

**SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA**

Ph.D. értekezések

3050.

INCZE EVELYN ERZSÉBET

**Experimentális és klinikai farmakológia
című program**

Programvezető: Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Monostory Katalin, tudományos tanácsadó

A tumor *CYP* kópiaszám változása és a terápia- rezisztencia közötti kapcsolat tüdő adenokarcinómával diagnosztizált betegekben

Doktori értekezés

Incze Evelyn Erzsébet

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Monostory Katalin, D.Sc., tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók:

Dr. Keszler Gergely, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Telbisz Ágnes, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság elnöke:

Dr. Szökő Éva, D.Sc., egyetemi tanár

Komplex vizsga szakmai bizottság tagjai:

Dr. Szatmári István, Ph.D., vegyészmérnök

Dr. Zelles Tibor, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés.....	4
1.1 Gyógyszer-metabolizmus.....	5
1.1.1 A gyógyszer-metabolizmus inter-individuális különbségeinek genetikai okai 8	
1.1.2 A gyógyszer-metabolizmus inter-individuális különbségeinek nem-genetikai okai.....	9
1.2 Gyógyszer-metabolizmusban részt vevő CYP enzimek.....	12
1.2.1 CYP1A alcsalád.....	12
1.2.2 CYP2 család.....	12
1.2.3 CYP3A alcsalád.....	16
1.3 Daganatos kórképek.....	18
1.3.1 A tüdődaganat.....	19
1.3.2 A nem-kissejtes tüdőrák kezelési lehetőségei.....	21
1.3.2.1. Célzott terápia.....	22
1.3.2.2 Kemoterápia.....	23
1.4 Terápia-rezisztencia.....	26
1.4.1 A transzporterek szerepe a rezisztencia kialakulásában.....	27
1.4.2 A citokróm P450 enzimek szerepe a terápia-rezisztencia kialakulásában ...	28
2. Célkitűzések.....	30
3. Módszerek.....	31
3.1. Vizsgálatba bevont betegek klinikai adatai.....	31
3.2. DNS izolálás humán eredetű mintákból.....	31
3.3. <i>CYP2C8</i> és <i>CYP3A</i> genotípus meghatározás.....	33
3.4. A <i>CYP</i> gén kópiaszám kimutatása.....	33
3.5. Teljes genom szekvenálás.....	40
4. Eredmények.....	42
4.1. <i>CYP2C8</i> *3 és <i>CYP2C8</i> *4 allélok meghatározása.....	42
4.2. <i>CYP2C8</i> , <i>CYP3A4</i> és <i>CYP3A5</i> genotípusok megállapítása a betegeknél.....	48
4.3. A tumorszövet <i>CYP</i> kópiaszám változásának meghatározására alkalmas módszer kidolgozása.....	51

4.4. A PCR-alapú kópiaszám meghatározás eredményeinek megerősítése új-generációs szekvenálással	55
4.5. A <i>CYP2C8</i> kópiaszám meghatározása tüdő adenokarcinómával diagnosztizált betegek tumor mintájában	57
4.6. Tüdő adenokarcinóma <i>CYP2C8</i> és <i>CYP3A4</i> kópiaszám változása és a betegség kimenetele közötti összefüggések	58
5. Az eredmények értékelése	60
6. Következtetések	65
7. Összefoglalás	66
8. Summary	67
9. Irodalomjegyzék	68
10. Saját publikációk jegyzéke	85
10.1. Disszertációhoz kapcsolódó publikáció	85
10.2. Disszertációtól független publikációk jegyzéke	85
11. Köszönetnyilvánítás	86

Rövidítések jegyzéke

ABCB1	-	ATP- kötő fehérje B 1, „ <i>ATP-binding cassette B 1</i> ”
ALB	-	albumin
ASCAT	-	„ <i>allele-specific copy number analysis of tumors</i> ”
B2M	-	beta-2-mikroglobulin
bp	-	bázis pár
BCKDHA	-	elágazó láncú α -ketosav dehidrogenáz
CD36	-	CD 36 molekula
CYP	-	citokróm P450
EGFR	-	epidermális növekedési faktor receptor
F5	-	V. koagulációs faktor
GRCh38	-	pán genom, jelenleg használt referenciagenom
MPO	-	mieloperoxidáz
MRP	-	multidrog-rezisztencia asszociált fehérjék
NSCLC	-	nem-kissejtes tüdőrák
OATP	-	szerves anion transzporter, „ <i>organic anion transporting polypeptides</i> ”
PCR	-	polimeráz-láncreakció
RPPH1	-	ribonukleáz P RNS komponens H1
SNP	-	egy pontos nukleotid polimorfizmus
TBP	-	TATA box kötő fehérje
TNM	-	Daganatok stádiumbeosztása a primer tumor, a nyirokcsomó érintettség és metasztázisok alapján
UNG	-	uracil-N-glikoziláz
Vmax	-	enzimaktivitás maximális sebessége

1. Bevezetés

Az emberi szervezet folyamatosan ki van téve a xenobiotikumoknak, olyan testidegen anyagoknak, amelyeket általában enzimatikus úton végbemenő átalakítást követően inaktivál. A biotranszformáció során kialakított metabolit vízoldékonyabb az anyavegyülethez viszonyítva és könnyebben kiürül a szervezetből az epén vagy vesén keresztül. A xenobiotikumok metabolizmusa főként a májban játszódik le. A gyógyszerhatóanyagok biotranszformációjában legfőbb szereppel a citokróm P450 (CYP) enzimek rendelkeznek. Inter-individuális különbségek figyelhetők meg a gyógyszer-metabolizmusban, amelyek egyrészt genetikai másrészt környezeti tényezőkre vezethetők vissza. A CYP enzimekben megfigyelt egy pontos nukleotid polimorfizmusok („*single nucleotide polymorphism*” - SNP) és a *CYP* gének kópiaszámának változása következtében az enzimek metabolikus aktivitása megváltozhat. Ezen genetikai változások fenotípus szinten gyenge vagy fokozott metabolizáló képességet eredményeznek, ezért kiemelt jelentőségű az enzimek genetikai polimorfizmusainak ismerete, hiszen a megfelelő terápia kialakítását segítheti elő. A daganatszövetet felépítő tumorsejtekre jellemző genom instabilitás következtében elképzelhető, hogy a *CYP* gének kópiaszámában változás következik be, amely megváltozott gyógyszer-metabolizáló képességet, ezáltal terápia-rezisztencia kialakulását eredményezheti.

A daganatos megbetegedések a szív- és érrendszeri megbetegedéseket követően a világ második legnagyobb mortalitású megbetegedései. Leggyakrabban diagnosztizált típusa a tüdő adenokarcinóma, amelynek öt éves túlélése alig éri el a 20%-ot. A tüdő adenokarcinóma első vonalbeli kezelése paklitaxel és egy platina alapú vegyület együttes alkalmazásából áll. A paklitaxel metabolizmusában fő katalizátor szereppel a *CYP2C8* enzim rendelkezik, míg kisebb mértékben a *CYP3A4* járul hozzá az inaktív metabolitok kialakításához. Ezen enzimeket kódoló génekre jellemző polimorfizmusok és kópiaszám változások nagymértékben befolyásolhatják a hatóanyag terápiás hatását, valamint a kezelés kimenetelét.

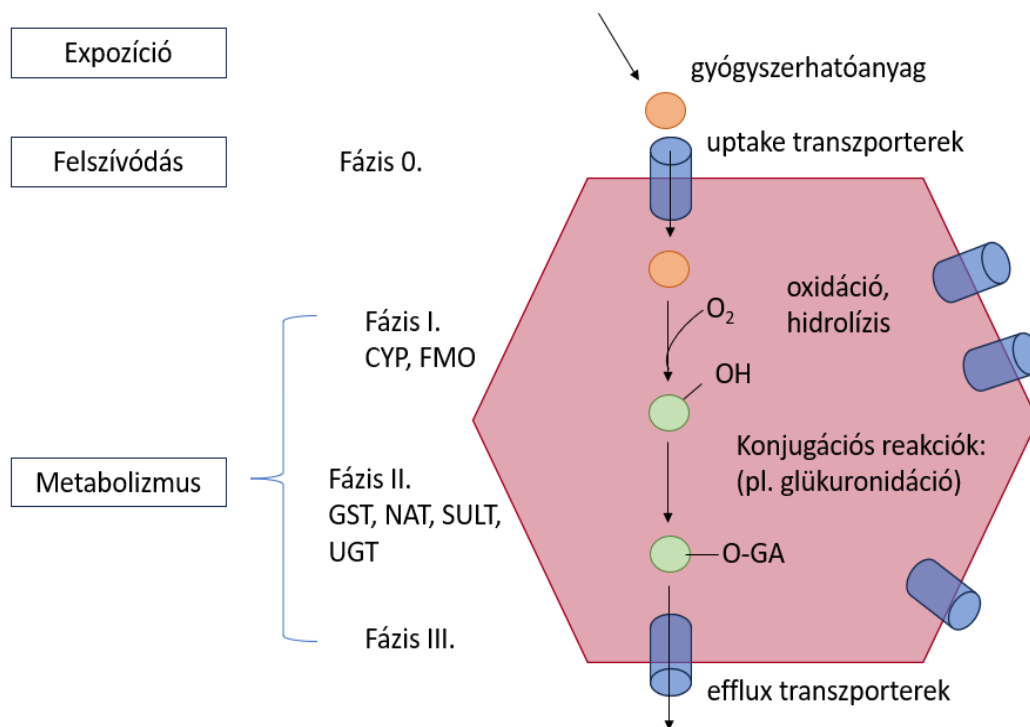
A dolgozatban bemutatásra kerül egyrészt a tüdő adenokarcinómával diagnosztizált betegek paklitaxel-metabolizáló képessége (*CYP2C8* és *CYP3A4* genetikai polimorfizmusai), másrészt a tumor mintákban a *CYP2C8* és *CYP3A4*

kópiaszám változás kimutatására alkalmas PCR-alapú (polimeráz-lánreakció) metodika kidolgozása és alkalmazása.

1.1 Gyógyszer-metabolizmus

Az élő organizmusok számára fontos a szervezetbe bejutott xenobiotikumoktól, testidegen vegyületektől való megszabadulás, amely enzimatikus úton valósul meg, elősegítve a vízzoldékonyabb metabolitok kialakítását és könnyebb kiürülésüket a szervezetből. A testidegen anyagok metabolizmusának folyamatában két fő fázist (fázis I. és II.) különítünk el, amelynek során a testidegen anyagok átalakulása megtörténik, ezáltal védelmet biztosítva a szervezetnek a káros anyagokkal szemben. Egy exogén vegyület koncentrációjának időbeli változását az abszorpció, disztribúció, metabolizmus és kiválasztás (ADME) folyamatai határozzák meg. A szervezetbe került gyógyszer molekula felszívódása két lehetséges módon valósul meg: passzív vagy aktív transzport formájában, a felszívódás helyét pedig a gyógyszeradagolás módja határozza meg. Egy lipofil xenobiotikum hidrofil formájának kialakítása enzimatikusan közvetített folyamat (1), amely elengedhetetlen ahhoz, hogy a hatóanyag a kiválasztó rendszeren vagy az epén keresztül elhagyhassa a szervezetet. A keringésbe kerülve a hatóanyag eljut a szövetekhez, ahol a metabolizmus lejátszódhat. Ennek eredményeképp létrejöhet 1) terápiás aktivitással rendelkező aktív metabolit prodrug esetében, 2) csökkent vagy hatást vesztett inaktív metabolit vagy 3) toxikus metabolit. A gyógyszervegyület szervezeten belüli sorsa szempontjából négy fázist különíthetünk el. Az uptake transzporterek (organikus anion transzporter polipeptid – OATP), amelyek a xenobiotikumot a sejten belüli térbe szállítják a 0. fázisba sorolhatók. A gyógyszerhatóanyagok leggyakoribb inaktivációja oxidáció során történik. A folyamat lebonyolítását a mikroszomális kevert funkciójú oxigenázok („*mixed function oxidase*”) hajtják végre. A citokróm P450 (CYP), valamint a flavin-monooxigenáz (FMO) enzimek alkotják a kevert funkciójú oxidázokat. A fázis I.-ben elsődlegesen a CYP családba tartozó enzimek játszanak kulcsszerepet a szubsztrátok biotranszformációjában. A gyógyszerhatóanyag szerkezetében funkcionális csoportok alakulnak ki a CYP enzimek által katalizált reakciók következtében (2–5), ezáltal előkészítve a fázis II.-ben szerepet játszó enzimek

(UDP-glükuronil-transzferázok, glutation-S-transzferázok, szulfotranszferázok, N-acetil-transzferázok) konjugációs reakcióit (glükuronidáció, glutation konjugáció, szulfatálás, glicin vagy glutamin konjugáció, acetiláció és metiláció), amelyek eredményeként poláros és vízdékony vegyületekké alakulnak. Az így kialakított konjugált vegyületek az efflux transzportereken (fázis III.) keresztül kerülnek az extracelluláris térbe (6,7).



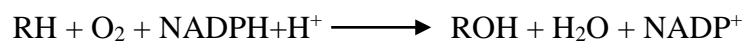
1. ábra: Testidegen vegyület (gyógyszerhatóanyag) metabolizmusa és exkréciója májsejtben. A testidegen gyógyszervegyület uptake transzporterek (0 fázis) segítségével kerül sejten belüli térbe, ahol a fázis I. enzimek citokróm P450 (CYP), flavin-monooxigenázok (FMO) majd a fázis II. enzimek által (glutathion S-transzferázok - GST, N-acetil transzferázok - NAT, szulfotranszferázok – SULF, UDP-glükuronsav transzferázok - UGT) katalizált konjugációs folyamatok eredményeként (például glükuronidáció) a kialakított metabolit vízdékonyabbá válik, ezáltal elősegítve szervezetből történő kiürülését (4) alapján.

A CYP enzimek felfedezése 1954-re nyúlik vissza, amikor azt először Klingenberg izolálta patkány máj mikroszomából (8). Emberben 57 funkcionálisan aktív *CYP* gént azonosítottak a humán genomban, amelyeket az aminosav szekvencia-homológia alapján 18 családba és 44 alcsaládba soroltak (9,10). Az aktív gének mellett 58 pszeudogén is ismert. A CYP enzimek osztályozását az egységesített nomenklatúra kidolgozása segítette elő. A nevezéktan alapján a CYP

a citokróm P450 rövidítése, amelyet a családot jelző arab szám követ. Az azonos családba sorolt enzimek fehérje szekvenciája 40%-os homológiát mutatnak. Ezt követi az alcsaládra utaló nagybetű. Azonos alcsaládba azok az enzimek kerülnek, amelyek aminosav szekvenciájának azonossága meghaladja az 55%-t. Az alcsaládba tartozó egyes enzimek megkülönböztetésében arab szám használata nyújt segítséget (például a CYP2C8 = CYP szupercsalád, 2 családjának C alcsaládjába tartozó 8-as enzimre utal).

A CYP enzimek a sima felszínű endoplazmatikus retikulum membránjában (50 enzim), valamint a mitokondrium membránjában (7 enzim) található meg (8,11). A CYP enzimek főként a májban kerülnek kifejeződésre. A CYP3A4 enzim a máj össz CYP készletének 14,5-37% közötti, míg a CYP3A5 enzim megközelítőleg 1%-át jelenti. A további biotranszformációban fontos szerepet betöltő enzim máj össz CYP mennyisége a következőképp tevődik össze: a CYP1A1 <1%-ban, a CYP1A2 4,4-16,3%-ban, a CYP2A6 3,6-14%-ban, a CYP2B6 1,7-5,3%-ban, a CYP2C8 megközelítőleg 7,5%-ban, a CYP2C9 4,5-29%-ban, a CYP2C19 0,9-3,8%-ban, a CYP2D6 1,3-4,3%-ban, a CYP2E1 5,5-16,5%-ban, CYP2J2 kevesebb mint 1%-ban járul hozzá (6). Extrahepatikus szervekben, mint a gasztrointesztinális traktusban, vesében, tüdőben, agyban és placentában is jelen vannak a CYP enzimek (6,12–17). A CYP 1-3 családba tartozó enzimek elsődlegesen a testidegen anyagok átalakításának folyamatait katalizálják, míg a CYP 4-51 családba tartozó enzimek endogén, élettani funkciót ellátó vegyületek, mint például a szteroid hormonok, prosztaglandinok és epesavak bioszintézisében és lebontásában vesznek részt (6).

CYP enzim szupercsalád tagjai a hem-tiolát fehérjék közé sorolhatóak, az enzim fehérjéhez vas-tiolát kötéssel kapcsolódik a protoporfirin IX gyűrű. A CYP enzimek monooxigenázok, amelyek az oxigén molekula egyik oxigénatomját beépítik az átalakítandó szubsztrátvegyületbe, míg a második oxigénatom vízzé redukálódik (4,18). Leegyszerűsítve az alábbi képlet alapján történik a szubsztrát (RH) átalakítása, amelyhez az elektrontranszportot a NADPH -citokróm P450 reduktáz vagy a citokróm b₅ biztosítja (2. ábra).



2. ábra: Citokróm P450 által katalizált reakció. Az RH a szubsztrátot jelöli (19).

1.1.1 A gyógyszer-metabolizmus inter-individuális különbségeinek genetikai okai

Populációs szinten jelentős inter-individuális eltérések tapasztalhatóak a gyógyszerhatóanyagokra adott válaszreakciókban, amelyek részben farmakokinetikai okokra vezethetők vissza. A gyógyszervegyület szervezetben kialakult koncentrációját befolyásolhatják a metabolizmusban részt vevő enzimek és transzportfehérjék genetikai polimorfizmusai. A gyógyszer-metabolizmusban részt vevő enzimek polimorfizmusainak ismerete fontos információval szolgál a terápiás döntések meghozatalában, annak érdekében, hogy a leghatékonyabb és biztonságos (toxikus mellékhatások elkerülése) kezelési módszer kerüljön kiválasztásra a beteg számára (20). A gyógyszer-metabolizmusban részt vevő CYP enzimekre (CYP1-3) nagyobb mértékű polimorfizmus jellemző, mint a többi, az endogén anyagok metabolizmusát katalizáló CYP enzimre.

A mutációk következményeként funkcionális változások alakulhatnak ki, amelyek a CYP enzim aktivitását és/vagy expresszióját befolyásolhatják. Az allélvariánsokban azonosított mutációk aminosav cseréhez (*CYP2C8*3*, *CYP2C8*4*), „splicing” (kivágódási) hibához (*CYP2C19*2*, *CYP2D6*4*), kereteltolódáshoz (*CYP2C19*4*, *CYP2D6*6*), vagy stop-kodon kialakulásához (*CYP2C19*3*), vagy megváltozott expresszióhoz (például: *CYP3A4*1B*, *CYP2C19*17*) vezethetnek (6). Az aminosav csere következtében módosulhat a fehérje konformációja, míg az inzerciók, deléciónok, kereteltolódások és a kópiaszám változások (teljes gén deléción, multiplikáción/duplikáción) az enzim expressziójának megváltozását idézhetik elő (21). Egyik leggyakrabban előforduló és azonosítható változás nukleotid szinten az egy pontos nukleotid polimorfizmus („*single nucleotide polymorphism*” - SNP), amely egy bázisban tér el a referencia DNS szekvenciától. A jelenlegi technikai eszközök segítségével (szekvenálás, microarray-SNP, hidrolízis SNP analízis) megállapíthatóak az egyén genomjában az eltérések, amely alapján meghatározható a CYP genotípus. A gének a diploid genomban általánosan két kópiában fordulnak elő. Azonban, szerkezeti változások kialakulása miatt a gének kópiaszáma módosulhat („*copy number alteration*” - CNA), amelyek 50 bázispárnál nagyobb eltéréseket foglalnak magukba.

Az egyén fenotípusa meghatározható a *CYP* gének polimorfizmusainak azonosításával, amely alapján négy fő metabolizáló csoport került kialakításra: gyenge, közepes, normál és ultragyors. A gyenge metabolizálókra két nem funkcionális enzimet kódoló allél jellemző, amelyek csökkent enzimaktivitást eredményeznek, és hajlamosító tényező lehet a fokozott gyógyszer mellékhatások megjelenésére. Ugyanis a funkcióvesztéssel járó genetikai változások csökkent gyógyszer-eliminációt és megnövekedett plazma koncentrációt eredményeznek. A mellékhatások elkerülése érdekében az adott gyógyszerhatóanyag dózisének csökkentése szükséges (22). A közepes (intermediér) metabolizálók egy csökkent működőképességű enzimet kódoló és egy vad típusú allél heterozigóta hordozói, ellentétben a normál metabolizálókkal, akik két vad típusú allélt hordoznak. Az ultragyors metabolizálókra a kettőnél több funkcionális enzimet kódoló allél jelenléte jellemző, valamint olyan allélvariáns jelenléte (például *CYP2C19*17* vagy *CYP2B6*22*), amely fokozott expressziót és fokozott enzimaktivitást eredményez. A funkció fokozódást eredményező változások, expresszió növekedést és fokozott metabolikus aktivitású fehérjét eredményeznek, ezáltal felgyorsítják a gyógyszerhatóanyag metabolizmusát és csökkentik a plazma hatóanyag-koncentrációját (6,23,24).

1.1.2 A gyógyszer-metabolizmus inter-individuális különbségeinek nem-genetikai okai

Ahhoz, hogy pontos farmakokinetikai becslést lehessen végezni a terápiás hatóanyagokra vonatkozóan, elengedhetetlen a *CYP* enzimek működését és kifejeződését befolyásoló belső és külső tényezők átfogó ismerete (6,25). Fontos szerepet játszanak az olyan nem-genetikai tényezők, mint a beteg neme, életkora, betegségei, testsúlya, betegségek és gyulladások, valamint a betegségek kezelésére alkalmazott gyógyszeres terápia (6). A *CYP3A4* és *CYP1A2* nőkben, míg a *CYP3A5* férfiakban mutatott fokozott mRNS expressziót (26). Az életkorral a gyógyszer-metabolizmusban részt vevő enzimek aktivitásának változását figyelték meg. Újszülöttek első életévében (például *CYP2D6* vagy *CYP2E1*) (27–30), valamint időskorban egyes *CYP* enzimeknél alacsony expressziót figyeltek meg más életkorokhoz viszonyítva. Újszülöttek esetében ez azzal magyarázható, hogy

bizonyos CYP enzimek a posztnatális időben érési folyamaton mennek keresztül, amely során elérik a felnőttkori enzimaktivitás szintjét (például CYP1A2 a születést követő 1 hónaptól válik detektálhatóvá és az 5-15 éves életkorban közelíti meg a felnőttben azonosított aktivitást) (30–33). A gyógyszerhatóanyag kiürítését időskorú emberek esetében fontos nyomon követni azon gyógyszerek esetében, amelyek szűk terápiás tartománnyal rendelkeznek, mint például a véralvadásgátlók (6). A CYP enzimek működése módosulhat olyan betegségek hatására, mint a fertőzés, gyulladás vagy daganatos betegség (6,34). Általánosságban a gyulladás hatására a CYP enzimek aktivitása csökken (például CYP3A4 és CYP2C19), viszont ismert olyan CYP enzim (például a CYP2D6), amelyekre a gyulladás nincs hatással (34–36). Krogstad és munkatársai vizsgálatukban a testsúly-változás májban expresszált CYP enzimek aktivitására gyakorolt hatását vizsgálva azt tapasztalta, hogy a CYP3A4 enzimaktivitása csökkent, ellentétben más CYP enzimek aktivitásával, amelyek nem mutattak eltérést (CYP2B6, CYP2C8, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2) (37). Továbbá a gyógyszer-interakciók hatására a CYP enzimek aktivitása szintén módosulhat (13).

A gyógyszer-metabolizmusban részt vevő enzimek indukciója és gátlása szintén a nem-genetikai tényezők közé sorolhatók, amelyek kiemelkedő fontosságúak a gyógyszer-interakciók feltárásában és megértésében, ezáltal a kezelés biztonságossá tételében és toxikus mellékhatások elkerülésében. Továbbá az enzim indukció vagy gátlás időskorban is fontos szerepet játszik, hiszen a különböző társbetegségek kezelésében alkalmazott farmakonok (gyógyszerhatóanyagok) kölcsönhatásba léphetnek egymással (38).

A CYP enzimek indukciója elsősorban nukleáris receptorok, mint az aromás szénhidrogén-receptor (AhR), a pregnán-X-receptor (PXR), a konstitutív androsztán-receptor (CAR), a peroxiszóma-proliferátor-aktivált receptor (PPAR), glükokortikoid receptor (GR), vitamin D₃ receptor (VDR) által valósul meg. Az aromás szénhidrogén-receptor döntő fontosságú a CYP1A1, CYP1A2 és CYP1B1, valamint egyes transzporterek indukciójában. A májban és a bél enterocitáiban kifejeződő pregnán-X-receptor központi szerepet tölt be számos CYP gén indukciójának megvalósításában. Rugalmas ligand kötő zsebe lehetővé teszi sokféle xenobiotikum felismerését. Számos CYP gén expresszióját szabályozza,

mint a *CYP2B6*, a *CYP2C* és *CYP3A* géneket, valamint uptake transzportereket („*organic anion transporting polypeptides*” - OATP) és efflux transzportereket (ABC - transzporterek, multidrog-rezisztencia asszociált fehérjék – MRP-k). A konstitutív androsztán-receptor xenobiotikumok metabolizmusában részt vevő számos gén szabályozásában vesz részt, átfedés figyelhető meg a pregnán-X-receptor és konstitutív androsztán-receptor célgénjei között: *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, *CYP3A5*. A konstitutív androsztán receptor ligandja foszforilációs-defoszforilációs kaszkád elindításával aktiválja a receptort (39,40). Induktor által kiváltott aktiválás következtében a nukleáris receptorok homo- vagy heterodimert alkotnak egy dimerizációs partnerrel és a sejtmagba transzlokálódnak, majd a *CYP* gének promóter régiójában található specifikus szabályzó régiókhöz („*xenobiotic response element*” - XRE) kötődnek és fokozzák a célgének transzkripcióját. A nukleáris faktorok által közvetített szabályozás módosítását a korepresszorok, koaktivátorok és hiszton acetilázok befolyásolják (41).

A *CYP* enzimek gátlása akadályozza a farmakon biotranszformációját, ezáltal annak plazma koncentrációja magasabb lesz, amely toxikus reakciókat idézhet elő. Amennyiben prodrugról van szó, az aktív metabolit képződése nem tud végbe menni, ezért a terápiás hatás elmarad, vagyis a gátlás hatására a fenotípus ideiglenesen megváltozik a genotípustól függetlenül. A genotípus alapján becsülhető a fenotípus, amelyet olyan nem-genetikai tényező modulálhat, mint a gyulladás során felszabaduló citokinek, vagy gyógyszer-kölcsönhatások következtében kialakuló ideiglenes eltérések. Ezt a jelenséget, amikor a genotípushoz ideiglenesen nem a megfelelő fenotípus társul fenokonverciónak nevezzük (42). Az enzim működésének gátlása lehet reverzibilis vagy irreverzibilis. Az irreverzibilis mechanizmus alapú enzimgátlás különösen veszélyes lehet. A farmakon enzimátikus átalakulása során a kialakított metabolit nem disszociál az enzimről, így tartós enzimaktivitás veszteséget okoz. Ilyen gátlószer a *CYP2C8* számára a gemfibrozil glükuronidált metabolitja (1-*O*- β -glükuronid), amely gátolja több *CYP2C8* szubsztrát biotranszformációját: cerivastatin, repaglinid, rosiglitazon és pioglitazon (2,4,43–48).

1.2 Gyógyszer-metabolizmusban részt vevő CYP enzimek

1.2.1 CYP1A alcsalád

A 15. kromoszómán (15q24.1) található *CYP1A1* és *CYP1A2* gének a 2. kromoszómán (2p22.2) található *CYP1B1* génnel együtt alkotják a CYP1 családot. A CYP1A enzimek katalitikus aktivitása átfedést mutat, különösen a policiklusos aromás szénhidrogének és az aromás vegyületek hidroxilálásában és oxidatív módosításában. Ezenkívül elősegítik a szenesedett élelmiszerekben és az ipari égés során keletkezett melléktermékekben található pro-karcinogének bioaktiválását, ezáltal olyan karcinogén köztes termékeket, intermediereket hoznak létre, amelyek a DNS károsodását idézik elő. A *CYP1A2* enzimatisz szerepe figyelemre méltó olyan hatóanyagok esetében, mint a mindennapokból ismert koffein vagy az asztma és krónikus tüdő betegségben alkalmazott teofillin, amely a hörgők simaizmaait tágítja (49). A CYP1A enzimeket alapos vizsgálatnak vetették alá daganat érzékenységét meghatározó tényezőkkel kapcsolatban, elsősorban a pro-karcinogén anyagok metabolizmusában betöltött funkcionális szerepük miatt. A *CYP1A1* szerepe a dohányban gyakran előforduló rákkeltő anyagok, például az aromás aminok és a policiklusos aromás szénhidrogének enzimatisz semlegesítésében jól ismert (19).

1.2.2 CYP2 család

A CYP2 család 16 gént foglal magába, amelyek több kromoszómán helyezkednek el, és három fő géncsoportba sorolhatóak. Az első klaszterbe a 19. kromoszómán található *CYP2A6*, *CYP2B6* és *CYP2F1* gének sorolhatóak, míg a második klaszterbe a 10. kromoszómán elhelyezkedő *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19* és *CYP2C18* gének tartoznak. A harmadik klasztert a 22. kromoszómán található *CYP2D6* gén képviseli (6). A CYP2C alcsaládot részletesen ismertetem, mivel a dolgozat középpontjában a *CYP2C8* génben előforduló allélok azonosítása, valamint az allélvariánsok és a gén kópiaszám változás vizsgálata áll.

Annak ellenére, hogy a CYP2C enzimek nagyfokú aminosav-szekvencia homológiát mutatnak, különbségek figyelhetők meg a szubsztrát specifitásukban és a gyógyszer-metabolizmusban betöltött szerepük tekintetében (1. táblázat).

1. táblázat: A CYP2C9, CYP2C19, CYP2C8 és CYP3A4 klinikailag fontos izoenzimek szubsztrátjainak összefoglalása (6,46,47 alapján).

Enzim	Szubsztrátok
CYP2C8	amodiaquine, cerivasztatin, paklitaxel, rosiglitazon, troglitazon, all- <i>trans</i> -retinol sav, arachidonsav
CYP2C9	losartan, fenitoin, valproát, tolbutamid, S-warfarin, diklofenák, ibuprofen, celecoxib
CYP2C19	omeprazol, pantoprazol, citalopram, diazepam, S-mefenitoin, clopidogrel
CYP3A4	atorvasztatin, szimvasztatin, midazolám, diazepam, vinkrisztin, irinotekán, gefitinib, docetaxel, erlotinib, etopozid, takrolimusz, ciklosporin A

A CYP2C8 számos exogén vegyület és endogén molekula metabolizmusában vesz részt (1. táblázat). A májon kívül más szövetekben is kifejeződik, beleértve a gyomor-bél traktust, a veséket, a mellékveséket és a mandulákat (52). Számos, klinikai következményekkel járó *CYP2C8* allélvariáns ismert (2. táblázat). A *CYP2C8*3*, amely két aminosavcseréhez is vezet (rs11572080, g.2130G>A, R139K; rs10509681, g.30411A>G, K399R), amelyek csökkent enzimaktivitást eredményeznek paklitaxel és arachidonsav metabolizmusban, viszont feltételezhető az allélvariáns szubsztrát-függő hatása (53–56). *In vitro* a paklitaxel és arachidonsav metabolizmusban jelentős csökkenést figyeltek meg a mutáns *CYP2C8*3* allél jelenlétében a vad típusú allélhoz viszonyítva, amelyet további kísérletek igazoltak (57–60). A szakirodalomban olyan vizsgálatról is lehet olvasni, amely kis mértékű eltérést mutatott ki paklitaxel metabolizmusban *CYP2C8*3* allél jelenlétében a vad típusú allélhoz viszonyítva, míg Marcath és munkatársai (61) klinikai vizsgálatukban megfigyelték, hogy azok az emlődaganattal diagnosztizált betegek, akik hordozták a *CYP2C8*3* allélt a paklitaxel felezési ideje ($T_{c>0,05}$)

rövidebb volt, vagyis gyorsabban lejáródott a metabolizmus esetükben vad típusú allélt hordozókhoz viszonyítva. A repaglinid, rosiglitazon és pioglitazon metabolizmusa során alacsony plazma koncentrációt figyeltek meg a *CYP2C8*3/*3* és *CYP2C8*1/*3* genotípussal rendelkező betegekben (52,54,62–66). A *CYP2C8*3* allél jelenléte *in vitro* körülmények között nincs hatással az amidaron metabolizmusra (67), valamint a sztereoszelektív ibuprofen metabolizmusban minimális a *CYP2C8* szerepe (52). A kaukázusi populációban nagyobb gyakorisággal mutatták ki a *CYP2C8*3* allélt (6,5-14%), mint az afrikai vagy ázsiai populációkban, amelyekben nagyrészt hiányzik. A *CYP2C8*4* allélra jellemző SNP csökkent enzimaktivitást eredményez az 11041 pozícióban történő citozin guaninra való báziscsere során (rs1058930), ami a fehérjében a 264. pozícióban izoleucinről metioninra történő cseréhez vezet. A *CYP2C8*4* 3-7%-os gyakorisággal fordul elő a kaukázusi populációban, míg az ázsiai és afrikai populációkban kevesebb mint 1%-ban detektálható. A *CYP2C8*4* allél jelenlétében egyértelműen enzimaktivitás csökkenésről számoltak be a paklitaxel, repaglinid és ibuprofen metabolizmus során, amelynek magyarázatához hozzájárulhat, hogy az aminosav csere hatására a fehérje stabilitása megváltozik (52,59).

CYP2C9 hozzávetőlegesen az alkalmazott gyógyszerhatóanyagok 15%-nak metabolizmusában vesz részt (1. táblázat). A kaukázusi populációban klinikai jelentősége a *CYP2C9*2* és *CYP2C9*3* allélvariánsoknak van (2.táblázat). A *CYP2C9*2* 20-30%-kal csökkenti az enzim metabolikus aktivitását S-warfarin és tolbutamid esetében, míg a *CYP2C9*3* allél esetén 70%-kal alacsonyabb maximális sebességről (V_{max} -ról) számoltak be (68). Szoros kapcsoltsági viszonyt mutattak ki a *CYP2C9*2* allélra jellemző g.3608C>T pont mutáció és a *CYP2C8*3*-ban detektálható mutációk (g.2130G>A és g.30411A>G) között, amely befolyásolhatja a *CYP2C8-CYP2C9* szubsztrátok átalakításának sebességét (69). A *CYP2C9*3/*3* genotípus 90%-kal lassabb S-warfarin biotranszformációt eredményez a vad típusú allélt hordozó egyénekhez viszonyítva (70). Szűk terápiás tartománnyal rendelkező valproát metabolizmusának egyik útvonala a CYP enzimek által valósul meg, amelyben fő szerepet tölt be a *CYP2C9*. A kutatócsoport *CYP2C9* genotípusa és expressziója alapján személyre szabott kezelést dolgozott ki a 15 évnél fiatalabb gyerekek számára (6,22,68,71).

CYP2C19 jelentős mértékben járul hozzá a proton pumpa gátlók, vagy a véralvadásgátló klopidogrel metabolizmusához (1. táblázat). Klinikai jelentőségűek a *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* és *CYP2C19*17* allélvariánsok. A *CYP2C19*2* allélvariáns következtében a képződő mRNS érése hibás, amely inaktív fehérjét eredményez, míg a *CYP2C19*3* esetében korai stop kodon kialakulása vezet működésképtelen fehérjéhez. A gyenge metabolizáló képességért a *CYP2C19*2* és *CYP2C19*3* allélok felelősek (2. táblázat). A *CYP2C19*17* allél jelenlétét fokozott enzim működéssel társították, amely következtében az omeprazol vérszint időbeli változását leíró görbe alatti terület („*area under the curve*” – AUC) 35-40%-kal alacsonyabb volt, mint azoknál, akik a vad típusú allélt hordozták (6,68,72).

A CYP2D6 a gyógyszerek közel 15-25%-nak biotranszformációjában vesz részt. Szubsztrátjai közül érdemes kiemelni a tamoxifent, amelyből az N-dezmetil tamoxifen metabolit képződését a CYP3A4 és /vagy CYP3A5 végzi, majd ezt követően az endoxifen metabolit kialakításában a CYP2D6 vesz részt, amely terápiásan aktív metabolit, vagyis daganatellenes hatással rendelkezik, míg a 4-hidroxitamoxifen kialakítását kizárólag a CYP2D6 végzi (73). Kaukázusi populációban több allélvariánsa ismert (*CYP2D6*4*, *CYP2D6*5*, *CYP2D6*6*, *CYP2D6*9*, *CYP2D6*10*, *CYP2D6*41*), amelyek klinikai relevanciával rendelkeznek (6,68). A tamoxifen kezelés sikerességét nagymértékben befolyásolja a *CYP2D6* null (*CYP2D6*4*, *CYP2D6*5*) és csökkent enzimaktivitást (*CYP2D6*10*, *CYP2D6*41*) eredményező allélok jelenléte (74,75). Ugyanis a *CYP2D6*5* allél jelenlétében deléció, míg *CYP2D6*3*, *4 vagy *6 allélok null aktivitást eredményeznek, amelynek eredményeképpen nem képződik a terápiás aktivitással rendelkező metabolit, az endoxifen (6). *CYP2D6*10* allél jelenlétében az enzim affinitása a szubsztrátokhoz csökkent, míg a *CYP2D6*41* allél maga után vonja a mennyiségi csökkenését a funkcionális mRNS-nek, így a CYP2D6 fehérje mennyisége és aktivitása is csökken (76,77).

2. táblázat: CYP2C alcsaládba tartozó gének kaukázusi populációban gyakori polimorfizmusai.

Allélvariáns	Meghatározó SNP (azonosító)	Enzimaktivásra gyakorolt hatás	Előfordulási gyakoriság kaukázusi populációban (%) (6)
<i>CYP2C8*3</i>	g.2130G>A (rs11572080) g.30411A>G (rs10509681)	ellentmondásos ^a	6,5-14
<i>CYP2C8*4</i>	g.11041C>G (rs1058930)	csökkent	3-7
<i>CYP2C9*2</i>	g.3608C>T (rs1799853)	csökkent	8-19
<i>CYP2C9*3</i>	g.42614A>C (rs1057910)	csökkent	6-10
<i>CYP2C19*2</i>	g.19154G>A (rs4244285)	inaktív	6-15
<i>CYP2C19*3</i>	g.17948G>A (rs4986893)	inaktív	>1
<i>CYP2C19*17</i>	g.-806C>T (rs12248560)	fokozott	21-25

^a Az irodalmi adatok ellentmondásosak, feltételezhető a *CYP2C8*3* allél hatása szubsztrát függő (55,78,79).

1.2.3 CYP3A alcsalád

A *CYP3* géncsalád egyetlen alcsaládból áll, amely négy gént - *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* és *CYP3A43* – foglal magába a 7q22.1 kromoszóma pozícióban. A májban a *CYP3A4* expresszálódik a legnagyobb mennyiségben (85,4%), a *CYP3A5* és a *CYP3A43* expressziós szintje alacsony, míg a *CYP3A7* jellemzően a fetális májban detektálható. A bél enterocitáiban szintén jelentős a *CYP3A4* expressziója, ami kiemeli központi szerepét a gyógyszerek „first-pass” metabolizmusában. Ezzel szemben a *CYP3A5* expressziója túlnyomórészt az agyban, a légutakban, a tüdőben és a vesében figyelhető meg, ahol az vagy dominál, vagy a *CYP3A4* expressziós szintjével megegyező szintet mutat (6).

A klinikumban alkalmazott gyógyszerek körülbelül 30%-át a CYP3A alcsaládba tartozó enzimek metabolizálják. Tág aktív centrumának köszönhetően a CYP3A4 enzim képes nagyon különböző szerkezetű gyógyszer-molekulák metabolizmusát katalizálni (1. táblázat). Tekintettel a CYP3A4 és a CYP3A5

közötti nagyfokú aminosav-szekvencia hasonlóságra, a szubsztrát specificitásukban átfedés figyelhető meg. (80–82). A kaukázusi populációban a *CYP3A4*1B* allél proximális promóter régiójában azonosított g.–392A>G SNP (rs2740574) fokozott *CYP3A4* expresszióval hozható összefüggésbe, előfordulási gyakorisága 2-9% (83). A polimorfizmus klinikai következményei azonban vitatottak, mivel a *CYP3A4*1B* és a *CYP3A5*1* között kapcsoltsági viszony áll fenn és nem lehet egyértelműen különbséget tenni a *CYP3A4*1B* és a vad típusú *CYP3A5*1* hatása között a *CYP3A* szubsztrátok átalakításához való hozzájárulásukban. A *CYP3A4*22* allélt hordozóknál a 6. intronban előforduló SNP (rs35599367, g.15389C>T) hatására csökkent mRNS expresszió detektálható (6,10) (3. táblázat).

A *CYP3A5*3* allélt hordozóknál a 3. intronban található egy pontos nukleotid polimorfizmus (rs776746, g.6981A>G) splicing-hibát okoz, és az enzim hiányához vezet. Gyakorisága a kaukázusi populációban rendkívül magas, 90-95%-ban azonosítható (3. táblázat).

3. táblázat: A *CYP3A4* és *CYP3A5* gének polimorfizmusainak összefoglalása (6,84) www.pharmvar.org/gene/ alapján.

Allélvariáns	Meghatározó SNP (azonosító)	Enzimaktivitásra gyakorolt hatás	Előfordulási gyakoriság kaukázusi populációban (%)
<i>CYP3A4*1B</i>	–392A>G (rs2740574)	fokozott expresszió	2-9
<i>CYP3A4*22</i>	15389C>T (rs35599367)	csökkent expresszió	2,5-8
<i>CYP3A5*3</i>	6986A>G (rs776746)	enzim hiány	90-95

A *CYP* gének jelenleg ismert egy pontos nukleotid polimorfizmusai a PharmVar (Pharmacogene Variation Consortium) oldalán megtalálhatóak (85–88). A *CYP* enzimek gyógyszer-metabolizmusban játszott kiemelkedő szerepe miatt a genetikai polimorfizmusaik jelentős inter-individuális különbségeket eredményezhetnek a hatóanyagok farmakokinetikai viselkedésében.

1.3 Daganatos kórképek

A sejtosztódás fokozódása hajlamosító tényező a genetikai rendellenességek kialakulására, amelyek a daganatok megjelenésének előzményei lehetnek. Hanahan és Weinberg összeállította a különböző daganattípusokban megfigyelt sejtek univerzális tulajdonságait. Egy malignus, daganatos sejt nyolc kulcsfontosságú jellemzővel rendelkezik: korlátlan osztódási képesség, a sejtnövekedési szuppresszorok kijátszása és sejthalál kiküszöbölése, replikációs halhatatlanság, saját vérellátás kialakítása, invázió és metasztázis kialakításának képessége, metabolizmus átprogramozása és az immunrendszer által végzett pusztítás elkerülése (89). Ezen fő és meghatározó jellemzők listája tovább bővült a daganatos sejtek fenotípusos plaszticitásával, a nem mutáció okozta epigenetikai újra programozással, a polimorf mikrobiom és szenteszcens sejtek megjelenésével (90).

A daganatos megbetegedések, a szív- és érrendszeri betegségeket követően a vezető halálokok közé tartoznak. Sung és munkatársai által készített tanulmány 2020-ra világszerte 19,3 millió új rákos megbetegedést és 10 millió daganathoz köthető halálesetet prognosztizált (91). A tüdődaganat a becslések szerint 2020-ban az össz daganatos megbetegedések 11,4%-át jelentette, és a rák okozta halálozások 18%-hoz járult hozzá, ami naponta átlagosan 6027 új diagnózist és 4932 halálesetet jelent (92,93). A rendelkezésre álló adatok alapján Európában a halálesetek 19,6%-a hozható összefüggésbe daganathoz köthető betegségekkel (94). A rák korai stádiumban történő felismerése, illetve az onkológiai kezelések terén elért előrelépések ellenére a daganatos megbetegedések morbiditási és mortalitási mutatói továbbra is magasak. Malvezzi és munkatársai 2023-ra megközelítőleg 1,2 millió halálesetet prognosztizáltak az Európai Unióban (95). Elemzésük szerint a tüdőrák az összesített daganatos halálozás 20%-át teszi ki, annak ellenére, hogy az Európai Unió dohány szabályozásának köszönhetően mindkét nemnél és minden korosztályban a dohányzás csökkenő tendenciáját mutatták ki (95). Magyarországon magas tüdődaganatos megbetegedések előfordulási és halálozási arányáról számoltak be (100 000 lakosra/év vetítve az előfordulási gyakorisága 50, míg a mortalitása 42,4 - (96) (92), azonban ezzel ellentétben Bogos és munkatársai (97) a korábbi, Ferlay és munkatársai által 2018-ban készített becslésekhez viszonyítva 13,9%-os abszolút csökkenést figyeltek meg a férfiak körében

azonosított tüdődaganat esetében, míg a nők körében 1,23%-os emelkedést tapasztaltak 2011 és 2016 között (98). A nők körében növekvő tendenciát figyeltek meg a dohányzási szokások elterjedtségében, ami különösen az urbanizált környezetben vált hangsúlyosabbá. Megfigyelésük alapján Magyarországon ugyan magas a tüdődaganat incidenciája és mortalitása viszont alacsonyabb a korábban Ferlay és munkatásai által közölt adatoknál (97,99).

1.3.1 A tüdődaganat

A tüdődaganatok két fő típusa különböztethető meg: a nem-kissejtes tüdőrák („*non-small cell lung cancer*” - NSCLC) és a kissejtes tüdőrák („*small cell lung cancer*” - SCLC). Az NSCLC a diagnosztizált tüdődaganatok 80-85%-át teszi ki, és olyan altípusokat foglal magába, mint a tüdő adenokarcinóma, laphámrák és nagysejtes karcinóma. Legfőképp a tüdő adenokarcinóma emelkedik ki, mint a legelterjedtebb altípus, amely a nem-kissejtes tüdődaganatos esetek mintegy 40%-át teszi ki (100). A vizsgálatainkba bevont betegeknél tüdő adenokarcinómát diagnosztizáltak, ezért ezt az altípust részletesebben ismertetem. A tüdő adenokarcinóma dohányosoknál és nem-dohányosoknál egyaránt előfordul, általában lassú növekedési mintát mutat, így lehetőséget ad a korai diagnózisra a tüdőn kívüli metasztatikus progresszió előtt. A képalkotási technikák széleskörű alkalmazása ellenére általánosságban a betegeknél előrehaladott daganatos állapot kerül megállapításra (101). A tüdőrák kialakulásában szerepet játszó kockázati tényezők közé számos környezeti tényező tartozik, beleértve a természetben előforduló rákkeltő anyagokat, az azbeszt foglalkozásból eredő expozícióját, a policiklusos aromás szénhidrogéneket tartalmazó légköri szennyező anyagokat, valamint a tüdőrákkal kapcsolatos családi kórtörténetben tükröződő genetikai hajlamot (102,103).

A tüdő adenokarcinóma azonosítására és típusainak elkülönítésére szolgáló összetett diagnosztikai módszertan magába foglalja a szövettani elemzéseket, a radiológiai képalkotást, a tumor osztályozási protokollokat és a prediktív biomarkerek molekuláris szűrését, beleértve, de nem kizárólagosan az epidermális növekedési faktor receptor (*EGFR*), az anaplasztikus limfóma kináz (*ALK*), valamint a ROS proto-onkogén tirozin-kináz (*ROS1*), v-raf murin szarkóma virális

onkogén homológ B1 (*BRAF*) és a Kristen rat szarkóma onkogén (*KRAS*) proto-onkogének aktiváló mutációit (97). A mutációk azonosításával célzott és személyre szabott terápia alkalmazására kerülhet sor, amely növelheti a terápiára pozitív választ adó betegek számát és a minimalizálhatja a mellékhatásokat.

A TNM klasszifikáció a betegség anatómiai kiterjedtségéről szolgáltat információt, amely a kezelés eredményességét is elősegítheti. Az osztályozás meghatározó elemei a primer daganat kiterjedése (T- tumor), közeli nyirokcsomókban áttét jelenléte (N- nyirokcsomó) és távoli szervekben képzett áttétek jelenléte (M- metasztázis) (104). A 4. táblázat szemlélteti a TNM besorolást. A TNM besorolás alapját képező tumor mérete, nyirokcsomó érintettsége és metasztázis jelenlétét a 5. táblázat szemlélteti.

4. táblázat: A tüdődaganatok stádium besorolása TNM klasszifikáció alapján (105) alapján.

Stádium besorolás	Tumor mérete-T	Nyirokcsomó érintettség-N	Metasztázisok száma-M
I/A	1a,1b	0	0
I/A	2a	0	0
II/A	1a,1b	1	0
	2a	1	0
	2b	0	0
II/B	2b	1	0
	3	0	0
III/A	1-3	2	0
	3	1	0
	4	0/1	0
III/B	4	2	0
	1-4	3	0
IV	bármely T	bármely N	1a, 1b

5. táblázat: TNM besorolás alapját képező tumor mérettartományok, valamint a nyirokcsomók érintettsége és a közeli vagy távoli szervekben jelenlévő áttétek meghatározása jelenti (105) alapján.

	Jellemző
T1a	≤ 2cm
T1b	1-3 cm
T2a	3-5 cm
T2b	5-7 cm
T3	>7 cm, közvetlenül ráterjed a következő struktúrára
T4	bármekorra, infiltrálja a következő struktúrát
N0	nincs nyirokcsomó érintettség
N1	áttét az ipszilaterális peribronchiális és/vagy a hiusi nyirokcsomókban, és az intrapulmonáris nyirokcsomókban
N2	áttét az ipszilaterális mediastinalis és/vagy a szubcarinális nyirokcsomókban
N3	áttét a kontralaterális mediastinalis, kontralaterális hilusi, ipszilaterális vagy kontralaterális, vagy a supraclavularis nyirokcsomókban
M0	nincs áttétképzés
M1a	áttét detektálható kontralateralis tüdőlebenyben, folyadékgyülem pleuralis vagy pericardialis
M1b	távoli áttét detektálható

1.3.2 A nem-kissejtes tüdőrák kezelési lehetőségei

A tüdődaganatok kezelési lehetőségeit, beleértve a sebészi eltávolítást, a sugárterápiát, a kemoterápiát, a célzott terápiát és az immunterápiát, különböző kritériumok alapján választják ki, mint például a TNM-besorolás, a betegség kórelőzménye és a társbetegségek (105).

A daganat sebészeti úton történő eltávolítása jelenti az elsődleges kezelési módot, azonban, ha a beteg nem alkalmas a műtetre, neoadjuváns kezeléssel esetleg alkalmassá tehető a daganat sebészeti eltávolítására. A daganat megtalálásának idejében a betegeknek csak 20%-a alkalmas a műtétek elvégzésére. A 6. táblázat foglalja össze a különböző stádiumbesorolások kezelési lehetőségeit. A részleges daganat sebészeti eltávolítása után gyakran adjuváns terápiaként sugárterápia kerül

alkalmazásra. A sugárterápia és a kemoterápia ötvözésével fokozott és szelektív tumorsejtpusztítás érhető el (102,105). A tüdő adenokarcinóma előrehaladott vagy áttétes stádiumában az elterjedt kezelési módok általában platina-alapú vegyületet tartalmaznak, amelyhez paklitaxel, docetaxel vagy pemetrexed társulhat.

6. táblázat: Stádium besorolás alapján megállapított nem-kissejtes tüdő adenokarcinóma kezelési lehetőségei (105–107) alapján

Stádium	Elsődleges kezelés	Adjuváns kezelés	5 éves túlélési arány (%)^a
I	sebészeti beavatkozás	kemoterápia	60-70
II	sebészeti beavatkozás	kemoterápia vagy kemoterápia + sugárterápia	40-50
III/A (operábilis)	sebészeti beavatkozás neoadjuváns terápia alkalmazásával vagy anélkül	kemoterápia vagy kemoterápia + sugárterápia	15-30
III/A (nem reszekábilis) III/B (kontraleterális vagy szupraklavikulár is nyirokcsomó érintettség)	kemoterápia egyidejű sugárterápia vagy kemoterápiát követő sugárterápia	-	10-20
III/B (pleurális folyadékkepződés) IV	kemoterápia vagy agyi áttét és primer T1 tumor eltávolítása	-	10-15 (2 éves túlélés)

^aSpira & Ettinger, 2004 (107) engedélyével felhasználva, Szerzői jog Massachusetts Medical Society-t illeti. („Reproduced with permission from Spira & Ettinger, 2004, Copyright Massachusetts Medical Society”).

1.3.2.1. Célzott terápia

A dolgozat középpontjában a paklitaxel, egy gyakori első vonalbeli citotoxikus rákellenes szer áll, de szükséges megemlíteni a célzott terápiák előrelépéseit is. Az NSCLC kezelésében jelentős változást jelentett a tirozin kináz-gátlók („*tyrosine-kinase inhibitors*” - TKI), például a gefitinib, erlotinib megjelenése, amelyek az

epidermális növekedési faktor receptorának (EGFR) aktiváló mutációit célozzák. A célzott terápiás megközelítések gyökeresen megváltoztatták az EGFR-mutációkat tartalmazó tüdő adenokarcinóma kezelési lehetőségeit. Az ilyen célzott beavatkozásra való jogosultsághoz molekulárisan igazolni kell a daganaton belüli specifikus mutációk jelenlétét (108,109). Megfigyelték és dokumentálták a célzott terápiában használt gyógyszerekkel szembeni szerzett rezisztencia kialakulását (110,111).

1.3.2.2 Kemoterápia

A tumor-ellenes kezelések célja a daganat sejtjeinek elpusztítása, a daganat növekedési ütemének csökkentése érdekében. A citotoxikus onkofarmakonok daganat növekedését gátló hatásukat a tumorsejtek gyors osztódásának gátlásával érik el, ezzel egyidejűleg azonban az egészséges, osztódó sejtekre is hatnak. Támadáspontjuk alapján a kemoterapeutikumokat négy fő csoportba soroljuk: antimetabolitok, DNS károsítók, topoizomeráz gátlók és mitotikus orsó gátlók (112). A dolgozat soron következő része a paklitaxel bemutatásával foglalkozik. A paklitaxel metabolizmusban meghatározó szereppel a CYP2C8, míg kisebb mértékben a CYP3A4 enzimek vesznek részt. A tumorszöveti szubklónok megváltozott CYP gén kópiaszámot tartalmazhatnak, ami a CYP expresszió és CYP enzim aktivitás fokozásával paklitaxel-rezisztens klónok kialakulásához vezethet. A paklitaxel-terápiával szemben rezisztens sejtklónok jelen lehetnek az elsődleges, kezeletlen tumorszövetben, ami a tumor kiújulásához és kedvezőtlen terápiás kimenetelhez vezethet.

1.3.2.2.1 Paklitaxel

1963-ban a *Taxus brevifolia* fa kivonat citotoxikus hatásának felfedezése jelentős előrelépést jelentett a rák kezelésében. A kivonatban lévő aktív vegyület, a paklitaxel szerkezetét csak 1971-ben határozták meg. A paklitaxel közvetlen kivonását a *Taxus brevifoliából* a vegyület alacsony koncentrációja korlátozta. E kihívás leküzdésére egy négylépcsős eljárást dolgoztak ki a tiszafafajok szélesebb körében megtalálható 10-deacetyl-bakkatin III vegyület paklitaxellé történő

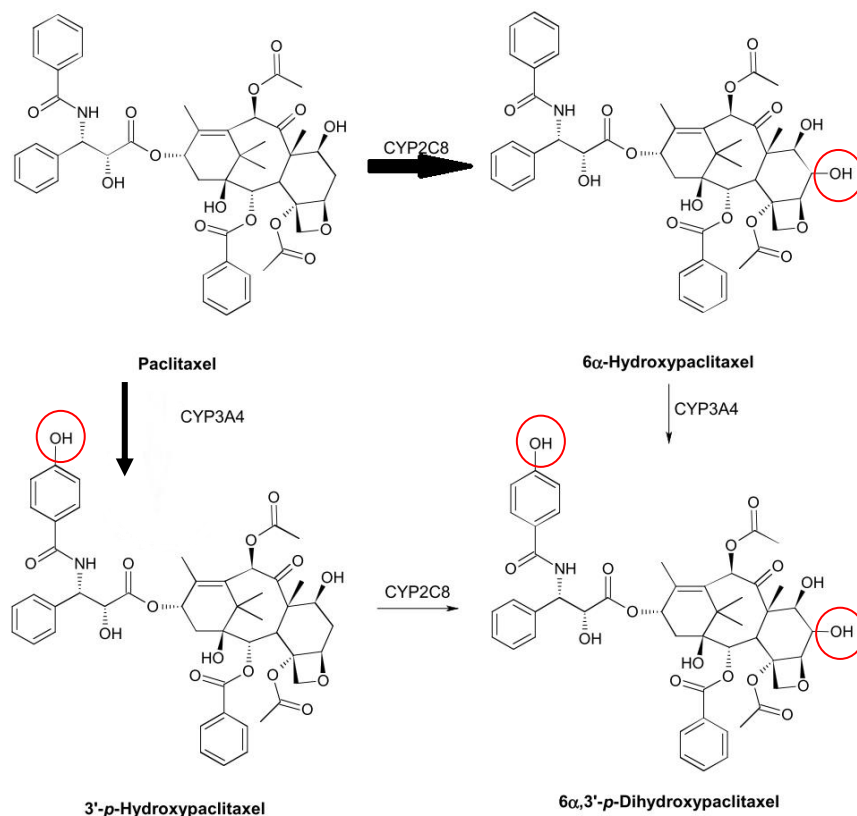
átalakítására. Ez az eljárás jelentősen javította a paklitaxel terápiás célú előállítását (113).

A taxánok közé sorolt paklitaxel a mikrotubulusokhoz kötődve azok stabilizációját idézi elő (depolimerizációra gátló hatást fejt ki), ezáltal a mikrotubulusok dinamikájának egyensúlyát megbontva a sejtosztódás akadályba ütközik amely végül sejthalált vált ki (114,115). A gyors osztódású sejtekre gyakorolt citotoxikus hatása miatt több daganattípus kezelésében is alkalmazzák, mint az emlő-, ovárium-, prosztatata- és tüdődaganatok, továbbá Kaposi szarkóma (116). A fő farmakokinetikai paramétereit és a paklitaxel kezeléshez köthető mellékhatások összefoglalását a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat: Paklitaxel farmakokinetikai tulajdonságai és mellékhatásai.

Paraméterek	Paklitaxel
Dózis	135-250 mg/m ²
Plazma fehérje kötődés	95%
Infúzió	3 órás
C_{max} (µM)	3,1-5,9
AUC (µM*hr)	10,9-18,5
Terminális felezési idő T_{1/2} (hr)	13,1-20,2
Ütemezés	3 hetes intervallumban
Premedikáció	dexametazon
Farmakokinetika	nem-lineáris
Metabolizmus	hepatikus
Inaktiválásban szerepet játszó enzimek	CYP2C8 és CYP3A4
Metabolitok aktivitása	csökkent terápiás aktivitású metabolitok
Kiválasztás	epe
Mellékhatások	csontvelő toxicitás, hányinger, hányás, mucositis, hajhullás, allergiás reakciók, neurotoxicitás

Metabolizmusában elsődleges szerepe van a CYP2C8 enzimnek, amely a fő metabolit, 6- α -hidroxipaklitaxel kialakításáért felelős, míg a CYP3A4 másodlagos szerepet tölt be a hatóanyag inaktiválásában (3. ábra). A CYP enzimek által kialakított metabolitok (6- α -hidroxipaklitaxel, 3-*p*'-hidroxipaklitaxel) csökkent terápiás hatással rendelkeznek az anyavegyülethez képest (117).



3. ábra: Paklitaxel metabolizmusában részt vevő CYP enzimek által kialakított metabolitok. Pirossal vannak megjelölve azok a helyek, ahol CYP enzimek által katalizált folyamat következtében változás történt a molekula szerkezetében (50).

1.4 Terápia-rezisztencia

A terapia-rezisztencia és ennek következtében kialakult kezelés sikertelen kimenetele a daganatok okozta halálozások 90%-ért tehető felelőssé. A daganatos megbetegedések terápiás kezelésének fejlődése ellenére a tüdő adenokarcinómák 30-55%-ában terapia-rezisztencia alakul ki, amely végül halálhoz vezet (118).

A terapia-rezisztencia két fő típusra osztható fel: veleszületett, más néven elsődleges és a szerzett, vagy másodlagos rezisztencia. A veleszületett rezisztenciát a terapia megkezdését követő első hónapokban jelentkező, a kezelésre nem reagáló állapot jellemzi, míg az utóbbi, szerzett rezisztenciát a hatékony kezelés kezdeti időszaka jellemzi, amely több hónap elteltével hatástalanná válik. A terapia-rezisztencia megjelenése számos komplex mechanizmuson keresztül alakulhat ki, amelyek közé sorolható a hatóanyag farmakokinetikájának és metabolizmusának megváltozása, a támadáspont funkcionális és expresszióbeli változása, a DNS

károsodást javító mechanizmusok módosított működése, valamint a sejthalál kikerülése (119,120).

A farmakokinetikai változások a terápiás hatást kifejtő hatóanyag koncentráció modulálásával terápia-rezisztencia kialakulásához vezethetnek. A gyógyszervegyület transzportjában és biotranszformációjában részt vevő fehérjék és enzimek változásai megváltoztathatják a hatóanyag farmakokinetikai viselkedését, ami a gyógyszervegyület fokozott inaktiválódását és a sejtől az extracelluláris térbe történő gyógyszer-kiáramlás fokozott transzportját eredményezheti. Ez szuboptimális gyógyszerkoncentrációhoz vezethet a tumorban (7,121,122).

1.4.1 A transzporterek szerepe a rezisztencia kialakulásában

A tumorsejtek membránjában jelenlévő uptake és efflux transzporterek befolyásolják a hatóanyag sejten belüli koncentrációját. Az uptake transzporterek teszik lehetővé a xenobiotikumok sejtbe történő bejuttatását, amelyek közül fontos szerepet töltenek be a szerves anion transzporter polipeptidok („*organic anion transporting polypeptides*” - OATP). Ismertek olyan OATP transzporterek, amelyek szerepet töltenek be az eliminációban is (123,124). Az uptake transzporterekben bekövetkezett mutációk hatására a transzporterek működése megváltozik, ami a hatóanyag koncentráció változásban nyilvánulhat meg, így terápia-rezisztenciához vezethet. Az efflux transzport megvalósítói az ABC-transzporterek („*ATP-binding cassette transporters*”), amelyek fokozott kifejeződését gyakran megfigyelték számos gyógyszer-rezisztenciát mutató daganatos sejtben. Ez arra utal, hogy a transzporterek a kemoterápiás szerek intracelluláris koncentrációjának megváltoztatásával (sejten belüli koncentráció csökkentésével) hozzájárulnak a terápia-rezisztencia kialakulásához. Az *ABCBI* gén által kódolt P-glikoprotein transzporter overexpresszióját azonosították számos ráktípusban, többek között a nem-kissejtes tüdőrákban (NSCLC), emlő-, gyomor-, prosztata- és petefészek daganatokban (125). A transzporterek terápia-rezisztenciában betöltött szerepe napjainkban is aktív kutatási terület.

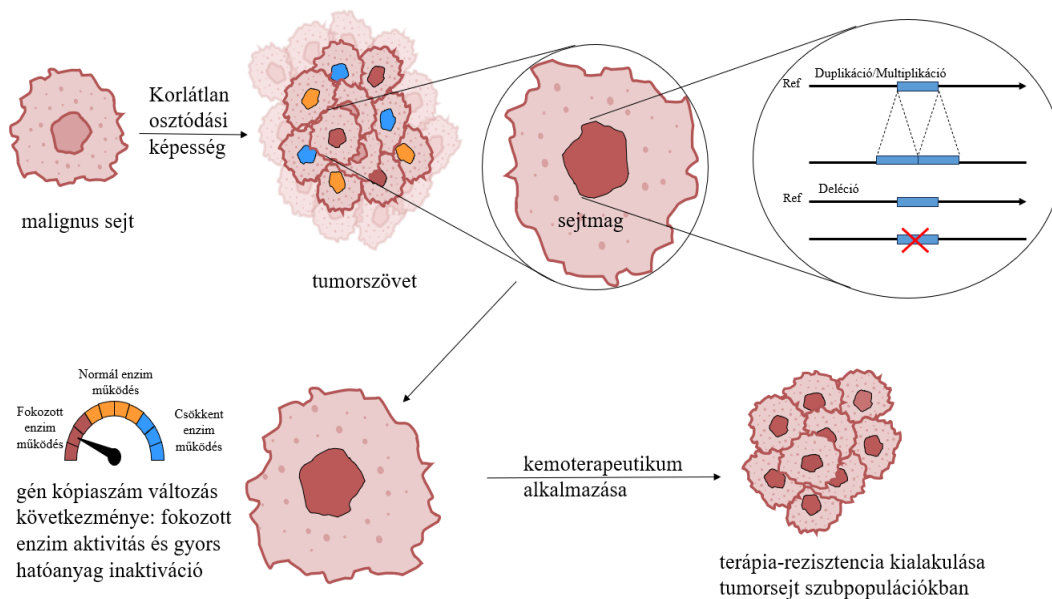
1.4.2 A citokróm P450 enzimek szerepe a terápia-rezisztencia kialakulásában

A kezelés személyre szabott megközelítésének figyelembe kell vennie a hatóanyagok metabolizmusát a betegben és a tumorban egyaránt. A tumor-ellenes hatóanyagok farmakokinetikájában bekövetkezett változás(ok), illetve a szervezetben lezajló hatóanyag-metabolizmus és elimináció sebessége jelentős szerepet játszik a kezelés sikeres kimenetelében. A hatóanyag metabolizmusában tapasztalt inter-individuális különbségekre részben a genetikai polimorfizmusok, másrészt az enzimaktivitást befolyásoló nem-genetikai tényezők (enzim-gátlás, enzim-indukció) adnak magyarázatot. A CYP enzimek genetikai variabilitása, amely megváltozott enzimaktivitáshoz vezet, a terápia-rezisztencia kialakulását eredményezheti. A *CYP* gének polimorfizmusai (inzerció, deléció, nukleotid csere, gén deléció, gén duplikáció) megváltoztathatják a hatóanyag metabolizmusát (funkció vesztett, csökkent vagy fokozott az enzimek metabolikus aktivitása), így a farmakon által kiváltott terápiás hatás megváltozik (csökkent metabolikus aktivitású enzim magas, míg fokozott aktivitással rendelkező enzimek alacsony plazma koncentrációt eredményeznek. Fontos ismerni a gyógyszerhatóanyagok biotranszformációja során keletkezett metabolitok terápiás aktivitását, ugyanis a metabolizmus során aktív és inaktív metabolitok is képződhetnek. Egy funkció vesztett enzim nem képes a prodrugból (például ciklofoszfamid, ifoszfamid, tegafur, thiotepa) terápiás aktivitással rendelkező vegyület kialakítását elvégezni, ugyanakkor a hatóanyag fokozott inaktivációja szintén terápia-rezisztenciához vezethet (126).

A beteg saját metabolizáló képessége mellett a tumorszövet metabolizáló képessége is hozzájárulhat a terápia-rezisztencia kialakulásához. A daganatokat heterogén sejtpopulációk alkotják. A sejtek fokozott osztódása elősegíti a szerkezeti és számbeli kromoszóma változások kialakulását. Ezáltal a tumorszövetet alkotó sejt szubpopulációk eltérő kariotípussal rendelkezhetnek. (127). A gén kópiaszám változáshoz három fő transzlációs következményt társítanak: 1) a génexpresszióra gyakorolt közvetlen hatás, 2) a kromoszóma aneuploidia tágabb biológiai hatása a közvetlen megváltozott régió túl, amely esetleg más genomiális régiókban lévő gének transzkripció aktivitására is hatást gyakorolhat, és 3) a kromoszóma

aneuploidia limitált számú génre kifejtett hatása következtében a daganatos sejtek metabolizmusát átprogramozva szelekciós előnyt kínál (128,129). A kezelés olyan szelekciós nyomást gyakorol, amely elpusztítja a terápiára érzékeny tumorsejteket, lehetővé téve a rezisztens sejtklónok szaporodását és esetleges dominanciáját (130).

A *CYP* gének kópiaszáma a tumor sejtekben multiplikációt szenvedhet el az abnormális osztódás következtében. A *CYP* kópiaszám multiplikáció hatására a *CYP* enzimek fokozott expressziója megnövekedett enzimaktivitást idézhet elő, amely a hatóanyag gyors metabolizmusát eredményezi, így alacsonyabb hatóanyag koncentráció lesz jelen a tumorsejtekben a fokozott hatóanyag inaktiválás következtében, amely terápia-rezisztencia kialakulásához vezethet (4. ábra). A daganatellenes szer metabolizmusában részt vevő *CYP* enzimek azonosítása és a tumorban lévő kópiaszám meghatározása hozzájárulhat a személyre szabott kezelési protokollok kidolgozásához, amelynek célja a terápia hatékonyságának növelése. A sebészi úton eltávolított daganatos szövet kópiaszám vizsgálata hasznos információval szolgálhat a kezelés előtti *CYP* gének kópiaszámáról.



4. ábra: Terápia-rezisztencia kialakulása *CYP* gén kópiaszám változás következményeként. Heterogén tumorszövetben a tumorsejtek kópiaszáma egymástól különbözhet, ami a gyors osztódás és genom instabilitás eredménye. Amennyiben gén duplikáció/multiplikáció következtében fokozott *CYP* enzimaktivitással rendelkeznek a sejtek, az alkalmazott kemoterápiával szemben rezisztens szubklónok jelenhetnek meg, amelyek nem pusztulnak el a kezelés következtében. Téglaszín jelöli a gén duplikációt/multiplikációt, míg a normál kópiaszámot narancsszín, a deléciót a kék szín jelöli, (131) alapján.

2. Célkitűzések

A daganatok kezelése során alkalmazott gyógyszerhatóanyagok biotranszformációjában kiemelkedő szereppel rendelkeznek a CYP enzimek. A daganatellenes terápia hatékonyságát egyrészt a beteg saját, főként a májban lezajló gyógyszer-metabolizáló képessége, másrészt a tumorban végbemenő metabolizmus határozza meg. A CYP enzimekre nagyfokú polimorfizmus jellemző, amely befolyásolja az enzimek aktivitását, ezáltal a beteg gyógyszer-metabolizáló képességét. A tumor heterogenitása és a genom instabilitás következtében kialakuló CYP kópiaszám változások (deléción, multiplikáció/duplikáció) a tumorsejtek hatóanyag-metabolizáló képességét befolyásolhatják. A kópiaszám változás hatással lehet a gén által kódolt fehérje expressziós szintjére és metabolikus aktivitására, így a megváltozott enzimaktivitás terápia-rezisztencia kialakulását idézheti elő.

Vizsgálatainkba paklitaxel kezelés előtt álló, tüdő adenokarcinómával diagnosztizált betegeket vontunk be. Munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

- a paklitaxel metabolizmusát katalizáló CYP2C8 enzim klinikailag releváns *CYP2C8*3* és *CYP2C8*4* allélvariánsainak kimutatására alkalmas esszé kidolgozása,
- a *CYP2C8* és *CYP3A* genotípusok meghatározása, amely alapján várhatóan becsülhető a betegek paklitaxel-metabolizáló képessége,
- a tumorszövetben a *CYP2C8* és *CYP3A4* kópiaszám meghatározására alkalmas, kvantitatív PCR-alapú metodika kidolgozása,
- a tumorszövetben lévő *CYP2C8* és *CYP3A4* kópiaszám változások és a paklitaxel kezelés kimenetele közötti kapcsolat vizsgálata.

3. Módszerek

3.1. Vizsgálatba bevont betegek klinikai adatai

A vizsgálatba 18 tüdő adenokarcinómával diagnosztizált beteget vontunk be. A betegek diagnosztizálását, a tumor eltávolító műtéteket, a daganatok stádium besorolását és a kezelést az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet munkatársai végezték. A vizsgálatba bevont személyek hozzájárulási nyilatkozat kitöltésével járultak hozzá az egészséges szövet (vérminta vagy egészséges tüdőszövet) és a tumorszövet genetikai elemzéséhez. A mintákat a feldolgozás idejéig -80°C -on tároltuk. A betegek demográfiai és klinikai adatai a 8. táblázatban foglaltam össze. A paklitaxel kezelésre adott válasz alapján, valamint a RECIST (*“Response Evaluation Criteria in Solid Tumours”*) besorolási kritérium alapján reagáló (teljes vagy részleges remisszió) és nem-reagáló (betegség progressziója/halál) betegcsoportokat alakítottunk ki (132).

3.2. DNS izolálás humán eredetű mintákból

A vérmintákból a genomiális DNS kivonásához Quick-DNA™ Universal kit-et (Zymo Research, Irvine, CA) használtunk a gyártó által megadott „Biological Fluids and Cells Protocol” lépései alapján. Az OK18 beteg egészséges tüdő szövet mintáját először PBS-sel (136,7 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4 , 1,47 mM KH_2PO_4 ; pH = 6,5 – 7) mostuk át, majd Petri csészében szikével kisebb darabokra vágtuk. Az egészséges tüdő szövet és a daganatszövet mintákból a genomiális DNS-t a gyártó által megadott „Solid Tissues Protocol” lépéseit követve nyertük ki. Proteináz K enzim segítette elő a preparálás során esetlegesen jelenlévő fehérje szennyeződések eltávolítását. Az izolált DNS tisztasága és koncentrációja NanoDrop™ 1000 spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) segítségével lett meghatározva. A DNS mintákat a további felhasználásig -20°C -on tároltuk.

8. táblázat: A vizsgálatba bevont betegek demográfiai és klinikai adatai.

		Teljes/ részleges remisszió	Progrediáló betegség/ halál
Betegek száma		8	10 ^b
Nem (férfi/nő)		2/6	4/6
Kor (év)^a		64 (49; 74)	63.5 (22; 72)
Dohányzás	aktív	6	4
	több mint 1 éve nem dohányzik	0	2
	soha	2	3
	NA ^c	-	1
Elsődleges tumor^d	1 (1a – 1b)	-	2
	2 (2a – 2b)	7	7
	3 (3a – 3b)	1	-
Nyirokcsomó érintettség^d	0		
	1	3	5
	2	2	-
	x	1	3
		1	1
Áttét^d	0	2	2
	x	6	7
Kezelés	paklitaxel+karbop latin	8	9
	gefitinib, ciszplatin, afatinib	-	1 ^e
	adjuváns sugárterápia	1	4

^amedián (minimum és maximum értékek)

^begy beteg TNM klasszifikáció nélkül

^cnincs adat

^dTNM klasszifikáció alapján (104)

^eOK18 beteg mintája

3.3. *CYP2C8* és *CYP3A* genotípus meghatározás

A vér és egészséges tüdőszövet mintákból DNS-t izoláltunk, majd ezt követően meghatároztuk a *CYP2C8**3 (rs10509681, rs11572080), *CYP2C8**4 (rs1058930), *CYP3A4**22 (rs35599367), *CYP3A4**1B (rs2740574) és *CYP3A5**3 (rs776746) allélokra jellemző mutációs pontokat. A *CYP2C8* SNP-meghatározás módszerének kidolgozásában vettem részt, míg a *CYP3A4* és *CYP3A5* SNP-k meghatározásának metodikája a kutatócsoportban korábban került kidolgozásra (133). A genotípust meghatározó reakcióhoz Thermo Fischer 2x Luminaris Color Probe qPCR Master Mix nevű terméket használtuk a gyártó előírásainak megfelelően. A reakció során alkalmazott primer és próba oligonukleotidok szekvenciáit és a reakciók optimális hibridizációs hőmérsékletét a 9. táblázatban foglaltam össze. Az általunk tervezett próba szekvenciák szintetizálását a Eurofins Genomics (Ebersberg, Németország) végezte. A génben előforduló pontmutációk azonosítása lehetővé teszi a *CYP* genotípus meghatározását.

3.4. A *CYP* gén kópiaszám kimutatása

Gének kópiaszám meghatározása abszolút, illetve relatív módon is elvégezhető. Az abszolút meghatározási módszer során szükséges a standard hígítási sor elkészítése a vizsgálni kívánt génszakaszból, amelyhez viszonyítani lehet az ismeretlen mintában lévő gén kópiaszámát. A relatív kópiaszám meghatározása során az ismertelen minta kópiaszámát viszonyítjuk a két kópiában előforduló referenciagén(ek) kópiaszámához. A tumorra jellemző genom instabilitás miatt, amely akár a referenciagéneket is érintheti, elengedhetetlen több referenciagén együttes alkalmazása a tumorban lévő kópiaszám meghatározása során. A soron következő leírások relatív *CYP*-kópiaszámok meghatározására vonatkoznak, amelyekhez TaqMan módszert alkalmaztunk.

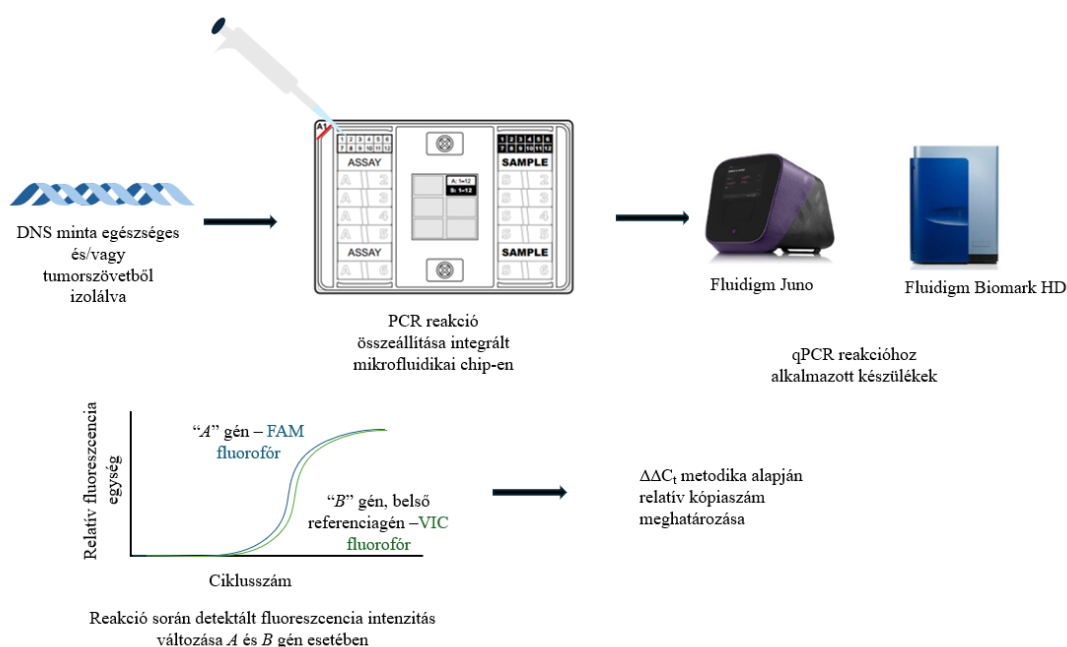
A polimeráz láncreakció (PCR) során a forward és reverz primerek által határolt génszakasz kerül felszorzosításra az alábbi lépéseken keresztül: 1) DNS denaturáció, 2) anelláció, 3) polimerizáció és 4) fluoreszcens jel detektálása. A fluoreszcencia változásának időbeli nyomon követése kvantitatív információt ad az amplikon termelődéséről. Ehhez TaqMan-próbát alkalmaztunk, amely méretében 20-30 bp közötti hosszúságú és a vizsgált DNS szakasz primerek által behatárolt szakasz

specifikus helyére kötődik, így a mérés specificitása és érzékenysége növelhető. A próba szekvencia 5` végén a riporter molekula, míg a 3` végen 'quencher', vagy kioltó molekula található. A riporter molekula fény hatására gerjeszhető, amelynek energiáját a reakció kezdetén a quencher molekula elnyeli, mivel a két molekula egymáshoz közel található a próbaszekvencia két végén. Ezt a jelenséget nevezzük 'fluorescence resonance energy transfer'-nek (FRET), amely során nem tapasztalható fénykibocsátás a PCR reakció elején, mivel a próba szekvencia ép. A Taq polimeráz a reakció előrehaladtával emészti a próbát 5` → 3` irányú exonukleáz aktivitása miatt, aminek következtében az energia átadás már nem valósul meg a két molekula között. A riporter molekula által kibocsátott fény detektálhatóvá válik a fizikai távolság miatt. Ennek a detektált és rögzített jelnek az intenzitása egyenesen arányos a keletkezett PCR termék mennyiségével.

9.táblázat: A *CYP2C8*, *CYP3A4* és *CYP3A5* genotípus meghatározása során alkalmazott oligonukleotidok szekvenciái 5' – 3' irányba

Allélváriáns	Oligonukleotid	Szekvencia
<i>CYP2C8</i> *3 g.2130G>A	Forward	CGT TTC TCC CTC ACA ACC TTG C
	Reverz	ACT GTT AAG GTC AAT GAC GCA GA
	Vad	CCT CAA TGC TCC TCT TCC CCA TCC C
	Mutáns	TCC TCA ATG CTC TTC TTC CCC ATC C
<i>CYP2C8</i> *3 g.30411A>G	Forward	CGC TAC GTG ATG TCC ACT AC
	Reverz	GCT GAG AAA GGC ATG AAG TAG T
	Vad	CGT GCT ACA TGA TGA CAA AGA ATT TCC TA
	Mutáns	CGT GCT ACA TGA TGA CAG AGA ATT TCC TA
<i>CYP2C8</i> *4 g.11041C>G	Forward	TCC CAG GAA CTC ACA ACA AAG T
	Reverz	CGA TGA ATC ACA AAA TGG ACA AGA
	Vad	CGG GAC TTT ATC GAT TGC TTC CTG ATC
	Mutáns	CGG GAC TTT ATG GAT TGC TTC CTG ATC
<i>CYP3A4</i> *1B	Forward	TCT GTA GGT GTG GCT TGT TG
	Reverz	AAG GGT TCT GGG TTC TTA TCA
	Vad	TCG CCT CTC TCC TGC CCT TG
	Mutáns	TCG CCT CTC TCT TGC CCT TGT
<i>CYP3A4</i> *22	Forward	CAG AGG TAG GTC TAA TTC AGT TCA
	Reverz	AGA TCA CCT TCT ATC ACA CTC C
	Vad	ATC ACA CCC AGC GTA GGG C
	Mutáns	ATC ACA CCC AGT GTA GGG CC
<i>CYP3A5</i> *3	Forward	GAG AGT GGC ATA GGA GAT ACC
	Reverz	TGT ACG ACA CAC AGC AAC C
	Vad	TTG TCT TTC AAT ATC TCT TCC CTG T
	Mutáns	T TTG TCT TTC AGT ATC TCT TCC CTG T

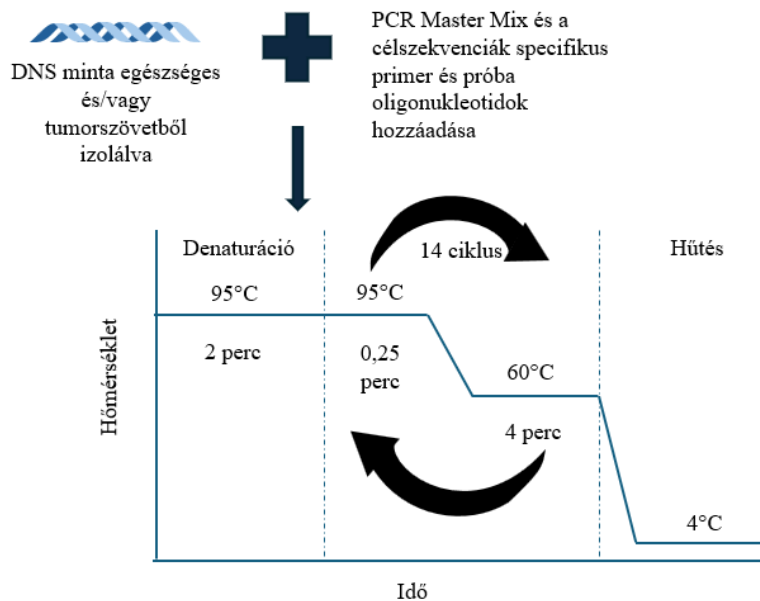
Nagy-áteresztőképességű kvantitatív PCR-alapú (qPCR) módszert dolgoztunk ki gén kópiaszám meghatározásra. A mérés során az egészséges vér vagy tüdőszövet, valamint daganatszövet mintákból kinyert DNS-t használtuk fel. Duplex PCR reakcióban cél- és referenciagénekre általunk tervezett primer párt és FAM (gerjesztő hullámhossz = 495 nm, emissziós hullámhossz = 520 nm) fluorofór jelölésű próbát adtuk hozzá (10. táblázat, 5.ábra) a kereskedelmi forgalomban elérhető *RPPH1* esszéhez, amely VIC (gerjesztő hullámhossz = 526 nm, emissziós hullámhossz = 543 nm) fluorofórral volt jelölve. A duplex mérés feltétele, hogy a két meghatározni kívánt gén („target-” és referenciagén) próba oligonukleotid szekvenciája eltérő fluoreszcens festékekkel legyen jelölve.



5. ábra: Duplex PCR egyszerűsített bemutatása. A kinyert DNS mintához „A” gént kék színű FAM fluorofórral és „B” gént zöld színű VIC fluorofórral jelölt próba oligonukleotidok hozzáadásával lehet megkülönböztetni. A qPCR reakció során kapott eredményeket a $\Delta\Delta C_t$ metodikával lehet kiértékelni, így meghatározható egy gén kópiaszáma egy belső referenciagénhez viszonyítva.

A primerek és próbák szekvenciáit a *National Center for Biotechnology Information*, NCBI adatbázis referencia szekvenciái alapján terveztük, kivéve az *RPPH1*-t, amely kereskedelmi forgalomban elérhető (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, katalógus szám: 4403326) (10. táblázat). A $\Delta\Delta C_t$ számítási módszert alkalmaztuk a kópiaszámok meghatározásában, amely széleskörűen elterjedt

a qPCR relatív kvantifikáció értékelésében (134). A tumorminták esetében fennáll a lehetősége a referenciagének kópiaszám változásának, amely szükségessé teszi a minták közötti normalizálást. Így a tumorszövetben detektált kópiaszámokat viszonyítottuk az egészséges kontroll mintában (vér, tüdőszövet) azonosított kópiaszámokhoz. A relatív kópiaszám meghatározás első lépéseként a tumor mintában mért célgén áttörési pontját (C_t) viszonyítjuk a referenciagén áttörési pontjához (C_t): $\Delta C_t = C_t \text{ „target” gén} - C_t \text{ referenciagén}$. Hasonlóképpen az egészséges szövetminta (kontroll minta) *CYP* gén áttörési pontjából kivontuk a referenciagén C_t értékét és megkaptuk a ΔC_t értéket a kontroll minta esetében. Végezetül kiszámoltuk a $\Delta \Delta C_t$ értéket [$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t$ (tumor minta) – ΔC_t (kontroll minta)], amelynek segítségével információ nyerhető a „target” gén (*CYP* gén) relatív kópiaszámáról a tumor mintában. A qPCR méréseket integrált mikrofluidikai chip technológián alapuló nagy-áteresztőképességű rendszeren (Flex Six™ Biomark HD™, Fluidigm, San Francisco, CA, USA) végeztük. Kezdeti lépésben a gyártó utasításai szerint a célgének szekvenciáit felsokszorosítottuk, amelyhez az alábbi hőmérsékleti protokollt alkalmaztuk: kezdeti denaturáció 95°C-on 2 percre, amelyet 14 ciklusos denaturáció 95°C-on 15 másodpercig, majd 60°C-on annealáció követett 4 percre (6. ábra).



6. ábra: A célgének felszorzásának és az alkalmazott hőmérsékleti protokoll sematikus bemutatása.

Az így felszorzított terméket (amplikon) 1:5 arányban pufferrel (Suspension Buffer, Fluidigm) hígítottuk, amely templátként szolgált a qPCR mérésekhez. A duplex reakciókhoz esszé („assay”) keverékeket alakítottunk ki 2x Luminaris Probe qPCR Master Mix ROX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), FAM jelölésű *CYP2C8*, *CYP3A4*, *ALB*, *B2M*, *BCKDHA*, *CD36*, *F5*, *MPO*, *TBP* és VIC jelölésű *RPPHI* próba szekvenciák, valamint a megfelelő primer szekvenciák felhasználásával (10. táblázat). A Flex Six™ assay és minta bemeneteibe („inlet”) betöltöttük az elkészített esszé-keket és minta templátokat, amelyek reakcióhelyre való eljuttatását integrált fluidikai áramkör vezérlő segítségével (Juno, Fluidigm) valósítottuk meg. A mikrofluidikai chip-en ezt követően sor került a PCR reakcióra a következő protokollnak megfelelően: UNG és Hot Start (Uracil-N glikoziláz) 50°C-on 2 percig, 95°C-on 10 percig, majd 40 ciklus denaturáció 95°C-on 15 másodpercig és anneláció 60°C-on 1 percig. Az UNG az egy szálú és kettős szálú DNS törésekbe beépült uracilt távolítja el, így a kontaminálás esélye csökkenthető a minta előkészítése folyamán és elkerülhető a PCR reakciók során (135).

10. táblázat: Több referenciagén bevonásával történő kópiaszám meghatározás során alkalmazott szekvenciák.

Gén	Gén név	Kromoszóma lokalizáció	Forward primer szekvencia	Reverz primer szekvencia	Próba szekvencia
<i>RPPH1</i>	Ribonukleáz P RNS komponens H1	14q11.2	TaqMan® Copy Number Reference Assay		
<i>ALB</i>	Albumin	4q13.3	TCT TCT GTC AAC CCC ACA	ATC TCG ACG AAA CAC ACC	GGC ACA ATG AAG TGG GTA ACC
<i>B2M</i>	beta-2-mikroglobulin	15q21.1	GAA TGA GTC CCA TCC CAT CT	CAG GGA AAC TAC TGG TTC AGA	CAG TAT CTC AGC AGG TGC CA
<i>BCKDHA</i>	Elágazó láncú α -ketosav dehidrogenáz	19q1.2	CCC TCT GAA TAA TGT TCC CG	TCA GAC AAG CTC TTT GCC	TAT CTG GGT GCC ATC TCC TC
<i>CD36</i>	CD 36 molekula	7q21.11	ACA AGG TAC TCC TCA CTA CAC	AAC TGA ATT AAC CTC TAA GGG C	AGT CAG TTG TCC TCG TCG AAA TC
<i>F5</i>	V.koagulációs faktor	1q24.2	TGA TCG AGG ATT TCA ACT CG	TCC CAT GAC AGA ACT CCT	AAG GTA AGA ACA CCC CCA CC
<i>MPO</i>	Mieloperoxidáz	17p22.1	ACA CTA GGG TCA GTC CTT G	CAA GCC TGG GTC ATT ATG AC	CAT CTG GAG GAT TCC TGG AAC A
<i>TBP</i>	TATA box kötő fehérje	6q27	CCT GCT CTG TTT TCA GAT GG	ATA GCT TTG CTT CCC TTT CC	AGT GGC ACT AAC GGT AAT TGT GT
<i>CYP2C8</i>	Citokróm P450 2C8	10q23.33	CGT TTC TCC CTC ACA ACC TTG C	ACT GTT AAG GTC AAT GAC GCA GA	CCT CAA TGC TCC TCT TCC CCA TCC CA
<i>CYP3A4</i>	Citokróm P450 3A4	7q22.1	CAG AGG TAG GTC TAA TTC AGT TCA	AGA TCA CCT TCT ATC ACA CTC C	ATC ACA CCC AGC GTA GGG C

Egészséges szövetekben (vér és egészséges tüdőszövet) a génkópiaszámok értékét 1-nek tekintettük. A daganatos mintákban meghatározott „target” gének (*CYP2C8* és *CYP3A4*, N=2), valamint referenciagének (*RPPH1*, *ALB*, *B2M*, *BCKDHA*, *CD36*, *F5*, *MPO*, *TBP*, N=8) kópiaszámait az egészséges mintákban meghatározott génekhez viszonyítottuk, amelyek értékelése során a $\Delta\Delta C_t$ módszert alkalmaztuk. Bármely két gén (A és B) relatív kópiaszámát akkor tekintettük azonosnak az egészséges szövetben (vér és egészséges tüdőszövet) lévővel, ha a tumor mintában a két gén (A és B) arányának értéke 90%-os konfidencia intervallum mellett 0,80 – 1,25 tartományba esett. Meghatároztuk a génpárok relatív kópiaszámait, majd ezt követően pontozási rendszert alakítottunk ki, amelyben 0 ponttal láttuk el azon génpárokat, amelyek 0,80 – 1,25 közötti tartományba estek, -1-et rendeltünk azon génpárok mellé, amelyek értéke <0,80 és +1 pontszámot adtunk azon génpároknak, amelyek értékei meghaladták az 1,25-öt. A pontszámok összegzését követően értékeltük a gének kópiaszám változását a következő módon: ha a pontszámok összege -5 értéknél kisebb volt, akkor deléció, míg +5 érték meghaladása esetén duplikáció/multiplikáció következett be. A tumorminták abszolút gén kópiaszámainak meghatározása során 1) azon gének, amelyek 2 kópiában fordultak elő, referenciagénként alkalmaztunk, 2) valamint a relatív kópiaszám értéket 2-vel szoroztuk meg. A *CYP*-kópiaszám változások és a terápia kimenetele közötti összefüggést Fisher teszttel elemeztük, amelyben a p-érték <0,05 statisztikailag szignifikáns különbségnek tekintettük.

3.5. Teljes genom szekvenálás

A nagy-áteresztőképességű qPCR módszerrel megállapított kópiaszámok megerősítéséhez az OK18 tüdő adenokarcinómával diagnosztizált beteg primer tüdőtumor és perifériás vérmintájából nyert teljes genom szekvenálás eredményét használtuk (EGAS00001003416), (136). A genom ploidia szintek meghatározására alkalmas „*allele-specific copy number analysis of tumors*” - ASCAT (137) módszer a teljes genomot érintő SNP-k nagy halmazára vonatkozó allélfrekvencia és lefedettségi információkat használja fel. Az SNP-eket az 1000 Genom Projekt (1000 Genomes Project) által kialakított közös variánsok listájából választottuk ki (<https://github.com/cancerit/alleleCount>, hozzáférés 2023. július 28-án), ennek segítségével határoztuk meg a gyakori SNP-k egyenletes eloszlását, minimális 10 kb

távolságban. A GRCh38 referencia szekvenciában vagy az ENCODE (138) által készített fekete listában szereplő centromerekben annotált genomi pozíciókat kihagytuk, a lefedettségek korrigálása GC-tartalommal és a replikációs időzítési értékekkel valósítottuk meg, amelyekhez felhasználtuk az ASCAT-hoz kapcsolódó segéd szkripteket. ASCAT segítségével a plioditás szinteket megállapítottuk, amely figyelembe vette a lefedettségi szinteket és allélgyakorisági eloszlásokat. A szekvenálási adatok kiértékelését Póti Ádám (HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont, Molekuláris Élettudományi Intézet, Genomistabilitás Kutatócsoport) végezte.

4. Eredmények

4.1. CYP2C8*3 és CYP2C8*4 allélok meghatározása

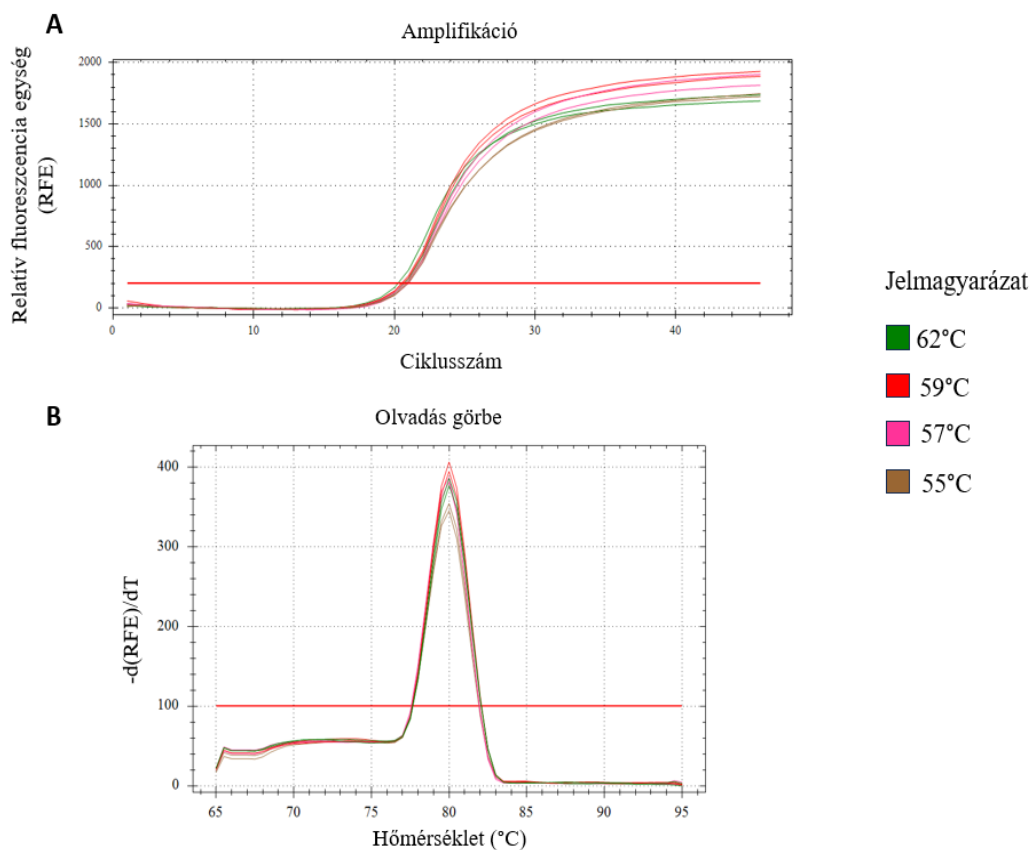
Vizsgálatok első lépése a CYP enzimek mutációinak és alléljainak azonosítása volt. A *CYP2C8* génben detektált és kaukázusi populációban gyakori mutációk (*CYP2C8*3* és *CYP2C8*4* allélok) kimutatására alkalmas mérési módszert dolgoztunk ki.

A *CYP2C8*3* allélra jellemző két pozícióban bekövetkező nukleotid csere (rs10509681, g.2130 G>A; rs11572080, g.30411 A>G) és a *CYP2C8*4* -re jellemző citozin guanin szubsztitúciót tartalmazó (rs1058930, g.11041 C>G) pontmutációkhoz tartozó genom szekvencia adatok az NCBI adatbázisából származtak (139). A primerek és próbák tervezése során figyelembe vettük a primer (18-22 bázispár (bp)) és próba szekvenciák (9-40 bp) hosszára, optimális olvadáspontjára („*melting temperature*” - T_m ; primerek optimális olvadáspontja 50-60°C, míg a próba szekvenciák optimális olvadáspontja 10°C-al meghaladta a primerek T_m -jét), guanin (G) és citozin (C) tartalmára (40-60% közötti) és az ampikon (PCR termék) hosszára (75-150bp) vonatkozó ajánlásokat (140–142). A primer és próba szekvenciák *in silico* megtervezéséhez az NCBI Primer-Blast eszközt használtuk (143). A primer szekvenciák fizikai-kémiai tulajdonságának ellenőrzése során az IDT OligoAnalyser™ -t használtuk (144), majd a specifikus bekötődés ellenőrzését az NCBI BLAST alkalmazásával végeztük (145). A 9. táblázatban találhatóak a tervezett és alkalmazott szekvenciák, amelyek a *CYP2C8*3* (rs11572080 g.2130G>A; rs10509681 g.30411A>G) és *CYP2C8*4* (rs1058930, g.11041C>G) allélokra jellemző SNP-k meghatározására szolgálnak.

11. táblázat: A *CYP2C8* SNP-k kimutatására tervezett primer és próba szekvenciák tulajdonságainak összefoglalása.

SNP	Tervezett oligonukleotid szekvencia	Szekvencia hossza (bp)	Guanin-citozin arány (%)	Olvadási hőmérséklet (°C)	Fluoreszcens jelölés
<i>CYP2C8*3</i> g.2130G>A	forward primer	22	54,5	65,3	-
	reverz primer	23	43,5	64,2	-
	vad próba	25	60	69,3	FAM
	mutáns próba	25	52	67,5	HEX
<i>CYP2C8*3</i> g.30411A> G	forward primer	20	55	61,8	-
	reverz primer	22	45,5	62,4	-
	vad próba	29	37,9	65,4	FAM
	mutáns próba	29	41,4	66,1	HEX
<i>CYP2C8*4</i> g.11041C> G	forward primer	22	45,5	64	-
	reverz primer	24	37,5	62	-
	vad próba	27	48,1	66,5	FAM
	mutáns próba	27	48,1	66,6	HEX

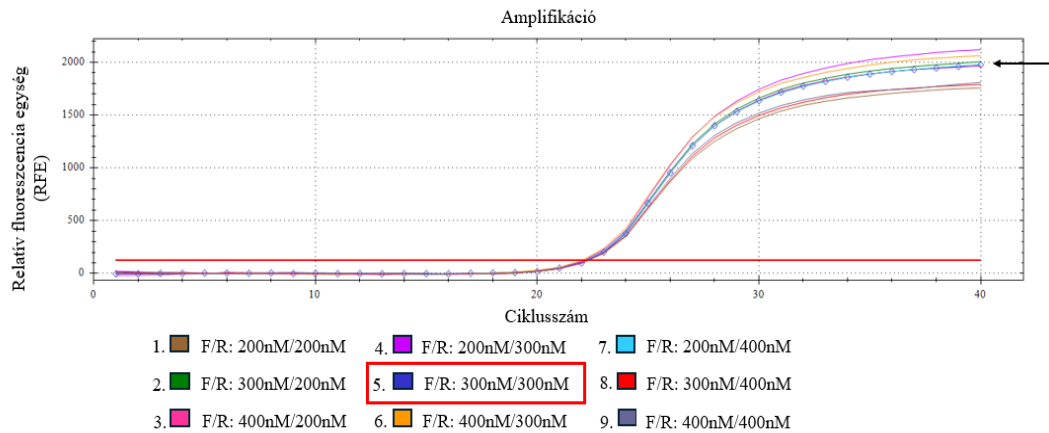
A *CYP2C8* SNP-k (*CYP2C8*3*: rs11572080 g.2130G>A; rs10509681 g.30411A>G; *CYP2C8*4*: rs1058930 g.11041C>G) azonosítására tervezett primer és próba szekvenciák tulajdonságainak összefoglalását a 11. táblázat tartalmazza. A próbák megkülönböztetése eltérő fluorofórokkal történt, a vad próbákat FAM (gerjesztő hullámhossz = 495 nm, emissziós hullámhossz = 520 nm), míg a mutáns próbákat HEX fluorofórral (gerjesztő hullámhossz = 533 nm, emissziós hullámhossz = 559 nm) jelöltük. A *CYP2C8*3* allélra jellemző SNP-k megkülönböztetésére a dolgozat további részében *CYP2C8*3* g.2130G>A és *CYP2C8*3* g.30411A>G kerülnek használatra. A *CYP2C8*3* g.2130G>A SNP azonosítására kidolgozott módszeren keresztül mutatom be az optimalizálás lépéseit, ugyanezen lépések alkalmazásával állítottuk be a *CYP2C8*3* g.30411A>G és *CYP2C8*4* g. 11041C>G SNP-k azonosítására alkalmas PCR módszert. A beállítás során egészséges önkéntesek DNS mintái kerültek felhasználásra.



7. ábra: Primer optimalizáció első lépése a beállításhoz alkalmazott hőfok meghatározása. **A)** A primer szekvenciák optimális hőmérsékletének vizsgálata, amelynek meghatározását követően a megfelelő koncentrációt lehet kiválasztani. **B)** Olvadáspont vizsgálattal ellenőrzésre került a primerek által felszorzósított PCR termék specifikussága.

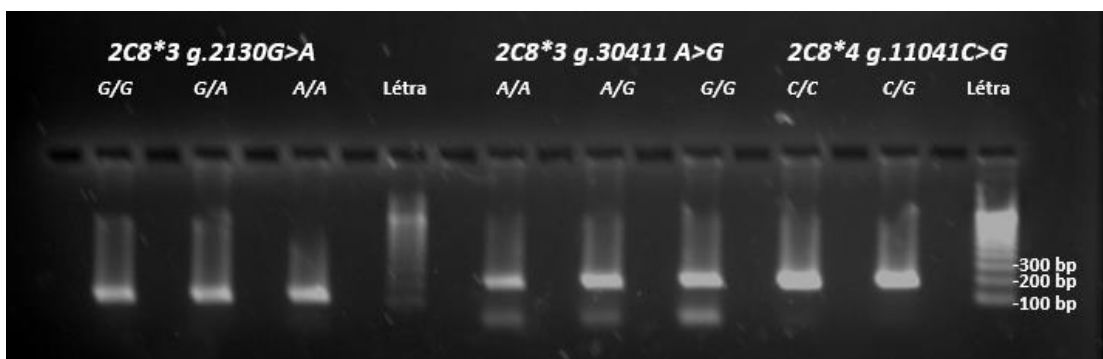
Első lépésként meghatároztuk azt a hőfokot, amelyen az optimalizálást elvégezhetjük a forward és reverz primerekkel (7. ábra). Ehhez hőmérséklet-gradienst alkalmaztunk 55°C – 62°C között. Az olvadáspont analízis segítségével megállapítható a PCR reakció során keletkezett termék(ek) száma, valamint az ampliton olvadáspontja. A keletkezett termék olvadáspont meghatározásához a hőmérséklet és a fluoreszcens jel intenzitás arányának negatív deriváltja és a hőmérséklet függvényében való ábrázolása szükséges. Az amplifikációhoz kiválasztott hőmérséklet a futási görbék alakja és az áttörési pontok alapján került meghatározásra (59°C). Ezt követően az optimális primer és próba koncentrációkat határoztuk meg (8. ábra). A futási görbe alakja, a fluoreszcencia intenzitása és az áttörési pontok alapján a forward (F) és reverz (R) primer koncentráció párokból a

300-300 nM koncentrációt választottuk ki (sötét kék szín, 5. koncentráció pár piros kerettel jelölve).



8. ábra: Primer koncentrációk meghatározásához használt koncentráció párok. A különböző színek jelölik a koncentráció párokat, míg F a forward és R a reverz primereket jelölik. Fekete nyíl és pontok jelölik azt a görbét, amit piros kerettel jelzett koncentráció párt alkalmazva kaptunk.

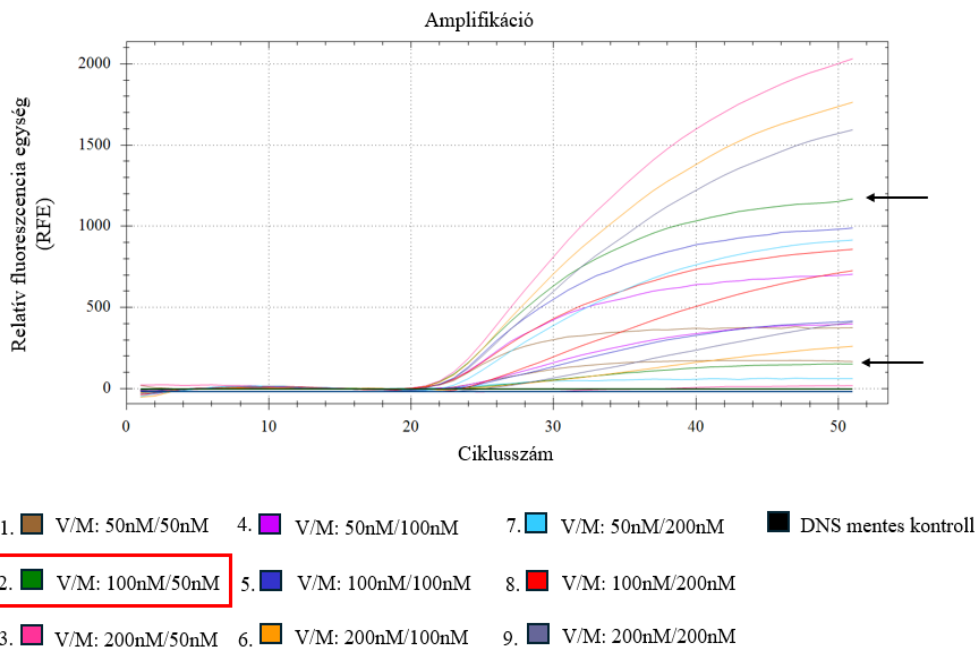
Ezt követően gélelektroforézissel (9. ábra) ellenőriztük a specifikus termékek keletkezését és méretét (*CYP2C8*3* g.2130G>A 146 bázis pár; *CYP2C8*3* g.30411 A>G: 216 bázis pár; *CYP2C8*4*: 200 bázis pár). A PCR reakciók során specifikus termék keletkezett, amelyek a megfelelő mérettartományba estek (9. ábra), vagyis a primerek specifikusan kötődtek a cél szekvenciához.



9. ábra: PCR reakció során keletkezett amplicon méreteinek ellenőrzése gélelektroforézissel. (A *CYP2C8*3* g.30411A>G esetében 100 bp alatti termék feltételezhetően primer-dimer jelenlétére utalhatnak.)

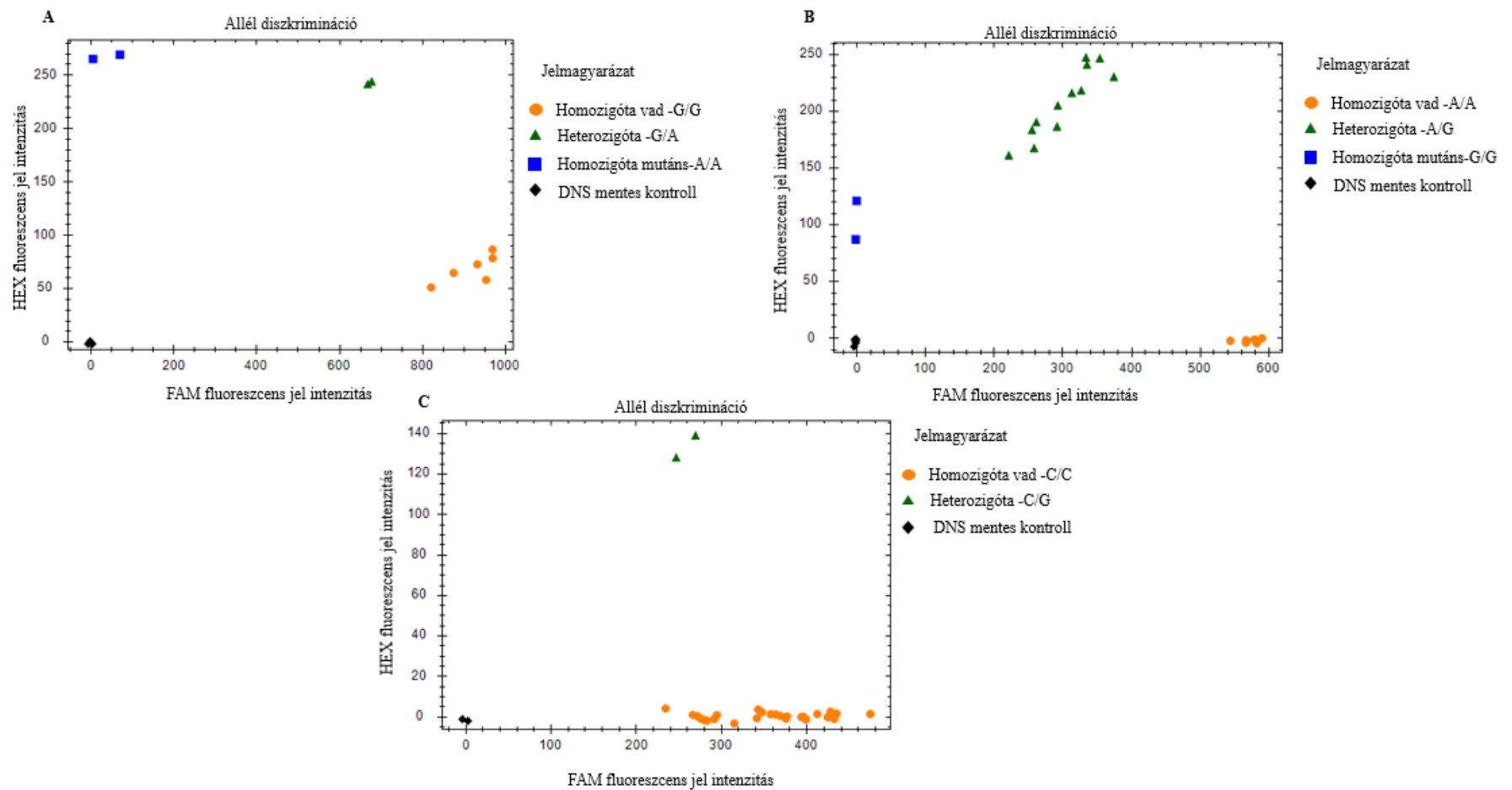
Következő lépésben beállítottuk az SNP-re tervezett próba szekvenciák optimális koncentrációját. A vad (V) próba jelölésére (referencia szekvenciával megegyező) FAM, míg a mutáns (M) (referencia szekvenciától egy nukleotidban

eltérő) esetében HEX fluorofórt használtunk. A 8. ábra szemlélteti a *CYP2C8*3* g.2130 G>A SNP próba koncentráció párokat. A vad próba 100 nM és a mutáns próba 50 nM koncentrációban való alkalmazása szigmoidális futási görbét eredményezett (10. ábra 2. koncentráció pár- zöld színű jelölve), továbbá elkülöníthetők a homozigóta és heterozigóta minták (11. ábra).

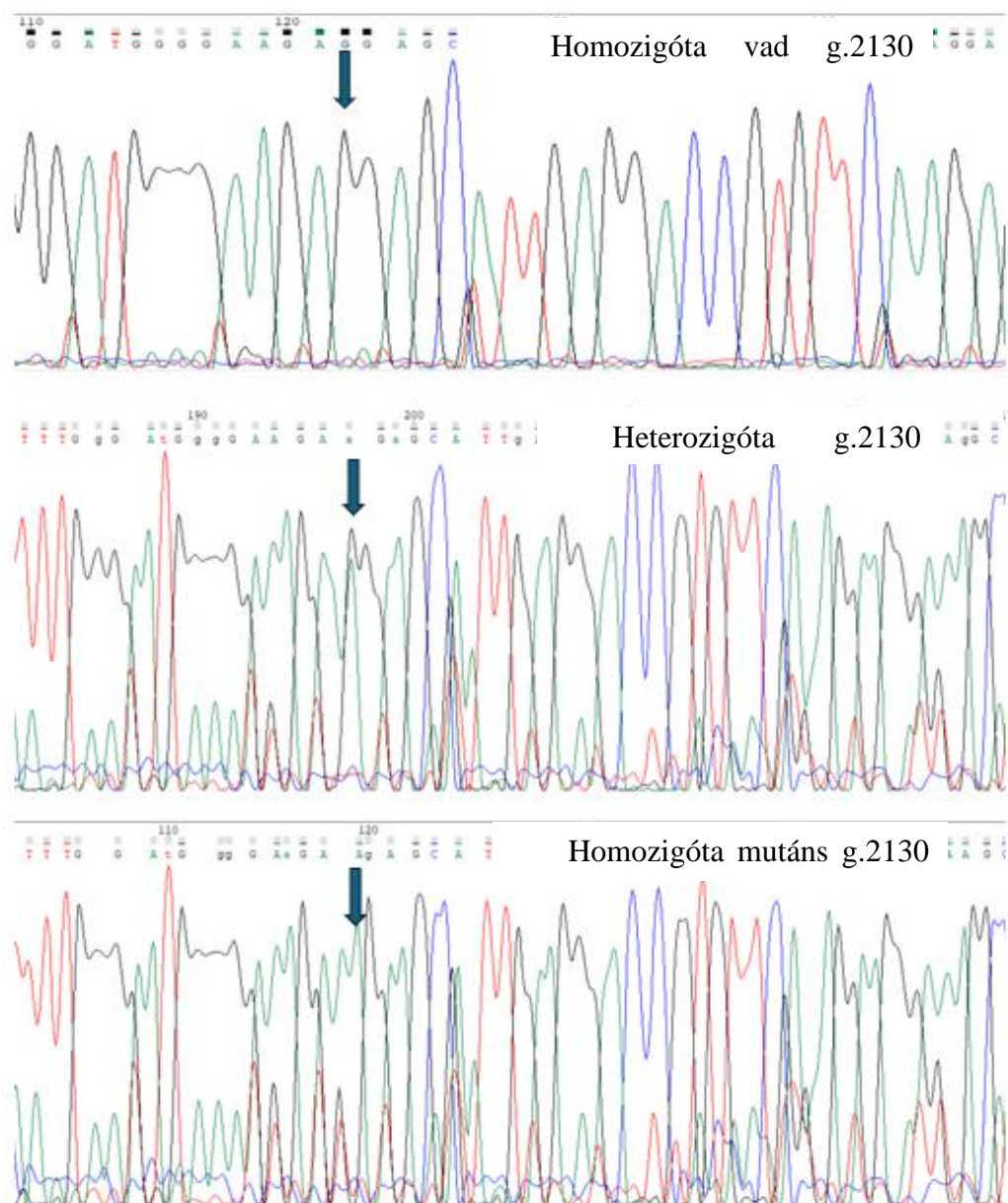


10. ábra: Próba koncentráció optimalizálása. meghatározáshoz alkalmazott vad (V) és mutáns (M) koncentráció párok. Fekete nyilak jelölik vad és mutáns próbákat, amit a piros kerettel jelzett 2. koncentráció pár alkalmazása során kaptunk.

A vad és mutáns próbákhoz kapcsolt fluoreszcencia jel intenzitása alapján elkülöníthető az adott mintában lévő SNP homozigóta vad, heterozigóta és homozigóta mutáns formája (11. A, B és C ábra). Eredményeinket Sanger-szekvenálással is megerősítettük. A 12. ábra mutatja be a *CYP2C8*3* g.2130 G>A SNP homozigóta vad típusú (G/G), heterozigóta (G/A) és homozigóta mutáns (A/A) minták szekvenogramját.



11. ábra: *CYP2C8* g.2130G>A, g.30411A>G és g.11041C>G SNP-k kimutatása homozigóta vad, heterozigóta és homozigóta mutáns mintákban. **A)** *CYP2C8* g.2130G>A diszkriminációja **B)** *CYP2C8* g.30411A>G **C)** *CYP2C8* g.11041C>G SNP-k diszkriminációja



12. ábra: *CYP2C8*3* g.2130G>A SNP-t azonosító amplikon precizitásának ellenőrzése Sanger szekvenálással. A felső panel mutatja be a homozigóta vad típusú (G/G), a középső panel a heterozigóta (G/A) és az alsó panel a homozigóta mutáns (A/A) genotípusokat. A nyíl jelzi a mutációs pontot.

4.2. *CYP2C8*, *CYP3A4* és *CYP3A5* genotípusok megállapítása a betegeknél

A paklitaxel-metabolizáló képesség becsléséhez a *CYP2C8*, *CYP3A4* és *CYP3A5* leggyakoribb alléljait vizsgáltuk (*CYP2C8*3*: g.2130G>A, rs11572080 és g.30411A>G, rs10509681; *CYP2C8*4* g.11041C>G, rs1058930; *CYP3A4*1B* g.-392A>G, rs2740574; *CYP3A4*22* g.15389C>T, rs35599367; *CYP3A5*3* g.6986A>G, rs776746) azon betegek vérmintájában, akik paklitaxelt tartalmazó

terápiában részesültek (N=17). Vad típusú allélt (*CYP2C8*1*, *CYP3A4*1*, *CYP3A5*1*) azonosítottunk minden olyan esetben, ha mutáció nem volt kimutatható. Az adatok elérhetőek az EVA adatbázisban (PRJEB64027, European Variant Archive). A 12. táblázat tartalmazza a tüdő adenokarcinómával diagnosztizált betegek allél és genotípus gyakoriságait és összehasonlításukat a kaukázusi populációban detektált gyakoriságokkal.

12. táblázat: *CYP* allél és genotípus előfordulásának gyakorisága tüdő adenokarcinómával diagnosztizált betegeknél és összevetése a kaukázusi populációban azonosított gyakoriságokkal.

CYP allél/genotípus	Mintaszám (N)	Gyakoriság (%)	
		Tüdő adenokarcinóma betegek	Kaukázusi populáció ^a
CYP allél			
<i>CYP2C8</i>			
*1	31,00	91,20	79-90,5
*3	3,00	8,80	6,5 - 14
*4	0,00	0,00	3-7
<i>CYP3A4</i>			
*1	32,00	94,10	83-95,5
*1B	2,00	5,90	2-9
*22	0,00	0,00	2,5 - 8
<i>CYP3A5</i>			
*1	3,00	8,80	3-12
*3	31,00	91,20	88 - 97
CYP genotípus			
<i>CYP2C8</i>			
*1/*1	14	82,3	81,8 – 85
*1/*3	3	17,7	11,9 – 18,1
<i>CYP3A4</i>			
*1/*1	15	88,2	90 – 90,9
*1/*1B	2	11,8	7,7 – 9
<i>CYP3A5</i>			
*1/*1	0	0	3,4
*1/*3	3	11,8	11,6 – 19,71
*3/*3	14	88,2	76,7 – 87,4

^a Kaukázusi populációban azonosított *CYP* allél és genotípus gyakoriságok (6,139–141 alapján).

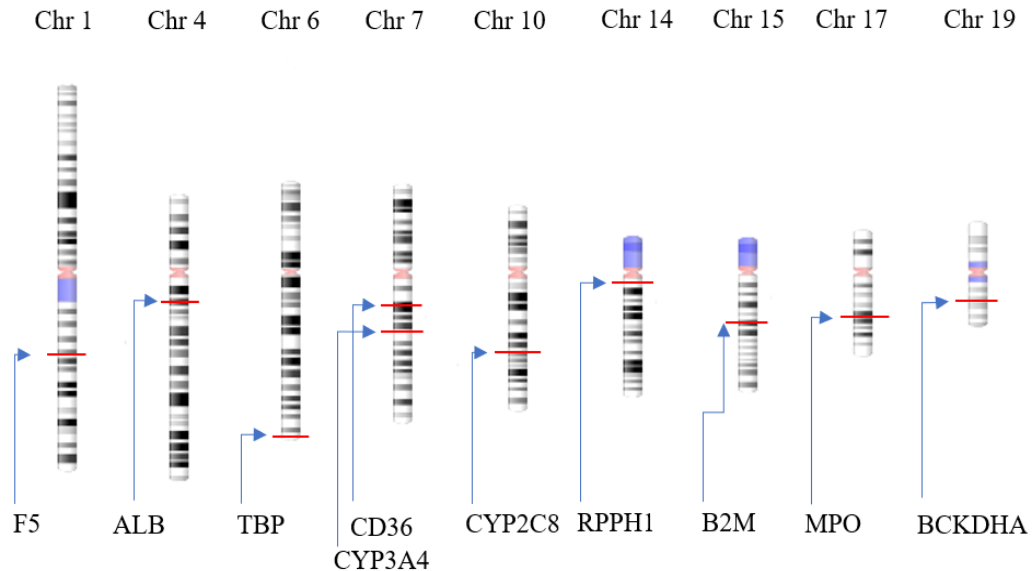
A *CYP2C8**1/*1 genotípust a legtöbb beteg hordozta (N=14), ami arra utal, hogy ezek a betegek működőképes *CYP2C8* enzimmel rendelkeztek. Ezzel szemben a *CYP2C8**1/*3 heterozigóta betegeknél feltételeztük az enzimaktivitás csökkenését azon irodalmi adatok alapján, amelyek a paklitaxel metabolizmus csökkenését mutatták be. A *CYP3A4**1/*1 genotípust a legtöbb beteg esetében

(N=15) azonosítható volt. A *CYP3A4*1B* és *CYP3A4*22* allél jelenlétében működőképes enzim termelődik, változás az expresszió mértékében van. Két beteg esetében a *CYP3A4*1/*1B* heterozigóta genotípust azonosítottunk. A *CYP3A4*1B* allélját fokozott mRNS expresszióval hozták összefüggésbe (149,150). A *CYP3A5* enzim intron kivágódását eredményező *CYP3A5*3* allélvariáns minden beteg esetében azonosításra került, míg a *CYP3A5*1* vad típusú allélt három beteg hordozta. A *CYP3A5*1* és a *CYP3A4*1B* között genetikai kapcsoltságról számoltak be (149,150), így feltételezhető volt, hogy a *CYP3A4*1B* allélt hordozó betegek között lesznek olyan egyének, akik a *CYP3A5*1* alléllal is rendelkeznek. A három *CYP3A5*1/*3* heterozigóta beteg közül két beteg hordozta a *CYP3A4*1B* allélt. Feltételezhető, hogy ezek a betegek fokozott *CYP3A* aktivitással rendelkeztek. Továbbá mindkét beteg a paklitaxel kezelésre nem-reagáló betegcsoportba tartozott. A *CYP2C8*4* és *CYP3A4*22* allélokot nem azonosítottunk a betegnél.

4.3. A tumorszövet *CYP* kópiaszám változásának meghatározására alkalmas módszer kidolgozása

A tumorszövet saját paklitaxel-metabolizáló képességének fokozódása a terápia-rezisztencia egyik forrása lehet. A paklitaxel metabolizmusában meghatározó *CYP2C8*, illetve a kisebb jelentőségű *CYP3A4* gén emelkedett kópiaszáma hozzájárulhat a tumorsejtek paklitaxel-metabolizáló képességének növekedéséhez. A tumorszövet *CYP* kópiaszám változásának meghatározásához nagy-áteresztőképességű, PCR alapú módszert fejlesztettünk ki. Az OK18 beteg három tumormintáján keresztül (primer tüdő adenokarcinóma, tüdő metasztázis, máj metasztázis) mutatom be a módszert. A tumorsejtekre jellemző genom instabilitás következményeként tapasztalható szerkezeti változások (kromoszóma-átrendeződés, gén kópiaszám változás) a „referencia-” és „target” -géneket egyformán érinthetik. A referenciagén(ek) kópiaszám változása hibás eredményre vezethet a „target” -gén relatív kópiaszámának megállapítása során. Ezért a módszer megbízhatóságának növelése érdekében a *CYP* gének (N=2; *CYP2C8*, *CYP3A4* „target” -gének) kópiaszámát több referenciagén (N=8; *ALB*, *B2M*, *BCKDHA*, *CD36*, *MPO*, *TBP*, *RPPH1*) kópiaszámához viszonyítottuk. Olyan referenciagéneket választottunk, amelyek különböző kromoszómákon (chr1, chr4,

chr6, chr7, chr14, chr15, chr17, chr19) és különböző kromoszómális pozíciókban helyezkednek el; a centromér közelében találhatóak az *ALB*, *CD36*, *RPPH1* gének, a telomér közelében a *TBP*, míg az *F5*, *B2M*, *MPO*, *BCKDHA* a centromér és a telomér közötti régióban (13. ábra).



13. ábra: Kiválasztott referencia és target gének pozíciója a kromoszómákon.

Az egészséges szövetminták (pl. vérminta vagy egészséges tüdőszövet minta) genomjában a referenciagének két kópiában fordulnak elő. A tumormintában meghatározni kívánt „target” -gén kópiaszám kiértékelésének alapját a $\Delta\Delta C_t$ módszer jelenti, amelynek során a célgén áttörési pontját viszonyítjuk a referenciagén áttörési pontjához (ΔC_t), majd ezt a különbséget az egészséges szövetben megállapított célgén és referenciagén különbségével vetjük össze ($\Delta\Delta C_t$). Egy gén kópiaszámának meghatározása során azt 9 másik gén kópiaszámához viszonyítottuk. A relatív kópiaszám a mintán belüli normalizálás eredményeként 1 lett. A Módszerek rész 3.4 fejezetében leírtak szerint határoztuk meg két gén kópiaszám azonosságát.

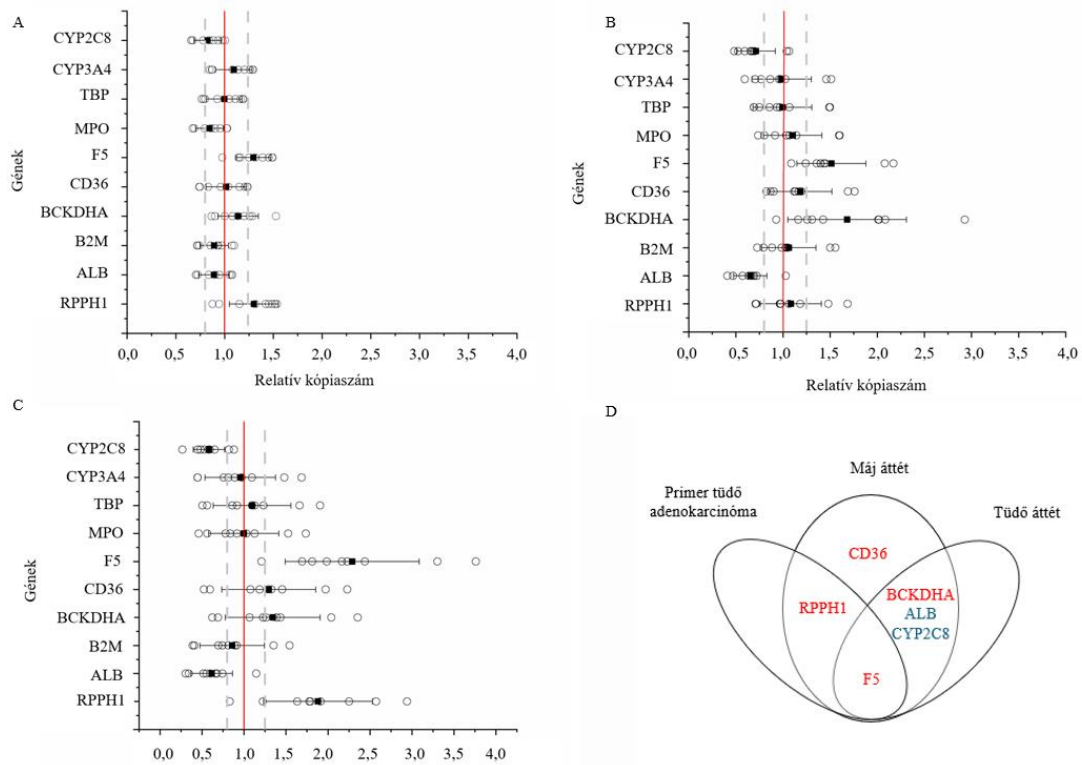
A kialakított pontozási rendszer alapján a gének relatív kópiaszám értékei mellé rendelt pontszámok összegzésével azonosítottuk azon géneket, amelyek használata referenciagénként hibás és nem megbízható eredményt ad, így az ilyen géneket a végső kópiaszám számolásából kizártuk (13. táblázat). Az összesített pontszám ≤ -5 gén deléció, míg az ≥ 5 duplikációt jeleztek. Azért jelöltük ki ily

módon a határértékeket, mert 9 kópiaszám összehasonlítást tettünk minden egyes gén esetén, és az összehasonlítások több mint felénél változást jelző összpontszámot valós kópiaszám változásnak ítéltük. A 13. táblázat az OK18 beteg primer tüdő adenokarcinóma és metasztázis mintáiban (tüdő- és máj-áttétekben) megállapított gének összesített pontszámait tartalmazza.

13. táblázat: Az OK18 beteg primer tüdő adenokarcinóma és áttétes mintáiban (tüdő – és máj-áttét) meghatározott összesített pontszámok.

Gén	Primer tüdő adenokarcinóma	Tüdő áttét	Máj áttét
<i>RPPH1</i>	6^a	0	7
<i>ALB</i>	-3	-8	-8
<i>B2M</i>	-3	0	-2
<i>BCKDHA</i>	3	7	3
<i>CD36</i>	-2	2	3
<i>F5</i>	6	7	8
<i>MPO</i>	-4	1	-1
<i>TBP</i>	-2	-1	0
<i>CYP3A4</i>	3	-1	-1
<i>CYP2C8</i>	-5	-7	-7

^avastagított számok jelölik a gének kópiaszámában történő változást (≤ -5 = deléció, vagy $\geq +5$ = multiplikáció).



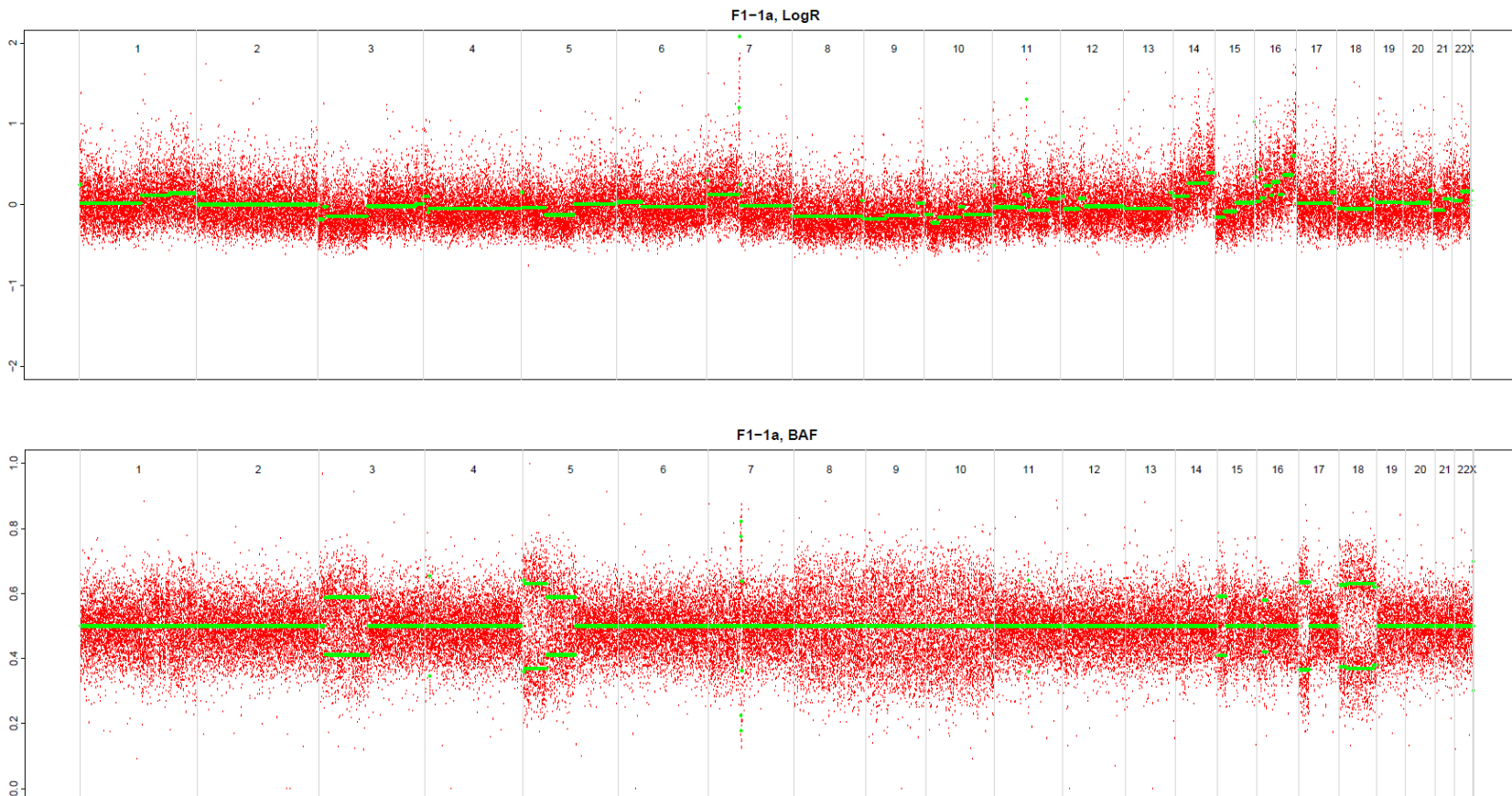
14. ábra: Az OK18 beteg primer tüdő adenokarcinómájában (A), tüdő metasztázis (B) és máj metasztázis (C) mintájában meghatározott relatív kópiaszámok. A függőleges piros vonal az 1 relatív kópiaszámot jelöli, míg a szürke szaggatott vonalak határolják azt a tartományt (0,8 – 1,25), amelyen belül nem állapítottunk meg a diploidtól való kópiaszám eltérést. Ezen a tartományon kívül eső génekben szerkezeti változás bekövetkeztét feltételeztük. Az egyedi értékeket üres körök, míg az átlagot és szórását fekete négyzet és a hozzá tartozó hibaszávok jelölik. (D) A referencia- és „target” – génekben azonosított kópiaszám eltérések. Piros szín jelöli a kópiaszám emelkedést (multiplikáció) és a kék szín a csökkenést (deléció).

Az OK18 beteg primer tüdő adenokarcinóma mintájában a következő génekben a relatív kópiaszámok átlagát kiszámolva eltérést azonosítottunk: *RPPH1* (1,301) és *F5* (1,297) gének esetében multiplikációt, míg a *CYP2C8* (0,80) génnél deléciót (14. A ábra). A tüdő metasztázis mintában a *BCKDHA* (1,681) és az *F5* (1,514) gének esetében multiplikáció mutatkozott, az *ALB* (0,653) és a *CYP2C8* (0,713) esetében azonban deléciót lehetett megfigyelni (14. B ábra). A máj áttét mintában a *RPPH1* (1,882) és *F5* (2,289) gének esetében szintén multiplikáció volt megállapítható, az *ALB* (0,616) és a *CYP2C8* (0,583) géneknél pedig deléció (14. C ábra). A 14. D ábra szemlélteti azokat a géneket, amelyekben kópiaszám változást azonosítottunk az OK18 beteg tumor mintáiban. Az *F5* gén mindhárom tumor mintában kópiaszám emelkedést mutatott. Az *RPPH1* gén kópiaszám emelkedése kimutatható volt a primer tüdő adenokarcinóma és máj metasztázis mintákban, míg

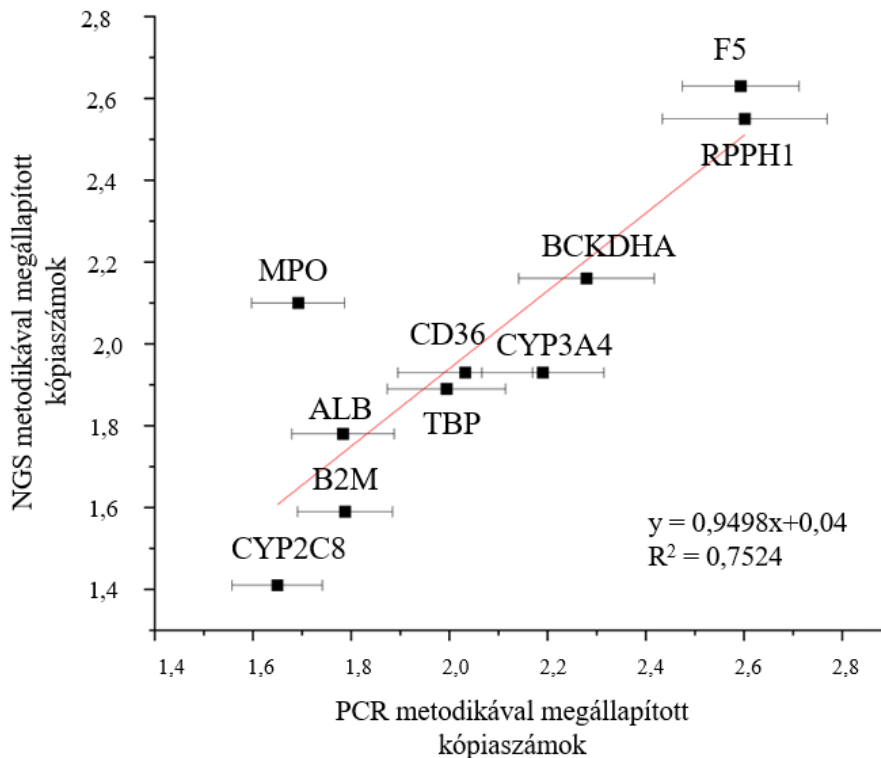
a *BCKDHA* multiplikációja, az *ALB* és *CYP2C8* deléciója a tüdő- és máj-metasztázisokban egyaránt megfigyelhető volt. A *CD36* gén kópiaszám emelkedését csak a máj áttét mintában tapasztaltuk. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a referenciagének kópiaszám változásának ily módon történő meghatározása segíthet kiszűrni a referenciának alkalmatlan géneket. A végső kópiaszámok meghatározása során kihagytuk a normalizálásból azokat a referenciagéneket, amelyeket alkalmatlannak találtunk, majd a normalizált értéket 2-vel megszoroztuk, mivel a kontroll szövetminta diploid genommal rendelkezik. Az OK18 beteg daganatos mintáiban (primer tüdő adenokarcinóma, tüdő- és máj-áttétekben) *CYP2C8* deléciót határoztunk meg, míg a *CYP3A4* kópiaszáma nem változott a primer tüdő adenokarcinómában. A tüdő- és máj-áttétekben *CYP2C8* deléciót állapítottunk meg.

4.4. A PCR-alapú kópiaszám meghatározás eredményeinek megerősítése új-generációs szekvenálással

Az OK18 beteg primer tüdő adenokarcinóma mintájában összehasonlítottuk a PCR-alapú módszerrel meghatározott kópiaszámokat a teljes genom szekvenálással nyert kópiaszám adatokkal. A tumor mintában szomatikus kópiaszám változásokat kerestünk, amelynek detektálásához az „*allele-specific copy number analysis of tumors*” - ASCAT algoritmust használtuk (15. ábra). Az ASCAT algoritmus a minta ploiditás és kópiaszám becslésére allél-specifikus konstans illesztést alkalmaz. Megállapítottuk, hogy a minta nagyrészt diploid ($2n$), és a mintán belüli heterogenitás kismértékű volt. Minden „referencia-” és „target” - gén esetében az abszolút ploiditást a két allél együttes, nem kerekített kópiaszáma jelentette. Az *F5*, az *RPPHI* és a *CYP2C8* gének PCR-alapú módszerrel azonosított kópiaszám változásait új-generációs szekvenálással igazoltuk. A kétféle módszerrel (PCR- és NGS-alapú módszer) meghatározott abszolút kópiaszám adatokat összevetettük és megállapítottuk, hogy a referencia- és célgén kópiaszáma jó egyezést mutatott (a 10 gén esetében a 16. ábra pontjaira illesztett egyenes meredeksége: $0,9498$, $r^2 = 0,7524$).



15. ábra: Az OK18 beteg primer tüdő adenokarcinóma mintájának lefedettsége (A) és B allél gyakorisági („B allele frequency” - BAF) profilja (referencia szekvenciától eltérő) (B). A piros pontok a teljes genom lognormált (LogR) lefedettségi értékeit mutatják, amelyet az emberben gyakori SNP-k listájának felhasználásával nyertünk, míg a zöld vonal az ASCAT algoritmus lépéseit követve illeszkedő szakaszokat jelöli.



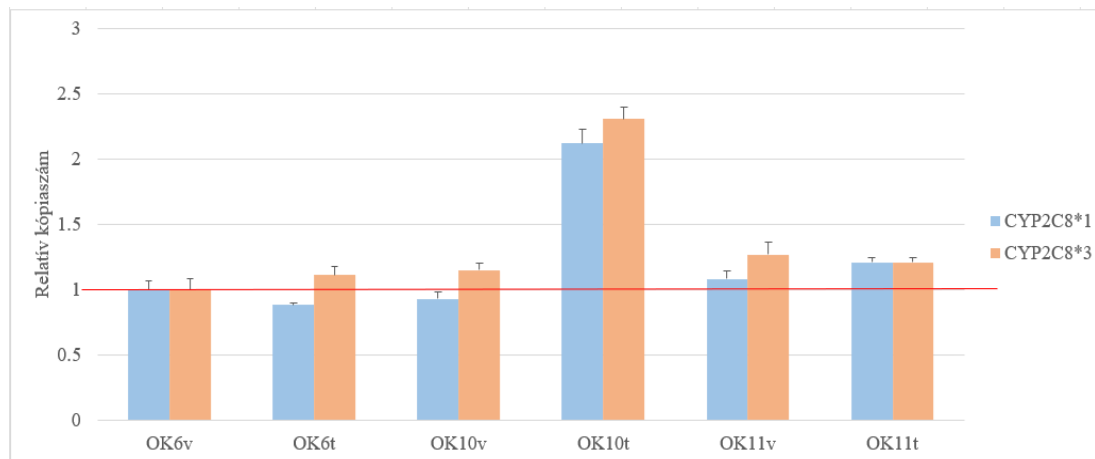
16. ábra: Az OK18 beteg primer tüdő adenokarcinóma mintájában PCR-alapú metodikával meghatározott kópiaszámok korrelációja új-generációs szekvenálás („next generation sequencing” - NGS) alapú kópiaszám detektálással. A gének kópiaszámait fekete négyzetek a PCR-alapú metodikával meghatározott értékek szórását a szürke hibaszávok jelölik.

4.5. A *CYP2C8* kópiaszám meghatározása tüdő adenokarcinómával diagnosztizált betegek tumor mintájában

A tüdő adenokarcinómával diagnosztizált 17 beteg többségénél *CYP2C8**1/*1 (homozigóta vad) genotípust (N=14), míg három esetben *CYP2C8**1/*3 genotípust azonosítottunk. A *CYP2C8**3 allél enzimaktivásra gyakorolt hatása ellentmondásos az irodalomban, ezért szükség van a *CYP2C8* össz kópiaszámának meghatározása mellett allélspecifikus kópiaszám meghatározására is. Az allélspecifikus kópiaszám meghatározás alapjai a kutatócsoport által korábban kifejlesztett *CYP2D6* allél-specifikus módszerből erednek (151). A duplex PCR mérés alapján külön detektálható a *CYP2C8**1 és *CYP2C8**3 allél, amelyek

kópiaszáma belső referenciagénhez viszonyítva számítható ki. Referenciagénnek a két kópiában jelenlévő *RPPH1* gént választottuk, amelynek detektálására kifejlesztett esszé kereskedelmi forgalomban elérhető, így a *CYP2C8* alléllal duplex reakcióban valósult meg a mérés.

A mérések során meggyőződünk arról, hogy a *CYP2C8*1/*3* heterozigóta genotípusú betegek (N=3) vérmintájában a *CYP2C8* össz kópiaszáma 2, egy kópia *CYP2C8*1* és egy kópia *CYP2C8*3* volt azonosítható (17. ábra). A tumormintákban detektált *CYP2C8* vad és mutáns allélok kópiaszáma egy beteg esetén (OK10) mutatott *CYP2C8* kópiaszám emelkedést, mind a *CYP2C8*1*, mind a *CYP2C8*3* allél több mint kétszeres változása volt kimutatható (17. ábra).



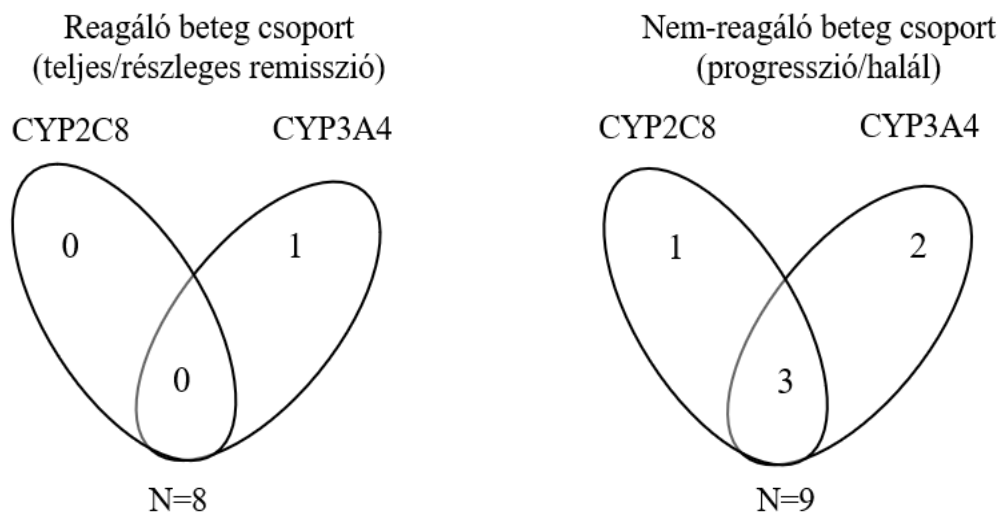
17. ábra: *CYP2C8*1/*3* heterozigóta genotípusú betegek (N=3) vér- (v) és tumormintájában (t) azonosított *CYP2C8*1* (vad típus) és *CYP2C8*3* allélok kópiaszáma.

4.6. Tüdő adenokarcinóma *CYP2C8* és *CYP3A4* kópiaszám változása és a betegség kimenetele közötti összefüggések

Feltételezésünk szerint a működőképes *CYP2C8* és *CYP3A4* enzimet kódoló allél duplikációja/multiplikációja jelentősen befolyásolhatja az expressziót, fokozott enzimaktivitást és fokozott paklitaxel metabolizmust eredményezve, ezáltal a tumorsejtben alacsonyabb paklitaxel koncentráció alakulhat ki. A *CYP3A4*1B* allélt fokozott *CYP3A4* expresszióval hozzák összefüggésbe, duplikációja szintén fokozott enzimaktivitáshoz és alacsony sejten belüli paklitaxel koncentrációhoz vezethet (83).

A tumorminták *CYP2C8* és *CYP3A4* kópiaszám változása és a paklitaxel terápia kimenetele közti összefüggést 17 betegnél vizsgáltuk, mivel az OK18 beteg

nem részesült paklitaxel kezelésben. A Módszerek rész 3.1 alfejezetében megjelölt részben leírtak szerint alakítottuk ki a daganatellenes kezelésre reagáló és nem reagáló betegcsoportokat. A 17 adenokarcinóma minta közül 7 mintában a *CYP2C8* és/vagy a *CYP3A4* gén kópiaszám emelkedése volt megfigyelhető, 1 mintában csak a *CYP2C8*, 3 mintában csak a *CYP3A4* és további 3 mintában mind a *CYP2C8*, mind a *CYP3A4* kópiaszáma növekedett. Szignifikáns összefüggést találtunk a paklitaxel-metabolizáló CYP enzimek kópiaszám növekedése és terápia kimenetele között. A *CYP2C8* és/vagy *CYP3A4* gének kópiaszám változás gyakrabban fordult elő a kezelésre nem-reagáló betegek primer tumor mintáiban, mint a terápiára jól reagáló betegnél (nem-reagálók 6/9, reagálók 1/8, $P=0,0498$) (18.ábra).



18. ábra: *CYP2C8* és/vagy *CYP3A4* kópiaszámok változása paklitaxellel kezelt betegek primer tüdő adenokarcinóma mintáiban (reagáló, N=8; nem-reagáló, N=9).

5. Az eredmények értékelése

A terápia-rezisztencia jelentős akadályt jelent a daganatos megbetegedések sikeres kezelésében. A transzportfehérjék, a gyógyszer-metabolizáló enzimek genetikai variabilitása és expressziós szintje farmakokinetikai okokra visszavezethető terápia-rezisztencia kialakulását eredményezheti. A genetikai polimorfizmusok kulcsfontosságúak lehetnek annak előrejelzésében, hogy hogyan fog az adott beteg reagálni a gyógyszeres kezelésre és milyen potenciális mellékhatások alakulhatnak ki. A sikeres daganatellenes kezelés elérésének érdekében a beteg saját metabolizáló képessége mellett fontos információt szerezni a tumort alkotó sejtekben lévő, gyógyszer-metabolizáló enzimek kópiaszám változásairól, ami a tumor metabolizáló képességének megváltozását jelentheti.

Inter-individuális különbségek figyelhetők meg a paklitaxel farmakokinetikájában, ezen különbségek a terápia hatékonyságát, valamint a potenciális mellékhatások kialakulását befolyásolhatják. *In vitro* tanulmányokban kimutatták a CYP2C8 és CYP3A4 enzimek szerepét a paklitaxel metabolizmusában (57,58,117,152), azonban a CYP2C8 és CYP3A4 polimorf allélok hatásai *in vitro* és *in vivo* körülmények között is ellentmondásosnak bizonyultak. Bergmann és munkatársai ovárium daganattal diagnosztizált CYP2C8*3 allélt hordozó betegekben mérsékelten alacsonyabb paklitaxel-kiürülést figyeltek meg összehasonlítva a vad típusú allélt hordozó betegek gyógyszer-kiürülésével (153). Marcató és munkatársai ezzel ellentétes eredményre jutottak, a CYP2C8*3 allélt hordozó emlődaganatos betegek csoportjában, vagyis a CYP2C8*3 allélhoz magasabb paklitaxel-metabolizáló aktivitást rendeltek (79,153). Lee és munkatársai paklitaxel által kiváltott neurotoxicitást vizsgálva arra jutottak, hogy a CYP2C8*3 allél jelenlétének nincs jelentős hatása a paklitaxel metabolizmusára *in vivo* vagy *in vitro* (154). Több tanulmány foglalkozott olyan polimorfizmusok detektálásával (CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5), amelyek összefüggésbe hozhatóak az inter-individuális különbségekkel (147,148,155), azonban egyelőre nem sikerült egybehangzó megállapításokat tenni ezen tanulmányok eredményei alapján. A vizsgálatunk első lépése tüdő adenokarcinómával diagnosztizált betegek CYP2C8 és CYP3A4 genetikai polimorfizmusait állapította meg. A CYP2C8*3 allél (N=3)

azonosítható volt mind a reagáló és nem-reagáló betegeknél, míg a *CYP3A5*1/*3* genotípusú heterozigóta betegek (N=3) mind a kezelésre nem-reagáló csoportba tartoztak, azonban a kis mintaszám miatt ebből csak limitált következtetést lehet levonni, megerősítéséhez további vizsgálatok szükségesek.

A daganatos sejtek fokozott hatóanyag-metabolizáló képessége a terápia-rezisztencia kialakulásának egyik mechanizmusát jelentheti (126). Több tumor típusban azonosítottak eltérést a CYP enzimek mRNS és fehérje expressziójában, valamint enzimaktivitásában (156,157). Feltételezhetően a megváltozott gyógyszer-metabolizáló képesség következtében olyan hatóanyag-toleráns sejtklónok alakulhatnak ki, amelyek a gyógyszer-rezisztencia kialakulását segítik elő (158). A tumorsejtek korlátlan osztódási képességüknek köszönhetően genom instabilitással jellemezhetőek, amely elősegíti a szerkezeti változások megjelenését. A szerkezeti változások lehetnek deléciók, multiplikációk/duplikációk, amelyek a gének transzkripciójára fejthetik ki hatásukat, ezáltal befolyásolva a daganatellenes hatóanyagok metabolizmusát, teret engedve rezisztens sejtklónok kialakulásának és a betegség progressziójának. A *CYP* géneket érintő multiplikációk vagy deléciók potenciális biomarkerként használhatóak azon daganatok esetében, amelyek az egészséges szövetből eltérő gyógyszerlebontó képességgel rendelkeznek az adott daganatellenes hatóanyaggal szemben (6,128).

Kópiaszám változás azonosítására több módszer is alkalmazható, úgymint az *in situ* hibridizációs analízis, micro-array alapú, multiplex ligációs próba analízis, PCR alapú kimutatási módszerek, illetve az új-generációs szekvenálás (159,160). A klinikai gyakorlatban szükséges egy olyan egyszerű és megbízható módszer kifejlesztése, amely segítségül szolgál a kópiaszámok rutin azonosításában. Egy érzékeny qPCR-alapú módszert mutattam be, amely a paklitaxel metabolizmusában szerepet játszó *CYP2C8* és *CYP3A4* enzimek kópiaszám-változásának azonosítását tette lehetővé tüdő adenokarcinómával diagnosztizált betegek tumormintáiban. A daganatos mintákban nehézséget jelent az optimális referenciagén kiválasztása, mivel a tumor heterogenitás minden gént érinthet és szerkezeti változásokat hozhat létre (161). Ennek megfelelően több, különböző kromoszómán elhelyezkedő referenciagént választottunk ki, majd a referenciagének (n=8; *RPPH1*, *ALB*, *B2M*, *BCKDHA*, *CD36*, *F5*, *MPO*, *TBP*) és targetgének (n=2; *CYP2C8*, *CYP3A4*)

kópiaszámát hasonlítottuk össze egymással és az egészséges szövetekben (vér vagy tüdőszövet) lévő kópiaszámokkal, így megállapítottuk a relatív kópiaszámokat. Az alkalmazott pontozási rendszer lehetővé tette azon gének azonosítását, amelyekben kópiaszám változás volt tapasztalható. Ezt követően azon referenciagéneket választottuk ki és vontuk be a végső kópiaszám számításba, amelyek kópiaszámai azonosak voltak az egészséges szövetben detektált értékekkel.

A tumor heterogenitás jelensége nehézséget jelent a kópiaszám meghatározásában. Az intratumorális heterogenitás következtében olyan tumorsejt szubpopulációk vannak jelen egy tumoron belül, illetve egy beteg különböző daganataiban, amelyek genetikailag eltérnek egymástól (127). Ennek következtében a tumormintákban a gének relatív kópiaszámai folytonos értékeket mutattak. Továbbá az OK18 beteg primer tüdő-tumor mintájában meghatározott kópiaszámok eltérőek voltak a tüdő- és máj-áttétekben meghatározott kópiaszámoktól. Azonos típusú daganatos megbetegedésekben kópiaszám heterogenitásról („*copy number heterogeneity*” - CNH) is beszámoltak, amely potenciálisan előre jelezheti a betegek túlélési arányát (162). Az 1. kromoszóma q karján kópiaszám növekedést detektáltak több daganat típusban (163,164), amely magyarázatul szolgálhat a vizsgálat qPCR alapú kópiaszám meghatározása során detektált *F5* referenciagén kópiaszám változására.

Az uptake és efflux transzporterek által előidézett terápia-rezisztencia intenzíven kutatott terület (165), azonban a tumor megváltozott gyógyszer-metabolizáló képességét kevésbé vizsgálják, mint a rezisztencia forrását. Qixing és munkatársai munkájukban megnövekedett *CYP3A4* és *CYP3A5* expressziót azonosítottak tüdő adenokarcinóma mintákban az egészséges szövethez viszonyítva, amely alapján ezek a gének lehetséges biomarkerként szolgálhatnak a tüdő adenokarcinóma prognózisában (166). A paklitaxellel szembeni rezisztencia kialakulásának oka részben a hatóanyag metabolizmusában részt vevő CYP enzimek fokozott expressziójának tulajdonítható. Hofman és munkatársai *CYP3A4* és *CYP2C8* overexpressziójának hatását vizsgálták paklitaxellel és docetaxellel kezelt HepG2 sejtekben. Eredményeik alapján arra következtettek, hogy a *CYP3A4* jelentős szereppel bír a docetaxel-érzékenységben, míg a *CYP2C8* fokozott expressziója a paklitaxel kezelés során a sejtek magasabb életképességét idézte elő

(167). Chen és munkatársai a paklitaxel hatását vizsgálták a PXR-ra és kimutatták, hogy paklitaxel kezelés alkalmazása során a PXR aktiválása végbemegy, így a *CYP3A4* expressziója és enzimaktivitása fokozódik. A PXR aktivációjának következtében mind a *CYP3A4*, mind az *ABCB1* gén által kódolt P-gp transzport fehérje transzkripciós indukciója is megvalósulhat (121,168,169). Feltételezhető, hogy *CYP* kópiaszám változások fokozhatják a *CYP2C8* és/vagy *CYP3A4* expressziós szintjét, növelve a paklitaxel metabolizmusát a tumorsejtekben. A qPCR-alapú metodika alkalmazása lehetővé tette a *CYP*-kópiaszám változások azonosítását tüdő adenokarcinóma mintákban, valamint lehetőséget teremtett a tumorban történő *CYP*-kópiaszámok megváltozása és paklitaxellel kezelt betegek terápia kimenetele közötti összefüggés kimutatására. A kezelésre nem-reagáló betegek esetében (progrediáló betegség vagy elhalálozás) gyakrabban fordult elő *CYP2C8* és/vagy *CYP3A4* kópiaszám növekedése összevetve a paklitaxel kezelésre reagáló (teljes/részleges remisszió) betegcsoport tagjaival. Természetesen figyelembe kell venni a vizsgálat korlátozott mintaszámát is, a következtetések megerősítéséhez nagyobb mintaszámú betegpopuláció szükséges. Munkánk elsődleges célja egy egyszerű, mindennapi klinikai rutin vizsgálatra alkalmas kópiaszám detektálási metodika kidolgozása volt. Ez a módszer lehetővé teszi a paklitaxel metabolizmusában szerepet játszó *CYP* enzimek fokozott expressziójához vezető *CYP* multiplikáció azonosítását, ami a rezisztens sejtklonok kialakulásához és szelekciójához vezethet.

Kérdésként felmerült, hogy a kópiaszám változás *CYP2C8* gén környezetét is érintheti és más gének kópiaszáma is változhat a 10q23.33 környezetében, ami különösen a környező tumorszuppresszorok vagy onkogének esetén lehet jelentős, hiszen befolyásolhatják a betegség kialakulásának folyamatát. A *CYP2C8* gén a 10. kromoszómán helyezkedik el (10q23.33), amelyhez közel van a foszfatáz és tenzin homológ gén („*phosphatase and tensin homolog*” - *PTEN*), és a citoplazmatikus poliadenilációs elemet kötő fehérje 3 („*cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3*” – *CPEB3*). A *PTEN* a sejtciklus szabályozásában, míg a *CPEB3* az EGFR szabályozásában vesz részt (170,171). A tumorok kialakulásában inkább a tumorszuppresszorok deléciója, mintsem sokszorozódása játszik jelentős szerepet (172). Vizsgálatunkban a *CYP2C8* expresszió emelkedését, a tumorsejtek fokozott

paklitaxel inaktiválását és a betegség negatív kimenetelét sokkal inkább a *CYP2C8* génben előforduló multiplikációval hoztuk összefüggésbe, mint a tumorszuppresszorok multiplikációjával.

A terápia-rezisztencia mechanizmusa feltételezhetően egyrészt a beteg saját metabolizáló képességével, másrészt a tumor gyógyszer-metabolizáló aktivitásával hozható összefüggésbe. Így fontos információt szerezni a gyógyszer-metabolizáló *CYP* gének polimorfizmusairól (funkció vesztő és funkció növelő hatást kifejtő mutációk) és a tumorban kialakult *CYP* gén kópiaszám változásokról. Nagy-áteresztőképességű qPCR-alapú módszert alakítottunk ki, amely alkalmas a tumorban kópiaszám változást kimutatni, illetve a kialakított pontrendszer alkalmas azon referenciagének azonosítására, amelyek deléció vagy multiplikációt szenvedtek és így alkalmatlanok arra, hogy referenciagénként használjuk. E módszer az új-generációs szekvenálás alternatív metodikája lehet, amely a rutin klinikai gyakorlatban alkalmazható. A paklitaxel naív, kezelés megkezdése előtti, tüdő adenokarcinóma mintákban *CYP2C8* és/vagy *CYP3A4* kópiaszám emelkedést mutattunk ki, amelyek nagyobb számban fordultak elő a terápiára nem-reagáló betegcsoportban. Ennek alapján a *CYP* gének kópiaszám változása potenciális biomarkere lehet a paklitaxel-rezisztenciának és a klinikai kimenetelnek. A vizsgálat kis mintaszáma miatt az eredmények klinikai megerősítéséhez további kísérletek szükségesek.

6. Következtetések

Tüdő adenokarcinóma elsővonalbeli terápiája paklitaxelt tartalmaz, amelynek metabolizmusában a CYP2C8 enzim kiemelt szerepet tölt be (6- α -hidroxipaklitaxel metabolit képződés). A gént érintő változások (SNP, kópiaszám változás) kihathatnak az enzim metabolikus működésére, így ezek ismerete hasznos információval szolgálhat a betegek kezelésének kialakításában. A CYP3A4 enzim kisebb szereppel rendelkezik a paklitaxel metabolizmusában (3-*p*'-hidroxipaklitaxel metabolit képződés)

Munkánk során tüdő adenokarcinómával diagnosztizált betegeknél meghatároztuk a *CYP2C8* és *CYP3A* allélvariánsokat. A *CYP2C8**3, *CYP3A4**1B és *CYP3A5**3 allélvariáns előfordulási gyakorisága hasonló volt a kaukázusi populációban leírt gyakoriságokhoz. Azonban az alacsony elemszám miatt a betegek saját paklitaxel metabolizáló képességének és a kezelés kimenetele közti összefüggés vizsgálatára nem került sor.

A beteg saját paklitaxel-metabolizáló képessége mellett a tumorsejtekben bekövetkező *CYP2C8* és/vagy *CYP3A4* kópiaszám változások is hozzájárulhatnak a terápia-rezisztencia kialakulásához. A tumorszövetben a *CYP* gének kópiaszám változásának megállapítására nagy-áteresztőképességű, qPCR-alapú metodikát dolgoztunk ki. Több referenciagént is alkalmaztunk, amelyek közül a megváltozott kópiaszámú géneket kihagytuk az értékelésből. A PCR-alapú módszerrel meghatározott gén kópiaszámok jó egyezést mutattak az új-generációs szekvenálással meghatározott kópiaszámokkal.

Összefüggést kerestünk a *CYP2C8* és *CYP3A4* kópiaszámok és a betegség kimenetele között. A kezelésre nem-reagáló betegeknél gyakrabban fordult elő *CYP2C8* és/vagy *CYP3A4* kópiaszám növekedés, mint a kezelésre reagáló betegnél.

A *CYP* kópiaszám meghatározására kialakított módszer az új-generációs szekvenálás alternatív metodikáját jelentheti, valamint potenciális biomarkere lehet a terápia-rezisztencia kialakulásának előrejelzésében tüdő adenokarcinómával diagnosztizált betegeknél még a paklitaxel terápia megkezdése előtt.

7. Összefoglalás

Az egyén gyógyszer-metabolizáló képességére a CYP enzimek genetikai polimorfizmusai számottevő hatást fejtenek ki, amelyek részben felelőssé tehetőek az egyének között megfigyelhető hatóanyag-metabolizmusban jelentkező különbségekért. A tumorsejtekben bekövetkező szerkezeti változások (pl. kópiaszám eltérések) miatt a gyógyszer-metabolizáló CYP enzimek metabolikus aktivitása, valamint a tumorban végbemenő hatóanyag lebontás megváltozhat egyes sejtekben, ami rezisztens sejtklonok kialakulását segítheti elő. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a tumorsejtben bekövetkező *CYP* gén kópiaszám változások miatt a daganatellenes hatóanyag inaktiválódása felgyorsul, amely a terápia-rezisztencia kialakulásához vezethet. Tüdő adenokarcinómával diagnosztizált betegek egészséges szöveti és tumormintáinak vizsgálata során a paklitaxel inaktivációban részt vevő *CYP2C8* és *CYP3A4* allélvariánsokat azonosítottuk. Továbbá nagy-áteresztőképességű PCR-alapú metodikát fejlesztettünk a paklitaxel metabolizmusában szerepet játszó CYP enzimek kópiaszám változásának tumorszövetben történő detektálására. A fejlesztéshez kapcsolódó értékelő rendszer elősegítette azon referenciagének azonosítását, amelyek deléció vagy multiplikációt szenvedtek a tumorban, így nem alkalmazhatók referenciának. A PCR-alapú módszerrel megállapított gén kópiaszámok (target gének: *CYP2C8*, *CYP3A4*; referenciagének: *ALB*, *B2M*, *BCKDHA*, *CD36*, *F5*, *MPO*, *TBP*, *RPPH1*) jó egyezést mutattak az ugyanazon mintában új-generációs szekvenálással meghatározott kópiaszámokkal. *CYP* kópiaszám emelkedés (*CYP2C8* és/vagy *CYP3A4*) gyakrabban fordult elő a kezelésre nem reagáló beteg (progresszió/elhalálozás) csoportban, mint a kezelésre reagáló betegeknél (remisszió). A kópiaszám detektálásra alkalmas PCR-alapú módszer egyszerűségénél fogva jó alternatívája lehet az új-generációs szekvenálásnak a mindennapi klinikai gyakorlatban, továbbá a tumorban azonosított CYP kópiaszám változások előrejelezhetik a paklitaxel kezelés kimenetelét.

8. Summary

An individual's ability to metabolise drugs is significantly influenced by genetic polymorphisms in CYP enzymes, which may be partly responsible for the variability in drug metabolism between individuals. Structural changes in tumour cells (e.g. copy number alterations) may alter the metabolic activity of drug-metabolising CYP enzymes and the drug inactivation in certain tumour cells, which may contribute to the development of resistant cell clones. This suggests that the copy number alterations in the *CYP* gene may increase inactivation of the anticancer drug in the tumour cell, which may lead to therapy resistance. *CYP2C8* and *CYP3A4* allelic variants involved in paclitaxel inactivation were identified in healthy and tumour samples from patients diagnosed with lung adenocarcinoma. Furthermore, we developed a high-throughput PCR-based method to detect copy number alterations in CYP enzymes involved in the metabolism of paclitaxel in tumour tissue. The development of a scoring system facilitated the identification of reference genes that have undergone deletion or multiplication in the tumour and therefore could not be used as a reference. The gene copy numbers determined by PCR-based methods (target genes: *CYP2C8*, *CYP3A4*; reference genes: *ALB*, *B2M*, *BCKDHA*, *CD36*, *F5*, *MPO*, *TBP*, *RPPHI*) showed strong correlation with the copy numbers determined by next-generation sequencing in the same sample. CYP copy number elevations (*CYP2C8* and/or *CYP3A4*) were identified to a greater extent in the treatment-resistant (progression/death) group of patients than in the responders (remission). The simplicity of a PCR-based method for copy number detection could be a good alternative to next-generation sequencing in everyday clinical practice, and CYP copy number alterations identified in tumours might predict the outcome of paclitaxel therapy.

9. Irodalomjegyzék

1. Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Drug - Metabolizing Enzymes – An Overview. In: Anzenbacher P, Zanger UM, editors. *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. First. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2012. p. 3–25.
2. Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: A Review. *Curr Drug Targets*. 2018;19(1):38–54.
3. Macherey AC, Dansette PM. Biotransformations leading to toxic metabolites: Chemical aspects. In: Wermuth CG, editor. *The Practice of Medicinal Chemistry: Fourth Edition*. 3rd editio. Academic Press; 2008. p. 674–96.
4. Esteves F, Rueff J, Kranendonk M. The central role of cytochrome p450 in xenobiotic metabolism—a brief review on a fascinating enzyme family. *J Xenobiotics*. 2021;11(3):94–114.
5. Iacopetta D, Ceramella J, Catalano A, Scali E, Scumaci D, Pellegrino M, et al. Impact of cytochrome P450 enzymes on the phase I metabolism of drugs. *Appl Sci*. 2023;13(10):6045.
6. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2013;138(1):103–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
7. Akhdar H, Legendre C, Aninat C, Fabrice M. Anticancer drug metabolism: Chemotherapy resistance and new therapeutic approaches. In: Paxton J, editor. *InTech:Topics on Drug Metabolism*. Intech; 2012. p. 267–322.
8. Omura T. Recollection of the early years of the research on cytochrome P450. *Proc Japan Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2011;87(10):617–40.
9. Lamb DC, Waterman MR. Fifty years of cytochrome P450 research. In: Yamazaki H, editor. *Fifty Years of Cytochrome P450 Research*. Springer, Japan; 2014. p. 1–409.
10. Klein K, Zanger UM. Pharmacogenomics of cytochrome P450 3A4: Recent progress toward the “missing heritability” problem. *Front Genet*. 2013;4(12).
11. Neve EPA, Ingelman-Sundberg M. Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450. *Anal Bioanal Chem*. 2008;392(6):1075–84.

12. Liu J, Lu YF, Corton JC, Klaassen CD. Expression of cytochrome P450 isozyme transcripts and activities in human livers. *Xenobiotica*. 2021;51(3):279–86.
13. Guengerich FP, Waterman MR, Egli M. Recent structural insights into cytochrome P450 function. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2016;37(8):625–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.006>
14. Anttila S, Raunio H, Hakkola J. Cytochrome P450-mediated pulmonary metabolism of carcinogens: Regulation and cross-talk in lung carcinogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(5):583–90.
15. Alsanosi SMM, Skiffington C, Padmanabhan S. Pharmacokinetic Pharmacogenomics. In: Padmanabhan S, editor. *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014. p. 341–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386882-4.00017-7>
16. Urquhart BL, Nolin TD. Drug metabolism in chronic kidney disease. In: Kimmel PL, Rosenberg ME, editors. *Chronic Renal Disease* [Internet]. Second. Elsevier Inc.; 2019. p. 1035–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-815876-0.00063-2>
17. Fanni D, Pinna F, Gerosa C, Paribello P, Carpinello B, Faa G, et al. Anatomical distribution and expression of CYP in humans: Neuropharmacological implications. *Drug Dev Res*. 2021;82(5):628–67.
18. Guengerich FP. Mechanisms of cytochrome P450-catalyzed oxidations. *ACS Catal* [Internet]. 2017;8(12):10964–76. Available from: <file:///C:/Users/Carla%0ACarolina/Desktop/Artigos%0Apara%0Aa%0Aacrescentar%0AAna%0Aa%0Aqualifica%C3%A7%C3%A3o/The%0Aa%0Aimpact%0Aof%0Aa%0Aa%0Abirth%0Aa%0Aweight%0Aon%0Aa%0Acardiovascular%0Adisease%0Arisk%0Ain>
19. Mittal B, Tulsyan S, Kumar S, Mittal RD, Agarwal G. Cytochrome P450 in cancer susceptibility and treatment. In: Makowski GS, editor. *Advances in Clinical Chemistry* [Internet]. Academic Press; 2015. p. 77–139. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242315000517>
20. Lam YWF. Principles of pharmacogenomics: Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical implications. In: Lam YWF, Scott SA, editors. *Pharmacogenomics: Challenges and Opportunities in Therapeutic Implementation* [Internet]. Second Edi. Elsevier Inc.; 2018. p. 1–53. Available

from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812626-4.00001-2>

21. Weide J Van Der, Steijns LSW. Impact on Clinical Pharmacology. *Ann Clin Biochem.* 1999;36:722–9.
22. Tóth K, Bdi T, Kiss Á, Temesvári M, Háfra E, Nagy A, et al. Phenoconversion of CYP2C9 in epilepsy limits the predictive value of CYP2C9 genotype in optimizing valproate therapy. *Per Med.* 2015;12(3):199–207.
23. Zanger UM, Klein K. Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): Advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Front Genet.* 2013;4(24).
24. Zukunft J, Lang T, Richter T, Hirsch-Ernst KI, Nussler AK, Klein K, et al. A natural CYP2B6 TATA box polymorphism (-82T→C) leading to enhanced transcription and relocation of the transcriptional start site. *Mol Pharmacol.* 2005;67(5):1772–82.
25. Rochat B. Role of cytochrome P450 activity in the fate of anticancer agents and in drug resistance: Focus on tamoxifen, paclitaxel and imatinib metabolism. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(4):349–66.
26. Zhang Y, Klein K, Sugathan A, Nassery N, Dombkowski A, Zanger UM, et al. Transcriptional profiling of human liver identifies sex-biased genes associated with polygenic dyslipidemia and coronary artery disease. *PLoS One.* 2011;6(8).
27. Stevens JC, Marsh SA, Zaya MJ, Regina KJ, Divakaran K, Le M, et al. Developmental changes in human liver CYP2D6 expression. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(8):1587–93.
28. Hakkola J, Tanaka E, Pelkonen O. Developmental expression of cytochrome P450 enzymes in human liver. *Pharmacol Toxicol.* 1998;82(5):209–17.
29. Lu H, Rosenbaum S. Developmental pharmacokinetics in pediatric populations. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2014;19(4):262–76.
30. Hines RN, Gail McCarver D. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: Phase I oxidative enzymes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;300(2):355–60.
31. Li H, Lampe JN. Neonatal cytochrome P450 CYP3A7: A comprehensive review of its role in development, disease, and xenobiotic metabolism. *Arch Biochem Biophys.* 2019;673:108078.

32. Zane NR, Chen Y, Wang MZ, Thakker DR. Cytochrome P450 and flavin-containing monooxygenase families: Age-dependent differences in expression and functional activity. *Pediatr Res* [Internet]. 2018;83(2):527–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2017.226>
33. Van Groen BD, Nicolai J, Kuik AC, Van Cruchten S, Van Peer E, Smits A, et al. Ontogeny of hepatic transporters and drug-metabolizing enzymes in humans and in nonclinical species. *Pharmacol Rev*. 2021;73(2):597–678.
34. de Jong LM, Jiskoot W, Swen JJ, Manson ML. Distinct effects of inflammation on cytochrome P450 regulation and drug metabolism: Lessons from experimental models and a potential role for pharmacogenetics. *Genes (Basel)*. 2020;11(12):1–24.
35. Lenoir C, Rollason V, Desmeules JA, Samer CF. Influence of inflammation on cytochromes P450 activity in adults: A systematic review of the literature. *Front Pharmacol*. 2021;12:733935.
36. Stanke-Labesque F, Gautier-Veyret E, Chhun S, Guilhaumou R. Inflammation is a major regulator of drug metabolizing enzymes and transporters: Consequences for the personalization of drug treatment. *Pharmacol Ther*. 2020;215:107627.
37. Krogstad V, Peric A, Robertsen I, Kringen MK, Vistnes M, Hjelmesæth J, et al. Correlation of body weight and composition with hepatic activities of cytochrome P450 enzymes. *J Pharm Sci*. 2021;110(1):432–7.
38. Guengerich FP. Inhibition of cytochrome P450 enzymes by drugs—molecular basis and practical applications. *Biomol Ther*. 2022;30(1):1–18.
39. Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ, Kivistö KT. Pharmacokinetic interactions with rifampicin: Clinical relevance. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(9):819–50.
40. Bolleddula J, Gopalakrishnan S, Hu P, Dong J, Venkatakrishnan K. Alternatives to rifampicin: A review and perspectives on the choice of strong CYP3A inducers for clinical drug–drug interaction studies. *Clin Transl Sci*. 2022;15(9):2075–95.
41. Monostory K, Pascussi JM. Regulation of drug-metabolizing human cytochrome P450s. *Acta Chim Slov*. 2008;55(1):20–37.
42. Klomp SD, Manson ML, Guchelaar HJ, Swen JJ. Phenoconversion of

- cytochrome P450 metabolism: A systematic review. *J Clin Med*. 2020;9(9):2890.
43. Wang JS, Neuvonen M, Wen X, Backman JT, Neuvonen PJ. Gemfibrozil inhibits CYP2C8-mediated cerivastatin metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(12):1352–6.
 44. Prueksaritanont T, Zhao JJ, Ma B, Roadcap BA, Tang C, Qiu Y, et al. Mechanistic studies on metabolic interactions between gemfibrozil and statins. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301(3):1042–51.
 45. Ogilvie BW, Zhang D, Li W, Rodrigues AD, Gipson AE, Holsapple J, et al. Glucuronidation converts gemfibrozil to a potent, metabolism-dependent inhibitor of CYP2C8: Implications for drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(1):191–7.
 46. Hakkola J, Hukkanen J, Turpeinen M, Pelkonen O. Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update [Internet]. Vol. 94, *Archives of Toxicology*. Springer Berlin Heidelberg; 2020. 3671–3722 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02936-7>
 47. Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: Current status. *Arch Toxicol*. 2008;82(10):667–715.
 48. Backman JT, Filppula AM, Niemi M, Neuvonen PJ. Role of cytochrome P450 2C8 in drug metabolism and interactions. *Pharmacol Rev*. 2016;68(1):168–241.
 49. Sutrisna E. The impact of CYP1A2 and CYP2E1 genes polymorphism on theophylline response. *J Clin Diagnostic Res*. 2016;10(11):FE01–3.
 50. Lai X-S, Yang L-P, Li X-T, Liu J-P, Zhou Z-W, Zhou S-F. Human CYP2C8: structure, substrate specificity, inhibitor selectivity, inducers and polymorphisms. *Curr Drug Metab* [Internet]. 2009;10(9):1009–47. Available from: <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdm/2009/00000010/00000009/art00007%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20214592>
 51. Ong CE, Coulter S, Birkett DJ, Ramana Bhasker C, Miners JO. The xenobiotic inhibitor profile of cytochrome P4502C8. *Br J Clin Pharmacol*. 2000;50(6):573–80.
 52. Yu L, Shi D, Liping M, Zhou Q, Su Z. Influence of CYP2C8 polymorphisms on the hydroxylation metabolism of paclitaxel, repaglinide and inbuprofen

- enantiomers in vitro. *Biopharm Drug Dispos.* 2013;34(5):278–87.
53. Daily EB, Aquilante CL. Cytochrome P450 2C8 pharmacogenetics: a review of clinical studies. *Pharmacogenomics.* 2010;10(9):1489–510.
 54. Aquilante CL, Kosmiski LA, Bourne DWA, Bushman LR, Daily EB, Hammond KP, et al. Impact of the CYP2C8 *3 polymorphism on the drug-drug interaction between gemfibrozil and pioglitazone. *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75(1):217–26.
 55. Campodónico DM, Zubiaur P, Soria-Chacartegui P, Casajús A, Villapalos-García G, Navares-Gómez M, et al. CYP2C8*3 and *4 define CYP2C8 phenotype: An approach with the substrate cinitapride. *Clin Transl Sci.* 2022;15(11):2613–24.
 56. Marcath LA, Pasternak AL, Hertz DL. Challenges to assess substrate-dependent allelic effects in CYP450 enzymes and the potential clinical implications. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2019;19(6):501–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41397-019-0105-1>
 57. Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, Chanas B, Coulter SJ, Ghanayem BI, et al. Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics* [Internet]. 2001 Oct;11(7):597–607. Available from: <http://journals.lww.com/00008571-200110000-00006>
 58. Soyama A, Saito Y, Hanioka N, Murayama N, Nakajima O, Katori N, et al. Non-synonymous single nucleotide alterations found in the CYP2C8 gene result in reduced in vitro paclitaxel metabolism. *Biol Pharm Bull.* 2001;24(12):1427–30.
 59. Gao Y, Liu D, Wang H, Zhu J, Chen C. Functional characterization of five CYP2C8 variants and prediction of CYP2C8 genotype-dependent effects on in vitro and in vivo drug – drug interactions. *Xenobiotica.* 2010;40(7):467–75.
 60. Taniguchi R, Kumai T, Matsumoto N, Watanabe M, Kamio K, Suzuki S, et al. Utilization of human liver microsomes to explain individual differences in paclitaxel metabolism by CYP2C8 and CYP3A4. *J Pharmacol Sci.* 2005;97(1):83–90.
 61. Marcath LA, Kidwell KM, Robinson AC, Vangipuram K, Monika L, Griggs JJ, et al. Patients carrying CYP2C8*3 have shorter systemic paclitaxel exposure. *Pharmacogenomics.* 2019;20(2):95–104.
 62. Kirchheiner J, Thomas S, Bauer S, Tomalik-Scharte D, Hering U, Doroshenko

- O, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rosiglitazone in relation to CYP2C8 genotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;80(6):657–67.
63. Niemi M, Leathart JB, Neuvonen M, Backman JT, Daly AK, Neuvonen PJ. Polymorphism in CYP2C8 is associated with reduced plasma concentrations of repaglinide. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;74(4):380–7.
 64. Tornio A, Niemi M, Neuvonen PJ, Backman JT. Trimethoprim and the CYP2C8*3 allele have opposite effects on the pharmacokinetics of pioglitazone. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(1):73–80.
 65. Baldwin SJ, Clarke SE, Chenery RJ. Characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in the in vitro metabolism of rosiglitazone. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;48(3):424–32.
 66. Kudo T, Goda H, Yokosuka Y, Tanaka R, Komatsu S, Ito K. Estimation of the contribution of CYP2C8 and CYP3A4 in repaglinide metabolism by human liver microsomes under various buffer conditions. *J Pharm Sci [Internet].* 2017;106(9):2847–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2017.02.013>
 67. Soyama A, Hanioka N, Saito Y, Murayama N, Ando M, Ozawa S, et al. Amiodarone N-deethylation by CYP2C8 and its variants, CYP2C8*3 and CYP2C8 P404A. *Pharmacol Toxicol.* 2002;91(4):174–8.
 68. Zhou S-F, Liu J-P, Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev.* 2009;41(2):89–295.
 69. Yasar U, Lundgren S, Eliasson E, Bennet A, Wiman B, De Faire U, et al. Linkage between the CYP2C8 and CYP2C9 genetic polymorphisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;299(1):25–8.
 70. Takahashi H, Echizen H. Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40(8):587–603.
 71. Monostory K, Nagy A, Tóth K, Búdi T, Kiss Á, Déri M, et al. Relevance of CYP2C9 function in valproate therapy. *Curr Neuropharmacol.* 2019;17(1):99–106.
 72. Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, et al. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin*

- Pharmacol Ther. 2006;79(1):103–13.
73. de Vries Schultink AHM, Zwart W, Linn SC, Beijnen JH, Huitema ADR. Effects of pharmacogenetics on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tamoxifen. *Clin Pharmacokinet*. 2015;54(8):797–810.
 74. Ramón Y Cajal T, Altés A, Paré L, Del Rio E, Alonso C, Barnadas A, et al. Impact of CYP2D6 polymorphisms in tamoxifen adjuvant breast cancer treatment. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;119(1):33–8.
 75. Thorén L, Lindh JD, Ackehed G, Kringen MK, Hall P, Bergh J, et al. Impairment of endoxifen formation in tamoxifen-treated premenopausal breast cancer patients carrying reduced-function CYP2D6 alleles. *Br J Clin Pharmacol*. 2021;87(3):1243–52.
 76. Bertilsson L, Dahl M-L, Dalén P, Al-Shurbaji A. Molecular genetics of CYP2D6: Clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;53(2):111–22.
 77. Toscano C, Klein K, Bliedernicht J, Schaeffeler E, Saussele T, Raimundo S, et al. Impaired expression of CYP2D6 in intermediate metabolizers carrying the *41 allele caused by the intronic SNP 2988G>A: Evidence for modulation of splicing events. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16(10):755–66.
 78. Aquilante CL, Niemi M, Gong L, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family2, subfamily C, polypeptide 8. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(12):721–8.
 79. Marcath LA, Kidwell KM, Robinson AC, Vangipuram K, Burness ML, Griggs JJ, et al. Patients carrying CYP2C8*3 have shorter systemic paclitaxel exposure. *Pharmacogenomics*. 2019;20(2):95–104.
 80. Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, et al. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(5):836–47.
 81. Kurzawski M, Dąbrowska J, Dziewanowski K, Domański L, Peruzińska M, Drożdżik M. CYP3A5 and CYP3A4, but not ABCB1 polymorphisms affect tacrolimus dose-adjusted trough concentrations in kidney transplant recipients. *Pharmacogenomics*. 2014;15(2):179–88.
 82. Déri M, Szakál-Tóth Z, Fekete F, Mangó K, Incze E, Minus A, et al. CYP3A-

- status is associated with blood concentration and dose-requirement of tacrolimus in heart transplant recipients. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00942-y>
83. Amirimani B, Ning B, Deitz AC, Weber BL, Kadlubar FF, Rebbeck TR. Increased transcriptional activity of the CYP3A4* 1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen*. 2003;42(4):299–305.
 84. Bahadur N, Leathart JBS, Mutch E, Steimel-Crespi D, Dunn S a, Gilissen R, et al. CYP2C8 polymorphisms in Caucasians and their relationship with paclitaxel 6alpha-hydroxylase activity in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(11):1579–89.
 85. Gaedigk A, Ingelman-Sundberg M, Miller NA, Leeder JS, Whirl-Carrillo M, Klein TE. The Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium: Incorporation of the human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature database. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;103(3):399–401.
 86. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Twist GP, Klein TE, Miller NA. The evolution of pharmVar. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;105(1):29–32.
 87. Gaedigk A, Whirl-Carrillo M, Pratt VM, Miller NA, Klein TE. PharmVar and the landscape of pharmacogenetic resources. *Clin Pharmacol Ther*. 2020;107(1):43–6.
 88. Gaedigk A, Casey ST, Whirl-Carrillo M, Miller NA, Klein TE. PharmVar: A global resource and repository for pharmacogene variation. *Clin Pharmacol Ther*. 2021;110(3):542–5.
 89. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
 90. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31–46.
 91. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.
 92. Leiter A, Veluswamy RR, Wisnivesky JP. The global burden of lung cancer:

- current status and future trends. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023;20(9):624–39.
93. Liao W, Coupland CAC, Burchardt J, Baldwin DR, DART initiative, Gleeson F V, et al. Predicting the future risk of lung cancer: development, and internal and external validation of the CanPredict (lung) model in 19-67 million people and evaluation of model performance against seven other risk prediction models. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2023;11(8):685–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37030308>
 94. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021;149(4):778–89.
 95. Malvezzi M, Santucci C, Boffetta P, Collatuzzo G, Levi F, La Vecchia C, et al. European cancer mortality predictions for the year 2023 with focus on lung cancer. *Ann Oncol*. 2023;34(4):410–9.
 96. International World cancer Research Fund. Lung cancer statistics [Internet]. 2020. Available from: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/lung-cancer-statistics/>
 97. Bogos K, Kiss Z, Gálffy G, Tamási L, Ostoros G, Müller V, et al. Revising incidence and mortality of lung cancer in central europe: An epidemiology review from hungary. *Front Oncol*. 2019;9:1051.
 98. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* [Internet]. 2018;103:356–87. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.005>
 99. Bogos K, Kiss Z, Gálffy G, Tamási L, Ostoros G, Müller V, et al. Lung cancer in Hungary. *J Thorac Oncol*. 2020;15(5):692–9.
 100. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res*. 2016;5(3):288–300.
 101. Bareschino MA, Schettino C, Rossi A, Maione P, Sacco PC, Zeppa R, et al. Treatment of advanced non small cell lung cancer. *J Thorac Dis*. 2011;3:122–33.
 102. Alduias Y, Zhandg H, Fan F, Chen J, Chen B. Non-small cell lung cancer (NSCLC). *Medicine (Baltimore)*. 2023;102(8):e32899.
 103. Singhal S, Kishan J, Singh M, Singh P. Treatment of advanced non small cell lung cancer (NSCLC): A clinical review. *Int J Contemp Med Surg Radiol*.

- 2019;4(2):150–4.
104. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC lung cancer staging project: Proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11(1):39–51.
 105. Ostoros G, Bajcsay A, Balikó Z, Borbély K, Csekeő A, Fillinger J, et al. A tüdőrák megelőzésének, diagnosztikájának és kezelésének alapelvei. *Magy Onkológia.* 2012;56:114–32.
 106. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: Diagnosis and management. *Am Fam Physician.* 2007;75(1):56–63.
 107. Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2004;350:379–92.
 108. Wu YL, Zhou C, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): An open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2014;15(2):213–22. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70604-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70604-1)
 109. Wu SG, Shih J-Y. Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Mol Cancer.* 2018;17(38).
 110. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* [Internet]. 2018;553:446–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature25183>
 111. Liu W Juan, Du Y, Wen R, Yang M, Xu J. Drug resistance to targeted therapeutic strategies in non-small cell lung cancer. *Pharmacol Ther.* 2020;206:107438.
 112. Anand U, Dey A, Chandel AKS, Sanyal R, Mishra A, Pandey DK, et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes Dis.* 2023;10(4):1367–401.
 113. Alqahtani FY, Aleanizy FS, El Tahir E, Alkahtani HM, AlQuadeib BT. Paclitaxel. In: Florey K, editor. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology.* First. Academic Press; 2019. p. 205–38.
 114. Barbuti AM, Chen ZS. Paclitaxel through the ages of anticancer therapy: Exploring its role in chemoresistance and radiation therapy. *Cancers (Basel)*

- [Internet]. 2015 Dec 3;7(4):2360–71. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6694/7/4/0897>
115. Samaan TMA, Samec M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. *Biomolecules*. 2019;9(12):789.
 116. Weaver BA. How taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2014;25(18):2677–81.
 117. Cresteil T, Monsarrat B, Dubois J, Sonnier M, Alvinerie P, Gueritte F. Regioselective metabolism of taxoids by human CYP3A4 and 2C8: Structure-activity relationship. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(4):438–45.
 118. Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist*. 2019;2(2):141–60.
 119. Coley HM. Mechanisms and consequences of chemotherapy resistance in breast cancer. *Eur J Cancer, Suppl* [Internet]. 2009;7(1):3–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6349\(09\)70003-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6349(09)70003-5)
 120. Maloney SM, Hoover CA, Morejon-Lasso L V., Prospero JR. Mechanisms of taxane resistance. *Cancers (Basel)*. 2020;12(11):1–57.
 121. Chen Y, Huang W, Chen F, Hu G, Li F, Li J, et al. Pregnane X receptors regulate CYP2C8 and P-glycoprotein to impact on the resistance of NSCLC cells to taxol. *Cancer Med*. 2016;5(12):3564–71.
 122. Fukumasu H, Rochetti AL, Pires PRL, Silva ER, Mesquita LG, Strefezzi RF, et al. Constitutive androstane receptor ligands modulate the anti-tumor efficacy of paclitaxel in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(6):1–10.
 123. Zhang Y. Overview of transporters in pharmacokinetics and drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol*. 2018;82(1):1–16.
 124. Smith NF, Figg WD, Sparreboom A. Role of the liver-specific transporters OATP1B1 and OATP1B3 in governing drug elimination. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2005;1(3):429–45.
 125. Juan-Carlos PDM, Perla-Lidia PP, Stephanie-Talia MM, Mónica-Griselda AM, Luz-María TE. ABC transporter superfamily. An updated overview, relevance in cancer multidrug resistance and perspectives with personalized medicine. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2021;48:1883–901. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06155-w>

126. Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*. 2006;25(11):1679–91.
127. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2018;15(2):81–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>
128. Ried T, Meijer GA, Harrison DJ, Grech G, Franch-Expósito S, Briffa R, et al. The landscape of genomic copy number alterations in colorectal cancer and their consequences on gene expression levels and disease outcome. *Mol Aspects Med*. 2019;69:48–61.
129. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet*. 2015;16(3):172–83.
130. Zheng Z, Yu T, Zhao X, Gao X, Zhao Y, Liu G. Intratumor heterogeneity: A new perspective on colorectal cancer research. *Cancer Med*. 2020;9(20):7637–45.
131. Incze E, Mangó K, Fekete F, Kiss ÁF, Póti Á, Harkó T, et al. Potential association of cytochrome P450 copy number alteration in tumour with chemotherapy resistance in lung adenocarcinoma patients. *Int J Mol Sci*. 2023;24(17).
132. Schwartz LH, Litière S, De Vries E, Ford R, Gwyther S, Mandrekar S, et al. RECIST 1.1 - Update and clarification: From the RECIST committee. *Eur J Cancer*. 2016;62:132–7.
133. Temesvári M, Kóbori L, Paulik J, Saárvaý E, Belic A, Monostory K. Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;341(1):294–305.
134. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7).
135. Thermo Fisher Scientific. What is UNG/UDG? [Internet]. Available from: <https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/what-is-ung-udg.html>
136. Németh E, Krzystanek M, Reiniger L, Ribli D, Pipek O, Sztupinszki Z, et al. The genomic imprint of cancer therapies helps timing the formation of metastases. *Int J Cancer*. 2019;145(3):694–704.

137. Van Loo P, Nordgard SH, Lingjærde OC, Russnes HG, Rye IH, Sun W, et al. Allele-specific copy number analysis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(39):16910–5.
138. Amemiya HM, Kundaje A, Boyle AP. The ENCODE Blacklist: Identification of problematic regions of the genome. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Jun 27;9(1):9354. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-45839-z>
139. National Center for Biotechnology Information. Databases [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
140. Thornton B, Basu C. Rapid and simple method of qPCR primer design. In: *Methods in Molecular Biology*. 2015. p. 173–9.
141. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611–22.
142. Bustin S, Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomol Detect Quantif* [Internet]. 2017;14(November):19–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
143. National Center for Biotechnology Information. Primer-BLAST [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
144. Integrated DNA Technologies. OligoAnalyzer Tool [Internet]. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>
145. National Center for Biotechnology Information. BLAST [Internet]. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BLASTSearch&LINK_LOC=blasthome
146. Gréen H, Söderkvist P, Rosenberg P, Mirghani RA, Rymark P, Lundqvist EÅ, et al. Pharmacogenetic studies of paclitaxel in the treatment of ovarian cancer. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009;104(2):130–7.
147. Henningsson A, Marsh S, Loos WJ, Karlsson MO, Garsa A, Mross K, et al. Association of CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 polymorphisms with the pharmacokinetics of paclitaxel. *Clin Cancer Res*. 2005;11(22):8097–104.
148. Marsh S, Somlo G, Li X, Frankel P, King CR, Shannon WD, et al. Pharmacogenetic analysis of paclitaxel transport and metabolism genes in breast

- cancer. *Pharmacogenomics J.* 2007;7:362–5.
149. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001;27:383–91.
 150. Wojnowski L, Hustert E, Klein K, Goldammer M, Haberl M, Kirchheiner J, et al. Re: Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(8):630–2.
 151. Kiss ÁF, Tóth K, Juhász C, Temesvári M, Paulik J, Hirka G, et al. Is CYP2D6 phenotype predictable from CYP2D6 genotype? *Microchem J.* 2018;136:209–14.
 152. Cresteil T, Monsarrat B, Alvinerie P, Tréluyer JM, Vieira I, Wright M. Taxol metabolism by human liver microsomes: Identification of cytochrome P450 isozymes involved in its biotransformation. *Cancer Res.* 1994;54(2):386–92.
 153. Bergmann TK, Brasch-Andersen C, Gréen H, Mirza M, Pedersen RS, Nielsen F, et al. Impact of CYP2C8*3 on paclitaxel clearance: A population pharmacokinetic and pharmacogenomic study in 93 patients with ovarian cancer. *Pharmacogenomics J.* 2011;11(2):113–20.
 154. Lee M-Y, Appelániz-Ruiz M, Johannson I, Vikingsson S, Bergmann TK, Brøsen K, et al. Role of cytochrome P450 2C8*3 (CYP2C8*3) in paclitaxel metabolism and paclitaxel-induced neurotoxicity. *Pharmacogenomics.* 2015;16(9):929–37.
 155. Bosch TM, Deenen M, Pruntel R, Smits PHM, Schellens JHM, Beijnen JH, et al. Screening for polymorphisms in the PXR gene in a Dutch population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006;62(5):395–9.
 156. van Eijk M, Boosman RJ, Schinkel AH, Huitema ADR, Beijnen JH. Cytochrome P450 3A4, 3A5, and 2C8 expression in breast, prostate, lung, endometrial, and ovarian tumors: relevance for resistance to taxanes. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2019;84:487–99. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00280-019-03905-3>
 157. Yu LJ, Matias J, Scudiero DA, Hite KM, Monks A, Sausville EA, et al. P450 enzyme expression patterns in the NCI human tumor cell line panel. *Drug Metab Dispos.* 2001;29(3):304–12.
 158. De Conti G, Dias MH, Bernards R. Fighting drug resistance through the targeting of drug-tolerant persister cells. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Mar

- 5;13(5):1118. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/5/1118>
159. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med* [Internet]. 2020;22(2):245–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41436-019-0686-8>
 160. Cantsilieris S, Baird PN, White SJ. Molecular methods for genotyping complex copy number polymorphisms. *Genomics* [Internet]. 2013;101(2):86–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.10.004>
 161. Lim ZF, Ma PC. Emerging insights of tumor heterogeneity and drug resistance mechanisms in lung cancer targeted therapy. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):1–18.
 162. van Dijk E, van den Bosch T, Lenos KJ, El Makrini K, Nijman LE, van Essen HFB, et al. Chromosomal copy number heterogeneity predicts survival rates across cancers. *Nat Commun* [Internet]. 2021;12:3188. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-23384-6>
 163. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010;463(7283):899–905.
 164. Han X, Tan Q, Yang S, Li J, Xu J, Hao X, et al. Comprehensive profiling of gene copy number alterations predicts patient prognosis in resected stages I–III lung adenocarcinoma. *Front Oncol* [Internet]. 2019 Aug 6;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.00556/full>
 165. Turner AP, Alam C, Bendayan R. Efflux transporters in cancer resistance: Molecular and functional characterization of P-glycoprotein. In: Sosnik A, Bendayan R, editors. *Drug Efflux Pumps in Cancer Resistance Pathways: From Molecular Recognition and Characterization to Possible Inhibition Strategies in Chemotherapy* [Internet]. Elsevier; 2020. p. 1–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816434-1.00001-2>
 166. Qixing M, Juqing X, Yajing W, Gaochao D, Wenjie X, Run S, et al. The expression levels of CYP3A4 and CYP3A5 serve as potential prognostic biomarkers in lung adenocarcinoma. *Tumor Biol*. 2017;39(4):1–11.

167. Hofman J, Vagiannis D, Chen S, Guo L. Roles of CYP3A4, CYP3A5 and CYP2C8 drug-metabolizing enzymes in cellular cytostatic resistance. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2021;340:109448. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109448>
168. Nallani S, Goodwin B, Buckley A, Buckley D, Desai P. Differences in the induction of cytochrome P450 3A4 by taxane anticancer drugs, docetaxel and paclitaxel, assessed employing primary human hepatocytes. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2004 Sep 3;54(3):219–29. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00280-004-0799-9>
169. Tolson AH, Wang H. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2010;62(13):1238–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.006>
170. Liu F, Zhang G, Lv S, Wen X, Liu P. miRNA-301b-3p accelerates migration and invasion of high-grade ovarian serous tumor via targeting CPEB3/EGFR axis. *J Cell Biochem*. 2019;120(8):12618–27.
171. Xiao J, Hu CP, He BX, Chen X, Lu XX, Xie MX, et al. PTEN expression is a prognostic marker for patients with nonsmall cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis of the literature. *Oncotarget*. 2016;7(36):57832–40.
172. Wang L-H, Wu C-F, Rajasekaran N, Shin YK. Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: An overview. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2018;51(6):2647–93. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/495956>

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. Disszertációhoz kapcsolódó publikáció

Incze E., Mangó K., Fekete F., Kiss Á. F., Póti Á., Harkó T., Moldvay J., Szüts D., Monostory K. (2023). Potential association of cytochrome P450 copy number alteration in tumour with chemotherapy resistance in lung adenocarcinoma patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (17), 13380
IF:5,6

10.2. Disszertációtól független publikációk jegyzéke

Déri M., Szakál-Tóth Z., Fekete F., Mangó K., **Incze E.**, Minus A., Merkely B., Sax B., Monostory K. (2021). CYP3A-status is associated with blood concentration and dose-requirement of tacrolimus in heart transplant recipients. *Scientific Reports* 11:1, 21389
IF: 4,997

Fekete, F., Mangó, K., Déri, M., **Incze, E.**, Minus, A., Monostory, K. (2021). Impact of genetic and non-genetic factors on hepatic CYP2C9 expression and activity in Hungarian subjects. *Scientific Reports* 11:1, 17081
IF: 4,997

Kiss, Á., Menus, Á., Tóth, K., Déri, M., Sirok, D., **Gabri, E.**, Belic, A., Csukly, G., Bitter, I., Monostory, K. (2020). Phenoconversion of CYP2D6 by inhibitors modifies aripiprazole exposure. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 270: 1 pp. 71-82
IF:5,276

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk összesített impakt faktora: **5,6**

A disszertációtól független publikációk összesített impakt faktora: **15,27**

A megjelent első és társszerzős publikációk összesített impakt faktora: **20,87**

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni és hálámat kifejezni elsősorban témavezetőmnek, Dr. Monostory Katalinnak, hogy lehetőséget kaptam e munkában való részvételre, valamint a disszertációm megírása során nyújtott folyamatos szakmai tanácsaiért és segítségéért, amelyekkel ellátott és megmutatta milyen egy kutatói csoporthoz tartozni, végezetül pedig azt, hogy infrastrukturális háttérrel biztosított kutatómunkámhoz.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Gyógyszertudományok és Egészségügyi Technológiák Tagozatának és vezetőjének Dr. Zelkó Románának, továbbá az Experimentális és klinikai farmakológia program vezetőjének Dr. Szökő Évának, hogy intézményükben tanulhattam és végezhettem el PhD tanulmányaimat.

Köszönetem szeretném kifejezni az Országos Korányi Pulmonológia Intézet munkatársainak a klinikai minták biztosításáért, valamint köszönöm Dr. Moldvay Judit és Dr. Harkó Tünde segítségét a minták rendelkezésünkre bocsátásában és a felmerülő kérdések készséges megválaszolásában.

Köszönettel tartozom Dr. Szüts Dávidnak és Dr. Póti Ádámnak a teljes genom szekvenálással rendelkező betegminta adatainak feldolgozásában és rendelkezésünkre bocsátásában, amely lehetővé tette mérésünk validálását.

Szeretném megköszönni a Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoport volt és jelenlegi tagjainak segítségét, észrevételeiket, amelyekkel munkám során elláttak, különösen hálás vagyok Dr. Tóth Katalinnak, Dr. Kiss Ádám Ferencnek, Dr. Déri Máténak, hogy kérdéseimet feltehettem és megválaszolták, valamint Fekete Ferencnek és Varga Katalinnak, Sándor Alexandrának munkám során nyújtott segítségükért. Köszönöm Dr. Szabéni Kornéliának segítségét, ötleteit, iránymutatásait.

Köszönöm Dr. Szeri Flórának, hogy a munkahelyi vita alkalmával elvállalta disszertációm bírálatát és hasznos javaslatokkal látta el.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm férjemnek, családomnak és barátaimnak a temérdek bátorítást és támogatást, amelyet az elmúlt időszakban nyújtottak. Örökké adós maradok feléjük hálámmal és szeretetemmel.