

MTA Doktori Értekezés



A kissejtes tüdőrák molekuláris altípusai: biológia, heterogenitás és terápia

Dr. Döme Balázs

Tumorbiológiai Osztály, Országos Korányi Pulmonológiai Intézet

Budapest

2023

MTA Doktori Értekezés

Tartalomjegyzék

Az értekezésben leggyakrabban használt rövidítések jegyzéke	4. oldal
Háttér	5. oldal
Célkitűzések	5. oldal
1. Szubtípus-specifikus transzkripció faktorok expressziós mintázata SCLC-ben	7. oldal
1.1. Bevezetés	7. oldal
1.2. Anyag és módszer	7. oldal
1.3. Eredmények	8. oldal
1.4. Megbeszélés	14. oldal
2. Humán SCLC komprehenzív proteomikai vizsgálata: szubtípus-specifikus molekuláris mintázatok	17. oldal
2.1. Bevezetés	17. oldal
2.2. Anyag és módszer	18. oldal
2.3. Eredmények	19. oldal
2.4. Megbeszélés	31. oldal
3. A CD47 és PD-L1 expresszió klinikai és prognosztikai jelentőségének vizsgálata műtétilag reszekált SCLC-ben	34. oldal
3.1. Bevezetés	34. oldal
3.2. Anyag és módszer	34. oldal
3.3. Eredmények	35. oldal
3.4. Megbeszélés	39. oldal
4. STING és MHCII immunellenőrzőpont-fehérjék expressziója SCLC-ben	41. oldal
4.1. Bevezetés	41. oldal
4.2. Anyag és módszer	41. oldal
4.3. Eredmények	44. oldal
4.4. Megbeszélés	54. oldal
5. BCL-2 expresszió és kombinált BCL-2 / MCL-1 gátlás SCLC-ben	57. oldal
5.1. Bevezetés	57. oldal
5.2. Anyag és módszer	58. oldal
5.3. Eredmények	60. oldal
5.4. Megbeszélés	68. oldal
6. Az értekezés főbb megállapításai	70. oldal

7. Közlemények	72. oldal
7.1. Az értekezés alapját képező saját közlemények	72. oldal
7.2. További, a PhD fokozat elnyerése (2004) után született, saját közlemény	73. oldal
7.3. A PhD fokozat elnyerése (2004) előtt készült saját közlemények	89. oldal
7.4. A PhD fokozat elnyerése (2004) előtt készült könyvfejezet	90. oldal
7.5. Az értekezésben hivatkozott egyéb közlemények listája	91. oldal
8. Köszönetnyilvánítás	98. oldal
9. Tudománymetriai adatok	99. oldal

Az értekezésben leggyakrabban használt rövidítések jegyzéke

ASCL1: achaete-scute homologue 1; **AXL:** tirozin-protein-kináz receptor UFO; **BAK:** BCL2 Antagonist/Killer; **BAX:** BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator; **BCAM:** Basal Cell Adhesion Molecule; **BCL-2:** BCL2 Apoptosis Regulator; **CDK:** Cyclin Dependent Kinase; **CHT:** kemoterápia; **CLL:** krónikus limfoid leukémia; **COPD:** krónikus obstruktív tüdőbetegség; **DDC:** aromás-L-aminosav-dekarboxiláz; **DFS:** betegségmentes túlélést; **EMT:** epithelial mesenchymal transformation; **EPHA2:** EPH Receptor A2; **FDA:** U.S. Food and Drug Administration; **FFPE:** Formalin-Fixed Paraffin-Embedded; **GPX8:** Glutathione Peroxidase 8; **GTPBP1:** GTP Binding Protein 1; **IDO:** indolamin-2,3-dioxygenáz; **IGF-1R:** Insulin Like Growth Factor 1 Receptor; **IHC:** immunhisztokémia; **KEGG:** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; **KIT:** KIT Proto-Oncogene; **KRT18:** Keratin 18; **MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase; **MCL-1:** MCL1 Apoptosis Regulator; **MHCII:** major histocompatibility complex II; **MVA:** multivariáns analízis; **NE:** neuroendokrin; **NEUROD1:** neurogenic differentiation factor 1; **NSCLC:** nem-kissejtes tüdőrák; **OLFML1:** Olfactomedin 1; **OS:** overall survival (teljes túlélés); **OXPHOS:** Oxidative phosphorylation; **PD-L1:** Programmed death-ligand 1; **PDK2:** Pyruvate Dehydrogenase Kinase 2; **PLCG2:** Phospholipase C Gamma 2; **POU2F3:** POU class 2 homeobox 3; **PVR:** poliovírus receptor; **RB1:** RB Transcriptional Corepressor 1; **SCLC:** small cell lung cancer (kissejtes tüdőrák); **STING:** Stimulator of interferon genes; **TMA:** tissue microarray; **TME:** tumor microenvironment; **TP53:** Tumor protein P53; **WTS:** whole tissue section; **YAP1:** yes-associated protein 1

Háttér

A kissejtes tüdőrák („small cell lung cancer”, SCLC) a tüdőrákos esetek mintegy 13-15%-át teszi ki, és – a kevesebb, mint 7%-os ötéves túlélési arányával – a rosszindulatú megbetegedések egyik leghalálosabb formájának számít (1-3). Az SCLC-t rendkívül agresszív kórlefolyás, kiterjedt kromoszóma-átrendeződések, nagy mutációs teher és a tumor protein P53 (TP53), valamint a retinoblasztóma 1 (RB1) tumorszupresszor gének csaknem általános inaktivációja jellemzi (1, 4). Az SCLC agresszív viselkedése miatt a betegek kétharmadánál már a kezdeti diagnózis felállításakor mellkason kívüli szervi áttétek figyelhetők meg (4). Ennek megfelelően a betegeket általában szisztémás citotoxikus kemoterápiával és immunterápiával kezelik, egyidejű sugárkezeléssel vagy anélkül (1, 5, 6). Bár az SCLC kezdetben kivételesen jól reagál a platina-alapú terápiákra, és a terápiás válasz aránya következetesen meghaladja a 60%-ot, az esetek többségében gyorsan rezisztencia alakul ki és a betegség kiújul (4, 7). Fontos megjegyezni, hogy a célzott terápiák az SCLC-ben szenvedő betegeknél eddig kudarcot vallottak, és az immunterápia nem-kissejtes tüdőrákban (NSCLC) tapasztalt hatékonysága nem tükröződik SCLC esetében (3, 8).

Bár az SCLC-t korábban homogén, egyetlen morfológiai típussal rendelkező betegségnek tekintették, a humán tumorokon és preklinikai modelleken (SCLC sejtvonalakon, genetikailag módosított egér modelleken és betegből származó xenograftokon) végzett legújabb kutatások azt mutatják, hogy az SCLC-tumorok az achaete-scute homologue 1 (ASCL1), a neurogenic differentiation factor 1 (NEUROD1) és a POU class 2 homeobox 3 (POU2F3) transzkripciós faktorok emelkedett expressziója, illetve bizonyos gyulladáshoz kapcsolódó jellemzők alapján különböző altípusokba sorolhatók (6, 9).

Az ASCL1-t nagymértékben expresszáló tumorok (SCLC-A altípus) a neuroendokrin (NE) markerek magasabb expressziójával jellemezhetők, míg a NEUROD1 magas expressziójú daganatok (SCLC-N altípus) általában alacsonyabb NE marker expressziót mutatnak, és ezért kevésbé NE jellegű fenotípus társul hozzájuk (9-14). A nem-NE altípusokat illetően, a POU2F3 magas expressziójú tumorok (SCLC-P altípus) eltérő expressziós profilja és transzkripciós faktor meghatározottsága arra utal, hogy ez az altípus – az előzőekben részletezett altípusokhoz képest – eltérő sejtes eredettel rendelkezik és az SCLC egy jellegzetes kefésejtes variánsát képviselheti (9, 15). Kezdetben egy negyedik molekuláris altípust is feltételeztek, amelyet a yes-associated protein 1 (YAP1) transzkripciós faktor vezérel (9), azonban több független vizsgálat sem erősítette meg egy különálló SCLC-Y altípus létezését (6, 10, 16, 17). Ehelyett egy – RNS-szekvenálási adatokon és annak immunhisztokémiai (IHC) validálásán alapuló – nemrégiben végzett vizsgálat egy „gyulladt” („inflamed”) SCLC altípus (SCLC-I) létezésére szolgáltatott bizonyítékot (18). Az emelkedett ASCL1, NEUROD1 és POU2F3 expresszió hiánya mellett az SCLC-I gyulladással-asszociált genetikai mintázatot és mesenchymális jellemzőket mutat (6, 18). Ami a nomenklatúrát illeti, az SCLC-I alternatívája lehet az újonnan javasolt négyszeresen negatív („quadruple negative) altípusnak (SCLC-QN) is, amelyet mind a négy transzkripciós szabályozó (ASCL1, NEUROD1, POU2F3 és YAP1) alacsony expressziója jellemez (6, 17). Bár sem az SCLC-I-t, sem az SCLC-QN-t nem a YAP1 expressziója határozza meg, jelenleg még vitatott, hogy ezek azonos altípusnak tekinthetők-e, vagy két különböző alcsoportot alkotnak a nem-NE SCLC-k skáláján belül (6, 19).

Célkitűzések

- Alábbiakban munkacsoportom az SCLC biológiájának, heterogenitásának és újabb prognosztikai markereinek vonatkozásában elért legújabb eredményeit foglalom össze. Külön hangsúlyt fektetve az SCLC molekuláris altípusok biológiai és klinikai relevanciájának tárgyalására. Értekezésemben az alábbi fő témákat érintem és tárgyalom részleteiben:
- Sebészileg reszekált kissejtes tüdőrákban az altípus-specifikus transzkripciós faktorok expressziós mintázata és prognosztikus jelentősége

- SCLC molekuláris alcsoportok vizsgálata jelölésmentes shotgun proteomikai módszerrel. A proteomikai adatok korreláltása a sejtvonalak fenotípusos jellemzőivel, valamint az SCLC-sejtvonalak és szövetek nyilvánosan elérhető transzkriptomikai adataival.
- A CD47/PD-L1 expresszió és a közelmúltban tárgyalt főbb molekuláris SCLC altípusok közötti kapcsolat, valamint a CD47 és a PD-L1 expresszió prognosztikai értékének vizsgálata
- Az új immunellenőrzési pontok, a STING és az MHCII, expressziós mintázatának és prognosztikus szerepének az immunsejt-sűrűség és a négy fő SCLC altípus marker összefüggésében történő vizsgálata a különböző tumorkompartmentekben
- A BCL-2 expresszió különbségeinek vizsgálata a különböző SCLC altípusok között. A BCL-2 gátlással szembeni rezisztencia hátterében álló mechanizmusok megismerése, illetve a BCL-2/MCL-1 kombinált gátlás hatékonyságának tanulmányozása in vitro és in vivo

1. Szubtípus-specifikus transzkripció faktorok expressziós mintázata SCLC-ben

1.1. Bevezetés

Humán SCLC tumorok és egér SCLC modellek elemzése arra utalnak, hogy a tumorok többsége jelentős intratumorális heterogenitást mutat az altípus-specifikus transzkripció szabályozók expresszióinak vonatkozásában (18, 20-22). Ez a heterogenitás hatással lehet a tumor viselkedésére és a terápiával szembeni rezisztenciára, valamint diagnosztikus jelentőséggel bírhat a daganatok domináns molekuláris altípusa szerinti osztályozásakor (4). A molekuláris expressziós mintázatok gyakran jobban megmutatkoznak a sebészeti mintákban, mint a kis SCLC-biopsziákban, és a domináns altípust pontosabban meghatározhatjuk a sebészeti minták alapján (4, 23). Az SCLC ritkán kerül sebészeti reszekcióra (24), ezért általában nincsenek teljes SCLC-szövetblokkok (20). Így eddig csak néhány tanulmány vizsgálta az altípus-specifikus transzkripció faktorok szöveti expresszióját immunhisztokémiai (IHC) módszerrel sebészeti mintákban (10, 25, 26). Sato és munkatársai (26)] 47 sebészeti mintában vizsgálták a négy kulcsfontosságú transzkripció regulátor jelenlétét, míg Baine és munkatársai (10) 43 elsődleges tüdőreszekátum, 105 biopszia és 26 finomtű-aspirátum vegyes kohorszában értékelték a markerek expresszióját és a kapcsolódó szövettani jellemzőket. Qu és munkatársai (25) szöveti microarray-eken (TMA-k) vizsgálták az altípus-specifikus fehérjék és a neuroendokrin differenciációs markerek közötti összefüggéseket. Fontos megjegyezni, hogy a sebészeti minták alacsony száma, a részletes túlélési adatok hiánya és az SCLC jelentős intratumorális heterogenitása miatt e korábbi tanulmányok további validációjára lenne szükség, különös tekintettel az altípus-specifikus fehérjék klinikopatológiai és prognosztikai jelentőségére.

Saját multicentrikus vizsgálatunkban 386 sebészileg kezelt SCLC-s beteg mintáján vizsgáltuk az altípus-specifikus transzkripció faktorok (ASCL1, NEUROD1, POU2F3 és YAP1), valamint a P53 és RB1 fehérjék expressziós mintázatának klinikai és prognosztikai jelentőségét, valamint a P53 és RB1 fehérjék expresszióját. Az altípus-specifikus fehérjék és a célzott és kemoterápiás szerek in vitro hatékonysága közötti összefüggések feltárására átfogó tömegspektrometria (MS) alapú proteomikai elemzést is végeztünk egy 26 humán SCLC-sejtvonalat tartalmazó panelen.

1.2. Anyag és módszer

Vizsgálati populáció

Ebbe a multicentrikus vizsgálatban 386 olyan beteget vontunk be, akiknél szövettani alapon megerősítették a kissejtes tüdőrák (SCLC) diagnózisát, és sebészi reszekción estek át. A vizsgálatban öt közép-európai egészségügyi központ vett részt. A kutatás a Világ Egészségügyi Szervezet Helsinki Nyilatkozatának irányelveivel összhangban történt, és a résztvevő országok etikai bizottságainak nemzeti szinten történő jóváhagyásával. A vizsgálat retrospektív jellege miatt a betegek írásbeli beleegyezésétől eltekintettünk. A klinikai információk összegyűjtését követően a betegazonosítókat eltávolítottuk annak érdekében, hogy a betegeket se közvetlenül, se közvetve ne lehessen azonosítani.

A betegek mintái és immunhisztokémiai vizsgálatok

A betegeket két kohorszba soroltuk: teljes szövetminta (WTS) kohorszba és szöveti mikroarray (TMA) kohorszba. A teljes szövetminta kohorszban teljes sebészeti minták, formalinban rögzített, paraffinba ágyazott (FFPE) blokkok formájában voltak elérhetőek (n = 141), míg a TMA-kohorszban szöveti mikroarray-ek (TMA) kerültek felhasználásra (n = 247). Mindkét kohorszot külön-külön elemeztük immunhisztokémiai (IHC) módszerrel.

Proteomikai elemzések és in vitro sejtvitalitási vizsgálatok

A vizsgálathoz 26, kereskedelmi forgalomban kapható humán SCLC sejtvonalat használtunk, amelyeket proteomikai elemzéseknek vetettünk alá. A különböző terápiás szerek *in vitro* hatékonyságát a sejtvonalak megfelelő IC50 értékeinek segítségével vizsgáltuk.

Statisztikai elemzések

Minden statisztikai elemzést az R 3.6.3 verziójával végeztünk, amelyet a R Foundation for Statistical Computing (Bécs, Ausztria) fejlesztett.

1.3. Eredmények

A betegek és a betegektől származó minták jellemzői

A WTS-kohorszba összesen 141 sebészileg reszekált SCLC-beteget vontak be. A bevont betegek medián életkora 63,9 év volt (tartomány: 41-83 év). Valamennyi beteg kaukázusi származású volt, és 85 beteg volt férfi (60,7%). Az altípus-specifikus fehérjék expressziós mintázatát vizsgálva azt találtuk, hogy a magas ASCL1- és NEUROD1-expressziót mutató betegek későbbi stádiumú betegségben szenvedtek a diagnózis idején. A POU2F3 expressziója nem mutatott szignifikáns kapcsolatot a korai stádiumú SCLC-vel. Ezenkívül a WTS-kohorsz elemzése során azt is megállapítottuk, hogy az alacsony NEUROD1-expressziót mutató tumorokban gyakrabban fordult elő intratumorális nekrozis. A P53 vagy RB expresszió és a klinikopatológiai jellemzők között nem találtunk szignifikáns összefüggést.

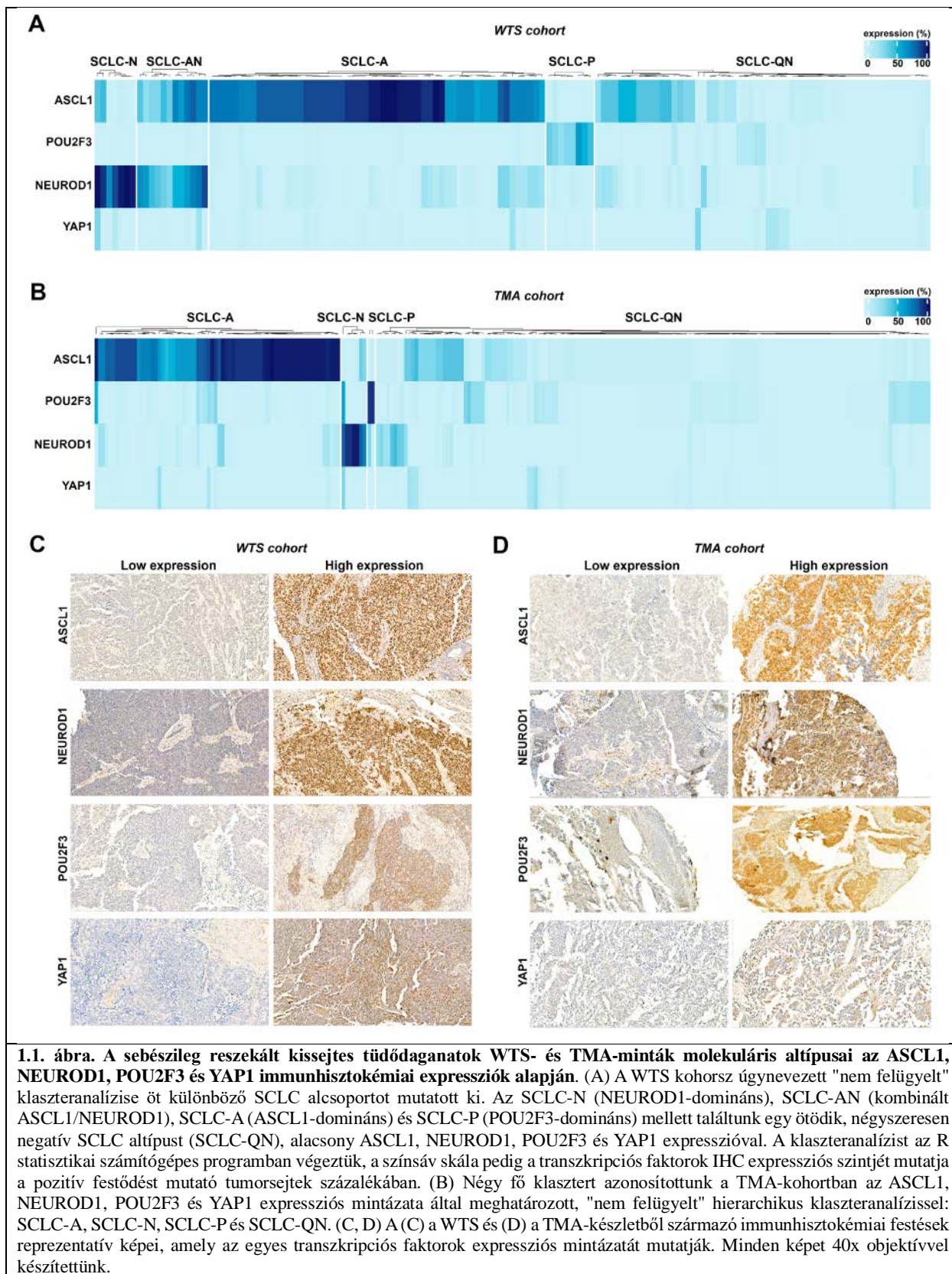
A TMA-kohorsz 245 SCLC-ben szenvedő beteg mintáját tartalmazta, akik tüdőreszekciós műtéten estek át, azonban csak TMA-minták álltak rendelkezésre, nem teljes szövetblokkok (WTS). A TMA-kohorsz betegeinek medián életkora 57 év volt (tartomány: 37-79 év). A bevont betegek túlnyomórészt férfiak voltak (76,4%). Megjegyzendő, hogy a viszonylag hosszú beválogatási időszak miatt néhány esetben nem voltak elérhetőek a teljes klinikopatológiai adatok. A TMA-kohorszban nem találtunk szignifikáns összefüggést a kulcsfontosságú transzkripciós faktorok expressziójának mintázata és a klinikopatológiai jellemzők között. Ugyanakkor mind a TMA, mind a WTS kohorszban statisztikailag nem szignifikáns tendenciát figyeltünk meg az ASCL1 expressziója és a tumor stádiuma között. A TMA-kohorszban a késői stádiumban lévő SCLC-ben szenvedő betegek többségének magas ASCL1-expressziót mutató tumorai voltak.

A TMA-minták minőségének ellenőrzéséhez használt antitestek esetében, erős pozitivitást találtunk a Bcl-2 és INI1 antitestek esetében, valamint mérsékelt pozitivitást a Ki-67 és SYP esetében.

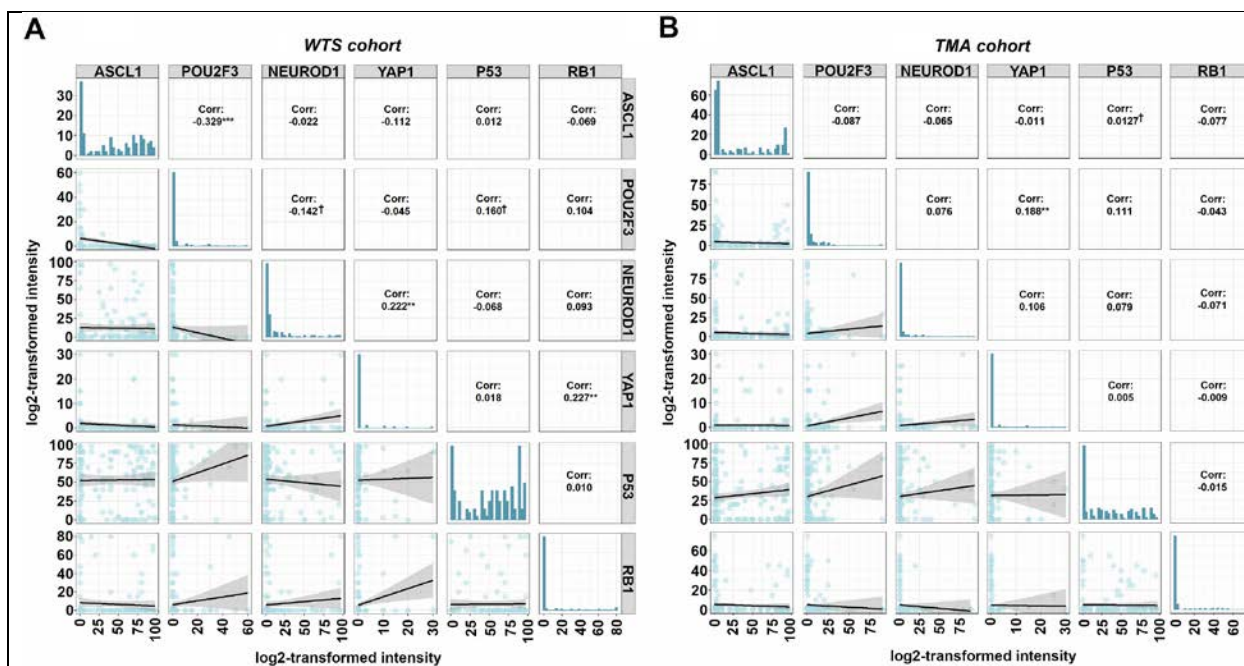
A sebészileg reszekált SCLC szövetminták molekuláris altípusai

A kulcsfontosságú transzkripciós szabályozók eltérő mértékű expressziója alapján öt fő SCLC altípust lehetett megkülönböztetni a WTS-kohorszban. (1.1.A. ábra) Ezen altípusok meghatározásához felügyelet nélküli hierarchikus klaszteranalízist végeztünk, ahol az expressziós szinteket tekintettük folyamatos változóknak. Ahogy az 1.1.A. ábra mutatja, az SCLC-A (ASCL1-domináns), SCLC-AN (kombinált ASCL1/NEUROD1), SCLC-N (NEUROD1-domináns), SCLC-P (POU2F3-domináns) altípusok mellett a klaszteranalízis meghatározott egy négyszeresen negatív (ún. SCLC-QN) altípust is, amely altípus a négy vizsgált transzkripciós faktor alacsony expressziójával jellemezhető. Az intratumorális heterogenitás két formája figyelhető meg a WTS-kohorszban: egyes szövetmintákban altípus-specifikus marker-expresszáló és nem expresszáló sejtek keveréke volt jelen a tumor területén belül, míg más esetekben e sejtek klasztereit térben egymástól elkülönülő régióban figyeltük meg.

Az altípusokat kimutattuk a TMA-kohorszban is (1.1.B. ábra), kivéve az SCLC-AN altípust. A YAP1 altípust ugyanakkor egyik kohorszban sem azonosítottuk immunhisztokémiai festésekkel. Az altípus-specifikus markerek expressziójának magas és alacsony szintjéről az 1.1.C. és D. ábrák mutatnak reprezentatív fotókat.



A transzkripciós faktorok és a P53 és RB1 expressziójának korrelációját vizsgálva a WTS-kohorszban statisztikailag szignifikáns, gyengén pozitív lineáris korrelációt találtunk a YAP1 és NEUROD1 között ($r = 0,222$), valamint a YAP1 és RB1 expressziója között ($r = 0,227$) (1.2.A. ábra). Azonban érdemes megjegyezni, hogy a YAP1 expressziója ritkán volt megfigyelhető mind a WTS, mind a TMA-kohorszban, így a YAP1-re vonatkozó eredményeket óvatosan kell értelmezni. Emellett mérsékelt negatív lineáris korrelációt találtunk az ASCL1 és POU2F3 expressziója között ($r = -0,329$; 1.2.A. ábra). A WTS-kohorszban nem találtunk szignifikáns korrelációt a P53 és az altípus-specifikus fehérjék expressziója között. A TMA-kohorszban nem tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns eredményeket, kivéve a YAP1 és POU2F3 közötti gyenge pozitív korrelációt ($r = 0,188$; 1.2.B. ábra).



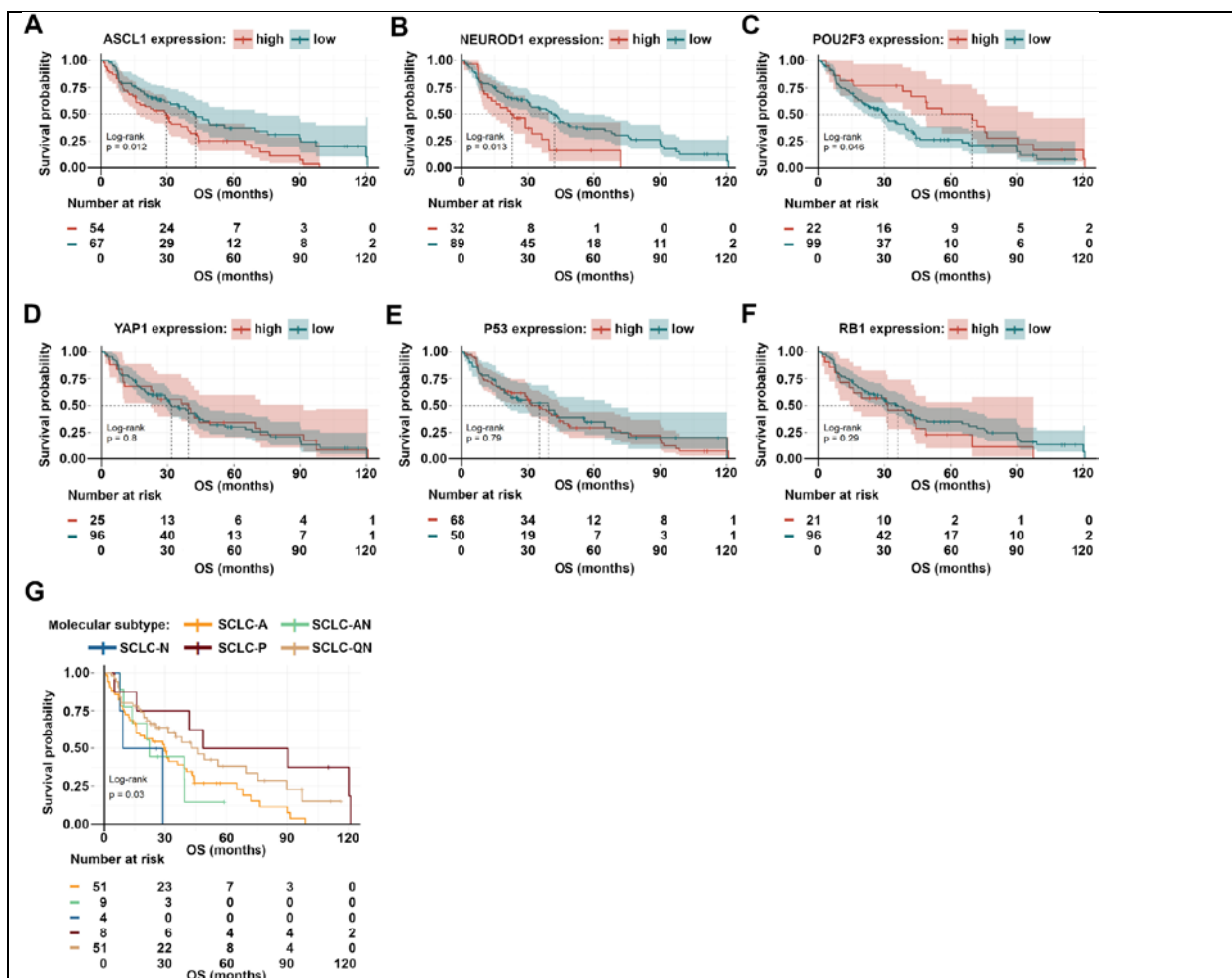
1.2. Az ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1, P53 és RB1 fehérjék korrelációs mintázata sebészileg reszekált SCLC-ben.

(A) Szórásdiagram, amely statisztikailag szignifikáns pozitív lineáris korrelációt mutat a WTS kohorszban a YAP1 és a NEUROD1 ($R = 0,222$), valamint a YAP1 és az RB1 ($R = 0,227$) között. Az ASCL1 és a POU2F3 expressziója szignifikáns, negatív korrelációt mutat ($R = -0,329$). (B) Statisztikailag szignifikáns pozitív lineáris korreláció a YAP1 és a POU2F3 expressziója között ($R = 0,188$) a TMA kohorszban. A korrelációs együtthatók a Pearson r -értékeket jelzik, míg az ezeket az értékeket követő karakterek a szignifikancia szintet jelzik (** $p < 0,001$; * $p < 0,01$; † $p < 0,10$).

Az altípus-specifikus fehérjék prognosztikai markernek bizonyulnak sebészileg reszekált SCLC-ben

A WTS-kohorszba tartozó betegek medián követési ideje 58,9 hónap volt, míg a medián teljes túlélés (OS) 35,3 hónap. Elsőként egyváltozós túlélési analízist végeztünk az OS klinikai prognosztikai faktorainak meghatározására. Az eredmények alapján a műtét után adjuváns kemoterápiában (CHT) részesülő betegek szignifikánsan jobb túlélési arányt mutattak, mint a CHT-naiv betegek ($p = 0,00027$). Az anatómiai reszekció, mint sebészi megközelítés, szintén szignifikánsan hosszabb túlélést eredményezett (szemben az ékrezekező műtéttel; $p = 0,056$). Nem találtunk szignifikáns összefüggést a túlélés és a nem vagy a szövettani jellemzők (pl. intratumorális nekrozis és érinvázio) között. Azonban érdemes megemlíteni, hogy a magas ASCL1-expresszió rosszabb túléléssel párosult a sebészileg reszekált betegeknél (szemben az alacsony ASCL1-expresszióval; a medián OS 29,63 hónap volt a magas ASCL1-expressziójú betegeknél; 42,93 hónap az alacsony ASCL1-expressziójú betegeknél; $p = 0,012$; 1.3.A ábra). A magas NEUROD1-expressziójú tumorral rendelkező betegeknél szintén szignifikánsan rövidebb volt a túlélés (szemben az alacsony NEUROD1-expressziójú betegeknél; a medián OS 22,88 hónap volt a magas NEUROD1-expressziójú betegeknél, míg 41,93 hónap az alacsony NEUROD1-expressziójú betegeknél; $p = 0,013$,

1.3.B. ábra). Ugyanakkor a magas POU2F3 expresszió szignifikánsan jobb túléléssel társult (szemben az alacsony POU2F3 expressziójú betegekkel; a medián OS 69,47 hónap volt a magas POU2F3 expressziójú betegeknek, és 30,07 hónap az alacsony POU2F3 expressziójú betegeknek; $p = 0,046$, 1.3.D. ábra). Ezután a betegeket a tumorok domináns molekuláris altípusa szerint csoportosítottuk (1.1.A. ábra). A vártnak megfelelően a legmagasabb túlélési arányt az SCLC-P és az SCLC-QN altípusoknál találtuk, míg a legalacsonyabbat az SCLC-A, SCLC-N és SCLC-AN altípusoknál ($p = 0,03$; 1.3.G. ábra). Ennek megfelelően az NE fenotípus a sebészileg reszekált SCLC esetében rossz prognózisa utalt ($p = 0,003$).



1.3. ábra. Kaplan-Meier becslések a műtéileg kezelt SCLC betegek teljes túlélésére (OS) az altípus-specifikus transzkripciós faktorok, valamint a P53 és RB1 expressziója szerint a WTS kohorszban. (A) A magas ASCL1-expresszázó tumorral rendelkező betegeknek szignifikánsan rosszabb volt a medián OS, mint az alacsony ASCL1-expresszázó SCLC-vel rendelkező betegeknek ($p = 0,012$). (B) A magas NEUROD1-expresszió szignifikánsan rövidebb OS-t eredményezett (szemben az alacsony NEUROD1-expresszióval; $p = 0,013$). (C) A magas POU2F3-expresszázó tumorral rendelkező SCLC betegek OS-értéke szignifikánsan jobb volt (az alacsony POU2F3-expresszióval rendelkezőkhöz képest; $p = 0,046$). (D-F) A YAP1, P53 és RB1 expresszió nem volt hatással az OS-re. (G) A domináns molekuláris altípusok szerint az SCLC-P és az SCLC-QN jobb túléléssel, míg az SCLC-A, az SCLC-N és az SCLC-AN rosszabb túléléssel társult ($p = 0,031$). Az eltérő csoportok közötti különbségeket a log-rank teszt segítségével hasonlítottuk össze. A betegek alacsony és magas alcsoportokba történő dichotomizálásához használt határértékek az ASCL1 esetében 50%, a NEUROD1 esetében 5%, a POU2F3 esetében 1%, a YAP1 esetében pozitivitás ($>0\%$), a P53 esetében 50% és az RB1 esetében pozitivitás ($>0\%$) voltak.

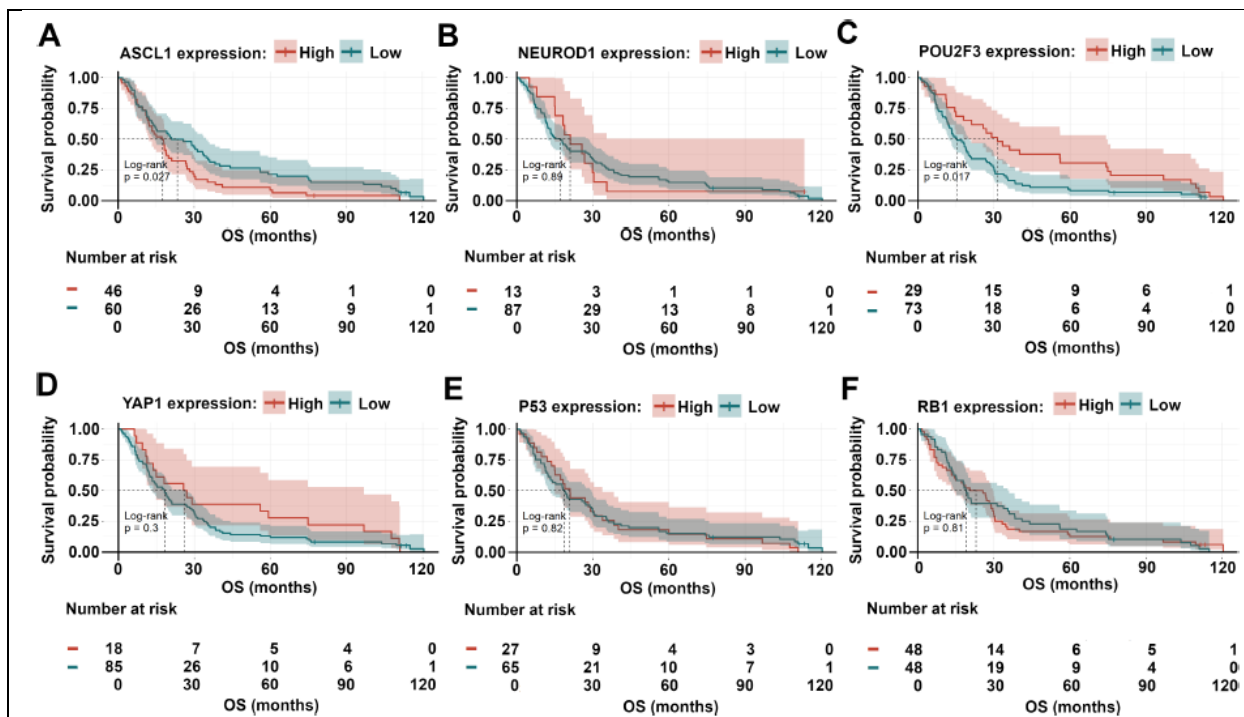
A további vizsgálatok során azt szeretnénk volna meghatározni, hogy az ASCL1, NEUROD1 és POU2F3 expresszió prognosztikai értéke független-e más változóktól (például a betegség stádiumától vagy a terápiás megközelítéstől) a WTS-kohorszban. Ehhez többváltozós Cox-regressziós elemzést végeztünk (1.4. ábra),

amelybe olyan klinikai tényezőket vettünk be, mint az életkor, nem, krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), tumor stádium a diagnózis időpontjában és a kezelések. Eredményeink alapján azt találtuk, hogy a magas ASCL1-expresszió továbbra is szignifikáns negatív prognosztikai tényező maradt az OS szempontjából ($p = 0,03$; 1.4. ábra). Ugyanakkor bár a magas POU2F3 expresszáló tumorok esetében a hazard ratio emelkedett értéket mutatott ($p = 0,08$), a POU2F3-expresszió nem befolyásolta a túlélést, függetlenül más klinikopatológiai változóktól (1.4. ábra). A vártnak megfelelően az életkor ($p = 0,01$) és az adjuváns CHT ($p < 0,001$) függetlenül befolyásolta az OS-t. A NEUROD1 expresszióknak nem volt szignifikáns hatása a túlélésre a többváltozós modellünkben.

WTS cohort					TMA cohort				
Variable		N	Hazard ratio	P	Variable		N	Hazard ratio	P
Age		96	1.05 (1.01, 1.09)	0.01	Age		64	0.97 (0.94, 1.01)	0.12
Surgery type	Anatomic	90	Reference		Surgery type	Anatomic	49	Reference	
	Wedge	8	1.29 (0.48, 3.48)	0.62		Wedge	15	1.73 (0.83, 3.62)	0.14
Gender	Female	37	Reference		Gender	Female	17	Reference	
	Male	61	0.98 (0.56, 1.71)	0.94		Male	47	0.95 (0.50, 1.78)	0.86
COPD	COPD	43	Reference		COPD	COPD	20	Reference	
	No COPD	55	0.61 (0.37, 1.02)	0.06		No COPD	44	1.02 (0.55, 1.89)	0.94
Stage [#]	Early	70	Reference		Stage [#]	Early	48	Reference	
	Late	28	0.98 (0.54, 1.76)	0.94		Late	16	2.13 (0.98, 4.64)	0.06
Adjuvant CHT	Adjuvant CHT	71	Reference		Adjuvant CHT	Adjuvant CHT	25	Reference	
	No adjuvant CHT	27	2.45 (1.44, 4.16)	<0.001		No adjuvant CHT	39	1.89 (1.07, 3.35)	0.03
ASCL1 expression	High	43	Reference		ASCL1 expression	High	29	Reference	
	Low	55	0.53 (0.30, 0.94)	0.03		Low	35	0.67 (0.36, 1.27)	0.22
NEUROD1 expression	High	27	Reference		NEUROD1 expression	High	10	Reference	
	Low	71	0.91 (0.51, 1.63)	0.75		Low	54	1.12 (0.52, 2.38)	0.77
POU2F3 expression	High	19	Reference		POU2F3 expression	High	17	Reference	
	Low	79	1.86 (0.93, 3.71)	0.08		Low	47	1.10 (0.57, 2.14)	0.78

1.4. ábra Többváltozós Cox-regressziós modell az OS-t befolyásoló klinikopatológiai változókra a sebészileg reszekált SCLC-k WTS- és TMA-kohorszban. A WTS-kohorszban az idősebb életkor és a magas ASCL1-expresszió statisztikailag szignifikáns negatív prognosztikai tényező volt az OS szempontjából, míg az adjuváns CHT jobb túlélési eredményekkel járt együtt. A Cox-regressziós elemzés emellett azt is kimutatta, hogy a WTS-kohorszban a magas POU2F3-expresszáló tumorral rendelkező betegek klinikailag releváns tendenciát mutatnak a jobb túlélésre ($p = 0,08$). A többváltozós modell konkordanciája = 67%. A TMA-kohorszban az alacsony ASCL1-expresszió és a magas POU2F3-expresszió inkább jobb túléléssel társult. A többváltozós modell egyezősége = 69%. OS, teljes túlélés; CHT, kemoterápia; COPD, krónikus obstruktív tüdőbetegség. #A korai stádium az I. és II. stádiumra, míg a késői stádium a III. és IV. stádiumú SCLC-re vonatkozik.

A TMA-kohorszban a medián követési idő 113,3 hónap volt, míg a medián OS 18,8 hónap. Egyváltozós túlélési elemzéssel szignifikánsan hosszabb OS-t azonosítottunk a korai stádiumú betegeknél (szemben a késői stádiumú SCLC-vel; $p < 0,0001$), az adjuváns CHT-vel kezelt betegeknél (szemben az adjuváns CHT-naiv betegekkal; $p = 0,0013$), valamint azoknál, akiknél anatómiai reszekciót végeztek (szemben az ékreszekcióval; $p = 0,012$). A TMA-kohorszban hasonlóan a WTS-kohorszhoz a magas ASCL1 ($p = 0,027$; 1.5.A. ábra) és magas POU2F3 ($p = 0,017$; 1.5.C. ábra) expressziót mutató betegek esetén volt szignifikánsan hosszabb az OS. Azonban a NEUROD1-expresszió tekintetében nem volt statisztikailag szignifikáns különbség az OS-ben a TMA-kohorszban ($p = 0,89$; 1.5.B. ábra). A klinikopatológiai változókkal korrigált Cox-multivariáns modellben a TMA-kohorszban az adjuváns CHT továbbra is független prognosztikai tényezőnek bizonyult az OS szempontjából ($p = 0,03$), továbbá az alacsony ASCL1-expresszió jobb túléléssel párosult (hazard ratio [HR]: 0,67; $p = 0,22$).

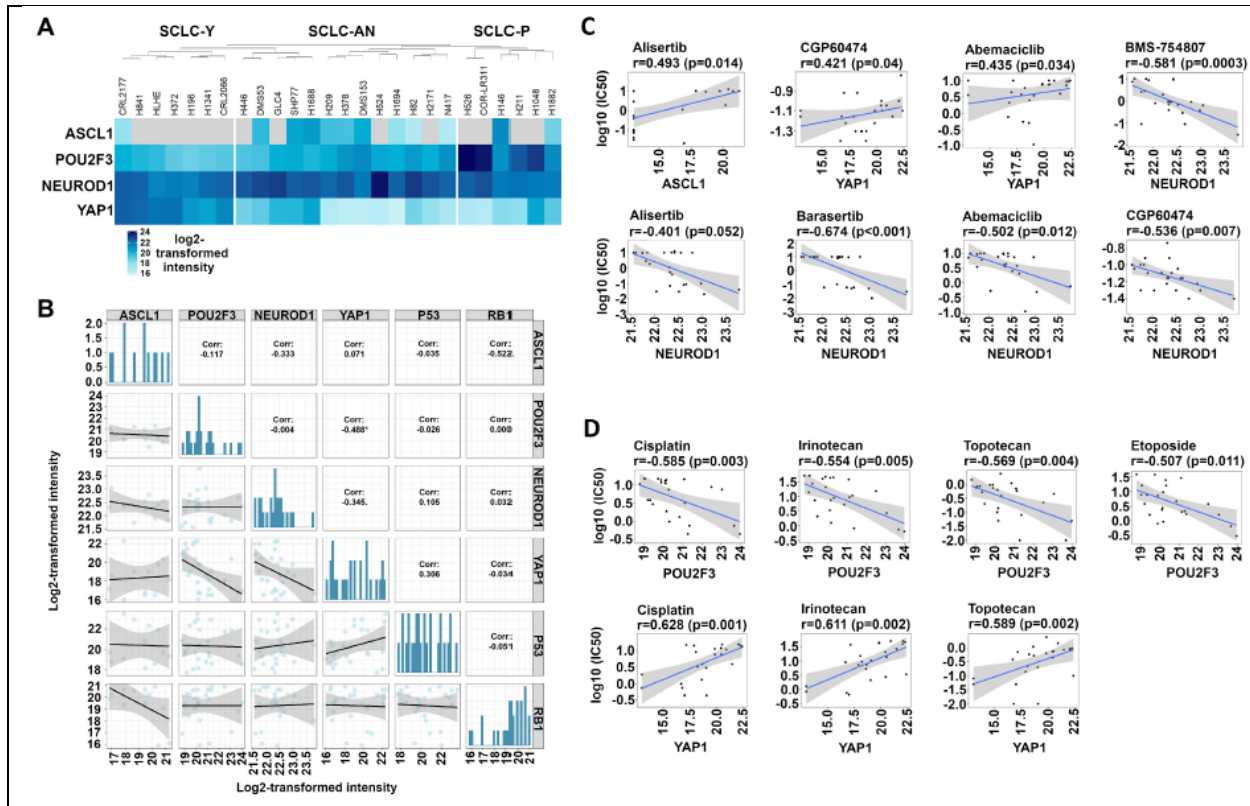


1.5. ábra. A műtéileg kezelt SCLC-s betegek Kaplan-Meier-görbéi az altípus-specifikus fehérjék, valamint a P53 és RB1 expressziója szerint a TMA-kohorszabban. (A) A magas ASCL1-expresszió szignifikánsan rövidebb medián OS-hez társult (szemben az alacsony ASCL1-expresszióval; $p = 0,027$). (B) Az OS nem különbözött szignifikánsan az alacsony versus magas NEUROD1 expressziójú betegek között ($p = 0,89$). (C) A magas POU2F3-expresszióval rendelkező betegek OS-e szignifikánsan jobb volt, mint az alacsony POU2F3-expressziós SCLC-vel rendelkező betegeké ($p = 0,017$). (D-F) A YAP1, P53 és RB1 expresszió nem volt hatással az OS-re. A csoportok közötti különbségeket a log-rank teszt segítségével hasonlítottuk össze. A betegek alacsony és magas alcsoportokba történő dichotomizálásához használt határértékek az ASCL1 esetében 5%, a NEUROD1 esetében 5%, a POU2F3 esetében 1%, a YAP1 esetében pozitívítás (>0%), a P53 esetében 50% és az RB1 esetében pozitívítás (>0%) voltak.

A humán SCLC sejtvonalak proteomikai elemzése és sejtvitalitási vizsgálatai a transzkripciós szabályozók által meghatározott, eltérő sebezhetőségi profilokat mutatnak

Részletes proteomikai elemzésünk során több mint 8000 fehérjét azonosítottunk és határoztuk meg a mennyiségüket mind a 26 humán SCLC sejtvonalban. A minták ASCL1, NEUROD1, POU2F3 és YAP1 fehérjék expressziója alapján végzett felügyelet nélküli klaszterezés eredményeként itt megkülönböztettünk egy YAP1 által vezérelt klasztert, egy kevert SCLC-AN klasztert és egy heterogén SCLC-P klasztert (1.6.A. ábra). Az altípus-specifikus fehérjék és az RB1/P53 expressziójának korrelációs mintázatát vizsgálva (1.6.B. ábra) statisztikailag szignifikáns negatív lineáris korrelációt találtunk a YAP1 és a POU2F3 expresszió között ($r = -0,488$), de nem találtunk korrelációt az RB1 és a P53 expressziója között. Az altípus-specifikus fehérjeexpressziók terápiás jelentőségének vizsgálata céljából korreláltattuk a fehérjék koncentrációját a különböző célzott és kemoterápiás szerek IC50 értékeivel (3, 9, 14). Mint ahogy a 1.6.C. ábrán látható, statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk az ASCL1 abundancia és az AURK-gátló alisertib IC50 értékei között ($r = 0,493$), valamint a YAP1 abundancia és a CDK-gátló abemaciclub és CGP60474 IC50 értékei között ($r = 0,435$ és $r = 0,421$). Ezenkívül megfigyeltük, hogy a magas NEUROD1-fehérje-abundancia in vitro érzékenységet jelent az alisertib ($r = -0,401$), az AURK-gátló barasertib ($r = -0,674$), az abemaciclub ($r = -0,502$), a CGP60474 ($r = -0,536$) és az IGF-1R-gátló BMS-754807 ($r = -0,581$) szerekkel szemben (1.6.C. ábra). A hagyományos kemoterápiás szerekkel kapcsolatban (1.6.D. ábra) statisztikailag szignifikáns negatív lineáris korrelációt találtunk a POU2F3 abundancia és a ciszplatin ($r = -0,585$), irinotekán ($r = -0,554$), topotekán ($r = -0,569$) és etopozid ($r = -0,507$) IC50 értékek között. Emellett

statistikailag szignifikáns pozitív lineáris korrelációt találtunk a YAP1 koncentráció és a ciszplatin ($r = 0,628$), irinotekán ($r = 0,611$) és topotekán ($r = 0,589$) IC50 értékek között.



1.6.ábra. A célzott terápiás és citosztatikus gyógyszerek proteomikai profilozása és in vitro hatékonysága az altípus-specifikus fehérjék szerint. (A) A vizsgált SCLC-sejtvonalak "nem felügyelt" klaszterezése egy elkülönült YAP1-vezérelt, egy kombinált SCLC-AN és egy heterogén SCLC-P klasztert mutatott ki. A színes sáv az ASCL1, NEUROD1, POU2F3 és YAP1 \log_2 -transzformált fehérjeintenzitás-pontszámát jelöli. (B) A POU2F3 és a YAP1 közötti statistikailag szignifikáns negatív lineáris korrelációt ($R = -0,488$) leszámítva nem azonosítottunk egyéb korrelációt az altípus-specifikus és a P53 és RB1 fehérjék között. (C) Szórásdiagramok, amelyek szignifikáns pozitív lineáris korrelációt mutatnak az ASCL1 abundanciája és az alisertib IC50 értékei ($r = 0,493$), valamint a YAP1 abundanciája és az abemaciclib, valamint a CGP60474 IC50 értékei között ($r = 0,435$, illetve $r = 0,421$). Szignifikáns negatív lineáris korreláció mutatkozott a NEUROD1 proteomikai abundanciája és az alisertib ($r = -0,401$), barasertib ($r = -0,674$), abemaciclib ($r = -0,502$), CGP60474 ($r = -0,536$), valamint a BMS-754807 ($r = -0,581$) IC50 értékei között is. (D) Statistikailag szignifikáns negatív lineáris korrelációt találtunk a POU2F3 abundancia és a ciszplatin ($r = -0,585$), irinotekán ($r = -0,554$), topotekán ($r = -0,569$) és etoposid ($r = -0,507$) IC50 értékei között. A YAP1 megjelenése pozitívan korrelált a ciszplatin ($r = 0,628$), az irinotekán ($r = 0,611$) és a topotekán ($r = 0,589$) IC50 értékeivel.

1.4. Megbeszélés

Az elmúlt években az átfogó genomikai vizsgálatok hozzájárultak az SCLC finomabb osztályozásához, az egyes génextpressziós profilok alapján meghatározott mintázatok szerint (9, 13). Fontos azonban megjegyezni, hogy a tumorok transzkripciós profilja nem feltétlenül egyezik meg a fehérjeszintű jellemzőkkel. Bár az új molekuláris osztályozások az altípus-specifikus terápiák kifejlesztéséhez hasznosak lehetnek, további kutatásokra van szükség az altípusokat meghatározó fehérjeexpressziós mintázatok tisztázásához (4, 9, 10, 25-28). Emellett az SCLC szövetminták korlátozott hozzáférhetősége és a megfelelő klinikai adatok hiánya miatt további vizsgálatokra van szükség annak megállapításához, hogy az egyes domináns altípusok milyen mértékben befolyásolják az SCLC-betegek klinikai kimenetelét. Így ebben a multicentrikus vizsgálatban nagyszámú, sebészileg reszekált SCLC mintát használtunk a kulcsfontosságú SCLC transzkripciós szabályozók, valamint az RB1 és P53 fehérjék immunhisztokémiai festésekkel meghatározott expressziójának és klinikopatológiai jelentőségének vizsgálatára. Továbbá, az altípus-

specifikus terápiás célpontok azonosítása érdekében MS-alapú proteomikai vizsgálatokat végeztünk in vitro citotoxicitási vizsgálatokkal kombinálva humán SCLC-sejtvonal panelen.

Az SCLC tumorokban a molekuláris sokféleség és az NE (neuroendokrin) jellemzők miatt jelentős heterogenitás figyelhető meg (18, 20). Ezért a domináns molekuláris altípusok a sebészi mintákban általában feltűnőbbek, mint a kis biopsziás mintákban (4). Ráadásul a kisméretű transzbronchiális vagy mediastinalis biopsziás minták esetében arteficiális nyomási károsodás is előfordulhat (29). Vizsgálatunk során a sebészileg reszekált SCLC-mintákban az SCLC-A és az SCLC-QN adódtak a domináns molekuláris altípusoknak mindkét vizsgált kohorszban. Az ASCL1-domináns SCLC-A tumorok (azaz a "klasszikus" altípusú daganatok (1, 30)) jelentik az SCLC-k túlnyomó többségét, és általában "tipikus" SCLC-morfológiával és az NE-markerek magas expressziójával társulnak (1). Ugyanakkor megállapítottuk, hogy az SCLC-A tumorok egy alcsoportja expresszálja a NEUROD1-et is, tehát (Baine és munkatársai (10) eredményeivel összhangban) létezik egy kombinált SCLC-AN altípus is. A legújabb genetikailag módosított egér SCLC-modellek azt mutatják, hogy idővel lehetséges átmenet egyik molekuláris altípusból a másikba (például az SCLC-A-ból az SCLC-N-be) (11, 14, 21).

E vizsgálatunkban nem találtunk elkülönülő SCLC-Y altípust, ami összhangban van Baine és munkatársai (10) eredményeivel. Ehelyett azonban azonosítottunk egy SCLC-QN altípust, amelyet mind a négy vizsgált transzkripciós faktor alacsony expressziója jellemez. Fontos megjegyezni, hogy az SCLC-QN-t nem a YAP1 expressziója határozza meg, így ez elkülöníti az osztályozásunkat a Rudin és munkatársai által javasolt osztályozástól (9). Ugyanakkor eredményeink felhívják a figyelmet a nemrégiben javasolt SCLC-I altípusra is, amelyet szintén az összes altípus-specifikus marker alacsony expressziója határoz meg (18). Az SCLC-I mesenchymális jellegzetességeket és gyulladósos fenotípust mutat, amelyek más tumorokban előre jelzik az immunellenőrzőpont-gátlásra adott választ (18, 31, 32).

Ami a tumorális heterogenitást illeti, vizsgálatunkban annak két formáját észleltük. Néhány tumorban ugyanazon területeken belül voltak olyan sejtek, amelyek expresszálták / nem expresszálták az altípus-specifikus markereket, míg más mintákban ezek a sejtklaszterek térben elkülönülő régiókban voltak jelen. Ez utóbbi jelenség megerősíti Gay és munkatársai (18) eredményeit, és alátámasztja azt a feltételezést, hogy a kis biopsziák nem feltétlenül tükrözik a teljes tumor expressziós profilját. Fontos megemlíteni, hogy az SCLC magas plaszticitása (9) miatt a műtéttel eltávolítható tumorok nem feltétlenül reprezentálják teljes mértékben az SCLC betegség teljes spektrumát a klinikai és patológiai jellemzők tekintetében. Ezért eredményeink elsősorban a sebészileg kezelhető SCLC esetében lehetnek iránymutatóak a molekuláris altípusok prognosztikai jelentőségére és eloszlási mintázatára vonatkozóan. Mindazonáltal eredményeink a későbbi validáló vizsgálatoknak és az előrehaladott stádiumú betegekben végzett tanulmányoknak is alapjául szolgálhatnak.

Az altípus-specifikus fehérjék és a P53 és RB1 fehérjék korrelációs mintázata alapján a YAP1 és az RB1 expressziója között pozitív lineáris korrelációt találtunk. Ez összhangban van egy nemrégiben végzett preklinikai vizsgálatral, amely szerint a YAP1-et expresszáló SCLC-sejtvonalak intakt RB1-el társulhatnak (33). Ugyanakkor, figyelembe véve mind a YAP1, mind az RB1 alacsony expresszióját, óvatosan kell értelmezni az ezekre a fehérjékre vonatkozó eredményeket.

Az altípusokat meghatározó fehérjék klinikopatológiai és prognosztikai jelentősége továbbra sem kellő mértékben tisztázott a megfelelő klinikai adatokkal rendelkező sebészeti esetek alacsony száma és a szövetszövetminták morfológiai heterogenitása miatt (pl. kombinált SCLC/NSCLC vagy SCLC/nagysejtes neuroendokrin karcinóma). Az általunk végzett vizsgálat az első, amely részletesen beszámol a molekuláris altípusok prognosztikus jelentőségéről sebészileg kezelt SCLC-s betegek esetében. E vizsgálatunkban a legjobb túlélési ráták a nem-NE (SCLC-P és SCLC-QN) altípusokhoz kapcsolódtak, míg a legrosszabbak az NE (SCLC-A, SCLC-N, SCLC-AN) altípusokhoz. Ezzel összhangban, univariációs modellben azt találtuk, hogy az ASCL1 vagy a POU2F3 egyéni (altípustól független) expressziója rosszabb (ASCL1) vagy jobb túléléssel (POU2F3) párosul. Az erőteljes NE jellemzőket általában a tüdőrákos betegek rossz prognózisának jeleként írják le (34, 35). Egy nemrégiben végzett IHC-alapú elemzés is arra utal, hogy az

ASCL1-pozitív tumorral rendelkező betegek túlélési eredményei általában rosszabbak, mint az ASCL1-negatív SCLC-vel rendelkező betegeké (36). Hasonlóképpen, az ASCL1 expresszió rossz prognózis jele lehet a NE differenciálódású tüdő adenokarcinómákban [38]. Érdemes megemlíteni, hogy a jelenlegi vizsgálatban a magas ASCL1-expresszió a késői stádiumú SCLC-vel összefüggésbe hozható. Fontos azonban kiemelni, hogy a többváltozós túlélési elemzés azt mutatta, hogy az ASCL1 expresszió a betegség stádiumától és más klinikai tényezőktől függetlenül befolyásolja a túlélési eredményeket.

Az SCLC-ben szenvedő betegeknél a NE jellemzők és a túlélés közötti mechanisztikus kapcsolat még nem egyértelmű. Azonban korábbi vizsgálatok során az alacsony neuroendokrin tulajdonságokkal bíró SCLC-khez fokozott immunsejt-infiltráció (CD45+, CD3+ és CD8+ sejtek) társult, szemben a magas NE jellemzőket mutató tumorokkal (37). Ez összhangban van más kutatók megállapításaival, akik szerint az „NE-alacsony” tumorok erősebben immunogének és „forró” vagy „immunoázis” fenotípussal rendelkeznek, míg az „NE-magas” tumorok „immunsivatag” fenotípussal jellemezhetők (38).

Egy másik lehetséges magyarázat a rossz túlélésre az NE-magas SCLC-ben az lehet, hogy e tumorok túlzott hormontermeléssel társulhatnak, és így gyakrabban alakulnak ki paraneoplasztikus szindrómák (39, 40). E paraneoplasztikus szindrómák negatívan befolyásolhatják mind a korai, mind a késői stádiumú SCLC-ben szenvedő betegek túlélését (41).

Az SCLC-P tumorokra, amelyeknél a POU2F3 a domináns, nem jellemzőek a klasszikus neuroendokrin markerek, hanem a kefe-sejtvonal markerei (15). Így az SCLC-P tumoros betegek prognózisa valószínűsíthetően jobb, mint a neuroendokrin vonásokat mutató SCLC-ben szenvedő betegeké. Ezt alátámasztja az is, hogy az immunhisztokémiával igazolt POU2F3 expresszió magasabb medián túléléssel párosult univariációs elemzéseink során. A POU2F3 prognosztikai jelentőségére vonatkozó adataink részben összhangban vannak Huang és munkatársai (15) eredményeivel is. Tanulmányukban ezek a szerzők egy korábban publikált adathalmaz (13) RNS-seq-adatait értékelték újra, és azt találták, hogy a „POU2F3-magas” tumorral rendelkező betegekben a túlélési arányok nem szignifikánsan magasabbak, mint a „POU2F3-alacsony” tumorokban (15). Érdemes megemlíteni, hogy bár nem találtunk szignifikáns összefüggést a betegség stádiuma és a POU2F3 expressziója között, a „POU2F3-magas” alcsoportba tartozó betegeknél inkább a korai stádiumú tumorok voltak jellemzőek. Ez is hozzájárulhat az ezeknél a betegeknél megfigyelt jobb túlélési eredményekhez.

A kis-sejtes tüdőrák proteomikai vizsgálata továbbra is aktív kutatási területet jelent, és jelentős előrelépések is történtek a közelmúltban (18, 42-44). Ellentétben a szövetminták immunhisztokémiai festései alapján kapott eredményekkel, a humán SCLC sejtvonalakban megfigyeltünk egy YAP1-domináns altípust a felügyelet nélküli klaszteranalízis során. Fontos megjegyezni, hogy a YAP1-expresszió különbségeit már korábban leírták az SCLC-sejtvonalak és a szövetminták között (10, 18), azonban ez további vizsgálatokat igényel. A YAP1 elvesztésével kapcsolatos lehetséges magyarázatok a tumor mikro környezetével, az RB1 mutációs státusszal és a kemoterápia érzékenységgel kapcsolatosak (33, 45). Újabb preklinikai modellek azt sugallják, hogy a YAP1 expressziója kulcsfontosságú lehet a vad típusú RB1-gént hordozó, kemoterápiára rezisztens esetekben (33, 45).

Az NEUROD1-et magasan expresszáló sejtek az AURK- és CDK-gátlókkal szembeni érzékenységét illetően az eredményeink összhangban vannak a korábbi vizsgálatokkal (3, 9, 14). Érdemes megjegyezni, hogy ezek a MYC által vezérelt NEUROD1-et nagymértékben expresszáló sejtek fokozott auróra-kináz-aktivitással rendelkeznek, ami előre jelezheti az AURKA- és AURKB-gátlók hatékonyságát (9, 14). Emellett a MYC-amplifikált SCLC-k várhatóan érzékenyek lesznek a CDK-gátlókra is a MYC szintetikus letális célpontjainak gátlásával (14, 46).

Még keveset tudunk a kemoterápiás szerek molekuláris altípusok szerinti terápiás hatékonyságáról. Az eredményeink összhangban vannak Ito és munkatársai eredményeivel, akik azt találták, hogy a YAP1 elvesztése a kemoterápiára adott válasz ígéretes előrejelzője lehet SCLC-ben (45). A YAP1 tömeges jelenléte és a kemoterápiára adott rezisztencia közötti erős korreláció alapján a YAP1-pozitív sejtek

valószínűleg jellemzőbbek a már kemoterápiával kezelt betegeknél, ami magyarázatot adhat a YAP1-domináns altípus hiányára a műtétilag kezelt kohorszunkban. Végül, a magas POU2F3-expresszálo sejtek ciszplatinnal, irinotekánnal, topotekánnal és etopoziddal szemben mutatott nagyobb érzékenysége részben magyarázhatja a „POU2F3-magas” molekuláris altípusban tapasztalt jobb túlélési eredményeket. Érdemes megjegyezni, hogy Gay és munkatársai is hasonló tendenciát találtak az SCLC-P sejtvonalakban a ciszplatinnal szemben javult válasznak köszönhetően (18).

Tanulmányunknak számos korlátja volt, mivel részben retrospektív jellegű volt. A TMA-kohorsz esetében hosszú idő alatt gyűlt össze a kellő esetszám, így néhány esetben hiányosak a klinikopatológiai adatok. Emellett, bár az antigének általában hosszú időn keresztül kimutathatóak az FFPE blokkokban, néhány régebbi blokk esetében csökkenő immunjel-intenzitást tapasztaltunk. Megjegyzendő azonban, hogy a minőségellenőrzéshez használt összes antitesttel (azaz Bcl-2 (47, 48), Ki-67 (49, 50), SYP (51) és INI1 (52)) pozitív festődést kaptunk még az SCLC-QN esetekben is. Mindazonáltal a vártnál gyengébb festődési arányok a Ki-67 esetében arra utalnak, hogy bár TMA-ink megfelelő minőségűek voltak, egyes esetekben az immunjel intenzitásának csökkenése is előfordulhat. Bár a régebbi TMA-minták értékes segítséget jelentenek a WTS-kohorsz megállapításainak ellenőrzéséhez, különösen az altípus-specifikus fehérjék prognosztikai jelentőségét és az SCLC-QN altípus jelenlétét illetően, nem biztos, hogy ugyanolyan minőségűek, mint az újabban készített TMA-k vagy a WTS-minták. Másodsor, a TMA-minták expressziós mintázatát az intratumorális heterogenitás is torzíthatja, így ennek részleges kiküszöbölése érdekében minden betegről két különálló szövetrészletet is vizsgáltunk. Fontos megjegyezni, hogy ezek a korlátok nem vonatkoztak a WTS-kohorszra. Vizsgálatunkban az SCLC-QN alcsoportot a négy transzkripciós szabályozó alacsony expressziójával definiáltuk, de a diagnózis könnyítése érdekében további pozitív diagnosztikai markerekre is szükség van. A jövőbeni vizsgálatoknak arra kell irányulniuk, hogy az SCLC-QN azonos-e az SCLC-I-vel, és diagnosztizálható-e olyan mesenchymális markerekkel, mint a vimentin és az AXL. A küszöbértékek kiválasztásakor széles körben elfogadott határértékeket használtunk, de további vizsgálatokra van szükség a pontosságuk megerősítéséhez a mindennapi gyakorlatban. A multicentrikus vizsgálat célja az volt, hogy meghatározza az altípus-specifikus fehérjék prognosztikus jelentőségét és szöveti eloszlását sebészileg kezelt SCLC-s betegeknél. Az új molekuláris altípus osztályozást nagyszámú sebészeti mintán validáltuk, és megállapítottuk, hogy az ASCL1, NEUROD1 és POU2F3 eltérő expressziója egyedi SCLC altípusokat határoz meg. Az IHC elemzéseink azonban nem különböztették meg a YAP1 által vezérelt altípust. Ehelyett beszámoltunk egy SCLC-QN altípusról, amelyet a négy transzkripciós szabályozó alacsony expressziója jellemez. Továbbá megállapítottuk, hogy a magas POU2F3 expresszió jobb túléléshez társult az egyváltozós elemzésben, míg a magas ASCL1 expresszió független negatív prognosztikai tényező volt a sebészileg kezelt SCLC-ben. Végül az SCLC sejtvonalak proteomikai elemzése segítettek a transzkripciós szabályozók és a célzott és kemoterápiás kezelések közötti korrelációk azonosításában. Eredményeink hozzájárulhatnak az altípus-specifikus terápiás megközelítések és követési stratégiák kidolgozásához ebben a súlyos betegségben.

2. Humán SCLC komprehenzív proteomikai vizsgálata: szubtípus-specifikus molekuláris mintázatok

2.1. Bevezetés

Az SCLC profilalkotó vizsgálatok túlnyomó többségét klinikai minták és preklinikai modellek, például betegből származó és keringő tumorsejtekből eredeztethető SCLC xenograftok transzkriptomikai adatainak és génextpressziós profiljának elemzésével végezték (9, 13, 16, 20). Bár a közelmúltban végzett immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatok megerősítették, hogy az altípus-specifikus markerek valóban kimutathatóak a humán tumorszövetmintákban, e módszerrel nem tudtak megkülönböztetni egy egyedi YAP1-vezérelt altípust (10). Megjegyzendő, hogy a nem-negatív mátrixfaktorizációval végzett tumorexpressziós adatok elemzése alapján Gay és munkatársai a YAP1 által meghatározott altípus

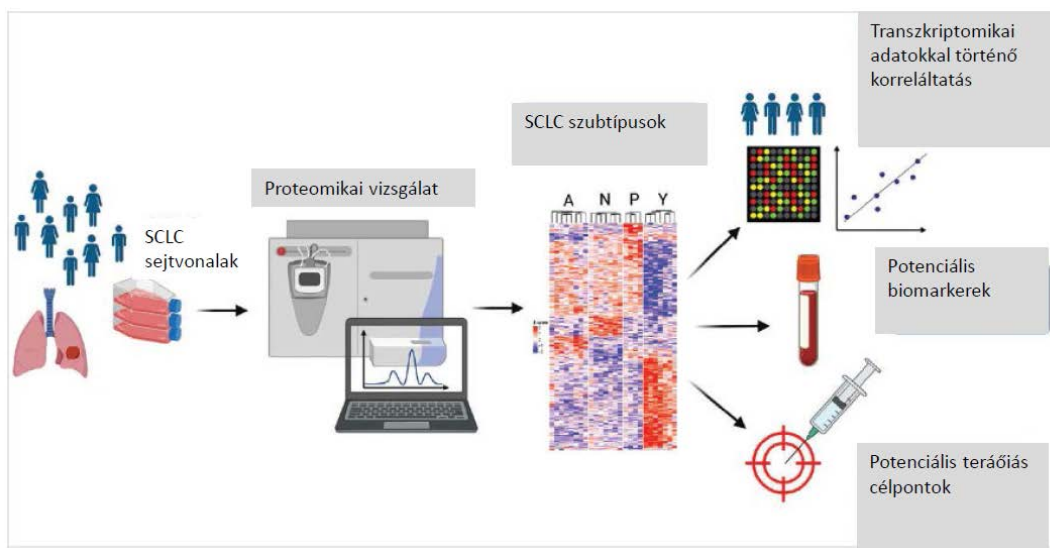
alternatívjaként egy egyedi gyulladásoz (SCLC-I) altípust javasoltak, amelyet egy gyulladásoz génszignatúra jellemoz (18). Emellett az altípus markerei és az NE jellemzői közötti, korábban várt RNS-alapú korrelációs mintázatot sem sikerült IHC-vel validálni (10). Ezért a transzkripciós profilozáson alapuló altípus-osztályozás nem biztos, hogy kizárólag a fehérjeexpresszió tekintetében reprezentatív.

A tömegspektrometrián (MS) alapuló proteomika lehetővé teszi komplex biológiai rendszerek, például sejtek, szövetek vagy vérplazma széleskörű elemzését. A modern, nagy felbontású tömegspektrométerekkel és fejlett mintaelőkészítési munkafolyamatokkal több ezer fehérje párhuzamos kimutatása és mennyiségi meghatározása lehetséges, beleértve a kisebb abundanciájú fehérjéket is, így jobban megérthetőek a tumorokra jellemző molekuláris kölcsönhatások és a jelátviteli útvonalak (53, 54). A rendelkezésre álló anyag szűkössége eddig akadályozta az SCLC szövetek átfogó proteomikai vizsgálatát, míg a nem-SCLC szövetek proteomját már korábban alaposan feltérképezték (55, 56). Ezidáig a proteomikai vizsgálatok az SCLC-t egyetlen entitásnak tekintették, és az SCLC-mintákat normál hörgőhám-szövettel (57), NSCLC sejtvonalakkal (42) vagy karcinoid tumorszövettel (43) hasonlították össze. Megjegyzendő, hogy ezek a tanulmányok viszonylag alacsony számú azonosítható fehérjéről (193-1991) számoltak be. Csak nemrégiben jelent meg egy 28 szövettypusból származó 949 tumoros sejtvonal, köztük 57 SCLC sejtvonal proteomikai vizsgálatáról szóló tanulmány, amelyben összesen 8498 fehérjét határoztak meg (58).

Jelen tanulmányunkban az SCLC altípusainak összehasonlító proteomikai elemzését végeztük el négy kulcsfontosságú transzkripciós faktor relatív expressziója alapján kategorizált sejtvonalak segítségével. A sejtpelletet (CP) és a sejtenyészto médiumot (CM) egyaránt értékelő, jelölésmentes shotgun proteomikai vizsgálatunk közel 9000 fehérje mennyiségi meghatározását eredményezte. Az SCLC-sejtvonalaknak ez az átfogó proteomikai elemzése a meglévő transzkriptomikai adathalmazokból származó ismeretekkel integrálva egyértelműbb meghatározást adhat az SCLC altípusairól, és betekintést nyújthat a terápiás választ meghatározó sajátosságaikba.

2.2. Anyag és módszer

26 humán SCLC-sejtvonal pelletét (CP) és sejtenyészto médiumát (CM) jelölésmentes shotgun proteomikai vizsgálatnak vetettük alá fehérjemeghatározás és kvantifikálás céljából, amelyet bioinformatikai elemzések követtek. A proteomikai adatokat korreláltattuk a sejtvonalak fenotípusos jellemzőivel, valamint az SCLC-sejtvonalak és szövetek nyilvánosan elérhető transzkriptomikai adataival. A munkafolyamatok részleges metodikai leírása meghaladja jelen dolgozat kereteit, így hivatkozom az alábbi grafikus absztraktra, illetve a közleményben leírtakra (59).



2.3. Eredmények

Az SCLC-sejtvonalak proteomikai módszerekkel kimutatott molekuláris heterogenitása

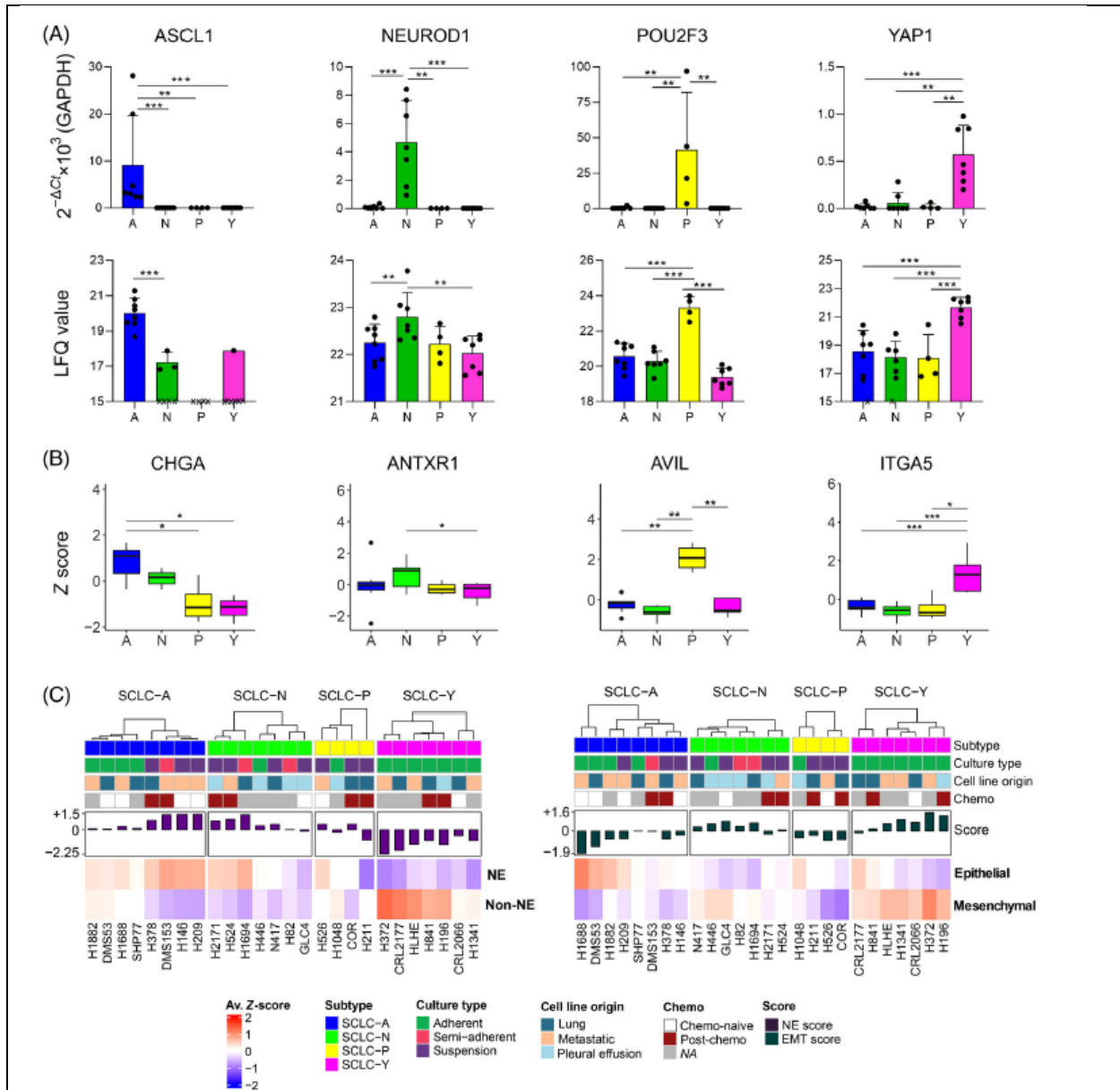
A primer vagy metasztatikus humán SCLC léziókból származó 26 sejtvonalat jelölésmentes proteomikai elemzéssel jellemeztük. Összesen 10161 fehérjét azonosítottunk és számszerűsítettünk (9570 fehérje a CP-ben, és 6425 a CM-ben), és e fehérjék többségét a minták legalább 80%-ában számszerűsítettük (8405 és 5408 fehérje a CP-ben, illetve a CM-ben). Összesen 699 szekretált fehérjét, 800 sejtfelszíni fehérjét, 3440 emberi vérplazmában kimutatható fehérjét, amelyek közül 367 aktívan szekretálódik a vérbe, és 289 gyógyszeresen befolyásolható fehérjét annotáltunk a sejtvonalainkban. A CM viszonylag több szekretált és plazmafehérjéből állt, kiemelve annak hozzáadott értékét a potenciális véralapú biomarkerek keresésében.

Először az ASCL1, NEUROD1, POU2F3 és YAP1 mRNS expressziós mintázatuk alapján - a sejtvonalakat a négy megfelelő alcsoport egyikébe csoportosítottuk: SCLC-A, SCLC-N, SCLC-P és SCLC-Y (nyolc, hét, négy, illetve hét sejtvonal) (1A. ábra, felső panel). Ezek a transzkripciós faktorok szintén megnövekedett fehérjeszintet mutattak a megfelelő altípusban (2.1.A. ábra, alsó panel).

Általánosságban a Myc proto-onkogén (MYC) család számos tagját azonosítottuk, amelyek általánosan kifejeződtek a mintáinkban, mint például a MYC és a fehérje L-Myc (MYCL) (9), vagy a transzkripciót aktiváló nukleáris faktor 1 B-típus (60). A TP53 és RB1 gének fehérjetermékeit, amelyekről jól ismert, hogy genetikailag megváltoznak az SCLC-ben (61-63), a sejtvonalak 100%-ában, illetve 88,5%-ában kvantifikáltunk, függetlenül a sejtvonalak korábban leírt TP53 és RB1 mutációs státuszától (52). Számos jól elfogadott altípus-marker (3) mutatta a várt fehérje-expressziós profilt az altípusok között, mint például a kromogranin-A (SCLC-A marker), az anthrax toxin receptor 1 (SCLC-N marker), az advillin (SCLC-P marker) és integrinek (SCLC-Y marker) (2.1.B. ábra).

A sejtvonalakat tovább jellemeztük NE és EMT jellemzőik alapján. Minden sejtvonalra kiszámoltuk az NE-pontszámokat, amelyek 19 NE és 17 nem-NE markerből épültek fel (40), valamint az EMT pontszámokat, amelyek 12 epithelialis és 10 mesenchymális markeren alapultak (64). A NE, nem-NE, epithelialis és mesenchymális markerek átlagos fehérjebőségét az egyes mintákban az 2.1D. ábra mutatja. A várakozásoknak megfelelően a legtöbb SCLC-A sejtvonal erősebben expresszálta a NE és epithelialis markereket, mint a nem-NE és a mesenchymális markereket (M NE score = 0,71, M EMT score = -0,70). Az SCLC-N inkább NE altípusnak bizonyult, vegyes epithelialis-mesenchymális jellemzőkkel (M NE score = 0,56 és M EMT score = 0,39). Az SCLC-P mérsékelt nem-NE jellemzőket mutatott az adatállományunkban (azaz alacsonyabbat, mint az SCLC-A és -N, de magasabbat, mint az SCLC-Y); azonban ebben az altípusban az epithelialis markerek magas expresszióját tapasztaltuk (M NE score = -0,05 és M EMT score = -0,61). Ezzel szemben az SCLC-Y sejtvonalak kiemelkedő nem-NE és mesenchymális vonásokat mutattak (MNE score = -1,35 és MEMT score = 0,75). Ezekkel az eredményekkel összhangban a delta-like protein 3 (DLL3) fehérje, egy gátló Notch-út vonal ligandum (65), az SCLC-A-tól az SCLC-Y felé csökkenő mennyiségben fejeződött ki, ami a Notch-út vonal fokozatos aktiválódására utal.

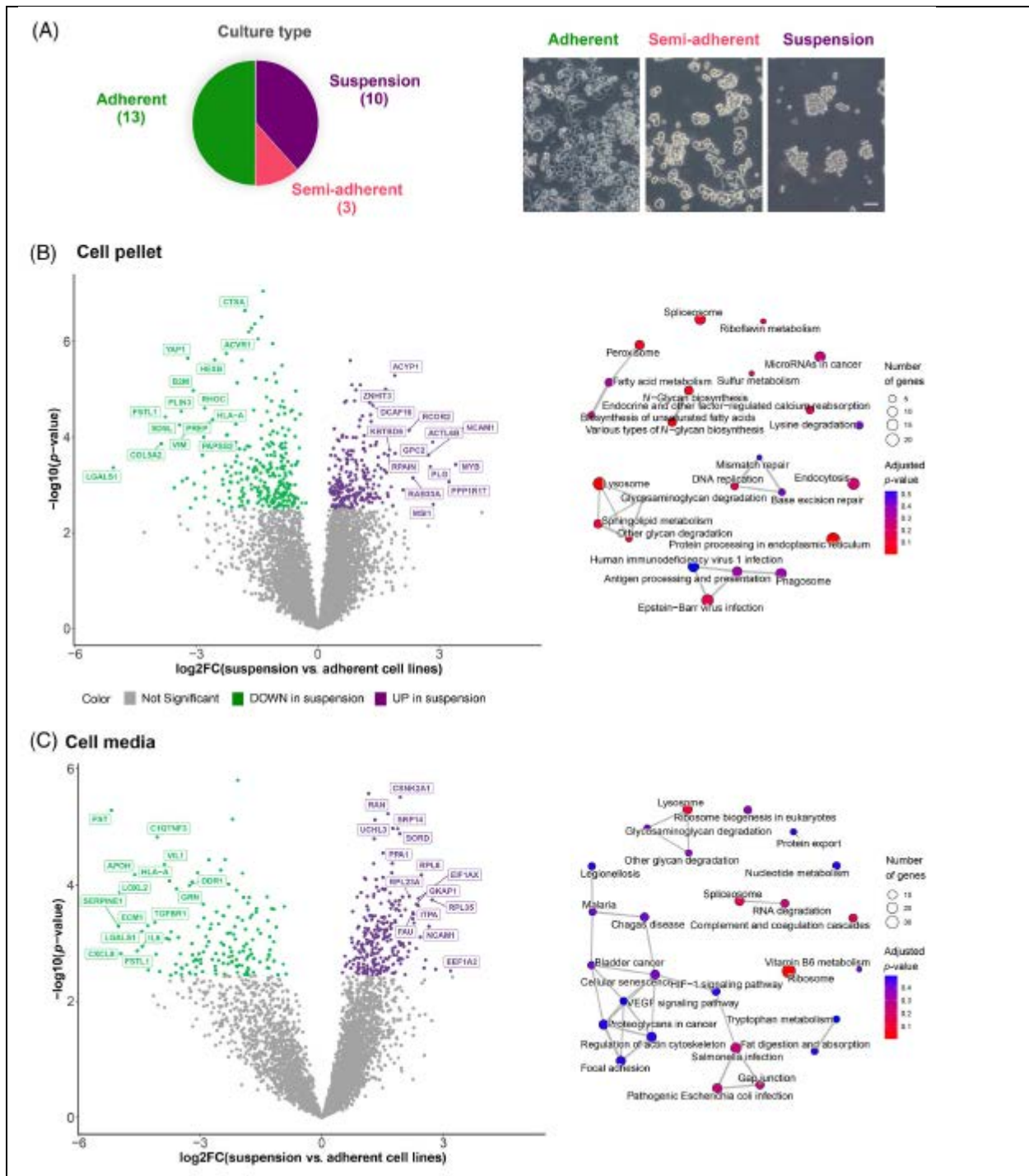
A különböző tulajdonságokkal rendelkező sejtvonalak - mint például a tenyésztési típus, a sejtvonal eredete és a kemoterápiás kezelés - NE- és EMT-pontszámát összehasonlítva azt találtuk, hogy az adherens sejtvonalak szignifikánsan alacsonyabb NE-pontszámot mutatnak, mint a nem-adherens sejtvonalak. Ezenkívül szignifikánsan negatív korrelációt figyeltünk meg az NE és az EMT pontszámok között.



2.1. ábra. A molekuláris heterogenitás feltérképezése a kissejtes tüdőrákos sejtvonalak proteomjában. (A) A molekuláris altípusok elkülönítéséhez használt transzkripciós faktorok (ASCL1, NEUROD1, POU2F3 és YAP1) expressziójának különbségei mRNS- (ábra felső sora) és fehérje-szinten (ábra alsó sora) az egyes molekuláris altípusokba sorolt sejtvonalakban. A felső sorban a $2^{-\Delta Ct} \times 1000$ értékek (ahol a Ct az áttörési ciklusszámra utal) átlaga \pm a standard deviáció (SD) van feltüntetve, normalizálva a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázra (GAPDH). Minden pont egy-egy sejtvonalra mért értéket jelöl, mely érték két biológiai replikátum három-három mérésének átlaga. A Mann–Whitney próbák szignifikanciája a dobozdiagramok felett található (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Az alsó sorban a proteomikai elemzés során a fehérjék jelölésmentes mennyiségi meghatározásából nyert LFQ (label-free quantitation) értékek átlag \pm SD értékei láthatóak külön-külön mindegyik altípusra. A hiányzó LFQ értékek x-el vannak feltüntetve. A független mintás T próbák szignifikanciája a dobozdiagramok felett látható (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (B) Négy ismert altípus-marker fehérje expressziós profilja (balról jobbra: CHGA, ANTXR1, AVIL és ITGA5, melyek az SCLC-A, -N, -P és -Y altípusok markerei). A független mintás T próbák szignifikanciája a dobozdiagramok felett található (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (C) A neuroendokrin és nem neuroendokrin markerek átlagos Z-értéke (bal oldali hőtérkép), illetve az epiteliális és mezenchimális markerek átlagos Z-értéke (jobb oldali hőtérkép) a sejtvonalak proteomikai adataiban.

A heterogén in vitro növekedési jellemzők megnyilvánulása a proteomban

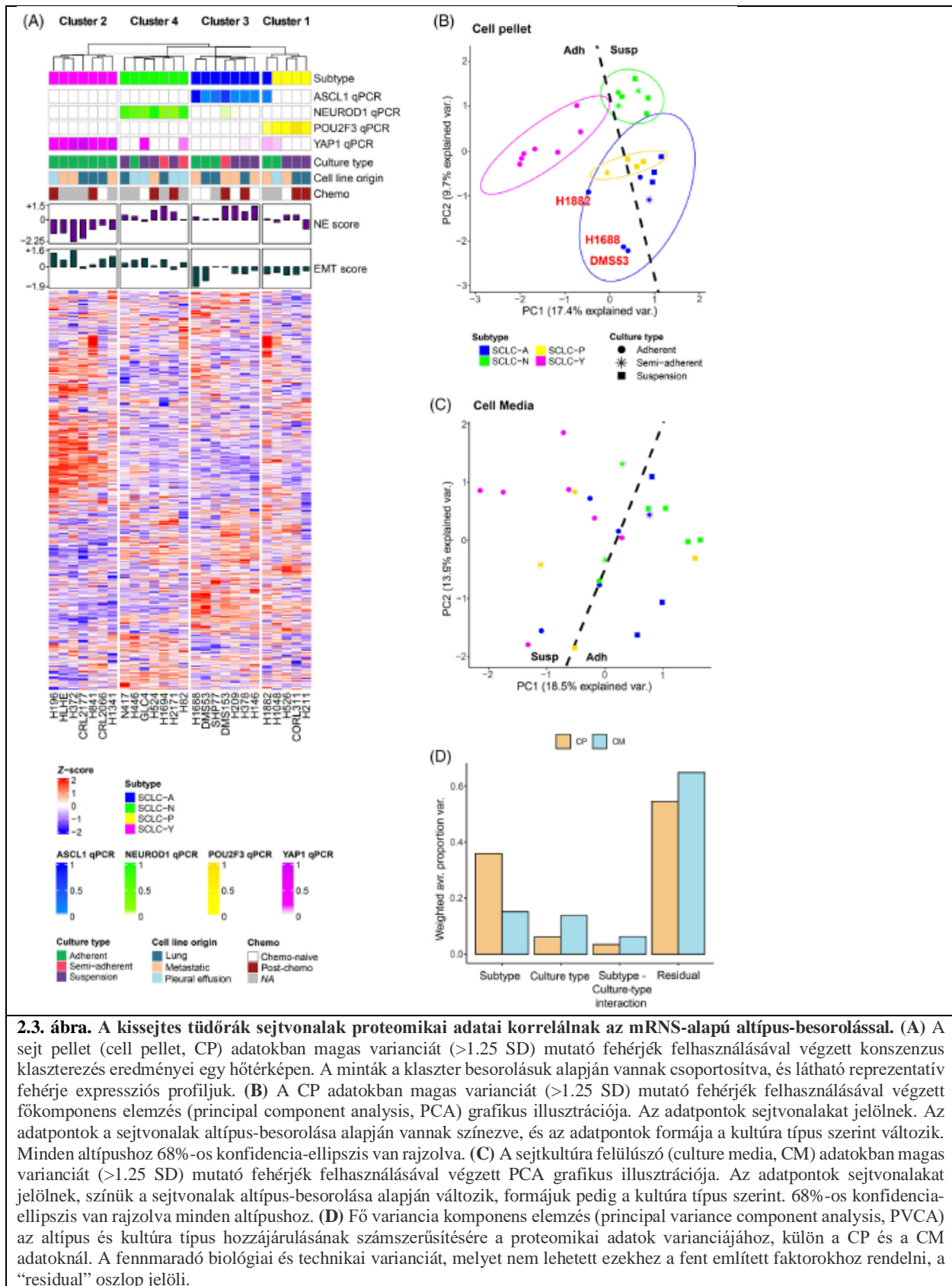
Bár azonos in vitro körülmények között tartottuk őket, a sejtvonalak jelentősen eltérő növekedési jellemzőket mutattak. Konkrétan a 26 sejtvonalból 10 (38,5%) szuszpenzióban, 3 (11,5%) félig tapadó formában, a többi 13 (50,0%) pedig műanyag tapadva növekedett (2.2A ábra). Az adherens és a nem-adherens sejtvonalak egyértelműen eltérő fehérje-expressziós profilokat mutattak (2.2.B-C. ábra). Összességében 270 és 148 fehérje volt szignifikánsan (BH korrigált $p < 0,05$) alulszabályozott a szuszpenziós sejtvonalakban a CP és CM adherens sejtvonalakhoz képest, míg 244 és 244 fehérje szignifikánsan túlszabályozott a CP és CM szuszpenziós sejtvonalakban (2.2.B-C. ábra, bal oldal). Az eltérően expresszált fehérjék ORA-ja (overrepresentation analysis), külön-külön a CP és a CM esetében, de túl- és alulszabályozott fehérjéket kombinálva, azt mutatta, hogy az olyan KEGG-útvonalak, mint a fehérje processzálas az endoplazmatikus retikulumban, a lizozóma és a glikozaminoglikán degradáció szignifikánsan ($p < 0,05$) feldúsultak mind a CP-ben, mind a CM-ben, valamint más útvonalak, mint az endocitózis, a CP-ben és a gap junction a CM-ben felülreprezentáltak voltak, ami alátámasztja a fenotípusos sejtvonalbeli különbségeket a fehérjék szintjén (2.2B-C. ábra, jobb oldal).



2.2. ábra. A sejtvonalak *in vitro* növekedési karakterisztikája és a proteomjuk közötti összefüggések. (A) A sejtkultúra típusok megoszlása a vizsgált 26 kissejtes tüdőrákos sejtvonal között egy kördiagramon, valamint reprezentatív képek a kultúra típusokról (Zeiss Axiovert 40 C mikroszkóppal felvett kép, skála = 100 μm). (B) A sejt pellet adatokban a szuszpenziós és adherens sejtvonalak közötti differenciális expresszió analízis eredményei egy vulkán-diagramon (balra), és a differenciális expressziót mutató fehérjék felülreprezentált KEGG útvonalai (jobbra). (C) A sejtkultúra felülíró adatokban a szuszpenziós és adherens sejtvonalak közötti differenciális expresszió analízis eredményei egy vulkán-diagramon (balra), és a differenciális expressziót mutató fehérjék felülreprezentált KEGG útvonalai (jobbra).

A proteom-alapú SCLC alcsoportok és a mRNS-alapú altípusmeghatározás összevetése

Annak vizsgálatára, hogy a proteomikai altípusmeghatározás korrelál-e az mRNS-alapú osztályozással, a CP-minták nem felügyelt konszenzusos klaszterezését végeztük el a legkülönbözőbb fehérjék alapján. Az elemzés négy klasztert mutatott ki a proteomikai adatokban, ami összhangban van a mRNS-alapú altípusmeghatározással (2.3.A. ábra). Eltérést csak egy sejtvonalt (H1882) esetében észleltünk, amelyet a qPCR-adatok alapján SCLC-A alklaszterbe, a proteomikai eredmények alapján pedig SCLC-P alklaszterbe soroltunk. Megjegyzendő, hogy ez a sejtvonalt is magasabb POU2F3 mRNS-expressziót mutatott, mint a többi SCLC-A sejtvonalt (2.3.A. ábra). Ezenkívül két adherens SCLC-A minta (H1688, DMS53) jobban elkülönült a csoport többi tagjától. Figyelemre méltó, hogy az SCLC-Y minták mutatták a legkülönbözőbb fehérje-expressziós profilt. Az előző megfigyeléseket jól tükrözi a CP-minták PCA-diagramja is (2.3.B. ábra). Ezzel szemben a CM-minták a legkülönbözőbb fehérjék alapján meglehetősen heterogén expressziós profilt mutattak, és a PCA-diagram nem mutatott egyértelmű elkülönülést az mRNS altípusok szerinti besorolás szerint (2.3.C. ábra). Ennek megfelelően a PVCA azt mutatta, hogy a molekuláris altípusok a CP-hez képest kevésbé jelentősen járulnak hozzá a CM fehérjeexpresszió variabilitásához (2.3D. ábra). Továbbá, a tenyésztési típus fontos hozzájárulást mutatott ki az SCLC-sejtvonaltak proteomikai profiljához, ami a CM-ben kifejezettebb volt.



Az SCLC altípusok multiomikai portréi felvázolják a lehetséges altípus-specifikus terápiás lehetőségeket

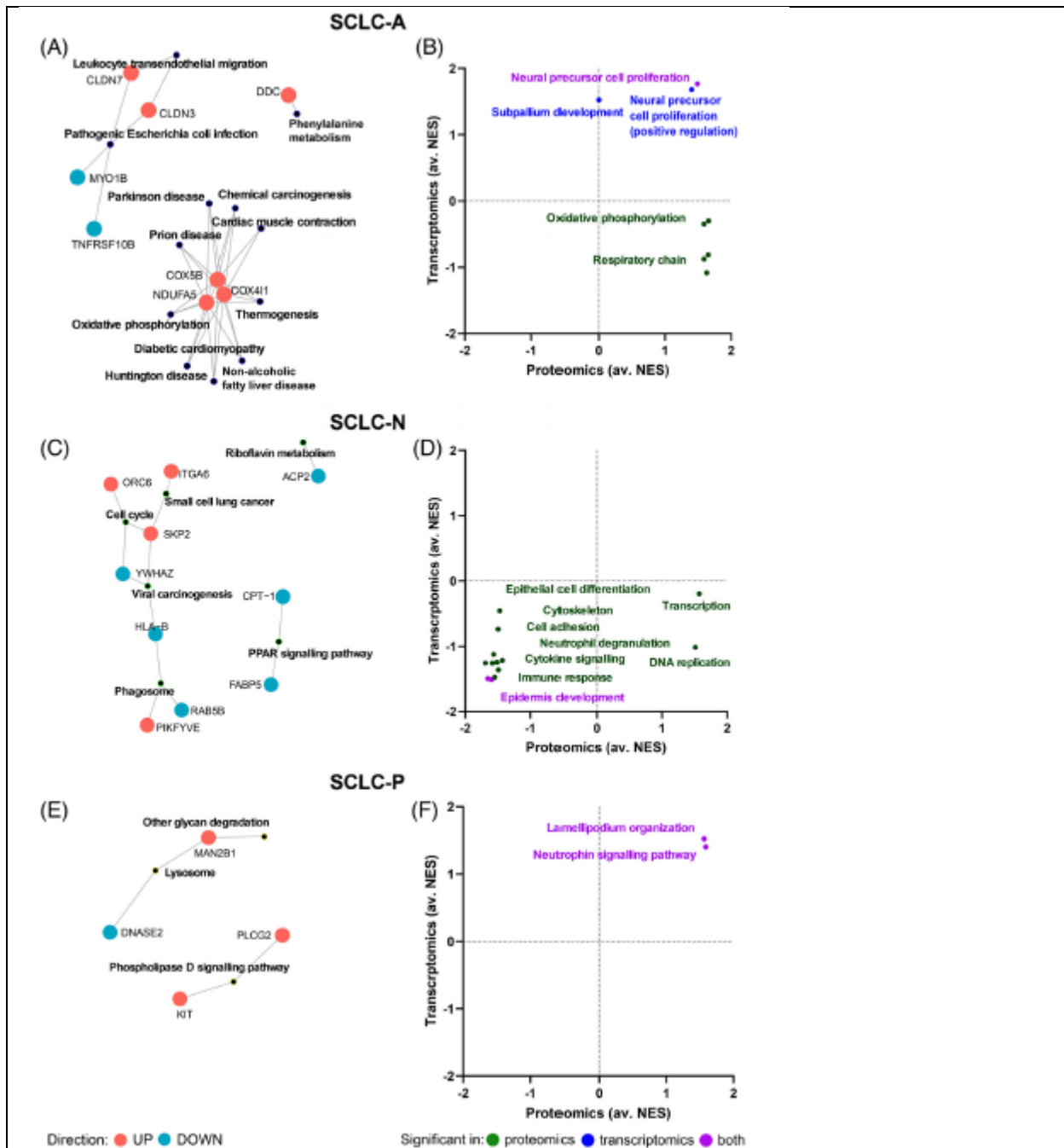
Az mRNS- és proteomalapú altípusok közötti nagyfokú egyezésnek megfelelően az altípusok közötti differenciális expressziós elemzésekben a mRNS-alapú osztályozási rendszert használtuk. 367 és 34 altípus-specifikus fehérjét találtunk (ANOVA BH korrigált $p < 0,05$, Tukey HSD post hoc $p < 0,05$), amelyek szintje egy adott altípusban különbözik a CP és CM adatokban szereplő mindhárom másik altípushoz képest. Ez négy olyan fehérjét is tartalmazott, amelyek a CP-adatokban on/off jellemzőkkel rendelkeztek, nevezetesen az achaete-scute homológ 1 (ASCL1; "on" az SCLC-A-ban), a G-protein signalling 22 szabályozója (RGS22; "on" az SCLC-P-ben), a neurexofilin-4 és a puratrofin-1 (NXPH4 és PKHG4; "off" az SCLC-Y-ban). Ezután az összes altípus-specifikus fehérjét (beleértve a CP és CM fehérjéket is) útvonal-elemzésnek vetettük alá.

Az SCLC altípusok mögöttes biológiájának szisztematikusabb vizsgálata érdekében az altípus-specifikus fehérjék azonosítása mellett az alcsoportok útvonalakon alapuló összehasonlítását is elvégeztük pGSEA-k segítségével. Olyan jelentős útvonalakat kerestünk, amelyek egy bizonyos altípusban egybehangzóan aktiválódtak vagy elnyomódtak a másik három altípushoz képest. Ehhez minden páros altípus-összehasonlítást elvégeztünk, a CP-adatokból származó kvantált fehérjék teljes listáját ($n = 8405$) felhasználva. Továbbá ugyanezt az elemzést elvégeztük a CCLE-ből (52) származó 50 SCLC-sejtútvonal RNS-Seq-adatain is ($n = 9237$ gén), és végül értékeltük a proteomikai és transzkriptomikai eredmények közötti kapcsolatot.

Az altípus-specifikus fehérjék szerint ($n = 33$) szignifikánsan felülreprezentáltak ($p < 0,05$) KEGG-folyamatok az SCLC-A-ban az oxidatív foszforiláció (OXPHOS), valamint a fenilalanin metabolizmus és a leukocita transzendotheliális migráció (2.4.A. ábra). Ezzel összhangban a pGSEA eredmények a proteomikai adatok alapján az OXPHOS és a légzési lánc elemeinek upregulációját is kimutatták. A neurális prekursorsejtek proliferációjának pozitív szabályozását mindkét adatkészlet alátámasztotta, míg a transzkriptomika a subpallium fejlődési génkészlet aktiválódását mutatta ki SCLC-A-ban (2.4.B. ábra).

Az SCLC-N ($n = 54$) altípus-specifikus fehérjék hozzájárultak a KEGG-útvonalak, például a sejtciklus, a fagoszóma, a riboflavin-anyagcsere és a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor jelátviteli útvonal jelentős felülreprezentáltságához (2.4.C. ábra). Az SCLC-N-t a pGSEA alapján tovább lehetett jellemezni az epidermisz fejlődési folyamatainak elnyomásával. A proteomikai adatok az immunválasz, a citokin-szignálok, a sejtadhézió és a citoszkeleton szerveződésének downregulációját, valamint a transzkripció és a DNS-replikáció upregulációját is körvonalazták (2.4.D. ábra).

Az SCLC-P specifikus fehérjéket ($n = 32$) figyelembe véve három szignifikánsan feldúsult KEGG-útvonalat észleltünk, nevezetesen a foszfolipáz D jelátvitelt, a lizoszómát, valamint az egyéb glikán degradációt (2.4.E. ábra). Továbbá a pGSEA kimutatta a neurotrofin jelátviteli útvonal és a lamellipodium szerveződési génkészlet aktiválódását SCLC-P-ben (2.4.F. ábra).

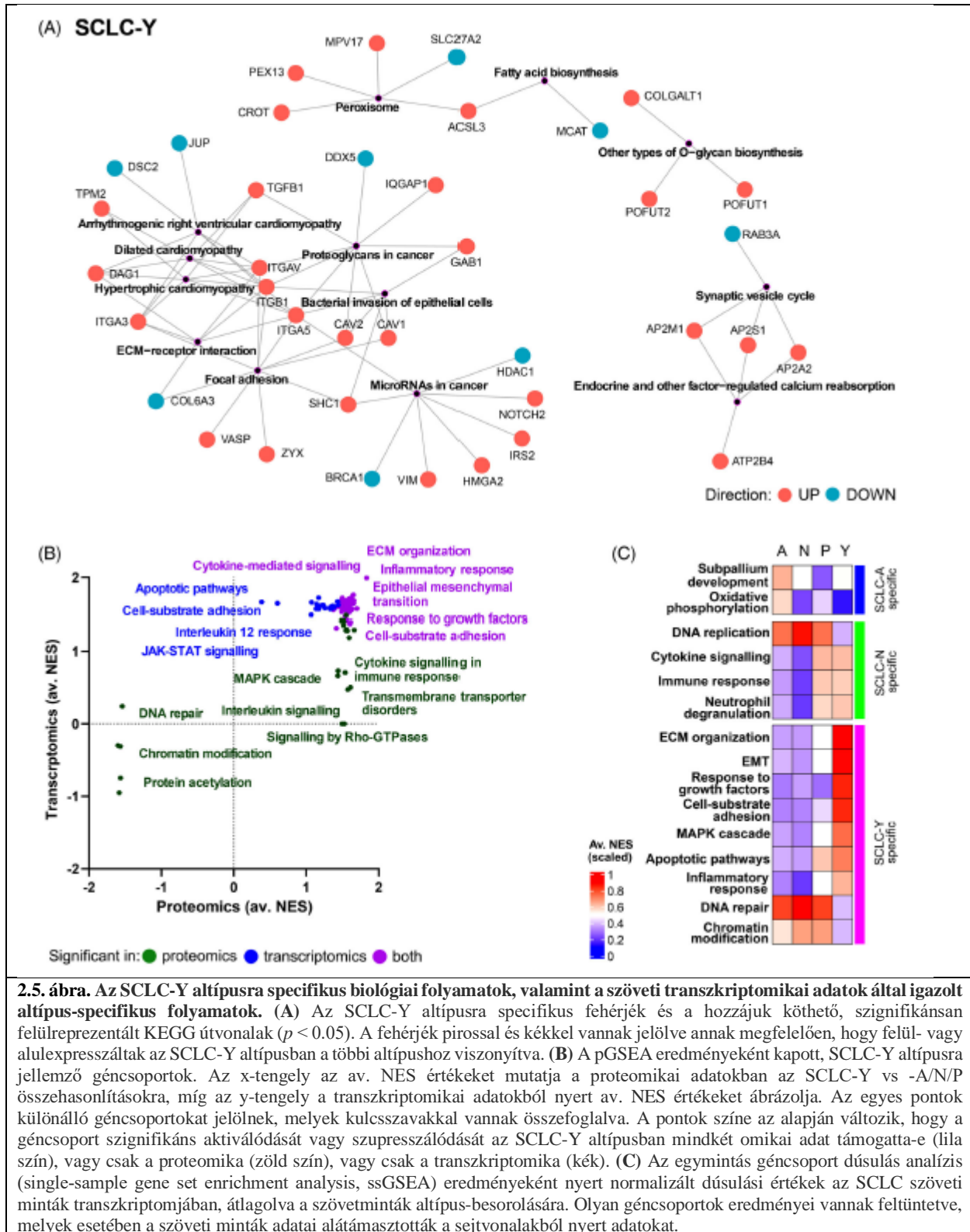


2.4. ábra. Az SCLC-A/N/P altípusokra specifikus biológiai folyamatok. Az altípus-specifikus fehérjék és a hozzájuk köthető, szignifikánsan felülreprezentált KEGG útvonalak ($p < 0.05$) láthatóak a bal oldalon (a fehérjék pirossal és késsel vannak jelölve annak megfelelően hogy felül- vagy alulexpresszáltak az adott altípusban a többi altípushoz viszonyítva). Az előre rangsorolt módon végzett géncsoport dúsulás analízis (pre-ranked gene set enrichment analysis, pGSEA) eredményeként kapott, az egyes altípusokra jellemző géncsoportok a jobb oldalon szerepelnek. Az x-tengely az átlagos normalizált dúsulási értéket (average normalized enrichment score, av. NES) mutatja a proteomikai adatokban az SCLC-A vs -N/P/Y, SCLC-N vs -A/P/Y, or SCLC-P vs -A/N/Y összehasonlításokra, míg az y-tengely a transzkriptomikai adatokból nyert av. NES értékeket mutatja. Az egyes pontok különálló géncsoportokat jelölnek, melyek kulcsszavakkal vannak ellátva. A pontok színe az alapján változik, hogy a géncsoport szignifikáns aktiválódását vagy szupresszációját az adott altípusban mindkét omikai adat támogatta-e (lila szín), vagy csak a proteomika (zöld szín), vagy csak a transzkriptomika (kék).

(A és B) SCLC-A, (C és D) SCLC-N és (E és F) SCLC-P altípusokra nyert eredmények.

Az SCLC-Y tekintetében több KEGG-útvonal szignifikánsan felülreprezentált volt az altípus-specifikus fehérjékkel összefüggésben ($n = 271$), mint például az extracelluláris mátrix (ECM)-receptor interakció, a fokális adhézió, a spliceoszóma, a peroxiszóma vagy az O-glikán bioszintézis (2.5.A. ábra). Hasonlóképpen, a pGSEA szerint az SCLC-Y-ban a többi altípushoz képest a folyamatok terjedelmes listája mutatott upregulációt, mint például az ECM-szerveződés, a citokin által közvetített jelátvitel, az interleukin jelátvitel, a gyulladásoz válasz, az EMT, a növekedési faktorokra adott válasz, a sejt-szubsztrát adhézió és a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaskád. A transzkriptomikai adatok az apoptotikus útvonalak és a Janus kináz-szignáltranszduktor és a transzkripció aktivátor jelátvitelének aktiválódását mutatták, míg a proteomika a Rho-GTPázok általi jelátvitel túlszabályozását, valamint a transzmembrán transzporterrel kapcsolatos folyamatok aktiválódását mutatta ki. Ezen túlmenően a DNS-javítás, a fehérje acetiláció és a kromatin-módosítás a proteomikai adatok alapján downreguláltak bizonyult ebben az altípusban (2.5.B. ábra).

Annak érdekében, hogy a sejtvonalaikban megfigyelt altípus-specifikusságot SCLC szövetekben is igazolni tudjuk, megvizsgáltuk a George és munkatársai által publikált SCLC szöveti transzkriptomikai adathalmazban korábban vázolt altípus-specifikus folyamatok reprezentatív génkészleteinek ($n = 33$) viselkedését (13). Az ssGSEA 22 olyan génkészletet azonosított, amelyek esetében az altípus-specifikusság bizonyos mértékben megerősítést nyert a szöveti adatokban (2.5.C). Ezek közül az OXPHOS aktiválódása az SCLC-A-ban, a túlszabályozott DNS-replikáció és a lecsökkent immunválasz az SCLC-N-ben, valamint az aktívabb EMT és a szupprimált DNS-javítás az SCLC-Y-ban volt kiemelhető. Az SCLC-P-ben az altípus-specifikus folyamatok egyike sem volt igazolható szöveti transzkriptomikai módszerekkel.

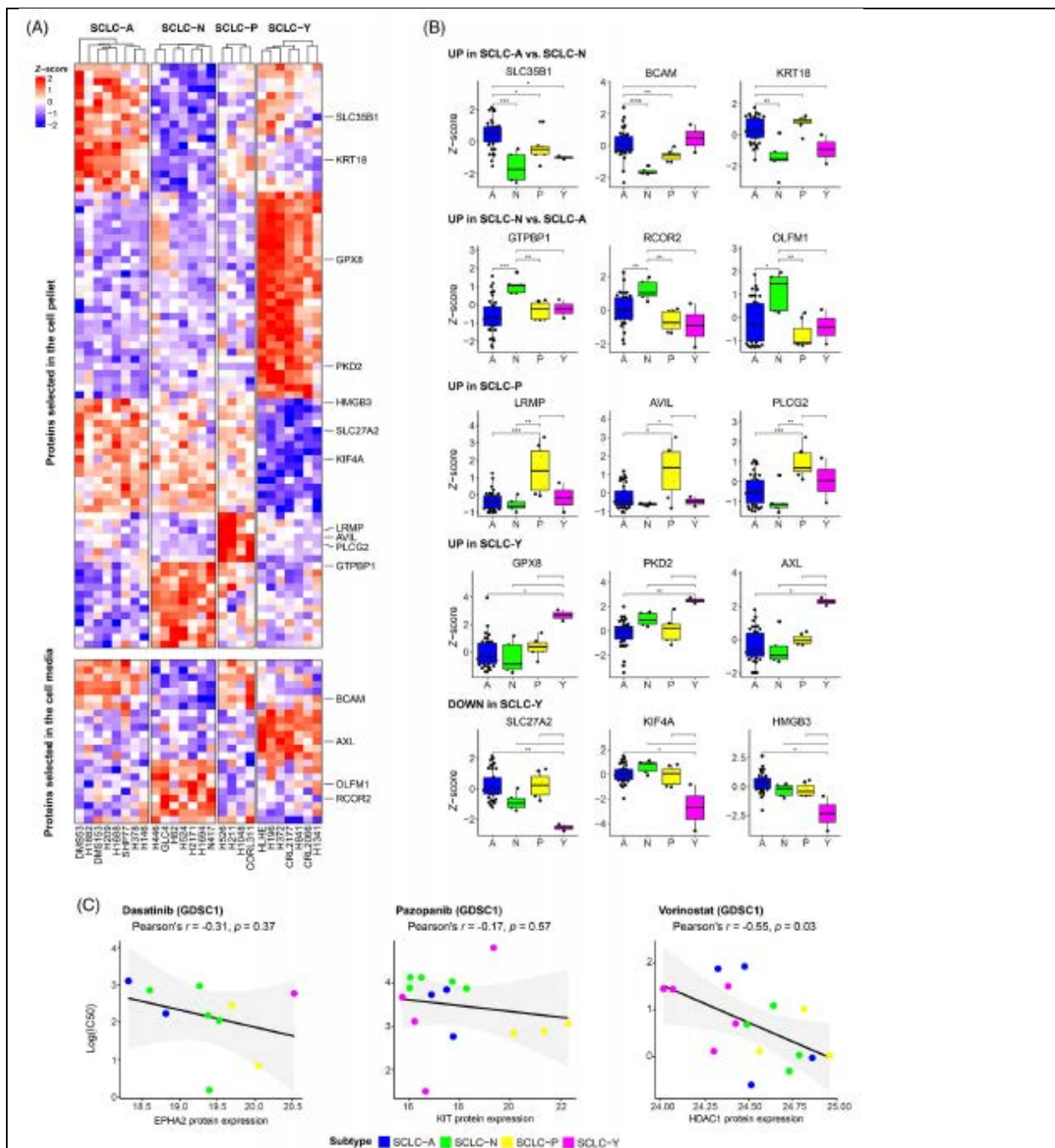


A proteomikai elemzés SCLC altípusok szerinti potenciális diagnosztikai markereket és gyógyszer-célpontokat azonosít

A differenciális expresszióelemzés mellett külön-külön végeztünk sPLS-DA (sparse partial least squares discriminant analysis)-t a CP és a CM esetében, hogy azonosítsuk azokat a fehérjéket, amelyek expressziós mintázatuk alapján leginkább alkalmasak az altípusok osztályozására (azaz potenciális IHC- vagy véralapú markerek). Az elemzés eredményeként 104 fehérje (82 és 23 a CP és a CM adatkészletekben; egy fehérje mindkét adatkészletben kimutatható volt) mutatott legalább két altípus között egyértelműen eltérő profilokat. Az sPLS-DA által kiválasztott fehérjéket a következő expressziós mintázati kategóriákba lehetett sorolni: túlszabályozott az SCLC-A-ban vs. SCLC-N, túlszabályozott az SCLC-N-ben vs. SCLC-A, túlszabályozott az SCLC-P-ben vs. más altípusok között, túlszabályozott az SCLC-Y-ban, alulszabályozott az SCLC-Y-ban (2.6.A. ábra). Figyelemre méltó, hogy a 104 fehérje közül 35 és 17 egyértelműen túl- vagy alulszabályozottnak mutatkozott az SCLC-Y altípusban. Számos marker esetében az expressziós mintázat egyezett az SCLC-szövetekből származó transzkriptomikai adatokkal (a három legfontosabbat a 2.6.B. ábra mutatja). Figyelemre méltó, hogy több ilyen fehérjéről állapítottuk meg, hogy túlexpresszálódik SCLC-Y-ban, így a glutation-peroxidáz 8 (GPX8), a piruvát-dehidrogenáz-kináz 2-es izoforma (PDK2) és a tirozin-protein-kináz receptor UFO (AXL) (2.6.B. ábra).

A szöveti transzkriptom szintjén megerősített fehérjék közül hatot a humán vérplazmában is ki lehet mutatni MS-sel. Ezek a következők: tirozin-fehérje-kináz receptor UFO (AXL, túlszabályozva az SCLC-Y-ban), a bazális sejtadhéziós molekula (BCAM, túlszabályozva az SCLC-A-ban vs. SCLC-N), GTP-kötő fehérje 1 (GTPBP1, túlszabályozva SCLC-N-ben vs. SCLC-A), keratin-18 (KRT18, túlszabályozva SCLC-A-ban vs. SCLC-N), noelin (OLFM1, túlszabályozva SCLC-N-ben vs. SCLC-A) és foszfolipáz C-gamma-2 (PLCG2, túlszabályozva SCLC-P-ben). A legígéretesebb véralapú biomarker ebből a listából az UFO fehérje, amelyet korábban immunassay-vel is kimutattak.

Végül megvizsgáltuk, hogy a differenciális expressziós analízissel vagy sPLS-DA-val detektált fehérjék (összesen 418 egyedi fehérje) között találunk-e gyógyszeresen befolyásolható fehérjéket (66) (azaz az FDA által jóváhagyott gyógyszer-célpontokat). Hat ilyen fehérjét azonosítottunk, mint az altípus-specifikus terápiák potenciális célpontjai: aromás-L-aminosav-dekarboxiláz (DDC, SCLC-A-ban túlexpresszált), efrin-A típusú receptor 2 (EPHA2), integrin alfa-V és béta-1 (ITGAV, ITGB1, SCLC-Y-ban túlexpresszált), hiszton-deacetiláz 1 (túlexpresszált az SCLC-A/N/P-ben vs. SCLC-Y), és az őssejt növekedési faktor receptor Kit (KIT, túlexpresszált SCLC-P-ben). Több olyan gyógyszert is ki lehetett jelölni, amelyek hatásmechanizmusuk részeként közvetlenül kölcsönhatásba lépnek a fent említett fehérjékkel. Ráadásul az SCLC-sejtvonalakat már hét ilyen gyógyszerrel szemben is tesztelték (CancerRxGene adatbázis (67)), nevezetesen a dasatinib (az EPHA2-t célozza), vorinosztát (a HDAC1-et célozza), imatinib, pazopanib, sorafenib, sunitinib és tivozanib (mind a KIT-et célozza). Ezért megvizsgáltuk, hogy az altípusok mutatnak-e különbséget az ezekre a gyógyszerekre való érzékenységekben, akár a GDSC1, akár a GDSC2 adathalmazokban. Általánosságban azt találtuk, hogy az alacsonyabb EPHA2, KIT és HDAC1 fehérje mennyiség a sejtvonalainkban a GDSC1 adatkészlet szerint az ezeket a fehérjéket célzó gyógyszerekkel szembeni fokozott rezisztenciára utal (2.6.C. ábra). Ezt a tendenciát a GDSC2-adatkészlet a dasatinib esetében nem igazolta; ugyanakkor néhány KIT-ellenes gyógyszer (pazopanib, sunitinib, tivozanib) medián IC50-értéke az SCLC-P sejtvonalakban volt a legalacsonyabb, valamint az SCLC-Y altípus vorinosztáttal szembeni nagyobb rezisztenciája is igazolható volt.



2.6. ábra. Diagnosztikai és terápiás relevanciát mutató fehérjék a kisgyegetes tüdőrák altípusokban.

(A) Fehérjék, melyek expressziós profiljuk alapján alkalmasak az altípusok elkülönítésére az adatainkban. A fehérjék listájának kinyerésére használt módszer az ún. "diszkriminancia analízis a parciális legkisebb négyzetek módszerével" volt, mely algoritmus a változók egyidejű szelektálását is tartalmazta (sparse partial least squares discriminant analysis, sPLS-DA). A felső hőterkép a CP, az alsó hőterkép a CM adatokat mutatja. Azon fehérjék vannak jelölve a hőterképeken, melyek hasonló profilt mutatnak az altípusok között az SCLC szövetek transzkriptomikai adataiban is. (B) Transzkriptek génexpressziós különbségei az altípusok között az SCLC szöveti adatokban. Olyan transzkriptek adatai láthatóak, melyek fehérje-szinten alkalmasak voltak az altípusok elkülönítésére, és ezt a transzkript-szintű adatok is alátámasztják. A Wilcoxon próbák szignifikanciája a dobozdiagramok felett található (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (C) A dasatinib, pazopanib, és vorinostat gyógyszerek IC₅₀ értékeinek természetes alapú logaritmusai a mért fehérje expresszió (LFQ érték) függvényében. Az IC₅₀ értékek a "Genomics of Drug Sensitivity in Cancer 1" (GDSC1) adatbázisból lettek összegyűjtve. A Pearson korrelációs analízisek eredményei a szórásdiagram fölött olvashatók. A pontok színe a sejtvonalak altípus-besorolása szerint változik.

2.4. Megbeszélés

Bár klinikailag az SCLC-t még mindig homogén, NE-jellemzőkkel rendelkező tumortípusnak tekintik, évtizedekkel ezelőtt leírták, hogy az SCLC "klasszikus", szuszpenziós növekedési típusú és NE-fenotípusú formája mellett létezik egy "variáns" (NE-alacsony típusú), főként adherens sejt kultúrákat alkotó SCLC-forma is (12, 30). Emellett a közelmúltban leírtak NE-differenciálódást nem mutató (nem-NE) tumorokat is (9). A mi SCLC-sejtvonalpanelünkben a minták 50%-a adherens, míg a másik fele semi-adherens módon vagy szuszpenzióban növekedett. Az adherens fenotípus és a nem-NE jellemzők között szignifikáns pozitív kapcsolatot figyeltünk meg. Fontos, hogy a vizsgált sejtvonalak proteomikai képe is tükrözte ezeket a fenotípusos különbségeket, és a sejtadhézióban szerepet játszó számos útvonallal összefüggő fehérjét azonosítottunk, amelyek eltérően fejeződtek ki az adhézióban vagy szuszpenzióban növekvő sejtvonalak között, beleértve a glikozaminoglikán lebomlást és az endocitózist vagy a gap junction-t is.

A legújabb profilalkotó vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy az SCLC NE és nem-NE osztályai további altípusokra oszthatók, nevezetesen az SCLC-A és -N (NE-magas, illetve NE-alacsony) és az SCLC-P és -Y (nem-NE típusok) (9). A sejtvonalainkat qPCR segítségével szintén ennek megfelelően kategorizáltuk, így nyolc ASCL1+, hét NEUROD1+, négy POU2F3+ és hét YAP1+ sejtvonalat kaptunk. A globális proteomikai adatokban ezek a transzkripciós faktorok nagyobb abundanciát mutattak a megfelelő altípusban, egyedül a neurogén differenciálódási faktor 1 (NEUROD1) emelkedett szintje az SCLC-N sejtvonalakban nem különbözött szignifikánsan mindhárom összehasonlításban.

A Zhang és munkatársai által leírt (40) NE és nem NE markerek fehérjeexpressziója szerint, a várakozásoknak megfelelően az SCLC-A és -N sejtvonalak NE jellemzőket mutattak, míg az SCLC-P és -Y csoportok inkább nem-NE fehérjeprofíllal társultak. Ez összhangban van egy nemrégiben humán szövetmintákon végzett IHC-alapú vizsgálat eredményeivel, amelyben a szerzők szintén azt találták, hogy a POU2F3 expresszió valószínűsége SCLC-ben kvantitatív módon összefügg a NE markerek expressziójának szintjével, és az SCLC-P tumorokra a NE-differenciálódás szinte teljes hiánya jellemző (68). Ezért a POU2F3 potenciális kiegészítő diagnosztikai markerként való bevonása vonzó megközelítést jelenthet az olyan SCLC-tumorok diagnosztizálásában, amelyekben a standard NE-markerek hiányoznak vagy minimális szintet mutatnak (68). Eközben egy másik vizsgálatban ugyanez a csoport azt is kimutatta, hogy a NE-differenciálódáshoz kapcsolódó hagyományos markerek expressziója lényegesen magasabb az ASCL1- és NEUROD1-definált tumorokban (az ASCL1/NEUROD1-dupla negatív tumorokkal szemben), ami szintén megfelel a mi eredményeinknek (10). Az epiteliális és mesenchymális jellemzőkkel kapcsolatban egy SCLC-sejtvonalakon végzett tanulmány (69) felvázolta, hogy az SCLC-P és -Y epiteliális, illetve mesenchymális tulajdonságokkal rendelkezik, míg az SCLC-A és -N altípusok vegyes jellemzőkkel rendelkeznek. A Kohn és munkatársai (64) által megállapított epiteliális és mesenchymális markerek alapján végzett proteomikai vizsgálatunk megerősítette ezeket a megfigyeléseket. Érdekes módon az EMT pontszámot nem befolyásolta a sejtvonalak származási helye. Adataink azt is kimutatták, hogy az erős NE vagy EMT jellemzők általában kölcsönösen kizárják egymást.

Fontos, hogy SCLC-sejtvonalainkat négy alcsoportba tudtuk besorolni átfogó sejtproteomikai profiljaik alapján, amelyek megegyeztek az előre meghatározott mRNS-alapú altípusokkal (csak egy sejtvonalat soroltunk be tévesen a proteomika alapján). Megjegyzendő, hogy a sejtközeg fehérjéinek a celluláris fehérjékhez viszonyított általános nagyfokú variabilitása valószínűleg zavarta az altípus-specifikus szignatúrák kimutatását ebben az adathalmazban (MSD a CP-ben = 0,85, MSD a CM-ben = 1,20). A proteomikai különbségek másik drivere a tenyésztési típus volt, amely mind a CP-t, mind a CM-et érintette.

Az SCLC altípusok egyedi vonásainak leírása érdekében megvizsgáltuk az altípusok között differenciálisan expresszálódó fehérjéket, és multiomikai útvonal-szintű elemzést végeztünk az összes kvantifikált fehérje (a mi adatállományunkból) és transzkriptum (az SCLC sejtvonalak CCLE transzkriptomikai adataiból)

expressziós különbségeinek felhasználásával az altípusok között. Ennek megfelelően feltártuk a potenciális altípus-specifikus terápiás lehetőségeket.

Az ASCL1 neurális differenciálódásban betöltött jól ismert szabályozó szerepének köszönhetően (70), a neurális prekursorsejt proliferációjával és a subpallium fejlődésével kapcsolatos fehérjék mutattak egybehangzó túlszabályozást az SCLC-A altípusban. Érdekes módon a proteomikai adatok egyértelműen jelezték, hogy az OXPHOS és a légzési lánc elemeinek aktiválása erősen specifikus az SCLC-A-ra. Nemrégiben leírták, hogy a MYC-et nem expresszáló sejtvonalak (jellemző az SCLC-A-ra (9, 13, 40)) jobban támaszkodnak az oxidatív anyagcserére (71), ami arra utal, hogy az SCLC-A tumorok érzékenyek lehetnek az OXPHOS-gátlókra (72).

Az SCLC-N sejtvonalak, amelyek vizsgálatunkban túlnyomórészt szuszpenziós kultúrákat alkottak, egybehangzóan a sejtadhéziós útvonalak downregulációját mutatták. A fehérjeszintű adatok elemzése rávilágított a DNS-replikáció és a transzkripció fokozott aktivitására és a citokin által közvetített jelátvitel depléciójára is ebben az altípusban. Érdekes módon hasonló tendenciát írtak le egy olyan vizsgálatban, amely az SCLC és a normál szövetek közötti génexpressziós különbségekkel foglalkozik (73).

Az epitéliszzerű SCLC-P sejtvonalakban a lamellipodium szerveződési útvonal túlszabályozását figyelték meg, amely az EMT egyik döntő lépését jelenti, ami a sejtek fokozott mozgékonyágához és invazív képességéhez vezet (74). Ezen túlmenően a neurotrofin jelátvitel túlszabályozása előrevetíti, hogy a poli(adenozin-difoszfát-ribóz) polimeráz (PARP) inhibitorok hatékony terápiás szerek lehetnek az SCLC-P esetében, ahogyan azt korábban javasolták (18), mivel a PARP elhúzódó aktivációja hozzájárul a neurotrofinok által kiváltott neuronális halálhoz (75). Ezen túlmenően adataink arra utalnak, hogy a neurotrofin-szignalizáció közvetlen célzott kezelése megfelelő kezelési lehetőség lehet a POU2F3 által vezérelt SCLC-ben (76).

Az SCLC-Y sejtvonalak egyértelműen meghatározott alcsoportot alkottak a mi SCLC-mintáinkban. A proteomikai adatokban egyedülálló felfedezés volt ebben az altípusban a fehérje acetiláció, a kromatinmódosítás (hiszton acetiltransferázok csökkent szintje által vezérelt) és a DNS kettősszál-törés javítási útvonalak downregulációja. Ezen túlmenően a MAPK-kaszkádnak és a Rho-GTPáz jelátviteli tagok overexpresszióját is kimutattuk ebben az altípusban. A Rho döntő fontosságú a YAP/TAZ aktivitáshoz (77); ezért az utóbbi útvonalak túlszabályozása várható a YAP1+ sejtvonalakban. Nemrégiben Caesar és munkatársai arról számoltak be, hogy SCLC-A-ban a MAPK útvonal aktiválódása inkább gátló funkciót tölt be, szemben az SCLC-N/P sejtvonalakkal. Az SCLC-Y altípusból származó sejtvonalakat azonban ezek a szerzők nem vizsgálták (78). A YAP1 által vezérelt sejtvonalak adhéziós jellegével összhangban azt is megfigyeltük, hogy a fokális adhézió, az ECM szerveződés és a sejt-szubsztrát protein útvonalak egységesen túlszabályozottak voltak az SCLC-Y alcsoportban, csakúgy, mint a peroxisómával és endocitózissal kapcsolatos fehérjék. Tlemsani és munkatársai leírták, hogy az SCLC-Y sejtvonalak magas prezentáló és natív immun predispozíciót mutatnak (69). Emellett ezek a sejtek rendelkeznek a legmagasabb antigénprezentáló pontszámmal is, így előrevetítve, hogy az SCLC-Y altípus érzékeny lehet az immun-checkpoint-inhibitorokra (69). Ezzel összhangban a citokin által közvetített jelátvitel és a gyulladáshoz vezető válasz jellegzetes túlszabályozását is azonosítottuk ebben az altípusban.

Megjegyzendő, hogy az SCLC-Y altípushoz kapcsolódóan még mindig van ellentmondás, mivel a betegmintákban az SCLC altípusok átfogó immunhisztokémiai és szövettani elemzése nem azonosították a YAP1 által vezérelt különálló altípust (10). Ezzel szemben a mi preklinikai proteomikai vizsgálatunk egyértelműen azonosít egy egyedi SCLC-Y altípust a vizsgált sejtvonalak között. Ennek megfelelően a 104 diagnosztikai jelentőségű fehérje jelentős hányada az SCLC-Y-hez kapcsolódott. Az SCLC-Y legígéretesebb biomarkerei közé tartozik a GPX8, a PKD2 és az UFO, amelyek közül az UFO potenciálisan kimutatható a humán vérplazmában is. Ez klinikai jelentőségű, mivel a megfelelő szövetminták hiánya rávilágít a véralapú biomarkerek diagnosztikai relevanciájára. Valóban, eddig csak egyetlen tanulmány tett kísérletet az altípus-specifikus véralapú biomarkerek panelének meghatározására (79). Tanulmányukban azonban a szerzők nem a fehérjék, hanem a keringő sejtmentes DNS diagnosztikai relevanciáját vizsgálták

(79). Ami a vizsgálatunkban azonosított potenciális SCLC-Y markereket illeti, a GPX8 génextpressziója korábban korrelált a YAP1 expressziójával SCLC-sejtvonalakban (80). A protein kináz D (PKD) SCLC-ben betöltött szerepéről keveset tudunk, de egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy a PKD a H69, H345 és H510 sejtvonalakban aktiválódik a protein kináz C-függő útvonal aktiválásán keresztül (81). Az AXL gén (amely az UFO fehérjét kódolja) a mesenchymális fenotípussal van kapcsolatban, és potenciális célpont az epidermális növekedési faktor (EGF) receptor inhibitorokkal szembeni rezisztencia leküzdésére (82).

Adataink hat olyan fehérjét vázoltak fel, amelyek az altípusok között figyelemre méltó különbségeket mutatnak a gyakoriságban, és amelyek az FDA által jóváhagyott gyógyszer-célpontok is, nevezetesen a DDC (overexpresszált az SCLC-A-ban), az EPHA2, az ITAV és az ITB1 (az EPHA2, ITGAV és ITGB1 géneknek megfelelő, az SCLC-Y-ban overexpresszált), a HDAC1 (az SCLC-Y-ban alulszabályozott) és a KIT (az SCLC-P-ben túlszabályozott). Az ASCL1 magas szintjével rendelkező sejtek a DDC erősebb expresszióját is mutatták (11), míg az EPHA2-t, egy nem-NE markert (40) korábban már leírták, hogy az SCLC-Y-ban túlszabályozott (69). Az integrinek túlzott expressziója az SCLC-Y-ban hozzájárul a kemoterápiás rezisztenciához a kemoterápia által indukált apoptózis elnyomása révén (83). Ezzel összhangban csoportunk korábban pozitív korrelációról számolt be a YAP1 fehérje mennyiség és a kemoterápiás szerekekkel szembeni rezisztencia között SCLC-sejtvonalakban (17). A közelmúltban beszámoltak a HDAC-gátlóval szembeni rezisztenciáról is az SCLC-Y-ban, amelyet a mi vizsgálatunkban a HDAC1 downregulációja előrevetített (84). A KIT fehérje ismert SCLC-P marker (85). Fontos, hogy hipotézisünket, miszerint a fehérjék altípus-specifikus overexpressziója bizonyos gyógyszerekkel szembeni érzékenységet jelez, a CancerRxGene adatai alátámasztották (67). Különösen azt erősítettük meg, hogy a KIT-et célzó gyógyszerek, mint például a pazopanib, potenciálisan megfelelőek a POU2F3-domináns SCLC-k ellen, míg a YAP1-domináns daganatok ellenállóbbak a vorinostáttal szemben (amely a HDAC1-et célozza).

A sejtvonalakon alapuló vizsgálatok fő előnye többek között az, hogy homogén tumorsejtek tiszta populációit lehet vizsgálni, keveredett stroma- vagy gyulladásos sejtek nélkül. Ez tudományos jelentőséggel bír a gyógyszer-érzékenységi vizsgálatokban és az altípus-meghatározási vizsgálatokban, mint amilyen a jelenlegi is (86, 87). Fontos, hogy a sejtvonalakból származó proteomikai adataink jelentős átfedést mutattak az SCLC szövetmintákból származó transzkriptomikai adatokkal az altípus-specifikus útvonalak tekintetében, ami arra utal, hogy az SCLC sejtvonalakon végzett in vitro vizsgálatok hasznosak az SCLC szöveti altípusainak jellemzésében. Gay és munkatársai által az SCLC szövet- és sejtvonaladatok átfogó multi-omikai vizsgálata ugyanezt mutatta ki, nevezetesen, hogy az SCLC-k mind a tumoros mikrokörnyezet jelenlétében, mind annak hiányában alcsoportokba sorolhatóak (18).

A sejtvonalak, bár kétségtelenül nem ideális modellek a profilalkotó vizsgálatokhoz, számos olyan előnnyel járnak, amelyek kiegészítik a tumorszövetek és állatmodellek használatát az SCLC vizsgálatához (86). Mindazonáltal néhány limitációját a tanulmányunknak hangsúlyozni kell. Bár számos korábban leírt altípus-markert megerősítettünk, és eredményeink nagyrészt összhangban vannak az altípus-specifikus útvonalakra vonatkozó korábbi transzkriptomikai adatokkal, a bevont sejtvonalak teljes száma viszonylag kicsi volt. Továbbá, tekintettel arra, hogy minden YAP1 által vezérelt sejtvonal adherens növekedési típussal rendelkezett, a későbbi elemzések nem voltak kivitelezhetőek az altípus és a sejtnövekedési típus külön-külön történő vizsgálatára. Ezért a sejtnövekedés típusának hatása az SCLC-Y különálló jellemzőire még mindig nem tisztázott. Azt is fontos megjegyezni, hogy az útvonalak egyedi túl- vagy alulszabályozása egy altípusban nem feltétlenül jelent függőséget vagy függetlenséget ezektől az útvonalaktól, mivel az egymáshoz kapcsolódó biológiai folyamatok és számos szabályozó tényező, beleértve a visszacsatolási és előrecsatolási hurkokat is, beavatkozik az ilyen folyamatokba. A kezeléssel kapcsolatos megfelelő adatok hiánya egyes sejtvonalak esetében egy másik lehetséges vizsgálati korlátot jelent. Ennek részben az az oka, hogy a vizsgált sejtvonalak többségét a múlt században hozták létre, és ezért a belőlük származó daganatra vonatkozó klinikopatológiai adatokat még alapos irodalomkutatást követően sem lehetett beszerezni. Figyelemre méltó azonban, hogy sem a NE/mesenchymális jellemzők, sem a fehérjeexpressziós profil nem különbözött jelentősen a kemoterápia jelenléte vagy hiánya szerint (az adatokat nem mutatjuk).

Összességében eredményeinket elsődlegesen hipotézisalkotónak kell tekinteni a jövőbeli vizsgálatokhoz, és minden megállapítást a fent említett korlátozások fényében kell megvizsgálni. Ennek megfelelően nagyobb SCLC-kohorszok proteomikai elemzése szükséges, lehetőleg homogén kezelési előzményekkel rendelkező betegek friss szövetmintáinak bevonásával, hogy megállapításainkat validáljuk.

3. A CD47 és PD-L1 expresszió klinikai és prognosztikai jelentőségének vizsgálata műtéti reszekált SCLC-ben

3.1. Bevezetés

A közelmúlt SCLC preklinikai és klinikai vizsgálataiban egyaránt jelentős számú célozható molekulát azonosítottak (4). Az immunterápiás megközelítést különösen ígéretesnek tartjuk az SCLC-ben (88). Az elmúlt évtizedek legjelentősebb terápiás újdonságait képviselve, a programozott sejthalál-ligandum 1 (PD-L1) célzott kezelése nemrégiben bekerült a kiterjedt stádiumú SCLC-s betegek kezelési irányelveibe (89, 90). Ezen túlmenően a CD47, a makrofágok számára antifagocitotikus sejt felszíni jel immunellenőrzőpont-mediált gátlásáról kimutatták, hogy hatékonyan elnyomja a SCLC tumor növekedését in vitro és in vivo (91). Ez klinikai jelentőséggel bír SCLC esetében, mivel a CD47-et szisztémás immunterápiával célzó klinikai vizsgálatokba már megkezdődtek a különböző szolid és hematológiai rosszindulatú daganatokban szenvedő betegek bevonása (92).

Mivel eddig csak néhány, kis kohorszokkal végzett vizsgálat tanulmányozta a PD-L1 és a CD47 eloszlását és prognosztikai jelentőségét SCLC-ben, az eredmények előzetesek és ellentmondásosak, ezért további vizsgálatokat igényelnek (93, 94). Ennek megfelelően jelen vizsgálatban célunk volt (i) a CD47 és a PD-L1 expressziós mintázatának, (ii) a CD47/PD-L1 expresszió és a közelmúltban tárgyalt főbb molekuláris SCLC altípusok közötti kapcsolat, valamint (iii) a CD47 és a PD-L1 expresszió prognosztikai hatásának értékelése egy nagy nemzetközi kohorszban, amely műtétiileg kezelt kaukázusi SCLC-s betegeket tartalmazott.

3.2. Anyag és módszer

Vizsgálati terv és klinikai adatok

A vizsgálatba olyan szövettanilag igazolt SCLC-s betegek kerültek, akik 2000 januárja és 2019 decembere között két közép-európai nagy volumenű mellkasebészeti központban (Bécsi Orvostudományi Egyetem, Mellkasebészeti Osztály, Bécs, Ausztria és Országos Korányi Pulmonológiai Intézet, Mellkasebészeti Osztály, Budapest, Magyarország) diagnosztikus vagy terápiás műtéti reszekción estek át. A klinikai és követési adatokat retrospektív módon az intézményi orvosi nyilvántartásokból nyertük ki, vagy közvetlenül a Központi Statisztikai Hivaltól szereztük be. Az ékrezekciót és a szegmentektómiát szublobaris rezekciónak, míg a lobektómiát vagy pneumonektómiát lobaris rezekciónak definiáltuk. A betegek stádiumbeosztását retrospektív módon végeztük el a szövettani leletek és az orvosi nyilvántartások adatai alapján, a Nemzetközi Tüdőrákkutató Társaság által a LC-re vonatkozó TNM (tumor-csomó-metasztázis) osztályozás nyolcadik kiadásának megfelelően (95, 96). Visszatérő betegségként definiáljuk a mediastinalis vagy hilaris nyirokcsomókban vagy az ipsilaterális tüdőben jelentkező kiújulást. Bármely más helyen történő kiújulást távoli szervi áttétként osztályozzuk.

Ha kiújulás vagy áttét gyanúja merült fel, további klinikai értékelést [pl. bronchoszkópos/transztorakális biopszia a gyanús elváltozásból, pozitronemissziós tomográfia-komputertomográfia (CT), mágneses rezonanciás képalkotás] végeztek az egyéni forgatókönyvek megfelelően. A teljes túlélést (OS) a műtét időpontjától az utolsó elérhető követés vagy halál időpontjáig, hónapokban kifejezett időtartamként határoztuk meg. A betegségmentes túlélést (DFS) a műtéttől az áttétek vagy a kiújuló betegség megjelenéséig eltelt időpontig hónapokban kifejezve számoltuk.

Az intézményi protokolloknak megfelelően valamennyi bevont beteg esetében rutin onkológiai követés történt. Ezek a követések rendszeres (azaz a műtét utáni első évben 3 havonta, majd 6-12 havonta) vérvizsgálatokat, röntgenfelvételeket és/vagy mellkasi CT-vizsgálatokat foglaltak magukba. Az egyes betegek daganat-specifikus adjuváns kezelésben részesültek a multidiszciplináris onkoteam döntése alapján, a National Comprehensive Cancer Network (NCCN) irányelveinek megfelelően (5). Az adjuváns kemoterápia platina hatóanyagból (ciszplatin vagy karboplatin) állt etopoziddal kombinálva. Ritka esetekben sugárterápiát is alkalmaztunk.

Immunhisztokémia és értékelés

A műtéti reszekált, formalinban rögzített, paraffinba ágyazott primer tumor- és nyirokcsomó-mintákat a résztvevő intézmények patológiai osztályairól szereztük be. Röviden, a friss szövetmintákat 4µm vastagságú metszetekre vágtuk, és a CD47, PD-L1, ASCL1, NEUROD1, YAP1 és POU2F3 expressziós szintjét immunhisztokémiai (IHC) módszerrel vizsgáltuk a gyártók protokolljának megfelelően. A következő antitesteket és hígításokat alkalmaztuk: anti-CD47 (Sigma Aldrich, Burlington, MA, HPA044659, 1 : 100), anti-PD-L1 (Cell Signaling Technology, Leiden, Hollandia, E1L3N/#13684, 1 : 100), anti-ASCL1 (BD Bioscience, San José, CA, #556604, 1 : 50), anti-NEUROD1 (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság, #ab213725, 1 : 100), anti-YAP1 (Cell Signaling Technology, Leiden, Hollandia, #4912, 1 : 200) és anti-POU2F3 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, #sc-293402, 1 : 100). A metszeteket egy éjszakán át 4°C-on festettük, majd 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk másodlagos ellenanyaggal. Végül az expressziós szintek vizualizálása Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako, K3468) segítségével történt, és a metszeteket hematoxilinnel kontrasztfestettük. Az antitesteket és az immunfestéshez használt kiteket egyaránt validáltuk megfelelő pozitív és negatív szöveti kontrollok használatával. Az IHC-festési eredményeket két tapasztalt, tüdődaganatokra szakosodott patológus egymástól függetlenül, kettős vakon értékelték. Ha az értékelések között jelentős különbségek voltak, a festést megvitatták és újraértékeltek. A CD47-expressziót negatívnak (hiányzik vagy az összes tumorsejt <10%-a pozitív) vagy pozitívnak (az összes tumorsejt ≥10%-a pozitív) értékelték, figyelembe véve a membrán és/vagy citoplazma jeleket. A PD-L1 esetében a tumorális és a stromális expressziót egyaránt értékelték, és negatívként (hiányzik vagy a tumor- vagy stromális sejtek <1%-a) vagy pozitívként (a tumor- vagy stromális sejtek ≥10%-a) határozták meg. Az ASCL1, NEUROD1, YAP1 és POU2F3 esetében a korábban meghatározott cut-off értékeket használtuk (17).

Statisztikai elemzés

Az adatokat GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), Microsoft Excel 16.48 verzió (Microsoft Corporation, Redmond, WA) és SPSS Statistics 27.0 verzió (IBM Corp., Armonk, NY) segítségével értékeltük. A binomiális változók összehasonlítására a khi-négyzet tesztet alkalmaztuk. Ha a várható gyakoriság 5 alatt volt, a Fisher-féle egzakt tesztet alkalmaztuk. Az OS és a DFS kockázati tényezőinek azonosítása érdekében az összes klinikopatológiai adatot és festési eredményt Cox-regressziós modellel végzett egyváltozós elemzésbe vontuk be, és kockázati arányokként (HR) mutattuk be, beleértve a megfelelő 95%-os konfidenciaintervallumokat (CI). Az egyváltozós elemzésben szignifikáns eredményeket mutató kockázati tényezőket egymás után bevontuk a többváltozós elemzésbe a megbízhatóság és a függetlenség vizsgálata érdekében. A túlélési görbe becsléséhez a Kaplan-Meier-módszert alkalmaztuk a log-rank teszttel együtt, hogy értékeljük az OS és a DFS szignifikáns különbségeit. Minden tesztet kétoldalasán számoltunk, és a <0,05-ös P-értékeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

3.3. Eredmények

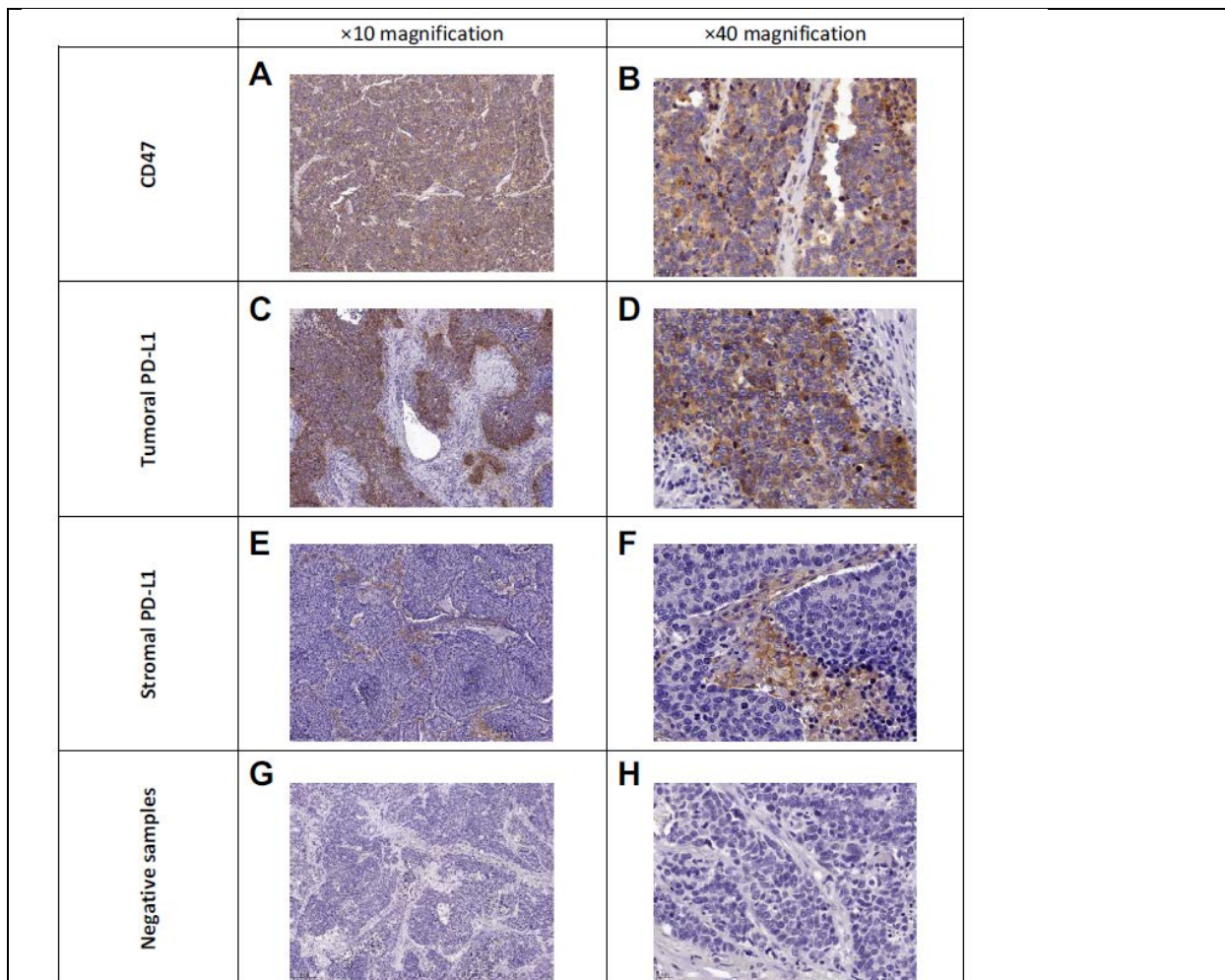
A vizsgálati kohorsz jellemzése

Összesen 104, 2000 januárja és 2019 decembere között műtéti reszekción átesett SCLC-beteget vontunk be a vizsgálatba. A medián életkor a műtét időpontjában 64 év volt (tartomány 41-83 év). Negyvenkilenc beteg

(47,1%) nő volt, és 87 beteg (83,7%) az orvosi feljegyzések szerint dohányzott. A leggyakoribb társbetegségek a magas vérnyomás (51%), a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) (41,3%) és a cukorbetegség (16,3%) voltak. A műtét típusát tekintve a leggyakoribb eljárások a lobektómia (51%), a szegmentektómia (13,5%), az ékrezekció (11,5%) és a pneumonektómia (10,6%) voltak. Ötvenhét beteg (54,8%) korlátozott stádiumú betegségben szenvedett (I + II. stádium), és 62 beteg (59,6%) kapott adjuváns kemoterápiát a helyi protokolloknak megfelelően. A vizsgált populáció klinikopatológiai adatait a CD47 és PD-L1 expresszió tekintetében az 1. táblázat és az S.1. kiegészítő táblázat mutatja, amelyek elérhetőek a <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100631> oldalon.

A CD47 magas aránya a sebészileg reszekált SCLC-ben

100 betegből 88-nál (84,6%) CD47-expressziót mutattunk ki. A CD47 expresszió azonban nem korrelált a klinikopatológiai betegadatokkal. A CD47 expressziója és a molekuláris SCLC altípusok között sem volt összefüggés a vizsgált kohorszon belül (S.1. kiegészítő táblázat, elérhető a <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100631> oldalon). Négy mintát ki kellett zárni a nem megfelelő festési minőség miatt. A CD47 antitesttel festett minták reprezentatív mintáit az 3.1.A. és B. ábra mutatja.



3.1. ábra. Reprezentatív képek az SCLC-t tartalmazó sebészi reszekátumokban IHC reakcióval detektált CD47 és PD-L1 expresszióról. CD47-et csak tumorsejtek expresszáltak (A, B), PD-L1 expresszió tumor- (C, D) és stromasejtekben (E, F) is megjelent. G és H ábrákon CD47 és PD-L1 pozitivitást nem mutató reprezentatív minták láthatók. IHC: immunhisztokémia; PD-L1: programmed death-ligand 1; SCLC: kissejtes tüdőrák (small-cell lung cancer).

Gyenge tumorális és mérsékelt stromális PD-L1 expresszió sebészileg reszekált SCLC-ben

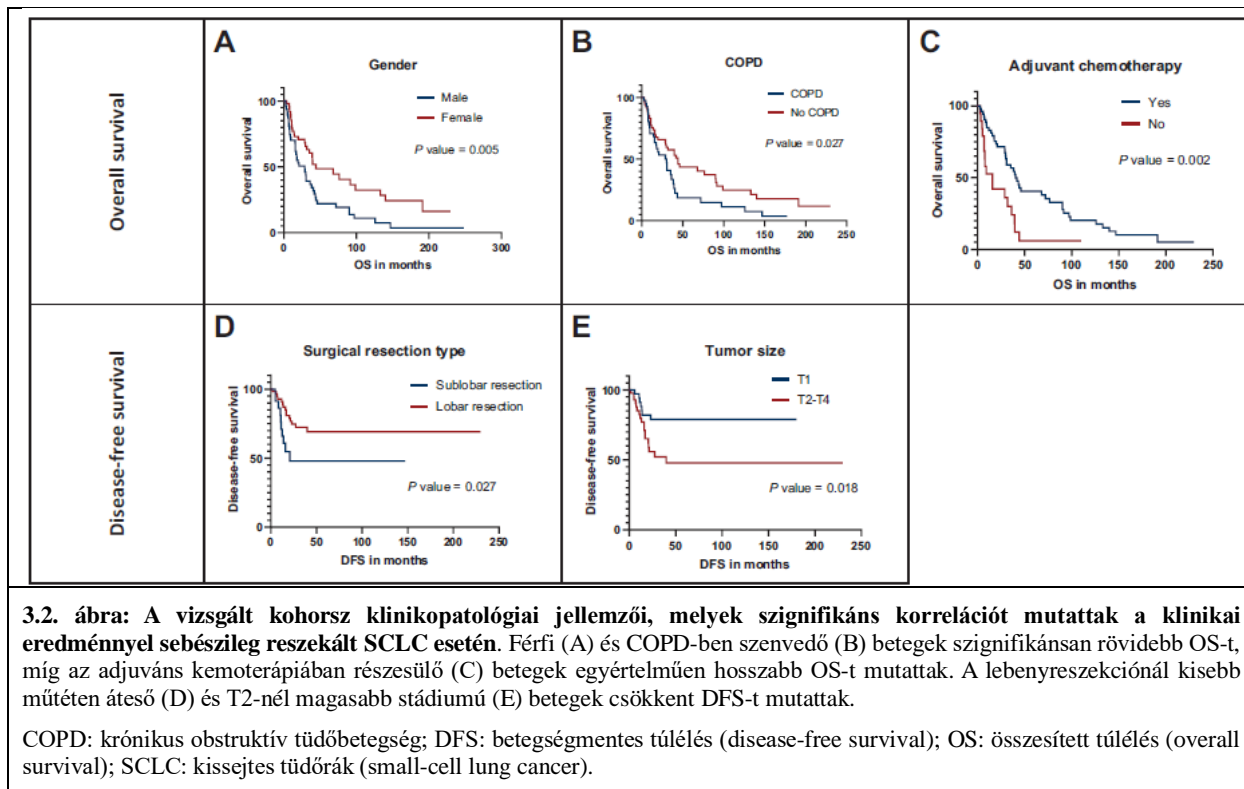
A CD47-gyel ellentétben a pozitív tumorális PD-L1-expresszió (t-PD-L1^{POS}) 102 betegből 10 betegnél (9,6%) volt kevésbé jelen. Érdekes módon a t-PD-L1^{POS} betegek között szignifikánsan magasabb volt a korlátozott stádiumú betegségben szenvedő betegek száma (a t-PD-L1^{POS} betegek 70%-a I + II stádiumú volt, $P = 0,0472$, Kiegészítő S.1. táblázat, elérhető a <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100631> oldalon). A tumoros PD-L1-státusz nem mutatott szignifikáns összefüggést a megfestett molekuláris SCLC altípusok egyikével sem.

A stromális terület értékelése során 62 olyan beteget azonosítottunk (a vizsgálati kohorsz 59,6%-a), akiknél pozitivitást (>1%) mutattunk ki a stromális PD-L1-expresszióra (st-PD-L1^{POS}). Érdekes módon az st-PD-L1^{POS} betegek nagyobb valószínűséggel tartoztak az N0 stádiumba, mint az st-PD-L1^{NEG} betegek (53,2% versus 25%, $P = 0,024$, Kiegészítő S.1. táblázat, elérhető a <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100631> oldalon). A stromális PD-L1-státusz nem különbözött a molekuláris SCLC altípusai között. Megjegyzendő, hogy két PD-L1-re festett mintát kizártunk a további elemzésből a rossz festési minőség miatt. A különböző tumoros és stromális PD-L1-státuszt mutató reprezentatív minták az 1C-F. ábrán találhatóak.

A klinikopatológiai jellemzők hatása a klinikai kimenetelre

Következő lépésként a klinikopatológiai jellemzők OS-re és DFS-re gyakorolt hatásának értékelését végeztük el az SCLC sebési reszekcióját követően. Érdekes módon a férfi betegek (szemben a nőkkel, 20 versus 44 hónap, $P = 0,0053$) és a COPD-s betegek (szemben a COPD nélküli betegekkel, 30 versus 44 hónap, $P = 0,0266$) OS-je szignifikánsan rosszabb volt, míg az adjuváns kemoterápiában részesülő betegek (szemben az adjuváns kemoterápia nélküli betegekkel, 41 versus 16 hónap, $P = 0,0015$) OS-e szignifikánsan hosszabb volt (3.2.A-C. ábra). Ennek megfelelően az egyváltozós elemzés megerősítette, hogy a nem (férfi, HR 1,954, 95% CI 1,209-3,158, $P = 0,006$) és a COPD (HR 1,712, 95% CI 1,059-2,770, $P = 0,028$) a rosszabb OS szignifikáns kockázati tényezői, míg az adjuváns kemoterápia (HR 0,399, 95% CI 0,221-0,717, $P = 0,002$) az SCLC sebészeti reszekcióját követően hosszabb OS-hez társult. A többváltozós elemzés alkalmazása után az adjuváns kemoterápia maradt a kedvező OS egyetlen független előrejelzője (HR 0,399, 95% CI 0,211-0,755, $P = 0,005$, 2. táblázat, <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100631>).

A DFS tekintetében a szublobáris reszekcióban részesülő (versus lobáris reszekció, 14 versus 29 hónap, $P = 0,027$) és a T1 tumoros (versus $\geq T2$ tumoros, 30 versus 18 hónap, $P = 0,018$) betegek prognosztikus klinikopatológiai feltételekkel rendelkeztek (3.2.D. és E. ábra). Különösen a sublobáris reszekciót igazoltuk a rosszabb DFS kockázati tényezőjeként az egyváltozós elemzés során (HR 2,424, 95% CI 1,077-5,456, $P = 0,032$), sőt, független prognosztikai tényezőként a többváltozós elemzés során (HR 3,274, 95% CI 1,407-7,618, $P = 0,006$). Hasonlóképpen a tumor mérete is a jobb DFS szignifikáns és független klinikai előrejelzője maradt az egyváltozós (T1 versus $\geq T2$, HR 0,362, 95% CI 0,151-0,869, $P = 0,023$) és a többváltozós elemzésben (T1 versus $\geq T2$, HR 0,351, 95% CI 0,144-0,858, $P = 0,022$) (3. táblázat, <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100631>).

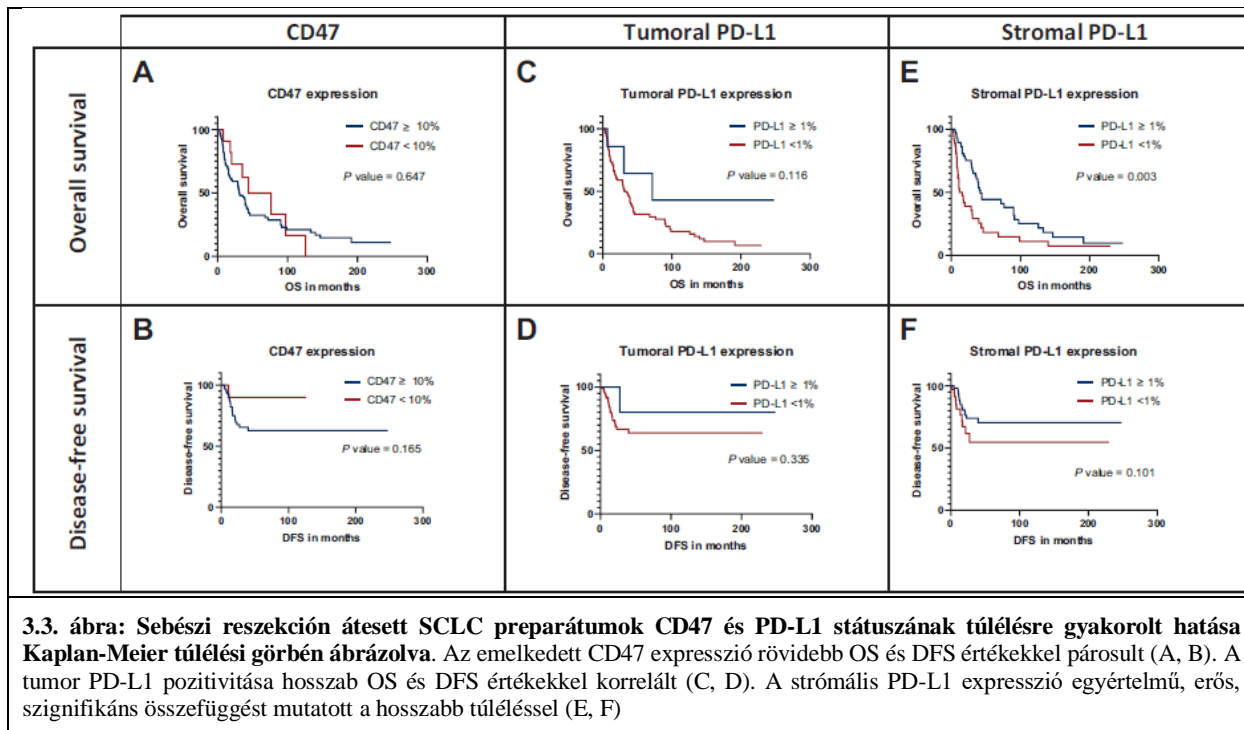


A CD47 és a PD-L1 expressziójának prognosztikai jelentősége

Végül a CD47 és a PD-L1 státusz prognosztikai értékét vizsgáltuk a betegek posztoperatív OS és DFS tekintetében a klinikai kimenetelre vonatkozóan. A pozitív CD47-státusz korrelált a rövidebb OS-sel (31 versus 44 hónap, $P = 0,647$) és DFS-sel (21 versus 35 hónap, $P = 0,165$) (3.3A. és B. ábra). Ezzel összhangban az egyváltozós elemzés a rövidebb OS (HR 1,181, 95% CI 0,562-2,482, $P = 0,661$) és a rövidebb DFS (HR 3,745, 95% CI 0,505-27,798, $P = 0,197$) egyértelműen megnövekedett kockázatát számította ki a CD47-expresszázó tumorral rendelkező betegeknél (2. és 3. táblázat, <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100631>).

Ami a PD-L1 expressziót illeti, a pozitív tumoros PD-L1 státuszú betegeknél a hosszabb OS (72 versus 32 hónap, $P = 0,116$) és DFS (30 versus 20 hónap, $P = 0,335$) volt a jellemző (3.C. és D. ábra). Ezenkívül az egyváltozós elemzés alacsonyabb eseménykockázatot számított ki az OS (HR 0,407, 95% CI 0,128-1,299, $P = 0,129$) és a DFS (HR 0,388, 95% CI 0,052-2,870, $P = 0,354$) tekintetében (2. és 3. táblázat: <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100631>).

Érdekes módon a pozitív stromális PD-L1-expresszióval rendelkező betegeknél szignifikánsan hosszabb OS (42 versus 14 hónap, $P = 0,003$) és tendenciaszerűen hosszabb DFS (30 versus 12 hónap, $P = 0,101$) volt megfigyelhető (3.3.E. és F. ábra). Fontos, hogy a stromális PD-L1-expresszió a kedvező OS erős és független előrejelzője maradt mind az egyváltozós (HR 0,487, 95% CI 0,302-0,785, $P = 0,003$), mind a többváltozós Cox-regressziós elemzésekben (HR 0,530, 95% CI 0,298-0,943, $P = 0,031$) (2. és 3. táblázat, <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100631>). A DFS tekintetében az egyváltozós (HR 0,521, 95% CI 0,236-1,153, $P = 0,108$) elemzés ismét megerősítette a pozitív stroma PD-L1 státuszt, mint a kedvező kimenetel előrejelzőjét, de nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét.



3.4. Megbeszélés

E tanulmányban a CD47 és a PD-L1 immunellenőrzőpont molekulák jelenlétének és prognosztikai értékének vizsgálatát tűztük ki célul sebészi reszekált SCLC-s betegek egy relatíve nagy nemzetközi kohorszában. Azonosítottuk a műtéti reszekált SCLC-betegek kimenetelét jelentősen befolyásoló különböző klinikopatológiai jellemzőket és terápiás megközelítéseket. Továbbá kimutattuk, hogy a CD47 erősen kifejeződik, míg a PD-L1 jelenléte általában alacsony az SCLC-szövetben. Végül kimutattuk, hogy a stroma PD-L1 expressziója szignifikánsan korrelál a betegség jobb kimenetelével, és független prognosztikai biomarker a reszekált SCLC-ben.

Bár a SCLC betegek általános klinikai kimenetele az elmúlt évtizedekben nem javult jelentősen, a különböző demográfiai jellemzők és kezelési módok figyelemre méltó túlélési különbségekkel társulnak (97-99). Tanulmányunkban az adjuváns kemoterápia alkalmazását azonosítottuk a hosszab OS egyik legerősebb előrejelzőjeként. Ezenkívül egyértelmű összefüggést találtunk a növekvő tumorméret ($\geq T2$) és a kevésbé radikális sebészi reszekció (sublobaris versus lobaris reszekció), valamint a rosszabb DFS között. Ennek megfelelően eredményeink megerősítik a korábbi jelentések hasonló eredményeit, és figyelembe kell venni a műtét alkalmazásakor SCLC-s betegeknél (100-103).

Ami a CD47 expresszió jelentőségét illeti SCLC-ben, az összes vizsgált beteg 88%-ánál (88/100) mutattunk ki pozitív expressziót. Egyértelmű, hogy a CD47-expresszió viszonylag magas volt a sebészeti SCLC-kohorszunkban. Egy nemrégiben végzett tanulmányban Orozco-Morales és munkatársai SCLC biopsziás mintákat értékelték, és 29-ből 7 pozitív volt CD47-re (94). Bár ez a pozitívítási arány alacsonyabb a mi eredményeinkhez képest, az SCLC jelentős intratumorális heterogenitást rejthet magában, ami nagy kihívást jelent, amikor a különböző fehérjék expressziós mintázatát kis biopsziás mintákból értékeljük (17, 18, 22). Megjegyzendő, hogy a malignus tüdőszövetben a CD47 viszonylag magas expressziójára vonatkozó eredményeink összhangban vannak az NSCLC-ben CD47 expressziót értékelő más tanulmányokkal. Arrieta és munkatársai ugyanis 84%-os CD47-pozitivitást mutattak ki a tumoros biopsziákban, 80%-os medián expresszióval (104). Egy másik tanulmányban Zhao és munkatársai a minták

65%-ában találták a CD47 overexpresszióját primer NSCLC-ben; azonban az ő cut-off értékeik a mi tanulmányunkhoz képest jelentősen magasabbak voltak (105). Figyelemre méltó, hogy egy további vizsgálatban a CD47 szintjét NSCLC és pulmonális fertőzőes mintákban vizsgálták, és szignifikánsan magasabb CD47-expressziót találtak a malignus, mint a fertőző kontroll szövetekben (106). Ezek alapján a CD47 egy olyan immunellenőrzőpont molekulát képvisel, amelyet főként a malignus sejtek overexpresszálnak. A CD47 prognosztikai értékét tekintve nem azonosítottuk a CD47-et a klinikai kimenetel szignifikáns és független előrejelzőjeként, bár a magasabb CD47-expresszió egyértelmű tendenciát mutatott az OS (31 versus 44 hónap, $P = 0,647$) és a DFS (21 versus 35 hónap, $P = 0,165$) rövidülésére. Ez a tendencia összhangban van más tanulmányok adataival, amelyek összefüggést mutatnak a magas CD47-expresszió és a rosszabb klinikai kimenetel között számos rosszindulatú daganatban, beleértve az akut myeloid leukémiát, a gyomorrákot és a petefészekrákot (107-109). Tekintettel a CD47 magas expressziójára a mi vizsgálati kohorszunkban, és a preklinikai SCLC modellekből származó ígéretes eredmények alapján, amelyek az anti-CD47 terápia in vivo hatékonyságát hangsúlyozzák, további vizsgálatok indokoltak a CD47 mint ígéretes célpont értékelésére SCLC-ben (91).

A PD-L1 tumorsejtek PD-L1-expressziója figyelemre méltóan alacsonyabb volt, mint a CD47-expressziója, a pozitivitás aránya összességében 9,6%-nak (10/102) adódott. Megjegyzendő azonban, hogy más tanulmányok még alacsonyabb PD-L1-expressziós arányról számoltak be SCLC-ben. Yasuda és munkatársai mindössze egyetlen PD-L1-expresszálo tumort azonosítottak a 39 vizsgált beteg közül, ami 2,5%-os általános pozitivitási arányra utal (110). Egy másik tanulmányban Schultheis és munkatársai 94 SCLC-beteget elemeztek, és egyikük mintái sem mutattak pozitív PD-L1-expressziót a tumorsejtekben (111). Fontos, hogy a jelenlegi tanulmányban arról is beszámolunk, hogy a tumoros PD-L1-expresszió gyakoribb a korai (I + II.), mint az előrehaladott stádiumú betegeknél. Hasonlóképpen Fu és munkatársai is szignifikánsan magasabb PD-L1-expresszióról számoltak be korlátozott stádiumú SCLC-ben, 43 sebészileg reszekált beteg körében 63%-os pozitivitási aránnyal (112). Ennek megfelelően a közeljövőben megalapozottak a korlátozott stádiumú SCLC-s betegek PD-L1-blokkoló terápiait értékelő vizsgálatok.

A mi eredményeinkhez hasonlóan Schultheis és munkatársai a PD-L1 nagyobb mértékű jelenlétét találták a tumor strómában, bár a vizsgált mintáik 46%-a kis biopsziából származott. Itt a tumor stróma jelentősen eltérhet a sebészi reszekcióból származó mintáktól (113). Mindazonáltal a vizsgált kohorsz 18,5%-a mutatott erőteljes PD-L1-expressziót a tumort infiltráló limfocitákban (TIL) (111). Ami a prognosztikai értékét illeti, egyértelmű összefüggést mutattunk ki a stróma PD-L1 jelenléte és a kedvező OS között SCLC sebészi reszekciója után. Más tanulmányok a petefészek-, vastagbél- vagy emlőrákos betegcsoportok értékelésekor ugyanezt a tendenciát írták le, mint amit mi is találtunk SCLC-ben (114-116). Elsőre ellentmondásosnak tűnhetnek eredményeink, miszerint a magas PD-L1-expresszió korrelál a jobb onkológiai kimenetellel. A PD-L1 ugyanis az egyik legjobban leírt "ne ölj meg" jelet közvetíti, amelyet a rosszindulatú sejtek arra használnak, hogy elnyomják a tumorspecifikus T-sejtek gátlását, és így kikerüljék a fiziológiás tumorelles immunitást. Ennek megfelelően azt várhatnánk, hogy a PD-L1 magas jelenléte automatikusan rosszabb onkológiai kimenetellel jár. Több olyan eredmény is van azonban, amely racionális magyarázatként szolgálhat a PD-L1 stromális jelenlétének pozitív prognosztikai értékére. Először is, Ali és munkatársai pozitív korrelációt írtak le a stromális PD-L1 expresszió és a TIL-ek magasabb jelenléte között, mely utóbbiaktól ismert, hogy domináns szerepet játszanak a malignus sejtek eliminációjában (117). Wang és munkatársai szintén jelentős PD-L1-túlszabályozásról számoltak be a T-sejtek proliferációs fázisában, míg Pulko és munkatársai azt javasolták, hogy az aktivált TIL-ek a PD-L1-et védelmi jelzésként használják saját túlélésük érdekében (118, 119). Továbbá, a PD-L1 jelátvitel túlszabályozását a tumorelles immunválaszban részt vevő citokinek közvetlenül is elősegítik (120-122). Ezen eredmények ismeretében a stromális PD-L1 expresszió olyan immunogén tumoros mikrokozonyt tükrözhet, amely képes elnyomni a tumor növekedését, ezzel magyarázva a vizsgálatunkban talált összefüggést a jobb klinikai kimenetellel (123, 124).

Csoportunk nemrégiben értékelte a korábban bemutatott főbb molekuláris SCLC altípusok klinikai relevanciáját a sebészileg reszekált betegek és sejtvonalak egy jelentős kohorszában (9, 17). A

prognosztikai implikációkon túlmenően jelentős összefüggéseket azonosítottunk a különböző molekuláris altípusok és a terápiásan releváns molekulák között. A jelenlegi vizsgálatban azonban sem a CD47, sem a PD-L1 expressziója nem mutatott összefüggést a fő molekuláris SCLC altípusok egyikével sem.

Meg kell jegyezni, hogy tanulmányunknak vannak bizonyos korlátai. Először is, annak ellenére, hogy az IHC jól bevált és rutinszerűen alkalmazott módszer a fehérjeszintű változások meghatározására a tumoros mintákban, nincsenek szabványosított protokollok a CD47 és PD-L1 értékelésére vonatkozóan. A különböző antitestek, festési protokollok, választott cut-off értékek és pontozási módszerek nyilvánvalóan nagyon eltérő eredményekhez vezethetnek. Másodsor, bár tanulmányunkban a sebészileg reszekált SCLC esetek viszonylag nagy kohorszát értékeltük, a bevont betegek száma összességében még mindig kicsi maradt. Végül, tekintettel a tanulmány retrospektív jellegére, az egyéni túlélési adatokhoz teljes mértékben a rendelkezésre álló orvosi nyilvántartásból jutottunk.

4. STING és MHCII immunellenőrzőpont-fehérjék expressziója SCLC-ben

4.1 Bevezetés

A tumor mikrokozonyezetét (TME) érintő kritikus immunológiai mechanizmusokról, mint például a tumort infiltráló limfocitákról (TIL) és a tumorasszociált makrofágokról (TAM) alkotott tudásunk a mai napig hiányos (125). Az immunsejt-infiltráció és a megnövekedett CD8+ T-sejtek független pozitív prognosztikai markereknek bizonyultak, és számos malignitásban, köztük vastagbél- (126), prosztata- (127) és emlőrákban (128), melanomában (129) és NSCLC-ben (129, 130) fokozhatják az anti-PD1-immunterápiára adott választ. A TME egy ellentmondásosabb eleme, a TAM-ok tumorról kapcsolatos aktivitása tumortípusonként és kompartmentenként eltérő lehet (131). A TAM-okat és más gyulladáshoz sejteteket a tumorstróma felé vonzza a tumorsejtek által termelt, pro-tumorigén és immunszuppresszív funkciókat ellátó citokinek és kemokinek felszabadulása (132).

Nemrégiben csoportunk kimutatta, hogy az immunellenőrző-pontok, mint az indolamin-2,3-dioxygenáz (IDO), a T-sejt immunoglobulin és mucin domén-tartalmú fehérje 3 (TIM3), a poliovírus receptor (PVR) és a fő hisztokompatibilitási komplex II (MHCII) expressziója szignifikánsan magasabb a neuroendokrin (NE) alacsony SCLC-ben (37). Míg az MHCII konstitutív expressziója az antigénprezentáló sejtekben (APC-k) jól ismert, bizonyos daganattípusok is képesek a molekula expressziójára (133). Arról is beszámoltak, hogy az MHCII molekula tumorspecifikus expressziója fokozhatja a tumor felismerését az immunsejtek által (134), míg a nagyszámú immunszuppresszív M2-macrofágok jelenléte (135) akadályokat gördíthet a jövőbeli immunterápiák sikerességének útjába. Egy másik immunellenőrzési pont, az interferongének stimulátora (STING) a tumor felismerésének alapvető veleszületett immunszenzoraként működik (136). A STING jelátvitel a TME-ben lévő APC-k aktiválódásakor az I. típusú interferon termelését irányítja, így fokozza az effektor (CD8+) T-sejtek keresztprimingjét (137, 138). Mások csökkent STING/cGAS expresszióról számoltak be tüdőrákban, ami rosszabb prognózissal jár (139, 140).

Ebben a vizsgálatban 219 SCLC-s beteg TMA-mintáin végeztünk immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatokat. Tanulmányoztuk az új immunellenőrzési pontok, a STING és az MHCII expressziós mintázatát és prognosztikus szerepét az immunsejt-sűrűség és a négy fő SCLC altípus marker összefüggésében a különböző tumorkompartimentekben, beleértve a strómát és a tumorfészkeket.

4.2. Anyag és módszer

Etikai nyilatkozat

A vizsgálatot az Orvosok Világszövetségének Helsinki Nyilatkozata irányelvei szerint, valamint a nemzeti etikai bizottság (ETTTUKEB-7214-1/2016/EKU) jóváhagyásával végeztük. E retrospektív vizsgálat

esetében eltekintettünk a betegek előzetes tájékoztatásától és beleegyezésétől. A klinikai információk beszerzése után a betegeket deidentifikáltuk, így sem közvetlenül, sem közvetve nem azonosíthatók.

Vizsgálati populáció

Ebbe a retrospektív vizsgálatba 1975 és 2013 között az Országos Korányi Pulmonológiai Intézetben sebészileg reszekált és szövettanilag igazolt, konsekutív SCLC betegek kerültek bevonásra. A vizsgálatot és a kezeléseket az intézményi irányelvek alapján végezték. Az elemzésbe bevont utolsó utánkövetés időpontja 2021. április volt.

Szövetfeldolgozás

Az SCLC-betegek daganatait a műtétet követően fixáltuk és paraffinblokkokba ágyaztuk. A TMA-k előállítását az FFPE-blokkokból a korábban leírtak szerint végeztük (141). Röviden, 4 mikronos metszeteket vágunk minden szövetblokkból egy HM-315 mikrotom (Microm) segítségével, és üveglemezekre helyeztük (Colorfrost Plus, #22-230-890, Fisher). A tárgylemezeket automatizált Tissue-Tek Prisma festőplatformon (Sukura) H&E festéssel festettük. Egy mellkasi onkológiában jártas patológus megvizsgálta a H&E-festett metszeteken a tumorterületet, amelynek a határait megjelölték. Minden donor szövetblokkból két 1 mm-es szövetlyukasztást végeztünk, és egy recipiens paraffinblokkba ültettük azokat pozíció-kódolt array formátumban (MP10 1,0 mm-es szövetlyukasztó kézi TMA-műszeren, Beecher Instruments).

Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia

Az IHC-festéshez öt mikron vastagságú metszeteket vágunk. A festési folyamatot Leica Bond RX autostainerrel végeztük a CD45 (#13917), CD8 (#8112), CD68 (#201340), STING (#13647) és MHCII (#68258S) nyúl monoklonális ellenanyaggal a Cell Signaling cégtől, amelyet a festés előtt 1:200 arányban hígítottunk, a korábban leírtak szerint (37). Az SCLC altípus markerekhez nyúl monoklonális antitesteket használtunk az ASCL1 (Sigma-Aldrich, #32355, 1:300-ban hígítva), POU2F3 (Sigma-Aldrich, #32537, 1:300-ban hígítva) és YAP1 (Invitrogen, #PA1-46,189, 1:300-ban hígítva), valamint egér monoklonális antitestet a NEUROD1 (abcam, #60704, 1:300-ban hígítva) ellen. A primer antitestek kötődését vizualizáltuk, majd a tárgylemezeket Bond Polymer Refine Detection kit (#DS9800) segítségével festettük meg a Leica IHC F protokollal, és 20 percig epitope retrieval 1-gyel (alacsony pH) inkubáltuk. A kettős IHC-festéshez a CD45 (#13917), CD3 (#17143), CD68 (#201340) és SMA (#7817) ellenanyagokat használtuk az Abcam-tól 1:300 arányban hígítva. Másodlagos ellenanyagként és kromogén szubsztrátként ImmPRESS® Duet Double Staining Polymer Kit (HRP Anti-Mouse IgG-brown, AP Anti-Rabbit IgG-magenta, MP-7724, VectorLabs) került felhasználásra. Az anti-POU2F3 festéshez másodlagos antitestként AP anti-Rabbit IgG-t (Vector) használtunk, 1:200 arányban hígítva 1% PBS/BSA-ban. Az endogén alkalikus foszfatáz aktivitást 5%-os levamizol oldattal oltottuk ki mielőtt az antigén bekötést vizualizáltuk VectaRed AP kit (Vector) segítségével. Az ellenfestést hematoxilinnel végeztük. A kettős immunfluoreszcenciához (IF) Alexa IgG anti-nyúl A488 és IgG anti-egér A546 fluoreszcens szekundereket használtunk (Invitrogen) a CD45, CD3, CD68 és SMA antitestek jelének kimutatására. TrueBlack® Lipofuscin Autofluorescence Quencher (Biotium) anyagot használtunk az FFPE minták autofluoreszcenciájának kiküszöbölésére. A fehérjeexpresszió kimutatásának optimalizálására pozitív kontrollként humán mandula- és tüdő adenokarcinóma-szövetet használtunk.

Immunfestések kiértékelése, sejtszámlálás és morfometria

A TMA-metszetekről készült képeket egy BX53 Olympus mikroszkóp és egy 20MP felbontású DP74 CMOS kamera segítségével készítettük el a kiértékeléshez, a sejtek számolásához és a tumorszövetek reprezentatív képeihez. A STING és az MHCII expresszióját és az SCLC altípus markerek (ASCL1, NEUROD1, POU2F3 és YAP1) festődési intenzitását egy szemikvantitatív pontozási rendszer segítségével értékeltük. Az MHCII esetében a pontszámokat az immunellenőrzőpont expressziós mintázata alapján határoztuk meg, ahol 0 = nincs pozitív tumorsejt, 1 = a tumorsejtek elszórtan elhelyezkedő csoportjai

pozitív (1-50 sejt), 2 = a tumorsejtek több csoportja pozitív (> 50 sejt), és 3 = a legtöbb tumorsejt diffúz pozitív festődése. A TME-n (stromasejtek, endothelium, immunsejtek) található pozitív festődést nem vettük figyelembe a pontozásnál. A STING esetében a pozitív sejtek száma/TMA core alapján pontozást alkalmaztunk, ahol a 0 = 0 sejt, 1 = 1-20 sejt, 2 = 20-40 sejt és 3 = > 40 sejt pontszámot határoztunk meg minden egyes szekcióra és kompartmentre (stroma és tumorfészek). A tumorsejteken az SCLC altípus marker expressziójának pontszámát a festődés intenzitása alapján határoztuk meg az Allred-pontszám szerint, ahol 0 = negatív, 1 = gyenge, 2 = közepes és 3 = erős pontszámot adtunk. Az SCLC altípus markereinek stromális expresszióját nem pontoztuk és nem értékeltük. A STING összpontszámot, a stroma és a tumorfészek pontszámát minden szekcióra átlagolva számoltuk ki.

A tumort infiltráló immunsejtek sejtsűrűségének méréséhez a morfometriát és a sejtek számolását az Olympus CellSens Dimensions szoftvercsomaggal végeztük, a mért területek (stroma és tumorfészek) kézi annotációját pedig a korábban leírtak szerint (37). Röviden, a CD45, CD8 és CD68 immunmarkerek pozitív sejtjeit két független megfigyelő által végzett szoftveres, kézi sejtszámlálással azonosítottuk az ImageJ szoftvercsomag „cell counter” bővítményével (142). 20% alatti eltérés esetén az értékeket átlagoltuk, ellenkező esetben a mintákat újra pontoztuk. Három különálló, öt mikron vastagságú metszetet (a metszetek között legalább 100 μm Z távolsággal) pontoztuk vagy számszerűsítettünk minden egyes TMA-core és minden egyes használt biomarker esetében. A négyzetmikrométereket (μm^2) négyzetmilliméterre (mm^2) konvertáltuk a sejtsűrűségi paraméterek kiszámításához a statisztikai elemzések során. Az azonos TMA-pontszámú, különálló metszetek eredményeit átlagoltuk.

A kolokalizáció mennyiségi értékelése

Megvizsgáltuk a STING-pozitív és a STING-negatív immunsejtek arányát; az összes sejtet megszámloltuk az összes immunsejt-marker (CD45, CD68 és CD3) esetében, majd külön-külön megszámloltuk a STING-CD45, STING-CD68 és STING-CD3 kettős pozitív sejtek számát a stromában, illetve a tumorkompartimentben. A kolokalizáció számszerűsítéséhez csak a CD45 stroma oázist vagy oázis tumorokat vettük figyelembe (4.1. ábra). A sejtszámlálást az ImageJ szoftvercsomag "cell counter" pluginjával végeztük IF-festett tárgylemezeken, ahol másodlagos antitesteket és Alexa A488 (STING esetében) és Alexa A546 (immunsejt-markerek esetében) fluorokrómokot használtunk. A kolokalizációt a kettős expressziós színjel (sárga) megjelenésekor értékeltük.

Határértékek és a TME fenotípusok meghatározása

Különböző TME-fenotípusokat számoltunk ki a stroma és a tumorkompartimentumok sejtsűrűsége (sejt/ mm^2) alapján. A k-means R plugin minden biomarker esetében 3 átlag-középpontú csoportot generált a stroma- és tumorfészek infiltrációs sűrűségére (0-1-2). Ezután egyesítettük a különálló stroma- és tumorpontszámokat, hogy minden egyes betegminta esetében meghatározzuk az általános "infiltrációs fenotípust". A különböző TME-fenotípusokra vonatkozó határértékeket, pontszámokat és osztályozási kritériumokat az 1. táblázat mutatja.

Statisztikai módszerek

A normalitást a Kolmogorov-Smirnov-tesztel értékeltük. A tumor-core A és B biomarkerek expresszióját Wilcoxon párosított mintás teszt segítségével hasonlítottuk össze, és egyik összehasonlításban sem találtunk szignifikáns különbséget; ezért a további statisztikai elemzésekhez az A és B tumor core átlagos értékeit használtuk. A statisztikai elemzéseket a PASW Statistics 22.0 csomag (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) segítségével végeztük. Az adatok előfeldolgozását és a klaszterelemzést R csomagokkal végeztük, beleértve a ggplot2-t a PCA ábrázolásához és a pheatmap-ot (R csomag 0.7.7-es verziója) a hőtérképek ábrázolásához. Az adatok előfeldolgozásához nem használtunk skálázási módszert. Az Oncomine adatbázis segítségével a TMEM173 (STING) RNS relatív expressziós értékeit (transzkript per read, TPM) értékeltük SCLC (n = 54) és NSCLC (n = 136) sejtvonalakban. A túlélési elemzés Kaplan-Meier-görbékkel és a túlélési görbék log-rank tesztel történő összehasonlítása révén történt. Cox-proporcionális hazard

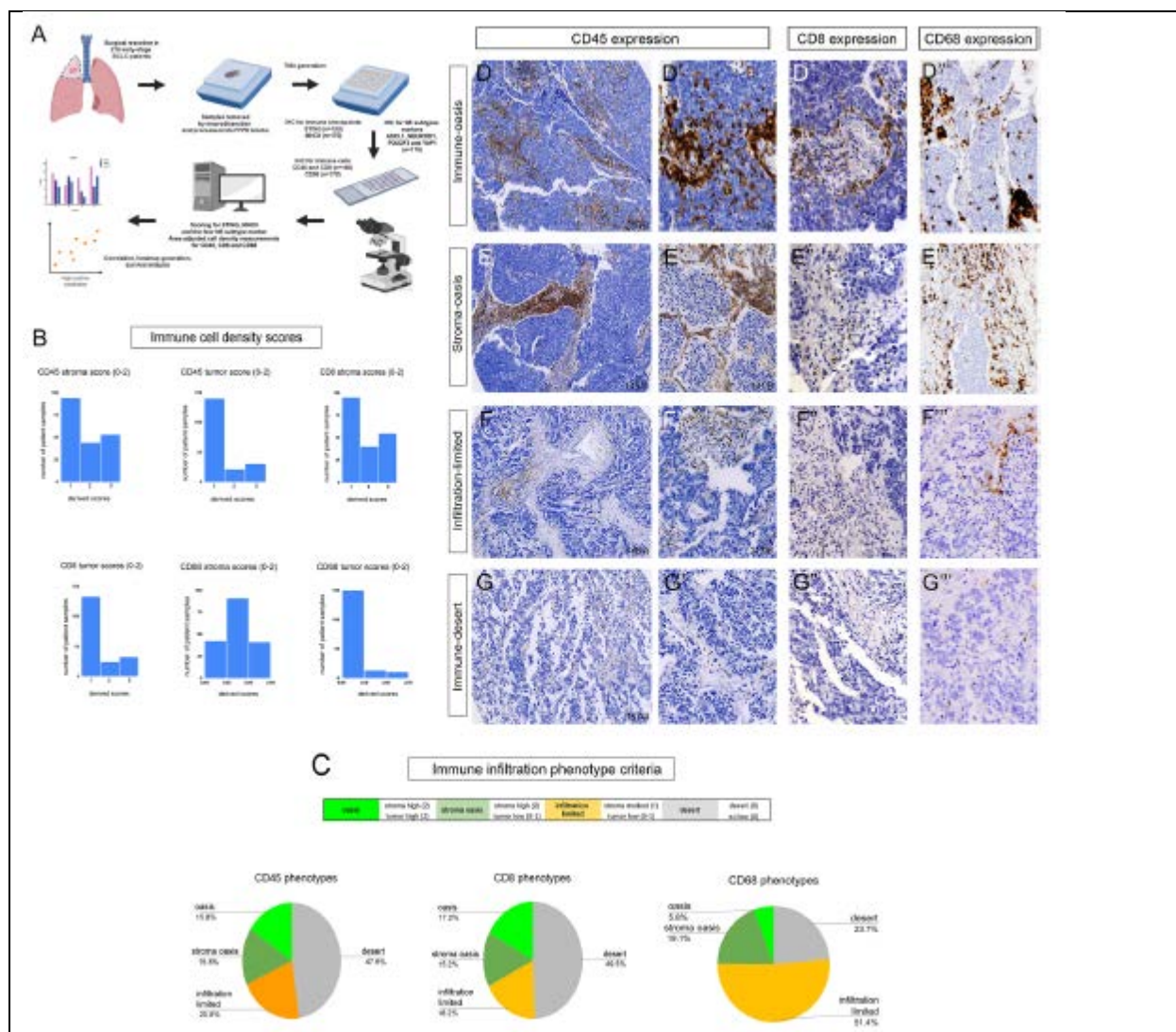
regressziót alkalmaztunk a jelentős prediktív változók szűrésére. Az elemzés kétoldalas volt $\alpha = 0,05$ szignifikancia-szinttel. A többváltozós modellünk illeszkedésének értékelésére Harrel C-indexét ($> 0,7$) számoltuk ki. A túlélési elemzéseket a SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) és a Statistica 13.05 (TIBCO Software Inc.) szoftvercsomagok segítségével végeztük.

4.3. Eredmények

Immunsejtek beszivárgása SCLC mintákban és a TME fenotípus

Vizsgálatunkban összesen 219 SCLC-vel diagnosztizált beteget azonosítottunk, akiknél sebészi reszekciót végeztünk. A vizsgálat munkafolyamatát az 4.1.A. ábra mutatja. A CD45 és CD8 IHC-festés $n = 190$ esetben, a CD68 $n = 173$ esetben, a STING $n = 193$ esetben és az MHCII $n = 178$ esetben állt rendelkezésre. A releváns klinikopatológiai adatok, beleértve a stádiumot, az OS-t és az adjuváns kemoterápiát, $n = 129$ beteg esetében álltak rendelkezésre.

Az 4.1B. ábra a kiterjedt (2), mérsékelt (1) vagy minimális (0) CD45+ , CD8+ vagy CD68+ CD45+ sejtes infiltrációt mutató tumorok relatív eloszlását szemlélteti a stromában és a tumor kompartmentekben. Az 4.1.C. ábra a négy fő infiltrációs fenotípus relatív eloszlását mutatja, amelyek a stroma és a tumorsejt-sűrűség pontszámokból származnak, a korábban leírtak szerint. A reprezentatív szövetminták CD45, CD8 és CD68 immunjelölést mutatnak a TMA mintákon. A morfológiai jellemzők és a területhez igazított sejtszámlálás alapján 4 TME fenotípust állapítottunk meg a CD45 + immunsejt-, CD8 + T-sejt- és CD68 + makrofág infiltráció tekintetében. Az immunoózis tumorokat úgy definiáltuk, mint erősen infiltrált tumorokat mind a stromában, mind a tumorfészekben CD45 (4.1.D., D.' ábra), CD8 (4.1.D." ábra) és CD68 (4.1.D.'" ábra) immunjelöléssel. A stroma oázis tumorok kiterjedt stroma immunsejtes infiltrációval rendelkeznek, a tumorfészekbe viszonylag kevés CD45 + (4.1.E., E.' ábra), CD8+ (4.1.E." ábra) vagy CD68+ (4.1.E.'" ábra) sejt jut be. Ezzel szemben az immunsejtek ritkán és kizárólag a stroma kompartmentben fordulnak elő az infiltrációval korlátozott tumorokban, gyakorlatilag a fent említett sejttípusok intratumorális jelenléte nélkül (4.1.F.-F.'" ábra). Az immunsivataggal jellemezhető tumorok teljesen negatívak a CD45, CD8 vagy CD68 tekintetében, vagy minimálisan expresszálódnak (4.1.G.-G.'" ábra).

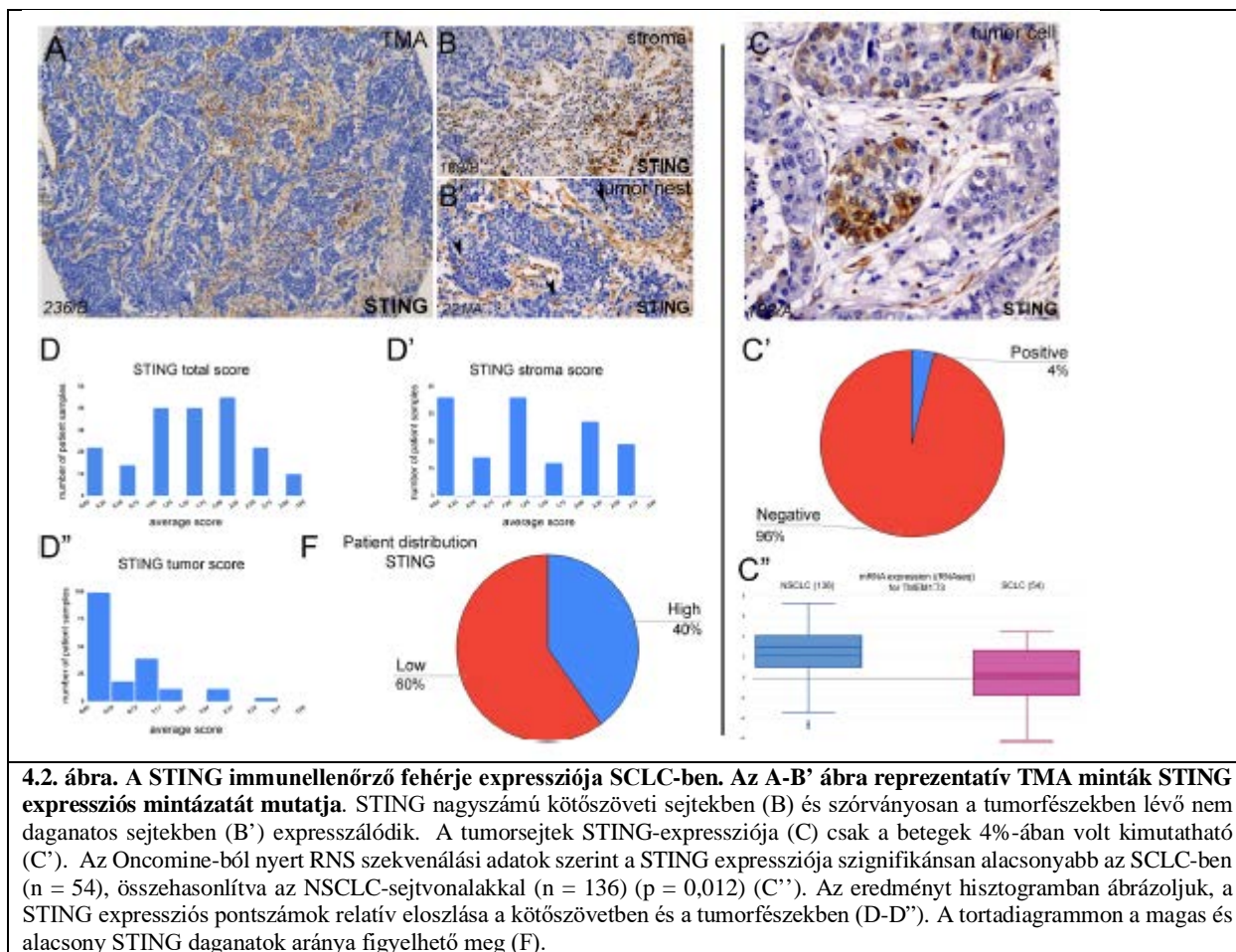


4.1. ábra. Az immuninfiltráció fenotípusai a CD45 + immunsejt-, CD8 + citotoxikus T-sejt- és CD68 + makrofág sejtsűrűség függvényében. A panel a vizsgálat munkafolyamatát mutatja. A. Összesen 219 betegnél végeztek sebészi reszekciót, ebből immunhisztokémiai festés a CD45 és CD8 esetében 190, CD68-nál 173, STING-nél 193, míg az MHCII tekintetében 178 esetszám állt rendelkezésre. Minden betegnek területre viszonyított sejtszámlálással, két TMA (tissue microarray) core-t értékeltünk. A “módszerek” fejezetnél leírtak szerint a pontszámokat a sejtsűrűség (sejt/mm²) értékekből számoltuk, külön a strómában és a tumorfészkekben. A panelben azon tumork relatív eloszlása látható, amelyek kiterjedt (2), mérsékelt (1) vagy minimális (0) CD45 +, CD8 + vagy CD68 + sejtinfiltrációt mutatnak a kötőszövetben, valamint a tumor kompartmentekben. A különböző területek morfológiai jellemzői és infiltrációs pontszámai alapján 4 TME-fenotípust állapítottunk meg az immunsejt-populációk jellemzésére (C). A reprezentatív szövetszövetminták CD45, CD8 és CD68 pozitív immunjelölést mutatnak a TMA mintákon (D-G’). Az immun oázis daganatok erősen infiltrált daganatoknak tekintettük mind a kötőszövet, mind a tumorfészkek CD45 (D-D’), CD8 (D’), és CD68 (D’’) immunjelölései alapján. A stroma oázis daganatoknál jelentős stromális immunsejt infiltráció figyelhető meg, ugyanakkor a CD45 + (E-E’), CD8 + (E’), vagy CD68 + (E’’) sejtek száma a tumor fészkekben viszonylag alacsony volt. Ezzel szemben az immunsejtek ritkán fordultak elő (és kizárólag a stromális régióban) a korlátozottan infiltrált daganatok esetében (F-F’’). Az immun sivatag daganatok teljesen negatívak, vagy csak minimálisan expresszálnak CD45-t, CD8-t vagy CD68-t (G-G’’).

A STING és az MHCII fehérjék expressziója az immun TME kontextusában

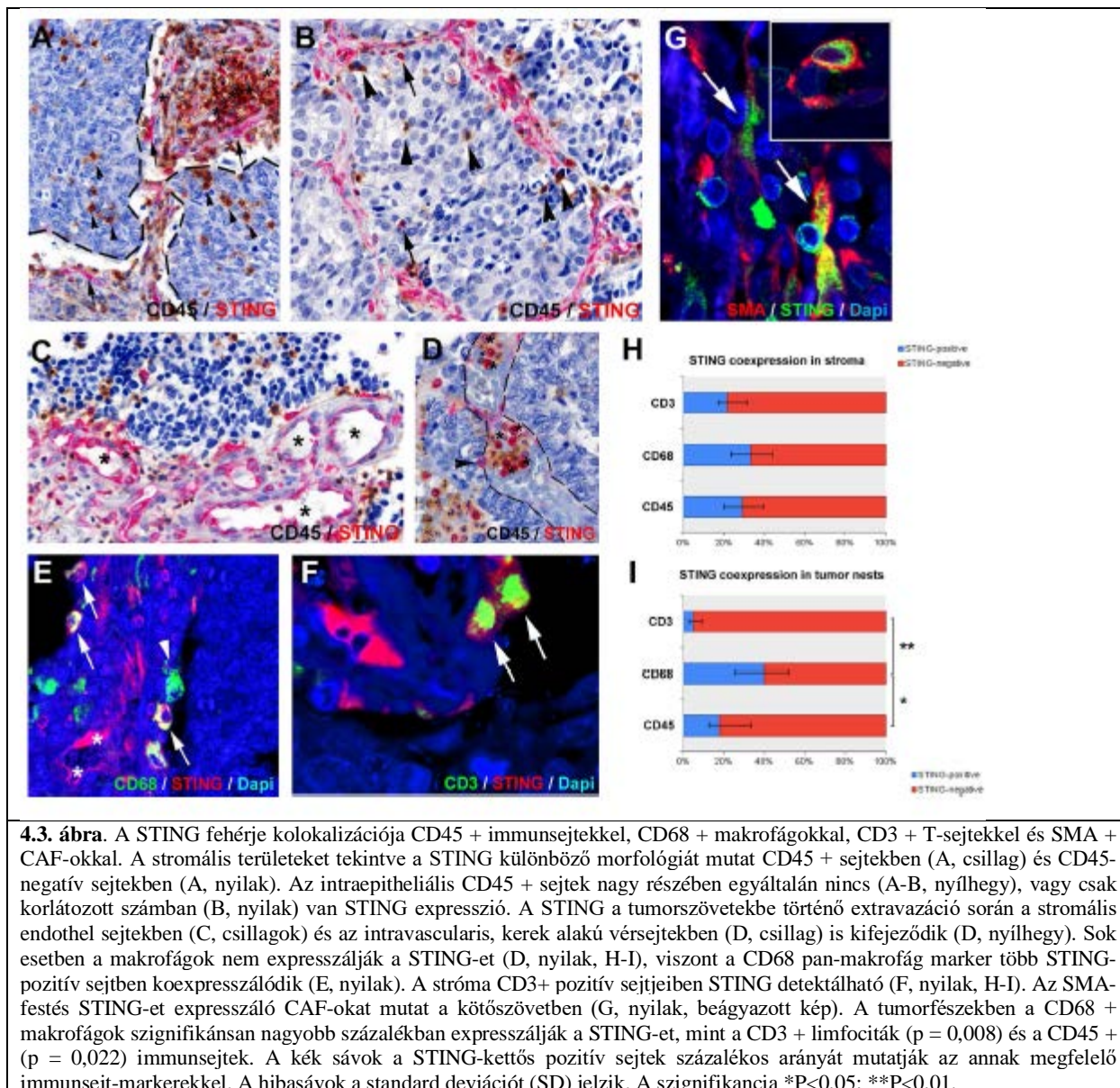
Az immunellenőrzőpont fehérje, a STING számos sejtben kifejeződött az SCLC-ben. A 4.2. ábra a STING expressziós mintázatát mutatja reprezentatív szövetszövetmintákon (4.2.A.-B.' ábra). Az IHC-festések azt mutatták, hogy a STING fehérje expressziója főként a stromasejtekben van jelen (4.2.A. és B. ábra), de

előfordul a tumorfészkekben elszórtan elhelyezkedő, nem malignus, elágazó vagy kerek morfológiájú sejtekben is, amelyeket a kolokalizációs vizsgálatok során CD68+ makrofágokként és CD3+ T-limfocitaként azonosítottak (4.2.B.' ábra nyílhegyek, 4.3. ábra). A daganatsejtek csak a betegek 4%-ában expresszálták a STING-et, többnyire elszórtan, klaszterekben (4.2.C.-C.' ábra). Ezt támasztják alá az Oncomine adatbázisból származó RNAseq adatok, ahol a STING expressziója szignifikánsan alacsonyabb az SCLC (n = 54), mint az NSCLC sejtvonalakban (n = 136) (0,043 vs 2,41 TPM, p = 0,012) (4.2.C." ábra). Hisztogramok mutatják a pontozás eredményét és a STING-expressziós pontszámok relatív eloszlását (4.2.E.-E." ábra), és egy kördiagram mutatja a magas vs. alacsony STING-értékű tumorok arányát a teljes kohorszban (4.2.F. ábra).



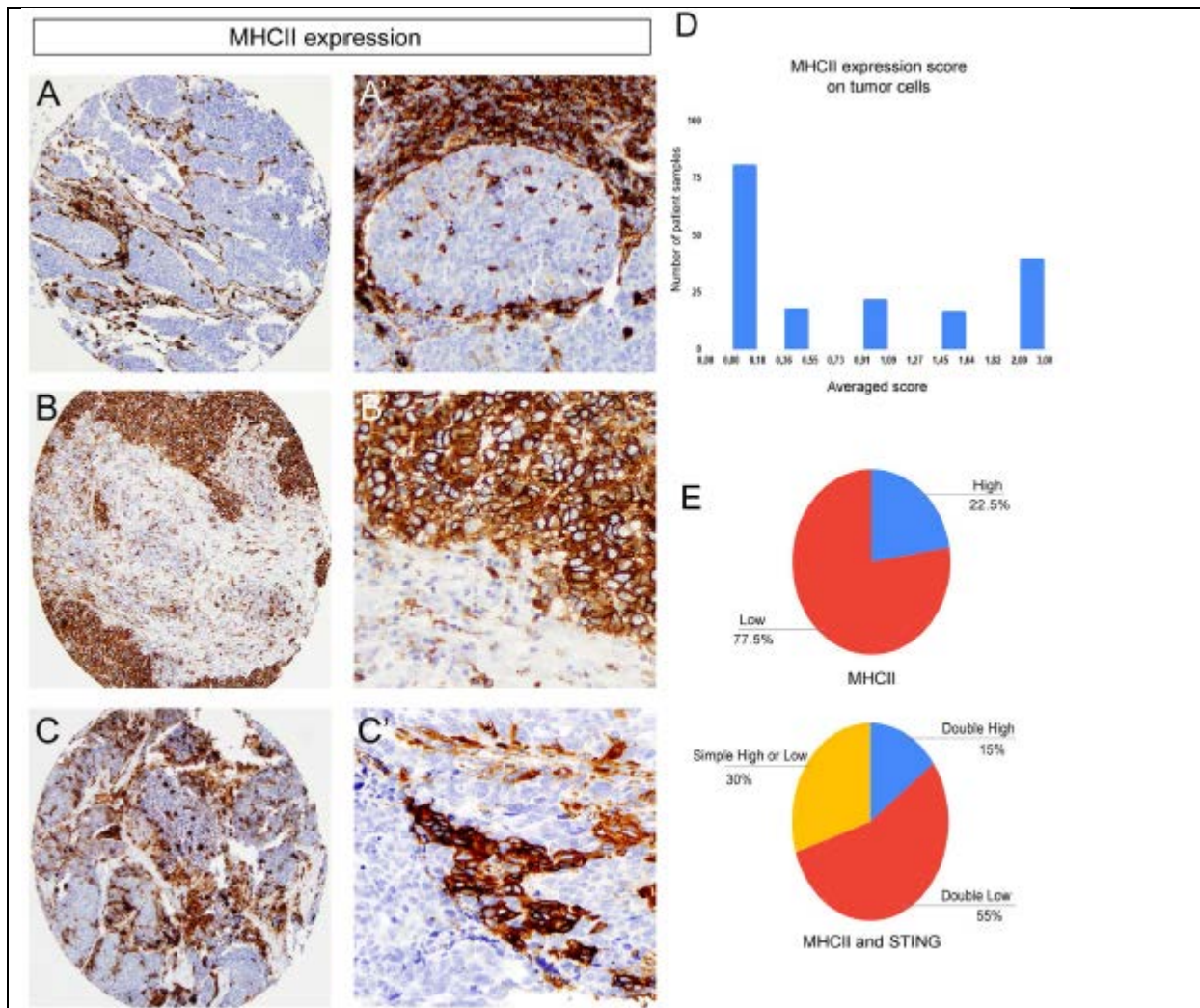
A STING-et expresszáló immunsejt-populációk azonosítása érdekében kettős IHC-festést végeztünk a CD45-re (leukociták) és kettős immunfluoreszcenciát (IF) a CD3-ra (T-sejtek) és a CD68-ra (tumorasszociált makrofágok, TAM-ok). A koexpresszió kvantitatív meghatározását immun-oázissal vagy stroma-oázissal jellemezhető tumorokban végeztük. A kolokalizációs vizsgálatok azt mutatták, hogy több stroma CD45+ sejt expresszálja a STING fehérjét (4.3.A. ábra, csillag), de az immunsejtek 71%-a még STING-negatív (4.3.H. ábra). Ehelyett a STING számos CD45-negatív elongált stromasejtben (4.3.A. ábra, nyilak) és az endotélsejtekben (4.3.C. ábra) expresszálódott. Érdekes módon a STING-expresszió a tumorhoz kapcsolódó erek lumenében extravazáló CD45+ immunsejtekben is előfordult (4.3.D. ábra csillagok és nyílhegy). A tumorfészkekben a CD45 + immunsejtek 81%-a STING-negatív volt (3.A-B. ábra, nyílhegyek és I.), csak néhány sejt koexpresszálta a STING fehérjét (4.3.B. ábra, nyilak és I.). A STING-et expresszáló immunsejtek immunfenotípusának pontosítása érdekében kettős immunfluoreszcenciát

végeztünk a pánmakrofág CD68 marker és a T-sejtek CD3 markerére (4.3.E.-F. ábra). A stroma kompartmentben a CD68+ sejtek 33%-a koexpresszálta a STING fehérjét (4.3.E. ábra, nyilak és H.), míg a tumorfészekben a TAM-ok 40%-a STING-pozitív volt (4.3.I. ábra). A nyílhegy a 4.3E. ábrán STING-negatív CD68 + TAM-ot, a csillagok pedig STING + CD68- sejteket mutatnak, amelyek elágazó, elnyújtott morfológiájúak. A CD3-STING kettős IF azt mutatja, hogy több T-sejt expresszál STING fehérjét (22%) a stromában (4.3.F. ábra, nyilak és H.). Ezzel szemben a CD3-immunpozitív T-sejteknek csak 5%-a volt pozitív STING-re a tumorfészekben (4.3.I. ábra). A STING fehérjét a CD68+ TAM-ok szignifikánsan nagyobb százalékban fejezték ki, mint a CD3+ T-sejtek ($p = 0,008$) a tumorfészekben. A STING-re pozitív, de CD68-ra és CD3-ra negatív megnyúlt sejtek SMA-t expresszáltak, ami a tumorhoz társult fibroblasztok (CAF-ok) általános markere (4.3.G. ábra).



IHC-elemzéseink szerint az MHCII molekula is kifejeződött a tumoros sejtekben. Bizonyos tumorok MHCII-expressziót mutattak a stromában és a tumorfészekbe belépő immunsejtek felszínén, de a tumoros sejtek nem mutattak MHCII-pozitivitást (4.4.A.-A.' ábra). Egyes tumorok azonban diffúz MHCII-

expressziót mutattak a tumorsejtjeikben (4.4.B.-B.' ábra). Közbülső fenotípusként létezik az MHCII mozaikos expressziója is, ahol a tumorsejteknek csak a klaszterei kedvezőek a molekula szempontjából (4.4.C.-C.' ábra). Az MHCII expressziós pontszámok eloszlását a 4.4.D. ábra mutatja. A kördiagramok a magas és az alacsony MHCII expressziójú daganatok, valamint a dupla magas és a dupla alacsony MHCII/STING expressziójú daganatok arányát mutatják (4.4.E. ábra) a teljes kohorszban.



4.4. ábra. Az MHCII expressziója SCLC-ben. Az MHCII expressziója bizonyos tumorok stromájában és a tumorfészekben, a daganat mikro környezetében (Tumor microenvironment, TME) előfordul, de a daganatos sejtek jellemzően nem expresszálják (score = 0, A-A'). Egyes tumorok sejtjeiben diffúz MHCII-expressziót mutatnak (score = 3, B-B'), és bizonyos esetekben a tumorsejtek különálló csoportjai expresszálják ezen molekulát (score = 1-2, C-C'). MHCII-re vonatkozó átlagos expressziós pontszámokat hisztogram (Allred) mutatja (D). A kördiagramok a betegeknél mért MHCII-magas és -alacsony, valamint a MHCII-STING-magas és -alacsony arányát mutatják a teljes kohorszban (E).

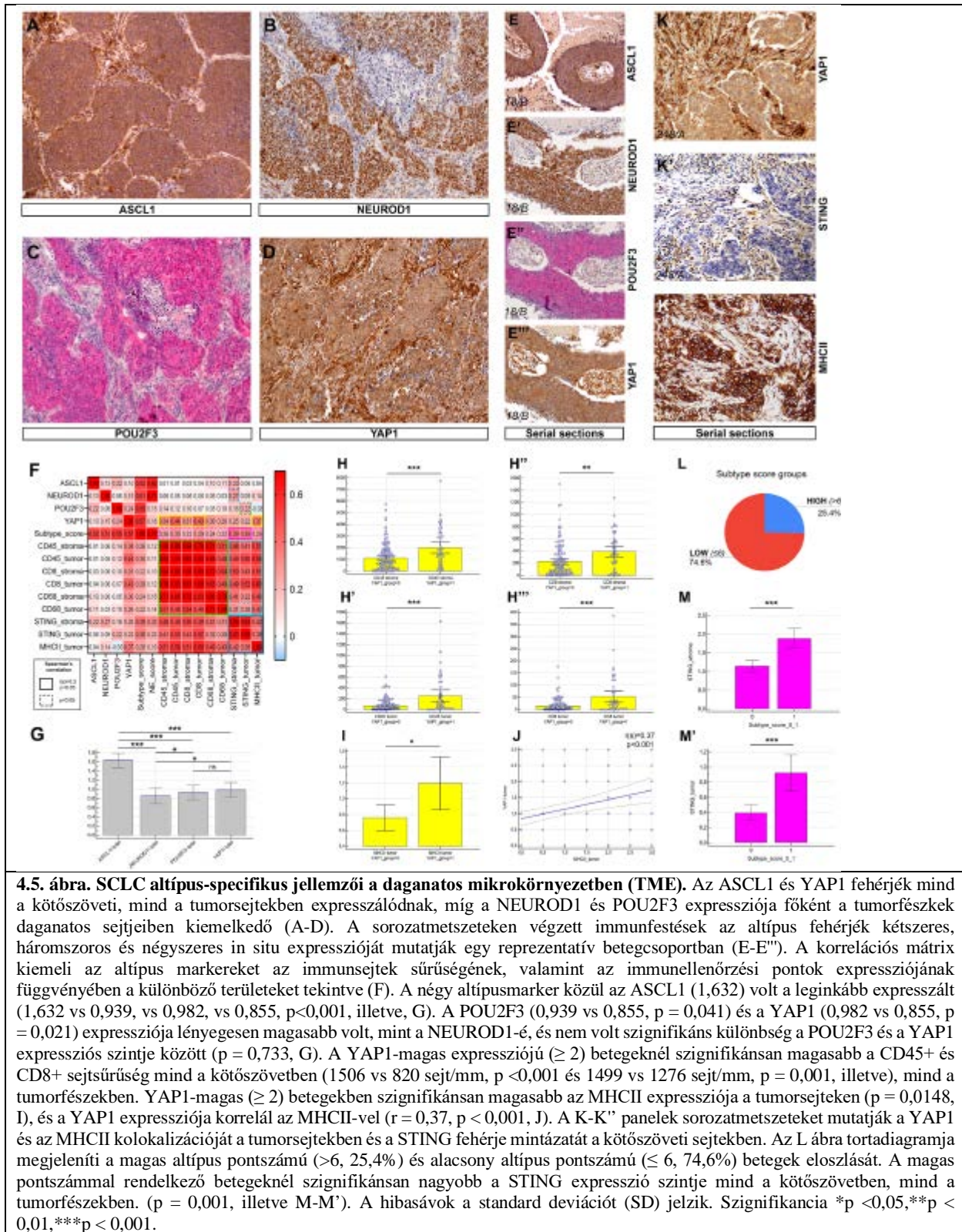
SCLC altípusok és korrelációjuk a TME-vel

Az ASCL1, POU2F3, YAP1 és NEUROD1 IHC-festése n = 179 beteg esetében állt rendelkezésre. Először a négy kulcsfontosságú altípust meghatározó fehérje expressziós mintázatát elemeztük IHC-vel, és a mintákat a tumorsejteken való festődés intenzitása szerint pontoztuk. Azt találtuk, hogy az ASCL1 és a YAP1 fehérjék expressziót mutatnak mind a stroma-, mind a tumorsejtjeiben, míg a NEUROD1 és a POU2F3 expressziója a tumorfészek tumorsejtjeiben dominál (4.5.A.-D. ábra). Az egymást követő metszeteken végzett immunfestések egy reprezentatív betegmintában az altípust meghatározó fehérjék

kétszeres-háromszoros és négyszeres in situ expresszióját mutatták ki (4.5.E.-E." ábra, a minták azonosítója dőlt betűvel szedve). A korrelációs mátrix összefoglalja az altípusjelzők és az immunsejtek sűrűségének, valamint az immunellenőrzőpontok expressziójának összefüggéseit a különböző tumorkompartmentekben (4.5.F. ábra). A CD45 + és CD8 + immunsejtsűrűségek erősen korreláltak ($r = 0,65-0,94$) minden összehasonlításban, a CD68 + TAM-sűrűség csak mérsékelten korrelált a CD45 + és CD8 + sejtsűrűségekkel a tumorfészekben ($r = 0,48-0,49$). Az immunsejt-markerek mérsékelt pozitív korrelációt mutattak mind a STING-, mind az MHCII-expresszióval ($r = 0,41-0,6$), hasonlóan a két immunellenőrzőpont expressziójához egymással ($r = 0,38-0,42$) (4.5.F. ábra).

Az összes altípus marker közül az ASCL1 mutatta a legerősebb expressziót, és expressziós szintje szignifikánsan magasabb volt, mint az összes többi marker esetében (4.5.G. ábra). Az ASCL1, a NEUROD1 és a POU2F3 fehérje expressziója nem mutatott szignifikáns korrelációt egyik immunsejt-markerrel sem, és csak elhanyagolható mértékű korrelációt mutatott az immunellenőrző pontok expressziójával (4.5.F. ábra). A YAP1 azonban szignifikáns, mérsékelt korrelációt mutatott a CD45+ és CD8+ sejtsűrűségekkel, amelyek a tumorfészekben kifejezettebbek voltak ($r = 0,43-0,44$), de csak gyenge korrelációt mutatott a CD68-cal ($r = 0,26-0,30$) (4.5.F. ábra). Ez utóbbit támasztja alá az a tény, hogy a YAP1-magas betegek mind a stromában, mind a tumorfészekben szignifikánsan megnövekedett CD45 + és CD8 + sejtsűrűséget mutattak (4.5.H.-H." ábra). A YAP1-magas betegek szignifikánsan fokozott MHCII-expressziót mutattak a tumorsejteken ($p = 0,148$, 4.5.I. ábra), és a YAP1-expresszió szignifikánsan korrelált az MHCII-vel ($r = 0,37$, $p < 0,001$, 4.5.J. ábra). Az 4.5.K-K" ábra a YAP1 és az MHCII kolokalizációját mutatja a tumorsejteken és a STING fehérje kolokalizációját a stromasejteken ugyanazon betegminta egymást követő metszetein.

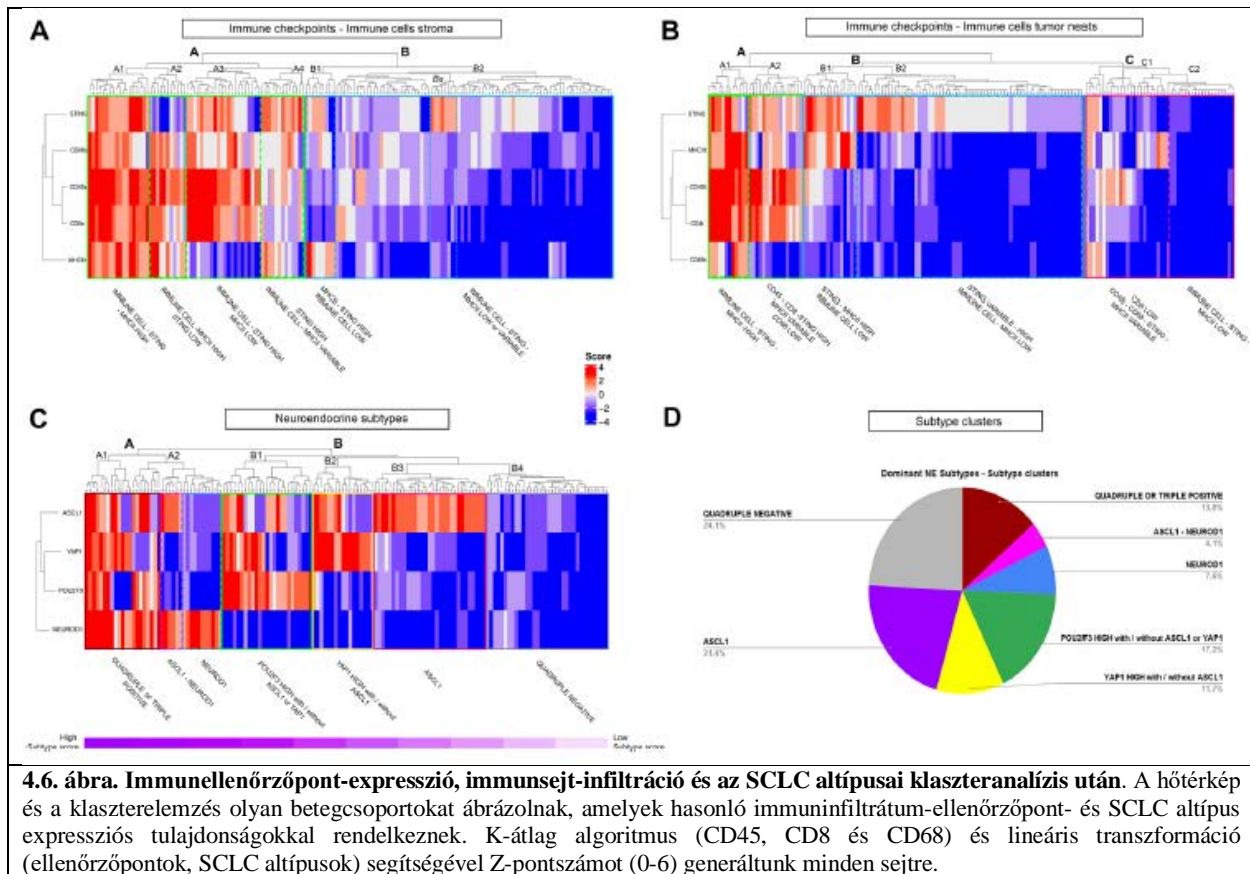
Bevezettünk egy „altípus-pontszámot” is, ahol az egyes altípusfehérjék pontszámait betegenként összegeztük. Ez azért lehet hasznos, mert az altípus-specifikus markerek expressziója között jelentős számú betegnél szembetűnő átfedés van (4.5.L. ábra). Az altípus pontszám szignifikáns mérsékelt korrelációt mutatott a STING stromális és tumorfészek-expressziójával ($r = 0,36-0,39$), és gyenge szignifikáns korrelációt a tumorsejteken lévő MHCII expressziójával ($r = 0,26$) (4.5.F. ábra). A „altípus-magas” betegek szignifikánsan magasabb STING-expressziót mutattak (az „altípus-alacsony” betegekhez képest) mind a stromában, mind a tumorfészekben ($p < 0,001$, 55.M-M' ábra).



Klaszteranalízis az immunsejtek infiltrációja, az SCLC altípusai és a checkpoint expresszió alapján

Hőtérképeket készítettünk, hogy klaszterelemzést végezzünk, és megvizsgáljuk a betegcsoportokat az immunsejt-infiltráció mértéke (a stromában, illetve a tumorfészekben), az immunellenőrzőpontok expressziója és az SCLC altípusok profilja szerint. A stroma infiltráció tekintetében (4.6.A. ábra) a betegek két fő klaszterbe voltak sorolhatók: magas (A klaszter) és alacsony (B klaszter) immunsejt-infiltrációval és a kapcsolódó ellenőrzőpont-expresszióval. Érdekes módon az A2 alklaszter magas MHCII-expressziót, de alacsony STING-expressziót mutatott, míg az A3 alklaszterre ennek ellenkezője volt jellemző. Néhány betegnél alacsony vagy minimális immunsejt-infiltráció volt megfigyelhető fokozott STING (Bs alklaszter) vagy fokozott STING- és MHCII-expresszióval (B1 alklaszter). E klaszter létezése a STING nem-immunsejteken (CAF-ok) történő stromális expresszióját hangsúlyozza. A B2 alklaszter az immun- és ellenőrzőpont-sivataggal jellemezhető tumorokat képviseli. A tumorfészekben (4.6.B. ábra) az A klaszterbe tartoznak a fokozott (A1 alklaszter) és a hiányzó (A2 alklaszter) CD68 + TAM infiltrációval, CD45- CD8- és ellenőrzőpont expressziós pontszámmal rendelkező tumorok. Ellenőrzőpont-magas és immuninfiltrátum-alacsony klaszter is előfordult (B1 és B2 alklaszter). A C1 alklaszter az intratumorális CD8 + T-sejtes infiltrációval nem rendelkező, de más immuninfiltráció és ellenőrzőpont-expresszió esetén változó szintet mutató tumorokat képviseli, míg a C2 alklaszter a teljes immun- és ellenőrzőpont-sivataggal jellemezhető tumorokat.

Az SCLC altípus markereit tekintve 6 fő betegcsoportot észleltünk (5.6C. ábra). Az A1 klaszterbe olyan tumorok tartoznak, amelyekben egyidejűleg több altípus-marker, köztük az ASCL1 és a NEUROD1, valamint változó mértékben a POU2F3 és a YAP1 is kifejeződik. Ez az úgynevezett „altípus-magas” pontszámú betegcsoport. Az A2 klaszter az ASCL1/NEUROD1 kettős pozitív tumorokat vagy csak a NEUROD1-et expresszáló tumorokat képviseli. A B1 klaszterben a POU2F3 expresszió dominál, de bizonyos számú tumorban egyidejűleg ASCL1 és/vagy YAP1 expresszió is előfordul. A B2 klaszterben a YAP1 dominál, és néhány tumorban az ASCL1 is expresszálódik. A B3 klaszter kizárólag ASCL1-pozitív, míg a B4 klaszter négyszeresen negatív tumorokat tartalmaz, amelyek egyik altípus-marker kifejeződését sem mutatják. A 4.6.D. ábra a különböző altípus-klaszterek arányát mutatja a domináns altípus alapján.



Klinikopatológiai jellemzők és az OS prognosztikai tényezői

Túlélési elemzést végeztünk az immunsejt-infiltráció és az STING és MHCII immunellenőrző-pontok prognosztikus szerepének értékelésére. Az OS-adatok $n = 129$ beteg esetében álltak rendelkezésre, $n = 96$ korai stádiumú (I-II) és $n = 33$ III. stádiumú betegséggel rendelkező beteg esetében. Összesen $n = 51$ beteg kapott adjuváns kemoterápiát (CT). A korai stádiumú (I-II) betegségben szenvedő betegek OS-je javult (vs. III. stádiumú, $p < 0,001$, 4.7.A. ábra), míg az adjuváns CT nem volt szignifikáns hatással a túlélésre ($p = 0,062$, S.2.A. Kiegészítő ábra).

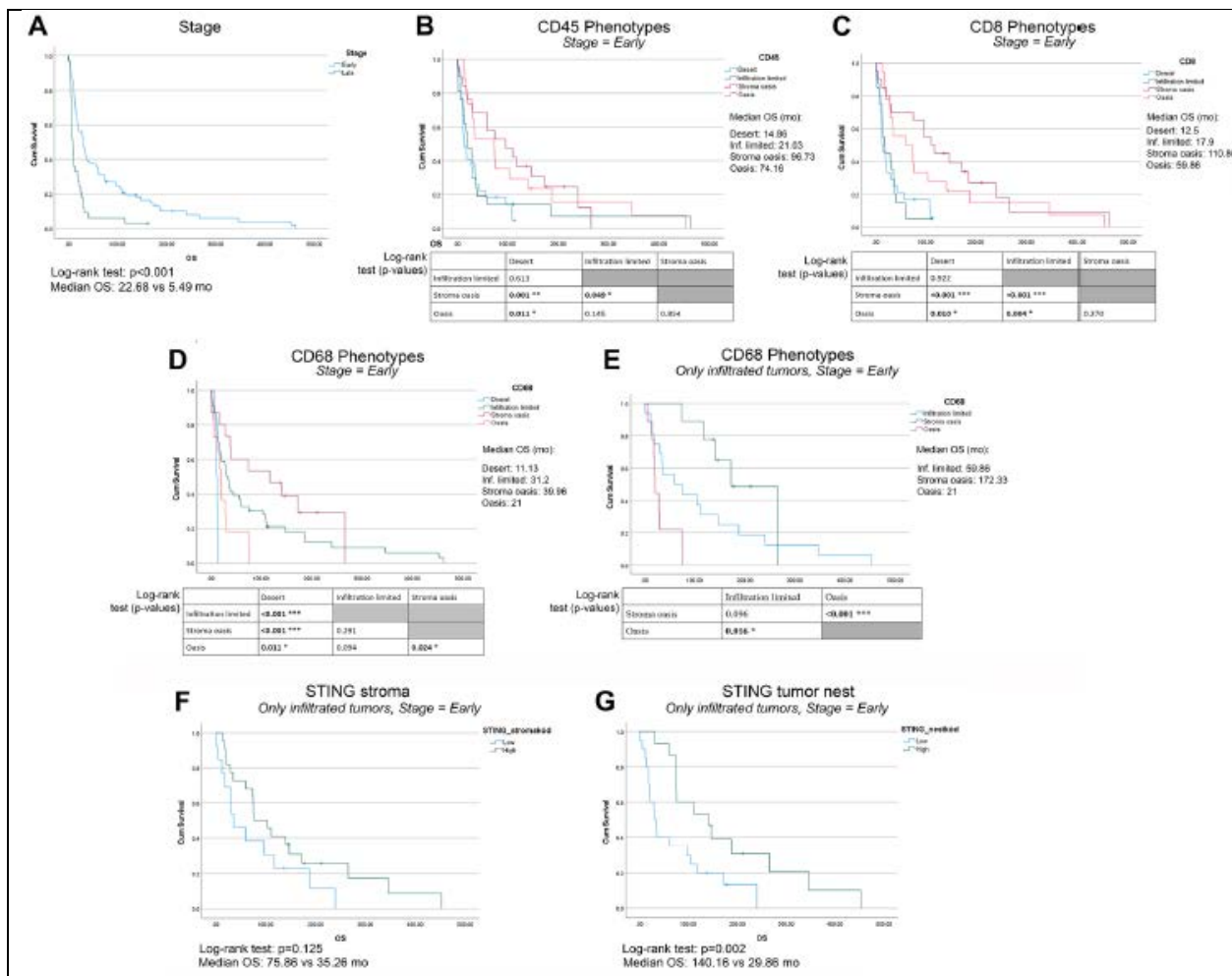
A 4.7.B.-E. ábra az oázis, a stroma-oázis, a korlátozott infiltrációt mutató és a sivataggal jellemezhető tumorok eltérő KM-görbéit mutatja a CD45 + immunsejt, a CD8 + T-sejt infiltráció és a CD68 + TAM infiltráció szerint. Mivel a korai stádiumú (I-II.) és a III. stádiumú betegek OS-értéke között jelentős különbség volt, a korai stádiumú betegekre szelektált KM-elemzéseket végeztünk. A CD45 és CD8 infiltrációs fenotípusok tekintetében nem volt szignifikáns különbség a túlélésben a „sivataggal” és a korlátozott infiltrációval bíró tumorok között (CD45: $p = 0,613$; CD8: $p = 0,922$), illetve a stroma-oázis és oázis tumorok között (CD45: $p = 0,854$; CD8: $p = 0,27$) (4.7.B.-C. ábra). A CD45 vagy CD8 stroma-oázis tumorral rendelkező betegeknél azonban szignifikánsan nagyobb OS-t mutattak a CD45 és CD8 sivatag ($p = 0,001$, illetve $p < 0,001$) vagy a CD45 és CD8 korlátozott infiltrációt mutató tumorokhoz képest ($p = 0,049$, $p < 0,001$). A CD8 oázis tumorok szignifikánsan jobb OS-t mutattak, mint a „sivataggal” vagy korlátozott infiltrációval bíró társaik ($p = 0,01$, illetve $p = 0,004$) (4.7.B.-C. ábra). Megjegyzendő, hogy a CD45 esetében a szerényebb különbség (az OS nem szignifikánsan jobb a CD45 oázis tumorok vs. infiltrációval korlátozott tumorok esetében ($p = 0,145$)) arra utal, hogy a CD8 infiltráció megbízhatóbb prognosztikai tényező. A CD45 stroma-oázis és oázis tumorok vs. korlátozott infiltrációval és „sivataggal” bíró fenotípusok összevonásakor a stroma-oázis vagy oázis tumoros betegek szignifikánsan jobb OS-t

mutattak (medián OS: 59,9 vs. 13,3 hónap; $p = 0,0019$). Ugyanebben az összehasonlításban a CD8 stroma-oázis és oázis tumorral rendelkező betegek hasonlóan megnövekedett túlélést mutattak a korlátozott infiltrációval és sivataggal rendelkező tumorokkal szemben (medián OS: 74,4 vs. 12,5 hónap; $p = 0,0001$).

A CD68 tekintetében a „sivataggal” és oázissal bíró daganatokban szenvedő betegeknél volt a legrosszabb az OS, míg a stroma-oázis daganatoknál a legjobb (4.7.D. ábra). Hogy vizsgáljuk a CD68+ TAM infiltráció jelentőségét, KM analízist végeztünk a kiválasztott stroma oázis vagy oázis-infiltrált fenotípusú betegeknél. Érdekes módon mind a CD68 stroma oázis, mind a korlátozott infiltrációt mutató tumorok szignifikánsan nagyobb OS-t mutattak a CD68 oázis tumorokhoz képest ($p < 0,001$, illetve $p = 0,016$) (4.7.E. ábra). Így a TAM-infiltráció a tumorfészekben kedvezőtlen hatást jelenthet az OS-re.

Az immunellenőrzőpontok expressziója és az immunsejt-infiltráció közötti szignifikáns korreláció miatt a STING fehérje prognosztikus szerepét vizsgáltuk az infiltrált tumorokban. Míg a STING stromális expressziója nem mutatott szignifikáns hatást az OS-re (4.7.F. ábra), a tumorfészekben lévő STING expressziója szignifikánsan jobb OS-hez járult hozzá ($p = 0,002$), még az immuninfiltrált tumorok között is (4.7.G. ábra). A tumorsejtek MHCII-expressziójára vonatkozó KM-elemzés nem mutatott szignifikáns különbséget az OS-ben sem az infiltrált tumorok között, sem a teljes kohorszban ($p = 0,14$, illetve $p = 0,862$).

Ezután többváltozós elemzést (MVA) végeztünk Cox-modell segítségével, hogy értékeljük a STING expressziójának prognosztikai értékét a stroma/tumorfészekben és az MHCII expresszióját a tumorsejteken. A stroma oázis/oázis és a korlátozott infiltrációjú/sivatag fenotípusokat külön értékeltük az MVA-hoz. Chi-négyzet tesztet végeztünk, hogy kizárjuk bármely paraméter torzulását az MVA csoport ($n = 129$) és a teljes IHC-festett kohorsz ($n = 193$) között, ahol egyik paraméter sem mutatott szignifikáns különbséget. A korlátozott CD45- és CD8-infiltrációt mutató és a sivatag jellegű tumoroknál nem volt szignifikáns különbség egyik paraméter tekintetében sem, az immunellenőrzőpontok, a stádium vagy az adjuváns CT sem rendelkezett prediktív prognosztikus túlélési értékkel, de a CD45-infiltrált tumoroknál a stádium az OS szignifikáns prognosztikus tényezőjének bizonyult ($p = 0,0266$, [HR]: 0,1444), és a CD8-immun-oázissal és stróma-oázissal rendelkező tumoroknál a III. stádiumú betegeknél tendencia volt a csökkent OS ($p = 0,0579$, [HR]: 0,1964). Érdekes módon, a CD8 stroma oázis és oázis tumorok tekintetében a STING expressziója a tumorfészekben szignifikáns pozitív prognosztikai értékkel bírt ($p = 0,0429$, [HR]: 0,4571). Sem az MHCII expresszió a tumorsejteken ($p = 0,5367$), sem a STING expresszió a stromában ($p = 0,6594$) nem mutatott prognosztikai értéket a túlélés tekintetében. Összességében a CD45+ immunsejt- és CD8+ citotoxikus T-sejt-infiltráció magas szintje szignifikánsan jobb túlélést biztosít az I-II. stádiumú SCLC-s betegek számára. Továbbá a többváltozós elemzés kimutatta, hogy a stroma oázis és az oázis tumorokban a tumorfészek STING fokozott expressziója pozitív prognosztikai értékkel bírt az OS tekintetében.



4.7. ábra. Az immunsejt-infiltráció és a STING-expresszió prognosztikai szerepe korai stádiumú SCLC-ben. Korai stádiumú (I-II) betegek jobb teljes túlélést (OS) mutattak (szemben a III. stádiumúakkal, $p < 0,001$, A). A korai stádiumban lévő betegeknél a Kaplan Meier-görbék az OS-t mutatják, mind az oázis, stroma-oázis, infiltráció-limitált és sivatag infiltrációs-fenotípusok esetében a CD45+ immunsejt és CD8 + T-sejtes infiltráció szerint (B és C), ahol az oázis és a stroma-oázis tumorok szignifikánsan nagyobb átlagos túlélést (OS) mutattak a sivatag és az infiltráció-limitált tumorokhoz képest a teljes összehasonlításban. Kivételt képez a CD45 oázis vs. CD45 infiltráció-limitált tumorok esete ($p = 0,145$, B). Egyik összehasonlításban sem volt szignifikáns különbség az átlagos túlélésben a sivatag és az infiltráció-limitált tumorok között. A CD68 tekintetében a stroma-oázis és oázis tumorok szignifikánsan nagyobb túlélést mutattak, mint a sivatag fenotípusú tumorok ($p < 0,001$, $p = 0,011$, illetve $p = 0,011$), azonban az infiltráció-limitált tumorokhoz képest szignifikáns különbség nem volt kimutatható ($p = 0,094$, illetve $p = 0,291$) (D). Csak az infiltrált tumorral rendelkező betegeket nézve (CD45 stroma-oázis és oázis) a legjobb prognózist a stroma-oázis és az infiltráció-limitált tumorok mutatták (172,3, illetve 59,8 hónap), ezzel szemben az immunoóázis fenotípusú tumoroknál volt a legrosszabb a túlélés (21 hónap) (E). A fentebb részletezett elemzési módszert használva (csak CD45 stroma-oázis és oázis tumorok) a magas tumorfészek STING expresszióval (≥ 2) rendelkező betegek szignifikánsan nagyobb túlélést mutattak (az alacsony STING-értékű (< 2) betegekhez képest, $p = 0,002$, G), míg a STING kötőszöveti expresszióját tekintve nem volt szignifikáns különbség az OS-ben ($p = 0,125$, F).

4.4. Megbeszélés

Az immunstimuláló molekulák, mint célpontok kulcsfontosságúak lehetnek a jövőbeli immunterápiákban, amelyek alapvetően fokozhatják a daganatellenes immunitást, beleértve a T-sejtek érését, proliferációját és fejlődését. Így jelenlegi tanulmányunkban a STING és MHCII immunellenőrzőpontok in situ fehérjeexpresszióját jellemeztük a CD45 +, CD8 + és CD68 + immunsejtes infiltráció és az SCLC altípusok szerint. A legfontosabb eredményünk, hogy az SCLC-tumorok 36%-a magas CD45 + immunsejtes infiltrációt (oázis és stroma oázis) tartalmaz. Ezzel szemben az SCLC-tumorok több mint kétharmada

korlátozott vagy sivatag jellegű immunsejtes infiltrációval rendelkezik. A CD45 + sejtsűrűség erős pozitív korrelációt mutat a CD8 + T-sejt-sűrűséggel mind a stromában, mind a tumorfészekben, míg a CD68 + TAM-sűrűség mérsékelten korrelál a CD8 + T-sejtes infiltrációval. Ez összhangban van korábbi, korlátozott betegcsoportokban végzett vizsgálatainkkal (37, 125)).

SCLC esetében, annak agresszív viselkedése és a tumorszövet korlátozott hozzáférhetősége miatt az immunsejt-infiltráció in situ értékelése csak primer tumorok kisebb kohorszaiban történt ez idáig (143) (37, 144) vagy agyi áttétek esetében (145)), klinikai kimenetelre vonatkozó meggyőző adatok nélkül. Tudomásunk szerint ez az első olyan átfogó, nagy adathalmazon végzett vizsgálat, amely a különböző immunellenőrzőpontokat az immuninfiltráció fenotípusai, molekuláris altípusai és klinikai kimenetele szerint jellemzi SCLC-ben. Eredményeink alapján arról számolunk be, hogy a megnövekedett CD45+ immunsejtsűrűség szignifikánsan fokozott túléléssel jár (medián OS, 59 vs. 13 hónap), és ez az előny még jelentősebb a CD8+ T-sejtek sűrűségét illetően. Emellett nem volt különbség a túlélésben a stroma-immuninfiltrált (stroma oázis) vagy tumorinfiltrált betegek túlélésében, ahol a tumorfészkeket immunsejtek is kolonizálják (oázis). Feltételezésünk szerint a kiváltó ok az időbeli eltérés lehet, vagyis hogy a két fenotípus a tumorfejlődés egymást követő szakaszaiként értelmezhető, ahol a tumorfészkek invázióját mindig megelőzi a szolid stromainfiltráció. Ezt támasztja alá az a tény, hogy minden olyan tumornak, amelyre jellemző a magas intraepiteliális immunsejt-arány, a sztrómája is erősen infiltrált. Ezzel szemben a CD68+ TAM-ok jelenléte a tumorfészekben szignifikánsan kedvezőtlen hatást gyakorolt az OS-re, még az egyébként immuninfiltrált tumorokban is. Ez alátámasztja az intratumorális makrofág-kolonizáció potenciális immunosuppresszív hatását, amelyet korábbi tanulmányunkban (135) kimutattunk, és részben magyarázatot adhat az immunterápia korlátozott sikerére SCLC-ben.

A különböző preklinikai modelleken (9, 13) és humán primer tumorokon (10, 17) végzett legújabb SCLC-profilalkotó vizsgálatok a négy kulcsfontosságú transzkripciós szabályozó (ASCL1, NEUROD1, POU2F3 és YAP1) vagy egy gyulladáso genetikai szignatúra (SCLC-I, (18)) által meghatározott SCLC osztályozási séma finomításához vezettek. A közelmúltban több tanulmány is arról számolt be, hogy a humán tumorok a sejtvonalakhoz képest összetettebb fenotípust mutatnak az SCLC altípusait illetően, valamint minden humán és egértumor több altípusból tevődik össze (146). Ez a funkcionális intratumorális heterogenitás elősegítheti a gazdag mikrokörnyezet kialakulását és a kezelésre adott adaptív választ (147). E vizsgálatunkban kimutattuk, hogy az ASCL1 a leginkább expresszálandó altípus marker SCLC-ben. Meglepő módon azt találtuk, hogy a betegek 13,8%-ánál több altípus marker hármas vagy akár négyszeres pozitivitása is kimutatható, és hogy az ASCL1 expressziója átfedésben lehet a POU2F3 vagy a YAP1 "nem-NE" markerek expressziójával. Ezenkívül az összes bevont beteg 24,1%-a négyszeresen negatívnak minősült, ahol egyik altípus marker fehérjeexpressziója sem volt kimutatható.

A mi átfedő altípusjellemzőinkkel összhangban Borromeo és munkatársai 81 humán primer SCLC-tumorminta esetében számoltak be koexpresszálandó alcsoportokról, amelyeket korábban egysejtes RNS-seq-elemzéssel profiloztak (11). Tanulmányunkban a tumorokat ASCL1 és NEUROD1 kettős magas és kettős alacsony alcsoportokba csoportosították. Adataink további alátámasztására ugyanez a tanulmány azt is kimutatta, hogy az ASCL1-magas tumorok sokkal gyakoribbak, mint a NEUROD1-magas tumorok (13). Vizsgálatunkban az összes altípusmarker közül csak a YAP1 mutatott érdemi korrelációt az immunsejtek infiltrációjával, különösen a CD45+ és CD8+ sejtekkel a tumorfészekben. Ez összhangban van az SCLC biológiájával kapcsolatos jelenlegi ismereteinkkel (13, 18, 40).

Ezt követően a STING immunellenőrző-pont expressziós mintázatát elemeztük. Más csoportok kimutatták, hogy az intratumorális STING aktiválása a cGAMP agonistájával normalizálta a tumor érrendszerét xenotranszplantátumokban és spontán daganatokban, és maximális terápiás hatékonyságot ért el, ha kölcsönösen kifejeződött a stromális hematopoetikus sejtekben is (148). Vizsgálatunkban a fokozott STING-expresszió mindkét kompartmentben magas CD45+ és CD8+ immunsejtsűrűséggel társult. Ezt korábbi beszámolók is megerősítették, ahol az endoteliális STING expresszió prediktív biomarker volt a terápia szempontjából, és korrelált a fokozott T-sejtes infiltrációval és a meghosszabbodott túléléssel

vastagbél- (149) és emlőrák esetén (150). Eredményeink szerint a STING fehérje expressziója az SCLC tumorok 40%-ában fokozott, de az NSCLC-vel ellentétben (Della Corte és mtsai. (151, 152)) a tumorsejtek csak a betegek 4%-ában expresszálják a STING-et, így az immunstimuláló molekula termelése a tumor mikrokörnyezetre marad. Ez gátolhatja a későbbi immunaktivációt kissejtes szövettanban, és csökkent TIL-kolonizációhoz vagy hatékonysághoz vezethet.

Ennek ellenére még az immunoázisos, STING-magas SCLC-tumorokban is csak az immunsejtek töredéke expresszálja az ellenőrzőpont-molekulát, a STING-pozitív limfociták száma alacsony a tumorfészekben. A tumorfészekbe beszűrődő immunsejtek fokozott STING-expressziója azonban független kedvező prognosztikai tényező a túlélés szempontjából. Ezzel szemben a STING magas stromális expressziója önmagában egyáltalán nem biztosít túlélési előnyt. Ennek oka az lehet, hogy a stromában sok STING-expresszáló sejt tumor-asszociált fibroblaszt, melyek immunszuppresszív, tumorigén szerepéről ismert a TME-ben (153-155). A négy altípusjelző közül csak a YAP1 mutatott gyenge pozitív korrelációt a STING-expresszióval mind a stromában, mind a tumorfészekben. Ugyanakkor szignifikáns, mérsékelt korreláció volt a STING expresszió és az aggregált altípus pontszám között, ami arra utal, hogy minél erősebb és átfedőbb egy tumor altípus molekulájának expressziója, annál magasabb a STING expressziója.

Korábban kimutatták, hogy tüdőrák-sejtvonalakban (156) és szövetszövetmintákban (157) egyes tumorsejtek MHCII-expressziót mutatnak elsősorban a TIL-ek közelében, erősen infiltrált tumorokban. Ez arra utal, hogy az immunsejtek beszívargása megengedő mikrokörnyezet esetén indukálhatja az MHCII molekula kifejeződését a tumorsejtekben (158). Az MHCII kritikus szerepet játszik az antigén prezentációjában a CD4+ T-limfociták számára, amelyek szerepe a tumorelles immunitásban egyre inkább felértékelődik (158). Ennek megfelelően a tumorspecifikus MHCII expresszió növelheti a tumor immunrendszer általi felismerését, és ezért fontos szerepet játszhat az immunterápiában (158). Továbbá a tumorspecifikus MHCII összefügg a melanoma és emlőrákos betegek jobb prognózisával és az immunterápiára adott jobb válasszal, továbbá megnövekedett tumor-kilökődéssel egérmódellekben (159-162). Ezért az MHCII ígéretes a gyulladt tumorok és az anti-PD-1/anti-PD-L1 szerekre adott válasz nagyobb valószínűségének biomarkereként (158). Megválaszolatlan kérdés, hogy az MHCII milyen hatással van a CD4+ Treg sejtekre, amelyek számos szolid tumortípusban bőségesen előfordulnak, és képesek az immunitást és a gyulladást erőteljesen elnyomni (163). Az MHCII Treg-aktivációban betöltött szerepével kapcsolatos ellentmondás főként azért áll fenn, mert az MHC-II expressziója az immunmediált eredmények javulásával függ össze, míg a Treg-aktiváció gyulladáscsökkentő hatású (158, 164). E tanulmányban kimutattuk, hogy a tumorsejtekben az MHCII-expresszió mérsékelt korrelációt mutat az immunsejt-infiltrációval, beleértve a CD8+ T-sejteket, és mérsékelt-gyenge korrelációt a STING-expresszióval. Az MHCII-expresszió a négy transzkripciós driver gén közül a YAP1-hez kapcsolódott, és a YAP1-et magasan expresszáló betegek szignifikánsan nagyobb mennyiségű MHCII-t fejeztek ki. Az MHCII-magas tumorok a teljes betegcsoport 22,5%-át teszik ki, és az NSCLC-vel (165) ellentétben a többváltozós elemzésünk nem mutatott túlélési előnyt vagy hátrányt az MHCII-expresszió tekintetében a SCLC-s betegek esetében, ami az SCLC-ben eltérő TME-biológiának tudható be.

Az MHCII expresszióval kapcsolatos eredményeinkhez hasonlóan Cai és munkatársai egy nemrégiben végzett tanulmánya kimutatta, hogy a NE-alacsony, "variáns" típusú SCLC-k kifejezett MHCII expresszióval, immun-infiltráltabb TME-vel, kemorezisztenciával és fokozott MYC expresszióval járnak együtt (a NE-magas tumorokhoz képest), még akkor is, ha az ASCL1 expresszióban nem következik be változás (166). Tekintettel arra, hogy ezek a tumorok általában egy sor immunszuppresszív gént expresszálnak (135), kritikus fontosságú lesz annak megértése, hogy mely génfunkciókat kell megcélolni annak érdekében, hogy a NE-alacsony SCLC-kben hosszán tartó daganatellenes immunválaszt érjünk el. Figyelemre méltó, hogy más csoportok is megfigyelték, hogy egy specifikus NE-alacsony fenotípusú SCLC alpopulációt erős MHCII-expresszió jellemez, és különösen érzékenyek a STING agonizmusra, ami a T-sejtek felismerésének fokozódásához vezet szingenikus egérmódellekben (167).

Tanulmányunknak van néhány limitációja. Először is, egy retrospektív keresztmetszeti vizsgálat, amelyben korlátozott klinikopatológiai adatok állnak rendelkezésre. Másodsor, egy túlnyomórészt korai stádiumban lévő kohorsz, és a betegeket nem kezelték specifikus terápiákkal. Ennek megfelelően nem tudjuk vizsgálni a biomarkerek prediktív vagy prognosztikai értékét. Mivel a toborzási időszak meglehetősen hosszú volt, a terápiás irányelvek (beleértve a műtéti technikákat is) idővel változhattak, ami befolyásolhatta a túlélést. Vizsgálatunkban a legtöbb intraepiteliális immunsejt nem mutat STING-expressziót, ami korlátozhatja a hatékony tumorellenes immunválaszt az egyébként erősen infiltrált tumorokban. Ennek a problémának a leküzdése segíthet a gazdaszervezet tumorsejtekkel szembeni immunitásának fokozásában, és jobb hosszú távú eredményeket biztosíthat ebben a nehezen kezelhető rosszindulatú daganatban.

5. BCL-2 expresszió és kombinált BCL-2 / MCL-1 gátlás SCLC-ben

5.1 Bevezetés

Mivel az SCLC szubtipusokat definiáló transzkripciós faktorok nehezen megcélozhatóak, a célzott SCLC terápiák kifejlesztése ez idáig elmaradt (168). 1988-ban kimutatták, hogy a BCL-2 fehérje a sejthalállal szembeni rezisztencia révén elősegíti a karcinogenezist és a tumor progresszióját (169). A következő években számos fehérje megismerésével bővült e család, amelyek mindegyike részt vesz a sejtek apoptózisának szabályozásában, és egy vagy több BCL-2 homológia (BH) domént tartalmaz (170). Az SCLC-k proteomikai profilalkotása a BCL-2 emelkedett szintjét mutatta ki, amelyet később fokozott ciszplatinrezisztenciával hoztak összefüggésbe (42). Emellett a primer SCLC-tumorer és sejtvonalak teljes genomjának szekvenálása arra utal, hogy a BCL-2 expressziója az újonnan meghatározott molekuláris altípusok között változhat, ami egy lehetséges altípus-specifikus terápiát határozhat meg (9).

Az MCL-1 a BCL-2 család másik tagja, amely a sejtek túlélését segíti elő azáltal, hogy megakadályozza a szerkezetileg hasonló, de pro-apoptotikus BAX és BAK aktiválódását a mitokondrium külső membránján (171). A BCL-2 expressziójával ellentétben azonban, amely a BCL-2 inhibitorokkal szembeni nagyobb érzékenységhöz vezet, az MCL-1-et az ezen antagonistákkal szemben szerzett rezisztencia kritikus tényezőjeként azonosították (172).

Az elmúlt években a BCL-2 családdal interakcióba lépő inhibitorok megjelenése új gyógyszerarzenált biztosított a különböző malignitások, különösen a leukémiák kezeléséhez (173). A venetoclax, az első, az FDA által jóváhagyott tiszta BCL-2 BH3 mimetikum drámai módon javította a betegek ellátását krónikus limfoid leukémiában (CLL) és akut myeloid leukémiában (AML), és jelenleg preklinikai és klinikai vizsgálatok alatt áll szolid tumorokban is (174, 175). Tekintettel a BCL-2 emelkedett expressziójára bizonyos kissejtes tüdőrákos esetekben (47), a venetoclax más BCL-2 antagonistákkal együtt ígéretes lehetőséget jelenthet e betegek kezelésében (173). Mindazonáltal a kezdetben biztató eredmények (168) ellenére az ezen inhibitorokra mutatott érzékenység mind a preklinikai modellekben, mind a korai fázisú klinikai vizsgálatokban még a magas BCL-2-expresszázó esetekben is ellentmondásos (173). Az ezekkel az inhibitorokkal szembeni rezisztencia egyik fő mechanizmusa feltehetően az MCL-1 overexpressziója, a BCL-2-ből felszabaduló, csak BH3-at tartalmazó fehérjék elkülönítése és a BAX/BAK aktivációjának gátlása révén (176, 177). Tanulmányunkban a személyre szabott terápiás megközelítések kidolgozásának elősegítése érdekében meghatároztuk a BCL-2 expressziójának különbségeit a különböző SCLC altípusok között, és vizsgáltuk a BCL-2 gátlással szembeni rezisztencia hátterében álló mechanizmusokat. Emellett a BCL-2/MCL-1 kombinált gátlásának hatékonyságát is tanulmányoztuk *in vitro* és *in vivo*.

5.2. Anyag és módszer

Sejtvonalak

A sejtvonalakat 10% magzati borjúszérumot (FCS) (Sigma, St. Louis, MO, USA), 100 U/ml penicillint és 10 mg/ml streptomycint (Sigma) tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban tenyésztettük 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó, párasított inkubátorban, és rendszeresen ellenőriztük a Mycoplasma-szennyezettséget.

Proteomikai elemzés

Az ebben a tanulmányban elemzett proteomikai adathalmazt feljebb tárgyaltam és korábban már publikálta csoportunk (59). Röviden, a fehérjéket 27 SCLC-sejtvonal sejtpelletjéből extraháltuk és enzimatikusan emésztettük. A peptidek tömegspektrometriás elemzését egy Ultimate 3000 RSLC nanopumpán végeztük, amely egy Q Exactive HF-X tömegspektrométerhez (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) volt csatlakoztatva, a korábban leírtak szerint (178). A nyers fájlokat a Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Fisher Scientific) programban kerestük a Spectral Library (Proteome tools humán spektrumkönyvtár) és a SEQUEST HT keresések segítségével az UniProtKB humán adatbázissal szemben (v.15/01/2019) (17, 179). A nyers fehérjeintenzitásokat ezután log₂-transzformáltuk, és a mintákat medián-normalizáltuk.

Gyógyszeres kezelés

A venetoclaxot és az S63845-öt a Medchemexpress-től (Monmouth Junction, NJ, USA) vásároltuk, DMSO-ban oldottuk, és in vitro a megadott koncentrációban használtuk. Az in vivo részhez a venetoclaxot 60% phosal 50 propilén-glikolban (PG) (Medchemexpress), 30% polietilén-glikol 400-ban (PEG400) (Medchemexpress) és 10% etanolban oldottuk. Az S63845-öt 20%-os hidroxipropil-β-ciklodextrin (Sigma)-ben készítettük elő, amelyet 20 mM HCl-ben oldottunk.

Transzfekció expressziós plazmidokkal

Összesen 1×10^6 sejtet ültettünk ki T25 sejtenyésző edénybe, majd a következő napon 2,5 μg pCMV6-BAX-al (OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) vagy pEGFP-n3-mal (Takara Bio, Kusatsu, Japán) transzfektáltuk Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével a gyártó utasításai szerint.

RNS-izolálás és qPCR

A totál RNS-t TRIzol segítségével izoláltuk, majd MMLV reverz transzkriptázzal (Thermo Fisher Scientific) reverz transzkripciót végeztünk a korábban leírtak szerint (180). A cDNS-eket TaqMan génexpressziós próbákkal (Thermo Fisher Scientific, BCL-2: Hs04986394; GAPDH: Hs02786624; BAX: Hs00180269) elemeztük 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) segítségével. Referencia géneként a GAPDH-t használtuk.

Fehérjeizolálás és Western blot analízis

A sejteket proteáz inhibitor koktélt (Thermo Fisher Scientific) tartalmazó RIPA pufferbe gyűjtöttük. A fehérjéket SDS-PAGE segítségével elválasztottuk, nitrocellulóz membránokra blottoltuk, és a Western blotokat a gyártó protokollja szerint végeztük el a következő primer antitestek felhasználásával (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA): BCL-2 (1:3000, #15071), MCL-1 (1:1000, #39224), BAX (1:1000, #5023), Kaspáz 3 (1:3000 #9662), Cleaved Caspase 3 (1:1000 #9661), PARP (1:3000, #9542) és GAPDH (1:5000, #5174).

Sejtvitalitási vizsgálat

Az előzetesen meghatározott optimális számú sejtet 100 μl tápfolyadékban 96 lyukú plate-re ültettük ki három-három well-be. A pontos sejtszámláláshoz tripszin segítségével egysejtes szuszpenziót hoztunk létre, a 3D klaszterekben növekvő sejtvonalak esetében is. Másnap a sejteket újabb 100 μl médiummal

kezeltük, amely tartalmazta a vizsgálandó gyógyszereket. Az előzetesen plazmidokkal transzfektált sejteket 24 órával a transzfekciót követően ültettük ki a plate-re. 72 óra elteltével a sejtek túlélését MTT-teszttel mértük a gyártó utasítása szerint (EZ4U, Biomedica, Bécs, Ausztria).

Telepképződési vizsgálat

Klonogén esszét hajtottunk végre a venetoclax és az S63845 hosszú távú hatásainak vizsgálatára önálló gyógyszerként, valamint kombinációban. Ehhez a sejteket alacsony sűrűségben 6 vagy 12 lyukú sejttenyésztő plate-re ültettük ki három-három well-be, és a következő napon kezeltük őket. A sejtvonaltól függően 10-21 nap elteltével a telepeket 70%-os etanollal fixáltuk és 0,1%-os kristályibolyával festettük. A mennyiségi meghatározáshoz a lemezeket 2%-os SDS-szel festettük, és az abszorbanciát 562 nm-en mértük.

Apoptózis esszé

Összesen 3×10^5 sejtet ültettünk ki 6 lyukú szövettenyésztő plate-re, majd a következő napon DMSO-val, 2,5 μM venetoclaxszal, 2,5 μM S63845-tel vagy ezek kombinációjával kezeltük. A 24 vagy 48 órás inkubációt követően a sejteket összegyűjtöttük és Annexin V-FITC-vel (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) és propidium-jodiddal jelöltük. 15 perces szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a sejteket áramlási citometriával elemeztük Gallios áramlási citométerrel (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

In vivo xenograft modell

Összesen 1×10^7 SHP77 sejtet oltottunk 1:1 arányban szubkután hím SCID egerekbe, szérummentes tápfolyadék és matrigel felhasználásával. 7 nap elteltével, amikor a tumorok tapinthatóvá váltak, az egereket véletlenszerűen 4 kezelési csoportba osztottuk ($N = 7$ csoportonként): vehicle control, venetoclax, S63846 és venetoclax+S63845. A venetoclax csoportban az egereket heti 5 napon keresztül kezeltük 100 mg/kg venetoclax-szal orálisan. Az S63845-öt intraperitoneálisan adtuk be 25 mg/kg dózisban hetente kétszer. Az állatkísérleteket az ARRIVE-irányelvek (181) és a befogadó intézetek állatjóléti szabályzata szerint végeztünk (engedélyszám: PEI/001/2574-6/2015). A daganatokat hetente háromszor mértük meg kaliperrel, és mm^3 -ben fejeztük ki az elnyújtott ellipszoid térfogatára vonatkozó képlettel ($\text{hossz} \times \text{szélesség}^2 \times \pi/6$), a korábban leírtak szerint (182). Az egereket 17 napos kezelés után termináltuk.

A daganatok szövettani elemzése

A daganatokat frissen fagyasztottuk és 4 μm -es metszetekre vágtuk. A sejtproliferáció értékeléséhez a preparátumokat Ki-67 antitesttel (1:100, MIB-1 klón, Dako, Glostrup, Dánia) inkubáltuk 30 percig az endogén peroxidáz blokkolása után. Az ImmPRESS Goat Anti-Mouse detektáló rendszert (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) használtuk az antitestek detektálására a gyártó ajánlásainak megfelelően. Az antitesteket 3-3-Diaminobenzidinnel (Dako) hívtuk elő. Minden egyes tárgylemezt Mayer-féle hematoxilinnel (Sigma) ellenfestettünk, és Entellan-nal (Merck, Darmstadt, Németország) fedtük. Az apoptózis elemzéséhez a terminális dezoxinukleotidil-transzferáz-mediált dUTP nick-end jelölést (TUNEL) végeztük a gyártó utasításai szerint (Roche Diagnostics, Basel, Svájc). A sejtmagokat DAPI-val jelöltük.

A tárgylemezeket TissueFAXS rendszerrel (TissueGnostics GmbH, Bécs, Ausztria) szkenneltük. A Ki-67 és TUNEL-pozitív tumorsejtek százalékos arányának értékeléséhez mintánként legalább 3000 tumorsejtet számoltunk meg manuálisan az ImageJ szoftverrel.

Statisztikai elemzés

Az adatokat a GraphPad Prism 8 programmal elemeztük, és legalább három független, három ismétlésben végzett kísérlet átlagaként vagy átlag \pm SD értékeként, illetve boxplotként (min-től max-ig) ábráztuk. Az IC50-értékeket a GraphPad Prism 8 segítségével dózis-válaszgöréből számoltuk ki. A

korrelációelemzéshez a normál eloszlásra vonatkozó Anderson-Darling-tesztet használtuk, és ennek megfelelően a Pearson- vagy Spearman-r értékeket GraphPad Prism 8 programmal számoltuk ki. A gyógyszerkölsönhatásokat a Combenefit szoftverrel értékeltük. A különbségeket két vagy több csoport összehasonlítása esetén Student's t-tesztel vagy varianciaanalízissel értékeltük, és $p < 0,05$ esetén statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

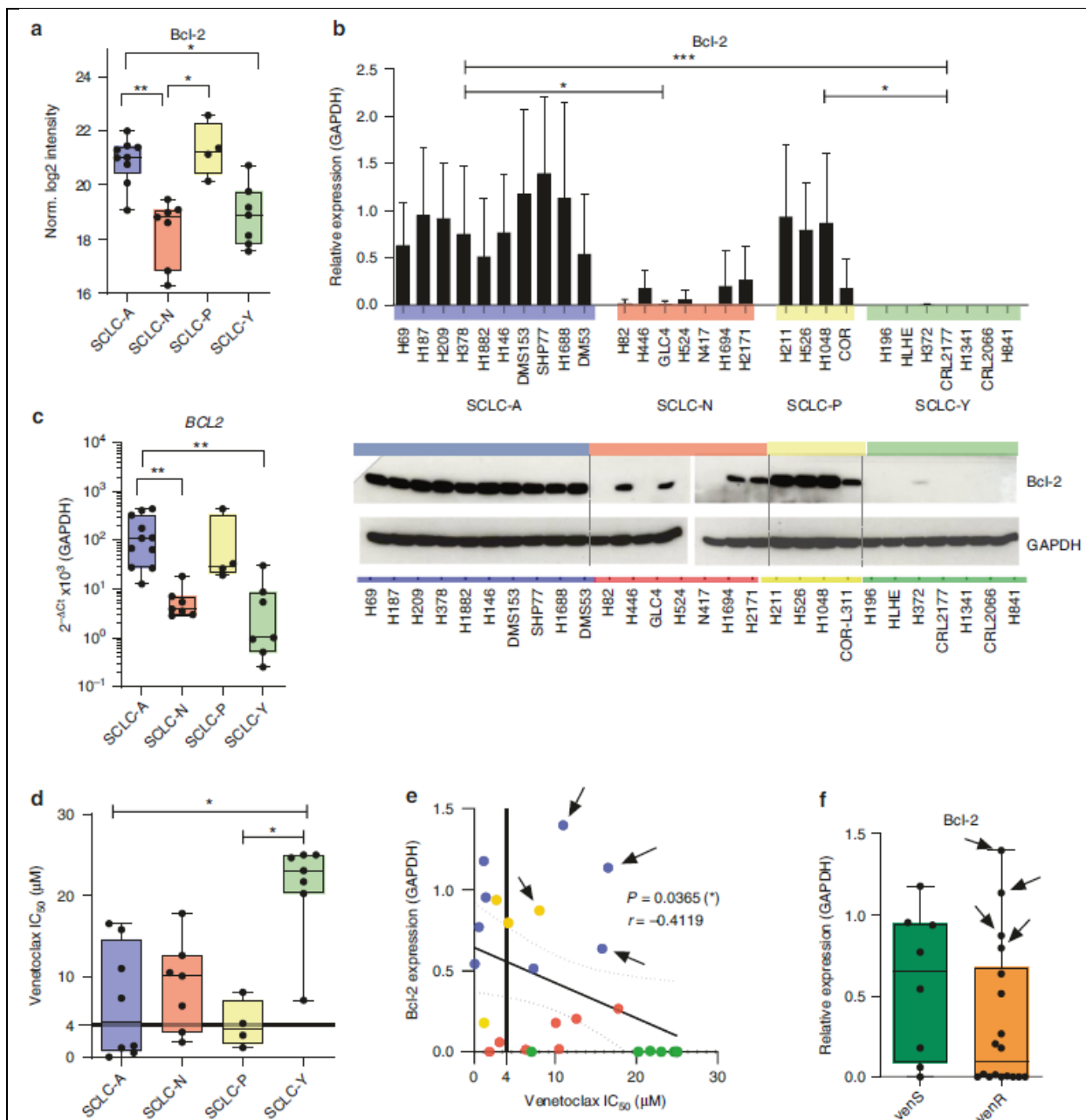
5.3. Eredmények

A BCL-2 nagymértékben expresszálódik az SCLC-A és -P altípusokban

Fentebb tárgyaltam a nemrégiben elvégzett átfogó proteomikai elemzésünket, melyet mind a 4 fő molekuláris altípust képviselő 27 SCLC-sejtvonalon végeztünk (9× ASCL1, 7× NEUROD1, 4× POU2F3, 7× YAP1) (59). Ezt az adathalmazt tovább elemeztük az altípusok közötti különbségek tekintetében, és azt találtuk, hogy a BCL-2 szignifikánsan nagyobb mértékben expresszálódik az SCLC-A és SCLC-P altípusokat képviselő tumorokból létrehozott sejtvonalakban (5.1.A. ábra). Ezt az expressziós mintázatot megerősítettük a sejtvonalak egy kibővített paneljében (N = 28) western blot és qPCR segítségével (5.1.B-C. ábra). Megjegyzendő, hogy szignifikáns pozitív korrelációt figyeltünk meg a BCL-2 mRNS- és fehérjeszintje között.

A BCL-2 gátlással szembeni érzékenység nem kizárólag a BCL-2 szintjétől függ

Ezután az SCLC-sejtvonalainkat a BCL-2-t gátló venetoclax különböző koncentrációival kezeltük, amely a sejtvonalak között széles hatásspektrumot mutatott, és 75 nM és $>25 \mu\text{M}$ közötti számított IC50 értékeket eredményezett. A BCL-2 gátlásra való érzékenységet a BCL-2 különböző szintjeit expresszáló SCLC altípusok részben tükrözték, az SCLC-A, SCLC-N és SCLC-P érzékenyebb volt, mint az SCLC-Y (5.1.D. ábra). Amikor a venetoclax érzékenységét összehasonlítottuk az egyes sejtvonalak BCL-2 expressziós szintjeivel, szignifikáns, de gyenge korrelációt találtunk (5.1.E. ábra). A $4 \mu\text{M}$ -os cut-off IC50 határértéket alkalmazva panelünket venetoclax-érzékeny (venS) és rezisztens (venR) csoportokra osztottuk, amelyek 8 (DMS53, H146, DMS153, COR-L311, H187, H211, H524, N417), valamint 18 (H526, H1882, H1048, H446, SHP77, H1694, H1688, H372, H69, H82, H2171, GLC4, H196, H841, H1341, CRL-2066, CRL-2177, HLHE) sejtvonalból álltak. A venS és venR csoportok között nem volt szignifikáns különbség a BCL-2 szintjében, mivel több sejtvonal is rezisztens volt a venetoclaxra a nagyon magas BCL-2 szintjük ellenére, amint azt a fekete nyilak jelzik (5.1.E-F. ábra).



5.1. ábra. A BCL-2 expresszió mintázata kevésbé korrelál a venetoklax rezisztenciával SCLC sejtvonalakban.

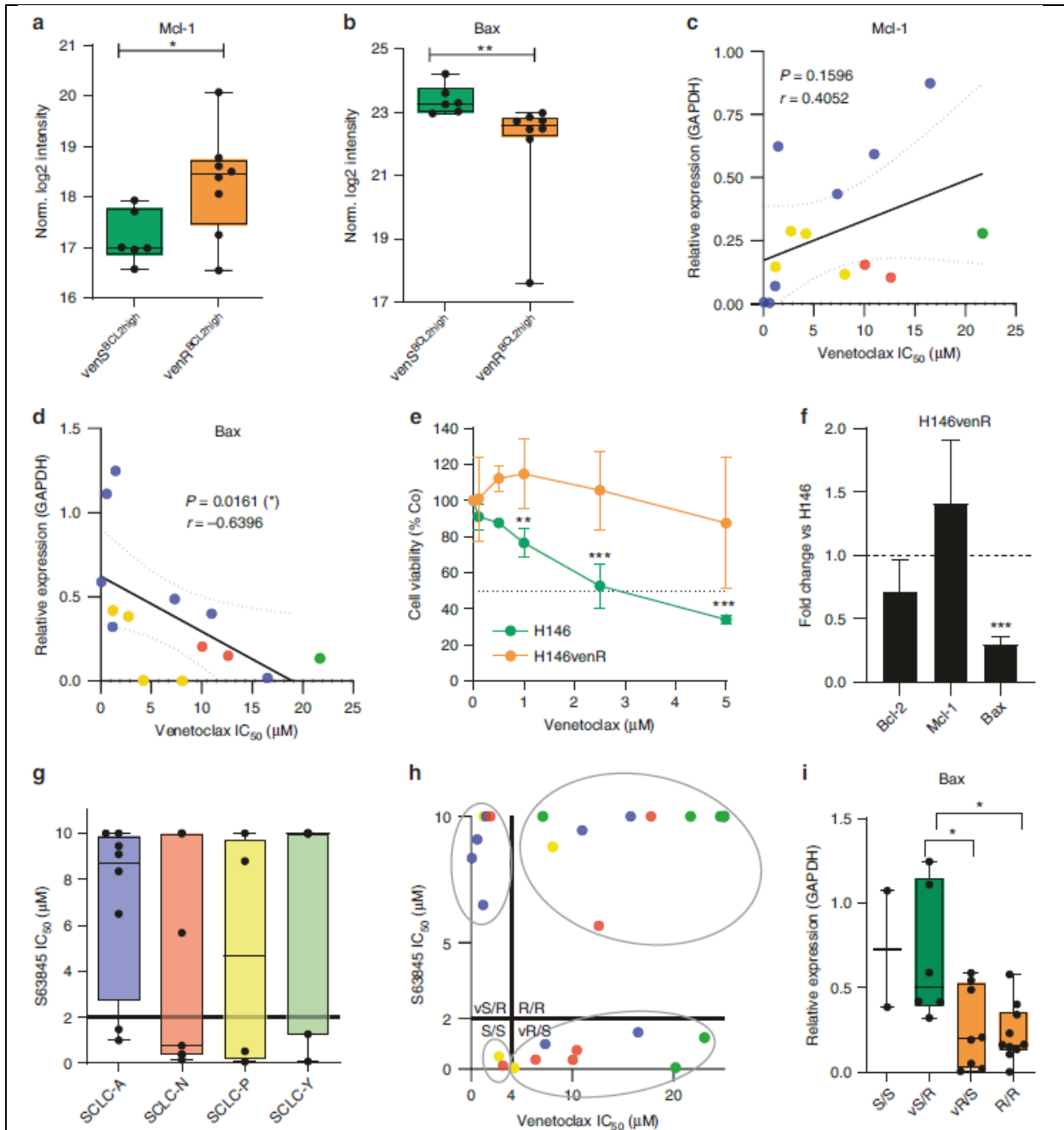
a BCL-2 fehérje expresszió SCLC sejtvonalakban, molekuláris altípusok szerinti csoportosításban, proteomikai analízis alapján (N=27). **b** BCL-2 expresszió SCLC-sejtvonalakban (N = 28) a Western blotok denzitometriai elemzése alapján a GAPDH-ra normalizálva, valamint reprezentatív Western blot képek. Az oszlopok 4-5 ismétlés átlagát és szórását mutatják. **c** BCL-2 mRNS kifejeződés (N = 28) GAPDH-ra normalizálva qPCR mérés alapján. **d** A venetoklax dózis-válasz görbékből számított IC50 értékei 72 óra elteltével, MTT-esszével mérve. A fekete vonal (4 μM) jelzi az érzékeny és rezisztens sejtek közötti küszöbértéket. **e** Spearman korreláció a Western blot analízisből származó BCL-2 fehérje expressziós szintek és a venetoklax IC50 értékek között (kék: SCLC-A, piros: SCLC-N, sárga: SCLC-P, zöld: SCLC-Y). A fekete nyilak a "kiugró értékeket" jelzik. **f** Western blot-elemzésekből származó BCL-2-expressziók, a 4 μM-os küszöbérték alapján venetoklax-érzékeny és rezisztens csoportba sorolt SCLC-sejtvonalakban. Minden pont egy sejtvonal átlagát jelenti. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Az MCL-1 overexpresszió és az alacsony BAX-szintek a venetoclax-rezisztencia jellemzői

A BCL-2 gátlással szemben megfigyelt rezisztenciáért felelős potenciális jelöltek keresése céljából csak a magas BCL-2 expresszáló sejtvonalakra (venS^{BCL2magas}, venR^{BCL2magas}) fókuszálva, proteomikai adataink segítségével megvizsgáltuk a BCL-2 család más tagjainak expresszióját a venetoclax érzékeny és rezisztens sejtvonalakban. Így azokat a sejtvonalakat, amelyeknél a normalizált log₂-intenzitás 19-nél nagyobb volt a proteomikai adathalmazban (5.1.A. ábra), és amelyeknél a BCL-2 western blot segítségével kimutatható volt (5.1.B. ábra), a BCL-2^{magas} csoportba soroltuk, így 6 venS^{BCL2magas} (DMS53, H146, DMS153, COR-L311, H187, H211) és 8 venR^{BCL2magas} (H526, H1882, H1048, H446, SHP77, H1694, H1688, H372) sejtvonalat különítettünk el. Míg a NOXA, BAD, BOK, BID, BAK1, Bcl-XL és BCL-2L12 expresszió szintekben nem tapasztaltunk különbséget, addig proteomikai adataink alapján az anti-apoptotikus MCL-1-nek szignifikánsan magasabb, a pro-apoptotikus BAX-nak alacsonyabb expresszióját találtuk a venetoclax-rezisztens csoportban (5.2.A-B. ábra). Ezt a megfigyelést megerősítették a western blot eredmények is, amelyek pozitív korrelációt mutattak a venetoclax IC₅₀ értéke és az MCL-1 expressziója között (5.2.C. ábra), továbbá szignifikáns negatív korrelációt a venetoclax érzékenység és a BAX szintje között (5.2.D. ábra). Általánosságban elmondható, hogy a BCL-2-vel ellentétben az MCL-1 és a BAX nem fejeződött ki eltérően a 4 SCLC altípus között, és a BCL-2 expressziója nem korrelált sem az MCL-1-gyel, sem a BAX-szal.

Ezután egy venetoclax-rezisztens sejtvonalat (H146venR) hoztunk létre úgy, hogy a H146 sejteket növekvő venetoclax-dózisokkal kezeltük több hónapon keresztül (5.2.E. ábra). Amikor összehasonlítottuk a BCL-2, MCL-1 és BAX szintjét a venetoclax-érzékeny szülői sejtvonallal, tendenciaszerűen alacsonyabb BCL-2, magasabb MCL-1 és szignifikánsan alacsonyabb BAX expressziós szintet találtunk (5.2.F. ábra). Így azt feltételeztük, hogy az MCL-1 közvetíti a venetoclax rezisztenciát a magas BCL-2 expresszáló sejtekben. Így a sejtvonalpanelünket az S63845 MCL-1-inhibitorral kezeltük, és 50 nM és >10 μM közötti IC₅₀-értékeket találtunk (5.2.G. ábra). A 2 μM-os értéket használtuk cut-off értéként. Az S63845-re érzékeny és rezisztens sejtek elkülönítésére cut-off értéként a 2 μM-os értéket használtuk, melyet a fekete vonal jelez. Nem volt korreláció az S63845 IC₅₀ értékek és a venetoclax IC₅₀ értékek vagy az MCL-1 szintek között. A korábban meghatározott határértékek (venetoclax: 4 μM; S63845: 2 μM) alkalmazásával ezután a BCL-2 és MCL-1 gátlásra való érzékenység szempontjából 4 csoportba soroltuk a sejtvonalakat: Érzékenyek mindkét inhibitorra (S/S, N = 2), érzékenyek a venetoclaxra, de az S63845-re nem (vS/R, N = 6), rezisztensek a venetoclaxra, de érzékenyek az S63845-re (vR/S, N = 8) és rezisztensek mindkét gyógyszerre (R/R, N = 10) (5.2.H. ábra).

A BCL-2, MCL-1 és BAX expressziós mintázatát vizsgálva ezekben a csoportokban nem-szignifikáns tendenciát találtunk a magasabb BCL-2 és MCL-1 szintek tekintetében a vS/R és vR/S sejtekben. Érdekes módon az alacsony BAX-expresszió továbbra is egyértelműen a venetoclax-rezisztenciához társult (5.2.I. ábra), ami arra utal, hogy a BCL-2 vagy MCL-1 magas szintjének expressziója ellenére az SCLC-sejtek a BAX downregulációjával leküzdhetik a venetoclax-szal szembeni érzékenységet.



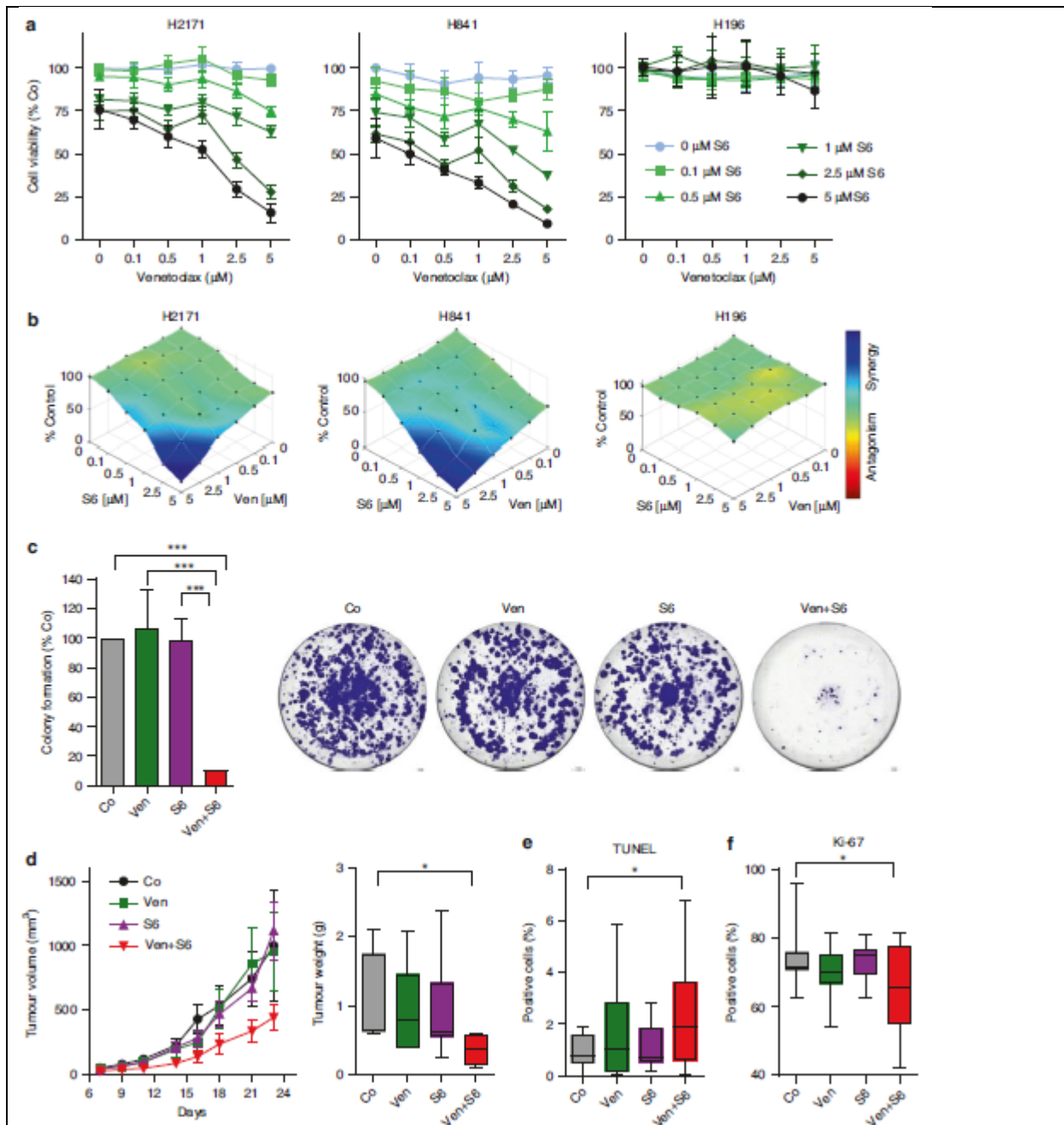
5.2. ábra. A venetoklax rezisztenciát megnövekedett MCL-1 és a csökkent BAX szint jellemzi.

a MCL-1 és **b** BAX normalizált log₂ intenzitása, a BCL-2-t magasan expresszáló venetoklax érzékeny (venSBCL2high) és BCL-2-t magasan expresszáló venetoklax rezisztens (venRBCL2high) csoportba sorolt sejtvonalak proteomikai elemzése alapján. **c** Pearson korreláció a Western-blottal mért MCL-1 expressziós szintek és a venetoklax IC₅₀ értékek között. **d** Spearman korreláció a Western-blottal mért BAX expressziós szintek és a venetoklax IC₅₀ értékek között (c és d: kék: SCLC-A, piros: SCLC-N, sárga: SCLC-P, zöld: SCLC-Y). **e** H146 és H146venR sejtek dózis-válasz görbéi 72 órával az adott dózisu venetoklax kezelése után. **f** A H146-hoz viszonyított Western blottal mért fehérje expresszió a H146venR sejtekben. Az oszlopok az átlagok és szórások értékeit mutatják. **g** Az S63845 dózis-válasz görbékből számított IC₅₀ értékei 72 óra elteltével, MTT esszével mérve. A fekete vonal (2 μM) jelzi az érzékeny és rezisztens sejtek közötti küszöbértéket. **h** A venetoklax és az S63845 IC₅₀-értékei (kék: SCLC-A, piros: SCLC-N, sárga: SCLC-P, zöld: SCLC-Y). **i** BAX fehérje expressziója Western blot analízis alapján, kettős érzékeny (S/S), venetoklax érzékeny (vS/R), S63845 érzékeny (vR/S) és kettős rezisztens (R/R) sejtekben. Minden pont egy sejtvonal átlagát jelöli. ANOVA és Tukey-féle többszörös összehasonlító teszt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A BCL-2 és az MCL-1 gátlása szinergiát eredményez a kettős rezisztenciával rendelkező SCLC sejtvonalak egy alcsoportjában.

Ezután a 10 kettős rezisztens sejtvonalat (R/R) kombináltan kezeltük a venetoclax és az S63845 különböző dózisaival, hogy felmérjük a gyógyszerkölcsonhatás lehetséges hatásait. Érdekes módon néhány sejtvonalt erős növekedési gátlást mutatott a kombinációs kezelésre adott válaszként, míg másoknál egyik kezelés sem volt hatással (5.3.A. ábra). A szinergizmus vagy antagonizmus kiszámításához a Combenefit szoftvert HSA modelljét használva azt találtuk, hogy öt sejtvonalt mérsékelt vagy erős szinergizmust mutatott. A másik öt sejtvonaltban a kombinációs kezelés főként additív vagy gyenge antagonista hatást eredményezett, és nem volt válasz a növekedésgátlás tekintetében (5.3.B. ábra). Az erős szinergizmus az adherensen növekedő SHP77 sejtekben a kolóniaképződési vizsgálatban is jól látható volt (5.3.C. ábra).

Ezután a venetoclax és az S63845 közötti erősen szinergisztikus kölcsönhatás in vivo validálása érdekében kettős rezisztens SHP77 sejteket injektáltunk szubkután SCID egerekbe. Amikor a tumorok mérhetővé váltak, az egereket venetoclaxszal, S63845-tel vagy a kettős kombinációjával kezeltük. Megjegyzendő, hogy a kombinációs csoportban a tumorterhelés jelentős csökkenését tapasztaltuk, míg önmagában egyik gyógyszer sem mutatott hatást a tumor növekedésére, ezzel igazolva in vitro eredményeinket (5.3.D. ábra). Súlyos toxicitásra vagy súlycsökkenésre utaló jeleket nem észleltünk. Az SCLC xenotranszplantátumainak későbbi elemzése szignifikánsan fokozott apoptózist és csökkent proliferációt mutatott a kombinációs csoportban (vs. kontrollok), amit a TUNEL-pozitív kettős szálszakadások (5.3.E. ábra), illetve a csökkent KI-67-expresszió (5.3.F. ábra) jelzett.

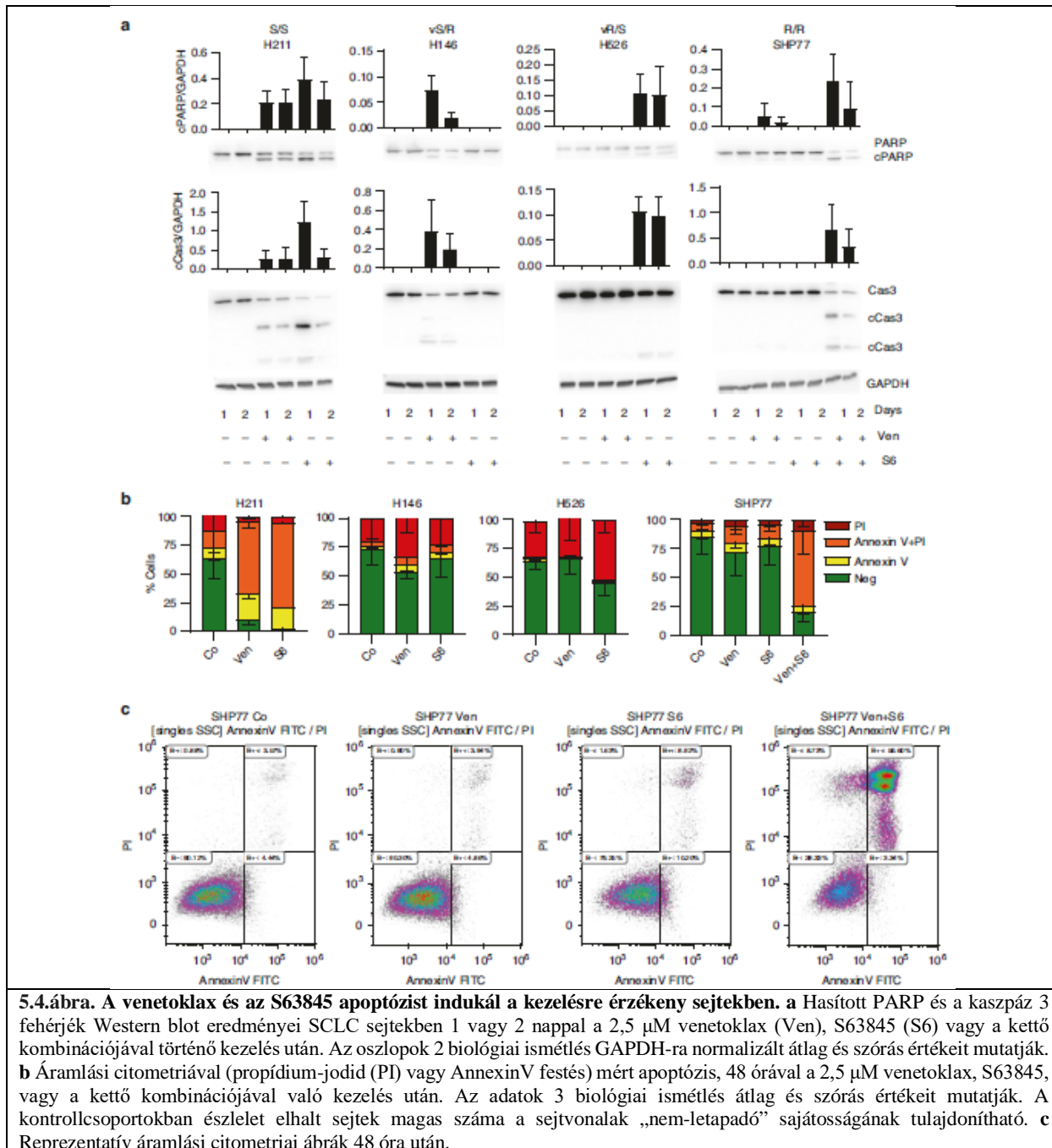


5.3. ábra. A venetoklax és az S63845 szinergizmust mutatnak az SCLC sejtvonalak egy alcsoportjában *in vitro* és *in vivo*.

a Az SCLC sejtvonalak dózis-válasz görbéi adott dózisu 72 óras venetoklax és S63845 kezelés után, MTT esszék alapján és **b** HSA szinergia/antagonizmus ábrák a Combenefit szoftverrel generálva. Az adatok átlag és szórás értékekben vannak feltüntetve. **c** SHP77 sejtek klonogenitási vizsgálatának mennyiségi meghatározása valamint reprezentatív képek a DMSO-val (Co), 2,5 µM venetoklax-szal (Ven), 2,5 µM S63845-tel (S6) vagy a kettő kombinációjával (Ven+S6) való kezelésük után. Az adatok három biológiai ismétlés átlag és szórás értékeként szerepelnek (ANOVA és Tukey többszörös összehasonlító teszt). **d** Tumorok térfogat változásai a kezelések időtartama alatt és tumor tömegek a 24. napon. SHP77 sejtekkel szubkután oltott SCID egerek (n = 4-7 csoportonként) az alábbi kezeléseket kapták: vivőanyag (Co), 100 mg/kg venetoklax hetente ötször (Ven), 25 mg/kg S63845 hetente kétszer (S6) illetve a kettő kombinációja (Ven+S6). **e** TUNEL- vagy **f** Ki67-pozitív sejtek százalékos aránya a xenograftokban. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

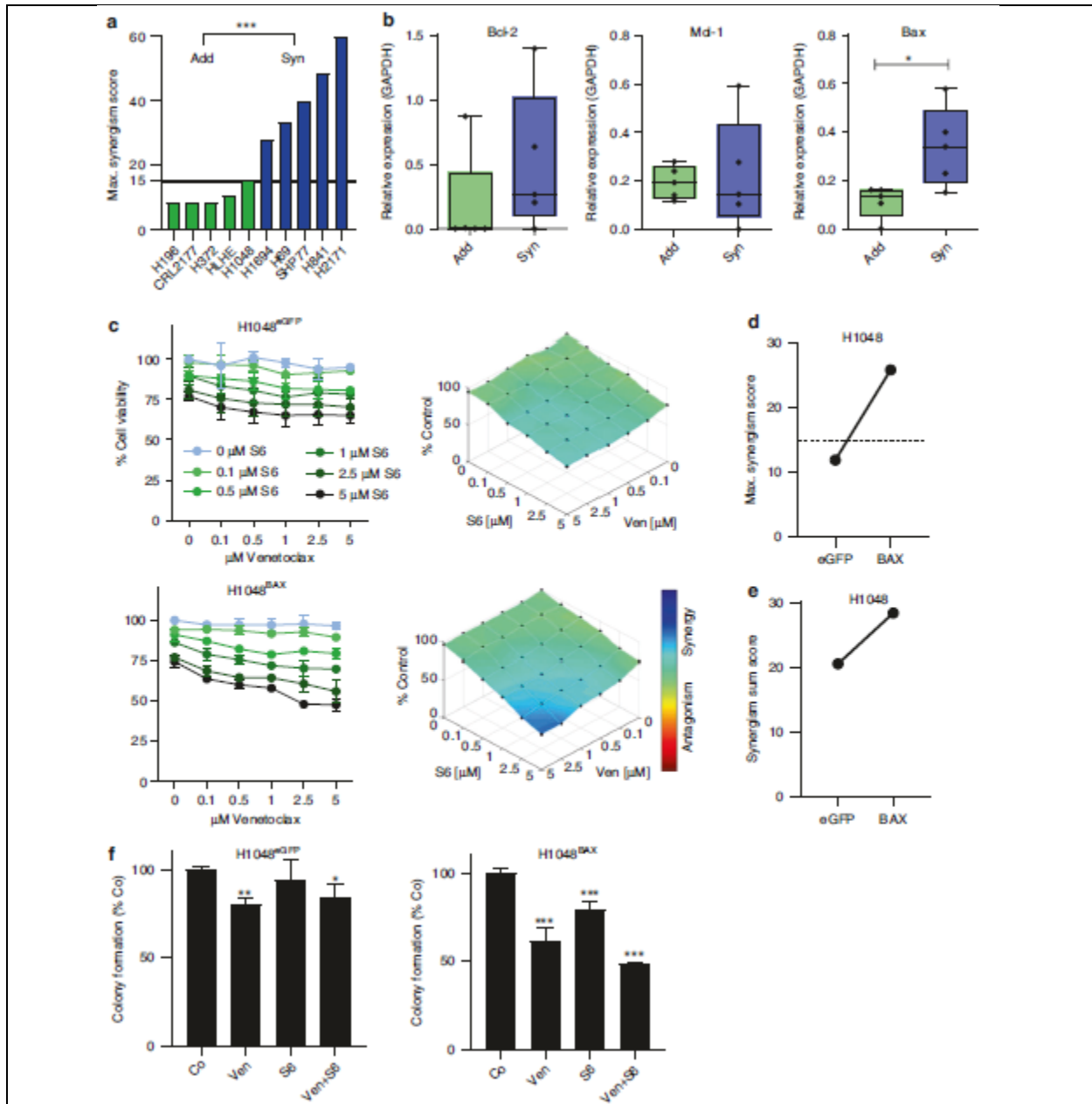
A venetoclax és az S63845 egyértelműen apoptózist indukál az érzékeny sejtekben

A BCL-2 és MCL-1 gátlás apoptózis indukcióra gyakorolt hatásának értékeléséhez western blotokat végeztünk a hasított PARP és kaszpáz 3 meghatározására egy-egy az adott csoportra (S/S, vS/R, vR/S, R/R) reprezentatív sejtvonalon, amelyet venetoclaxszal, S63845-tel, illetve a kettős rezisztens SHP77 sejtvonalon esetében a kettős kombinációjával kezeltünk. A sejtvonalakban a hasított PARP és hasított kaszpáz 3 indukcióját találtuk az érzékenységi profiljuknak megfelelően (5.4.A. ábra). Ezt az áramlási citometriai elemzések során is megfigyeltük. Kiemelendő, hogy a kettős rezisztens SHP77 sejtvonalon esetében a kombinációs csoportban szignifikánsan több apoptotikus sejtet találtunk, míg önmagukban a hatóanyagoknak nem volt hatása (5.4.B-C. ábra).



A BAX szükséges a venetoclax és az S63845 közötti szinergista kölcsönhatásokhoz

A venetoclax és az S63845 kombinációjára adott eltérő válaszáért felelős mechanizmus azonosítására összehasonlítottuk az additív/antagonista (Add) és szinergista (Syn) sejtvonalak expressziós profilját. Ehhez a sejteket a HSA/CombeneFit elemzésből származó maximális szinergizmus pontszámuk alapján csoportosítottuk, a cut-off érték 15 volt (ezt az 5.5.A. ábrán a fekete vonal jelzi), és így csoportonként 5 sejtvonalat kaptunk. Korábbi eredményeinkkel összhangban a BAX expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a nem válaszoló, additív sejtvonalakban, míg a BCL-2 és MCL-1 expressziója nem változott jelentősen (5.5.B. ábra). Ezért expressziós plazmidok segítségével túltermeltettük a BAX-ot az alacsony BAX-expressziót, de detektálható BCL2-t mutató H1048 sejtvonalban, hogy megvizsgáljuk, hogy a helyreállított BAX szenzitizálja-e a sejteket a venetoclaxra, az S63845-re vagy a kettő kombinációjára. Azt találtuk, hogy a H1048 sejtek, amelyek korábban nem reagáltak a kombinációs kezelésre a kontroll plazmiddal (eGFP) transzfektálva sem, a BAX túltermelése esetében szinergista hatást mutattak (5.5.C. ábra). Amikor összehasonlítottuk a HSA szinergia modellből származó pontszámokat, a BAX-transzfektált H1048BAX sejteknél 25.86 maximális szinergia pontszámot kaptunk (szemben a kontroll transzfektált H1048eGFP sejteknél kapott 11.89 ponttal), ami jóval meghaladja a korábban meghatározott 15-ös küszöbértéket (5.5.D. ábra). A szinergia- és antagonista pontszámok összege is magasabb volt a H1048BAX sejtekben (5.5.E. ábra). Végül a kolóniaképződési vizsgálatok megerősítették a venetoclax és az S63845 önmagukban, és különösen kombinációban tapasztalt fokozott aktivitását a BAX-túltermelő sejtvonalban (5.5.F. ábra).



5.5. ábra. A BAX nélkülözhetetlen a venetoklax és az S63845 közötti szinergisztikus kölcsönhatáshoz. a HSA/Combeneft elemzésből származó maximális szinergia pontszám. A fekete vonal által jelzett küszöbérték az additív (<15, Add) és a szinergikus hatások (>15, Syn) között, amely csoportonként 5 sejtvonalat eredményez. b A Western blot elemzésből származó expressziós profilok a szinergista (Syn) és az additív/antagonista (Add) sejtvonalcsoportok között. Minden pont egy sejtvonal átlagát jelöli. c Az eGFP-vel (H1048^{eGFP}) vagy BAX-szal (H1048^{BAX}) transzfektált H1048 sejtek dózis-válasz görbéi 72 órás venetoklax és S63845 kezelés után a jelzett dózisokban, MTT esszék (balra) és a Combeneft szoftverrel létrehozott megfelelő HSA szinergia/antagonizmus ábrák (jobbra) alapján. Az adatok átlag és szórás értékben vannak feltüntetve. d Maximum szinergia érték és e összesített szinergia érték, HSA elemzések alapján. f A H1048^{eGFP} és H1048^{BAX} klonogenitási vizsgálatait 10 napos inkubáció után DMSO-val (Co), 1 μ M venetoklax-szal (Ven), 1 μ M S63845-tel (S6) vagy a kettő kombinációjával (Ven+S6) (ANOVA és Dunnett többszörös összehasonlító teszt), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.4. Megbeszélés

A preklinikai modellekben és a korai fázisú klinikai vizsgálatokban a különböző célzott hatóanyagokkal elért biztató eredmények ellenére az utóbbi időben nem sikerült jelentős áttörést elérni az SCLC-s betegek

kezelésében. A negatív fázis II. klinikai vizsgálatok végtelen sora elsősorban az SCLC nagyfokú plaszticitásának és a nem szelektált betegcsoportoknak köszönhető. Így a betegek molekuláris altípus és specifikus fehérjeszintű módosulások szerinti csoportosítása hozzájárulhat az új célzott stratégiák kifejlesztéséhez ebben a nehezen kezelhető betegségben. Jelen tanulmányban a BCL-2 gátló venetoclax és az MCL-1 gátló S63845 preklinikai hatékonyságát értékeltük a BCL-2 család más fehérjéinek expressziója szerint, továbbá vizsgáltuk azokat a mechanizmusokat, amelyek hozzájárulhatnak terápiás sikertelenségükhöz.

A BCL-2 molekuláris altípus-specifikusságát elemezve az ASCL1- és POU2F3-domináns altípusokban széles körben emelkedett expressziós szintet találtunk. Ez összhangban van mások eredményeivel, amelyek szerint az SCLC-A altípus nagymértékben függ a BCL-2 és az INSM1 szintjétől (9, 18, 183, 184). Ezen eredmények fényében a BCL-2 valóban potenciális altípus-specifikus terápiás célpontot jelenthet az SCLC ezen alcsoportja számára. Korábban a BCL-2 génexpressziós szintje korrelált a POU2F3 expressziójával is, azonban ezek az eredmények nem mutatkoztak szignifikánsnak a korábbi vizsgálatokban (9). Figyelemre méltó, hogy vizsgálatunkban a BCL-2 szintje szignifikánsan megnövekedett az SCLC-P sejtekben mind az RNS-, mind a fehérjeexpresszió tekintetében. A legújabb preklinikai munkák mellett érvelnek, hogy a POU2F3 expressziója is értékes lehet a PARP-gátlásra érzékeny tumorok azonosításában (18, 185). Mivel a BCL-2 gyakran kölcsönhatásba lép a PARP-1-gyel, és ezért elnyomja a PARP-1-függő DNS-javítást (186), a BCL-2-PARP-1 kölcsönhatás célzott megszakítása ígéretes altípus-specifikus megközelítést jelenthet ezekben az esetekben.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy a BCL-2 expressziója korrelál-e in vitro a venetoclax hatékonyságával, és azt találtuk, hogy bár a venetoclaxra érzékeny sejtvonalak többsége valóban az SCLC-A vagy SCLC-P altípusba tartozott, nem minden magas BCL-2 szintet expresszáló sejtvonal reagált megfelelően a BCL-2 gátlására. Ezzel összhangban Lochmann és munkatársai is azt találták, hogy az SCLC-k egy jelentős alcsoportja érzékeny a venetoclax adására (168). Ezek az eredmények némi optimizmust adhatnak arra vonatkozóan, hogy egy új terápiás stratégia lehet a láthatáron, ugyanakkor a terápiára refrakter esetek és a dózist korlátozó toxicitások komoly aggodalomra adnak okot. Ezt támasztja alá az is, hogy a multicentrikus 1/2-es fázisú vizsgálatot (NCT04543916), amelynek célja az orális venetoclax ajánlott dózisének meghatározása volt visszaesett vagy refrakter SCLC-ben szenvedő betegeknél, a fellépő toxicitások miatt leállították. E problémák leküzdése érdekében a rezisztencia fő mechanizmusainak meghatározása a megfelelő betegkiválasztással együtt döntő fontosságú. Fontos eredményünk, hogy mind az MCL-1 overexpresszió, mind az alacsony BAX-szint jellemző volt a venetoclax rezisztenciára SCLC-ben, míg a NOXA, BAD, BOK, BID, BAK1, BCL-XL és BCL-2L12 szintek nem befolyásolták a terápiás hatékonyságot. Hasonló következtetésekre jutottak Punnoose és munkatársai myeloma multiplexben, ahol az MCL-1 overexpresszió rezisztenciát eredményezett a venetoclax és a navitoclax BCL-2-gátlókkal szemben (187). Érdekes módon előzetes elemzésük arra is utalt, hogy a BCL-XL fokozott expressziója a BCL-2-höz képest a venetoclaxra való csökkent érzékenységgel járhat együtt (187). Megjegyzendő, hogy ezeket az eredményeket a mi vizsgálatunkban nem sikerült validálni. Ehelyett vizsgálataink szerint egy másik, a terápiás rezisztenciával kapcsolatban érdekes fehérjének adódott a BAX, egy pro-apoptotikus fehérje, amely az apoptotikus szignál hatására oligomerizáción megy keresztül, és lyukakat képez a külső mitokondriális membránban (188, 189). Ezzel elősegíti a citokrom c és a többi pro-apoptotikus molekula citoplazmába való bejutását, és aktiválja a kaszpázokat, így a sejtek apoptózisához vezet (188, 189). Akut limfoid leukémiában (ALL) végzett korábbi vizsgálatok szintén arra utalnak, hogy a BAX-deficiencia és a missense BAX-mutációk szerzett venetoclax-rezisztenciát indukálnak (176, 190).

Mivel az emelkedett MCL-1 szintek magas BCL-2 expresszióval rendelkező SCLC-sejtvonalakban a venetoclax rezisztenciával társulnak, az MCL-1 célzott kezelése az S63845-tel szintén megvalósítható terápiás megközelítést jelenthet a refrakter esetekben. Azonban nem minden venetoclax-rezisztens BCL-2-expresszáló, túlszabályozott MCL-1-gyel rendelkező sejtvonal reagált megfelelően az MCL-1 gátlására sem, és meglepő módon az MCL-1 expresszió nem korrelált az S63845 hatékonyságával. Annak érdekében,

hogy legyőzzük a terápiás rezisztenciát ezekben a kettős rezisztens sejtvonalakban, a két célzott hatóanyagot egyszerre adtuk be. Az MCL-1 és a BCL-2 kettős gátlásával kapcsolatban több tanulmány is született (191). Az S63845 és a venetoclax kombinációja erős aktivitást mutatott orrgarat karcinóma (192), AML (193) és köpenysejtes limfóma (194) esetében. Ezzel összhangban egy nemrégiben SCLC-sejtvonalakon végzett in vitro vizsgálat szintén az S63845 és a navitoklax, egy kettős BCL-XL- és BCL-2-gátló közötti potenciális szinergizmusra utalt (191). Ugyanakkor a navitoklax és az S63845 terápiás tartománya további in vivo vizsgálatokban szűknek bizonyult (191). Összességében a venetoclax és az S63845 kettős alkalmazása továbbra is ellentmondásos maradt SCLC-ben. A jelenlegi munka azt mutatja, hogy a BCL-2 és az MCL-1 egyidejű gátlása a fent említett két terápiás szerrel szinergista a kettős rezisztens SCLC-sejtvonalak egy alcsoportjában. Emellett azt is megállapítottuk, hogy a venetoclax/S63845 kombináció kifejezett tumorelles aktivitást mutatott az SHP77 xenograft modellben, amely mindkét gátlóval szemben önmagában rezisztens, ami összhangban van azokkal a vizsgálatokkal, amelyek a venetoclax MCL1-gátlókkal kombinált hatékonyságáról számoltak be myeloma-modellekben (195-197). Fontos, hogy in vivo modellünkben nem észleltük a toxicitás jeleit. Figyelemre méltó, hogy a mi SCLC-mintáink egy része még a BCL-2/MCL-1 kettős célzással szemben is rezisztens maradt.

Bár mind a BCL-2, mind az MCL-1 inhibitorok klinikailag elérhetőek és tolerálhatóak különböző tumormodellekben (196, 198, 199), a venetoclax és az S63845 egyidejű adását még nem vezették át klinikai vizsgálatokba. A jelenlegi és a korábbi vizsgálatokban nem észleltek dózisfüggő toxicitást (196), ugyanakkor a BCL-2 és MCL-1 gátlók egyidejű alkalmazása egyes esetekben még mindig növelheti a toxicitási arányokat. Emellett a kettős gátlás hatékonysága nem minden sejtvonalban következetes, és nem minden tumor reagál határozottan a BCL-2/MCL-1 gátlásra (196). Ezért a megfelelő a beteg kiválasztás mellett a terápiás rezisztenciára vonatkozó biológiai jellemzők értékelése alapvető fontosságú lesz a jövőbeli klinikai vizsgálatok esetében. Jelen tanulmányban azt mutatjuk be, hogy a két inhibitor kombinációja BAX-függő módon kedvez az apoptózisnak. Specifikusabban, összhangban az AML (193) és a myeloma multiplex (196) korábbi eredményeivel, azt találtuk, hogy a venetoclax/S63845 kombináció hatékony gátlásához SCLC-ben is kötelező az intakt és aktivált BAX. Fontos, hogy a BAX szintjének helyreállítása szenzitizálja a H1048 sejteket a venetoclax/S63845-re. A BCL-2/MCL-1/BAX kölcsönhatás mélyreható biológiai jellemzőit még meg kell határozni, azonban a BAX-függő hatékonyság egyik lehetséges oka magának a BAX-nak a pro-apoptotikus tulajdonságaiban rejlik. A kettős gátlás ugyanis azáltal indukálja a sejthalált, hogy lehetővé teszi a BAX számára, hogy heterokomplexeket képezzen a BAK-kal, ami az apoptózis egyik döntő lépése (196). Emellett a BAX és a BAK közötti kooperatív kötődést is megfigyelték a mitokondriális membránporusok kialakításához kettős gátlás hatására, ami tovább erősíti azt a hipotézist, hogy a megfelelő BAX-szint szükséges a sejthalálhoz (200, 201). Bár ezek a biológiai elképzelések részben megmagyarázzák a BAX^{low} sejtvonalak gyenge válaszadási arányát a kettős BCL-2/MCL-1 gátlásra, e lehetőségek további vizsgálata a jövőbeni kutatások tárgyát kell, hogy képezze.

6. Az értekezés főbb megállapításai

6.1. Sebészileg reszekált SCLC minták nagy kohorszán vizsgáltuk az SCLC molekuláris altípusok klinikopatológiai jelentőségét. Immunhisztokémiai festésekkel meghatároztuk az ASCL1, NEUROD1 és POU2F3 fehérjék expresszióját, és az eredmények alapján azonosítottuk az SCLC altípusokat. YAP1-altípust nem lehetett elkülöníteni az IHC segítségével. Az univariációs elemzés során a POU2F3 magas expressziója kedvezőbb túlélési eredményekkel társult, míg az ASCL1 emelkedett expressziója független negatív prognosztikai faktornak bizonyult. A humán SCLC sejtvonalak proteomikai és sejtvitalitási vizsgálatai eltérő sebezhetőségi profilokat mutattak ki, amelyeket a transzkripciós szabályozók határoznak meg.

6.2. Kvantitatív proteomikai adataink rávilágítottak, hogy a négy molekuláris SCLC altípus fehérjeszinten egyértelműen megkülönböztethető. A sejtvonalak változatos neuroendokrin és epiteliális-mesenchymális jellemzőket mutattak, amelyek altípusonként eltérőek voltak. Összesen 367 olyan fehérjét azonosítottunk

sejtpelletben és 34-et sejttenyésztő médiumban, amelyek valamelyik altípusban jelentős túl- vagy alulszabályozást mutattak, köztük ismert gyógyszeresen célozható fehérjéket és potenciális véralapú markereket. Az SCLC-sejtvonalakból származó transzkriptum és a kapcsolódó útvonalak párhuzamos vizsgálata az egyes altípusok egyedi szignatúráit mutatta ki, mint például az oxidatív foszforiláció túlszabályozása az SCLC-A-ban, a DNS-replikáció az SCLC-N-ben, a neurotropin jelátvitel az SCLC-P-ben és az epitheliális-mesenchymális átmenet az SCLC-Y esetében. Fontos, hogy a YAP1 által vezérelt altípust azonosítottuk a leginkább eltérő SCLC alcsoportként. A legkisebb négyzetek diszkriminancia-analízisét alkalmazva olyan fehérjéket azonosítottunk, amelyek expressziós mintázatuk alapján egyértelműen megkülönböztetik a négy SCLC altípust, beleértve az SCLC-Y potenciális diagnosztikai markereit (pl. GPX8, PKD2 és UFO).

6.3. Meghatároztuk a CD47 és a PD-L1 expressziós mintázatát és klinikopatológiai és prognosztikai jelentőségét sebészileg reszekált SCLC betegek eddigi legnagyobb nemzetközi kohorszában. Kimutattuk, hogy a CD47 nagymértékben jelen van az SCLC mintákban, és a stromális PD-L1 expresszió prognosztikai biomarkerként szolgálhat az SCLC kedvező kimenetelének szempontjából. Ezenkívül a sebészileg kezelt SCLC-betegek optimális túlélési kimenetelének szempontjából releváns tényezőként azonosítottuk a különböző demográfiai jellemzőket és terápiás módokat.

6.4. Megállapítottuk, hogy a STING és az MHCII kifejeződik az SCLC-ben. Az immuninfiltráció meghatározása a tumor kompartmentek szerint kritikus az SCLC progressziója szempontjából. Az immunsejtes infiltráció, különösen a CD8+ citotoxikus T-sejtek sűrűsége prognosztikus a korlátozott stádiumú SCLC betegeknél. Továbbá a STING expressziója a tumorfészekben prognosztikus az immuninfiltrált tumorokban, és így a STING potenciális terápiás célpont SCLC-ben.

6.5. Bár az SCLC molekuláris altípusainak specifikus genetikai és proteomikai térképe közelebb visz minket az egyénre szabott terápiákhoz, az altípus-specifikus terápiás sebezhetőségek kifejeződése és eloszlása még mindig ellentmondásos az SCLC-ben. Vizsgálatainkban az SCLC-A és SCLC-P altípusokban szignifikánsan emelkedett BCL-2 szintet mutattunk ki, ami arra utal, hogy a venetoclax ígéretes altípus-specifikus terápiás szer lehet ezekben az alcsoportokban. Ezen túlmenően azt is kimutattuk, hogy a BCL2 magas SCLC-sejtvonalak venetoclax-rezisztenciája elsősorban az anti-apoptotikus fehérje MCL-1 magas expressziójának és a pro-apoptotikus fehérje BAX alacsony expressziójának köszönhető. E vizsgálatot megelőzően a BCL-2 és az MCL-1 egyidejű farmakológiai célzásának megvalósíthatósága bizonytalan volt SCLC-ben. Tanulmányunk preklinikai bizonyítékot szolgáltat arra vonatkozóan, hogy a BCL-2/MCL-1 venetoclaxszal és S63845-tel történő kettős gátlása hatékony megközelítés lehet a venetoclax rezisztencia leküzdésére a magas BCL-2-expresszázó SCLC-kben. Mindazonáltal az MCL-1 és BCL-2 gátlás hatásának maximalizálásához intakt BAX szükséges. Összességében, amellett, hogy feltártuk a BCL-2 altípus-specifikus jellegét és fényt derítettünk a venetoclax rezisztencia mechanizmusára humán SCLC-ben, vizsgálatunk igazolja, hogy a BCL-2 és az MCL-1 egyidejű célzása hatékony stratégia a SCLC növekedésének gátlására in vitro és in vivo. Mindazonáltal a kettős BCL-2/MCL-1 gátlásának jogosultsága SCLC-ben további preklinikai validálást igényel, mielőtt klinikai tesztelésére sor kerülne.

7. Közlemények

7.1. Az értekezés alapját képező (a PhD fokozat elnyerése (2004) után született) közlemények

1. Megyesfalvi Z, Heeke S, Drapkin BJ, Solta A, Kovacs I, Boettiger K, Horvath L, Ernhofer B, Fillinger J, Renyi-Vamos F, Aigner C, Schelch K, Lang C, Marko-Varga G, Gay CM, Byers LA, Morris BB, Heymach JV, Van Loo P, Hirsch FR, **Dome B**. Unfolding the secrets of small cell lung cancer progression: Novel approaches and insights through rapid autopsies. *Cancer Cell* 2023; 41:1535-1540. (IF: 50.3)
2. Megyesfalvi Z, Gay CM, Popper H, Pirker R, Ostoros G, Heeke S, Lang C, Hoetzenecker K, Schwendenwein A, Boettiger K, Bunn PA Jr, Renyi-Vamos F, Schelch K, Prosch H, Byers LA, Hirsch FR, **Dome B**. Clinical insights into small cell lung cancer: Tumor heterogeneity, diagnosis, therapy, and future directions. *CA Cancer J Clin* 2023 Jun 17. doi: 10.3322/caac.21785. Epub ahead of print. (IF: 254.7)
3. Megyesfalvi Z, Bárány N, Valkó Z, Bugyik E, Paku S, Berta J, Lantos A, Fillinger J, Moldvay J, Bogos K, Rezeli M, Gálffy G, Lang C, Lohinai Z, Hécz R, Lovas T, Rényi-Vámos F, László V, **Döme B**. A kissejtes tüdőrák heterogenitásának biológiai és klinikopatológiai jelentősége. *Magy Onkol* 2020; 64:243-255.
4. Megyesfalvi Z, Barany N, Lantos A, Valko Z, Pipek O, Lang C, Schwendenwein A, Oberndorfer F, Paku S, Ferencz B, Dezso K, Fillinger J, Lohinai Z, Moldvay J, Galfy G, Szeitz B, Rezeli M, Rivard C, Hirsch FR, Brcic L, Popper H, Kern I, Kovacevic M, Skarda J, Mittak M, Marko-Varga G, Bogos K, Renyi-Vamos F, Hoda MA, Klikovits T, Hoetzenecker K, Schelch K, Laszlo V*, **Dome B**. Expression patterns and prognostic relevance of subtype-specific transcription factors in surgically resected small-cell lung cancer: an international multicenter study. *J Pathol* 2022; 257:674-686. (IF: 7.3)
5. Szeitz B, Megyesfalvi Z, Woldmar N, Valkó Z, Schwendenwein A, Bárány N, Paku S, László V, Kiss H, Bugyik E, Lang C, Szász AM, Pizzatti L, Bogos K, Hoda MA, Hoetzenecker K, Marko-Varga G, Horvatovich P, **Döme B***[#], Schelch K[#], Rezeli M*[,]. In-depth proteomic analysis reveals unique subtype-specific signatures in human small-cell lung cancer. *Clin Transl Med* 2022; 12:e1060. (IF: 10.6) *levelező szerzők, [#]utolsó szerzők
6. Lang C, Lantos A, Megyesfalvi Z, Egger F, Hoda MA, Mosleh B, Klikovits T, Oberndorfer F, Timelthaler G, Ferencz B, Fillinger J, Schwendenwein A, Querner AS, Boettiger K, Renyi-Vamos F, Hoetzenecker K, Laszlo V, Schelch K, **Dome B**. Clinical and prognostic implications of CD47 and PD-L1 expression in surgically resected small-cell lung cancer. *ESMO Open* 2022; 7:100631. (IF: 7.3)
7. Dora D, Rivard C, Yu H, Pickard SL, Laszlo V, Harko T, Megyesfalvi Z, Gerdan C, Dinya E, Hoetzenecker K, Hirsch FR, Lohinai Z, **Dome B**. Protein Expression of immune checkpoints STING and MHCII in small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2023; 72:561-578. (IF: 5.8)
8. Valko Z, Megyesfalvi Z, Schwendenwein A, Lang C, Paku S, Barany N, Ferencz B, Horvath-Rozsas A, Kovacs I, Schlegl E, Pozonec V, Boettiger K, Rezeli M, Marko-Varga G, Renyi-Vamos F, Hoda MA, Klikovits T, Hoetzenecker K, Grusch M, Laszlo V, **Dome B***, Schelch K*. Dual targeting of BCL-2 and MCL-1 in the presence of BAX breaks venetoclax resistance in human small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2023; 128:1850-1861. (IF: 8.8) *levelező és utolsó szerzők

7.2. További, a PhD fokozat elnyerése (2004) után született, saját közlemények

Schelch K, Emminger D, Zitta B, Johnson TG, Kopatz V, Eder S, Ries A, Stefanelli A, Heffeter P, Hoda MA, Hoetzenecker K, **Dome B**, Berger W, Reid G, Grusch G. Targeting YB-1 via entinostat enhances cisplatin sensitivity of pleural mesothelioma in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2023, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216395>

Kerpel-Fronius A[#], Megyesfalvi Z, Markóczy Z, Solymosi D, Csányi P, Tisza J, Kecskés A, Baranyi B, Csánky E, Dóka A, Gálffy G, Göcző K, Győry C, Horváth Z, Juhász T, Kállai A, Kincses ZT, Király Z, Király-Incze E, Kostyál L, Kovács A, Kovács A, Kuczkó E, Makra Z, Maurovich-Horváth P, Merth G, Moldoványi I, Müller V, Pápai-Székely Z, Papp D, Polgár C, Rózsa P, Sárosi V, Szalai Z, Székely A, Szuhács M, Tárnoki D, Tavaszi G, Túróczi-Kirizs R, Tóth L, Urbán L, Vaskó A, Vigh E, **Dome B**^{*#}, Bogos K*. HUNCHEST-II contributes to a shift to earlier-stage lung cancer detection: final results of a nationwide screening program. *Eur Radiol* (accepted) *co-senior authors, # co-corresponding authors

Stockhammer P, Baumeister H, Ploenes T, Bonella F, Theegarten D, **Dome B**, Pirker C, Berger W, Schuler M, Aigner C, Hegedus B. Krebs von den Lungen 6 (KL-6) is a Novel Diagnostic and Prognostic Biomarker in Pleural Mesothelioma. *Lung Cancer* 2023; 185:107360.

Solta A, Boettiger K, Kovács I, Lang C, Megyesfalvi Z, Ferk F, Mišík M, Hoetzenecker K, Aigner C, Kowol CR, Knasmueller S, Grusch M, Szeitz B, Rezel M, **Dome B**^{*}, Schelch K*. Entinostat enhances the efficacy of chemotherapy in small cell lung cancer through S-phase arrest and decreased base excision repair. *Clin Cancer Res* (accepted) *co-senior and corresponding authors

Ries A, Slany A, Pirker C, Mader JC, Mejri D, Mohr T, Schelch K, Flehberger D, Maach N, Hashim M, Hoda MA, **Dome B**, Krupitza G, Berger W, Gerner C, Holzmann K, Grusch M. Primary and hTERT-Transduced Mesothelioma-Associated Fibroblasts but Not Primary or hTERT-Transduced Mesothelial Cells Stimulate Growth of Human Mesothelioma Cells. *Cells* 2023; 12:2006.

Gyulai M, Megyesfalvi Z, Reiniger L, Harko T, Ferencz B, Karsko L, Agocs L, Fillinger J, **Dome B**, Szallasi Z, Moldvay J. PD-1 and PD-L1 expression in rare lung tumors. *Pathol Oncol Res* 2023; 29:1611164.

Dora D, Rivard C, Yu H, Bunn P, Suda K, Ren S, Lueke Pickard S, Laszlo V, Harko T, Megyesfalvi Z, Moldvay J, Hirsch FR, **Dome B**^{*}, Lohinai Z*. Neuroendocrine subtypes of small cell lung cancer differ in terms of immune microenvironment and checkpoint molecule distribution. *Mol Oncol* 2020; 14:1947-1965. *levelező szerzők

Mosleh B, Schelch K, Mohr T, Klikovits T, Wagner C, Ratzinger L, Dong Y, Sinn K, Ries A, Berger W, Grasl-Kraupp B, Hoetzenecker K, Laszlo V, **Dome B**, Hegedus B, Jakopovic M, Hoda MA, Grusch M. Circulating FGF18 is decreased in pleural mesothelioma but not correlated with disease prognosis. *Thorac Cancer* 2023; 14:2177-2186.

Lohinai Z*, Megyesfalvi Z, Suda K, Harko T, Ren S, Moldvay J, Laszlo V, Rivard C, **Dome B**^{*}, Hirsch FR. Comparative expression analysis in small cell lung carcinoma reveals neuroendocrine pattern change in primary tumor versus lymph node metastases. *Transl Lung Cancer Res* 2019; 8:938-950. *levelező szerzők

Lang C, Egger F, Hoda M A, Querner A S, Ferencz B, Lungu V, Szegedi R, Bogyo L, Torok K, Oberndorfer F, Klikovits T, Schwendenwein A, Boettiger K, Renyi-Vamos F, Hoetzenecker K, Schelch K, Megyesfalvi

Z, **Dome B**. Lymphocyte-to-monocyte ratio is an independent prognostic factor in surgically treated small cell lung cancer: An international multicenter analysis. *Lung Cancer* 2022; 169:40-46.

Barany N, Rozsas A, Megyesfalvi Z, Grusch M, Hegedus B, Lang C, Boettiger K, Schwendenwein A, Tisza A, Renyi-Vamos F, Schelch K, Hoetzenecker K, Hoda MA, Paku S, Laszlo V, **Dome B**. Clinical relevance of circulating activin A and follistatin in small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2021; 161:128-135.

Ferencz B, Megyesfalvi Z, Csende K, Fillinger J, Poór V, Lantos A, Pipek O, Sólyom-Tisza A, Rényi-Vámos F, Schelch K, Lang C, Schwendenwein A, Boettiger K, László V, Hoetzenecker K, **Döme B***, Berta J*. Comparative expression analysis of immune-related markers in surgically resected lung neuroendocrine neoplasms. *Lung Cancer* 2023; 181:107263. *co-senior and corresponding authors

Tisza A, Klikovits T, Benej M, Torok S, Szeitz B, Valko Z, Hoda MA, Hegedus B, Bonta M, Nischkauer W, Hoetzenecker K, Limbeck A, Schelch K, Laszlo V, Megyesfalvi Z, **Dome B**. Laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry analysis reveals differences in chemotherapeutic drug distribution in surgically resected pleural mesothelioma. *Br J Clin Pharmacol*. 2023 Jun 5. doi: 10.1111/bcp.15813. Epub ahead of print.

Seelbinder B, Lohinai Z, Vazquez-Urbe R, Brunke S, Chen X, Mirhakkak M, Lopez-Escalera S, **Dome B**, Megyesfalvi Z, Berta J, Galffy G, Dulka E, Wellejus A, Weiss GJ, Bauer M, Hube B, Sommer MOA. Candida expansion in the gut of lung cancer patients associates with anecological signature that supports growth under dysbiotic conditions. *Nat Commun* 2023; 14:2673.

Dora D, Ligeti B, Kovacs T, Revisnyei P, Galffy G, Dulka E, Krizsán D, Megyesfalvi Z, **Dome B***, Weiss GJ, Lohinai Z*. Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Anti-PD1 Immunotherapy Show Distinct Microbial Signatures and Metabolic Pathways According to Clinical Outcomes. *Oncoimmunology* 2023; 12:2204746. *co-corresponding authors

Ries A, Flehberger D, Slany A, Pirker C, Mader JC, Mohr T, Schelch K, Sinn K, Mosleh B, Hoda MA, **Dome B**, Dolznig H, Krupitza G, Müllauer L, Gerner C, Berger W, Grusch M. Mesothelioma-associated fibroblasts enhance proliferation and migration of pleural mesothelioma cells via c-Met/PI3K and WNT signaling but do not protect against cisplatin. *J Exp Clin Cancer Res* 2023; 42:27.

Schelch K, Eder S, Zitta B, Phimmachanh M, Johnson TG, Emminger D, Wenninger-Weinzierl A, Sturtzel C, Popliment H, Ries A, Hoetzenecker K, Hoda MA, Berger W, Distel M, **Dome B**, Reid G, Grusch M. YB-1 regulates mesothelioma cell migration via snail but not EGFR, MMP1, EPHA5 or PARK2. *Mol Oncol* 2022 Dec 22. doi: 10.1002/1878-0261.13367.

Woldmar N, Schwendenwein A, Kuras M, Szeitz B, Boettiger K, Tisza A, László V, Reiniger L, Bagó AG, Szállási Z, Moldvay J, Szász AM, Malm J, Horvatovich P, Pizzatti L, Domont GB, Rényi-Vámos F, Hoetzenecker K, Hoda MA, Marko-Varga G, Schelch K, Megyesfalvi Z, Rezeli M, **Döme B**. Proteomic analysis of brain metastatic lung adenocarcinoma reveals intertumoral heterogeneity and specific alterations associated with the timing of brain metastases. *ESMO Open* 2023; 8:100741.

Berta J, Rózsás A, Megyesfalvi Z, Ostoros G, **Döme B**. Thoracic irradiation as consolidation therapy in patients with extensive-stage small cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* 2023; 35:54-60.

Kovacs I, Bugyik E, Dezso K, Tarnoki-Zach J, Mehes E, Gulyas M, Czirok A, Lang E, Grusch M, Schelch K, Hegedus B, Horvath I, Barany N, Megyesfalvi Z, Tisza A, Lohinai Z, Hoda MA, Hoetzenecker K, Pezzella F, Paku S, Laszlo V, **Dome B***. Malignant pleural mesothelioma nodules remodel their surroundings to vascularize and grow. *Transl Lung Cancer Res* 2022; 11:991-1008.

Sinn K, Mosleh B, Steindl A, Zoechbauer-Mueller S, Dieckmann K, Widder J, Steiner E, Klepetko W, Hoetzenecker K, Laszlo V, **Dome B**, Klikovits T, Hoda MA. Neoadjuvant chemoradiotherapy is superior to chemotherapy alone in surgically treated stage III/N2 non-small-cell lung cancer: a retrospective single-center cohort study. *ESMO Open* 2022; 7:100466.

Ramsheh MY, Haldar K, Esteve-Codina A, Purser LF, Richardson M, Müller-Quernheim J, Greulich T, Nowinski A, Barta I, Stendardo M, Boschetto P, Korzybski D, Prasse A, Parr DG, Hohlfeld JM, **Döme B**, Welte T, Heath S, Gut I, Morrissey JA, Ziegler-Heitbrock L, Barer MR, Singh D, Brightling CE. Lung microbiome composition and bronchial epithelial gene expression in patients with COPD versus healthy individuals: a bacterial 16S rRNA gene sequencing and host transcriptomic analysis. *Lancet Microbe* 2021; 2:e300-e310.

Kerpel-Fronius A, Monostori Z, Kovacs G, Ostoros G, Horvath I, Solymosi D, Pipek O, Szatmari F, Kovacs A, Markoczy Z, Rojko L, Renyi-Vamos F, Hoetzenecker K, Bogos K, Megyesfalvi Z, **Dome B**^{*,#}. Nationwide lung cancer screening with low-dose computed tomography: implementation and first results of the HUNCHEST screening program. *Eur Radiol* 2022; 32:4457-4467.

Miyahara N, Benazzo A, Oberndorfer F, Iwasaki A, Laszlo V, **Döme B**, Hoda MA, Jaksch P, Klepetko W, Hoetzenecker K. MiR-21 in Lung Transplant Recipients With Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Transpl Int* 2022; 35:10184.

Marfil-Sánchez A, Seelbinder B, Ni Y, Varga J, Berta J, Hollosi V, **Dome B**, Megyesfalvi Z, Dulka E, Galffy G, Weiss GJ, Panagiotou G, Lohinai Z. Gut microbiome functionality might be associated with exercise tolerance and recurrence of resected early-stage lung cancer patients. *PLoS One* 2021; 16:e0259898.

Radeczky P, Moldvay J, Fillinger J, Szeitz B, Ferencz B, Boettiger K, Rezeli M, Bogos K, Renyi-Vamos F, Hoetzenecker K, Hegedus B, Megyesfalvi Z, **Dome B**^{*,#}. Bone-Specific Metastasis Pattern of Advanced-Stage Lung Adenocarcinoma According to the Localization of the Primary Tumor. *Pathol Oncol Res* 2021; 27:1609926.

Oo HZ, Lohinai Z, Khazamipour N, Lo J, Kumar G, Pihl J, Adomat H, Nabavi N, Behmanesh H, Zhai B, Dagil R, Choudhary S, Gustavsson T, Clausen TM, Esko JD, Allen JW, Thompson MA, Tran NL, Moldvay J, **Dome B**, Salanti A, Al-Nakouzi N, Weiss GJ, Daugaard M. Oncofetal Chondroitin Sulfate Is a Highly Expressed Therapeutic Target in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers* 2021; 13:4489.

Kim TY, Lee B, Kim Y, Sugihara Y, Rezeli M, Szasz AM, **Dome B**, Marko-Varga G, Kwon HJ. Matrix-assisted laser desorption ionization - mass spectrometry imaging of erlotinib reveals a limited tumor tissue distribution in a non-small-cell lung cancer mouse xenograft model. *Clin Transl Med* 2021; 11:e481.

Breitenecker K, Homolya M, Luca AC, Lang V, Trenk C, Petroczi G, Mohrherr J, Horvath J, Moritsch S, Haas L, Kurnaeva M, Eferl R, Stoiber D, Moriggl R, Bilban M, Obenauf AC, Ferran C, **Dome B**, Laszlo V, Györfy B, Dezso K, Moldvay J, Casanova E, Moll HP. Down-regulation of A20 promotes immune escape of lung adenocarcinomas. *Sci Transl Med* 2021; 13:eabc3911.

Dora D, Rivard C, Yu H, Pickard SL, Laszlo V, Harko T, Megyesfalvi Z, Dinya E, Gerdan C, Szegvari G, Hirsch FR, **Dome B**^{*}, Lohinai Z^{*}. Characterization of Tumor-Associated Macrophages and the Immune Microenvironment in Limited-Stage Neuroendocrine-High and -Low Small Cell Lung Cancer. *Biology* 2021; 10:502. ^{*}co-corresponding authors

Esteve-Codina A, Hofer TP, Burggraf D, Heiss-Neumann MS, Gesierich W, Boland A, Olaso R, Bihoreau MT, Deleuze JF, Moeller W, Schmid O, Soler Artigas M, Renner K, Hohlfeld JM, Welte T, Fuehner T, Jerrentrup L, Koczulla AR, Greulich T, Prasse A, Müller-Quernheim J, Gupta S, Brightling C, Subramanian DR, Parr DG, Kolsum U, Gupta V, Barta I, **Döme B**, Strausz J, Stendardo M, Piattella M, Boschetto P, Korzybski D, Gorecka D, Nowinski A, Dabad M, Fernández-Callejo M, Endesfelder D, Zu Castell W, Hiemstra PS, Venge P, Noessner E, Griebel T, Heath S, Singh D, Gut I, Ziegler-Heitbrock L. Gender specific airway gene expression in COPD sub-phenotypes supports a role of mitochondria and of different types of leukocytes. *Sci Rep* 2021; 11:12848.

Breic L, Klikovits T, Megyesfalvi Z, Mosleh B, Sinn K, Hritcu R, Laszlo V, Cufer T, Rozman A, Kern I, Mohorcic K, Jakopovic M, Samarzija M, Seiwerth S, Kolek V, Fischer O, Jakubec P, Škarda J, Gieszer B, Hegedus B, Fillinger J, Renyi-Vamos F, Buder A, Bilecz A, Berger W, Grusch M, Hoetzenecker K, Klepetko W, Hoda MA, Filipits M, **Dome B**. Prognostic impact of PD-1 and PD-L1 expression in malignant pleural mesothelioma: an international multicenter study. *Transl Lung Cancer Res* 2021; 10:1594-1607.

Ni Y, Lohinai Z, Heshiki Y, **Dome B**, Moldvay J, Dulka E, Galffy G, Berta J, Weiss GJ, Sommer MOA, Panagiotou G. Distinct composition and metabolic functions of human gut microbiota are associated with cachexia in lung cancer patients. *ISME J.* 2021;15:3207-3220.

Schwendenwein A, Megyesfalvi Z, Barany N, Valko Z, Bugyik E, Lang C, Ferencz B, Paku S, Lantos A, Fillinger J, Rezeli M, Marko-Varga G, Bogos K, Galffy G, Renyi-Vamos F, Hoda MA, Klepetko W, Hoetzenecker K, Laszlo V, **Dome B**. Molecular profiles of small cell lung cancer subtypes: therapeutic implications. *Mol Ther Oncolytics* 2021;20:470-483.

Radeczky P, Megyesfalvi Z, Laszlo V, Fillinger J, Moldvay J, Raso E, Schlegl E, Barbai T, Timar J, Renyi-Vamos F, **Dome B***, Hegedus B*. The effects of bisphosphonate and radiation therapy in bone-metastatic lung adenocarcinoma: the impact of KRAS mutation. *Transl Lung Cancer Res* 2021; 10:675-684. *co-senior and co-corresponding authors

Gieszer B, Megyesfalvi Z, Dulai V, Papay J, Kovalszky I, Timar J, Fillinger J, Harko T, Pipek O, Teglas V, Regos E, Papp G, Szallasi Z, Laszlo V, Renyi-Vamos F, Galffy G, Bodor C, **Dome B***, Moldvay J*. EGFR variant allele frequency predicts EGFR-TKI efficacy in lung adenocarcinoma: a multicenter study. *Transl Lung Cancer Res* 2021; 10:662-674. *co-senior and co-corresponding authors

Berta J, Török S, Tárnoki-Zách J, Drozdovszky O, Tóvári J, Paku S, Kovács I, Czirók A, Masri B, Megyesfalvi Z, Oskolás H, Malm J, Ingvar C, Markó-Varga G, **Döme B***, László V*. Apelin promotes blood and lymph vessel formation and the growth of melanoma lung metastasis. *Sci Rep* 2021; 11:5798. *co-senior and co-corresponding authors

Hegedüs L, Okumus Ö, Livingstone E, Baranyi M, Kovács I, **Döme B**, Tóvári J, Bánkfalvi Á, Schadendorf D, Aigner C, Hegedüs B. Allosteric and ATP-Competitive MEK-Inhibition in a Novel Spitzoid Melanoma Model with a RAF- and Phosphorylation-Independent Mutation. *Cancers* 2021; 13:829.

Megyesfalvi Z, Tallosy B, Pipek O, Fillinger J, Lang C, Klikovits T, Schwendenwein A, Hoda MA, Renyi-Vamos F, Laszlo V, Rezeli M, Moldvay J, **Dome B**. The landscape of small cell lung cancer metastases: Organ specificity and timing. *Thorac Cancer* 2021; 12:914-923.

Kuras M, Woldmar N, Kim Y, Hefner M, Malm J, Moldvay J, **Döme B**, Fillinger J, Pizzatti L, Gil J, Marko-Varga G, Rezeli M. Proteomic Workflows for High-Quality Quantitative Proteome and Post-Translational Modification Analysis of Clinically Relevant Samples from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Archives. *J Proteome Res* 2021; 20:1027-1039.

Tarnoki-Zach J, Stockhammer P, Isai DG, Mehes E, Szeder B, Kovacs I, Bugyik E, Paku S, Berger W, Thomas SM, Neufeld Z, **Dome B**, Hegedus B, Czirok A. Multicellular contractility contributes to the emergence of mesothelioma nodules. *Sci Rep* 2020; 10:20114.

Sabdyusheva Litschauer I, Becker K, Saghafi S, Ballke S, Bollwein C, Foroughipour M, Gaugeler J, Foroughipour M, Schavelová V, László V, **Döme B**, Brostjan C, Weichert W, Dodt HU. 3D histopathology of human tumours by fast clearing and ultramicroscopy. *Sci Rep* 2020; 10:17619.

Rojko L, Megyesfalvi Z, Czibula E, Reiniger L, Teglas V, Szegedi Z, Szallasi Z, **Dome B**, Moldvay J. Longitudinal analysis of complete blood count parameters in advanced-stage lung cancer patients. *Thorax Cancer* 2020; 11:3193-3204.

Kim TY, Ji ES, Lee JY, Kim JY, Yoo JS, Szasz AM, **Dome B**, Marko-Varga G, Kwon HJ. DNA Polymerase Alpha Subunit B Is a Binding Protein for Erlotinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers* 2020; 12:2613.

Hegedüs L, Rittler D, Garay T, Stockhammer P, Kovács I, **Döme B**, Theurer S, Hager T, Herold T, Kalbourtzis S, Bankfalvi A, Schmid KW, Führer D, Aigner C, Hegedüs B. HDAC Inhibition Induces PD-L1 Expression in a Novel Anaplastic Thyroid Cancer Cell Line. *Pathol Oncol Res* 2020; 26:2523-2535.

Ghimessy A, Radeczky P, Laszlo V, Hegedus B, Renyi-Vamos F, Fillinger J, Klepetko W, Lang C, **Dome B***, Megyesfalvi Z*. Current therapy of KRAS-mutant lung cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2020; 39:1159-1177. *co-senior and co-corresponding authors

Kelemen O, Pla I, Sanchez A, Rezel M, Szasz AM, Malm J, Laszlo V, Kwon HJ, **Dome B***, Marko-Varga G*. Proteomic analysis enables distinction of early- versus advanced-stage lung adenocarcinomas. *Clin Transl Med* 2020; 10:e106. *co-senior and co-corresponding authors

Pirker C, Bilecz A, Grusch M, Mohr T, Heidenreich B, Laszlo V, Stockhammer P, Lötsch-Gojo D, Gojo J, Gabler L, Spiegl-Kreinecker S, **Dome B**, Steindl A, Klikovits T, Hoda MA, Jakopovic M, Samarzija M, Mohorcic K, Kern I, Kiesel B, Brcic L, Oberndorfer F, Müllauer L, Klepetko W, Schmidt WM, Kumar R, Hegedus B, Berger W. Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Mutations Identify a Genomically Defined and Highly Aggressive Human Pleural Mesothelioma Subgroup. *Clin Cancer Res* 2020; 26:3819-3830.

Bilecz A, Stockhammer P, Theegarten D, Kern I, Jakopovic M, Samarzija M, Klikovits T, Hoda MA, **Döme B**, Oberndorfer F, Muellauer L, Fillinger J, Kovács I, Pirker C, Schuler M, Plönes T, Aigner C, Klepetko W, Berger W, Brcic L, Laszlo V, Hegedus B. Comparative analysis of prognostic histopathologic parameters in subtypes of epithelioid pleural mesothelioma. *Histopathology* 2020; 77:55-66.

Hwang HY, Kim TY, Szász MA, **Dome B**, Malm J, Marko-Varga G, Kwon HJ. Profiling the Protein Targets of Unmodified Bio-Active Molecules with Drug Affinity Responsive Target Stability and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Proteomics* 2020 ;20:e1900325.

Thun GA, Derdak S, Castro-Giner F, Apunte-Ramos K, Águeda L, Wjst M, Boland A, Deleuze JF, Kolsum U, Heiss-Neumann MS, Nowinski A, Gorecka D, Hohlfeld JM, Welte T, Brightling CE, Parr DG, Prasse A, Müller-Quernheim J, Greulich T, Stendardo M, Boschetto P, Barta I, **Döme B**, Gut M, Singh D, Ziegler-Heitbrock L, Gut IG. High degree of polyclonality hinders somatic mutation calling in lung brush samples of COPD cases and controls. *Sci Rep* 2019; 9:20158.

Janik S, Bekos C, Hacker P, Raunegger T, Schiefer AI, Müllauer L, Veraar C, **Dome B**, Klepetko W, Ankersmit HJ, Moser B. Follistatin impacts Tumor Angiogenesis and Outcome in Thymic Epithelial Tumors. *Sci Rep* 2019; 9:17359.

Ghimessy AK, Gellert A, Schlegl E, Hegedus B, Raso E, Barbai T, Timar J, Ostoros G, Megyesfalvi Z, Gieszer B, Moldvay J, Renyi-Vamos F, Lohinai Z, Hoda MA, Klikovits T, Klepetko W, Laszlo V*, **Dome B***. KRAS Mutations Predict Response and Outcome in Advanced Lung Adenocarcinoma Patients Receiving First-Line Bevacizumab and Platinum-Based Chemotherapy. *Cancers* 2019; 11. pii: E1514. IF: 6.126

Vlacic G, Hoda MA, Klikovits T, Sinn K, Gschwandtner E, Mohorcic K, Schelch K, Pirker C, Peter-Vörösmarty B, Brankovic J, **Dome B**, Laszlo V, Cufer T, Rozman A, Klepetko W, Grasl-Kraupp B, Hegedus B, Berger W, Kern I, Grusch M. Expression of FGFR1-4 in Malignant Pleural Mesothelioma Tissue and Corresponding Cell Lines and its Relationship to Patient Survival and FGFR Inhibitor Sensitivity. *Cells* 2019; 8. pii: E1091.

Mohrherr J, Haber M, Breitenacker K, Aigner P, Moritsch S, Voronin V, Eferl R, Moriggl R, Stoiber D, Györfy B, Brcic L, László V, **Döme B**, Moldvay J, Dezső K, Bilban M, Popper H, Moll HP, Casanova E. JAK-STAT inhibition impairs K-RAS-driven lung adenocarcinoma progression. *Int J Cancer* 2019; 145:3376-3388.

Lohinai Z*, Megyesfalvi Z, **Dome B***, Weiss GJ. Next-generation Sequencing May Discriminate Extreme Long-term versus Short-term Survival in Patients with Metastatic Small-Cell Lung Cancer (SCLC). *Transl Oncol* 2019; 12:1539-1548. IF: 3.558 *co-corresponding authors

Biswas D, Birkbak NJ, Rosenthal R, Hiley CT, Lim EL, Papp K, Boeing S, Krzystanek M, Djureinovic D, La Fleur L, Greco M, **Döme B**, Fillinger J, Brunnström H, Wu Y, Moore DA, Skrzypski M, Abbosh C, Litchfield K, Al Bakir M, Watkins TBK, Veeriah S, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Moldvay J, Botling J, Chinnaiyan AM, Micke P, Hackshaw A, Bartek J, Csabai I, Szallasi Z, Herrero J, McGranahan N, Swanton C; TRACERx Consortium. A clonal expression biomarker associates with lung cancer mortality. *Nat Med* 2019; 25:1540-1548. IF: 36,13

Lohinai Z, Bonanno L, Aksarin A, Pavan A, Megyesfalvi Z, Santa B, Hollosi V, Hegedus B, Moldvay J, Conte P, Ter-Ovanesov M, Bilan E, **Dome B**, Weiss GJ. Neutrophil-lymphocyte ratio is prognostic in early stage resected small-cell lung cancer. *PeerJ*. 2019; 7:e7232. IF: 2.379

Uribealago I, Hoffmann D, Zhang Y, Kavirayani A, Lazovic J, Berta J, Novatchkova M, Pai TP, Wimmer RA, László V, Schramek D, Karim R, Tortola L, Deswal S, Haas L, Zuber J, Szűcs M, Kuba K, **Dome B**, Cao Y, Haubner BJ, Penninger JM. Apelin inhibition prevents resistance and metastasis associated with anti-angiogenic therapy. *EMBO Mol Med* 2019; 11:e9266. IF: 8,821

Téglási V, Pipek O, Lózsa R, Berta K, Szüts D, Harkó T, Vadász P, Rojkó L, **Döme B**, Bagó AG, Tímár J, Moldvay J, Szállási Z, Reiniger L. PD-L1 Expression of Lung Cancer Cells, Unlike Infiltrating Immune Cells, Is Stable and Unaffected by Therapy During Brain Metastasis. *Clin Lung Cancer* 2019; 20:363-369.e2.

Reiniger L, Téglási V, Pipek O, Rojkó L, Glasz T, Vágvölgyi A, Kovalszky I, Gyulai M, Lohinai Z, Rásó E, Tímár J, **Döme B**, Szállási Z, Moldvay J. Tumor necrosis correlates with PD-L1 and PD-1 expression in lung adenocarcinoma. *Acta Oncol* 2019; 58:1087-1094.

Laszlo V, Valko Z, Ozsvar J, Kovacs I, Garay T, Hoda MA, Klikovits T, Stockhammer P, Aigner C, Gröger M, Klepetko W, Berger W, Grusch M, Tovari J, Waizenegger IC, **Dome B***, Hegedus B*. The FAK inhibitor BI 853520 inhibits spheroid formation and orthotopic tumor growth in malignant pleural mesothelioma. *J Mol Med* 2019; 97:231-242. *co-senior and co-corresponding authors.

Radeczky P, Ghimessy ÁK, Farkas A, Csende K, Mészáros L, Török K, Fazekas L, Agócs L, Kocsis Á, Bartók T, Dancs T, Tóth KK, Schönauer N, Bogyó L, Bohács A, Madurka I, Elek J, **Döme B**, Rényi-Vámos F, Lang G, Gieszer B. Antibody-Mediated Rejection in a Multiple Lung Transplant Patient: A Case Report. *Transplant Proc* 2019; 51:1296-1298.

Ghimessy ÁK, Farkas A, Gieszer B, Radeczky P, Csende K, Mészáros L, Török K, Fazekas L, Agócs L, Kocsis Á, Bartók T, Dancs T, Tóth KK, Schönauer N, Madurka I, Elek J, **Döme B**, Rényi-Vámos F, Lang G, Taghavi S, Hötzenecker K, Klepetko W, Bogyó L. Donation After Cardiac Death, a Possibility to Expand the Donor Pool: Review and the Hungarian Experience. *Transplant Proc* 2019; 51:1276-1280.

Fazekas L, Ghimessy Á, Gieszer B, Radeczky P, Mészáros L, Török K, Bogyó L, Hartvánszky I, Pólos M, Daróczi L, Agócs L, Kocsis Á, Bartók T, Dancs T, Tóth KK, Schönauer N, Madurka I, Elek J, **Döme B**, Rényi-Vámos F, Lang G, Farkas A. Lung Transplantation in Hungary From Cardiac Surgeons' Perspective. *Transplant Proc* 2019; 51:1263-1267.

Gieszer B, Radeczky P, Farkas A, Csende K, Mészáros L, Török K, Fazekas L, Bogyó L, Agócs L, Kocsis Á, Varga J, Bartók T, Dancs T, Kormosoi Tóth K, Schönauer N, Madurka I, Elek J, **Döme B**, Rényi-Vámos F, Lang G, Jaksch P, Ghimessy ÁK. Lung Transplant Patients on Kilimanjaro. *Transplant Proc* 2019; 51:1258-1262.

Klikovits T, Lohinai Z, Fábíán K, Gyulai M, Szilasi M, Varga J, Baranya E, Pipek O, Csabai I, Szállási Z, Tímár J, Hoda MA, Laszlo V, Hegedűs B, Rényi-Vámos F, Klepetko W, Ostoros G, **Döme B***, Moldvay J*. New insights into the impact of primary lung adenocarcinoma location on metastatic sites and sequence: A multicenter cohort study. *Lung Cancer* 2018; 126:139-148. *co-senior and co-corresponding authors

Molnár E, Rittler D, Baranyi M, Grusch M, Berger W, **Döme B**, Tóvári J, Aigner C, Tímár J, Garay T, Hegedűs B. Pan-RAF and MEK vertical inhibition enhances therapeutic response in non-V600 BRAF mutant cells. *BMC Cancer* 2018; 18:542.

Laszlo V, Valko Z, Kovacs I, Ozsvar J, Hoda MA, Klikovits T, Lakatos D, Cziráok A, Garay T, Stiglbauer A, Helbich TH, Groger M, Tovari J, Klepetko W, Pirker C, Grusch M, Berger W, Hilberg F, Hegedus B*, **Dome B***. Nintedanib is active in malignant pleural mesothelioma cell models and inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Clin Cancer Res* 2018; 24:3729-3740. *co-senior and co-corresponding authors

Rojkó L, Reiniger L, Téglási V, Fábíán K, Pipek O, Vágvölgyi A, Agócs L, Fillinger J, Kajdácsi Z, Tímár J, **Döme B**, Szállási Z, Moldvay J. Chemotherapy treatment is associated with altered PD-L1 expression in lung cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018; 144:1219-1226.

Moll PM, Pranz K, Musteanu M, Grabner B, Hruschka N, Mohrherr J, Aigner P, Stiedl P, Brcic L, Laszlo V, Schramek D, Moriggl R, Eferl R, Moldvay J, Dezso K, Lopez-Casas PP, Stoiber D, Hidalgo M, Penninger J, Sibilia M, Györffy B, Barbacid M, **Dome B**, Popper H, Casanova E. Afatinib restrains K-RAS driven lung tumorigenesis. *Sci Transl Med* 2018; 10:446.

Heller G, Altenberger C, Steiner I, Topakian T, Ziegler B, Tomasich E, Lang G, End-Pfützenreuter A, Zehetmayer S, **Döme B**, Arns BM, Klepetko W, Zielinski CC, Zöchbauer-Müller S. DNA methylation of miRNA-encoding genes in non-small cell lung cancer patients. *J Pathol* 2018; 245:387-398.

Saghafi S, Haghi-Danaloo N, Becker K, Sabdyusheva I, Foroughipour M, Hahn C, Pende M, Wanis M, Bergmann M, Stift J, Hegedus B, **Dome B**, Dodt HU. Reshaping a multimode laser beam into a constructed Gaussian beam for generating a thin light sheet. *J Biophotonics* 2018; 11:e201700213.

Bugyik E, Szabó V, Dezső K, Rókusz A, Szücs A, Nagy P, Tóvári J, László V, **Döme B***, Paku S*. Role of (myo)fibroblasts in the development of vascular and connective tissue architecture in cancer. *Cancer Communications* 2018; 38:46. IF: 3.6 *co-senior and co-corresponding authors

Schelch K, Wagner C, Hager S, Pirker C, Siess K, Lang E, Lin R, Kirschner MB, Mohr T, Brcic L, Marian B, Holzmann K, Grasl-Kraupp B, Krupitza G, Laszlo V, Klikovits T, **Dome B**, Hegedus B, Garay T, Reid G, van Zandwijk N, Klepetko W, Berger W, Grusch M, Hoda MA. FGF2 and EGF induce epithelial-mesenchymal transition in malignant pleural mesothelioma cells via a MAPKinase/MMP1 signal. *Carcinogenesis* 2018; 39:534-545.

Fábián K, Puskás R, Kakuk T, Prés L, Fejes D, Szegedi Z, Rojkó L, Szállási Z, **Döme B**, Pipek O, Moldvay J. Renal Impairment Hampers Bisphosphonate Treatment in a Quarter of Lung Cancer Patients with Bone Metastasis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2018; 122:126-132.

Bonta M, Török S, **Döme B**, Limbeck A. Tandem LA-LIBS coupled to ICP-MS for comprehensive analysis of tumor samples. *Spectroscopy (Santa Monica)* 2017; 32, 42-46.

Klikovits T, Stockhammer P, Laszlo V, Dong Y, Hoda MA, Ghanim B, Opitz I, Frauenfelder T, Nguyen-Kim TDL, Weder W, Berger W, Grusch M, Aigner C, Klepetko W, **Dome B**, Renyi-Vamos F, Oehler R, Hegedus B. Circulating complement component 4d (C4d) correlates with tumor volume, chemotherapeutic response and survival in patients with malignant pleural mesothelioma. *Sci Rep* 2017; 7:16456.

Ghanim B, Hess S, Bertoglio P, Celik A, Bas A, Oberndorfer F, Melfi F, Mussi A, Klepetko W, Pirker C, Berger W, Harmati I, Farkas A, Jan Ankersmit H, **Dome B**, Fillinger J, Aigner C, Hegedus B, Renyi-Vamos F, Lang G. Intrathoracic solitary fibrous tumor - an international multicenter study on clinical outcome and novel circulating biomarkers. *Sci Rep* 2017; 7:12557.

Rényi-Vámos F, Radezky P, Gieszer B, Ghimessy Á, Czebe K, Török K, **Döme B**, Elek J, Klepetko W, Lang G, Madurka I. Launching the Hungarian Lung Transplantation Program. *Transplant Proc* 2017; 49:1535-1537.

Balbekova A, Bonta M, Török S, Ofner J, **Döme B**, Limbeck A, Lendl B. FTIR-spectroscopic and LA-ICP-MS imaging for combined hyperspectral image analysis of tumor models. *Analytical Methods* 2017; 9: 5464-5471.

Pilyugin M, Descloux P, André PA, Laszlo V, **Dome B**, Hegedus B, Sardy S, Janes S, Bianco A, Laurent GJ, Irmingier-Finger I. BARD1 serum autoantibodies for the detection of lung cancer. *PLoS One* 2017; 12:e0182356.

Ofner J, Brenner F, Wieland K, Eitenberger E, Kirschner J, Eisenmenger-Sittner C, Török S, **Döme B**, Konegger T, Kasper-Giebl A, Hutter H, Friedbacher G, Lendl B, Lohninger H. Image-Based Chemical Structure Determination. *Sci Rep* 2017; 7:6832.

Engel M, Endesfelder D, Schlöter-Hai B, Kublik S, Granitsiotis MS, Boschetto P, Stendardo M, Barta I, **Dome B**, Deleuze JF, Boland A, Müller-Quernheim J, Prasse A, Welte T, Hohlfeld J, Subramanian D, Parr D, Gut IG, Greulich T, Koczulla AR, Nowinski A, Gorecka D, Singh D, Gupta S, Brightling CE, Hoffmann

H, Frankenberger M, Hofer TP, Burggraf D, Heiss-Neumann M, Ziegler-Heitbrock L, Schloter M, Zu Castell W. Influence of lung CT changes in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) on the human lung microbiome. *PLoS One* 2017; 12:e0180859.

Waseda R, Klikovits T, Hoda MA, Hoetzenecker K, Bertoglio P, Dieckmann K, Zöchbauer-Müller S, Pirker R, Prosch H, **Döme B**, Klepetko W. Trimodality therapy for Pancoast tumors: T4 is not a contraindication to radical surgery. *J Surg Oncol* 2017; 116:227-235.

Téglási V, Reiniger L, Fábíán K, Pipek O, Csala I, Bagó AG, Várallyai P, Vízkeleti L, Rojkó L, Tímár J, **Döme B**, Szállási Z, Swanton C, Moldvay J. Evaluating the significance of density, localization, and PD-1/PD-L1 immunopositivity of mononuclear cells in the clinical course of lung adenocarcinoma patients with brain metastasis. *Neuro Oncol* 2017; 19:1058-1067.

Altenberger C, Heller G, Ziegler B, Tomasich E, Marhold M, Topakian T, Müllauer L, Heffeter P, Lang G, End-Pfützenreuter A, **Döme B**, Arns BM, Klepetko W, Zielinski CC, Zöchbauer-Müller S. SPAG6 and L1TD1 are transcriptionally regulated by DNA methylation in non-small cell lung cancers. *Mol Cancer* 2017; 16:1.

Bonta M, Török S, Hegedus B, **Döme B**, Limbeck A. A comparison of sample preparation strategies for biological tissues and subsequent trace element analysis using LA-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 2017; 409:1805-1814.

Lohinai Z, Klikovits T, Moldvay J, Ostoros G, Raso E, Timar J, Fabian K, Kovalszky I, Kenessey I, Aigner C, Renyi-Vamos F, Klepetko W, **Döme B***, Hegedus B*. KRAS-mutation incidence and prognostic value are metastatic site-specific in lung adenocarcinoma: poor prognosis in patients with KRAS mutation and bone metastasis. *Sci Rep* 2017; 7:39721. *co-senior and co-corresponding authors

Paku S*, Laszlo V, Dezso K, Nagy P, Hoda MA, Klepetko W, Renyi-Vamos F, Timar J, Reynolds AR*, **Döme B^{#*}**. The evidence for and against different modes of tumour cell extravasation in the lung: diapedesis, capillary destruction, necroptosis and endothelialisation. *J Pathol* 2017;241:441-447.

Buchberger E, Payrhuber D, El Harchi M, Zagrapan B, Scheuba K, Zommer A, Bugyik E, **Döme B**, Kral JB, Schrottmaier WC, Schabbauer G, Petzelbauer P, Gröger M, Bilban M, Brostjan C. Inhibition of the transcriptional repressor complex Bcl-6/BCoR induces endothelial sprouting but does not promote tumor growth. *Oncotarget* 2017;8:552-564.

Torok S, Rezeli M, Kelemen O, Vegvari A, Watanabe K, Sugihara Y, Tisza A, Marton T, Kovacs I, Tovari J, Laszlo V, Helbich TH, Hegedus B, Klikovits T, Hoda MA, Klepetko W, Paku S, Marko-Varga G, **Döme B**. Limited Tumor Tissue Drug Penetration Contributes to Primary Resistance against Angiogenesis Inhibitors. *Theranostics* 2017; 7:400-412.

Hegedüs L, Garay T, Molnár E, Varga K, Bilecz Á, Török S, Padányi R, Pászty K, Wolf M, Grusch M, Kállay E, **Döme B**, Berger W, Hegedüs B, Enyedi A. The plasma membrane Ca(2+) pump PMCA4b inhibits the migratory and metastatic activity of BRAF mutant melanoma cells. *Int J Cancer* 2017; 140:2758-2770.

Bridgeman VL, Vermeulen PB, Foo S, Bilecz A, Daley F, Kostaras E, Nathan MR, Wan E, Frentzas S, Schweiger T, Hegedus B, Hoetzenecker K, Renyi-Vamos F, Kuczynski EA, Vasudev NS, Larkin J, Gore M, Dvorak HF, Paku S, Kerbel RS, **Döme B***, Reynolds AR*. Vessel co-option is common in human lung metastases and mediates resistance to anti-angiogenic therapy in preclinical lung metastasis models. *J Pathol* 2017; 241:362-374. *co-senior and co-corresponding authors

Madaras B, Horváth Z, Gráf L, Gálffy G, Tamási L, Ostoros G, **Döme B**, Mórocz E, Bártfai Z, Prohászka Z, Kocsis J. Serum heat shock protein 70, as a potential biomarker for small cell lung cancer. *Pathol Oncol Res* 2017; 23:377–383.

Hock K, Laengle J, Kuznetsova I, Egorov A, Hegedus B, **Döme B**, Wekerle T, Sachet M, Bergmann M. Oncolytic influenza A virus expressing interleukin-15 decreases tumor growth in vivo. *Surgery* 2017; 161:735-746.

Moldvay J, Fábíán K, Jäckel M, Németh Z, Bogos K, Furák J, Tiszlavicz L, Fillinger J, **Döme B**, Schaff Z. Claudin-1 Protein Expression Is a Good Prognostic Factor in Non-Small Cell Lung Cancer, but only in Squamous Cell Carcinoma Cases. *Pathol Oncol Res* 2017; 23:151-156.

Csala I, Elemery M, Martinovszky F, Dome P, **Döme B**, Faludi G, Sandor I, Gyorffy Z, Birkas E, Lazary J. Maternal bonding styles in smokers and non-smokers: a comparative study. *Ann Gen Psychiatry* 2016 Nov 11;15:32. eCollection 2016.

Zinngrebe J, Rieser E, Taraborrelli L, Peltzer N, Hartwig T, Ren H, Kovács I, Endres C, Draber P, Darding M, von Karstedt S, Lemke J, **Döme B**, Bergmann M, Ferguson BJ, Walczak H. LUBAC deficiency perturbs TLR3 signaling to cause immunodeficiency and autoinflammation. *J Exp Med* 2016; 213:2671-2689.

Hoda MA, Pirker C, Dong Y, Schelch K, Heffeter P, Kryeziu K, van Schoonhoven S, Klikovits T, Laszlo V, Rozsas A, Ozsvar J, Klepetko W, **Döme B**, Grusch M, Hegedüs B, Berger W. Trabectedin Is Active against Malignant Pleural Mesothelioma Cell and Xenograft Models and Synergizes with Chemotherapy and Bcl-2 Inhibition In Vitro. *Mol Cancer Ther* 2016; 15:2357-2369.

Fábíán K, Gyulai M, Furák J, Várallyay P, Jäckel M, Bogos K, **Döme B**, Pápay J, Tímár J, Szállási Z, Moldvay J. Significance of Primary Tumor Location and Histology for Brain Metastasis Development and Peritumoral Brain Edema in Lung Cancer. *Oncology* 2016; 91:237-242.

Klikovits T, Lambers C, Ghanim B, **Döme B**, Murakoezy G, Zöchbauer-Müller S, Waseda R, Aigner C, Lang G, Taghavi S, Klepetko W, Jaksch P, Hoda MA. Lung transplantation in patients with incidental early stage lung cancer – institutional experience of a high volume center. *Clin Transplant* 2016; 30:912-7.

Hoda MA, Dong Y, Rozsas A, Klikovits T, Laszlo V, Ghanim B, Stockhammer P, Ozsvar J, Jakopovic M, Samarzija M, Brcic L, Bendek M, Szirtes I, Reid G, Kirschner MB, Kao SC, Opitz I, Weder W, Frauenfelder T, Nguyen-Kim TD, Aigner C, Klepetko W, van Zandwijk N, Berger W, **Döme B**, Grusch M, Hegedus B. Circulating activin A is a novel prognostic biomarker in malignant pleural mesothelioma – a multi-institutional study. *Eur J Cancer* 2016; 63:64-73.

Subramanian D, Gupta S, Burggraf D, Silberberg SJ, Heimbeck I, Heiss-Neumann MS, Haeussinger K, Newby C, Hargadon B, Raj V, Singh D, Kolsum U, Hofer TP, Al-shair K, Luetzen N, Prasse A, Müller-Quernheim J, Benea G, Leprotti S, Boschetto P, Gorecka D, Nowinski A, Oniszh K, Castell W, Hagen M, Barta I, **Döme B**, Strausz J, Greulich T, Vogelmeier C, Koczulla AR, Gut I, Hohlfeld J, Welte T, Lavae-Mokhtari M, Ziegler-Heitbrock L, Brightling C, Parr DG. Emphysema- and airways-dominant COPD phenotypes defined by standardised quantitative CT. *Eur Respir J* 2016; 48:92-103.

Nemeth Z, Csizmadia E, Vikstrom L, Li M, Bisht K, Feizi A, Otterbein S, Zuckerbraun B, Costa D, Pandolfi PP, Fillinger J, **Döme B**, Otterbein LE, Wegiel B. Alterations of Tumor Microenvironment by Carbon Monoxide Impedes Lung Cancer Growth. *Oncotarget* 2016; 7:23919-32.

Hoda MA, Rozsas A, Lang E, Klikovits T, Lohinai Z, Torok S, Berta J, Bendek M, Berger W, Hegedus B, Klepetko W, Renyi-Vamos F, Grusch M, **Dome B***, Laszlo V*. High circulating activin A level is associated with tumor progression and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 2016; 7:13388-99. *co-senior and co-corresponding authors

Bugyik E, Renyi-Vamos F, Szabo V, Dezso K, Ecker N, Rokusz A, Nagy P, **Dome B**, Paku S. Mechanisms of vascularization in murine models of primary and metastatic tumor growth. *Chin J Cancer* 2016; 35:19. IF: 4.1 (currently published as *Cancer Communications*)

Lohinai Z, Dome P, Szilagyi Z, Ostoros G, Moldvay J, Hegedus B, **Dome B***, Weiss GJ*. From bench to bedside: Attempt to evaluate repositioning of drugs in the treatment of metastatic small cell lung cancer (SCLC). *PLoS One* 2016; 11:e0144797. *shared senior authorship

Nemeth Z, Li M, Csizmadia E, **Dome B**, Johansson M, Persson JL, Seth P, Otterbein L, Wegiel B. Heme oxygenase-1 in macrophages controls prostate cancer progression. *Oncotarget* 2015; 6:33675-88.

Schelch K, Hoda MA, Hegedus B, **Dome B**, Klepetko W, Berger W, Grusch M. Targeting receptor tyrosine kinases in malignant pleural mesothelioma: Focus on FGF-receptors. *Receptors & Clinical Investigation* 2015; 2: e543.

Kwon HJ, Kim Y, Sugihara Y, Baldetorp B, Welinder C, Watanabe KI, Nishimura T, Malm J, Török S, **Döme B**, Végvári Á, Gustavsson L, Fehniger TE, Marko-Varga G. Drug compound characterization by mass spectrometry imaging in cancer tissue. *Arch Pharm Res* 2015; 38:1718-27.

Kirschner MB, Pulford E, Hoda MA, Rozsas A, Griggs K, Cheng YY, Edelman JJ, Kao SC, Hyland R, Dong Y, László V, Klikovits T, Valley MP, Grusch M, Hegedus B, **Dome B**, Klepetko W, van Zandwijk N, Klebe S, Reid G. Fibulin-3 levels in malignant pleural mesothelioma are associated with prognosis but not diagnosis. *Br J Cancer* 2015; 113:963-9.

Laszlo V, Hoda MA, Garay T, Pirker C, Ghanim B, Klikovits T, Dong YW, Rozsas A, Kenessey I, Szirtes I, Grusch M, Jakopovic M, Samarzija M, Brcic L, Kern I, Rozman A, Popper H, Zöchbauer-Müller S, Heller G, Altenberger C, Ziegler B, Klepetko W, Berger W, **Dome B***, Hegedus B*. Epigenetic downregulation of integrin $\alpha 7$ increases migratory potential and confers poor prognosis in malignant pleural mesothelioma. *J Pathol.* 2015; 237:203-14. *shared senior authorship

Welinder C, Pawłowski K, Sugihara Y, Yakovleva M, Jönsson G, Ingvar C, Lundgren L, Baldetorp B, Olsson H, Rezeli M, Jansson B, Laurell T, Fehniger T, **Dome B**, Wieslander E, Nishimura T, Marko-Varga G. A Protein Deep Sequencing Evaluation of Metastatic Melanoma Tissues. *PLoS One* 2015;10:e0123661.

Schweiger T, Nikolowsky C, Starlinger P, Traxler D, Zimmermann M, Birner P, Hegedus B, **Dome B**, Bergmann M, Mildner M, Klepetko W, Hoetzenecker K, Ankersmit HJ. Stromal expression of heat-shock protein 27 is associated with worse clinical outcome in patients with colorectal cancer lung metastases. *PLoS One* 2015; 10:e0120724.

Csala I, Egervari L, Dome P, Faludi G, **Dome B**, Lazary J. The possible role of maternal bonding style and CHRNA2 gene polymorphisms in smoking and related depressive phenotype. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2015; 59:84-90.

Lohinai Z, Hoda MA, Fabian K, Ostoros G, Raso E, Barbai T, Timar J, Kovalszky I, Cserepes M, Rozsas A, Laszlo V, Grusch M, Berger W, Klepetko W, Moldvay J, **Dome B***, Hegedus B*. Distinct epidemiology

and clinical consequence of classic versus rare EGFR mutations in lung adenocarcinoma. *J Thoracic Oncol* 2015;10:738-46. *co-senior and co-corresponding authors

Ghanim B, Klikovits T, Hoda MA, Lang G, Szirtes I, Setinek U, Rozsas A, Renyi-Vamos F, Laszlo V, Grusch M, Filipits M, Scheed A, Jakopovic M, Samarzija M, Brcic L, Stancic-Rokotov D, Kern K, Rozman A, Dekan G, Klepetko K, Berger W, Glasz T, **Dome B***, Hegedus B*. Ki67 index is an independent prognostic factor in epithelioid but not in non-epithelioid malignant pleural mesothelioma: a multicenter study. *Br J Cancer* 2015; 112:783-92. *shared senior authorship

Garay T, Kenessey I, Molnar E, Juhasz E, Reti A, Laszlo V, Rozsas A, Dobos J, **Dome B**, Berger W, Klepetko W, Tovari J, Timar J, Hegedus B. Prenylation inhibition-induced cell death in melanoma: reduced sensitivity in BRAF mutant/PTEN wild -type melanoma cells. *PLoS One* 2015; 10:e0117021.

Connell J, Sugihara Y, Torok S, **Dome B**, Tovari J, Fehniger T, Marko-Varga G, Vegvari A. Localization of Sunitinib in in vivo Animal and in vitro Experimental Models by MALDI Mass Spectrometry Imaging. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407:2245-53.

Heller G, Altenberger C, Schmid B, Marhold M, Tomasich E, Ziegler B, Müllauer L, Minichsdorfer C, Lang G, End-Pfützenreuter A, **Döme B**, Arns BM, Fong KM, Wright CM, Yang IA, Klepetko W, Zielinski CC, Zöchbauer-Müller S. DNA methylation transcriptionally regulates the putative tumor cell growth suppressor ZNF677 in non-small cell lung cancers. *Oncotarget* 2015; 6:394-408.

Torok S, Vegvari A, Rezeli M, Fehniger TE, Tovari J, Paku S, Laszlo V, Hegedus B, Rozsas A, **Dome B***, Marko-Varga G*. Localization of sunitinib, its metabolites and its target receptors in tumour bearing mice: a MALDI mass spectrometry imaging study. *Br J Pharmacol* 2015; 172:1148-63. *co-senior and co-corresponding authors

Szabo V, Bugyik E, Dezso K, Ecker N, Nagy P, Timar J, Tovari J, Laszlo V, Bridgeman VL, Wan E, Frenzas S, Vermeulen PB, Reynolds AR*, **Dome B***, Paku S*. Mechanism of tumour vascularisation in experimental lung metastases. *J Pathol* 2015; 235:384-96. *co-senior and co-corresponding authors

Schelch K, Hoda MA, Klikovits T, Münzker J, Ghanim B, Wagner C, Garay T, Laszlo V, Setinek U, **Dome B**, Filipits M, Pirker C, Heffeter P, Selzer E, Tovari J, Torok S, Kenessey I, Holzmann K, Grasl-Kraupp B, Marian B, Klepetko W, Berger W, Hegedus B, Grusch M. FGF Receptor Inhibition is Active Against Mesothelioma and Synergizes with Radio- and Chemotherapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190:763-72.

Ghanim B, Hoda MA, Klikovits T, **Dome B**, Grusch M, Filipits M, Klepetko W, Berger W, Hegedus B. A critical update on prognostic and predictive biomarkers in malignant pleural mesothelioma. *Mag Eur Med Oncol* 2014; p. 1-5.

Sarosi V, Losonczy G, Francovszky E, Tolnay E, Torok S, Galffy G, Hegedus B, **Dome B***, Ostoros G*. Effectiveness of erlotinib treatment in advanced KRAS mutation-negative lung adenocarcinoma patients: results of a multicenter observational cohort study (MOTIVATE). *Lung Cancer* 2014; 86:54-8. *co-senior and co-corresponding authors

Berta J, Hoda MA, Laszlo V, Rozsas A, Garay T, Torok S, Grusch M, Berger W, Paku S, Renyi-Vamos F, Masri B, Tovari J, Groger M, Klepetko W, Hegedus B, **Dome B**. Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncotarget* 2014; 5:4426-37.

Cserepes M, Ostoros G, Lohinai Z, Raso E, Barbai T, Timar J, Rozsas A, Moldvay J, Kovalszky I, Fabian K, Gyulai M, Ghanim B, Laszlo V, Klikovits T, Hoda MA, Grusch M, Berger W, Klepetko W, Hegedus B, **Dome B**. Subtype-specific KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma: A retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy. *Eur J Cancer* 2014; 50:1819-28. *co-senior authors, #corresponding author

Ghanim B, Hoda MA, Klikovits T, Winter MP, Alimohammadi A, Grusch M, **Dome B**, Arns M, Schenk P, Jakopovic M, Samarzija M, Brcic L, Filipits M, Laszlo V, Klepetko W, Berger W, Hegedus B. Circulating fibrinogen is a prognostic and predictive biomarker in malignant pleural mesothelioma. *Br J Cancer* 2014; 110:984-90.

Lazáry J, Döme P, Csala I, Kovacs G, Faludi G, Kaunisto M, **Döme B**. Massive Withdrawal Symptoms and Affective Vulnerability Are Associated with Variants of the CHRNA4 Gene in a Subgroup of Smokers. *PLoS One* 2014; 9: e87141.

Berghoff AS, Ilhan-Mutlu A, Wöhrer A, Hackl M, Widhalm G, Hainfellner JA, Dieckmann K, Melchardt T, **Dome B**, Heinzl H, Birner P, Preusser M. Prognostic significance of Ki67 proliferation index, HIF1 alpha index and microvascular density in patients with non-small cell lung cancer brain metastases. *Strahlenther Onkol* 2014; 190:676-85.

Schweiger T, Hegedüs B, Nikolowsky C, Hegedüs Z, Szirtes I, Mair R, Birner P, **Döme B**, Lang G, Klepetko W, Ankersmit HJ, Hoetzenecker K. EGFR, BRAF and KRAS status in patients undergoing pulmonary metastasectomy from primary colorectal carcinoma: a prospective follow-up study. *Ann Surg Oncol* 2014; 21:946-54.

Virág J, Kenessey I, Haberler C, Piurkó V, Bálint K, **Döme B**, Tímár J, Garami M, Hegedüs B. Angiogenesis and angiogenic tyrosine kinase receptor expression in pediatric brain tumors. *Pathol Oncol Res* 2014; 20:417-26.

Végvári A, Fehniger TE, Rezeli M, Laurell T, **Dome B**, Jansson B, Welinder C, Marko-Varga G. Experimental Models to Study Drug Distributions in Tissue Using MALDI Mass Spectrometry Imaging. *J Proteome Res* 2013; 12:5626-33.

Rozsas A, Berta J, Rojko L, Horvath LZ, Keszthelyi M, Kenessey I, Laszlo V, Berger W, Grusch M, Hoda MA, Torok S, Klepetko W, Renyi-Vamos F, Hegedus B, **Dome B***, Tovari J*. Erythropoietin receptor expression is a potential prognostic factor in human lung adenocarcinoma. *PLoS One* 2013; 8:e77459. co-senior and co-corresponding authors

Höftberger R, Titulaer MJ, Sabater L, **Dome B**, Rózsás A, Hegedus B, Hoda MA, Laszlo V, Ankersmit HJ, Harms L, Boyero S, de Felipe A, Saiz A, Dalmau J, Graus F. Encephalitis and GABAB receptor antibodies: Novel findings in a new case series of 20 patients. *Neurology* 2013; 81:1500-6.

Garay T, Juhasz E, Molnar E, Eisenbauer M, Czirok A, Dekan B, Laszlo V, Hoda MA, **Dome B**, Timar J, Klepetko W, Berger W, Hegedus B. Cell migration or cytokinesis and proliferation? – revisiting the “go or grow” hypothesis in cancer cells in vitro. *Exp Cell Res* 2013; 319:3094-103.

Zimmermann M, Mueller T, Dieplinger B, Bekos C, Beer L, Hofbauer H, **Dome B**, Ankersmit HJ. Circulating heat shock protein 27 as a biomarker for the differentiation of patients with lung cancer and healthy controls -- a clinical comparison of different enzyme linked immunosorbent assays. *Clin Lab* 2014; 60:999-1006.

Fehniger TE, Vegvari A, Rezeli M, **Dome B**, Timar J, Marko-Varga G. International biobanking for lung cancer and COPD as the future resource for clinical protein research. *EuPA Open Proteomics* 2013; 1: 3–7.

Heller G, Babinsky V, Ziegler B, Weinzierl M, Noll C, Lang G, End-Pfutzenreuter A, Womastek I, Zehetmayer S, **Dome B**, Arns BM, Fong KM, Wright CM, Yang IA, Bowman RV, Klepetko W, Posch M, Zielinski CC, Zochbauer-Muller S. Genome-wide CpG island methylation analyses in non-small cell lung cancer patients. *Carcinogenesis* 2013; 34:513-21.

Hoda MA, Munzker J, Ghanim B, Schelch K, Klikovits T, Laszlo V, Sahin E, Bedeir A, Lackner A, **Dome B**, Setinek U, Filipits M, Eisenbauer M, Kenessey I, Torok S, Garay T, Hegedus B, Taghavi S, Klepetko W, Berger W, Grusch M. Suppression of Activin A Signals Inhibits Growth of Malignant Pleural Mesothelioma Cells. *Br J Cancer* 2012; 107:1978-86.

Sheff KW, Hoda MA, **Dome B**, Hegedus B, Klepetko W, Weiss GJ. The role of microRNAs in the diagnosis and treatment of malignant pleural mesothelioma – a short review. *MicroRNA* 2012; 1: 40-48.

Zimmermann M, Nickl S, Lambers C, Hacker S, Mitterbauer A, Hoetzenecker K, Rozsas A, Ostoros G, Laszlo V, Hofbauer H, Renyi-Vamos F, Klepetko W, **Dome B**, Ankersmit HJ. Discrimination of clinical stages in non-small cell lung cancer patients by serum HSP27 and HSP70: A multi-institutional case-control study. *Clin Chim Acta* 2012; 413:1115-20.

Ankersmit HJ, Nickl S, Hoeltl E, Toepker M, Lambers C, Mitterbauer A, Kortuem B, Zimmermann M, Moser B, Bekos C, Steinlechner B, Hofbauer H, Klepetko W, Schenk P, **Dome B***. Increased Serum Levels of HSP27 as a Marker for Incipient Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Young Smokers. *Respiration* 2012; 83:391-9.

Ziegler-Heitbrock L, Frankenberger M, Heimbeck I, Burggraf D, Wjst M, Häussinger K, Brightling C, Gupta S, Parr D, Subramanian D, Singh D, Kolsum U, Boschetto P, Potena A, Gorecka D, Nowinski A, Barta I, **Döme B**, Strausz J, Greulich T, Vogelmeier C, Bals R, Hohlfeld J, Welte T, Venge P, Gut I, Boland A, Olaso R, Hager J, Hiemstra P, Rabe KF, Unmüßig M, Müller-Quernheim J, Prasse A. The EvA study: aims and strategy. *Eur Respir J* 2012; 40:823-9.

Ghanim B, Hoda MA, Winter MP, Klikovits T, Alimohammadi A, Hegedus B, **Dome B**, Grusch M, Arns M, Schenk P, Pohl W, Zielinski C, Filipits M, Klepetko W, Berger W. Pretreatment serum C-reactive protein levels predict benefit from multimodality treatment including radical surgery in malignant pleural mesothelioma: a retrospective multicenter analysis. *Ann Surg* 2012; 256:357-62.

Heller G, Weinzierl M, Noll C, Babinsky V, Ziegler B, Altenberger C, Minichsdorfer C, Lang G, **Dome B**, End-Pfutzenreuter A, Arns BM, Grin Y, Klepetko W, Zielinski CC, Zochbauer-Muller S. Genome-wide microRNA expression profiling identifies miR-9-3 and miR-193a as targets for DNA methylation in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2012; 18:1619-29.

Végvári A, **Dome B***. State-of-the-Art Mass Spectrometric Technology Applications in Lung Diseases. *Bioanalysis* 2011; 3:2665-77.

Bugyik E, Dezső K, Reiniger L, László V, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Klepetko W, **Döme B***, Paku S*. Lack of Angiogenesis in Experimental Brain Metastases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011; 70:979-991.
*shared senior authorship

Torok S, Hegedus B, Laszlo V, Hoda MA, Ghanim B, Berger W, Klepetko W, **Dome B**, Ostoros G. Lung cancer in never smokers. *Future Oncol* 2011; 7:1195-211.

Paku S, Dezso K, Bugyik E, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Laszlo V, Klepetko W, **Döme B**. A new mechanism for pillar formation during tumor-induced intussusceptive angiogenesis: inverse sprouting. *Am J Pathol* 2011; 179:1573-85.

Kapitány B, Döme P, **Döme B**, Rihmer Z. Associations between season of birth and the risk of lung cancer: epidemiological findings from Hungary. *Chronobiol Int* 2011; 28:643-50.

Szabó B, Nelhubel GA, Kárpáti A, Kenessey I, Jóri B, Székely C, Peták I, Lotz G, Hegedus Z, Hegedus B, Füle T, **Döme B**, Tímár J, Tóvári J. Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2011; 47:487-96.

Marko-Varga G, Fehniger TE, Rezeli M, **Döme B**, Laurell T, Végvári A. Drug localization in different lung cancer phenotypes by MALDI mass spectrometry imaging. *J Proteomics* 2011; 74:982-92.

Hoda MA, Mohamed A, Ghanim B, Filipits M, Hegedus B, Tamura M, Berta J, Kubista B, **Dome B**, Grusch M, Setinek U, Micksche M, Klepetko W, Berger W. Temsirolimus inhibits malignant pleural mesothelioma growth in vitro and in vivo: synergism with chemotherapy. *J Thoracic Oncol* 2011; 6:852-63.

Mildner M, Storka A, Lichtenauer M, Mlitz V, Ghannadan M, Hoetzenecker K, Nickl S, **Dome B**, Tschachler E, Ankersmit HJ. Primary sources and immunological prerequisites for sST2 secretion in humans. *Cardiovasc Res* 2010; 87:769-77.

Berta J, Kenessey I, Dobos J, Tovari J, Klepetko W, Ankersmit HJ, Hegedus B, Renyi-Vamos F, Varga J, Lorincz Z, Paku S, Ostoros G, Rozsas A, Timar J, **Dome B**. Apelin expression in human non-small cell lung cancer: Role in angiogenesis and prognosis. *J Thoracic Oncol* 2010; 5:1120-9.

Kenessey I, Keszthelyi M, Krámer Z, Berta J, Adám A, Dobos J, Mildner M, Flachner B, Cseh S, Barna G, Szokol B, Orfi L, Kéri G, **Dome B**, Klepetko W, Tímár J, Tóvári J. Inhibition of c-Met with the specific small molecule tyrosine kinase inhibitor SU11274 decreases growth and metastasis formation of experimental human melanoma. *Curr Cancer Drug Targets* 2010; 10:332-42. IF: 4.77

Dome P, Teleki Z, Rihmer Z, Peter L, Dobos J, Kenessey I, Tovari J, Timar J, Paku S, Kovacs G, **Dome B***. Circulating endothelial progenitor cells and depression: a possible novel link between heart and soul. *Mol Psychiatry* 2009; 14:523-31.

Amir E, Mandoky L, Blackhall F, Thatcher N, Klepetko W, Ankersmit HJ, Hoda MA, Ostoros G, Dank M, **Dome B***. Antivascular agents for non-small cell lung cancer: current status and future directions. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18:1667-86.

Dezso K, Bugyik E, Papp V, Laszlo V, **Dome B**, Tovari J, Timar J, Nagy P, Paku S. Development of arterial blood supply in experimental liver metastases. *Am J Pathol* 2009; 175:835-43.

Dome B*, Timar J, Ladanyi A, Paku S, Renyi-Vamos F, Klepetko W, Lang G, Dome P, Bogos K, Tovari J. Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic hematopoietic cells in cancer: From biology to therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009; 69:108-24. *first and corresponding author

Bogos K, Renyi-Vamos F, Dobos J, Kenessey I, Tovari J, Timar J, Strausz J, Ostoros G, Klepetko W, Ankersmit HJ, Lang G, Hoda MA, Nierlich P, **Dome B**. High VEGFR-3-positive Circulating Lymphatic/Vascular Endothelial Progenitor Cell Level Is Associated with Poor Prognosis in Human Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15:1741-1746.

Dome B*, Dobos J, Tovari J, Paku S, Kovacs G, Ostoros G, Timar J. Circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells: characterization, mobilization and therapeutic considerations in malignant disease. *Cytometry A* 2008; 73:186-93. *first and corresponding author

Amir E, Hughes S, Blackhall F, Thatcher N, Ostoros G, Timar J, Tovari J, Kovacs G, **Dome B**. Targeting blood vessels for the treatment of non-small cell lung cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8:392-403.

Lovey J, Bereczky B, Gilly R, Kenessey I, Raso E, Simon E, Dobos J, Vago A, **Dome B**, Timar J, Tovari J. Recombinant human erythropoietin-alpha improves the efficacy of radiotherapy of a human tumor xenograft, affecting tumor cells and microvessels. *Strahlenther Onkol* 2008; 184:1-7.

Tovari J, Pirker R, Timar J, Ostoros G, Kovacs G, **Dome B**. Erythropoietin in cancer: an update. *Curr Mol Med* 2008; 8:481-91.

Bogos K, Renyi-Vamos F, Kovacs G, Tovari J, **Dome B**. Role of retinoic receptors in lung carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; 27:18.

Timar J, **Dome B**. Antiangiogenic Drugs and Tyrosine Kinases. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8:462-9.

Dome B, Hendrix MJ, Paku S, Tovari J, Timar J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: pathomechanisms and therapeutic implications. *Am J Pathol* 2007; 170:1-15.

Dome B*, Timar J, Dobos J, Meszaros L, Raso E, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Magyar M, Ladanyi A, Bogos K, Tovari J. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006; 66:7341-7. *first and corresponding author

Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I, Ostoros Gy, Agocs L, Soltesz I, **Dome B***. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:7344-7353.

Timar J, Ladanyi A, Forster-Horvath C, Lukits J, **Dome B**, Remenar E, Godeny M, Kasler M, Bencsik M, Rapassy G, Szabó G, Velich N, Suba Z, Elo J, Balatoni Z, Pocza K, Zempleni B, Chretien P, Talor E. Neoadjuvant Immunotherapy of Oral Squamous Cell Carcinoma Modulates Intratumoral CD4/CD8 Ratio and Tumor Microenvironment. A Multicenter Phase II Trial. *J Clin Oncol* 2005; 23:3421-32.

Ostoros Gy, Harisi R, Kovacs G, Horti J, Geczi L, Szondy K, Orosz M, Ferenczi E, Ruby E, **Dome B***. Inhibition of EGFR tyrosine-kinase in NSCLC treatment: the Hungarian experience with gefitinib in the context of an expanded access programme. *Anticancer Res* 2005; 25(6C):4759-62.

Dome B*, Timar J, Ostoros Gy, Paku S. Endothelial progenitor cells in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58:446. *first and corresponding author

Ostoros G, Pretz A, Fillinger J, Soltesz I, **Dome B**. Fatal pulmonary fibrosis induced by paclitaxel: a case report and review of the literature. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16 Suppl 1:391-3.

7.3. A PhD fokozat elnyerése (2004) előtt készült saját közlemények

Raso E, **Dome B**, Somlai B, Zacharek A, Hagmann W, Honn KV, Timar J. Molecular identification, localization and function of platelet-type 12-lipoxygenase in human melanoma progression, under experimental and clinical conditions. *Melanoma Res* 2004; 14:245-250.

Forster-Horvath C, Meszaros L, Raso E, **Dome B**, Ladányi A, Albin A, Timar J. Expression of CD44v3 Protein in Human Endothelial Cells in Vitro and in Peritumoral Microvessels in Vivo. *Microvascular Res* 2004; 68:110–118.

Forster-Horváth C, **Dome B**, Paku S, Ladanyi A, Somlai B, Jalkanen S, Timar J. Loss of VAP-1 protein expression in intratumoral microvessels of human skin melanoma. *Melanoma Res* 2004; 14:135-140.

Dome B, Timar J, Paku S. A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 655-661.

Timar J, Forster-Horvath C, Lukits J, **Dome B**, Ladanyi A, Remenar E, Kasler M, Bencsik M, Repassy G, Szabo G, Velich N, Suba Z; Elo J, Balatoni Z, Bajtai A, Chretien P, Talor E. The Effect of Leukocyte Interleukin Injection Treatment on the Peritumoral and Intratumoral Subpopulation of Mononuclear Cells and on Tumor Epithelia: A Possible New Approach to Augmenting Sensitivity to Radiation Therapy and Chemotherapy in Oral Cancer—A Multicenter Phases I and II Clinical Trial. *Laryngoscope* 2003; 113:2206-17.

Paku S, Tóvári J, Lőrincz Z, Timár F, **Dome B**, Kopper L, Raz A, Timár J. Adhesion dynamics and cytoskeletal structure of gliding human fibrosarcoma cells: a hypothetical model of cell migration. *Exp Cell Res* 2003; 290; 246-53.

Dome B, Paku S, Somlai B, Timar J. Vascularisation of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol* 2002; 197:355-362.

Timar J, Raso E, **Dome B**, Ladanyi A, Banfalvi T, Gilde K, Raz A. Expression and function of the AMF receptor by human melanoma in experimental and clinical systems. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19:225-232.

Trikha M, Timar J, Zacharek A, Nemeth JA, Cai Y, **Dome B**, Somlai B, Raso E, Ladanyi A, Honn KV. Role for α II β 3 integrin in human melanoma growth, survival and metastasis. *Int J Cancer* 2002; 101:156–167.

Dome B, Somlai B, Ladanyi A, Fazekas K, Zoller M, Tímár J. Expression of CD44v3 splice variant is associated with the visceral metastatic phenotype of human melanoma. *Virchows Arch* 2001; 439:628–635.

Paku S, **Dome B**, Toth R, Timar J. Organ-specificity of the extravasation process: An ultrastructural study. *Clin Exp Metastasis* 2001; 18:481-92.

Timar J, **Dome B**, Fazekas K, Janovics A, Paku S. Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy. *Pathol Oncol Res* 2001; 7:85-94.

Fazekas K, Janovics A, **Dome B**, Koska P, Albin A, Timar J. Effect of HGF-like basic hexapeptides on angiogenesis. *Microvasc Res* 2001; 62:440-4.

Lukits J, Timar J, Juhasz A, **Dome B**, Paku S, Répássy G. Progression difference between cancers of the larynx and hypopharynx is not due to tumor size and vascularization. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 125:18-22.

Dome B, Somlai B, Timar J. The loss of NM23 protein in malignant melanoma predicts lymphatic spread without affecting survival. *Anticancer Res* 2000; 20:3971-4.

Timar J, Raso E, **Dome B**, Li L, Grignon D, Nie D, Honn KV, Hagmann W. Expression, subcellular localization and putative function of platelet-type 12-lipoxygenase in human prostate cancer cell lines of different metastatic potential. *Int J Cancer* 2000; 87:37-43.

7.4. A PhD fokozat elnyerése (2004) előtt készült könyvfejezet

Timar J, **Dome B**, Paku S. Angiogenesis. In: *Molecular Pathomechanisms and New Trends in Drug Research*. Publisher: Taylor & Francis Group, London, ISBN: 0415277256, Publication Date: 14 NOV 2002, Part 8/37.

7.5. Az értekezésben hivatkozott egyéb közlemények listája

1. Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD. Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(12):765.
2. Kahnert K, Kauffmann-Guerrero D, Huber RM. SCLC-State of the Art and What Does the Future Have in Store? *Clin Lung Cancer*. 2016;17(5):325-33.
3. Schwendenwein A, Megyesfalvi Z, Barany N, Valko Z, Bugyik E, Lang C, et al. Molecular profiles of small cell lung cancer subtypes: therapeutic implications. *Mol Ther Oncolytics*. 2021;20:470-83.
4. Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):3.
5. Ganti AKP, Loo BW, Bassetti M, Blakely C, Chiang A, D'Amico TA, et al. Small Cell Lung Cancer, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021;19(12):1441-64.
6. Megyesfalvi Z, Gay CM, Popper H, Pirker R, Ostoros G, Heeke S, et al. Clinical insights into small cell lung cancer: Tumor heterogeneity, diagnosis, therapy, and future directions. *CA Cancer J Clin*. 2023.
7. Gong J, Salgia R. Managing Patients With Relapsed Small-Cell Lung Cancer. *J Oncol Pract*. 2018;14(6):359-66.
8. Taniguchi H, Sen T, Rudin CM. Targeted Therapies and Biomarkers in Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:741.
9. Rudin CM, Poirier JT, Byers LA, Dive C, Dowlati A, George J, et al. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(5):289-97.
10. Baine MK, Hsieh MS, Lai WV, Egger JV, Jungbluth AA, Daneshbod Y, et al. SCLC Subtypes Defined by ASCL1, NEUROD1, POU2F3, and YAP1: A Comprehensive Immunohistochemical and Histopathologic Characterization. *J Thorac Oncol*. 2020;15(12):1823-35.
11. Borromeo MD, Savage TK, Kollipara RK, He M, Augustyn A, Osborne JK, et al. ASCL1 and NEUROD1 Reveal Heterogeneity in Pulmonary Neuroendocrine Tumors and Regulate Distinct Genetic Programs. *Cell Rep*. 2016;16(5):1259-72.
12. Gazdar AF, Carney DN, Nau MM, Minna JD. Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Res*. 1985;45(6):2924-30.
13. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretic L, Kong G, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 2015;524(7563):47-53.
14. Mollaoglu G, Guthrie MR, Bohm S, Bragelmann J, Can I, Ballieu PM, et al. MYC Drives Progression of Small Cell Lung Cancer to a Variant Neuroendocrine Subtype with Vulnerability to Aurora Kinase Inhibition. *Cancer Cell*. 2017;31(2):270-85.
15. Huang YH, Klingbeil O, He XY, Wu XS, Arun G, Lu B, et al. POU2F3 is a master regulator of a tuft cell-like variant of small cell lung cancer. *Genes Dev*. 2018;32(13-14):915-28.
16. Caesar R, Egger JV, Chavan S, Socci ND, Jones CB, Kombak FE, et al. Genomic and transcriptomic analysis of a library of small cell lung cancer patient-derived xenografts. *Nat Commun*. 2022;13(1):2144.
17. Megyesfalvi Z, Barany N, Lantos A, Valko Z, Pipek O, Lang C, et al. Expression patterns and prognostic relevance of subtype-specific transcription factors in surgically resected small-cell lung cancer: an international multicenter study. *J Pathol*. 2022;257(5):674-86.
18. Gay CM, Stewart CA, Park EM, Diao L, Groves SM, Heeke S, et al. Patterns of transcription factor programs and immune pathway activation define four major subtypes of SCLC with distinct therapeutic vulnerabilities. *Cancer Cell*. 2021;39(3):346-60 e7.
19. Berta J FB, Horváth L, Fillinger J, Lantos A, Bogos K, Rényi-Vámos F, Megyesfalvi Zs, Döme B. Molekuláris altípusok szerinti heterogenitás biológiai és klinikai jelentősége kissejtes tüdőrákban. *Magyar Onkológia*. 2023.
20. Drapkin BJ, Rudin CM. Advances in Small-Cell Lung Cancer (SCLC) Translational Research. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2021;11(4).
21. Ireland AS, Micinski AM, Kastner DW, Guo B, Wait SJ, Spainhower KB, et al. MYC Drives Temporal Evolution of Small Cell Lung Cancer Subtypes by Reprogramming Neuroendocrine Fate. *Cancer Cell*. 2020;38(1):60-78 e12.
22. Simpson KL, Stoney R, Frese KK, Simms N, Rowe W, Pearce SP, et al. A biobank of small cell lung cancer CDX models elucidates inter- and intratumoral phenotypic heterogeneity. *Nat Cancer*. 2020;1(4):437-51.
23. Nicholson SA, Beasley MB, Brambilla E, Hasleton PS, Colby TV, Sheppard MN, et al. Small cell lung carcinoma (SCLC): a clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(9):1184-97.
24. Hoda MA, Klikovits T, Klepetko W. Controversies in oncology: surgery for small cell lung cancer? It's time to rethink the case. *ESMO Open*. 2018;3(3):e000366.
25. Qu S, Fetsch P, Thomas A, Pommier Y, Schrupp DS, Miettinen MM, Chen H. Molecular Subtypes of Primary SCLC Tumors and Their Associations With Neuroendocrine and Therapeutic Markers. *J Thorac Oncol*. 2022;17(1):141-53.
26. Sato Y, Okamoto I, Kameyama H, Kudoh S, Saito H, Sanada M, et al. Integrated Immunohistochemical Study on Small-Cell Carcinoma of the Lung Focusing on Transcription and Co-Transcription Factors. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(11).
27. WCV Lai JE, H Rizvi , AL Richards, A Beras, K Marina, MK Baine, et al. Molecular subtypes and clinical outcomes to initial systemic treatment in patients with small cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2020;38: 9018.
28. Qi J, Zhang J, Liu N, Zhao L, Xu B. Prognostic Implications of Molecular Subtypes in Primary Small Cell Lung Cancer and Their Correlation With Cancer Immunity. *Front Oncol*. 2022;12:779276.

29. Wallace WA, Dorward DA, Salter DM. Immunohistochemistry for small-cell carcinoma: a potential diagnostic pitfall. *Histopathology*. 2019;74(5):792-4.
30. Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, Guccion JG, Marangos PJ, Moody TW, et al. Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res*. 1985;45(6):2913-23.
31. Bai R, Lv Z, Xu D, Cui J. Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. *Biomark Res*. 2020;8:34.
32. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol*. 2016;17(12):e542-e51.
33. McColl K, Wildey G, Sakre N, Lipka MB, Behtaj M, Kresak A, et al. Reciprocal expression of INSM1 and YAP1 defines subgroups in small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017;8(43):73745-56.
34. Asamura H, Kameya T, Matsuno Y, Noguchi M, Tada H, Ishikawa Y, et al. Neuroendocrine neoplasms of the lung: a prognostic spectrum. *J Clin Oncol*. 2006;24(1):70-6.
35. Welter S, Aigner C, Roesel C. The role of surgery in high grade neuroendocrine tumours of the lung. *J Thorac Dis*. 2017;9(Suppl 15):S1474-S83.
36. Furuta M, Sakakibara-Konishi J, Kikuchi H, Yokouchi H, Nishihara H, Minemura H, et al. Analysis of DLL3 and ASCL1 in Surgically Resected Small Cell Lung Cancer (HOT1702). *Oncologist*. 2019;24(11):e1172-e9.
37. Dora D, Rivard C, Yu H, Bunn P, Suda K, Ren S, et al. Neuroendocrine subtypes of small cell lung cancer differ in terms of immune microenvironment and checkpoint molecule distribution. *Mol Oncol*. 2020;14(9):1947-65.
38. Gazdar A, editor. Molecular Phenotypes of SCLC. In International Association for the Study of Lung Cancer - 19th World Conference on Lung Cancer; September 23-26, 2018; JTO: Toronto.
39. Saunders LR, Bankovich AJ, Anderson WC, Aujay MA, Bheddah S, Black K, et al. A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Sci Transl Med*. 2015;7(302):302ra136.
40. Zhang W, Girard L, Zhang YA, Haruki T, Papari-Zareei M, Stastny V, et al. Small cell lung cancer tumors and preclinical models display heterogeneity of neuroendocrine phenotypes. *Transl Lung Cancer Res*. 2018;7(1):32-49.
41. Picard Leblanc G BN, Tehfe M, et al. Prognostic impact of paraneoplastic syndromes in patients with small cell lung cancer, real-world data. *J Clin oncol*. 2019;37:e20082.
42. Byers LA, Wang J, Nilsson MB, Fujimoto J, Saintigny P, Yordy J, et al. Proteomic profiling identifies dysregulated pathways in small cell lung cancer and novel therapeutic targets including PARP1. *Cancer Discov*. 2012;2(9):798-811.
43. Fujii K, Miyata Y, Takahashi I, Koizumi H, Saji H, Hoshikawa M, et al. Differential Proteomic Analysis between Small Cell Lung Carcinoma (SCLC) and Pulmonary Carcinoid Tumors Reveals Molecular Signatures for Malignancy in Lung Cancer. *Proteomics Clin Appl*. 2018;12(6):e1800015.
44. Wang XD, Hu R, Ding Q, Savage TK, Huffman KE, Williams N, et al. Subtype-specific secretomic characterization of pulmonary neuroendocrine tumor cells. *Nat Commun*. 2019;10(1):3201.
45. Ito T, Matsubara D, Tanaka I, Makiya K, Tanei ZI, Kumagai Y, et al. Loss of YAP1 defines neuroendocrine differentiation of lung tumors. *Cancer Sci*. 2016;107(10):1527-38.
46. Thng DKH, Toh TB, Chow EK. Capitalizing on Synthetic Lethality of MYC to Treat Cancer in the Digital Age. *Trends Pharmacol Sci*. 2021;42(3):166-82.
47. Ben-Ezra JM, Kornstein MJ, Grimes MM, Krystal G. Small cell carcinomas of the lung express the Bcl-2 protein. *Am J Pathol*. 1994;145(5):1036-40.
48. Kaiser U, Schilli M, Haag U, Neumann K, Kreipe H, Kogan E, Havemann K. Expression of bcl-2--protein in small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 1996;15(1):31-40.
49. Pelosi G, Rindi G, Travis WD, Papotti M. Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: unraveling a role in clinical practice. *J Thorac Oncol*. 2014;9(3):273-84.
50. Travis WD. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Mod Pathol*. 2012;25 Suppl 1:S18-30.
51. Thunnissen E, Borczuk AC, Flieder DB, Witte B, Beasley MB, Chung JH, et al. The Use of Immunohistochemistry Improves the Diagnosis of Small Cell Lung Cancer and Its Differential Diagnosis. An International Reproducibility Study in a Demanding Set of Cases. *J Thorac Oncol*. 2017;12(2):334-46.
52. Ghandi M, Huang FW, Jane-Valbuena J, Kryukov GV, Lo CC, McDonald ER, 3rd, et al. Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature*. 2019;569(7757):503-8.
53. Kelemen O, Pla I, Sanchez A, Rezeli M, Szasz AM, Malm J, et al. Proteomic analysis enables distinction of early- versus advanced-stage lung adenocarcinomas. *Clin Transl Med*. 2020;10(2):e106.
54. Macklin A, Khan S, Kislinger T. Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: applications to cancer research. *Clin Proteomics*. 2020;17:17.
55. Gillette MA, Satpathy S, Cao S, Dhanasekaran SM, Vasaikar SV, Krug K, et al. Proteogenomic Characterization Reveals Therapeutic Vulnerabilities in Lung Adenocarcinoma. *Cell*. 2020;182(1):200-25 e35.
56. Satpathy S, Krug K, Jean Beltran PM, Savage SR, Petralia F, Kumar-Sinha C, et al. A proteogenomic portrait of lung squamous cell carcinoma. *Cell*. 2021;184(16):4348-71 e40.
57. Jeong HC, Kim GI, Cho SH, Lee KH, Ko JJ, Yang JH, Chung KH. Proteomic analysis of human small cell lung cancer tissues: up-regulation of coactosin-like protein-1. *J Proteome Res*. 2011;10(1):269-76.
58. Goncalves E, Poulos RC, Cai Z, Barthorpe S, Manda SS, Lucas N, et al. Pan-cancer proteomic map of 949 human cell lines. *Cancer Cell*. 2022;40(8):835-49 e8.

59. Szeitz B, Megyesfalvi Z, Woldmar N, Valko Z, Schwendenwein A, Barany N, et al. In-depth proteomic analysis reveals unique subtype-specific signatures in human small-cell lung cancer. *Clin Transl Med.* 2022;12(9):e1060.
60. Denny SK, Yang D, Chuang CH, Brady JJ, Lim JS, Gruner BM, et al. Nfib Promotes Metastasis through a Widespread Increase in Chromatin Accessibility. *Cell.* 2016;166(2):328-42.
61. Arriola E, Canadas I, Arumi M, Rojo F, Rovira A, Albanell J. Genetic changes in small cell lung carcinoma. *Clin Transl Oncol.* 2008;10(4):189-97.
62. Mori N, Yokota J, Akiyama T, Sameshima Y, Okamoto A, Mizoguchi H, et al. Variable mutations of the RB gene in small-cell lung carcinoma. *Oncogene.* 1990;5(11):1713-7.
63. Wistuba, II, Gazdar AF, Minna JD. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol.* 2001;28(2 Suppl 4):3-13.
64. Kohn KW, Zeeberg BM, Reinhold WC, Pommier Y. Gene expression correlations in human cancer cell lines define molecular interaction networks for epithelial phenotype. *PLoS One.* 2014;9(6):e99269.
65. Sabari JK, Lok BH, Laird JH, Poirier JT, Rudin CM. Unravelling the biology of SCLC: implications for therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(9):549-61.
66. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347(6220):1260419.
67. Yang W, Soares J, Greninger P, Edelman EJ, Lightfoot H, Forbes S, et al. Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D955-61.
68. Baine MK, Febres-Aldana CA, Chang JC, Jungbluth AA, Sethi S, Antonescu CR, et al. POU2F3 in SCLC: Clinicopathologic and Genomic Analysis With a Focus on Its Diagnostic Utility in Neuroendocrine-Low SCLC. *J Thorac Oncol.* 2022;17(9):1109-21.
69. Tlemsani C, Pongor L, Elloumi F, Girard L, Huffman KE, Roper N, et al. SCLC-CellMiner: A Resource for Small Cell Lung Cancer Cell Line Genomics and Pharmacology Based on Genomic Signatures. *Cell Rep.* 2020;33(3):108296.
70. Guillemot F, Hassan BA. Beyond proneural: emerging functions and regulations of proneural proteins. *Curr Opin Neurobiol.* 2017;42:93-101.
71. Cargill KR, Stewart CA, Park EM, Ramkumar K, Gay CM, Cardnell RJ, et al. Targeting MYC-enhanced glycolysis for the treatment of small cell lung cancer. *Cancer Metab.* 2021;9(1):33.
72. Sica V, Bravo-San Pedro JM, Stoll G, Kroemer G. Oxidative phosphorylation as a potential therapeutic target for cancer therapy. *Int J Cancer.* 2020;146(1):10-7.
73. Liao Y, Yin G, Wang X, Zhong P, Fan X, Huang C. Identification of candidate genes associated with the pathogenesis of small cell lung cancer via integrated bioinformatics analysis. *Oncol Lett.* 2019;18(4):3723-33.
74. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178-96.
75. Hwang JJ, Choi SY, Koh JY. The role of NADPH oxidase, neuronal nitric oxide synthase and poly(ADP ribose) polymerase in oxidative neuronal death induced in cortical cultures by brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5. *J Neurochem.* 2002;82(4):894-902.
76. Griffin N, Faulkner S, Jobling P, Hondermarck H. Targeting neurotrophin signaling in cancer: The renaissance. *Pharmacol Res.* 2018;135:12-7.
77. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature.* 2011;474(7350):179-83.
78. Caesar R, Hulton C, Costa E, Durani V, Little M, Chen X, et al. MAPK pathway activation selectively inhibits ASCL1-driven small cell lung cancer. *iScience.* 2021;24(11):103224.
79. Chemi F, Pearce SP, Clipson A, Hill SM, Conway AM, Richardson SA, et al. cfDNA methylome profiling for detection and subtyping of small cell lung cancers. *Nat Cancer.* 2022;3(10):1260-70.
80. Horie M, Saito A, Ohshima M, Suzuki HI, Nagase T. YAP and TAZ modulate cell phenotype in a subset of small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2016;107(12):1755-66.
81. Paolucci L, Rozengurt E. Protein kinase D in small cell lung cancer cells: rapid activation through protein kinase C. *Cancer Res.* 1999;59(3):572-7.
82. Byers LA, Diao L, Wang J, Saintigny P, Girard L, Peyton M, et al. An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res.* 2013;19(1):279-90.
83. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C, et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med.* 1999;5(6):662-8.
84. Zhao P, Sun X, Li H, Liu Y, Cui Y, Tian L, Cheng Y. c-Myc Targets HDAC3 to Suppress NKG2DL Expression and Innate Immune Response in N-Type SCLC through Histone Deacetylation. *Cancers (Basel).* 2022;14(3).
85. Chan JM, Quintanal-Villalonga A, Gao VR, Xie Y, Allaj V, Chaudhary O, et al. Signatures of plasticity, metastasis, and immunosuppression in an atlas of human small cell lung cancer. *Cancer Cell.* 2021;39(11):1479-96 e18.
86. Gazdar AF, Gao B, Minna JD. Lung cancer cell lines: Useless artifacts or invaluable tools for medical science? *Lung Cancer.* 2010;68(3):309-18.
87. van Staveren WC, Solis DY, Hebrant A, Detours V, Dumont JE, Maenhaut C. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochim Biophys Acta.* 2009;1795(2):92-103.

88. Walia HK, Sharma P, Singh N, Sharma S. Immunotherapy in Small Cell Lung Cancer Treatment: a Promising Headway for Future Perspective. *Curr Treat Options Oncol.* 2022;23(2):268-94.
89. Horn L, Mansfield AS, Szczesna A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, et al. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(23):2220-9.
90. Paz-Ares L, Dvorkin M, Chen Y, Reinmuth N, Hotta K, Trukhin D, et al. Durvalumab plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2019;394(10212):1929-39.
91. Weiskopf K, Jahchan NS, Schnorr PJ, Cristea S, Ring AM, Maute RL, et al. CD47-blocking immunotherapies stimulate macrophage-mediated destruction of small-cell lung cancer. *J Clin Invest.* 2016;126(7):2610-20.
92. Jiang Z, Sun H, Yu J, Tian W, Song Y. Targeting CD47 for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):180.
93. Acheampong E, Abed A, Morici M, Bowyer S, Amanuel B, Lin W, et al. Tumour PD-L1 Expression in Small-Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cells.* 2020;9(11).
94. Orozco-Morales M, Aviles-Salas A, Hernandez-Pedro N, Catalan R, Cruz-Rico G, Colin-Gonzalez AL, et al. Clinicopathological and Prognostic Significance of CD47 Expression in Lung Neuroendocrine Tumors. *J Immunol Res.* 2021;2021:6632249.
95. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest.* 2017;151(1):193-203.
96. Detterbeck FC, Chansky K, Groome P, Bolejack V, Crowley J, Shemanski L, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Methodology and Validation Used in the Development of Proposals for Revision of the Stage Classification of NSCLC in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11(9):1433-46.
97. Gaspar LE, McNamara EJ, Gay EG, Putnam JB, Crawford J, Herbst RS, Bonner JA. Small-cell lung cancer: prognostic factors and changing treatment over 15 years. *Clin Lung Cancer.* 2012;13(2):115-22.
98. Lim JH, Ryu JS, Kim JH, Kim HJ, Lee D. Gender as an independent prognostic factor in small-cell lung cancer: Inha Lung Cancer Cohort study using propensity score matching. *PLoS One.* 2018;13(12):e0208492.
99. Wang S, Tang J, Sun T, Zheng X, Li J, Sun H, et al. Survival changes in patients with small cell lung cancer and disparities between different sexes, socioeconomic statuses and ages. *Sci Rep.* 2017;7(1):1339.
100. Combs SE, Hancock JG, Boffa DJ, Decker RH, Detterbeck FC, Kim AW. Bolstering the case for lobectomy in stages I, II, and IIIA small-cell lung cancer using the National Cancer Data Base. *J Thorac Oncol.* 2015;10(2):316-23.
101. Varlotto JM, Recht A, Flickinger JC, Medford-Davis LN, Dyer AM, DeCamp MM. Lobectomy leads to optimal survival in early-stage small cell lung cancer: a retrospective analysis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;142(3):538-46.
102. Yang CF, Chan DY, Speicher PJ, Gulack BC, Wang X, Hartwig MG, et al. Role of Adjuvant Therapy in a Population-Based Cohort of Patients With Early-Stage Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34(10):1057-64.
103. Zhou N, Bott M, Park BJ, Vallieres E, Wilshire CL, Yasufuku K, et al. Predictors of survival following surgical resection of limited-stage small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2021;161(3):760-71 e2.
104. Arrieta O, Aviles-Salas A, Orozco-Morales M, Hernandez-Pedro N, Cardona AF, Cabrera-Miranda L, et al. Association between CD47 expression, clinical characteristics and prognosis in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Med.* 2020;9(7):2390-402.
105. Zhao H, Wang J, Kong X, Li E, Liu Y, Du X, et al. CD47 Promotes Tumor Invasion and Metastasis in Non-small Cell Lung Cancer. *Sci Rep.* 2016;6:29719.
106. Xu Y, Li J, Tong B, Chen M, Liu X, Zhong W, et al. Positive tumour CD47 expression is an independent prognostic factor for recurrence in resected non-small cell lung cancer. *ESMO Open.* 2020;5(4).
107. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, Jr., et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell.* 2009;138(2):286-99.
108. Yoshida K, Tsujimoto H, Matsumura K, Kinoshita M, Takahata R, Matsumoto Y, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and a therapeutic target in gastric cancer. *Cancer Med.* 2015;4(9):1322-33.
109. Yu L, Ding Y, Wan T, Deng T, Huang H, Liu J. Significance of CD47 and Its Association With Tumor Immune Microenvironment Heterogeneity in Ovarian Cancer. *Front Immunol.* 2021;12:768115.
110. Yasuda Y, Ozasa H, Kim YH. PD-L1 Expression in Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2018;13(3):e40-e1.
111. Schultheis AM, Scheel AH, Ozretic L, George J, Thomas RK, Hagemann T, et al. PD-L1 expression in small cell neuroendocrine carcinomas. *Eur J Cancer.* 2015;51(3):421-6.
112. Fu X, Liu Z, Xiang L, Liu M, Zheng X, Wang J, et al. PD-L1 Predicts Poor Prognosis in Surgically Resected Limited Stage Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Manag Res.* 2020;12:10939-48.
113. Doxtader EE, Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Biopsy-site changes in lung adenocarcinoma with prior core needle biopsy: a potential pitfall in the assessment of stromal invasion. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(3):443-6.
114. Kim KH, Choi KU, Kim A, Lee SJ, Lee JH, Suh DS, et al. PD-L1 expression on stromal tumor-infiltrating lymphocytes is a favorable prognostic factor in ovarian serous carcinoma. *J Ovarian Res.* 2019;12(1):56.
115. Li X, Wetherilt CS, Krishnamurti U, Yang J, Ma Y, Styblo TM, et al. Stromal PD-L1 Expression Is Associated With Better Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer. *Am J Clin Pathol.* 2016;146(4):496-502.
116. Wyss J, Dislich B, Koelzer VH, Galvan JA, Dawson H, Hadrich M, et al. Stromal PD-1/PD-L1 Expression Predicts Outcome in Colon Cancer Patients. *Clin Colorectal Cancer.* 2019;18(1):e20-e38.
117. Ali HR, Glont SE, Blows FM, Provenzano E, Dawson SJ, Liu B, et al. PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes. *Ann Oncol.* 2015;26(7):1488-93.

118. Pulko V, Harris KJ, Liu X, Gibbons RM, Harrington SM, Krco CJ, et al. B7-h1 expressed by activated CD8 T cells is essential for their survival. *J Immunol.* 2011;187(11):5606-14.
119. Wang S, Bajorath J, Flies DB, Dong H, Honjo T, Chen L. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med.* 2003;197(9):1083-91.
120. Isvoranu G, Surcel M, Munteanu AN, Bratu OG, Ionita-Radu F, Neagu MT, Chiritoiu-Butnaru M. Therapeutic potential of interleukin-15 in cancer (Review). *Exp Ther Med.* 2021;22(1):675.
121. Jiang T, Zhou C, Ren S. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2016;5(6):e1163462.
122. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O'Shea MA, Fauci AS. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol.* 2008;181(10):6738-46.
123. Jesinghaus M, Steiger K, Slotta-Huspenina J, Drecoll E, Pfarr N, Meyer P, et al. Increased intraepithelial CD3+ T-lymphocytes and high PD-L1 expression on tumor cells are associated with a favorable prognosis in esophageal squamous cell carcinoma and allow prognostic immunogenic subgrouping. *Oncotarget.* 2017;8(29):46756-68.
124. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med.* 2012;4(127):127ra37.
125. Galon J, Bruni D. Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories. *Immunity.* 2020;52(1):55-81.
126. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006;313(5795):1960-4.
127. Vesalainen S, Lipponen P, Talja M, Syrjanen K. Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer.* 1994;30A(12):1797-803.
128. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 2006;24(34):5373-80.
129. Clemente CG, Mihm MC, Jr., Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 1996;77(7):1303-10.
130. Lin Z, Gu J, Cui X, Huang L, Li S, Feng J, et al. Deciphering Microenvironment of NSCLC based on CD8+ TIL Density and PD-1/PD-L1 Expression. *J Cancer.* 2019;10(1):211-22.
131. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity.* 2014;41(1):49-61.
132. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006;66(2):605-12.
133. Kambayashi T, Laufer TM. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol.* 2014;14(11):719-30.
134. Alspach E, Lussier DM, Miceli AP, Kizhvator I, DuPage M, Luoma AM, et al. MHC-II neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy. *Nature.* 2019;574(7780):696-701.
135. Dora D, Rivard C, Yu H, Pickard SL, Laszlo V, Harko T, et al. Characterization of Tumor-Associated Macrophages and the Immune Microenvironment in Limited-Stage Neuroendocrine-High and -Low Small Cell Lung Cancer. *Biology (Basel).* 2021;10(6).
136. Barber GN. STING: infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(12):760-70.
137. Corrales L, Gajewski TF. Molecular Pathways: Targeting the Stimulator of Interferon Genes (STING) in the Immunotherapy of Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(21):4774-9.
138. Rivera Vargas T, Benoit-Lizon I, Apetoh L. Rationale for stimulator of interferon genes-targeted cancer immunotherapy. *Eur J Cancer.* 2017;75:86-97.
139. Kitajima S, Ivanova E, Guo S, Yoshida R, Campisi M, Sundararaman SK, et al. Suppression of STING Associated with LKB1 Loss in KRAS-Driven Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2019;9(1):34-45.
140. Lohinai Z, Dora D, Caldwell C, Rivard CJ, Suda K, Yu H, et al. Loss of STING expression is prognostic in non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol.* 2022;125(6):1042-52.
141. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest.* 1986;55(2):244-8.
142. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, Eliceiri KW. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics.* 2017;18(1):529.
143. Sun Y, Zhai C, Chen X, Dong Z, Hou L, Zhou C, Jiang T. Characterization of PD-L1 protein expression and CD8(+) tumor-infiltrating lymphocyte density, and their associations with clinical outcome in small-cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2019;8(6):748-59.
144. Carvajal-Hausdorf D, Altan M, Velcheti V, Gettinger SN, Herbst RS, Rimm DL, Schalper KA. Expression and clinical significance of PD-L1, B7-H3, B7-H4 and TILs in human small cell lung cancer (SCLC). *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):65.
145. Berghoff AS, Ricken G, Wilhelm D, Rajky O, Widhalm G, Dieckmann K, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in brain metastases of small cell lung cancer (SCLC). *J Neurooncol.* 2016;130(1):19-29.
146. Poirier JT, Gardner EE, Connis N, Moreira AL, de Stanchina E, Hann CL, Rudin CM. DNA methylation in small cell lung cancer defines distinct disease subtypes and correlates with high expression of EZH2. *Oncogene.* 2015;34(48):5869-78.
147. Wooten DJ, Groves SM, Tyson DR, Liu Q, Lim JS, Albert R, et al. Systems-level network modeling of Small Cell Lung Cancer subtypes identifies master regulators and destabilizers. *PLoS Comput Biol.* 2019;15(10):e1007343.

148. Yang H, Lee WS, Kong SJ, Kim CG, Kim JH, Chang SK, et al. STING activation reprograms tumor vasculatures and synergizes with VEGFR2 blockade. *J Clin Invest.* 2019;129(10):4350-64.
149. Chon HJ, Kim H, Noh JH, Yang H, Lee WS, Kong SJ, et al. STING signaling is a potential immunotherapeutic target in colorectal cancer. *J Cancer.* 2019;10(20):4932-8.
150. Gaston J, Cheradame L, Yvonnet V, Deas O, Poupon MF, Judde JG, et al. Intracellular STING inactivation sensitizes breast cancer cells to genotoxic agents. *Oncotarget.* 2016;7(47):77205-24.
151. Della Corte CM, Byers LA. Evading the STING: LKB1 Loss Leads to STING Silencing and Immune Escape in KRAS-Mutant Lung Cancers. *Cancer Discov.* 2019;9(1):16-8.
152. Raaby Gammelgaard K, Sandfeld-Paulsen B, Godsk SH, Demuth C, Meldgaard P, Sorensen BS, Jakobsen MR. cGAS-STING pathway expression as a prognostic tool in NSCLC. *Transl Lung Cancer Res.* 2021;10(1):340-54.
153. Barrett RL, Pure E. Cancer-associated fibroblasts and their influence on tumor immunity and immunotherapy. *Elife.* 2020;9.
154. Chen PY, Wei WF, Wu HZ, Fan LS, Wang W. Cancer-Associated Fibroblast Heterogeneity: A Factor That Cannot Be Ignored in Immune Microenvironment Remodeling. *Front Immunol.* 2021;12:671595.
155. Liu T, Han C, Wang S, Fang P, Ma Z, Xu L, Yin R. Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):86.
156. He Y, Rozeboom L, Rivard CJ, Ellison K, Dziadziuszko R, Yu H, et al. MHC class II expression in lung cancer. *Lung Cancer.* 2017;112:75-80.
157. Kamma H, Yazawa T, Ogata T, Horiguchi H, Iijima T. Expression of MHC class II antigens in human lung cancer cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1991;60(6):407-12.
158. Axelrod ML, Cook RS, Johnson DB, Balko JM. Biological Consequences of MHC-II Expression by Tumor Cells in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25(8):2392-402.
159. Armstrong TD, Clements VK, Martin BK, Ting JP, Ostrand-Rosenberg S. Major histocompatibility complex class II-transfected tumor cells present endogenous antigen and are potent inducers of tumor-specific immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(13):6886-91.
160. Forero A, Li Y, Chen D, Grizzle WE, Updike KL, Merz ND, et al. Expression of the MHC Class II Pathway in Triple-Negative Breast Cancer Tumor Cells Is Associated with a Good Prognosis and Infiltrating Lymphocytes. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(5):390-9.
161. Johnson DB, Estrada MV, Salgado R, Sanchez V, Doxie DB, Opalenik SR, et al. Melanoma-specific MHC-II expression represents a tumour-autonomous phenotype and predicts response to anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Nat Commun.* 2016;7:10582.
162. Rodig SJ, Gusenleitner D, Jackson DG, Gjini E, Giobbie-Hurder A, Jin C, et al. MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma. *Sci Transl Med.* 2018;10(450).
163. Plitas G, Konopacki C, Wu K, Bos PD, Morrow M, Putintseva EV, et al. Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer. *Immunity.* 2016;45(5):1122-34.
164. Levine AG, Arvey A, Jin W, Rudensky AY. Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nat Immunol.* 2014;15(11):1070-8.
165. Johnson AM, Bullock BL, Neuwelt AJ, Poczobutt JM, Kaspar RE, Li HY, et al. Cancer Cell-Intrinsic Expression of MHC Class II Regulates the Immune Microenvironment and Response to Anti-PD-1 Therapy in Lung Adenocarcinoma. *J Immunol.* 2020;204(8):2295-307.
166. Cai L, Liu H, Huang F, Fujimoto J, Girard L, Chen J, et al. Cell-autonomous immune gene expression is repressed in pulmonary neuroendocrine cells and small cell lung cancer. *Commun Biol.* 2021;4(1):314.
167. Mahadevan NR, Knelson EH, Wolff JO, Vajdi A, Saigi M, Campisi M, et al. Intrinsic Immunogenicity of Small Cell Lung Carcinoma Revealed by Its Cellular Plasticity. *Cancer Discov.* 2021;11(8):1952-69.
168. Lochmann TL, Floros KV, Naseri M, Powell KM, Cook W, March RJ, et al. Venetoclax Is Effective in Small-Cell Lung Cancers with High BCL-2 Expression. *Clin Cancer Res.* 2018;24(2):360-9.
169. Schenk RL, Strasser A, Dewson G. BCL-2: Long and winding path from discovery to therapeutic target. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482(3):459-69.
170. Campbell KJ, Tait SWG. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol.* 2018;8(5).
171. Anstee NS, Bilardi RA, Ng AP, Xu Z, Robati M, Vandenberg CJ, Cory S. Impact of elevated anti-apoptotic MCL-1 and BCL-2 on the development and treatment of MLL-AF9 AML in mice. *Cell Death Differ.* 2019;26(7):1316-31.
172. Pan R, Ruvolo VR, Wei J, Konopleva M, Reed JC, Pellicchia M, et al. Inhibition of Mcl-1 with the pan-Bcl-2 family inhibitor (-)BI97D6 overcomes ABT-737 resistance in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2015;126(3):363-72.
173. Lochmann TL, Bouck YM, Faber AC. BCL-2 inhibition is a promising therapeutic strategy for small cell lung cancer. *Oncoscience.* 2018;5(7-8):218-9.
174. Juarez-Salcedo LM, Desai V, Dalia S. Venetoclax: evidence to date and clinical potential. *Drugs Context.* 2019;8:212574.
175. Roberts AW, Stilgenbauer S, Seymour JF, Huang DCS. Venetoclax in Patients with Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res.* 2017;23(16):4527-33.
176. Tahir SK, Smith ML, Hessler P, Rapp LR, Idler KB, Park CH, et al. Potential mechanisms of resistance to venetoclax and strategies to circumvent it. *BMC Cancer.* 2017;17(1):399.
177. Zhang Q, Riley-Gillis B, Han L, Jia Y, Lodi A, Zhang H, et al. Activation of RAS/MAPK pathway confers MCL-1 mediated acquired resistance to BCL-2 inhibitor venetoclax in acute myeloid leukemia. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):51.

178. Kuras M, Woldmar N, Kim Y, Hefner M, Malm J, Moldvay J, et al. Proteomic Workflows for High-Quality Quantitative Proteome and Post-Translational Modification Analysis of Clinically Relevant Samples from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Archives. *J Proteome Res.* 2021;20(1):1027-39.
179. Szeitz B; Woldmar N; Valko Z; Megyesfalvi Z BN, Paku S, et al. Proteomic characterization of small cell lung cancer subtypes. 16th Annual US HUPPO Conference, Seattle Washington, USA. 2020.
180. Laszlo V, Valko Z, Ozsvar J, Kovacs I, Garay T, Hoda MA, et al. The FAK inhibitor BI 853520 inhibits spheroid formation and orthotopic tumor growth in malignant pleural mesothelioma. *J Mol Med (Berl).* 2019;97(2):231-42.
181. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010;8(6):e1000412.
182. Torok S, Rezeli M, Kelemen O, Vegvari A, Watanabe K, Sugihara Y, et al. Limited Tumor Tissue Drug Penetration Contributes to Primary Resistance against Angiogenesis Inhibitors. *Theranostics.* 2017;7(2):400-12.
183. Augustyn A, Borrromeo M, Wang T, Fujimoto J, Shao C, Dospoy PD, et al. ASCL1 is a lineage oncogene providing therapeutic targets for high-grade neuroendocrine lung cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(41):14788-93.
184. Costanzo F, Martinez Diez M, Santamaria Nunez G, Diaz-Hernandez JI, Genes Robles CM, Diez Perez J, et al. Promoters of ASCL1- and NEUROD1-dependent genes are specific targets of lurbectedin in SCLC cells. *EMBO Mol Med.* 2022;14(4):e14841.
185. Knelson EH, Patel SA, Sands JM. PARP Inhibitors in Small-Cell Lung Cancer: Rational Combinations to Improve Responses. *Cancers (Basel).* 2021;13(4).
186. Dutta C, Day T, Kopp N, van Bodegom D, Davids MS, Ryan J, et al. BCL2 suppresses PARP1 function and nonapoptotic cell death. *Cancer Res.* 2012;72(16):4193-203.
187. Punnoose EA, Levenson JD, Peale F, Boghaert ER, Belmont LD, Tan N, et al. Expression Profile of BCL-2, BCL-XL, and MCL-1 Predicts Pharmacological Response to the BCL-2 Selective Antagonist Venetoclax in Multiple Myeloma Models. *Mol Cancer Ther.* 2016;15(5):1132-44.
188. Bose P, Gandhi V, Konopleva M. Pathways and mechanisms of venetoclax resistance. *Leuk Lymphoma.* 2017;58(9):1-17.
189. Yue X, Chen Q, He J. Combination strategies to overcome resistance to the BCL2 inhibitor venetoclax in hematologic malignancies. *Cancer Cell Int.* 2020;20(1):524.
190. Fresquet V, Rieger M, Carolis C, Garcia-Barchino MJ, Martinez-Climent JA. Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma. *Blood.* 2014;123(26):4111-9.
191. Yasuda Y, Ozasa H, Kim YH, Yamazoe M, Ajimizu H, Yamamoto Funazo T, et al. MCL1 inhibition is effective against a subset of small-cell lung cancer with high MCL1 and low BCL-X(L) expression. *Cell Death Dis.* 2020;11(3):177.
192. Wang Y, Wang Y, Fan X, Song J, Wu H, Han J, et al. ABT-199-mediated inhibition of Bcl-2 as a potential therapeutic strategy for nasopharyngeal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;503(3):1214-20.
193. Moujalled DM, Pomilio G, Ghiurau C, Ivey A, Salmon J, Rijal S, et al. Combining BH3-mimetics to target both BCL-2 and MCL1 has potent activity in pre-clinical models of acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2019;33(4):905-17.
194. Prukova D, Andera L, Nahacka Z, Karolova J, Svaton M, Klanova M, et al. Cotargeting of BCL2 with Venetoclax and MCL1 with S63845 Is Synthetically Lethal In Vivo in Relapsed Mantle Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2019;25(14):4455-65.
195. Algarin EM, Diaz-Tejedor A, Mogollon P, Hernandez-Garcia S, Corchete LA, San-Segundo L, et al. Preclinical evaluation of the simultaneous inhibition of MCL-1 and BCL-2 with the combination of S63845 and venetoclax in multiple myeloma. *Haematologica.* 2020;105(3):e116-e20.
196. Seiller C, Maiga S, Touzeau C, Bellanger C, Kervoelen C, Descamps G, et al. Dual targeting of BCL2 and MCL1 rescues myeloma cells resistant to BCL2 and MCL1 inhibitors associated with the formation of BAX/BAK hetero-complexes. *Cell Death Dis.* 2020;11(5):316.
197. Siu KT, Huang C, Panaroni C, Mukaiharu K, Fulzele K, Soucy R, et al. BCL2 blockade overcomes MCL1 resistance in multiple myeloma. *Leukemia.* 2019;33(8):2098-102.
198. Kotschy A, Szlavik Z, Murray J, Davidson J, Maragno AL, Le Toumelin-Braizat G, et al. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature.* 2016;538(7626):477-82.
199. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med.* 2013;19(2):202-8.
200. Debernardi J, Hollville E, Lipinski M, Wiels J, Robert A. Differential role of FL-BID and t-BID during verotoxin-1-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene.* 2018;37(18):2410-21.
201. Sundararajan R, Cuconati A, Nelson D, White E. Tumor necrosis factor-alpha induces Bax-Bak interaction and apoptosis, which is inhibited by adenovirus E1B 19K. *J Biol Chem.* 2001;276(48):45120-7.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom PhD mentoromnak, Prof. Tímár Józsefnek, aki munkacsoportjába fogadott és biztosította kutatásaim feltételeit, valamint Prof. Paku Sándornak, aki mindvégig irányította doktoranduszi munkám.

Köszönöm Lapis Károly, Szende Béla, Kopper László és Matolcsy András Professzor Uraknak, hogy intézetvezetőként segítették munkámat a Semmelweis Egyetem I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében.

Köszönettel tartozom az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet korábbi és jelenlegi igazgatóinak, Dr. Kovács Gábornak, Dr. Bogos Krisztinának, valamint osztályvezetőinek, elsősorban Dr. Ostoros Gyulának.

Hálás vagyok továbbá a Semmelweis Egyetem Mellkasebészeti Klinika igazgatójának, Prof. Rényi-Vámos Ferencnek, valamint az Országos Onkológiai Intézet igazgatójának, Prof. Polgár Csabának, hogy munkámban támogattak.

Köszönettel tartozom korábbi és jelenlegi kollegáimnak, elsősorban Dr. Megyesfalvi Zsoltnak, Dr. László Viktóriának, Dr. Hegedüs Baláznak, Dr. Tóvári Józsefnek, Dr. Ladányi Andreának, Dr. Rózsás Anitának, Kovács Ildikónak, Dr. Török Szilviának, Schlegl Erzsébetnek, Tisza Annának és Prof. Marko-Varga Györgynek évtizedes együttműködésükért, továbbá Dr. Berta Juditnak és Tóth Aninának a jelen értekezés összeállításában nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti továbbá Walter Klepetko, Konrad Hoetzenecker és Clemens Aigner Professzor Urakat a Bécsi Orvostudományi Egyetem Mellkasebészeti Klinikáján.

Végezetül gyermekeimnek, Döme Borókának és Döme Ágostonnak, testvéremnek, Dr. Döme Péternek, és néhai szüleimnek, Dr. Herjavec Irénnek és Dr. Döme Lászlónak szeretném megköszönni szeretetüket és útmutatásaikat.

9. Tudománymetriai adatok

Döme Balázs (Tumor indukált angiogenezis) tudományos és oktatói munkásságának összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztálya (2023.10.25)

Tudományos közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratok²	223			
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű		164	4237	5001
szakcikk hazai idegen nyelvű		0	0	0
szakcikk magyar nyelvű		13	18	23
szakcikk sokszerzős, érdemi szerzőként ³		7	154	196
összefoglaló közlemény		35	816	902
rövid közlemény		4	34	34
II. Könyvek	0			
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		0		
bb) Felsőoktatási tankönyv		0		
III. Könyvrészlet	4			
idegen nyelvű		1	0	0
magyar nyelvű		1	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet		2	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	0			
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		2	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV)		225	5259	6156
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV)	227		5259	6156
V. További tudományos művek	17			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikket is		11	4	6
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		6	2	6
Oltalmak (szabadalmak)		0	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok⁵	5		10	11
Összes hivatkozás¹			5275	6179
Hirsch index⁶	44			
g index⁶	70			

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	12	919
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	70	1723
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2004) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	201	5486
Az utolsó 10 év (2013-) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	156	3293
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	354	5,73%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben		274 + 0
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0