merck) sejtszámolással határoztuk meg. Ehhez a pellethez 10 ml PBS-t adtunk, majd az így kapott sejtszuspenzióból 7 µl-t összeszuszpendáltunk 7 µl Tripánkékkal, majd Bürker-kamrában megállapítottuk a sejtszámot és az életképességet. A pelletre 4 x 10⁶ sejtenként 1 ml fagyasztómédiumot mértünk (90% FBS (Capricorn Scientific), 10% DMSO (Merck)), majd a sejtszuspenziót 1 ml-ként 1,5 ml-es fagyasztócsövekbe pipettáztuk. A mintákat 2 napig -80°C-on, ezt követően pedig felhasználásig folyékony nitrogénben tároltuk.

IV.4 Sejtek felolvasztása CyTOF kísérletekhez

A folyékony nitrogénből kivett fagyasztócsöveket 2 percre 37°C-os vízfürdőbe helyeztük, majd egy 15 ml-es falcon csőben lévő 14 ml 37°C-re előmelegített RPMI-1640 médiumhoz (Capricorn Scientific) csepegtetjük. 350 x g, 6 perces centrifugálás után a felülúszót leöntjük, majd a pelletet 5 ml Maxpar sejtfestő oldattal (MCSB, Fluidigm)

mossuk és centrifugáljuk. A felülúszó leöntése után a sejtek életképességét 1 ml PBS-ben határozzuk meg Tripánkék festéssel, Bürker-kamrás számolással.

IV.5 PBMC minták antitest jelölése CyTOF kísérletekhez

A mérés során a sejtek életképességét ciszplatin jelöléssel határoztuk meg, melyhez a pelletet 300 μ l 5 μ M ciszplatin-¹⁹⁵Pt tartalmazó RPMI-1640 médiumban, 3 percig inkubáljuk, jégen. A mintát 2 ml RPMI-1640-nel hígítjuk, majd centrifugáljuk 350 x g, 6 percig, a felülúszót leöntjük. A mintát 4 ml MCSB-vel mossuk, majd újra centrifugáljuk és eltávolítjuk a felülúszót. A sejteket 50 μ l 1:20 v/v TrueStain FcX™ FC receptor blokkolót (Biolegend) tartalmazó MCSB-ben szuszpendáljuk fel, majd 10 percig szobanhőmérsékleten inkubáljuk. A minták antitest jelöléséhez gyári, a Human Immune Monitoring Panel Kit (Fluidigm) 29 stabil fémizotóppal jelölt antitestetjeit (1. táblázat) alkalmaztunk. A sejtekhez 50 μ l 29 féle antitestetből álló mixet adtunk követve a gyártó utasításait (Fluidigm), majd, 45 percig inkubáltuk sötétben, 4 °C-on. A sejteket kétszer 1ml MCSB-vel mostuk, majd 1 ml 1,6%-os Pierce™ formaldehiddel (Thermo Scientific) fixáltuk 10 percig, szobahőmérsékleten. A mintát 800 x g, 6 percig centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük és a pelletet 1 ml 1:1000 v/v Ir¹⁹¹/Ir¹⁹³ DNS interkalátorral (Fluidigm) kiegészített Fix & Perm oldatban (Fluidigm) tároltuk 4°C-on, egy éjszakán át.

Human Immune Monitoring Panel (Fluidigm)		
Antitest	Klón	Stabil fémizotóp
Anti-Human CD45	HI-30	⁸⁹ Y
Anti-Human CD196/CCR6	G034E3	¹⁴¹ Pr
Anti-Human CD19	HIB19	¹⁴² Nd
Anti-Human CD127/IL-7Ra	A019D5	¹⁴³ Nd
Anti-Human CD38	HIT2	¹⁴⁴ Nd
Anti-Human IgD	IA6-2	¹⁴⁶ Nd
Anti-Human CD11c	Bu15	¹⁴⁷ Sm
Anti-Human CD16	3G8	¹⁴⁸ Nd
Anti-Human CD194/CCR4	L29IH4	¹⁴⁹ Sm
Anti-Human CD123/IL-3R	6H6	¹⁵¹ Eu
Anti-Human TCRgd	11F2	¹⁵² Sm
Anti-Human CD185/CXCR5	RF8B2	¹⁵³ Eu
Anti-Human CD3	UCHT1	¹⁵⁴ Sm
Anti-Human CD45RA	HI100	¹⁵⁵ Gd
Anti-Human CD27	L128	¹⁵⁸ Gd
Anti-Human CD28	CD28.2	¹⁶⁰ Gd
Anti-Human CD66b	80H3	¹⁶² Dy
Anti-Human CD183/CXCR3	G02H7	¹⁶³ Dy
Anti-Human CD161	HP-3G10	¹⁶⁴ Dy
Anti-Human CD45RO	UCHL1	¹⁶⁵ Ho
Anti-Human CD24	ML5	¹⁶⁶ Er
Anti-Human CD197/CCR7	G043H7	¹⁶⁷ Er
Anti-Human CD8	SK1	¹⁶⁸ Er
Anti-Human CD25	2A3	¹⁶⁹ Tm
Anti-Human CD20	2H7	¹⁷¹ Yb
Anti-Human HLA-DR	L243	¹⁷³ Yb
Anti-Human CD4	SK3	¹⁷⁴ Yb
Anti-Human CD14	M5E2	¹⁷⁵ Lu
Anti-Human CD56	NCAM16.2	¹⁷⁶ Yb

1.Táblázat: Az egysejt-tömegcitometriás mérésekhez használt antitestek és stabil fémizotóp konjugátumainak listája, melyekkel a fő immunsejt populációk és alpopulációik egyértelműen meghatározhatók.

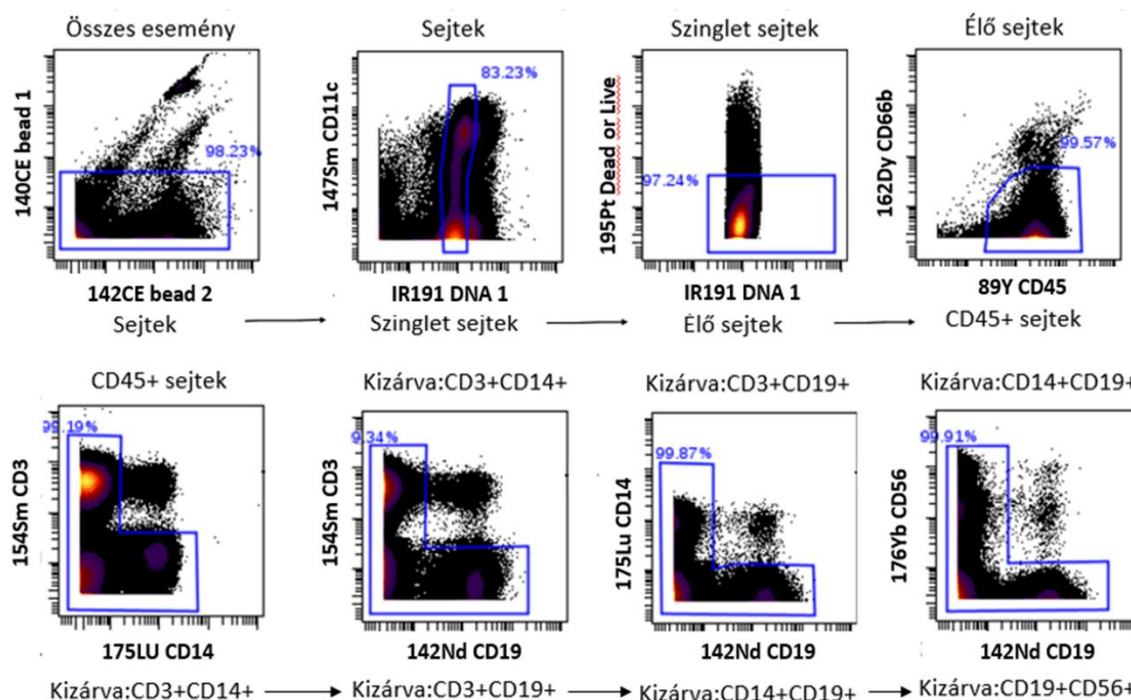
IV.6 CyTOF mérés

A mintát háromszor mostuk 4 ml MCSB-vel, majd 30 µm-es Celltrics (System Hungaria Kft.) gravitációs sejtszűrőn szűrtük, a sejtkoncentrációt 7×10^5 /ml állítottuk be Maxpar Cell Acquisition oldat (Fluidigm) hozzáadásával. Utolsó lépésben a mintához EQ

négy elemű kalibrációs gyöngyöket (Fluidigm) adtunk 1:10 arányban, majd a gyártó utasításai szerint beállított Helios egysetjt-tömegcitométeren (Fluidigm) lemértünk. Ahhoz, hogy azonosítani a tudjuk a ritka sejt-alpopulációkat, 1×10^6 eseményt mértünk egyedi PBMC mintánként. A tömeg-citométer által generált standard fájlokat (FCS) CyTOF szoftverrel (Fluidigm, verzió: 7.0.8493) randomizáltuk és normalizáltuk az alapbeállítások szerint.

IV.7 CyTOF adatfeldolgozás

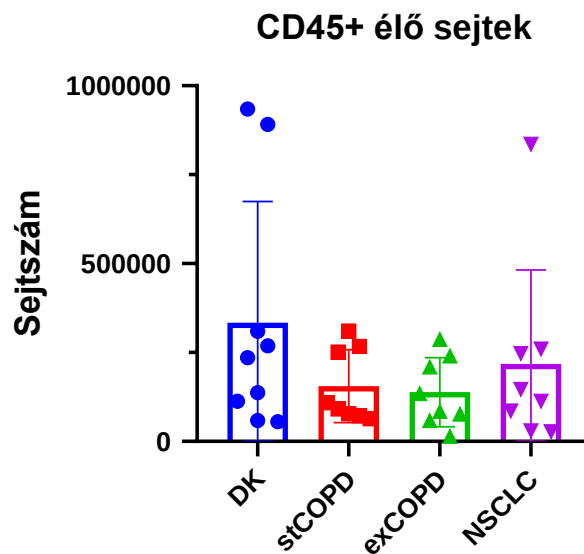
A randomizált és normalizált FCS mérési fájlokat a Cytobank (Beckman Coulter) online analizáló platformra töltöttük fel, majd manuális kapuzással kizártuk a normalizációs gyöngyöket, a ciszplatin pozitív halott sejteket és a törmeléket, illetve az összetapadt sejteket. Szintén hagyományos kapuzással meghatároztuk az élő, szinglet (egysejt), CD45+ sejteket, melyen a további mintaelemzés történt. A kapuzás során a fő populáció meghatározó markerekre, mint a CD3 (T-limfociták), CD14 (monociták), CD19 (B-sejtek), CD56 (NK-sejtek) kettős pozitív sejtpopulációkat kizártuk a további analízisból (7. ábra).



7. ábra: Manuális kapuzási stratégia az élő, egysejt, CD45+ immunsejtek meghatározására. Első lépésben a kalibrációs gyöngyök kizárásával meghatároztuk a sejteket. Majd definiáltuk a szingleteket (egysejt), ezt követően pedig a halott sejtek kizárásával (Pt195 pozitívak) az élő sejteket, majd pedig a CD45+ sejteket. Továbbá, kizártuk a CD3+/CD14+, CD3+/CD19+,

CD14+/CD19+ és CD19+/CD56+ sejteket. A kapuzási hierarcia balról jobbra halad, a pont ábrák címe a parentális populáció, alattuk pedig a kapuban lévő populáció olvasható.

A CD45+ sejtek meghatározását követően a minták közötti sejtszámokat Kruskal-Wallis teszttel összehasonlítottuk, majd megállapítottuk, hogy a minták sejtszámai közötti nincs szignifikáns eltérés, így a további kiértékelés során kapott statisztikai adatok közötti szignifikáns különbségek nem a csoportok közötti sejtszámeltérésekből származnak (8.ábra). Az élő, szinglet, CD45+ sejteket tartalmazó FCS fájlokat exportáltuk és további elemzésüket RStudio szoftverrel (Posit) végeztük el. A fájlok kompenzálását, klaszterezését és dimenziócsökkentő vizualizációját a Crowell HL et al. által publikált cikkben ([69]) leírtak szerint végeztük el. Az FCS fájlokat CATALYST és FlowCore R csomagokkal integráltuk, kompenzáltuk majd transzformáluk. A jel-áthallás kompenzálását követően a CyTOF medián markerintezitásokat inverz szinusz hiperbolikususszal ($\arcsinh$) 5-ös kofaktorral transzformáltuk. A főpopulációk meghatározásához a transzformált fájlokon áramlási önszerveződő térképen alapuló klaszterező algoritmust (FlowSOM) futattunk, mely a sejteket marker expressziójuk alapján csoportokba, másnéven klaszterekbe sorolja. Az ily módon meghatározott fő immunsejt populációkat egy újabb FlowSOM analízissel további alpopulációkra, úgynevezett metaklaszterekre bontottunk. A klaszterezés során a klaszterek számát a felhasználó adja meg, az optimális klaszterszámot az összegyűjtő eloszlás függvény (CDF) platópontja határozza meg. A humán perifériás immunrendszer főbb sejtcsoportjainak ábrázolásához UMAP-et (Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction) futtatunk összesen 300.000 sejt és 29 marker felhasználásával.



8.ábra: A CD45+ élő sejtek számának csoportok közötti eloszlása. A CD45+ immunsejtek csoportok közötti eloszlásában nincs szignifikáns eltérés.

IV.8 Sejtszortolás

Első lépésben a CD4+ T-sejtek izolálását, majd pedig a CD4+ centális memória (CD4+ CM) és CD4+ effektor memória (CD4+ EM) T-sejtek szortolását végeztük el. A PBMC mintákat a folyékony nitrogénből felolvasztottuk, majd Tripánkék festéssel Bürker-kamrában meghatároztuk a minta sejtszámát és életképességét. A sejteket 50 µl 1:20 v/v TrueStain FcX™ FC receptor blokkoló reagenst tartalmazó PBS-ben felfuszpendáltuk és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A CD4+ T sejtek izolálását a gyári, Dynabeads™ FlowComp™ Human CD4 Isolation kit from PBMC (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával végeztük a gyártó utasításait követve. A szortoláshoz felhasznált, populációt meghatározó antitestek (3.táblázat) titrálását követően, a CD4+ T-sejteket 50 µl 25X hígított antitesteket tartalmazó FACS pufferben (2% FBS-t tartalmazó 1X PBS) inkubáltuk 45 percig, szobahőmérsékleten. 1 ml FACS pufferrel mosás és 350 x g, 5 perces centrifugálás után a pelletet szortoláshoz 2mM EDTA-t tartalmazó FACS pufferben szuszpendáljuk fel. A szortolást FACSJazz (Beckman Coulter) sejtszorterrel végeztük, a sejtpopulációk meghatározásához manuális kapuzást alkalmaztunk:(1) CD4+ EM T-sejtek (CD45RA-/CD45RO+/CD197-) vagy (2) CD4+ CM T-sejtek (CD45RA-/CD45RO+/CD197+).

Antitest (klón)	Fluorofór	Gyártó
CD45RA (HI100)	FITC	Biolegend
CD45RO (UCHL1)	PerCP-Cy5.5	Biolegend
CD197/CCR7 (G043H7)	PB	Biolegend

3.táblázat: CD4+ EM és CD4+ CM T-sejtek szortolásához használt antitestek listája.

IV.9 Minta előkészítés RNS szekvenáláshoz

A szortolt sejteket 350 x g, 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszó eltávolítása után 500 µl TRIzol lízispufferben (Thermo Fisher Scientific) felfuszpendáltuk és -80°C-on tároltuk. Az RNS izolálást az RNeasy Micro kit (Qiagen) felhasználásával végeztük a gyártó utasításai szerint. Az izolálást követően 20 U/µl RNase inhibítort (ThermoFisher Scientific) adtunk a mintákhoz 100X-os hígításban. Az RNS minták koncentrációját és tisztaságát NanoDrop™ One készülékkel határoztuk meg. A vizsgált memóriasejtek relatív alacsony száma, és az ebből adódó mintánkénti alacsony RNS koncentráció miatt, az RNS szekvenáláshoz a vizsgálati csoportok RNS mintáit azonos mennyiségben összekevertük (egy csoporton belül 3-5 személy RNS mintáit, azonos mennyiségben). Az RNS-szekvenálást (Massive Analysis of cDNA Ends) a GenXPro GMBH (Frankfurt Am Main, Németország) szolgáltatásként végezte el. A génkészlet dúsítás analízist a GSEA 4.1.0 szoftverrel végeztük ([70]). A szoftvert CLI módban futtatuk és a kiolvasatait egyedi R szkripteken keresztül analizáltuk.

IV.10 Plazmafehérjék kvantitatív meghatározása

A plazmamintákból 17 különböző immun-onkológiai ellenőrzőpont fehérje koncentrációjának multiplex meghatározását Luminex xMAP (MAGPIX®) technológiával, Human Immuno-Oncology Checkpoint Protein Panel 1 - Immuno-Oncology Multiplex Assay (Cat. num.: HCKP1-11, Merck) felhasználásával végeztük el a gyártó utasításait követve. A 20 ml K₂EDTA-val alvadésgátolt perifériás vérből izolált plazmamintákat a vizsgálat lefutásáig -80°C-on tároltuk. Minden mintát kódolva tároltunk és vizsgáltunk. Egy 96-lyukú lemezre 25 µl befogó antitesttel bevont, fluoreszcensen jelölt mágneses gyöngyöt vittünk fel. Mintánként 50 µl plazmát mértünk a mintákat, 25 µl standard és 25 µl mátrix oldatot pedig a standard mintákat tartalmazó lyukakba. 2 óra szobahőmérsékletű inkubálást és mosási lépéseket követően 25 µl biotinilát detekciós antitestet, majd 25 µl sztreptavidin-fikoetitrin konjugátumot adtunk minden mintához a lemezen. Az inkubálási és mosási lépések után 150 µl vivőfolyadékot adtunk minden mintához, majd a lemezt Luminex xMAP (MAGPIX®) készüléken

olvastuk le. Az adatokat az Analyst 5.1 (Merck) programmal kiértékeljük és meghatároztuk a 17 plazmafehérje koncentrációját. A vizsgált 17 plazmafehérje panelje és a kimutatási tartomány (pg/ml-ben az alsó és a felső határérték között) a 4. táblázatban található. Az adatokat GraphPad Prism v8 (Dotmatics) programban ábrázoltuk.

Fehérje rövid neve	Fehérje teljes neve	Gén név	UniProt ID	Detekciós határ (pg/ml)
BTLA	B- és T-limfocita attenuátor/CD272	BTLA	Q7Z6A9	16,63-198560
CD27	CD27 antigén	CD27	P26842	10,04-172511
CD28	T-sejt specifikus sejtfelszíni glikoprotein CD28	CD28	P10747	1121,23-199220
CD40	Tumon nekrosis faktor szupercsalád 5-ös tagja	CD40	P25942	2,37-23003
CD80/B7-1	T-limfocita aktivációs antigén CD80	CD80	P33681	7,59-71188
CD86/B7-2	T-limfocita aktivációs antigén CD86	CD86	P42081	32,56-186,951
CTLA-4	Citotoxikus T-limfocita protein 4/CD152	CTLA4	P16410	5,04-74684
GITR	Tumon nekrosis faktor receptor szupercsalád 18-as tagja/CD357	TNFRSF18	Q9Y5U5	3,07--79814
GITRL	Tumon nekrosis faktor ligand szupercsalád 18-as tagja	TNFSF18	Q9UNG2	13,57-29449
HVEM	Tumon nekrosis faktor receptor szupercsalád 14-es tagja/CD270	TNFRSF14	Q92956	1,22-14501
ICOS	Indukálható T-sejt kostimulátor/CD278	ICOS	Q9Y6W8	23,79-198219
LAG-3	Limfocita aktivációs gén 3 protein /CD223	LAG3	P18627	57,66-198972
PD-1	Programozott sejthalál protein1/CD279	PDCD1	Q15116	14,51-149468
PD-L1	Programozott sejthalál ligand 1/CD274	CD274	Q9NZQ7	2,37-36458
PD-L2	Programozott sejthalál ligand 2/CD273	PDCD1LG2	Q9BQ51	15,85-189115
TIM-3	Hepatitis A vírus celluláris receptor 2/CD366	HAVCR2	Q8TDQ0	2,33-36013
TLR-2	Toll-like receptor 2/CD282	TLR2	O60603	33,88-198927

4.táblázat: A Human Immuno-Oncology Checkpoint Protein Panel 1 (Merck) 17 különböző plazmafehérjét tartalmazó panel összetétele a hozzájuk tartozó detekciós tartományokkal.

IV.11 Minták csoportosítása a plazmafehérje koncentrációk alapján

A 4 dohányos vizsgálati csoportból származó mintákban (DK, stCOPD, exCOPD és NSCLC) mért analitok koncentrációit a pheatmap R csomag (35) segítségével hőterképen ábrázoltuk. A hierarchikus klaszterezést az euklideszi távolság alapján és az R-ben található hclust módszerrel végeztük el.

IV.12 Statisztikai analízis

A CyTOF mérésekből kapott medián jelintenzitásokat, valamint a fő sejtpopulációk és alpopulációk eloszlásának statisztikai elemzését és ábrázolását GraphPad Prism 8.0.1 (Dotmatics) programmal végeztük el. Az adatok normalitását D'Agostino és Pearson – teszttel vizsgáltuk. Abban az esetben, ha minden csoport alfa értéke 0,05 alatt volt, az adathalmazt normál eloszlásúnak tekintettük. A normál eloszlású adatokat azonos szórás esetén normál ANOVA-val, egyenlőtlen szórások esetén Brown-Forsythe ANOVA-val hasonlítottuk össze. Nem normál eloszlású adatoknál Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk. Minden típusú szignifikancia tesztet többszörös összehasonlításra korrigáltuk, a hamis felfedezési arány (FDR) szabályozásával kétféle Benjamini, Krieger és Yekutieli megközelítéssel, 10%-os FDR határértékkel. A különbségek $*p < 0,05$; $** < 0,01$; $*** < 0,001$, $**** < 0,0001$ esetében tekinthetők szignifikánsnak.

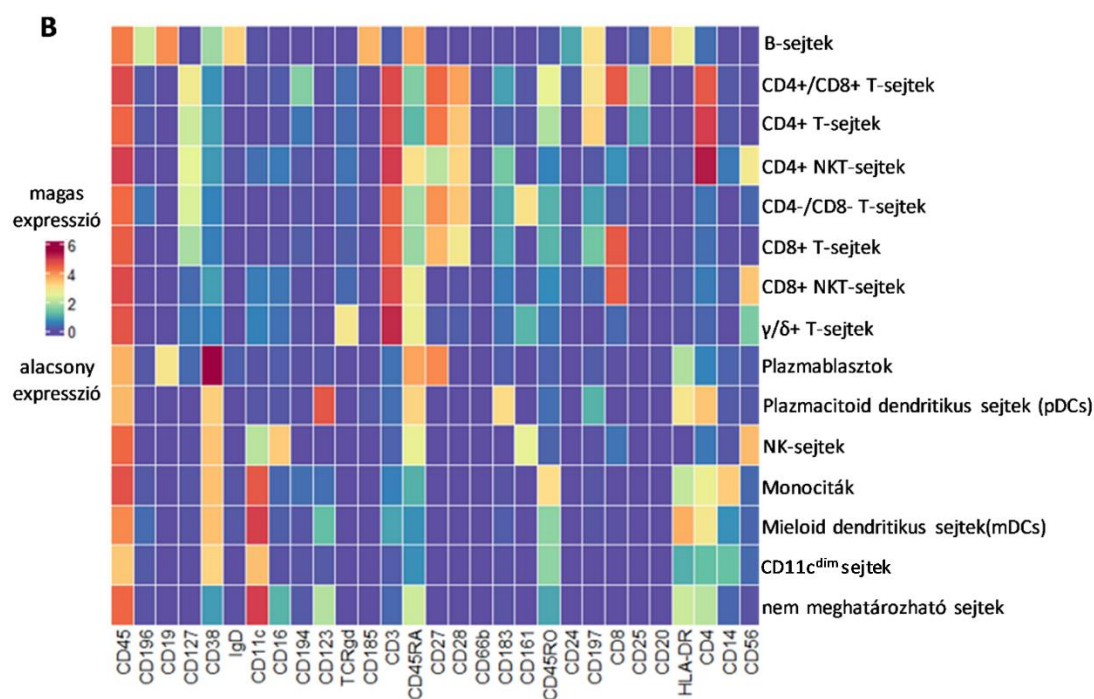
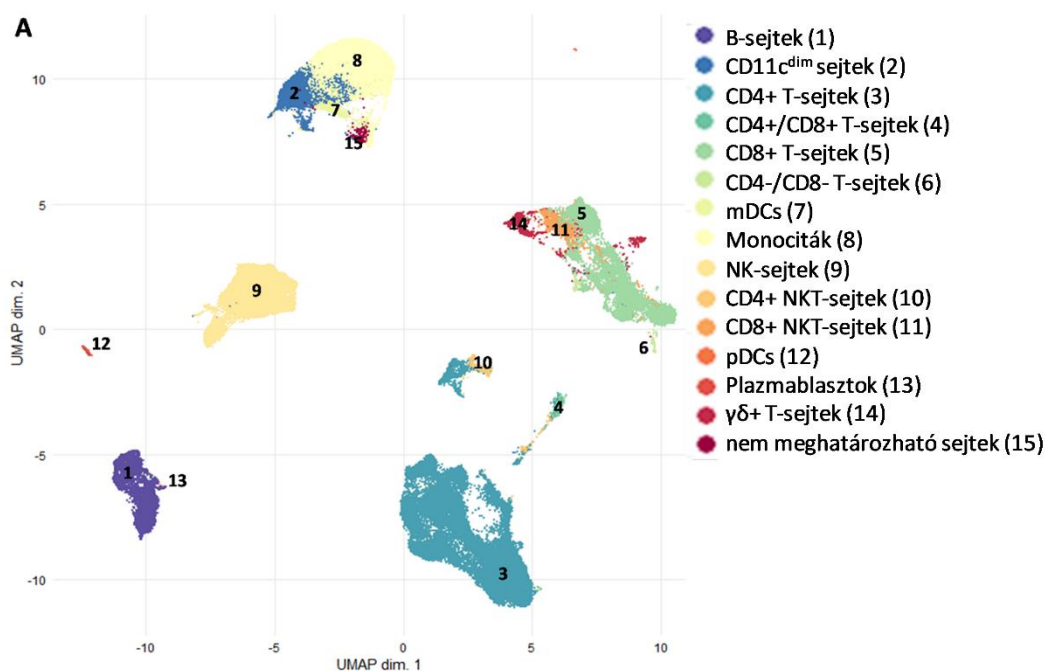
A plazmafehérjék Luminex mérése során a statisztikai szignifikancia kiszámítása Student's t-próbával történt. A statisztikai számításokat a dplyr v1.0.6 és az rstatix v0.7.0, a grafikonok ábrázolását a ggpubr v0.4.0 ggprism v1.0.3 R csomagok segítségével végeztük. A különbségek $*p < 0,05$; $** < 0,01$; $*** < 0,001$ esetében tekinthetők szignifikánsnak.

V. Eredmények

V.1 Egysejt-tömegcitometriás multiplex immunfenotipizás terápia naív, dohányos COPD-s és NSCL-s betegekben és dohányos kontrollokban

Egysejt-tömegcitometriás méréseinket 4 vizsgalati csoport - DK, stCOPD, exCOPD, NSCLC - perifériás vérből izolált PBMC mintáin végeztük. Méréseinkhez a kereskedelmi forgalomban kapható Human Immune Monitoring Panel kitet (Fluidigm) használtuk, mely 29 stabil fémizotóppal konjugált antitestet tartalmazott, így azonosítani tudtuk a fő immunsejt populációkat valamint azok további alpopulációt. Az adatelemzés során a kalibrációs gyöngyöket kizártuk, majd az élő, egysejt CD45⁺ sejteket manuális kapuzással határoztuk meg. Továbbá szintén kézi kapuzással, a CD45⁺ sejteken belül kizártuk az olyan kettős pozitív sejtek csoportjait, mint a CD3⁺/CD14⁺; CD3⁺/CD19⁺; CD19⁺/CD14⁺; CD19⁺/CD56⁺ sejtek, melyek vagy összetapadt kisebb sejtek vagy pedig a mérés során a csatornák közötti jel-áthallásból keletkezhetnek.

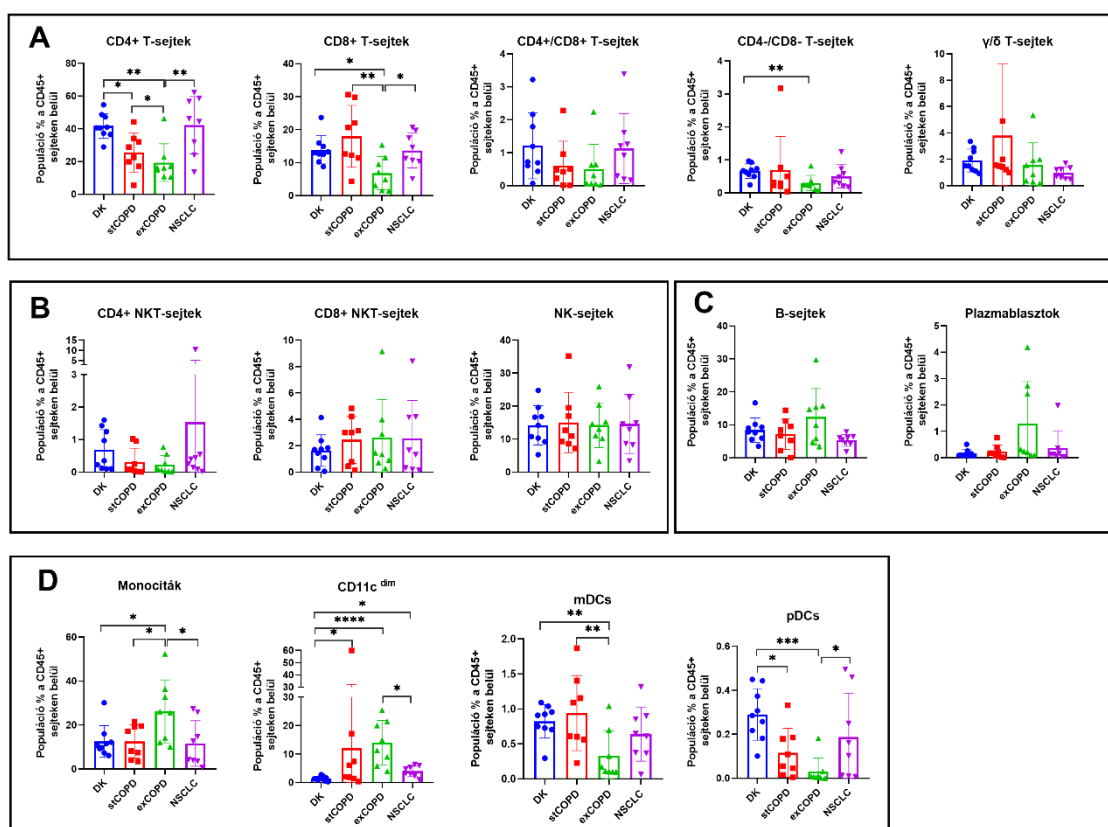
Az így kapott CD45⁺ egysejteken további felügyelet nélküli elemzéseket végeztünk, vizualizációhoz a UMAP-et (Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction) klaszterezéshez pedig a FlowSOM-ot (Self-Organizing Maps for flow cytometry), melyekkel 14 fő immunsejt populációt azonosítottunk, mint a CD4⁺ T-sejtek, CD8⁺ T-sejtek, CD4⁺/CD8⁺ T-sejtek, CD4⁻/CD8⁻ T-sejtek, γ/δ T-sejtek, NK-sejtek, CD4⁺ NKT-sejtek, CD8⁺ NKT-sejtek, plazmablasztok, B-sejtek, monociták, CD11c^{dim} sejtek, plazmacitoid dendritikus sejtek (pDC), monocitoid dendritikus sejtek (mDC) (9.A-B.ábra)



9.ábra: Fő immunsejt populációk meghatározása UMAP és FlowSOM analízissel. (A) Reprezentatív UMAP ábra 14 immunsejt populációval, ahol egy pont egy sejtet jelenít meg, így a „felhők” mérete azonos a sejtípusok arányával és eloszlásával. (B) Fő immunsejt populációk marker expressziós hő térképe, ahol a piros szín a magas, míg a kék szín az alacsony kifejeződést jelöli. Lila szín esetében nincs fehérje kifejeződés. Az analízist R Studio programban végeztük 33 FCS fájlra.

V.1.1 Fő immunsejt populációk

A fő immunpopulációk gyakoriságát a CD45+ élő sejtek arányában, százalékosan fejeztük ki. A CD4+ T-sejtek csoportok közötti eloszlását összehasonlítva a stCOPD és az exCOPD csoportban az egyharmadára, a DK esetén a felére csökken és NSCLC-ben a legmagasabb, míg a CD8+ T-sejtek aránya stCOPD-ben meghaladja a DK csoportot, ellenben az exCOPD-vel, ahol a felére csökken a DK csoporthoz viszonyítva. A CD4-/CD8- T-sejtek aránya szintén a exCOPD-ben a legalacsonyabb (10.A ábra). Ezzel szemben a monociták aránya kétszer nagyobb az exCOPD-ben a DK csoporthoz viszonyítva, a CD11c^{dim} sejtek aránya közel tízszeres a stCOPD és exCOPD esetén összehasonlítva a DK-val, míg az NSCLC csoporthoz képest pedig ötször magasabb arányban vannak jelen. A pDCs és mDCs alpopulációk a exCOPD csoportban vannak a legalacsonyabb jelen (10.C ábra). A további vizsgált immunsejt populációk esetén szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk (10.A-C ábra).

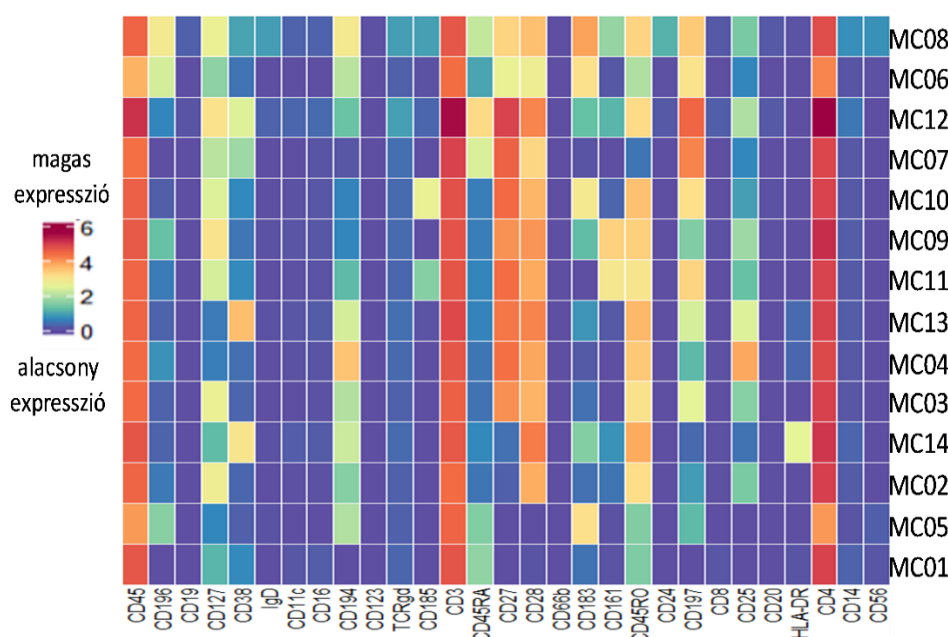


10.ábra: A 14 fő immunsejt populációk százalékos eloszlásának aránya a CD45+ sejteken belül. (A) A T-sejtek alpopulációinak vizsgálati csoportok közötti eloszlása, mint CD4+, CD8+, CD4+/CD8+, CD4-/CD8- és γ/δ T-sejtek. (B) NK-sejt altípusok eloszlása: NK-sejtek, CD4+ NKT-sejtek, CD8+ NKT-sejtek. (C) A B-sejtek és plazmablasztok eloszlása a vizsgálati

csoportokba. (D) A mieloid eredetű sejtpopulációk, mint a monociták, CD11c^{dim}, pDCs és mDCs százalékos eloszlása. Szignifikáns az érték, ha az FDR q értéke < 0,1 és p * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, **** < 0,0001.

V.1.1.1 T-sejtek

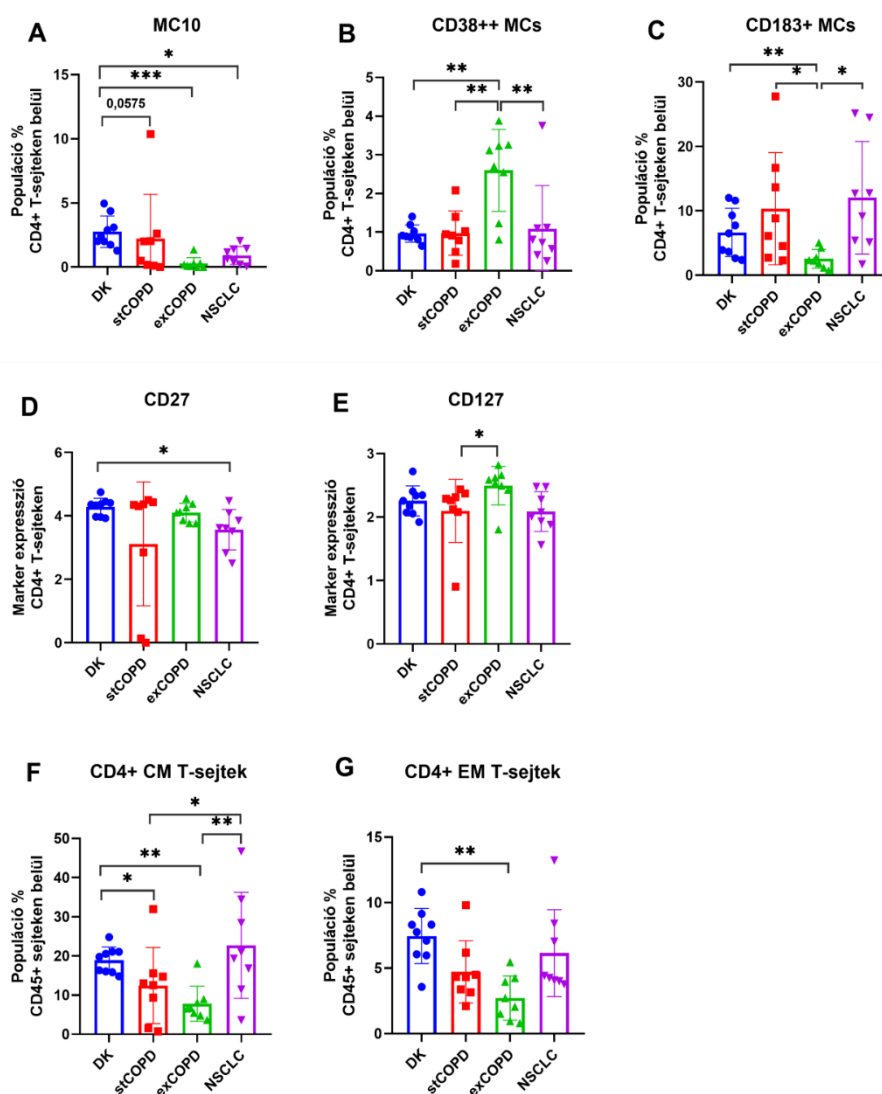
A dohányos, COPD-s betegek adaptív immunrendszerének aktiválódása, valamint tüdőrák esetén a T-sejtek diszfunkciója vagy kimerülése már régóta ismert ([25], [71], [72]), ezért fókuszunkat a T-sejtek különböző alpopulációinak vizsgálatára összpontosítottunk. A CD4⁺ T-sejtek főpopulációjában a különböző marker expressziós mintázatok alapján 14 metaklasztert (MC) azonosítottunk (11.ábra).



11.ábra: A CD4⁺ T-sejtek FlowSOM analízisének marker expressziós hő térképe, ahol a piros szín a magas, míg a kék szín az alacsony kifejeződést jelöli. Lila szín esetében nincs fehérje kifejeződés. Az analízist R Studio programban végeztük A CD4⁺ T-sejtek marker profilja alapján 14 metaklasztert határoztunk meg.

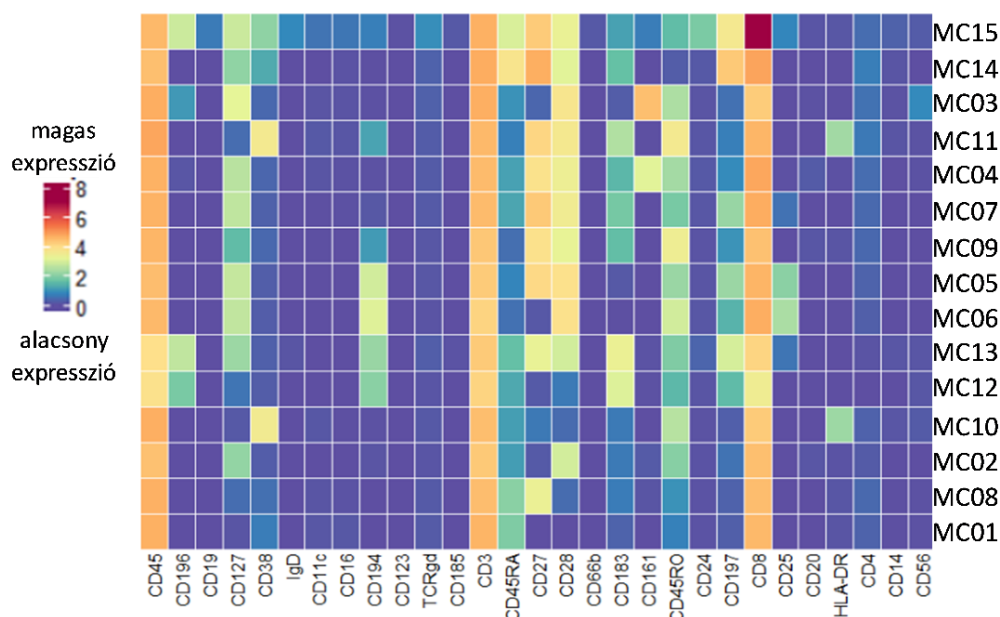
Szignifikáns különbségeket találtunk a CD4⁺/CD185⁺ MC10-ben, melynek gyakorisága exCOPD-ben és NSCLC-ben csökkent (12.A ábra). A CD38^{bright}, vagyis CD38-at magasan expresszáló CD4⁺ T-sejtek csoportját a CD38⁺⁺ MC-t a MC13 és MC14 metaklaszterek összevonásával határoztuk meg, amelyek gyakorisága exCOPD-ben a legmagasabb (12.B ábra). Ezzel ellentétben a CD183⁺ MC-k, vagyis az MC05, MC06, MC08, MC10 összevonásával létrehozott csoport exCOPD-ben a legalacsonyabb (12.C ábra). Ami az összes CD4⁺ T-sejt marker expresszióját illeti, a CD27 kifejeződése

csökken NSCLC-ben összehasonlítva a DK-val (2D ábra), a CD127 pedig stCOPD-ben mutat alacsonyabb kifejeződést. az exCOPD-hez képest. (2E ábra). A továbbiakban fókuszunk a CD4⁺ memóriasejtek, így a CD4⁺ CM (centrális memória) és a CD4⁺ EM (effektor memória) T-sejtek irányába szűkült. A CD4⁺ CM sejteket a MC03, MC10, MC11, MC13 metaklaszterek összevonásával, CD4⁺/CD45RA⁻/CD45RO⁺/CD197⁺ sejtekként definiáltuk. A CD4⁺ EM sejteket a MC02, MC04, MC09, MC14 metaklaszterek egyesítésével, CD4⁺/CD45RA⁻/CD45RO⁺/CD197⁻ sejtekként határoztuk meg. A CD4⁺ CM és CD4⁺ EM sejtek aránya minden vizsgálati csoport közül az exCOPD csoportban a legalacsonyabb (12.F-G ábra).



12.ábra:A CD4⁺ T-sejtek alpopulációinak eloszlása (A-C) és marker-expressziós profilja (D-E) a különböző vizsgálati csoportokba. A CD4⁺CM (F) és CD4⁺EM (G) T-sejtek százalékos arányának különbségei. Szignifikáns az érték, ha az FDR q értéke < 0,1 és p * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

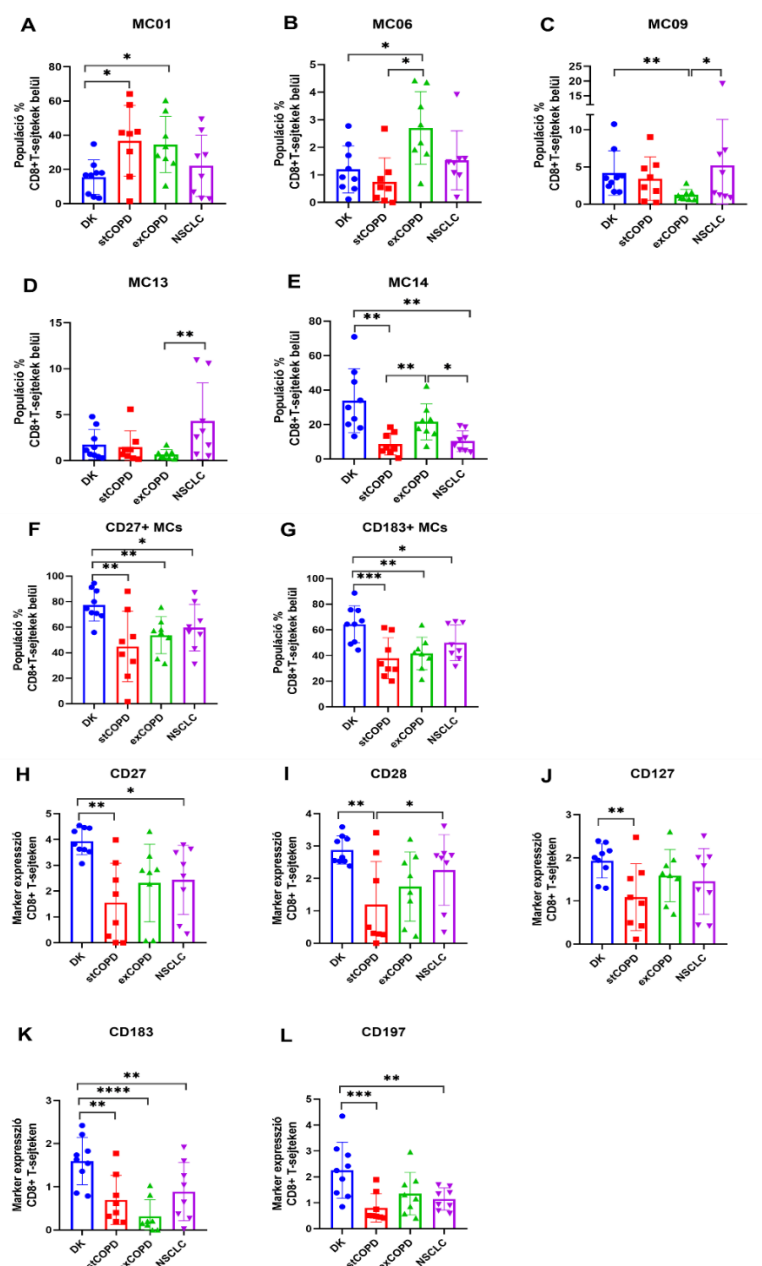
Vizsgálataink során a CD8⁺ T-sejteket FlowSOM analízisét is elvégeztük, mellyel 15 metaklasztert határoztuk meg (13.ábra).



13.ábra: A CD8⁺ T-sejtek FlowSOM analízisének marker expressziós hő térképe, ahol a piros szín a magas, míg a kék szín az alacsony kifejeződést jelöli. Lila szín esetében nincs fehérje kifejeződés. Az analízist R Studio programban végeztük A CD8⁺ T-sejtek marker profilja alapján 15 metaklasztert határoztunk meg.

A statisztikai analízis eredményeképp több szignifikáns különbségeket találtunk a metaklaszterek százalékos eloszlásában valamint a marker kifejeződési mintázatokban is a betegcsoportok és a dohányos kontrollcsoport között. A metaklaszterek szignifikáns eltéréseit a 14.ábra oszlopdiagramjai (A-G) mutatják be. A MC01: CD45RA^{dim} alpopuláció százalékos aránya a betegcsoportokban emelkedést mutat, a stCOPD és exCOPD csoportokban a legmagasabb a kontrollhoz viszonyítva, az MC06: CD28⁺/CD194⁺ alpopuláció az exCOPD csoportban a legmagasabb; az MC09: CD27⁺/CD45RO⁺ és az MC13: CD27⁺/CD183⁺/CD194^{dim} metaklaszterek aránya az exCOPD-ben a legalacsonyabb, míg az MC14: CD45RA⁺/CD197⁺ alpopuláció csökkenő tendenciát mutat a DK csoporthoz képest, a betegcsoportok közül pedig a exCOPD csoportban figyelhetünk meg szignifikáns emelkedést (14.A-E ábra). Az összevont CD27⁺ MC-t a MC04, MC05, MC07, MC08, MC09, MC11, MC13, MC14, MC15 sejtei képviselik, amelyek százalékos aránya a stCOPD-ben a legalacsonyabb, a betegcsoportok közötti eloszlásban pedig emelkedő tendencia ábrázolódik (14. ábra F). Az összevont CD183⁺ MC-t az MC04, MC07, MC09, MC11, MC12, MC13, MC14

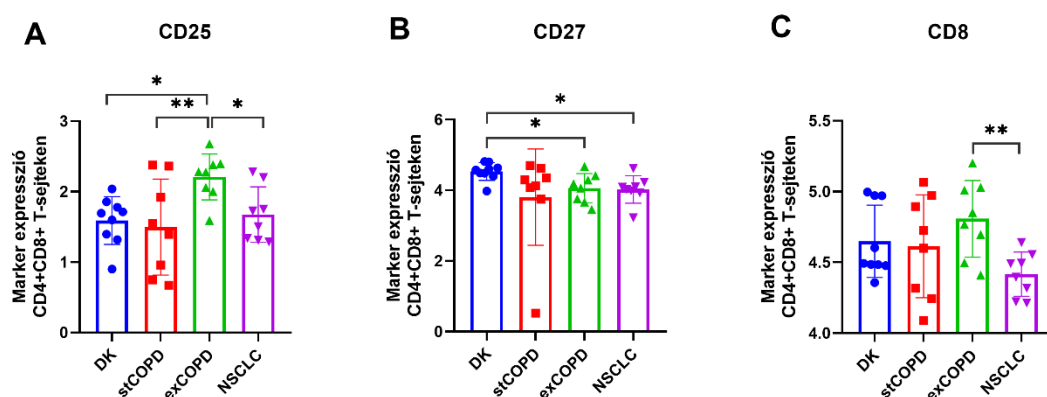
sejtjei képviselik, ami szintén a legalacsonyabb az stCOPD csoportban, a betegcsoportok közötti eloszlásban pedig emelkedő tendencia figyelhető meg, hasonlóan a CD27+ MC-hez. (14.G ábra). A CD27 és CD28 kifejeződése hasonló mintázatot mutat a vizsgált csoportokban, a legalacsonyabb expresszió a stCOPD-ben figyelhető meg (14.H-I ábra). A CD127 kifejeződése szignifikánsan csökkent a stCOPD csoportban (14.J ábra), míg a CD183 expressziója stCOPD és exCOPD-ben, a CD197 expressziója pedig az stCOPD-ben és az NSCLC-ben a legalacsonyabb a DK csoporttal összevetve. (14.K-L ábra).



14.ábra: A CD8+ T-sejtek alpopulációinak eloszlása (A-G), valamint marker expressziós mintázata (H-L) a vizsgált csoportokban. A különbség akkor szignifikáns, ha az FDR q értéke <

0,1 és $p < 0,05$, $** < 0,01$, $*** < 0,001$, $**** < 0,0001$. Szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk a MC01, MC06, MC09, MC13, MC14, illetve a CD27⁺ összevont MC-k és a CD183⁺ összevont MC-k esetén. A markerek kifejeződésének vizsgálatkor a CD27, CD28, CD127, CD183 és CD197 expressziójában találtunk szignifikáns eltéréseket.

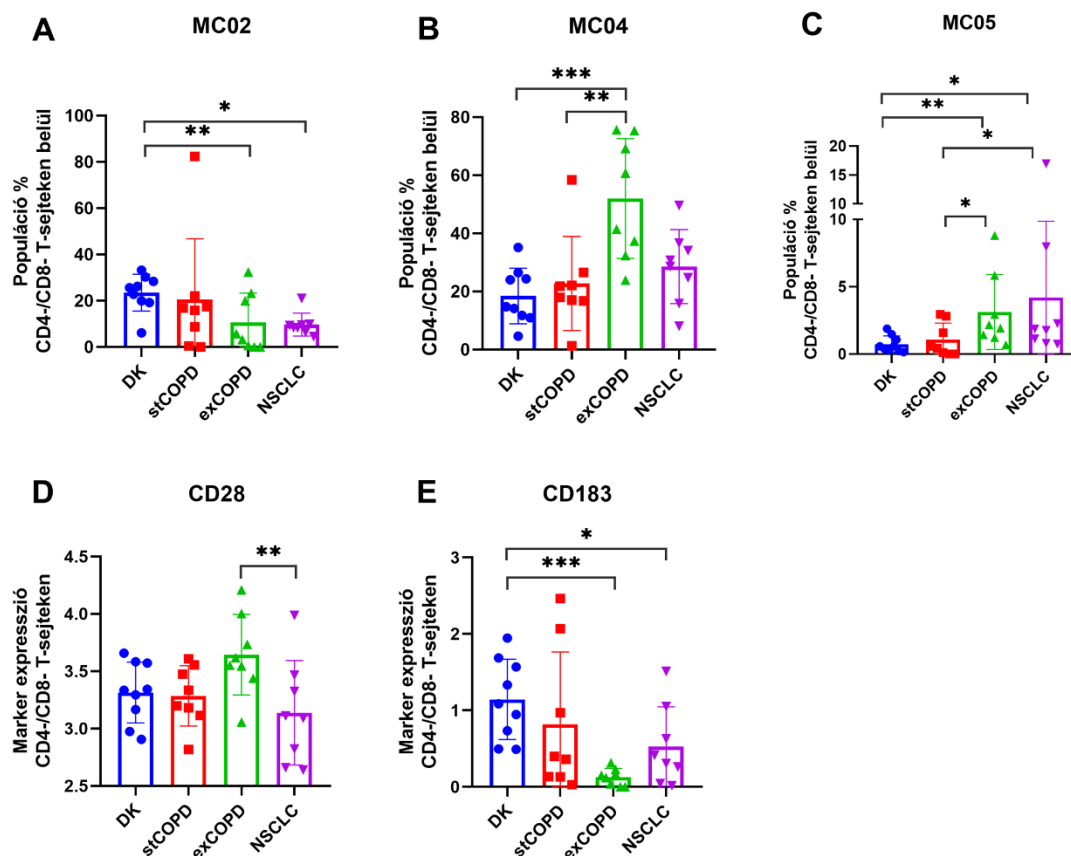
A CD4⁺/CD8⁺ úgynevezett kettős pozitív T-sejtek sejtfelszíni marker expressziós profiljuk alapján további alcsoportokra nem bonthatók, így a FlowSOM analízissel további metaklasztereket nem tudtunk meghatározni. Ellenben az CD4⁺/CD8⁺ T-sejtek marker kifejeződésében szignifikáns különbségeket tapasztaltunk. A CD25 expressziója az exCOPD csoportban a legmagasabb a DK, a stCOPD és a NSCLC csoportokkal összevetve egyaránt (15.A ábra). A CD27 kifejeződése az exCOPD és NSCLC csoportokban szignifikánsan csökken a DK-val összehasonlítva (15.B ábra), míg a CD8 expressziója az exCOPD csoportban a legmagasabb a betegcsoportokkal összevetve (15.C ábra).



15.ábra: A CD4⁺/CD8⁺ T-sejtek szignifikáns különbséget mutató markereinek expressziós profilja a 4 vizsgálati csoportban. A különbség akkor szignifikáns, ha az FDR q értéke $< 0,1$ és $p < 0,05$, $** < 0,01$. Szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk a CD25, CD27 és a CD8 sejtfelszíni markerek kifejeződésének statisztikai elemzésekor.

A CD4⁺/CD8⁻ úgynevezett kettős negatív T-sejtek alpopulációit marker expressziós különbségeik alapján FlowSOM analízissel 5 különböző metaklaszterbe soroltuk. Szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk a következő metaklaszterekre százalékos eloszlásában: MC02: CD27⁺/CD127⁺/CD161⁺, mely az exCOPD és NSCLC-ben van a legalacsonyabban jelen, az MC04: CD38^{bright} a betegcsoportban emelkedést mutat, legnagyobb arányban az exCOPD-ben figyelhető meg, az MC05: CD38^{bright}/CD183⁺/CD196⁺ aránya pedig egyre magasabb a stCOPD-től a NSCLC irányába (16.A-C ábra). A sejtfelszíni markerexpressziók tekintetében szignifikáns

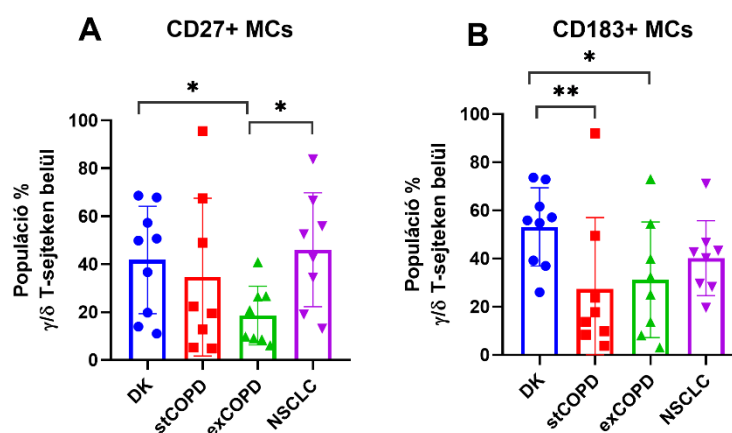
eltérést tapasztaltunk a CD28 esetén, mely kifejeződésében szignifikáns csökkenés figyelhető meg NSCLC-ben az exCOPD-hez képest (16.D ábra). A CD183 expressziójában is csökkenés tapasztalható a betegcsoportokban a DK-val összevetve, szignifikáns csökkenést az exCOPD és NSCLC csoportokban találunk (16.E ábra).



16.ábra: A CD4-/CD8- kettős negatív T-sejtek metaklasztereinek eloszlásának (A-C) és sejtfelszíni marker kifejeződésének (D-E) szignifikáns eltérései. A különbség akkor szignifikáns, ha az FDR q értéke < 0,1 és $p < 0,05$, $** < 0,01$, $*** < 0,001$. Az analízis során az MC02, MC04, MC05 csoportok közötti arányában ill. a CD28 és a CD183 kifejeződésében mutatkoztak szignifikáns különbségek.

A γ/δ T-sejtek FlowSOM analízisével 11 metaklasztert határoztunk meg. A CD27+ γ/δ T-sejt metaklasztert az MC03-MC07 metaklaszterek összevonásával definiáltuk. A CD27+ metaklaszter eloszlásában szignifikáns eltérést tapasztaltunk, legalacsonyabb százalékban az exCOPD csoportban van jelen a DK és NSCLC csoporttal összevetve egyaránt (17.A ábra). A CD183+ metaklasztert a MC03, MC04, MC06, MC07 és MC11 összevonásával határoztuk meg. A CD183+ alpopuláció százalékos aránya a

stCOPD és exCOPD betegcsoportban szignifikáns csökkenést mutat a DK és NSCLC csoporttal összehasonlítva.

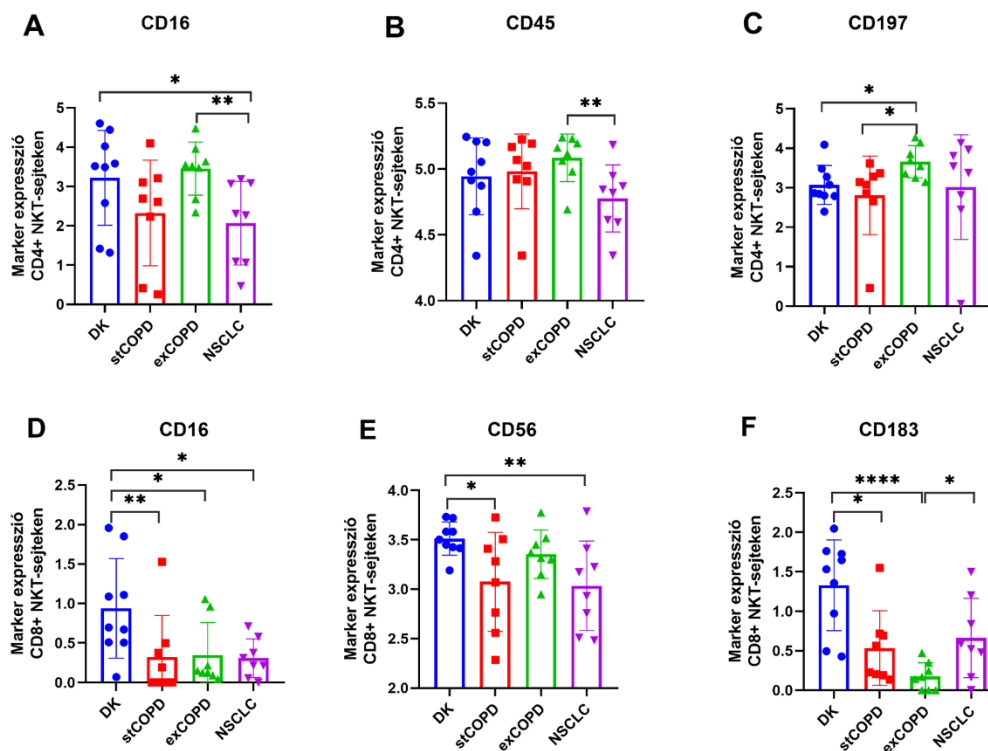


17.ábra: A γ/δ T-sejtek CD27+ (A) és CD183+ (B) metaklasztereinek populáció százalékos eloszlása a vizsgált csoportokban. A különbség akkor szignifikáns, ha az FDR q értéke $< 0,1$ és $p < 0,05$, $** < 0,01$.

A CyTOF-al végzett, úgynevezett mély immunfenotipizálás jelentős különbségeket tárt fel 46 további nem T-sejtes populációban és alpopulációikban illetve sejtfelszíni marker expressziós profiljukban.

V.1.1.2 NKT-sejtek:

A CD4+ NKT-sejtek és a CD8+ NKT-sejtek FlowSOM analízise során 3-3 metaklasztert azonosítottunk. A metaklaszterek százalékos arányában szignifikáns különbségeket nem tapasztaltunk, ellenben a marker expressziós mintázatokban megfigyelhetünk szignifikáns eltéréseket, mint a CD16, CD45 és CD197 az CD4+ NKT-sejteken (18.A-C ábra), valamint a CD16, CD56 és CD183 a CD8+ NKT-sejteken (18.D-F ábra). A CD4+ NKT-sejteken CD16 kifejeződése az NSCLC-ben a legalacsonyabban a DK-val összehasonlítva, a CD45 expressziója szintén az NSCLC-ben a legalacsonyabb az exCOPD-vel összevetve, míg a CD197 kifejeződése az exCOPD-ben a legmagasabb a DK és stCOPD-vel összevetve. A CD8+ NKT-sejteken a a CD56 kifejeződése az stCOPD-ben csökkent, míg az NSCLC-ben a legalacsonyabb a DK-hoz képest, a CD16 expressziója pedig a DK-val összevetve minden betegcsoportban szignifikánsan lecsökkent, a CD183 kifejeződése szintén minden betegcsoportban csökkenést mutat a DK-val összehasonlítva, legalacsonyabban pedig az exCOPD-ben expresszálódik.

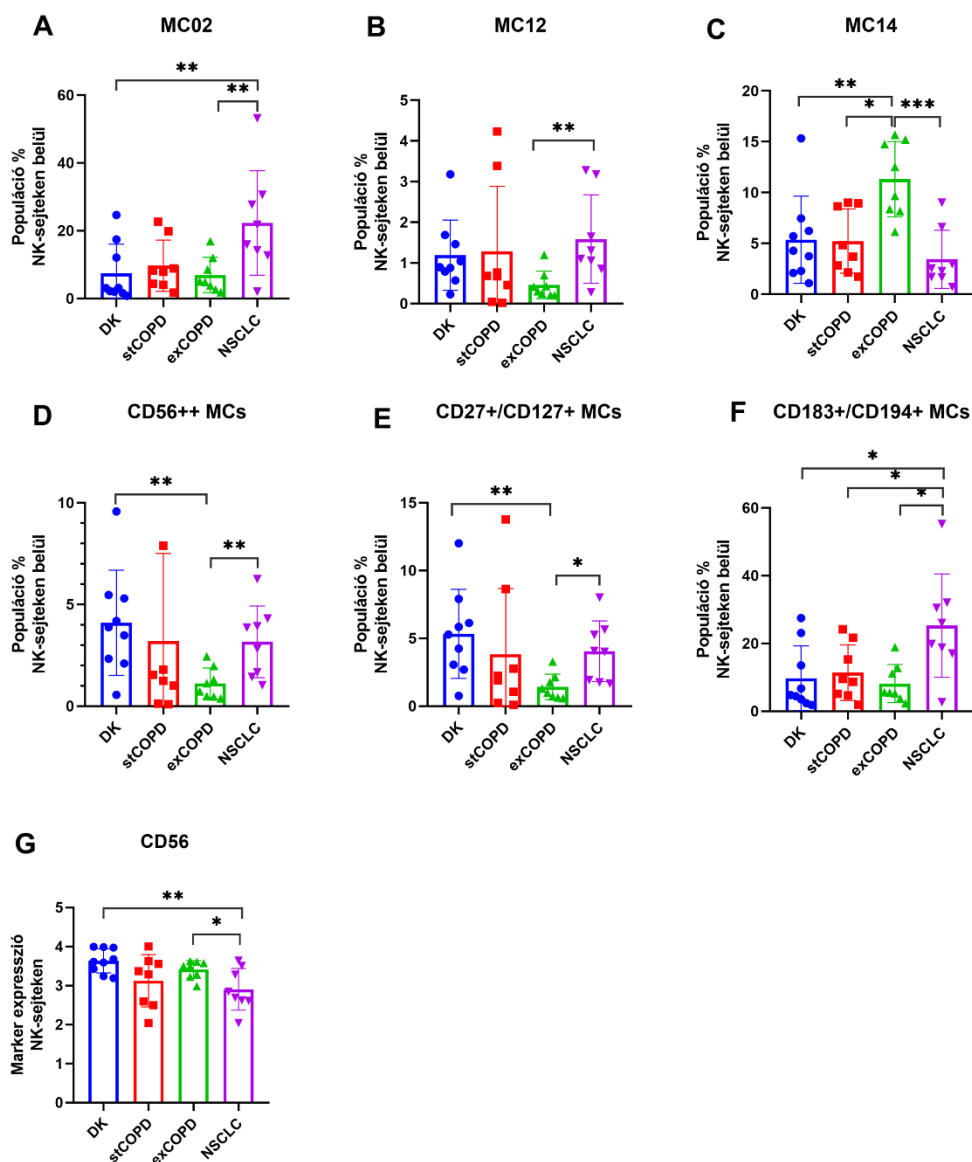


18.ábra: A CD4+NKT-sejtek és CD8+ NKT-sejtek marker expressziójának csoportok közötti szignifikáns eltérései (A-F). A különbség akkor szignifikáns, ha az FDR q értéke $< 0,1$ és $p < 0,05$, $** < 0,01$, $*** < 0,001$, $**** < 0,0001$. A statisztikai elemzés során összehasonlítottuk a markerek kifejeződését a különböző csoportokban, a CD4+ NKT-sejtek CD16, CD45 és CD197, a CD8+ NKT-sejtek CD16, CD56 és CD183 markereinek expressziójában kaptunk szignifikáns különbségeket.

V.1.1.3 NK-sejtek:

Az NK-sejtek FlowSOM analízisével 18 metaklasztert határoztunk meg, melyekből 7 mutatott szignifikáns különbséget a vizsgált csoportok között. A MC02: CD11c-/CD45RO-/CD183+ az exCOPD és DK csoporttal összevetve szignifikánsan emelkedett NSCLC-ben, hasonlóan az MC12: CD56^{bright}/CD27-/CD161- metaklaszterrel, mely szintén emelkedést mutat NSCLC-ben az exCOPD-hez képest (19.A-B ábra). A MC14: CD11c-/CD38+/CD161- metaklaszter szignifikánsan a legnagyobb százalékban az exCOPD-ben van jelen a DK, a stCOPD és az NSCLC-vel összehasonlítva (19.C ábra). Az összevont metaklasztereket vizsgálva további szignifikáns különbségeket találtunk, mint a CD56⁺⁺ MC: MC05-06, MC09, MC12 összevonásával, valamint a CD27⁺/CD127⁺ MC: MC04-06, MC09 és MC12 összevonásával melyek százalékos aránya exCOPD-ben a legmagasabb a DK és NSCLC-vel összehasonlítva (19.D-E ábra) A

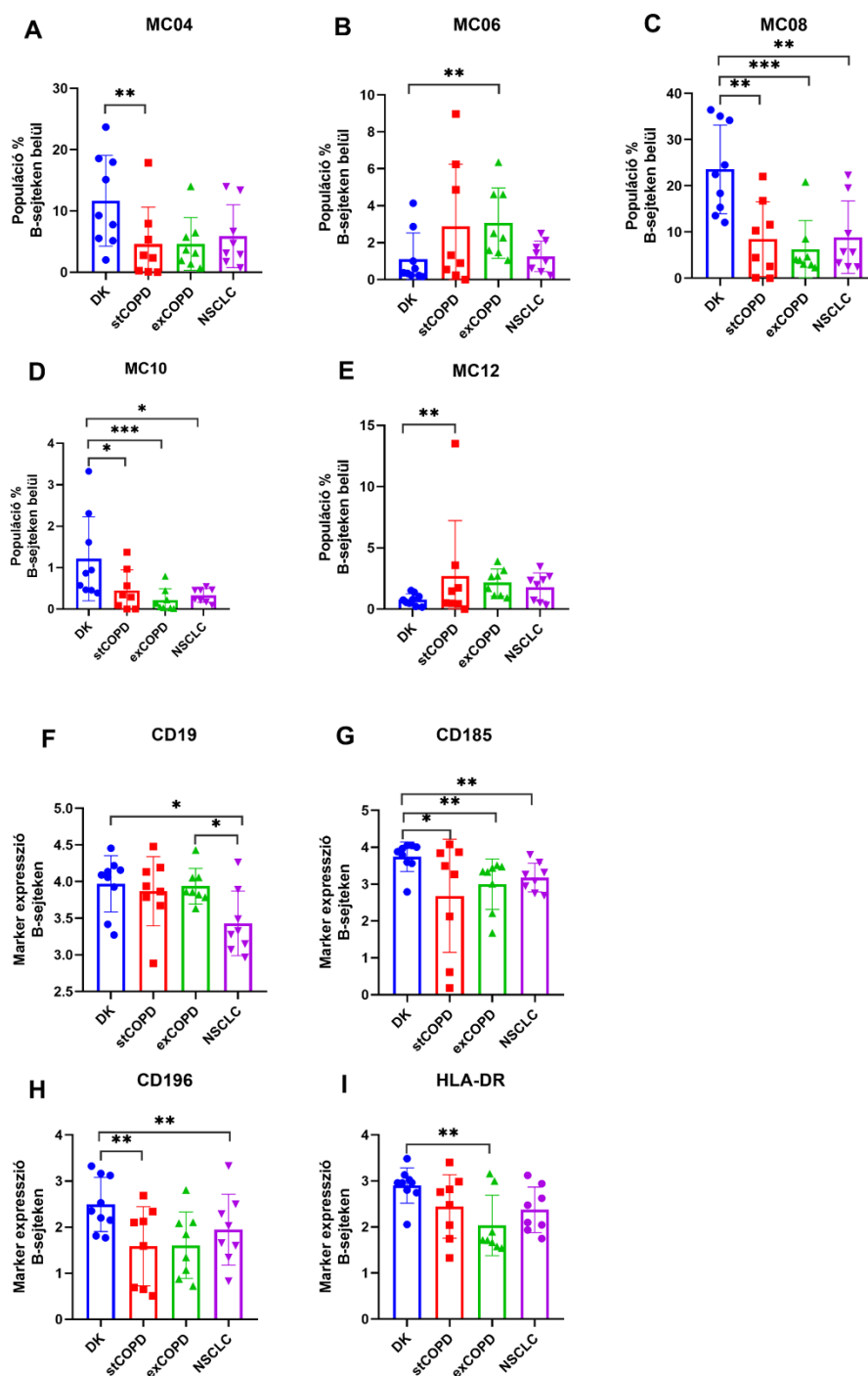
CD183+/CD194+ MC: MC01-02, MC07 összevonásával létrehozott metaklaszter, mely NSCLC-ben a van jelen legmagasabb arányban a DK, stCOPD és exCOPD csoportokkal összevetve egyaránt (18.F ábra). Továbbá, szignifikánsan csökkent CD56 kifejeződést figyeltünk meg az NSCLC csoportban a DK és exCOPD-vel összevetve (19.G ábra).



19.ábra: Az NK-sejtek metaklasztereinek csoportok közötti eloszlásának (A-F) és a CD56 kifejeződésének (G) szignifikáns eltérései a vizsgált csoportokban. A különbség akkor szignifikáns, ha az FDR q értéke < 0,1 és $p < 0,05$, $** < 0,01$, $*** < 0,001$. Az NK-sejtek MC02, MC12 és MC14 alpopulációnak és a CD56++, CD27+/CD127+, CD183+/CD194+ összevont metaklasztereinek csoportok közötti eloszlása és a CD56 kifejeződése a különböző csoportokban szignifikáns különbséget mutatnak.

V.1.1.4 B-sejtek

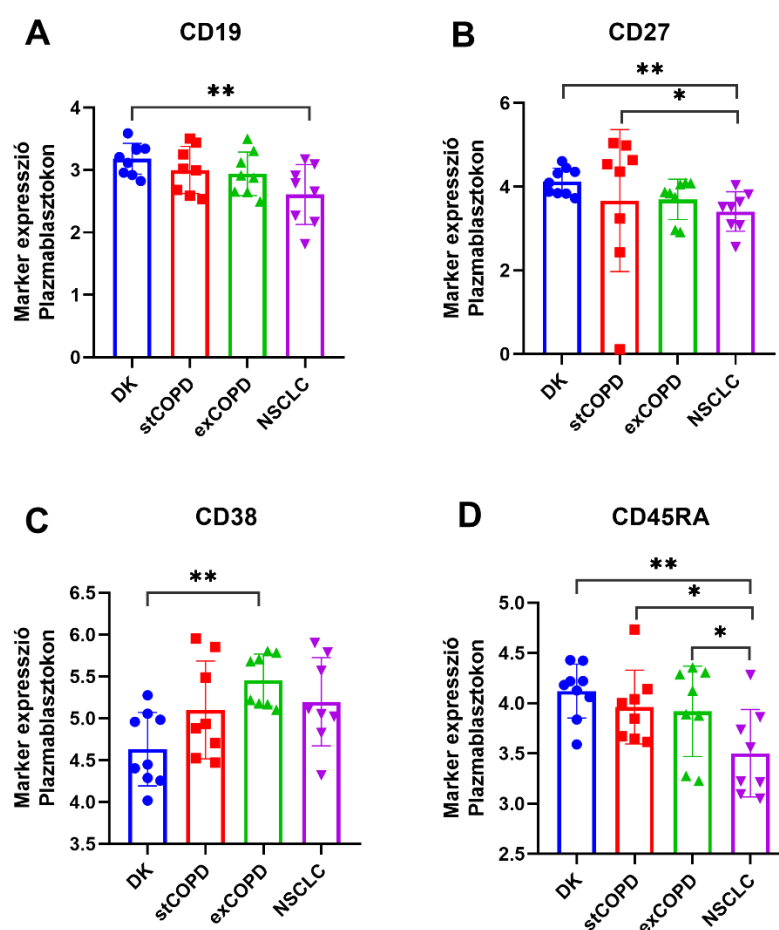
A B-sejtek marker expressziós profilja alapján 15 metaklasztert határoztunk meg FlowSOM analízissel, melyek közül 5 metaklaszter csoportok közötti százalékos eloszlásának arányában, valamint a CD19, CD185, CD196 és HLA-DR markerek kifejeződési mintázatában tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket. Az MC04: CD45RA^{bright}/CD185+/IgD+ aránya szignifikánsan lecsökkent a stCOPD csoportban, ellentétben az MC12: CD20^{bright}/CD196^{low}/CD197- -vel, amely szignifikáns emelkedést mutat DK-val összehasonlítva (20.A,E ábra). Az MC06: CD45RA+/CD185^{low}/IgD+ aránya az exCOPD-ben a legmagasabb (20.B ábra). Az MC08: CD45RA^{bright}/CD185+/IgD- és MC10: CD45RA+/CD185+/IgD- metaklaszterek százalékos eloszlása hasonló tendenciát mutat a vizsgált csoportok között (20.C-D ábra). Mindkét esetben szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a stCOPD, exCOPD és NSCLC esetében is a DK csoporthoz hasonlítva. A CD19 kifejeződése az NSCLC-ben a legalacsonyabb, míg a CD185 és CD196 expressziója a DK-val összevetve minden betegcsoportban alacsony, legalacsonyabb a stCOPD-ben, viszont a betegcsoportok között, a betegség súlyosbodásával párhuzamosan emelkedés tapasztaltunk a stCOPD-től az NSCLC irányába (20.F-H ábra). A HLA-DR kifejeződése az exCOPD-ben a legalacsonyabb (20.I ábra).



20.ábra: A B-sejtek metaklasztereinek csoportok közötti eloszlásának (A-E) és sejtfelszíni marker kifejeződésének (F-I) szignifikáns eltérései a vizsgált csoportokban. A különbség akkor szignifikáns, ha az FDR q értéke $< 0,1$ és $p < 0,05$, $** < 0,01$, $*** < 0,001$. Az MC04, MC06, MC08, MC10 és MC12 alpopulációk csoportok közötti aránya szignifikánsan eltér. A CD19, CD185, CD194 és HLA-DR expressziós profilja szignifikáns különbségeket mutat a vizsgált csoportokban.

V.1.1.5 Plazmablasztok:

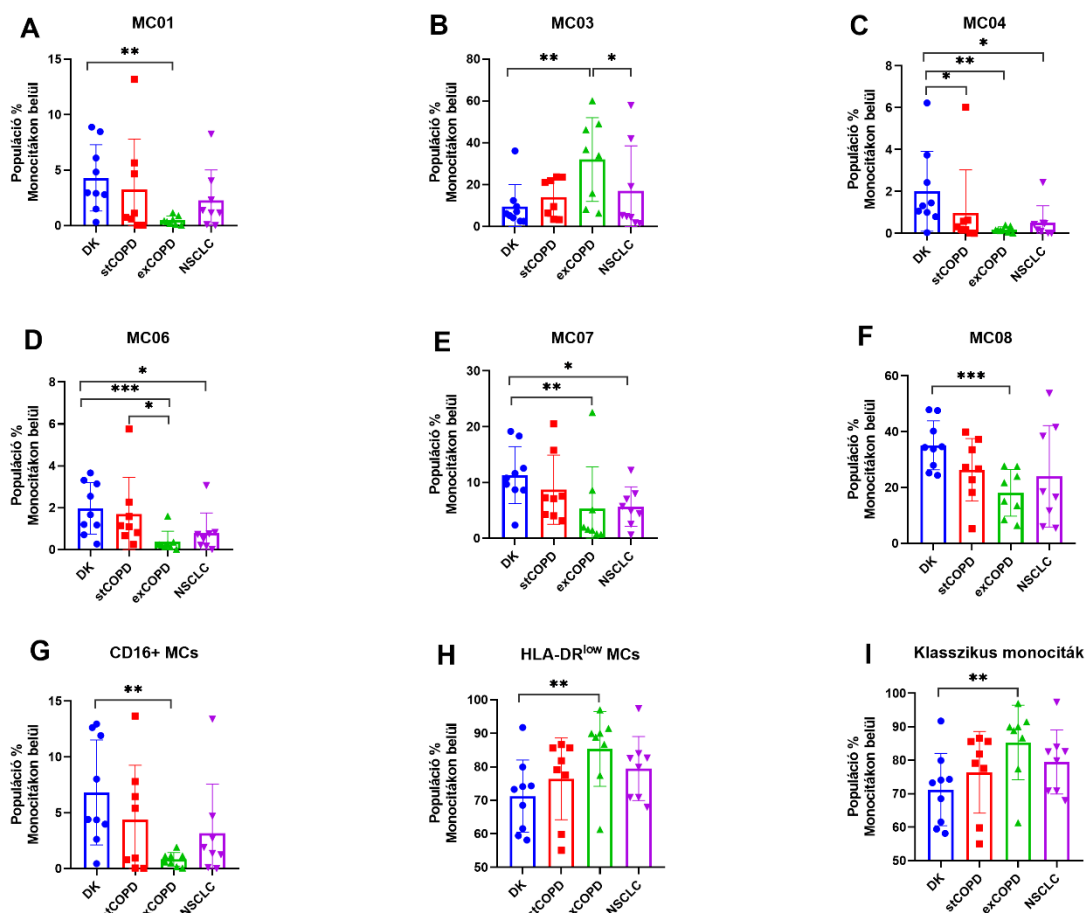
A plazmablasztokat, kis százalékban jelen lévő immunsejt populáció révén további metaklaszterekre nem bontottuk, hanem marker expressziós mintázatukat vizsgáltuk, mely során a CD19, CD27, CD38 és CD45RA kifejeződésében találtunk szignifikáns eltéréseket. A CD19 és CD27 kifejeződése az NSCLC csoportban a legalacsonyabb, míg a CD38 az exCOPD-ben mutat emelkedett expressziót (21.A-C árba). A CD45RA kifejeződése a betegcsoportokban a betegség súlyosbodásával párhuzamosan csökken, legalacsonyabb NSCLC-ben a DK, az stCOPD és az exCOPD-vel összehasonlítva (21.D ábra).



21.ábra: A plazmablaszt sejtek marker expressziós profilja (A-D). A különbség akkor szignifikáns, ha az FDR q értéke $< 0,1$ és $p < 0,05$, $** < 0,01$. A CD19, CD27, CD38 és CD45RA kifejeződése szignifikánsan eltérő a 4 vizsgált csoportban.

V.1.1.6 Monociták:

A monocitákat marker expressziós mintázatuk alapján FlowSOM analízissel 12 metaklaszterre bontottuk, melyekből 6 metaklaszter és 3 összevont metaklaszter százalékos eloszlása mutatott szignifikáns különbségeket. Az MC01: CD11c^{bright}/CD14-/CD45RA⁺, az MC04: CD11c^{bright}/CD14-/CD45RA^{low}, az MC06: CD11c^{bright}/CD16-/CD123^{low}, az MC07: CD11c^{bright}/CD38+/HLA-DR+/CD123- és az MC08: CD11^{bright}/CD45RO+/HLA-DR^{low} metaklaszterek az exCOPD csoportban szignifikánsan a legalacsonyabb, míg a MC03: CD11c+/CD56^{low} az exCOPD-ben szignifikánsan a legmagasabban arányban vannak jelen (22.A-F ábra). Az összevont, HLA-DR^{low} MC: MC03, MC05, MC08, MC10, MC11, MC12 és a klasszikus monociták: MC02, MC05, M08, MC10-12 összevonásával szignifikánsan magasan, ellenben a CD16+ MC: MC01, MC04, MC09 szignifikánsan a legalacsonyabb százalékban fordulnak elő az exCOPD csoportban (22.G-I ábra).

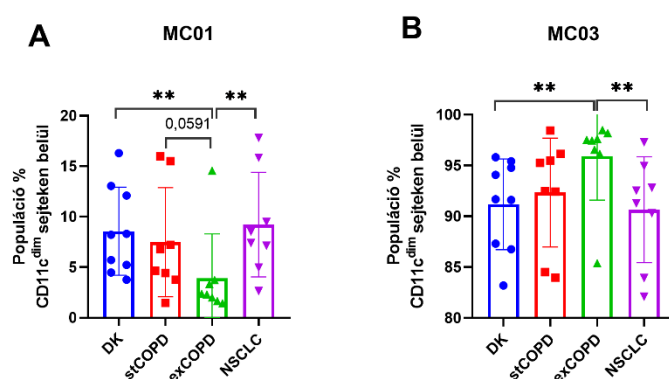


22.ábra: A monociták alpopulációinak csoportok közötti eloszlása (A-I). A különbség akkor szignifikáns, ha az FDR q értéke < 0,1 és p * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001. A monociták

alpopulációi közül az MC01, MC03, MC04, MC06, MC07 és MC08 alpopulációk, illetve az összevonással létrehozott CD16, HLA-DR^{low} és klasszikus monociták alpopulációinak csoportok közötti aránya szignifikánsan különbözik.

V.1.1.7 CD11c^{dim} sejtek:

A CD11c^{dim} sejtek FlowSOM analízise során további 3 metaklasztert határoztunk meg (22.ábra), melyekből 2 esetén figyelhetünk meg szignifikáns különbségeket. Az MC01:CD183+/CD196^{low} aránya az exCOPD-ben a legalacsonyabb, míg ezzel szemben az MC03: CD183-/CD196- az exCOPD-ben van legnagyobb százalékban jelen a vizsgált csoportokat összehasonlítva (23.A,B ábra).



23.ábra: CD11c^{dim} sejtek metaklaszttereinek csoportok közötti eloszlásának (A-B) szignifikáns különbségei. A különbség akkor szignifikáns, ha az FDR q értéke < 0,1 és p * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001. Az MC01 és MC03 eloszlása szignifikánsan eltér a DK vs. exCOPD és exCOPD vs. NSCLC között.

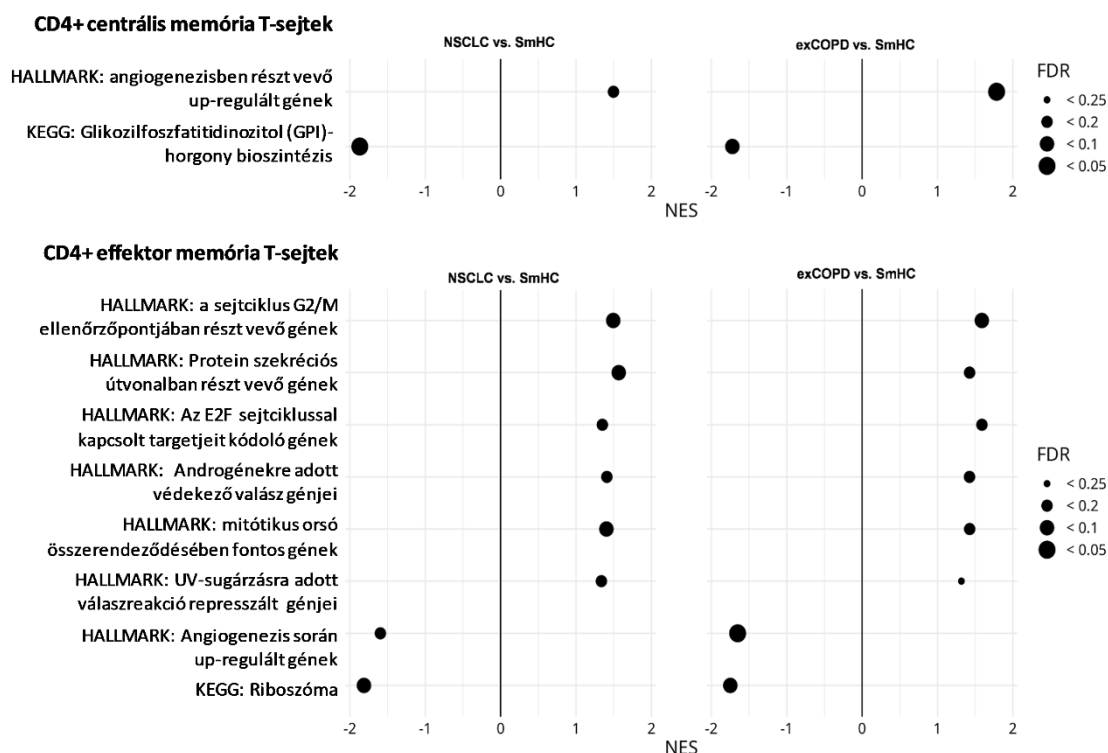
Az immunfenotipizálás eredményei közül érdemes kiemelni néhány jelentős különbséget, melyek a gyulladás súlyosbodásával összefüggésben, a daganatellenes immunválasz károsodásában relevánsak lehetnek. Ilyen például a CD16 (FcγRIII) csökkenése mind a CD4⁺ NKT-, mind pedig a CD8⁺ NKT-sejteken az NSCLC csoportban a DK-csoporttal összehasonlítva, vagy a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek CD27, ami kulcsszerepet játszik a T-sejt aktivációban és differenciációban, expressziójának csökkenése a betegcsoportokban. A G-protein kapcsolt receptorok, mint a CD183 (CXCR3) vagy a CD194 (CCR4) pozitív metaklaszterek emelkedett arányát NK-sejteken szintén az NSCLC csoportban a 3 másik vizsgálati csoporthoz képest. A B-sejtek MC08 (CD45RA^{bright}/CD185+/IgD-) metaklasztere drámaian lecsökkent mind a három betegcsoportban a dohányos kontrollokhoz képest, addig a monociták MC03

(CD11c⁺/CD56^{low}), a klasszikus monociták, valamint a HLA-DR^{low} metaklaszter sejtjei szignifikánsan magasabb arányban vannak jelen az exCOPD-ben. Ezzel szemben, szintén a monociták MC06 (CD11c^{bright}/CD123^{low}/CD16), MC07 (CD11c^{bright}/CD38⁺/HLA-DR⁺/CD123⁻), MC08 (CD45RA^{bright}/CD185⁺/IgD⁻) és CD16⁺ metaklaszterek sejtjei a legalacsonyabb arányban az exCOPD csoportban figyelhetők meg. A CD11c^{dim} MC01(CD196^{low}) metaklaszter sejteinek aránya exCOPD-ben a legalacsonyabb, míg az MC03 (CD196⁻) sejtjei exCOPD-ben a legmagasabb arányban találhatók meg.

V.2 A CD4⁺ EM és CD4⁺ CM T-sejtek transzkriptomikai vizsgálata

A CD183 (CXCR3) a szakirodalmi adatokkal megegyezően csökkent génkifejeződést mutat a CD4⁺ EM és CD4⁺ CM T-sejt alpopulációkban, melynek a memória T-sejtek fejlődésére gyakorolt hatása szintén ismert ([73]). Emellett korábbi szakirodalmi adatok szintén a memória T-sejtek alpopulációinak változásáról számoltak be COPD-ben ([74], [75], [76]). Ezért a további transzkriptomikai elemzéshez, az RNS szekvenáláshoz a CD4⁺ EM és CD4⁺ CM T-sejteket szortoltuk, majd a tisztított RNS-t egy vizsgálati csoporton belül – 3-5 alanyból mintánként azonos mennyiségű RNS-t összemérve – összevontuk annak érdekében, hogy elkerüljük az izolált RNS mennyiségi különbségből adódó torzítást. A szekvenálás eredményeképp az exCOPD és NSCLC csoport CD4⁺ CM populációjában, 203 eltérően up-regulált és 167 eltérően represszált gént azonosítottunk, melyek a két csoportban közösen up-vagy down-reguláltak és 0,807 Pearson-korrelációt mutattak. A exCOPD és NSCLC csoport CD4⁺ EM populációjában 234 eltérően up-regulált és 90 eltérően represszált gént azonosítottunk, melyek a két csoportban közösen up-vagy down-reguláltak és 0,747 Pearson-korrelációt mutattak. A Gene Set Enrichment Analízis (GSEA) eredményei hasonló expressziós mintázatot mutattak az NSCLC-ből és exCOPD-ből származó CD4⁺ CM és CD4⁺ EM sejtek között (23.ábra). Eredményeinket HALLMARK és KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) jelátviteli útvonal analízissel is tovább vizsgáltuk, amelyek során a genomban lévő géntartalmat összehasonlítják a KEGG/PATHWAY adatbázissal, hogy megvizsgálják, mely útvonalak és kapcsolódó funkciók lehetnek kódolva a genomban[77]. Az elemzésekhez normalizált expressziós értékeket használtunk a dohányos kontroll csoport expressziós értékeivel összehasonlítva. Az exCOPD és NSCLC CD4⁺ CM sejteiben az angiogenezisben szerepet játszó útvonalak, míg exCOPD és NSCLC CD4⁺ EM sejteiben a sejtosztódásban, fehérje szekrécióban, transzkripcióban, androgénre vagy az ultraibolya sugárzásra adott válaszban résztvevő útvonalak mutatkoztak up-reguláltnak (23.ábra). Az exCOPD és NSCLC csoportok 10 legjobban represszált közös génjei CD4⁺ CM T-sejtekben a következők: MAP3K2, SUZ12, SYNE2, HNRNPF, RNF24, APLP2, HIPK3, FBXL5, SEPT2, GLCCI1, míg exCOPD és NSCLC csoportok 10 túlexpresszált közös génjei CD4⁺ CM T-sejtekben a következők: AC008481.1, COMMD1, MRPL41, C12orf57, RPS3AP5, AL009174.1, AC026979.2, AC108161.1, CUTA, AL450998.1. Az exCOPD és NSCLC csoportok 10 leginkább represszált közös génjei CD4⁺ EM T-sejtekben a következők: FGFBP2,

CERKL, RBL2, GNLY, SYNE1, HNRNPLL, PTPN4, GLS, ITGAM, TGFBR3, addig a exCOPD és NSCLC csoportok 10 up-regulált közös génjei CD4+ CM T-sejtekben a következők: AC008677.2, AC245033.4, AL450998.1, RPS18P9, RPS3AP5, EEF1A1P5, RPL27AP, RPL41P5, AC008481.1, S100A9.

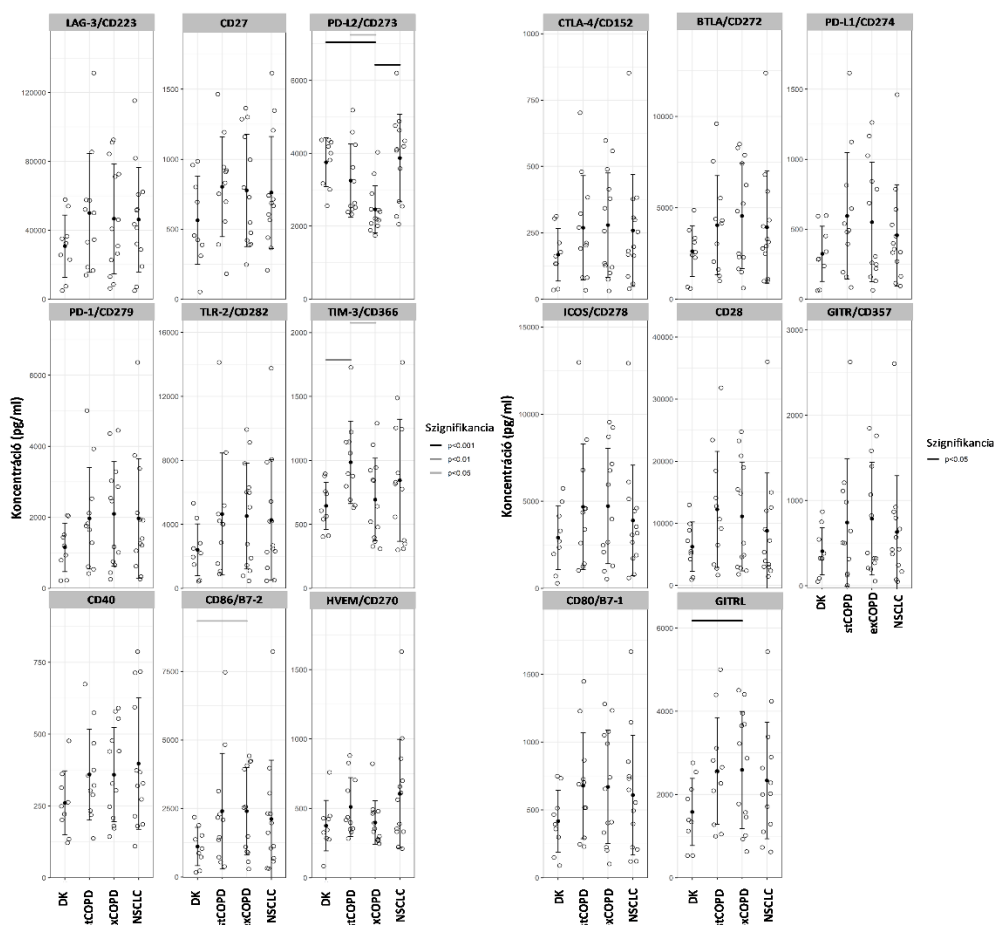


23.ábra: CD4+ EM és CD4+ CM T-sejtek Gene Set Enrichment Analízisének eredményei. Az ábrák azokat a KEGG és HALLMARK génkészleteket mutatják, melyek hasonló tendenciát mutattak a NSCLC vs. DK és az exCOPD vs. DK csoportok összehasonlítása során. A pozitív NES (Normalized Effect Score) értékek a DK-ban való génfelhalmozódást jelzik. A pontok méretei az FDR (False Discovery Rate) értéktartományait mutatják.

V.3 Immuno-onkológiai ellenőrzőpont mediátorok meghatározása vérplazma mintából

A -80°C-on tárolt 4 vizsgálati csoport vérplazma mintájából multiplex, kvantitatív analízist végeztünk Luminex MAGPIX® technológiát használva, mely során meghatároztuk 17 szolubilis immuno-onkológiai ellenőrzőpont protein koncentrációját. A vizsgált plazmafehérjék közül négy mediátor (TIM-3/CD366, PD-L2/CD273, B7-2/CD86, GITRL) mutatott szignifikáns eltérést a vizsgált csoportok között. A gátló TIM-3/CD366 koncentrációja emelkedett stCOPD-ben a DK-hoz viszonyítva, míg exCOPD-

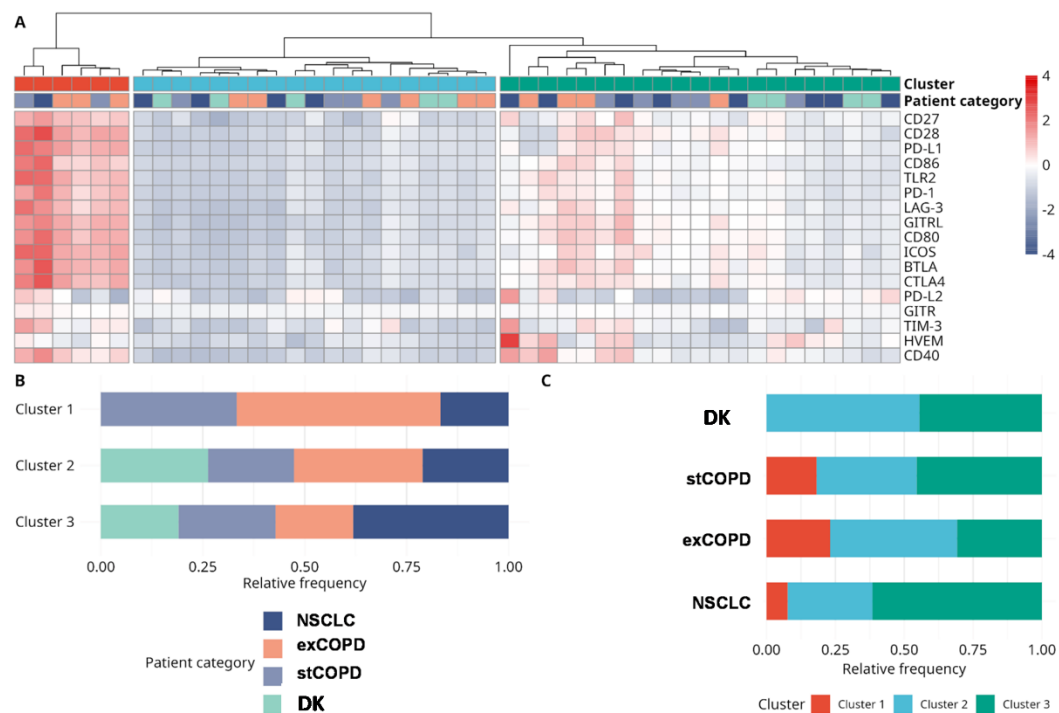
ben a stCOPD-vel összevetve csökkenést tapasztaltunk. A szintén inhibitor szerepet betöltő PD-L2/CD273 szignifikánsan legalacsonyabban az exCOPD-ben figyelhető meg a másik három csoporttal összehasonlítva. A T-sejt stimulációban szerepet játszó CD86/B7-2 és GITRL koncentrációja exCOPD-ben emelkedést mutat összevetve a DK csoporttal. A további vizsgált 13 plazmaprotein esetén bár szignifikáns különbséget nem, viszont a DK csoporttal összehasonlítva emelkedett koncentráció figyelhető meg a stCOPD, exCOPD és NSCLC csoportokban. (24.ábra)



24.ábra: 17 szolubilis immun-onkológiai ellenőrzőpont fehérje koncentrációja egyéni értékeket ábrázolva a DK, stCOPD, exCOPD és NSCLC csoportokban. Szignifikánsnak tekintettük a különbséget, ha $p < 0,05$. Csoportok közötti szignifikáns eltérést a gátló TIM-3/CD366 és PD-L2/CD273 ill. az aktiváló B7-2/CD86 és GITRL mennyiségében tapasztaltunk.

A Luminex mérés eredményeit klaszterező analízissel is vizsgáltuk, mely során a koncentrációs értékek a z-pontszám tarnszformáció után 3 fő klasztert határoztak meg (27.A ábra). Az 1. klaszterből, melyre a gyulladásos mediátorok legmagasabb koncentrációja jellemző, hiányzik a DK csoport, és 3 exCOPD, 2 stCOPD és 1 NSCLC-s beteget foglal magába. A 2. klaszterre a plazmafehérjék legalacsonyabb koncentrációja

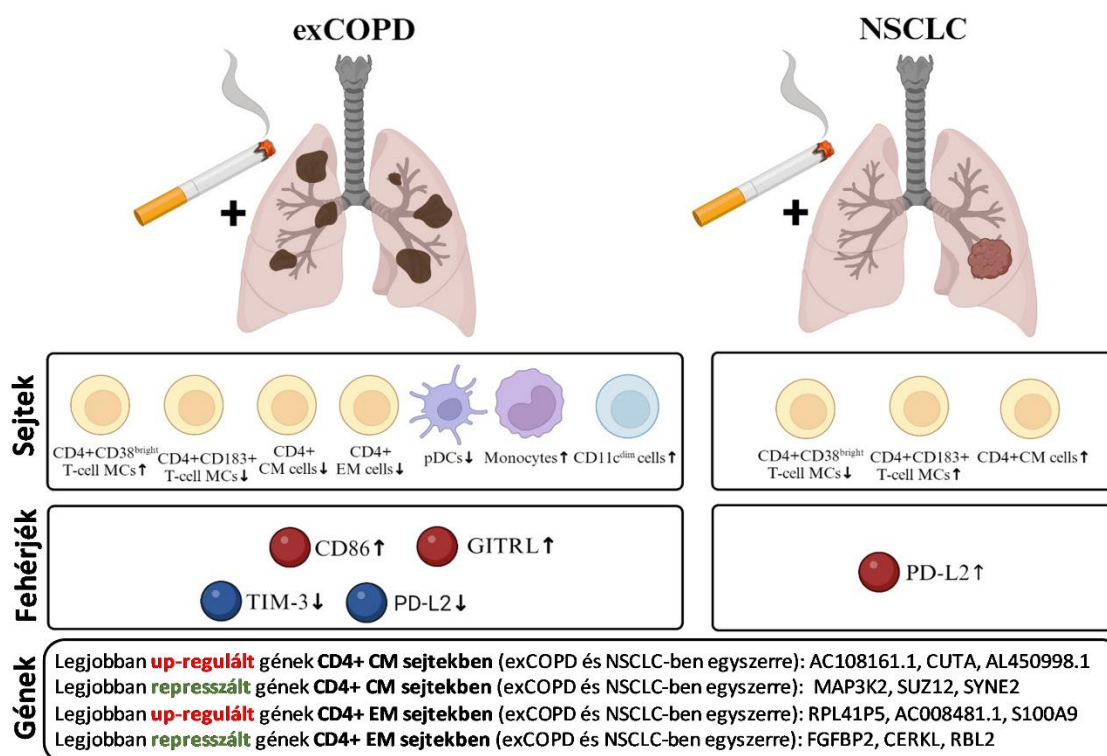
jellemző és 5 DK, 6 exCOPD és 4 NSCLC-s beteg alkotja. A 3 klaszter egy köztes klaszternek tekinthető, ahol az immun-onkológiai mediátorok közepes koncentrációja figyelhető meg, 4 DK, 5 stCOPD és 8 NSCLC-s beteget képvisel. (27.B ábra) Az analízis során azt is megállapítottuk, hogy az egyes vizsgálati csoportok milyen arányban tartalmazzák a 3 klasztert. A DK csoport csak az 2 és 3 klasztert, a stCOPD legnagyobb arányban a 3. klasztert, majd a 2. és kis százalékban az 1. klasztert tartalmazza. Az betegség súlyosbodásával korrelálva az exCOPD csoport legnagyobb arányban a 2. klaszter, majd 3. klasztert, végezetül legkisebb arányban, de a betegcsoportok között a legnagyobb százalékban pedig a 1. klasztert tartalmazza ellentétben az NSCLC-vel, ahol legnagyobb százalékban a köztes, 3.klaszter-t, majd a 2. klaszter, és – a betegcsoportok között a legkisebb százalékban itt előforduló – gyulladásos, 1. klaszter-t tartalmazza (27.C ábra).



25.ábra: A betegek vérplazmájában detektálható 17 immun-onkológiai mediátor koncentrációjának klaszter elemzése. (A) A különböző mintákban lévő analit koncentrációk színskóddal vannak feltüntetve, ahol a piros a magas, a kék pedig az alacsony koncentrációt jelöli. A koncentrációs szinteket Z-pontszám transzformációval normalizáltuk. Hierarchikus klaszterezéssel három fő klasztert azonosítottunk. (B) A vizsgálati csoportok eloszlása a három klaszterben. (C) A klaszterek eloszlása a különböző vizsgálati csoportok között. Az 1. és 2. klaszter a legmagasabb, illetve a legalacsonyabb plazmafehérje koncentrációval jellemezhető. A

3. klaszter köztes plazmaprotein koncentrációt mutat, és az NSCLC minták legnagyobb hányadát tartalmazza.

Végezetül, a T-sejtek biológiájára összpontosítva eredményeinket 3 szinten – gének, fehérjék, sejtek – foglalhatjuk össze. A CD4⁺ CM és CD4⁺ EM T-sejtek transzkriptomikai vizsgálata feltárta, hogy az exCOPD-s és NSCLC-s betegpopuláció memóriasejtjeinek transzkriptomja korrelációt mutat, vagyis sikeresen azonosítottuk csoportok közötti, közösen magasan és alacsonyan kifejeződő géneket. Fehérjék szintjén a szolubilis plazmafehérjék kvantitatív meghatározása történt, ahol a CD86, a GITRL emelkedett, a TIM-3 és a PD-L2 pedig csökkent exCOPD-ben. NSCLC-ben emelkedett PD-L2 koncentrációt figyeltünk meg. Sejtek szintjén az egysejtes immunfenotipizálás tárt fel különbségeket a perifériás immunrendszer sejt kompartmentjeiben. A CD4⁺/CD38^{bright} T-sejtek mennyisége exCOPD-ben megnőtt, NSCLC-ben lecsökkent, a CD4⁺/CD183⁺ T-sejtek száma pedig exCOPD-ben csökkent le, NSCLC-ben pedig növekedett, hasonlóan a CD4⁺ CM T-sejtekhez.(26.ábra)



26.ábra: Az eredményeink vázlatos ábrája három szintre összpontosítva: gének, fehérjék, sejtek. A CD4⁺ CM és CD4⁺ EM sejtek transzkriptomja korrelációt mutatott exCOPD és NSCLC esetén. A három leginkább eltérően expresszáldó gént emeltük ki. Meghatároztuk a szolubilis mediátorok mennyiségét, ahol a CD86 és a GITRL magasabb, míg a TIM-3 és a PD-L2

alacsonyabb volt az exCOPD betegek plazmamintáiban. Végül az egysejtes immunfenotipizálás a perifériás kompartmentek összetételének megváltozását tárta fel, ahol az immunsejt alpopulációk gyakoriságát számszerűsítettük, majd azonsítottuk az exCOPD-re és az NSCLC-re jellegzetes immunsejt csoportokat. (Forrás: Gémes és mtsai, Front. Immunol., 14:1297577, 2023)

VI. Diszkusszió

Vizsgálatunk célja a dohányos, stabil COPD és exacerbáló COPD immunhomeosztázis egyensúlyhiányának mélyebb megértése volt. Mivel a dohányzás és a már kialakult COPD gyakran tüdőrákhoz vezet, ezért dohányos NSCLC-s betegek mintáit is vizsgáltuk. A dohányzás okozta önfenn tartó, szisztémás gyulladást korábban már csoportunk, valamint más kutatócsoportok is intenzíven tanulmányozták [4], [78], [79]. A dohányzás szisztémás immunrendszerben okozott változásait COPD megbetegedésben Taucher és mtsai átfogóan vizsgálták [80]. Csoportunk nemrégiben határozta meg a kemo- vagy immunellenőrpont-gátló terápiában (ICI) részesülő dohányos, előrehaladott NSCLC-s betegek perifériás immunfenotípusát egysejt-tömegcitometriát felhasználva [34]. Ugyanakkor korlátozott számú tanulmány áll rendelkezésünkre, melyben CyTOF technikát alkalmaznak a dohányos COPD-s és NSCLC-s betegek perifériás mononukleáris vérsejtjeinek immunfenotipizálására. Korábban Vasudevan és mtsai CyTOF-ot használva krónikus gyulladást támogató mieloid sejtek alacsonyabb PD-L1 és PD-L2 expresszióját mutatták ki dohányos COPD-s betegek bronchoalveoláris mosással (BAL) gyűjtött mintájából [81]. Freeman és mtsai elvégezték COPD-s betegek PBMC, BAL és köpetmintáinak immunfenotipizálását 12-színű áramlási citométer antitest panelt felhasználva. Meghatározták 7 immunsejt populáció (CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek, B-sejtek, monociták, makrofágok, neutrofilek és eozinofilek) kapuzási stratégiáját és további elemzéseket javasoltak annak céljából, hogy felfedjék az immunsejt alpopulációk fenotípusa valamint a dohányzási előzmények, spirometriai adatok illetve a COPD-s betegek egyéb fiziológiai paraméterei közötti korrelációt [82]. Xiong és mtsai szintén áramlási citometriával, 8-színű panelt felhasználva Th1, Th17 típusú és regulátoros T-sejt alpopulációk növekedését mutatták ki akut, exacerbáló COPD-s betegek PBMC mintáiból a stabil COPD-s betegek mintáival összevetve [83]. Kappellos és mtsai a cigarettafüst-kitettség rágcsló modelljében egysejt-tömegcitometriával kimutatták a CD34⁺/CD117⁺/CD16/32⁺/IdU⁺ progenitorok, CD117⁺/CD11b⁺ preneutrofilek és CD11b⁺/Ly-6G⁺/CD117⁻/CD62L⁻/CD172a⁻ éretlen neutrofilek relatív növekedését a dohányfüstnek kitett állatokban, míg a CD11b⁺/Ly-6G⁺/CD117⁻/CD62L⁺/CD172a⁺ érett neutrofilek száma viszonylag csökkent [84].

Jelenlegi szakirodalmi ismereteink szerint az általunk végezett vizsgálat az első, amely összehasonlítja a dohányos, egészséges kontrollok perifériás immunfenotípusát a terápia naív, dohányos, stabil illetve exacerbáló COPD-ben vagy NSCLC-ben szenvedő betegek perifériás immunfenotípusával. A rendelkezésünkre álló kontrollok és betegek perifériás vérmintáit széleskörűen vizsgáltuk CyTOF és Luminex MAGPIX® technológiával. Multiplex, egysejt- tömegcitometriás méréseinkhez egy 29 tagú antitest panelt használtunk, így 14 fő immunsejt populációt tudtunk meghatározni, mint a CD4+ T-sejtek, CD8+ T-sejtek, CD4+/CD8+ (kettős pozitív) T-sejtek, CD4-/CD8- (kettős negatív) T-sejtek, γ/δ T-sejtek, CD4+ NKT-sejtek, CD8+ NKT-sejtek, B-sejtek, plazmablasztok, monociták, CD11c^{dim} sejtek, pDC-k és mDC-k. Későbbiekben fókuszunkat a T-sejtek alpopulációinak további vizsgálataira szűkítettük. A CD4+ és CD8+ T-sejtek arányát vizsgálva jelentős emelkedést tapasztaltuk NSCLC-ben a monociták és CD11c^{dim} sejtek számának csökkenése rovására. A CD4+ T-sejteken a CD38 fokozott expresszióját figyeltük meg exCOPD-ben, ami egy ciklikus ADP ribóz-hidrolázként működő aktivációs sejtfelszíni marker. Guades és mtsai korábban leírták a CD38 által közvetített fokozott jelátvitelt COPD-ben, mely a NAD-ot több metabolit, többek között adenzin-difoszfát ribóz és a ciklikus adenzin-difoszfát ribóz előállítására használja fel, amelyek a légút simaizmainak kalcium jelátvitelében vesznek részt [85]. A CD38 további szerepet tölt be az immunsejtekben, ahol funkciója a sejtdifferenciálódás modulálásától a gyulladás alatti effektor funkciókig terjed, így a CD38 szabályozhatja a sejtek toborzását, a citokin felszabadulást és a NAD elérhetőségét[86]. A CD183 vagy másnéven CXCR3 egy kemokin receptor, mely kölcsönhatásba léphet a CXCL9, CXCL10 és CXCL11 kemokin ligandokkal, így befolyásolva a T-sejtek polarizációját [87]. Összehasonlító elemzésünk során azt találtuk, hogy a CD183+ összevont metaklaszterek legkisebb arányban fordultak elő CD4+ T-sejteket vizsgálva exCOPD-ben, ellenben NSCLC-ben emelkedés volt megfigyelhető, míg CD8+ T-sejtek esetén szintén csökkent stCOPD-ben. A CD183 kifejeződésének csökkenését tapasztaltuk CD4-/CD8-T-sejtek esetében az exCOPD, és γ/δ T-sejtekben a stCOPD csoportban. A CD183 a T-sejtek polarizációján túl, befolyásolhatja a memória T-sejtek fejlődését [73], [88].

Eredményeinket a CD4+ CM és CD4+ EM T-sejteket vizsgálva a korábbi szakirodalmi adatok alátámasztják, mert a vizsgált memória T-sejtek aránya az exCOPD-ben a legalacsonyabb, illetve a CD183+ metaklaszterek aránya szintén exCOPD-ben volt a legalacsonyabb CD4+ T-sejtek esetében. Továbbá, Roberts és mtsai is a CD4+ CM és

CD4⁺ EM T-sejtek alacsonyabb arányát publikálták COPD-s megbetegedésben a dohányos kontroll csoporthoz képest [74]. Mivel a CD4⁺ T-sejtek központi szerepet játszanak a T-sejt mediált válaszok polarizációjában, ezért a CD4⁺ CM és CD4⁺ EM T-sejteket választottuk ki a további transzkriptom analízisre RNS szekvenálással, melyhez a vizsgálni kívánt CD4⁺ memória T-sejt alpopulációkat fluoreszcens antitest jelölés után szortoltuk. Jelenlegi ismereteink szerint kutatócsoportunk vizsgálta először a dohányos kontroll, stabil és exacerbáló COPD és NSCLC betegekből származó CD4⁺ CM és CD4⁺ EM sejtek perifériás immunfenotípusát és transzkriptomját. Az exacerbáló COPD-ben és az NSCLC-ben tartósan fennálló krónikus gyulladás a CD4⁺ CM vagy CD4⁺ EM sejtek differenciálisan expresszált génjeinek koexpressziójában 0,8 vagy 0,74 Pearson-korrelációt mutatott. Mivel a CD4⁺ helper T-sejtek esszenciális szerepet töltenek be az adaptív immunitás polarizációjában, az mRNS-ek magas lefedettsége ezekben a memória sejtekben szerepet játszhat az antigénfüggő gyulladásos útvonalakban exCOPD és NSCLC esetén. Ezért azt feltételezzük, hogy a dohányzás által generált gyulladás polarizálja a CD4⁺ CM és CD4⁺ EM T-sejteket, amelyek hozzájárulhatnak a COPD exacerbációjához és a tumorelles immunitás károsodásához NSCLC-ben. Néhány markert, mint például az exCOPD és NSCLC-ben magasan kifejezett S100A9-et a dohányzás indukálja, és hozzájárul a COPD kialakulásához vagy az NSCLC csökkent túléléséhez [89], [90]. Azt, hogy a COPD és a tüdőrákos szövetek milyen immunsejt összetétellel rendelkeznek korábban más kutatócsoportok már publikálták [75], [91], [92], ezért a vizsgálat során a perifériás immunitás jellemzésére, ezen belül pedig az immunsejt alcsoportok heterogenitásának megismerésére koncentráltunk. Sahin és mtsai publikációjukban 11 szérumbiomarkert vizsgáltak stabil és exacerbáló COPD-ben és megállapították, hogy a leukocita és neutrofil sejtek száma, a vörösvérsejt-eloszlási szélessége (red cell distribution width, RDW), a C-reaktív protein, a neutrofil-limfocita arány és a trombocita-limfocita arány magasabb volt exCOPD-ben, mint az egészséges kontroll csoportban [93]. Barta és mtsai köpet minták citokin vizsgálatát során IL-6 és növekedés szabályzott onkogén- α magasabb szintjét mérték stCOPD-ben, mint a nem dohányos kontrollokban, az IL-1R α , RANTES, MIG, BMP-4, BMP-6, GDNF és Acrp30 szintjét szintén magasabbnak találták exCOPD-ben, mint stCOPD-ben [94]. Az általunk használt Luminex MAGPIX® panel egy kereskedelmi forgalomban kapható immun-onkológiai ellenőrzőpont proteinek mérésére alkalmas panel volt, amelynek eredménye a COPD-s és tüdőrákos betegek vegyes fenotípusát mutatta. Az exCOPD-s betegek plazmája gyulladásos fenotípust mutatott, ahol a gátló PD-L2 és TIM-3 alacsonyabb

koncentrációban volt jelen az stCOPD-vel szemben, valamint a stimuláló CD86 és GITRL a DK-hoz képest megnövekedett szintjével jellemezhető. A meghatározott klaszterek eloszlása a DK, stCOPD, exCOPD vagy NSCLC csoportba tartozó egyének heterogenitását reprezentálják. A fentebb említett betegséggel összefüggő heterogén fenotípusok terápiás rezisztenciát rejthetnek magukban, így a megfelelő terápiás lehetőségek kiválasztása további kihívást hordoz magában. Csoportunk korábban átfogóan vizsgálta, hogy a krónikus gyulladás hogyan biztosítja a megfelelő feltételeket rák kialakulásához [95], valamint azt is, hogy a COPD előfeltétele lehet a tüdőrák kialakulásának [4]. Vizsgálatunk egyik fő üzenete a dohányzással összefüggő, az exCOPD-t és az NSCLC-t összekötő szisztémás gyulladás, mely komplex egysejt-tömegcitometriás profilként mutatható ki, hiszen a perifériás immunfenotípus meghatározása komplex rálátást biztosít az immunpopulációkra, különös tekintettel a T-sejtes kompartmentekre. Freeman és mtsai korábban a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek csökkenését publikálták akut exacerbációban szenvedő COPD-s betegek perifériás vérében, ami eredményeinkkel szintén összecseng [96].

Összességében nehéz megbecsülni, hogy az immunfenotípusban mutatkozó különbségek közül melyiknek van a legnagyobb klinikai jelentősége, viszont adataink forrásként szolgálhatnak olyan jövőbeli vizsgálatokhoz, amelyek a dohányos COPD-s vagy NSCLC-s betegek immunhomeosztázis-egyensúlyzavarának mélyebb megértéséhez vezetnek.

VII. Irodalomjegyzék

- [1] T. Yoshida és R. M. Tudor, „Pathobiology of Cigarette Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease”, *Physiol. Rev.*, köt. 87, sz. 3, o. 1047–1082, júl. 2007, doi: 10.1152/physrev.00048.2006.
- [2] S. Safiri és mtsai., „Burden of chronic obstructive pulmonary disease and its attributable risk factors in 204 countries and territories, 1990-2019: results from the Global Burden of Disease Study 2019”, *BMJ*, o. e069679, júl. 2022, doi: 10.1136/bmj-2021-069679.
- [3] A. Lindberg és mtsai., „Large underreporting of COPD as cause of death-results from a population-based cohort study”, *Respir. Med.*, köt. 186, o. 106518, szept. 2021, doi: 10.1016/j.rmed.2021.106518.
- [4] K. Szalontai és mtsai., „Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Epidemiology, Biomarkers, and Paving the Way to Lung Cancer”, *J. Clin. Med.*, köt. 10, sz. 13, o. 2889, jún. 2021, doi: 10.3390/jcm10132889.
- [5] R. P. Young és R. J. Hopkins, „Link between COPD and lung cancer”, *Respir. Med.*, köt. 104, sz. 5, o. 758–759, máj. 2010, doi: 10.1016/j.rmed.2009.11.025.
- [6] R. P. Young és mtsai., „Airflow Limitation and Histology Shift in the National Lung Screening Trial. The NLST-ACRIN Cohort Substudy”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, köt. 192, sz. 9, o. 1060–1067, nov. 2015, doi: 10.1164/rccm.201505-0894OC.
- [7] A. L. Durham és I. M. Adcock, „The relationship between COPD and lung cancer”, *Lung Cancer*, köt. 90, sz. 2, o. 121–127, nov. 2015, doi: 10.1016/j.lungcan.2015.08.017.
- [8] R. N. Proctor, „The history of the discovery of the cigarette–lung cancer link: evidentiary traditions, corporate denial, global toll: Table 1”, *Tob. Control*, köt. 21, sz. 2, o. 87–91, márc. 2012, doi: 10.1136/tobaccocontrol-2011-050338.
- [9] L. Zeneyedpour, L. J. M. Dekker, J. J. M. Van Sten-van't Hoff, P. C. Burgers, N. H. T. Ten Hacken, és T. M. Luidier, „Neoantigens in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer: A Point of View”, *PROTEOMICS – Clin. Appl.*, köt. 13, sz. 2, o. 1800093, márc. 2019, doi: 10.1002/prca.201800093.
- [10] A. Forder és mtsai., „Mechanisms Contributing to the Comorbidity of COPD and Lung Cancer”, *Int. J. Mol. Sci.*, köt. 24, sz. 3, o. 2859, febr. 2023, doi: 10.3390/ijms24032859.
- [11] M. Xie, X. Liu, X. Cao, M. Guo, és X. Li, „Trends in prevalence and incidence of chronic respiratory diseases from 1990 to 2017”, *Respir. Res.*, köt. 21, sz. 1, o. 49, dec. 2020, doi: 10.1186/s12931-020-1291-8.
- [12] S. Marsh, „Smoking and COPD: what really are the risks?”, *Eur. Respir. J.*, köt. 28, sz. 4, o. 883–884, okt. 2006, doi: 10.1183/09031936.06.00074806.
- [13] J. Chorostowska-Wynimko, „Targeted screening programmes in COPD: how to identify individuals with α_1 -antitrypsin deficiency”, *Eur. Respir. Rev.*, köt. 24, sz. 135, o. 40–45, márc. 2015, doi: 10.1183/09059180.00010614.
- [14] J. K. Stoller és L. S. Aboussouan, „ α_1 -antitrypsin deficiency”, *The Lancet*, köt. 365, sz. 9478, o. 2225–2236, jún. 2005, doi: 10.1016/S0140-6736(05)66781-5.

- [15] J. B. Soriano és mtsai., „Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017”, *Lancet Respir. Med.*, köt. 8, sz. 6, o. 585–596, jún. 2020, doi: 10.1016/S2213-2600(20)30105-3.
- [16] K. Atsou, C. Chouaid, és G. Hejblum, „Variability of the chronic obstructive pulmonary disease key epidemiological data in Europe: systematic review”, *BMC Med.*, köt. 9, sz. 1, o. 7, dec. 2011, doi: 10.1186/1741-7015-9-7.
- [17] K. S. Khan és mtsai., „Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Exacerbations in Hospitalized Patients From Admission to Discharge: A Comprehensive Review of Therapeutic Interventions”, *Cureus*, aug. 2023, doi: 10.7759/cureus.43694.
- [18] A. Agustí és mtsai., „Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2023 Report: GOLD Executive Summary”, *Eur. Respir. J.*, köt. 61, sz. 4, o. 2300239, ápr. 2023, doi: 10.1183/13993003.00239-2023.
- [19] A. Fazleen és T. Wilkinson, „Early COPD: current evidence for diagnosis and management”, *Ther. Adv. Respir. Dis.*, köt. 14, o. 175346662094212, jan. 2020, doi: 10.1177/1753466620942128.
- [20] L. Bhatta és mtsai., „GOLD Classifications, COPD Hospitalization, and All-Cause Mortality in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: The HUNT Study”, *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, köt. Volume 15, o. 225–233, jan. 2020, doi: 10.2147/COPD.S228958.
- [21] P. T. King, „Inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and its role in cardiovascular disease and lung cancer”, *Clin. Transl. Med.*, köt. 4, sz. 1, o. e26, dec. 2015, doi: 10.1186/s40169-015-0068-z.
- [22] S. D. O. Rodrigues, C. M. C. D. Cunha, G. M. V. Soares, P. L. Silva, A. R. Silva, és C. F. Gonçalves-de-Albuquerque, „Mechanisms, Pathophysiology and Currently Proposed Treatments of Chronic Obstructive Pulmonary Disease”, *Pharmaceuticals*, köt. 14, sz. 10, o. 979, szept. 2021, doi: 10.3390/ph14100979.
- [23] R. T. McKendry és mtsai., „Dysregulation of Antiviral Function of CD8⁺ T Cells in the Chronic Obstructive Pulmonary Disease Lung. Role of the PD-1–PD-L1 Axis”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, köt. 193, sz. 6, o. 642–651, márc. 2016, doi: 10.1164/rccm.201504-0782OC.
- [24] S. G. Kalathil és mtsai., „T-Regulatory Cells and Programmed Death 1⁺ T Cells Contribute to Effector T-Cell Dysfunction in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, köt. 190, sz. 1, o. 40–50, júl. 2014, doi: 10.1164/rccm.201312-2293OC.
- [25] P. J. Barnes és M. G. Cosio, „Characterization of T Lymphocytes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease”, *PLoS Med.*, köt. 1, sz. 1, o. e20, okt. 2004, doi: 10.1371/journal.pmed.0010020.
- [26] K. H. Czarnecka-Chrebelska, D. Mukherjee, S. V. Maryanchik, és M. Rudzinska-Radecka, „Biological and Genetic Mechanisms of COPD, Its Diagnosis, Treatment, and Relationship with Lung Cancer”, *Biomedicines*, köt. 11, sz. 2, o. 448, febr. 2023, doi: 10.3390/biomedicines11020448.

- [27] R. V. Bowman, C. M. Wright, M. R. Davidson, S. M. Savarimuthu Francis, I. A. Yang, és K. M. Fong, „Epigenomic targets for the treatment of respiratory disease”, *Expert Opin. Ther. Targets*, köt. 13, sz. 6, o. 625–640, jún. 2009, doi: 10.1517/14728220902926119.
- [28] M. W. Lawless, K. J. O’Byrne, és S. G. Gray, „Oxidative stress induced lung cancer and COPD: opportunities for epigenetic therapy”, *J. Cell. Mol. Med.*, köt. 13, sz. 9a, o. 2800–2821, szept. 2009, doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00845.x.
- [29] W. Qiu és mtsai., „The impact of genetic variation and cigarette smoke on DNA methylation in current and former smokers from the COPD Gene study”, *Epigenetics*, köt. 10, sz. 11, o. 1064–1073, nov. 2015, doi: 10.1080/15592294.2015.1106672.
- [30] I. K. Sundar és mtsai., „DNA methylation profiling in peripheral lung tissues of smokers and patients with COPD”, *Clin. Epigenetics*, köt. 9, sz. 1, o. 38, dec. 2017, doi: 10.1186/s13148-017-0335-5.
- [31] P. M. Meek, A. Sood, H. Petersen, S. A. Belinsky, és Y. Tesfagzi, „Epigenetic Change (GATA-4 Gene Methylation) Is Associated With Health Status in Chronic Obstructive Pulmonary Disease”, *Biol. Res. Nurs.*, köt. 17, sz. 2, o. 191–198, márc. 2015, doi: 10.1177/1099800414538113.
- [32] L. Guzmán és mtsai., „Analysis of aberrant methylation on promoter sequences of tumor suppressor genes and total DNA in sputum samples: a promising tool for early detection of COPD and lung cancer in smokers”, *Diagn. Pathol.*, köt. 7, sz. 1, o. 87, dec. 2012, doi: 10.1186/1746-1596-7-87.
- [33] M. Suzuki és mtsai., „Molecular Characterization of Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Related Non-Small Cell Lung Cancer Through Aberrant Methylation and Alterations of EGFR Signaling”, *Ann. Surg. Oncol.*, köt. 17, sz. 3, o. 878–888, márc. 2010, doi: 10.1245/s10434-009-0739-3.
- [34] P. Neuperger és mtsai., „Single-cell mass cytometric analysis of peripheral immunity and multiplex plasma marker profiling of non-small cell lung cancer patients receiving PD-1 targeting immune checkpoint inhibitors in comparison with platinum-based chemotherapy”, *Front. Immunol.*, köt. 14, o. 1243233, okt. 2023, doi: 10.3389/fimmu.2023.1243233.
- [35] L. A. Pikor, V. R. Ramnarine, S. Lam, és W. L. Lam, „Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications”, *Lung Cancer*, köt. 82, sz. 2, o. 179–189, nov. 2013, doi: 10.1016/j.lungcan.2013.07.025.
- [36] V. L. Athey, R. J. Suckling, A. M. Tod, S. J. Walters, és T. K. Rogers, „Early diagnosis of lung cancer: evaluation of a community-based social marketing intervention”, *Thorax*, köt. 67, sz. 5, o. 412–417, máj. 2012, doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-200714.
- [37] G. Kathiresan, Clement, és Sankaranarayanan, „Dyspnea in lung cancer patients: a systematic review”, *Lung Cancer Targets Ther.*, o. 141, nov. 2010, doi: 10.2147/LCTT.S14426.
- [38] J. Corner, „Is late diagnosis of lung cancer inevitable? Interview study of patients’ recollections of symptoms before diagnosis”, *Thorax*, köt. 60, sz. 4, o. 314–319, ápr. 2005, doi: 10.1136/thx.2004.029264.

- [39] W. Hamilton, „What are the clinical features of lung cancer before the diagnosis is made? A population based case-control study”, *Thorax*, köt. 60, sz. 12, o. 1059–1065, dec. 2005, doi: 10.1136/thx.2005.045880.
- [40] L. Elliss-Brookes és mtsai., „Routes to diagnosis for cancer – determining the patient journey using multiple routine data sets”, *Br. J. Cancer*, köt. 107, sz. 8, o. 1220–1226, okt. 2012, doi: 10.1038/bjc.2012.408.
- [41] R. D. Neal és mtsai., „Comparison of cancer diagnostic intervals before and after implementation of NICE guidelines: analysis of data from the UK General Practice Research Database”, *Br. J. Cancer*, köt. 110, sz. 3, o. 584–592, febr. 2014, doi: 10.1038/bjc.2013.791.
- [42] J. R. Molina, P. Yang, S. D. Cassivi, S. E. Schild, és A. A. Adjei, „Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship”, *Mayo Clin. Proc.*, köt. 83, sz. 5, o. 584–594, máj. 2008, doi: 10.4065/83.5.584.
- [43] C. O’Leary és mtsai., „Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC)”, *Pharmaceuticals*, köt. 13, sz. 10, o. 273, szept. 2020, doi: 10.3390/ph13100273.
- [44] Y.-Y. Bi, Q. Chen, M.-Y. Yang, L. Xing, és H.-L. Jiang, „Nanoparticles targeting mutant p53 overcome chemoresistance and tumor recurrence in non-small cell lung cancer”, *Nat. Commun.*, köt. 15, sz. 1, o. 2759, márc. 2024, doi: 10.1038/s41467-024-47080-3.
- [45] M. Riudavets, I. Sullivan, P. Abdayem, és D. Planchard, „Targeting HER2 in non-small-cell lung cancer (NSCLC): a glimpse of hope? An updated review on therapeutic strategies in NSCLC harbouring HER2 alterations”, *ESMO Open*, köt. 6, sz. 5, o. 100260, okt. 2021, doi: 10.1016/j.esmoop.2021.100260.
- [46] T.-C. Liu, X. Jin, Y. Wang, és K. Wang, „Role of epidermal growth factor receptor in lung cancer and targeted therapies”, *Am. J. Cancer Res.*, köt. 7, sz. 2, o. 187–202, 2017.
- [47] G. Guaitoli, L. Zullo, M. Tiseo, M. Dankner, A. A. Rose, és F. Facchinetti, „Non-small-cell lung cancer: how to manage BRAF-mutated disease”, *Drugs Context*, köt. 12, o. 1–19, máj. 2023, doi: 10.7573/dic.2022-11-3.
- [48] X. Yang, Z. Tang, J. Li, J. Jiang, és Y. Liu, „Progress of non-small-cell lung cancer with ROS1 rearrangement”, *Front. Mol. Biosci.*, köt. 10, o. 1238093, dec. 2023, doi: 10.3389/fmolb.2023.1238093.
- [49] K. C. Arbour és G. J. Riely, „Diagnosis and Treatment of Anaplastic Lymphoma Kinase–Positive Non–Small Cell Lung Cancer”, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, köt. 31, sz. 1, o. 101–111, febr. 2017, doi: 10.1016/j.hoc.2016.08.012.
- [50] X. Du, Y. Shao, H. Qin, Y. Tai, és H. Gao, „ALK- rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC)”, *Thorac. Cancer*, köt. 9, sz. 4, o. 423–430, ápr. 2018, doi: 10.1111/1759-7714.12613.
- [51] S. M. Langevin, R. A. Kratzke, és K. T. Kelsey, „Epigenetics of lung cancer”, *Transl. Res.*, köt. 165, sz. 1, o. 74–90, jan. 2015, doi: 10.1016/j.trsl.2014.03.001.
- [52] K. A. Papavassiliou, A. A. Sofianidi, V. A. Gogou, N. Anagnostopoulos, és A. G. Papavassiliou, „P53 and Rb Aberrations in Small Cell Lung Cancer (SCLC): From Molecular

Mechanisms to Therapeutic Modulation", *Int. J. Mol. Sci.*, köt. 25, sz. 5, o. 2479, febr. 2024, doi: 10.3390/ijms25052479.

[53] P. Wang és mtsai., „TP53 and CDKN2A mutations in patients with early-stage lung squamous cell carcinoma: an analysis of the correlations and prognostic outcomes”, *Ann. Transl. Med.*, köt. 9, sz. 16, o. 1330–1330, aug. 2021, doi: 10.21037/atm-21-3709.

[54] J. S. Song, Y. S. Kim, D. K. Kim, S. I. Park, és S. J. Jang, „Global histone modification pattern associated with recurrence and disease-free survival in non-small cell lung cancer patients”, *Pathol. Int.*, köt. 62, sz. 3, o. 182–190, márc. 2012, doi: 10.1111/j.1440-1827.2011.02776.x.

[55] M. Ando és mtsai., „Chromatin dysregulation and DNA methylation at transcription start sites associated with transcriptional repression in cancers”, *Nat. Commun.*, köt. 10, sz. 1, o. 2188, máj. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09937-w.

[56] J. Ansari, R. E. Shackelford, és H. El-Osta, „Epigenetics in non-small cell lung cancer: from basics to therapeutics”, *Transl. Lung Cancer Res.*, köt. 5, sz. 2, o. 155–171, ápr. 2016, doi: 10.21037/tlcr.2016.02.02.

[57] A. J. Schetter, N. H. H. Heegaard, és C. C. Harris, „Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways”, *Carcinogenesis*, köt. 31, sz. 1, o. 37–49, jan. 2010, doi: 10.1093/carcin/bgp272.

[58] S. P. Hussain, L. J. Hofseth, és C. C. Harris, „Radical causes of cancer”, *Nat. Rev. Cancer*, köt. 3, sz. 4, o. 276–285, ápr. 2003, doi: 10.1038/nrc1046.

[59] G. Dranoff, „Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy”, *Nat. Rev. Cancer*, köt. 4, sz. 1, o. 11–22, jan. 2004, doi: 10.1038/nrc1252.

[60] H.-M. Shen és V. Tergaonkar, „NFκB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy”, *Apoptosis*, köt. 14, sz. 4, o. 348–363, ápr. 2009, doi: 10.1007/s10495-009-0315-0.

[61] X. Su, W. Wu, Z. Zhu, X. Lin, és Y. Zeng, „The effects of epithelial–mesenchymal transitions in COPD induced by cigarette smoke: an update”, *Respir. Res.*, köt. 23, sz. 1, o. 225, aug. 2022, doi: 10.1186/s12931-022-02153-z.

[62] E. Sahai és mtsai., „A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts”, *Nat. Rev. Cancer*, köt. 20, sz. 3, o. 174–186, márc. 2020, doi: 10.1038/s41568-019-0238-1.

[63] S. C. Bendall, G. P. Nolan, M. Roederer, és P. K. Chattopadhyay, „A deep profiler’s guide to cytometry”, *Trends Immunol.*, köt. 33, sz. 7, o. 323–332, júl. 2012, doi: 10.1016/j.it.2012.02.010.

[64] H. T. Maecker és A. Harari, „Immune monitoring technology primer: flow and mass cytometry”, *J. Immunother. Cancer*, köt. 3, sz. 1, o. 44, dec. 2015, doi: 10.1186/s40425-015-0085-x.

[65] S. Basu, H. M. Campbell, B. N. Dittel, és A. Ray, „Purification of Specific Cell Population by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)”, *J. Vis. Exp.*, sz. 41, o. 1546, júl. 2010, doi: 10.3791/1546.

- [66] S. Khalifian, G. Raimondi, és G. Brandacher, „The Use of Luminex Assays to Measure Cytokines”, *J. Invest. Dermatol.*, köt. 135, sz. 4, o. 1–5, ápr. 2015, doi: 10.1038/jid.2015.36.
- [67] S. O. Majed és S. A. Mustafa, „MACE-Seq-based coding RNA and TrueQuant-based small RNA profile in breast cancer: tumor-suppressive miRNA-1275 identified as a novel marker”, *BMC Cancer*, köt. 21, sz. 1, o. 473, dec. 2021, doi: 10.1186/s12885-021-08218-4.
- [68] C. F. Vogelmeier és mtsai., „Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, köt. 195, sz. 5, o. 557–582, márc. 2017, doi: 10.1164/rccm.201701-0218PP.
- [69] H. L. Crowell és mtsai., „An R-based reproducible and user-friendly preprocessing pipeline for CyTOF data”, *F1000Research*, köt. 9, o. 1263, aug. 2022, doi: 10.12688/f1000research.26073.2.
- [70] A. Subramanian és mtsai., „Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, köt. 102, sz. 43, o. 15545–15550, okt. 2005, doi: 10.1073/pnas.0506580102.
- [71] S. Duncan, „Role of T-lymphocytes and pro-inflammatory mediators in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease”, *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, köt. Volume 3, o. 531–541, dec. 2008, doi: 10.2147/COPD.S1759.
- [72] D. S. Thommen és mtsai., „Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors”, *Cancer Immunol. Res.*, köt. 3, sz. 12, o. 1344–1355, dec. 2015, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0097.
- [73] R. L. Rabin és mtsai., „CXCR3 Is Induced Early on the Pathway of CD4+ T Cell Differentiation and Bridges Central and Peripheral Functions”, *J. Immunol.*, köt. 171, sz. 6, o. 2812–2824, szept. 2003, doi: 10.4049/jimmunol.171.6.2812.
- [74] M. E. P. Roberts és mtsai., „CD4+ T-Cell Profiles and Peripheral Blood Ex-Vivo Responses to T-Cell Directed Stimulation Delineate COPD Phenotypes”, *Chronic Obstr. Pulm. Dis. J. COPD Found.*, köt. 2, sz. 4, o. 268–280, 2015, doi: 10.15326/jcopdf.2.4.2015.0131.
- [75] R. Yuan és mtsai., „The Roles of Tissue-Resident Memory T Cells in Lung Diseases”, *Front. Immunol.*, köt. 12, o. 710375, okt. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.710375.
- [76] J. R. Fernandes és mtsai., „Age-associated phenotypic imbalance in TCD4 and TCD8 cell subsets: comparison between healthy aged, smokers, COPD patients and young adults”, *Immun. Ageing*, köt. 19, sz. 1, o. 9, dec. 2022, doi: 10.1186/s12979-022-00267-y.
- [77] M. Kanehisa, „KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”, *Nucleic Acids Res.*, köt. 28, sz. 1, o. 27–30, jan. 2000, doi: 10.1093/nar/28.1.27.
- [78] I. Elisia és mtsai., „The effect of smoking on chronic inflammation, immune function and blood cell composition”, *Sci. Rep.*, köt. 10, sz. 1, o. 19480, nov. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-76556-7.
- [79] A. Hosseinzadeh, P. R. Thompson, B. H. Segal, és C. F. Urban, „Nicotine induces neutrophil extracellular traps”, *J. Leukoc. Biol.*, köt. 100, sz. 5, o. 1105–1112, nov. 2016, doi: 10.1189/jlb.3AB0815-379RR.

- [80] E. Taucher, I. Mykoliuk, J. Lindenmann, és F.-M. Smolle-Juettner, „Implications of the Immune Landscape in COPD and Lung Cancer: Smoking Versus Other Causes”, *Front. Immunol.*, köt. 13, o. 846605, márc. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.846605.
- [81] S. Vasudevan és mtsai., „Lower PDL1, PDL2, and AXL Expression on Lung Myeloid Cells Suggests Inflammatory Bias in Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease”, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, köt. 63, sz. 6, o. 780–793, dec. 2020, doi: 10.1165/rcmb.2020-0085OC.
- [82] C. M. Freeman és mtsai., „Design of a multi-center immunophenotyping analysis of peripheral blood, sputum and bronchoalveolar lavage fluid in the Subpopulations and Intermediate Outcome Measures in COPD Study (SPIROMICS)”, *J. Transl. Med.*, köt. 13, sz. 1, o. 19, dec. 2015, doi: 10.1186/s12967-014-0374-z.
- [83] X. Xiong, M. Zhu, H. Wu, L. Fan, és D. Cheng, „Immunophenotype in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study”, *Respir. Res.*, köt. 23, sz. 1, o. 137, dec. 2022, doi: 10.1186/s12931-022-02058-x.
- [84] T. S. Kapellos és mtsai., „Systemic alterations in neutrophils and their precursors in early-stage chronic obstructive pulmonary disease”, *Cell Rep.*, köt. 42, sz. 6, o. 112525, jún. 2023, doi: 10.1016/j.celrep.2023.112525.
- [85] A. G. Guedes, M. Dileepan, J. A. Jude, D. A. Deshpande, T. F. Walseth, és M. S. Kannan, „Role of CD38/cADPR signaling in obstructive pulmonary diseases”, *Curr. Opin. Pharmacol.*, köt. 51, o. 29–33, ápr. 2020, doi: 10.1016/j.coph.2020.04.007.
- [86] Z. L. Piedra-Quintero, Z. Wilson, P. Nava, és M. Guerau-de-Arellano, „CD38: An Immunomodulatory Molecule in Inflammation and Autoimmunity”, *Front. Immunol.*, köt. 11, o. 597959, nov. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.597959.
- [87] N. Karin, „CXCR3 Ligands in Cancer and Autoimmunity, Chemoattraction of Effector T Cells, and Beyond”, *Front. Immunol.*, köt. 11, o. 976, máj. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00976.
- [88] J. K. Hu, T. Kagari, J. M. Clingan, és M. Matloubian, „Expression of chemokine receptor CXCR3 on T cells affects the balance between effector and memory CD8 T-cell generation”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, köt. 108, sz. 21, máj. 2011, doi: 10.1073/pnas.1101881108.
- [89] C. Railwah és mtsai., „Cigarette smoke induction of S100A9 contributes to chronic obstructive pulmonary disease”, *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, köt. 319, sz. 6, o. L1021–L1035, dec. 2020, doi: 10.1152/ajplung.00207.2020.
- [90] H. M. Koh és mtsai., „Prognostic Role of S100A8 and S100A9 Protein Expressions in Non-small Cell Carcinoma of the Lung”, *J. Pathol. Transl. Med.*, köt. 53, sz. 1, o. 13–22, jan. 2019, doi: 10.4132/jptm.2018.11.12.
- [91] I. S. Cheon, Y. M. Son, és J. Sun, „Tissue-resident memory T cells and lung immunopathology”, *Immunol. Rev.*, köt. 316, sz. 1, o. 63–83, júl. 2023, doi: 10.1111/imr.13201.
- [92] Y. Lavin és mtsai., „Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses”, *Cell*, köt. 169, sz. 4, o. 750-765.e17, máj. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.04.014.

- [93] F. Şahin, A. F. Koşar, A. F. Aslan, B. Yiğitbaş, és B. Uslu, „Serum biomarkers in patients with stable and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: A comparative study”, *J. Med. Biochem.*, köt. 38, sz. 4, o. 503–511, jan. 2019, doi: 10.2478/jomb-2018-0050.
- [94] I. Barta, C. Paska, és B. Antus, „Sputum Cytokine Profiling in COPD: Comparison Between Stable Disease and Exacerbation”, *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, köt. Volume 17, o. 1897–1908, aug. 2022, doi: 10.2147/COPD.S364982.
- [95] G. J. Szebeni, C. Vizler, K. Kitajka, és L. G. Puskas, „Inflammation and Cancer: Extra- and Intracellular Determinants of Tumor-Associated Macrophages as Tumor Promoters”, *Mediators Inflamm.*, köt. 2017, o. 1–13, 2017, doi: 10.1155/2017/9294018.
- [96] C. M. Freeman és mtsai., „Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are associated with decreased CD4+ & CD8+ T cells and increased growth & differentiation factor-15 (GDF-15) in peripheral blood”, *Respir. Res.*, köt. 16, sz. 1, o. 94, dec. 2015, doi: 10.1186/s12931-015-0251-1.

VIII. Összefoglaló

A tüdőrákos megbetegedés mellett a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) 2020-ban a harmadik vezető halálozási ok volt világszerte. A COPD, olyan gyulladásos tüdőbetegség, mely a tüdő légáramlásának akadályozottságát okozza, a betegség progressziója pedig tüdőrák kialakulásához vezethet. Tünetei közé tartozik a nehézlégzés, köhögés, fokozott nyálkatermelés és a zihálás. A legfontosabb kockázati tényezői a dohányzás, a bel-és kültéri légszennyezésnek való kitettség, allergének, munkahelyi kitettség, elhízás, mozgásszegény életmód és az egészségtelen táplálkozási szokások. Míg a COPD fő kockázati tényezőjének a dohányzást tartják, addig a dohányosok körülbelül 45-50%-a szenved COPD-ben, a COPD-s betegek nagyjából 25-45%-a pedig soha nem dohányzott. Továbbá, a tüdőrák kialakulásának kockázata ötször magasabb dohányos COPD-s betegeknél, mint normál tüdőfunkcióval rendelkező dohányosoknál, és kétszer magasabb, mint a nem dohányos COPD-s betegeknél. Ezért az oxidatív stressz és a dohányzás kiemelt fontosságú szerepet játszik a COPD és a tüdőrák kialakulásában.

Érdeklődési körünkbe a gyulladásos megbetegedések és a betegség kialakulása során fellépő perifériás immunhomeosztázis zavarai tartoznak, ezért Ph.D. munkám során a dohányfüst hatását vizsgáltuk a perifériás immunrendszer immunfenotípusára, sejtes és molekuláris résztvevőire egyaránt dohányos, gyulladásos tüdőpathológiákban. Kísérleteink legfőbb módszerei az egysejt-tömegcitometria, mely multiplex fenotipizálásra képes egysejt szinten, a Luminex xMAP (MAGPIX®) technológia, mely során egyetlen mintából egyszerre több plazmafehérje mennyisége detektálható, illetve az RNS-szekvenálással végzett transzkriptomikai analízis volt.

Vizsgálatainkhoz 4 vizsgálati csoportot határoztunk meg: dohányos, egészséges kontrollok (DK); dohányos, terápia naiv stabil COPD (stCOPD); dohányos, terápia naiv exacerbáló COPD (exCOPD) és dohányos, terápia naiv nem kissejtes tüdőrákos betegek (NSCLC) csoportja. A DK csoportot korban és nemben a betegcsoporthoz illeszkedő egyének alkották, míg a COPD-s csoportokban a mintavételkor ismert tüdőrákos megbetegedés nem állt fenn. A vérminták gyűjtése 2018. december – 2019 december között, a COVID-19 járvány kialakulása előtt történt.

Első célunk a perifériás mononukleáris sejtek (PBMC) immunfenotípusának multiplex összehasonlító vizsgálata volt egysejt-tömegcitometriával. Ennek elvégzéséhez

az önkéntes kontrolloktól és a betegektől perifériás vérmintát gyűjtöttünk, majd elválasztottuk a PBMC-t a vér többi alkotóelemétől. Összesen 9 dohányos kontroll, 8 stCOPD-s, 8 exCOPD-s és 8 NSCLC-s beteg PBMC mintájának immunfenotipizálását végeztük el a 29 antitestet tartalmazó, Human Immune Monitorig (Fluidigm) gyári panelt felhasználva. Az élő, szinglet, CD45+ immunsejteket a CD3, CD4, CD8, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD20, CD24, CD25, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD45RO, CD56, CD66b, CD123, CD127, CD161, CD183, CD185, CD194, CD196, CD197, HLA-DR, IgD és TCR $\gamma\delta$ sejtfelszíni markerekkel jellemeztük. A vizsgált markerek kifejeződése alapján felügyelet nélküli elemzéseket végeztünk, mint a UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction) és a FlowSOM (Self-Organizing Maps for flow cytometry), melyekkel 14 fő immunsejt populációt határoztunk meg, mint a CD4+ T-sejtek, CD8+ T-sejtek, CD4+CD8+ T-sejtek, CD4-CD8- T-sejtek, $\gamma\delta$ T-sejtek, NK-sejtek, CD4+ NKT-sejtek, CD8+ NKT-sejtek, plazmablasztok, B-sejtek, monociták, CD11c^{dim} sejtek, plazmacitoid dendritikus sejtek (pDC), monocitoid dendritikus sejtek (mDC). A fő immunpopulációk gyakoriságát a CD45+, élő sejtek arányában fejeztük ki százalékosan, majd statisztikai összehasonlítást végeztünk a különböző betegcsoportok és a kontrollcsoport között. Az összehasonlítás során 5 immunpopuláció eloszlása mutatott szignifikáns eltéréseket. A CD4+ T-sejtek aránya a stCOPD és exCOPD csoportban egyharmadára, a DK csoportban a felére csökkent, NSCLC-ben volt a legmagasabb, míg a CD8+ T-sejtek aránya exCOPD-ben volt a legalacsonyabb és stCOPD-ben pedig a legmagasabb. A CD4-/CD8- T-sejtek, a pDC és mDC aránya szintén exCOPD-ben bizonyult a legalacsonyabbnak. Ezzel ellentétben a monociták aránya exCOPD-ben a DK kétszerese, a CD11c^{dim} sejtek aránya pedig a DK tízszerese stCOPD és exCOPD, NSCLC-ben pedig a DK ötszöröse volt.

Ezt követően a főbb immunsejt populációk marker expresszióját is összehasonlítottuk, mely során 33 szignifikáns különbséget azonosítottuk. A CD4+ T-sejtek esetén a CD27 kifejeződése NSCLC-ben csökkent a CD127 pedig exCOPD-ben volt a legmagasabb. A CD8+ T-sejtek CD27, CD28 és CD127 expressziója stCOPD-ben volt a legalacsonyabb, de a betegség súlyosbodásával az expressziójuk fokozódott, míg a CD183 exCOPD-ben a CD197 pedig stCOPD-ben fejeződött ki legalacsonyabban, de a többi betegcsoportban is csökkent expressziót mutatott. A CD4+/CD8+ T-sejtek esetén a CD8 és CD25 kifejeződése exCOPD-ben volt a legmagasabb, a CD27 expressziójában pedig exCOPD és NSCLC-ben csökkenést tapasztaltunk. A CD4-/CD8- T-sejtek a CD28-

at exCOPD-ben a legmagasabban, a CD183-at pedig exCOPD-ben expresszálták a legalacsonyabban. Az CD4+ NKT-sejtek CD16, CD45 és CD197 míg a CD8+ NKT-sejtek CD16, CD56 és CD183 kifejeződésében találtunk szignifikáns eltéréseket. B-sejtek esetében a CD19 kifejeződése NSCLC-ben, a HLA-DR expressziója pedig exCOPD-ben volt a legalacsonyabb, a CD185 és CD196 expressziója pedig stCOPD-ben. A pDC-k a CD19-et, a CD27-et és a CD45RA-t az NSCLC-ben legalacsonyabban, a CD38-at pedig az exCOPD-ben fejezték ki a legmagasabban. A CD11c^{dim} populáció marker expressziós vizsgálata során a CD3, CD14 és HLA-DR kifejeződésében találtunk szignifikáns különbséget, a CD3 és HLA-DR expressziója exCOPD-ben a legalacsonyabban, a CD14 pedig exCOPD-ben a legmagasabban kifejeződőnek bizonyult.

Az egysejt-immunfenotipizálás eredményei közül érdemes kiemelni néhány különbséget, melyek relevánsak lehetnek a gyulladás súlyosbodásában és a tumorelles immunválasz károsodásában, mint CD4+ és CD8+ T-sejtek betegcsoportokban mutatott csökkent CD27 expresszióját, amely a tumor nekrosis faktor szupercsalád tagjaként kulcsszerepet tölt be a T-sejt aktivációban, elősegíti a T-sejtek osztódását és differenciációját memória illetve effektor sejtek irányába. Továbbá a CD16 (FcγRIII), - melynek az NK-sejtek általi tumorsejt ölésben van meghatározó szerepe - csökkenése mind a CD4+ NKT- és CD8+ NKT-sejteken NSCLC-ben kiemelt jelentőségű.

Az analízis utolsó lépéseként minden főpopulációt FlowSOM algoritmussal további alpopulációkra, úgynevezett metaklaszterekre bontottunk és statisztikai elemzést végeztünk a csoportok közötti eloszlásuk alapján. Mivel a dohányos COPD-s betegek immunrendszerének aktiválódása és tüdőrák esetén a T-sejtek diszfunkciója vagy kimerülése ismert, ezért fókuszunkat a T-sejtek alpopulációinak vizsgálatára összpontosítottuk. A betegcsoportban szignifikánsan magasabb arányban megtalálható alpopulációk a DK-val összehasonlítva a következők voltak: CD4+ T-sejtek CD38^{bright} és CD183+ MC-ei, CD8+ sejtek a MC01: CD45RA^{dim} alpopuláció, MC06: CD28+/CD194+, MC13: CD27+/CD183+/CD197^{dim}, CD4-/CD8- sejtek a MC04: CD38^{bright} és MC05: CD38^{bright}/CD183+/CD196+ alpopulációi. A betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb arányban megtalálható alpopulációk a DK-val összehasonlítva a következők voltak: CD8+ sejtek a CD27+ MC-ei és a CD183+ MC-ei, γδT-sejtek CD183+ MC-ei.

Mivel a CD4⁺ EM és CD4⁺ CM T-sejtek eloszlása hasonló mintázatot mutatott, vagyis a DK-hoz képest a stCOPD-ben csökkent, legalacsonyabban az exCOPD-ben, majd a NSCLC-ben a DK-val közel azonos arányban volt jelen, ezért további transzkriptomikai vizsgálatainkhoz ezt a két memóriasejt populációt választottuk ki. Az RNS szekvenálás eredményeképp exCOPD és NSCLC csoport CD4⁺ CM populációjában 203 közösen, eltérően magasan és 167 közösen, eltérően alacsonyan expresszált gént azonosítottunk, melyek 0,807 Pearson-korrelációt mutattak. A exCOPD és NSCLC csoport CD4⁺ EM populációjában 234 közösen, eltérően magasan és 90 közösen, eltérően alacsonyan kifejeződő gént azonosítottunk, melyek 0,747 Pearson-korrelációt mutattak. A HALLMARK és KEGG analízisek során azt az eredményt kaptuk, hogy az exCOPD és NSCLC CD4⁺ CM sejteiben főképp az angiogenezisben szerepet játszó útvonalak, addig az exCOPD és NSCLC CD4⁺ EM sejteiben a sejtsztódásban, fehérje szekrécióban, transzkripcióban, UV sugárzásra adott válaszban szerepet játszó gének up-reguláltak.

A rendelkezésünkre álló vérplazma mintákon multiplex Luminex MAGPIX® mérést végeztünk 17 immuno-onkológiai ellenőrzőpont mediátor (BTLA, CD27, CD28, TIM-3, HVEM, CD40, GITR, LAG-3, TLR2, GITRL, PD-1, CTLA4, CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, ICOS) mennyiségi meghatározása céljából. A vizsgálati csoportot 9 dohányos kontroll, 11 stCOPD-s, 13 exCOPD-s és 13 NSCLC-s beteg alkotta. A vizsgált plazmafehérjék közül a TIM-3/CD366, a PD-L2/CD273, a B7-2/CD86 és a GITRL mutatott szignifikáns eltérést. A T-sejt aktivációban résztvevő B7-2/CD86 és a GITRL koncentrációja exCOPD-ben volt a legmagasabb, ezzel ellentétben az inhibitor PD-L2/CD273 exCOPD-ben volt a legalacsonyabb. A gátló TIM-3/CD366 mennyisége pedig stCOPD-ben a volt legmagasabb. Elvégeztük a vizsgált plazmafehérjék klaszterezését is, mely során 3 klasztert határoztunk meg. Az 1. klaszterre a gyulladásos mediátorok legmagasabb koncentrációja jellemző és hiányzik belőle a DK csoport, addig a 2. klasztert a plazmafehérjék legalacsonyabb koncentrációja jellemzi. A 3. klaszter egy átmeneti csoportnak tekinthető, ahol a vizsgált mediátorok közepes koncentrációja figyelhető meg, többségben NSCLC-sek alkotják.

IX. Summary

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) was the third leading cause of death worldwide in 2020 beside lung cancer. COPD is a chronic inflammatory lung disease that causes obstructed airflow in the lungs. The progression of COPD may cause lung cancer. Symptoms include difficulty breathing, coughing, increased mucus production and wheezing. The most important risk factors are tobacco smoking, exposure to indoor and outdoor pollutants, allergens, occupational exposure, obesity, physical inactivity and unhealthy diet. The main risk factor of COPD is tobacco use, however around 25-45% of COPD patients were never-smokers. Furthermore, the risk of developing lung cancer is five times higher in smokers with COPD than in smokers with normal lung function, and twice as high as in non-smokers with COPD. Therefore, oxidative stress and tobacco smoking play a major role in the development of COPD and lung cancer.

Our interest was the immunophenotyping of smoking related pathologies, therefore the main goal of my Ph.D. research was to examine the effects of tobacco smoking on the peripheral immune system in chronic inflammatory lung pathologies. The main methods of our experiments were single-cell mass cytometry which is able to perform multiplex phenotyping at single cell level, Luminex xMAP (MAGPIX®) technology, able to detect multiple plasma protein levels simultaneously from a single sample, and transcriptomic analysis by RNA sequencing.

We defined 4 experimental groups: smoker, healthy controls (SmHC), smoker, therapy naive stable COPD (stCOPD), smoker, therapy naive exacerbating COPD (exCOPD) and smoker, therapy naive non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. The SmHC group consisted of age- and sex-matched individuals, in the COPD groups there was no known lung cancer at the time of sampling. Blood samples were collected between December 2018 and December 2019, before the outbreak of COVID-19 pandemic in Hungary.

Our first aim was to perform a multiple comparative analysis to identify the immunophenotype of peripheral blood mononuclear cells by mass cytometry. Peripheral blood samples were collected from volunteer controls and COPD or NSCLC patients, then PBMC was separated from other blood components. We performed the immunophenotyping of the PBMCs of 9 SmHCs, 8 stCOPD, 8 exCOPD and 8 NSCLC patients using the 29 antibodies containing Human Immune Monitoring Panel (Fluidigm).

The CD45⁺ living singlet cells were characterized by the following cell surface markers: CD3, CD4, CD8, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD20, CD24, CD25, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD45RO, CD56, CD66b, CD123, CD127, CD161, CD183, CD185, CD194, CD196, CD197, HLA-DR, IgD and TCR $\gamma\delta$. Unsupervised analyses, such as UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction) and FlowSOM (Self-Organizing Maps for flow cytometry), were carried out according to the expression of the markers. We identified 14 main immune cell populations: CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD4⁺/CD8⁺ T cells, CD4⁺/CD8⁻ T cells, γ/δ T cells, NK cells, CD4⁺ NKT cells, CD8⁺ NKT cells, plasmacytoid cells, B cells, monocytes, CD11c^{dim} cells, plasmacytoid dendritic cells (pDC), monocytoic dendritic cells (mDC) and their subpopulations. The frequency of the main immune populations was given within the percentage of CD45⁺ cells, then examination groups were statistically compared. The statistical analysis showed significant differences in the distribution of 5 immune populations. The proportion of CD4⁺ T cells was reduced to a third in stCOPD and exCOPD, a half in SmHC and the highest in NSCLC, while the percentage of CD8⁺ T cells was the lowest in exCOPD and the highest in stCOPD. The proportion of CD4⁺/CD8⁻ T cells, pDCs and mDCs was also the lowest in exCOPD. In contrast, the percentage of monocytes in exCOPD is twice of the SmHC, the percentage of CD11c^{dim} cells is 10 times higher in stCOPD and exCOPD than in SmHC and 5 times higher in NSCLC compared to SmHC.

Next, the marker expression profile of the main immune cell populations was compared, revealing 33 significant differences. The CD27 expression on CD4⁺ T-cells was reduced in NSCLC and expression of CD127 was the highest in exCOPD. The CD27, CD28 and CD127 expression on CD8⁺ T cells was the lowest in stCOPD but increased with the progression of the disease, while the expression of CD183 was the lowest in exCOPD and CD197 in stCOPD, but showed also decreased expression level in the other patient groups. On CD4⁺/CD8⁺ T cells, CD8 and CD25 expression was the highest in exCOPD, and CD27 expression was reduced in exCOPD and NSCLC. CD4⁺/CD8⁻ T cells expressed CD28 the highest in exCOPD and CD183 lowest in exCOPD. Significant differences were found in the expression of CD16, CD197 and CD45 on CD4⁺ NKT cells and CD16, CD56 and CD183 on CD8⁺ NKT cells. The CD19 expression on B cells was the lowest in NSCLC, HLA-DR expression was the lowest in exCOPD, and CD185 and CD196 expression was the lowest in stCOPD. pDCs expressed CD19, CD27 and

CD45RA the lowest in NSCLC and CD38 the highest in exCOPD. CD11c^{dim} cells expressed CD3 and HLA-DR the lowest in exCOPD and the expression of CD14 was the highest in exCOPD.

Of the results, it is worth highlighting some differences, that may be relevant in the exacerbation of inflammation and impairment of the antitumor immune response, such as the reduced expression of CD27 in CD4⁺ and CD8⁺ T cells in patient groups, which plays a key role in T cell activation as a member of the tumour necrosis factor superfamily, promoting T cell proliferation and differentiation into memory and effector cells. Furthermore, the reduction of CD16 (FcγRIII), which plays a crucial role in tumour cell killing by NK cells, was shown both in CD4⁺ NKT and in CD8⁺ NKT cells in NSCLC.

Finally, all main populations were further subdivided into subpopulations, also known as metaclusters, using FlowSOM algorithm and statistically compared according to the distribution among groups. Because the dysfunction or exhaustion of T cells in lung cancer has been well known, we focused on T-cell subpopulations. The subpopulations found in significantly higher rates in patient groups compared to SmHC were the following: In CD4⁺ T cells CD38^{bright} and CD183⁺ MCs; in CD8⁺ cells MC01: CD45RA^{dim}, MC06: CD28⁺/CD194⁺, MC13: CD27⁺/CD183⁺/CD197^{dim} subpopulations, in CD4⁺/CD8⁻ cells MC04: CD38^{bright} and MC05: CD38^{bright}/CD183⁺/CD196⁺ subpopulations. The subpopulations with significantly lower rates in patient groups compared to SmHC were the following: in CD8⁺ cells CD27⁺ MCs and CD183⁺ MCs; in γδT cells CD183⁺ MCs.

As a result of the distribution of CD4⁺ EM and CD4⁺ CM cells showed similar trend, we selected these two memory cell populations for further transcriptomic analysis. As a result of RNA sequencing in CD4⁺ CM cells of exCOPD and NSCLC groups, we identified 203 genes which were differentially upregulated and 167 genes which were differentially downregulated and showing 0,807 Pearson correlation. In CD4⁺ EM cells of the exCOPD and NSCLC group, 234 differentially upregulated and 90 differentially downregulated genes were identified, showing 0,747 Pearson correlation. HALLMARK and KEGG analyses revealed that in CD4⁺ CM cells of exCOPD and NSCLC, pathways involved mainly in angiogenesis, whereas in CD4⁺ EM cells of exCOPD and NSCLC, genes involved in cell division, protein secretion, transcription, and response to UV radiation were upregulated.

We performed multiplex Luminex MAGPIX® measurements on available plasma samples to detect the concentration level of 17 immuno-oncology checkpoint mediators (BTLA, CD27, CD28, TIM-3, HVEM, CD40, GITR, LAG-3, TLR2, GITRL, PD-1, CTLA4, CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, ICOS). The study group consisted of 9 SmHC, 11 stCOPD, 13 exCOPD and 13 NSCLC patients. Of the 17 plasma proteins, TIM-3/CD366, PD-L2/CD273, B7-2/CD86 and GITRL showed significant differences. The concentrations of B7-2/CD86, which takes part in T cell activation and GITRL, were the highest in exCOPD, in contrast the inhibitor PD-L2/CD273 was the lowest in exCOPD. The amount of the inhibitor TIM-3/CD366 was the highest in stCOPD. Clustering of the plasma proteins was also performed and 3 clusters were identified. Cluster 1 was characterized by the highest concentration of inflammatory mediators and it was lacking in SmHC, while cluster 2 was characterized by the lowest concentration of the measured plasma proteins. Cluster 3 was considered as a transition group with intermediate concentration of the protein mediators, predominantly represented by NSCLC patients.

X. Publikációs lista

MTMT azonosító: 10081633

Kumulatív impakt faktor: 79,811

A dolgozat alapjául szolgáló közlemény:

Gémes Nikolett, Balog József Á., Neuperger Patrícia, Schlegl Erzsébet, Barta Imre, Fillinger János, Antus Balázs, Zvara Ágnes, Hegedűs Zoltán, Czimmerer Zsolt, Manczinger Máté, Balogh Gergő M., Tóvári József, Puskás László G., Szebeni Gábor J., *Single-cell immunophenotyping revealed the association of CD4⁺ central and CD4⁺ effector memory T cells linking exacerbating chronic obstructive pulmonary disease and NSCLC*. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, (2023) **IF: 7,3/Q1**

A fokozatszerzési eljárás alapját képező tudományos közlemények:

1. **Gémes Nikolett**, Balog József Á., Neuperger Patrícia, Schlegl Erzsébet, Barta Imre, Fillinger János, Antus Balázs, Zvara Ágnes, Hegedűs Zoltán, Czimmerer Zsolt, Manczinger Máté, Balogh Gergő M., Tóvári József, Puskás László G., Szebeni Gábor J., *Single-cell immunophenotyping revealed the association of CD4⁺ central and CD4⁺ effector memory T cells linking exacerbating chronic obstructive pulmonary disease and NSCLC*. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, (2023), **IF (2023): 5,7/Q1**

2. Szebeni Gábor J. *, **Gémes Nikolett***, Honfi Dániel , Szabó Enikő, Neuperger Patrícia, Balog József Á., Nagy Lajos I., Szekanecz Zoltán, Puskás László G., Toldi Gergely, Balog Attila, *Humoral and cellular immunogenicity and safety of five different SARS-CoV-2 vaccines in patients with autoimmune rheumatic and musculoskeletal diseases in remission or with low disease activity and in healthy controls: a single center study*, FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, (2022), **IF (2022): 7,3/Q1**

Egyéb közlemények listája:

1. Szalontai Klára, **Gémes Nikolett**, Furák József, Varga Tünde, Neuperger Patrícia, Balog József Á., Puskás László G., Szebeni Gábor J.*, *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Epidemiology, Biomarkers and Paving the Way to Lung Cancer*, Journal of Clinical Medicine 2021, Special issue: Living with Chronic Obstructive Pulmonary Disease, JOURNAL OF CLINICAL MEDICINE (2020), **IF (2021): 4,964/Q1**

2. Brunner Szilvia , Varga Dániel , Bozó Renáta , Polanek Róbert , Tőkés Tünde , Szabó Emília Rita , Molnár Réka , **Gémes Nikolett** , Szebeni Gábor J. , Puskás László G., Erdélyi Miklós, Hideghéty Katalin, *Analysis of Ionizing Radiation Induced DNA Damage by Superresolution dSTORM Microscopy*, PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH, (2021), **IF (2021): 2,847/Q2**

3. Neuperger Patrícia, Balog József Á., Tiszlavicz László, Furák József, **Gémes Nikolett**, Kotogány Edit, Szalontai Klára, Puskás László G., Szebeni Gábor J., *Analysis of the Single-Cell Heterogeneity of Adenocarcinoma Cell Lines and the Investigation of Intratumor Heterogeneity Reveals the Expression of Transmembrane Protein 45A (TMEM45A) in Lung Adenocarcinoma Cancer Patients*, CANCERS (2022), **IF (2022): 5,2/Q1**

4. Honfi Dániel*, **Gémes Nikolett***, Szabó Enikő, Neuperger Patrícia, Balog József Á., Nagy Lajos I., Toldi Gergely, Puskás László G., Szebeni Gábor J., Balog Attila, *Comparison of Homologous and Heterologous Booster SARS-CoV-2 Vaccination in Autoimmune Rheumatic and*

Musculoskeletal Patients, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, (2022), **IF (2022): 5,6/Q1**

5. **Gémes Nikolett**, Makra Zsófia, Neuperger Patrícia, Szabó Enikő, Balog József Á., Flink Lili Borbála, Kari Beáta, Hackler László, Puskás László G., Kanizsai Iván, Szebeni Gábor J., A cytotoxic survey on 2-amino-1H-imidazol based synthetic marine sponge alkaloid analogues., DRUG DEVELOPMENT RESEARCH, (2022), **IF (2022): 3,8/Q3**

6. Ali Hazhmat, Traj Péter, Szebeni Gábor J., **Gémes Nikolett**, Resch Vivien, Paragi Gábor, Mernyák Erzsébet, Minorics Renáta, Zupkó István, *Investigation of the Antineoplastic Effects of 2-(4-Chlorophenyl)-13 α -Estrone Sulfamate against the HPV16-Positive Human Invasive Cervical Carcinoma Cell Line SiHa*, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, (2023), **IF (2023): 4,9/Q1**

7. Nagy Viktória, Mounir Raji, Szebeni Gábor J., Szakonyi Zsolt, Gémes Nikolett, Minorics Renáta , Germán Péter, Zupkó István, *Investigation of Anticancer Properties of Monoterpene-Aminopyrimidine Hybrids on A2780 Ovarian Cancer Cells*, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, (2023), **IF (2023): 4,9/Q1**

8. Szabó Enikő , Modok Szabolcs* , Rónaszéki Benedek , Faragó Anna , **Gémes Nikolett** , Nagy Lajos I. , Hackler László , Farkas Katalin , Neuperger Patrícia , Balog József Á., Balog Attila, Puskás László G., Szebeni Gábor J., *Comparison of humoral and cellular immune responses in hematologic diseases following completed vaccination protocol with BBIBP-CorV, or AZD1222, or BNT162b2 vaccines against SARS-CoV-2*, FRONTIERS IN MEDICINE, (2023), **IF (2023): 3,1/Q1**

9. Szebeni Gábor J., Alföldi Róbert, Nagy Lajos I., Neuperger Patrícia, **Gémes Nikolett**, Balog József Á., Tislavicz László, Puskás László G., *Introduction of an Ultraviolet C-Irradiated 4T1 Murine Breast Cancer Whole-Cell Vaccine Model*, VACCINES (BASEL), (2023), **IF (2023): 5,2/Q1**

10. Seyyed Ashkan Senobar Tahaei, Kulmány Ágnes, Minorics Renáta, Kiss Anita, Szabó Zoltán, Germán Péter, Szebeni Gábor J., **Gémes Nikolett**, Mernyák Erzsébet, Zupkó István, *Antiproliferative and antimetastatic properties of 16-azidomethyl substituted 3-O-benzyl estrone analogs*, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES (2023.), **IF (2023): 4,9/Q1**

11. Neuperger Patrícia, Szalontai Klára, **Gémes Nikolett**, Balog József Á., Tislavicz László, Furák József, Lázár György, Puskás László G, Szebeni Gábor J., *Single-Cell Mass Cytometric Analysis of Peripheral Immunity and Multiplex Plasma Marker Profiling of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Receiving PD-1 Targeting Immune Checkpoint Inhibitors in Comparison with Platinum-Based Chemotherapy*, FRONTIERS IN IMMUNOLOGY (2023), **IF (2023):5,7/Q1**

12. Szabó Enikő, Faragó Anna, Bodor Gergely, **Gémes Nikolett**, Puskás László G., Kovács László, Szebeni Gábor J., *Identification of immune subsets with distinct lectin binding signatures using multi-parameter flow cytometry: correlations with disease activity in systemic lupus erythematosus*, FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, (2024), **IF (2023): 5,7/Q1**

13. Ruppert Zsófia, Neuperger Patrícia, Rákóczi Bettina, **Gémes Nikolett**, Dukay Brigitta, Hajdu Petra, Péter Mária, Balogh Gábor, Tislavicz László, Vígh László, Puskás László G, Szebeni Gábor J., Tóth E. Melinda, *Characterization of obesity-related diseases and inflammation using single cell immunophenotyping in two different diet-induced obesity models*, INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY, (2024), **IF (2023): 4,2/Q1**

14. Inczeffi Orsolya, Eutamene Hélène, Placide Fanny, Tondereau Valérie, Pallagi Petra, Bagyánszki Mária, Bódi Nikolett, **Gémes Nikolett**, Szebeni Gábor, Molnár Tamás, Theodorou Vassilia, Róka Richárd, *Translational evaluation of Gelsectan® effects on gut barrier dysfunction and visceral pain in animal models and irritable bowel syndrome with diarrhoea*, UNITED EUROPEAN GASTROENTEROLOGY JOURNAL, (2024), **IF (2023): 5,8/Q1**

XI. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Szebeni Gábor Jánosnak**, hogy minden feltételt biztosított a sikeres kutatómunkához, a szakmai útmutatásért és a szakmai fejlődésem folyamatos támogatásáért. Köszönöm, hogy általa számos kollaborációs kutatásban részt vehettem, így mélyebben megismerhettem és elsajátíthattam az immunológia kutatás különböző aspektusait.

Köszönöm csoportvezetőnknek, **Dr. Puskás Lászlónak**, hogy a Funkcionális Genomika csoport tagja lehetek.

Ezúton szeretném köszönetem kifejezni a csoport jelenlegi és korábbi munkatársainak, **Balog József Ágostonnak**, **Neuperger Patrícianak** és **Szabó Enikőnek** a folyamatos szakmai támogatásért és segítségért. Köszönöm **Szabó Cynthiának** és **Minorits Szilviának** a labormunka során nyújtott segítségüket, rugalmas hozzáállásukat. Köszönöm **Zvara Ágnesnek** a transzkriptomikai elemzésekben, **Kotogány Editnek** pedig az áramlási citometria elsajátításában nyújtott segítségét és a végeláthatatlan sejtiszortolásokat.

Köszönöm az Országos Korányi Pulmonológia Intézetből **Dr. Fillinger Jánosnak**, **Dr. Tóvári Józsefnek** és **Schlegl Erzsébetnek**, hogy biztosították számunkra a kontroll és betegmintákat egyaránt.

Hálával tartozom a családomnak és a barátaimnak a végtelen türelmükért és támogatásukért.