

A *PSMB7* gén mint a doxorubicinnal szembeni rezisztencia prognosztikus markere az emlőrák terápiájában

Doktori értekezés

Munkácsy Gyöngyi

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Györffy Balázs, tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Barta Péter, egyetemi tanársegéd, Ph.D.

Dr. Mersich Tamás, főorvos, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tóth Miklós, egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Herszényi László, egyetemi docens, az MTA doktora

Dr. Tóth László, osztályvezető főorvos, Ph.D.

Budapest
2011

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	6
1. A kemoterápia	6
1.1. A kemoterápia hatásmechanizmusa	6
1.2. A kemoterápia mellékhatásai.....	8
2. Kemorezisztencia kialakulása	9
2.1. Az intracelluláris koncentrációt csökkentő mechanizmusok	11
2.2. A gyógyszer-célmolekula interakción alapuló mechanizmusok.....	14
2.3. A celluláris válasz megváltozása	14
3. A doxorubicin.....	16
3.1. Hatásmechanizmusa	16
3.2. Alkalmazása	17
3.3. Doxorubicinnal szembeni kemorezisztencia	18
4. Az emlőrák és markerei.....	19
4.1. Az emlőrák klinikailag alkalmazott biomarkerei	20
5. Microarray	22
5.1. Génexpressziós mintázat a multidrog-rezisztencia vizsgálatában	24
6. RNS interferencia	25
6.1. Mechanizmusa.....	25
6.2. Az RNSi élettani működése	27
6.3. RNSi vizsgálatok	28
6.4. RNSi a klinikai gyakorlatban.....	31
6.5. Az RNSi -alapú terápia nehézségei.....	32
7. Proteaszóma	33

CÉLKITŰZÉSEK	36
1. In vitro vizsgálat rákos sejtvonalakon.....	36
2. In silico vizsgálat emlőrákos betegeken.....	37
MÓDSZEREK	38
1. Sejtvonalak	38
2. A gyógyszerre való szenzitivitás megállapítása	39
3. RNS izolálás.....	39
4. Array hibridizáció.....	40
5. Adatok feldolgozása, szignifikáns gének azonosítása.....	41
6. További in silico analízisek	43
7. Immunhisztokémia	43
8. siRNS oligok tervezése, szintetizálása	44
9. Az siRNS oligok hatékonyságának vizsgálata	47
10. Transzfekció és gyógyszeres kezelés	48
11. Doxorubicin autofluoreszcenciája	50
12. A gén jelentőségének igazolása klinikai mintákon	51
EREDMÉNYEK	52
1. A doxorubicin autofluoreszcenciája	52
2. A sejtek doxorubicinnal szembeni rezisztenciájának igazolása	52
3. Gének azonosítása.....	53
4. Proteaszóma alegységek prognosztikus jellege.....	55
5. A sejtek túlélése a géncsendesítés és doxorubicin-kezelés után.....	55
6. PSMB7 gén mint biomarker klinikai mintákon	57
MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	61
ÖSSZEFOGLALÁS	66
SUMMARY	67
SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	68
IRODALOMJEGYZÉK	69
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	93

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5-FU = 5-fluorouracil

ABC = ATP-kötő kazetta transzformer fehérjék

ALS = amiotrofikus laterális szklerózis

AMD = időskori makuladegeneráció

ATP = adenzin trifoszfát

β -ME = beta-merkaptóetanol

bp = bázispár

cDNS = komplementer DNS

CHS = chalcon-szintetáz

cRNS = komplementer RNS

D3T = 3H-1,2-ditiol-3-tion

DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol

DOX = doxorubicin

dsRNS = kettősszálú RNS

EGFR = epidermális növekedési faktor receptor

ER = ösztrogén receptor

ER+/- = ösztrogén receptor pozitív/negatív beteg

FAC = 5-FU, epirubicin és ciklofoszfamid kezelések kombinációja

FCS = magzati borjú szérum

FDR = téves elfogadási arány

FISH = fluoreszcens in situ hibridizáció

HER2 = human epidermális növekedési faktor receptor 2-es típus

HPLC = magasnyomású folyadék kromatográfia

HT29PAR = szenzitív HT-29 sejtvonala

HT29RDB = daunorubicin-rezisztens HT-29 sejtvonala

IFNG = γ -interferon

IHC = immunhisztokémia

kDa = kilodalton

miRNS = mikroRNS

mRNS = hírvivő RNS

MCF-7 = parentális emlőrák sejtvonal
MCF-7-RAdr = doxorubicin-rezisztens MCF-7 sejtvonal
MDR = multidrog rezisztencia
MTT = 3-[4, 5-dimetiltiazolil-2]-2, 5-difeniltetrazolium bromid
NER = nukleotidok kivágását javító molekula
PAM = Prediction Analysis for Microarrays
PBS = foszfát pufferelt sóoldat
P-gP = p-glikoprotein
PKR = protein-kináz
PR = progeszteron-receptor
PR+/- = progeszteron receptor pozitív/negatív beteg
PSMB7 = a proteaszóma béta 7 alegysége
PTGS = poszttranszkripció génelcsendesítés
RISC = RNS-indukált elcsendesítő komplex
RMA = Robust Multichip Average
RNA, RNS = ribonukleinsav
RNSi = RNS interferencia
rpm = percenkénti fordulatszám (round per minute)
RSV = respirációs szinciciális vírus
siRNS = rövid interferáló RNS
shRNS = short hairpin RNS
TOP2A = topoizomeráz 2A enzim
TFBS = transzkripció faktor kötőhely
UPS = ubikvitin-proteaszóma útvonal
VEGFR = vaszkuláris endoteliális növekedési faktort kötő receptor

BEVEZETÉS

A rosszindulatú daganatok okozta megbetegedések világszerte listavezetők a halálozási okok között. Az Egyesült Államokban és más fejlett országokban évente a lakosság kb. 0,5%-át diagnosztizálják rákkal, és az összes haláleset kb. 25%-áért felelősek a különböző rákbetegségek (1). Az újonnan felfedezett összes daganatos megbetegedések száma Magyarországon évi 66 ezer körül van, és évente 33-34 ezren halnak meg rákban. A szolid tumorok kezelésében elsődleges szempont a mielőbbi felismerés és orvoshoz fordulás, ami hatékony szekunder prevenciót és magas szenzitivitású és specificitású diagnosztikus eljárásokat követel. A daganat típusa, kiterjedése, lokalizációja, patológiai és molekuláris státusza valamint a beteg életkora és általános állapota határozza meg a terápia típusát. A későn felismert tumorok limfogén és hematogén úton metasztatizálhatnak, ami megnehezíti a hatékony kezelést.

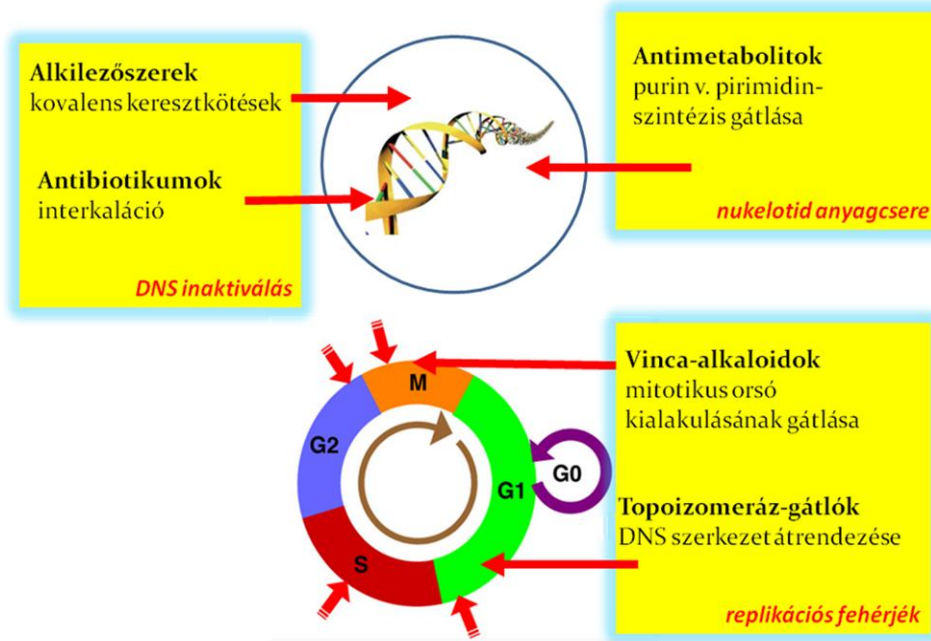
1. A kemoterápia

Napjainkban a rákos megbetegedésben szenvedőknél alkalmazott, tudományosan megalapozott kezelési eljárások a *sebészet*, a *besugárzás*, a *kemoterápia* és az *immun- és/vagy célzott terápia*. Ezek a kezelési módok az egyes betegeknek egyedileg vagy kombinált formában kerülnek alkalmazásra. Mi ezek közül a kemoterápiával foglalkoztunk.

1.1. A kemoterápia hatásmechanizmusa

A citotoxikus kemoterapeutikumok hatásmechanizmusának alapja, hogy a gyorsan osztódó sejteket szelektíven pusztítják. Közös ezekben a szerekben, hogy a normál szöveti sejtekre is hatnak és nem specifikusak a tumoros sejtekre. Így nagymértékű nem kívánt mellékhatás lép fel leginkább a csontvelő és a gasztrointesztinális sejtekben az antitumorális hatás mellett, így adásuk csak egy rövid ideig tolerálható a szervezet számára.

A citotoxikus szerek a sejtciklust és a replikációt gátolják különböző támadáspontokon, amelyeket az 1. ábra foglal össze.



1. ábra: Citotoxikus szerek hatástan szerinti csoportjai. Az alkilezőszerek és antibiotikumok a DNS inaktiválása révén fejtik ki hatásukat, az antimetabolitok a nukleotid anyagcserére hatnak a purin- vagy pirimidinszintézis gátlása révén. A vinka-alkaloidok és topoizomeráz-gátlók a replikációs fehéjék támadásával a sejtciklust különböző támadáspontokon gátolva megakadályozzák annak normális lefolyását.

A DNS szintézisét gátló antimetabolitok (5-fluorouracil, metotrexát, merkaptopurin) a nukleotid anyagcserén keresztül gátolják a DNS szintézist, ami létfontosságú a sejtek proliferációjához. Az alkiláló ágensek (ciklofoszfamid, melfalan, karmusztin) és a DNS transzkripciót és transzlációt interkalálással gátló antibiotikumok (ciszplatin, karboplatin, aktinomicin-D) a DNS-t inaktíválják. A mitózisban a mitotikus orsón ható vinka-alkaloidok (taxánok és vinkrisztinek) a tumoros sejtek replikációjának gátlásával akadályozzák meg a sejtciklus folyamatosságát. Egyes szerek szintén a sejtciklusra hatnak a topoizomeráz gátlása révén, (TOP2 gátlás: doxorubicin, daunorubicin; TOP1 gátlás: Irinotecan) azonban a pontos hatásmechanizmusuk még nem tisztázott. Az alábbi, 1. táblázat összefoglalja a különböző támadásponton ható kemoterapeutikumokat.

1. táblázat: Különböző támadáspontú szerek csoportjai és tagjai.

<u>Alkilálószer</u>	<u>Antimetabolitok</u>	<u>Antibiotikumok</u>	<u>Vinka-alkaloidok</u>	<u>Topoizomeráz gátlók</u>
Platina vegyületek: Cisplatin Carboplatin	Folsav-antagonisták Methotrexat	Actinomycin-D	Vinka-alkaloidok Vincristin Vinblastin	Camptothecin-származékok: Irinotecan
Diazometánok: Procarbazin Dacarbazin	Antipirimidinek 5-Fluorouracil Cytarabin	Bleomycin		Antraciklinek: Doxorubicin Daunorubicin
Alkilszulfonátok: Busulphan	Antipurinok Mercaptopurin Thioguanin	Mitomycin	Taxánok Paclitaxel Docetaxel	Etopozid
Nitozouerák: Stretozotocin		Mitoxantron		
Chlorambucil				
Cyclophosphamid				
Estramustin				
Melphalan				
Mustárnitrogén				

1.2. A kemoterápia mellékhatásai

A szervezet egészére ható tulajdonságuk miatt e szerek legfontosabb mellékhatásai a hányás, hajhullás, neuropátia, anémia, neutropénia, trombocitopénia és egyes szereknél a kardiotoxicitás is. Bár a leggyakoribb mellékhatásként fellépő hányinger tüneti kezelésére ismertek hatásos szerek, ezek beszedése további mellékhatások jelentkezését is indukálhatja (2). Mivel a szervezetünkben a csontvelősejtek, az emésztőtraktus (szájüreg, nyelőcső, gyomor, bél) nyálkahártyájának sejtjei, valamint az ivarszervek (petefészek, ill. here), továbbá a szőrtüszők és hajhagymák sejtjei azok, amelyek folyamatosan, gyorsan szaporodnak, így a kemoterápiás kezelése során az egészséges sejtek közül elsősorban ezek károsodnak. A mellékhatások és a megjelenő kemorezisztencia egyaránt arra készítetik az onkológusokat, hogy új, komplex, személyre szabott onkoterápiás protokollokat alakítsanak ki.

2. Kemorezisztencia kialakulása

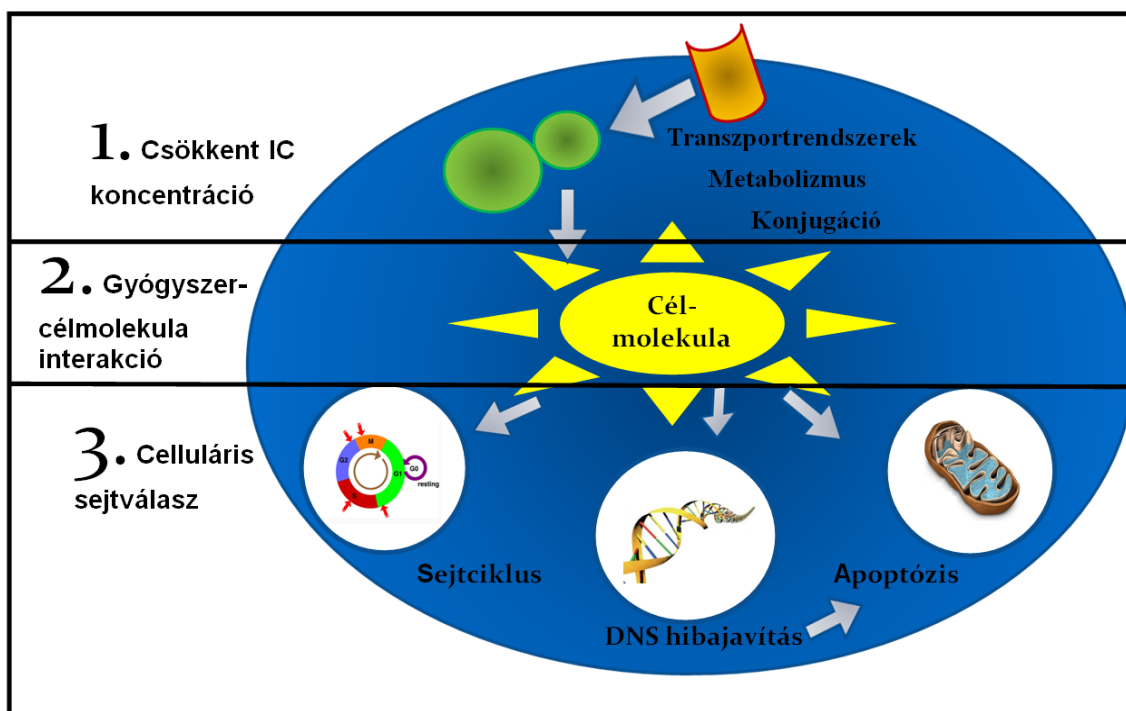
A rákos megbetegedések eredménytelen kezelésének hátterében a tumorsejtek által örökölt (primer rezisztencia), ill. a kemoterapeutikum hatására kialakuló rezisztencia (szerzett rezisztencia) állhat (3). A tipikus forgatókönyv szerint egy tumorban a 10^6 – 10^7 ráksejtből 1 sejt feltehetőleg primer rezisztenciával rendelkezik egy bizonyos gyógyszerrel szemben. A klinikailag már detektálható tumor 10^9 sejtől áll, amely így 10–1000 gyógyszerre rezisztens sejtet tartalmaz. Ez már képes arra, hogy a szenzitív sejtek pusztulása ellenére újraképezze a tumort (4). A tumorsejtek heterogenitása, párosulva azok magas mutációs rátájával, mind hozzájárulnak a gyógyszerrezisztens klónok rendkívül gyors szelekciójához.

A kemoterapeutikumokkal szembeni rezisztencia gyors kialakulása jelentősen megnehezíti a daganatos betegek hatékony kezelését. A kemorezisztencia többtényezős jelenség (5, 6); szerzett rezisztencia kialakulásánál a tumor számos, más útvonalon ható gyógyszerrel szemben is rezisztenssé válhat (7-9). A rezisztencia mechanizmusok megismerésére és az azokat gátló szerek fejlesztésére sok vizsgálat irányult (10). Napjainkra számos rezisztenciamechanizmust azonosítottak, beleértve az ABC-transzporter tagjainak felülexpresszióját, mint pl. a P-glikoproteint (ABCB1), a multidrog rezisztenciával-összefüggésbe hozott MRP1 és MRP2 fehérjét, valamint a mitoxantron-rezisztencia fehérje/emplőrák rezisztencia fehérjét (11). A gyógyszerrezisztencia a sejt belső védekezőmechanizmusainak sérülésével is bekövetkezhet, így akadályozva az apoptózis létrejöttét. A programozott sejthalál kiesését okozó tumorelleses gyógyszerek hatásukat a DNS károsodását jelző útvonal szabályozóinak (mint a p53 és bcl-2) megtörésén keresztül fejtik ki.

Kemorezisztencia kialakulásában három celluláris mechanizmust különíthetünk el, amelyek a következők:

1. az intracelluláris gyógyszer koncentrációt csökkentő,
2. gyógyszer célmolekula interakción alapuló, és
3. celluláris válaszon alapuló folyamatok.

A három mechanizmust a 2. ábra foglalja össze, emlőrákban előforduló példáit a 2. táblázat ismerteti.



2. ábra: A kemorezisztencia kialakulásának celluláris mechanizmusai. A kemorezisztencia egyrészt bekövetkezhet a citoplazmában csökkent gyógyszerkoncentrációt okozó nagyobb efflux vagy a csökkent influx révén; másodsorban a gyógyszer-célmolekula csökkent interakciójával; harmadrészt pedig a fokozott celluláris sejtválasszal.

2. táblázat: A gyógyszerrel szembeni rezisztencia mechanizmusai emlőráknál (12, 13).

Rezisztencia mechanizmusok	Példák
Transzportrendszerek	ABC transzporterek: P-glikoprotein, MDR1(BCRP), MRP1
Célmolekula megváltozása (mennyiségi, minőségi)	Dihydrofolát reduktáz, EGFR; C-KIT mutációk; tubulin
Gyógyszermetabolizmus/inaktiváció	Citokróm P450; glutation S-transzferáz; aldehyd-dehidrogenáz
DNS repair/genom instabilitás	Mismatch repair fehérjék; kaspázok, PTEN; p27; mikroszatellita instabilitás, topoizomeráz I, topoizomeráz II
Apoptózis szabályozói	p53; PTEN; Bcl-2, Bcl-x

2.1. Az intracelluláris koncentrációt csökkentő mechanizmusok

A sejtekbe bekerülő gyógyszer intracelluláris koncentrációja csökkenthető a transzport mechanizmusok által az influx csökkenése vagy az efflux növekedése révén, a glutation konjugáció segítségével, valamint a metabolizmus és a szubcelluláris disztribúció változása által.

1. **Az efflux pumpák felülexpressziója.** A kemorezisztencia leggyakoribb oka a sejtekből az idegen, toxikus anyagok eltávolítását okozó MDR (multidrog rezisztencia) *efflux pumpák aktivációja*, amelyek a tumorsejtekből eltávolítják a kemoterápiás szereket. Az MDR multidrog transzporterek az ATP függő ABC fehérjék szupercsaládjához tartoznak. Energiafüggő fehérjék, amelyek a sejtmembránban elhelyezkedve aktívan pumpálják ki a gyógyszereket, ezáltal csökkentve azok intracelluláris koncentrációját és ezáltal a citotoxicitást (3). Ismert, hogy nemcsak a tumorelles szereket, hanem pl. az antituberkulotikumokat (14) és a malária ellenes gátló szereket (15) is kipumpálják a sejtekből. A kemoterapetikumok kiváltotta redox szignálok a sejteken a pumpák számának és aktivitásának növekedését okozzák a transzporterek konformációjának megváltoztatásával, a bioszintézisükhöz szükséges kofaktorok és a transláció, poszttranszlációs és epigenetikai változások regulációja, valamint a kódoló gének amplifikációja révén (16). Az alábbiakban az ismertebb efflux pumpák képviselőit ismertetem.

P-glikoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1).

A multidrog rezisztencia(egyszerre több szerrel szembeni rezisztencia) széles körben vizsgált kulcsmolekulája (17). A P-gp-t egy 170 kDa glikoprotein, az MDR1 gén kódolja. Ez az ATP-függő membrán transzporter kipumpálja az antraciklineket, taxánokat, vinka-alkaloidokat, epipodofillotoxinokat és antifolatokat. A P-gp normál élettani szerepéről ismert, hogy a normál szövet védelméül szolgál a toxikus termékekkel és xenobiotikumokkal szemben (13). Leukémiás betegek esetében találtak olyan átrendeződést a MDR1 génen, amelynek hatására a gén expressziója megnőtt és kemorezisztencia alakult ki (18). Egy meta-analízis szerint az összes emlőrák 40%-ában expresszálódik (19), de elérheti a 66%-ot is (20). A kemoterápiának való kitettség növelheti a P-gp expresszióját emlőrákban, ahogyan azt neoadjuváns kemoterápiát kapott betegeknél is tapasztalták (21). Egy meta-analízisben, a kemoterápia vagy

hormonális terápiát követően a P-gp-pozitív tumorok aránya közel 1,8-szorosára nőtt. Ezt a megnövekedett P-gp expressziót hozták összefüggésbe a kemoterápia sikertelenségének háromszorosára növekedésével (19). A P-gp expressziója tehát ebben és más tanulmányban is (22) a terápiára adott válasz kedvezőtlen lefolyását jelezheti, bár más esetekben hasonló összefüggést nem találtak (20, 23).

MRP1 (MDR related protein).

Az MRP1 az ABC transzporter családkhoz tartik 8 ismert taggal (MRP1-8), amelyek mindegyike más szöveti eloszlást és drog transzport specificitást mutat. A normál szöveti sejtekben is jelen vannak. Tumorokban kimutatták az MRP1-t az arzenit, az MRP2-t a ciszplatin és az MRP4-t a nukleozid analóg vírusellenes szerekkel szembeni rezisztencia háttérében (24). RT-PCR-rel történt vizsgálat szerint az emlőrákok közel felében expresszálódik (12). Az MRP1 a vinka-alkaloidokkal, antraciklinekkel és magas-dózisú metotrexátokkal szembeni rezisztenciát okozhatja. Néhány tanulmány szerint az MRP1 expressziója a kemoterápiát kapott, korai stádiumú betegek rossz túlélési esélyeivel korrelál, de az összefüggés egyelőre nem tisztázott (25).

BCRP (breast cancer resistance protein)

Az ABCG2 gén kódolta BCRP minden sejtben a xenobiotikumok kipumpálásáért felelős ABC transzporter. Kemorezisztens tumoros sejtvonalakban ennek felülexpresszióját tapasztalták (26). Összefüggésbe hozható a mitoxantronnal, antraciklinekkel, metotrexáttal és topoizomeráz I inhibitorokkal szembeni rezisztenciával. A BCRP-mediálta rezisztencia a P-gp-mediálta kemoterápiához hasonló mintázatot mutat. Ez a transzporter a tumor őssejtek markere és valószínűleg a hipoxia elleni védelemben játszik szerepet (27, 28).

LRP (lung resistance-related protein)

Több különböző eredetű, nem MDR1 asszociált rezisztencia háttérében az LRP (lung resistant protein) vagy major vault protein (MVP) megnövekedett expresszióját találták. A legnagyobb alkotóeleme a sejt szilárdító rendszerének. Több alegységből álló sejtalkotó, amelynek fontos feladata van az intracelluláris transzportban a mikrotubulusokon és aktinfilamentumok mentén (29). LRP/MVP megnövekedett expresszióját tapasztalták számos tumorban és sejttípusban kemoterápiás szerekkel történő kezelést követően, és P-gp-független MDR-ként írták le (30). A fehérje számos humán tumortípusban felülexpresszált és rezisztenciát okozhat kemoterápiával szemben

tüdő-, petefészekrák, vastagbél-, veserák és hasnyálmirigyrák, valamint hererák, neuroblasztóma, multiple mieloma, és akut mieloid leukémia esetén (30). Számos olyan tanulmány létezik, amelyben az emlőrák prognózisa és LRP expresszió között nem találtak összefüggést (31, 32). Ennek ellenére az LRP/MVP és MDR1 együttes expresszióját rossz progressziómentes túléléssel hozták összefüggésbe 5-FU, epirubicin és ciklofoszfamid (FAC) kezelést követően (22), és mint az axilláris nyirokcsomó inváziójának prediktorát azonosították előrehaladott emlőrákos betegeknél kemoterápiás kezelés után (33). Petefészek és akut mieloid leukémia esetében az LRP expressziója szignifikánsan korrelált a platina bázisú kemoterápia hatásosságával (34). További vizsgálatok szükségesek, hogy az LRP szerepére fény derüljön az emlőrákos betegek gyógyszerrel szembeni rezisztenciájának kialakulásában.

2. A gyógyszer farmakokinetikájában és metabolizmusában bekövetkező változások. A xenobiotikumokat (pl. kemoterápiás szerek) *metabolizáló enzimek* megnövekedett vagy megváltozott expressziója növeli a kemoterapeutikumok konjugált, kiválasztható vagy a hatástalanított mennyiségét. Petefészekdaganatos sejtek esetében a dihidrodiol-dehidrogenáz megnövekedett expresszióját mérték (35). Az Irinotecan esetében a szer aktív metabolitját bontó UGT1A1 (uridine diphosphate glucuronosyl transferase) enzimet kódoló gén polimorfizmusa esetén a szer hatékonysága lecsökkent és toxikussága megnőtt (36).

3. Glutation-mediálta rezisztencia. Ismert, hogy a *glutation* és glutationfüggő enzimrendszer a kemoterapeutikumokat konjugációval inaktiválja, a redox állapotot modulálja, a transzport rendszereket, a jelátviteli útvonalakat és a repair mechanizmusokat aktiválja, ami szerepet játszhat a kemorezisztencia kialakulásában (37). Ez a tiol-tartalmú tripeptid spontán vagy GST által katalizálva reakcióba tud lépni elektrofil komponensekkel, ezáltal nélkülözhetetlen faktor a szabadgyökök eltávolításában és a peroxidázok csökkentésében a glutation peroxidázok révén. Változó, de legtöbbször magas koncentrációban van jelen a különböző sejtípusokban (akár 10 mM), a sejt redox státuszának kritikus mediátora (37). MCF-7-RAdr emlőrákos rezisztens sejtvonalakon megnövekedett glutationszintézist mutattak ki (38). Bizonyos, hogy a glutation homeosztázis megváltozása számos sejtfunkcióra hatással van, beleértve a transzkripció faktorok, mint pl. AP-1 és NFkB (39) valamint az enzimek (pl. protein kináz C) aktivitását is (40).

2.2. A gyógyszer-célmolekula interakción alapuló mechanizmusok

1. **A kemoterápia célpontjául szolgáló molekula koncentrációja csökken.** A megváltozott szint miatt a megfelelő mennyiségben sejtbe kerülő gyógyszer mégsem tudja a hatását kifejteni. A topoizomeráz gátlók esetében a célmolekula topoizomeráz csökkent expresszióját találták rezisztens sejtvonalakon (41).

2. **Mikrotubulusok szerkezetének megváltozása.** A mikrotubulus-gátló vinkaalkaloidok és taxánok esetében a kemorezisztencia egyik oka lehet a megváltozott mikrotubulus szerkezet, ami miatt ezeknek a szereknek a kötődése nehezített, így hatásukat nem tudják kifejteni (42). Számos mikrotubulus-gátlóra rezisztens rákos sejtvonalban és xenograftban a β -tubulin izotípusok eltérő expresszióit találták, amit ezek után a tubulin-kötő gyógyszerekkel szemben tapasztalt primer vagy szerzett rezisztencia okának tekintenek a klinikumban számos tumornál (43). *In vitro* körülmények között a β III alegység felülexpressziója paklitaxel rezisztenciát okoz valószínűleg azért, hogy a paklitaxel kevésbé tud kötődni a β III-tubulinhoz, ami így a mikrotubulus dinamikájának megbomlásához vezet (44). A tubulin pszeudogének összehavartsága következtében kialakult ilyen mutációknak a klinikai jelentősége egyelőre nem tisztázott (45). Klinikailag a β III-felülexpresszió markerként szolgálhat a paklitaxel-rezisztenciához előrehaladott emlőráknál (46).

2.3. A celluláris válasz megváltozása

A celluláris válasz megváltozása is rezisztenciát eredményezhet. A sejtciklus, a DNS repair rendszer vagy az apoptotikus útvonalakban létrejövő változás akár inaktíváló, akár aktiváló mutációk révén csökkentheti a szerek hatékonyságát.

1. **Fokozott DNS-repair.** A DNS interkaláció révén ható ciszplatin ellen egyes tumorok a szer által képzett adduktokat eltávolító és a *DNS károsodást javító mechanizmusokat* hoznak működésbe a DNS repair rendszerének indukálásával (47). Egy másik csoport kutatása szerint a DNS repair rendszerben a NER (nucleotide excision repair) proteinkomplex egyik kulcs génjének az XPD-nek a felülexpressziója a sejtvonalakon korrelál az alkiláló szerekkel szembeni rezisztenciával (48). Az alkiláló szerekre rezisztens glioma sejteknél az endonukleáz (repair során rossz

bázisok kivágása után működésbe lépő enzim) hibajavító aktivitásának megváltozását találták (49). Különböző ciszplatin rezisztens sejtvonalon megfigyelték, hogy a mismatch repair rendszer hiánya miatt a DNS károsodás felismerésének gátoltsága miatt nem következett be sejthalál (50). Azoknak a géneknek a csendesítése, amelyek gátolják a mitózis szabályozóit, sejtvonalakban paklitaxellel szembeni rezisztenciához vezettek (51). A DNS repair fehérje ERCC1 (excision repair cross-complementing protein) szintjének emelkedését írták le, amikor a tumor karboplatinra rezisztenssé vált (47).

2. Az apoptotikus útvonalak zavara. A rezisztencia e típusa hatással van szinte az összes rákellenes szerre. Növeli a túlélő mutáns sejtek arányát, amely a tumor nagyobb heterogenitásához vezet. A p53, apoptózist mediáló molekula mutációja humán daganatokban igen gyakran kimutatható. Ezekben a tumorokban a DNS károsító szerekekkel szembeni rezisztenciát is megfigyelték (52), hisz a p53 hiány esetén kiesik a károsodott DNS szintézis gátlása. A p53 megváltozott működése esetén általában multidrogrezisztencia következik be (53), mert az apoptózisban betöltött központi szerepe miatt a károsodott sejtek túlélését megakadályozó fontos mechanizmus sérül. Mások az apoptózis indukálásában fontos szerepet betöltő (bcl2/bax, H-Ras) molekula mutációja esetén is multidrogrezisztencia kialakulásáról számoltak be (54). Gorre és mtsai a Gleevec-kel szemben kialakuló rezisztencia hátterében egyes betegeknél a target molekulát kódoló gén mutációját találták. Olyan új molekula jött létre a kemoterapeutikumot kötőhely megváltozása miatt, hogy a szer által indukált apoptotikus kaszkádot a bcr-abl receptorok mutációs reaktiválódása hatástalanította (55). Általánosságban elmondható, hogy az apoptózisban szerepet játszó molekulák mutációja sok szerrel szembeni rezisztenciát hoz létre.

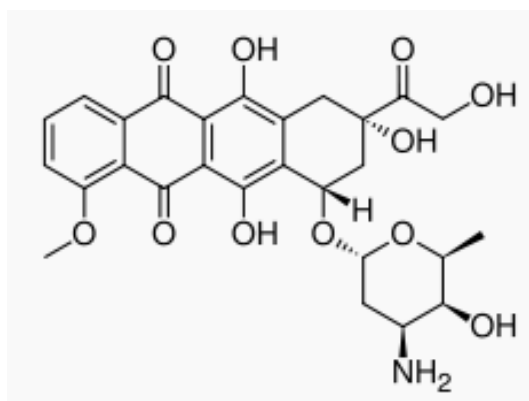
3. A sejtciklus megváltozása. Paklitaxellel szembeni kemorezisztens sejtvonalakban megfigyelték, hogy a mitózis szabályozóinak gátlásával rezisztencia alakult ki (51). Az emlőrákos páciensekben a tamoxifennel szemben kialakult rezisztencia esetében a tumor növekedése az ösztrogén stimuláció gátlását követően egy másik proliferációs jelre továbbra is indukálódott (56).

A kemorezisztencia kialakulása tehát több különböző, egyidejű és egymást erősítő mechanizmus révén jöhet létre. Az okok megértése hozzásegíthet a rezisztencia előrejelzéséhez, ami nélkülözhetetlen a klinikus számára a lehető leghatékonyabb

személyre szabott terápia alkalmazásához, valamint az új, hatékonyabb szerek kifejlesztéséhez.

3. A doxorubicin

A doxorubicin egy antraciklin-alapú antibiotikum. Szerkezetében ($C_{27}H_{29}NO_{11}$, 3. ábra) közel áll a természetes származék daunorubicinhez ($C_{27}H_{29}NO_{10}$), mely a *Streptomyces peucetius* nevű gomba által termelt vörös színű pigment, de terápiás hatékonysága jelentősebb. A doxorubicint jelenleg 4-féle néven forgalmazzák: Adriamycin, Doxil, Doxorubicin hydrochloride és Rubex. Mindegyiket intravénásan alkalmazzák. A szer a májban metabolizálódik és az epével ürül. Felezési ideje 12-18,5 óra (57). Aktív metabolitja a doxorubicinol.



3. ábra: A doxorubicin [(8*S*,10*S*)-10-(4-amino-5-hidroxi-6-metil-tetrahidro-2*H*-pirán-2-iloxi)-6,8,11-trihidroxi-8-(2-hidroxiacetyl)-1-metoxi-7,8,9,10-tetrahidrotetracén-5,12-dion] szerkezeti képe.

3.1. Hatásmechanizmusa

Bár számos különböző mechanizmus létezik, amiről úgy vélik, hogy az antraciklinek citotoxikus hatásának hátterében áll, az elsődleges mechanizmus minden bizonnyal a DNS bioszintézisének gátlása a topoizomeráz II kötésén keresztül, amely a sejtciklus S/G2 fázisban történő megrekedését okozza (58). Egy másik elképzelés szerint a doxorubicin megnöveli a topoizomeráz II okozta kettősláncú DNS-törést

magába foglaló steady-state állapot élettartamát. Ez lehetséges a törést létrehozó részreakció stimulálásával, vagy a törést később megszüntető részreakció gátlásával. Egyelőre nem ismert, hogy a doxorubicin melyik mechanizmussal éri el az élettartamnövelő hatását. A hosszabb életidejű kettős-törött DNS-láncot a sejten működő apoptotikus rendszerek hibaként detektálják és apoptózist indukálnak, így módon a topoizomeráz II-t DNS-károsító ágenssé alakítják. Lehetséges, hogy ez egy normálisan is működő mechanizmus, amit a doxorubicin mesterségesen felerősít, tehát a nemtumoros sejtekben is szerepe lehet a topoizomeráz II-nek az apoptózis megindításában (59). A fémionokkal való kelátképzés, valamint a reaktív szabadgyök-képzés is felmerült alternatív hatásmechanizmusként. A szer hátránya, hogy az apoptózist indukáló reaktív oxigén gyökök kialakulása (60) nemtumoros sejtekben is bekövetkezhet (59). A hatásmechanizmust illető hipotézisek egyelőre még nem bizonyítottak.

3.2. Alkalmazása

A doxorubicin már a '60-as évektől ismert antitumorális hatású szer, klinikai vizsgálatai (61) és a kombinált terápiás vizsgálatai a '70-es években folytak (62). Széles körben használják emlő-, petefészekrák, tüdő- és gyomorrák, pajzsmirigyrák, valamint limfóma és leukémia, Wilms-tumor, neuroblasztóma, húgyhólyagrák, csont- és lágy szöveti szarkómák kemoterápiájában (63). Az ún. „triple negative” (ER-, PR-, HER2-) emlőrákos betegek monoterápiaként vagy kombinációban antraciklin-alapú terápiát kapnak. A doxorubicin-tartalmú kombinációk a túlélési időt és a kemoterápiára adott válasz arányát tekintve is hatékonyabbnak bizonyultak abban az emlőrákos betegeket kutató vizsgálatban, amelyekben kombinált terápiákat hasonlítottak össze doxorubicint tartalmazó és attól mentes összeállításokban (64). A kezelés során a szükséges mennyiséget testfelületre számolják (m^2) és többféle módon osztható el: $75 \text{ mg}/m^2$ 3 hetente vagy $60 \text{ mg}/m^2$ csontvelőkárosodás esetén, vagy $25 \text{ mg}/m^2/\text{nap}$ 3 napon át, vagy $35 \text{ mg}/m^2/\text{nap}$ 2 napon át. Az utóbbi kettőnél a kezelések között 10 nap szünetet kell tartani.

Mellékhatásai közül a hányinger, hányás, alopecia (hajhullás), aritmiák, neutropénia a legjelentősebbek. Előfordulhat mielodiszplastikus szindróma,

mieloszuppresszió ill. májkárosodás. 550 mg/m² kumulatív dózis felett fokozott kardiotoxikus hatás érvényesül, kongesztív szívelégtelenség, dilatatív kardiomiopátia jöhet létre, esetleg hirtelen szívhalál következhet be (65). A betegek 0,4-9%-ában előforduló kardiomiopátia mortalitási aránya 61% (66).

3.3. Doxorubicinnal szembeni kemorezisztencia

Az antraciklinekkel szembeni rezisztenciát klinikailag úgy határozták meg, mint egy, az adjuváns, neoadjuváns vagy elsővonalbeli metasztázisos kezelés lezárását követő 6-12 hónap között visszatérő kórképet, vagy kezelés alatti tumorprogressziót ill. a metasztázis kezelésének utolsó adagját követően 3 hónapon belüli tumorprogressziót. Áttétes emlőrákos betegek sikertelen kezelésének >90%-áért felelős a gyógyszerrel szembeni rezisztencia (13). A rezisztens visszaeső vagy áttétes emlőrákos betegek, amint kimerítették az antraciklin és taxán lehetőségeket, más citotoxikus terápiákkal is próbálkozhatnak, de annak valószínűsége, hogy szignifikáns lesz a válasz, fokozatosan csökken (67, 68).

A rezisztencia minél pontosabb előrejelzése a doxorubicin széleskörű alkalmazása és a mellékhatásainak súlyossága miatt rendkívül fontos. A rezisztencia hátterében három lehetséges mechanizmus áll:

1. gátolt felvétel a sejtbe (endocitózis);
2. gátolt a transzportja a hatás helyére (a magba);
3. fokozott efflux a sejtől való kipumpálására;

A doxorubicin-rezisztencia hátterében már igazolt az idegen anyagokat a sejtől kipumpáló MDR fehérjék fokozott aktivitása, valamint a doxorubicin plazmában való felhalmozódása multidrogr-rezisztens sejtekben (69). Az antraciklinekkel szemben kialakuló rezisztencia okai lehetnek a sejt transzport fehérjéinek megnövekedett expressziója, génmutáció, β -III-tubulin felülexpressziója vagy a jelátviteli útvonalak fehérjéinek változása (5). A rezisztencia összefüggésben lehet a sejtben levő topoizomeráz II mennyiségével, és a hatásmechanizmus több eleme is számos gén befolyása alatt áll (70). A rezisztencia szignifikánsan korrelál a MAPK-aktivált monofoszfotirozin, a ciklin D2, a citokeratin 18, a ciklin B1 és a heterogén nukleáris ribonukleoprotein m3-m4 a csökkent expressziójával (71). Az oxidatív stresszel

szembeni védekezésben, és így a sejtek túlélésében szerepet játszó NRF2 transzkripciós faktorról petefészek tumor sejtvonalakban kimutatták, hogy a doxorubicinnal szemben rezisztens sejtvonalon szintje emelkedett a szerre szenzitív sejtvonalakhoz képest. A NRF2 aktivitása befolyásolhatja a doxorubicinnal szembeni kemorezisztenciát (72).

Diffúz nagy B sejt limfómák esetében az antraciklin-alapú kemoterápiára rezisztens és szenzitív sejtek összehasonlítása során a 14-3-3 fehérje család zéta izoformájának eltérő expresszióját figyelték meg. 14-3-3 zétáról ismert, hogy az antiapoptózist befolyásolja és kemorezisztenciáért felelős (vastagbél-, prosztata- és tüdőcarcinómák esetén). A szenzitív sejtekben alacsony, a rezisztens sejtekben magas expresszió volt mérhető, így felmerült a gátló vegyületeivel kombinált kemoterápia adása a rezisztenciát mutató diffúz nagy B sejt limfómák esetében (73). Egy másik kutató csoport eredményei szintén rezisztens és szenzitív sejtvonalak összehasonlítása során a TP3 útvonal és az NFkappaB útvonal aktivitásában talált eltérést. A TP3 útvonal a rezisztens sejtvonalakokat érintő mutáció miatt nem működött. A legrezisztensebbnek mutató sejtvonalak esetében az NFkappaB útvonal aktivitását észlelték, amit csökkentve a terápia bortezomibbal való kombinálásával, antraciklinekkel szembeni érzékenység nőtt. Az egyik sejtvonalon még a 2. kromoszóma hiánya is megfigyelhető volt, ami a kedvezőtlen kimenettel *in vivo* korrelációt mutat (74).

Emlő tumorsejtekben mért 8q22 amplifikáció a lizoszómális *LAPTM4B* és az antiapoptotikus *YWHAZ* gének felülexpresszióján keresztül okozhat az antraciklinekkel szembeni rezisztenciát. Li és mtsai *in vitro* *LAPTM4B* és *YWHAZ* géncsendesítéssel a sejteket antraciklinekkel szemben szenzibilizálni tudták. További megfigyelésük volt, hogy a neoadjuváns terápia során antraciklin-rezisztenciát mutató emlőrákos páciensek esetében ezek a gének felülexpresszálódtak. Ezek alapján a két gén felülexpresszióját mint az antraciklinekkel szembeni rezisztencia lehetséges előrejelzőit nevezték meg (75).

4. Az emlőrák és markerei

Az emlőrák a nők leggyakoribb daganatos betegsége. Az egész világon a nők összes daganatának 22%-a emlőrák, Magyarországon évente mintegy 7500 új megbetegedés fordul elő, és mintegy 2800 nő veszti életét évente a betegség

következtében. Az életkort figyelembe véve leginkább 30 éves kor fölött jelentkezik, 50-65 év között a leggyakoribb, az ezt követő években az előfordulása fokozatosan csökken. Az emlőrákban meghaltak száma korábban nőtt, a nyugati országokban ma már csökken. Magyarországon az utóbbi években a növekedés megállt, és a daganatos halálozás csökkenése is megkezdődött. A Nemzeti Rákregiszter adatai szerint ma Magyarországon az emlőrák felismerésétől a daganatos haláláig eltelt idő átlagosan több mint 14 évre becsülhető.

4.1. Az emlőrák klinikailag alkalmazott biomarkerei

A molekuláris szintű ismeretek jelentős része – a BRCA családon kívül – az ösztrogénnel és a HER2-vel kapcsolatos. Ezek köszönnek vissza a molekuláris alapú osztályozásokban is, amelyek a gyógyszerérzékenység előrejelzése (predikció) és a túlélési esélyek becslése (prognózis) terén próbálnak reálisabb információkat nyújtani. Manapság léteznek szoftverek (pl. Adjuvant!Online, www.adjuvantonline.com), amelyek ezen klinikai és patológiai adatok integrálása alapján a terápiás hatékonyság felbecslésére szolgálnak. Az alábbiakban ezeket a markereket fogom röviden ismertetni.

Az emlőrákok jelentős részében a daganatsejtek **ösztrogénreceptort (ER) és/vagy progeszteronreceptort (PR)** expresszálnak. Az ER transzkripciós faktorként működik, egyik legfontosabb célgénje a PR. Ha a PR kimutatható a daganatsejtekben, akkor ez azt jelenti, hogy az ER funkcionálisan aktív, tehát az ösztrogének elleni hormonterápiának van esélye. Az ER+ betegek 60%-a egyben PR+ is. Az ER és PR kombinált előfordulása esetén megbízhatóbb az immunhisztokémiai előrejelzés: ezek a kétszeresen pozitív (ER+/PR+) betegek 75%-a reagál tamoxifenre és az aromatáz-inhibitorokra (76). ER-/PR- betegek egyáltalán nem reagálnak, az ER+/PR- és ER-/PR+ betegek válasza pedig változó a hormonterápiára (77). A pozitívítás mostani határa a megegyezések szerint 1% . Bár a PR kimutatása megerősíti az ER eredményeit, országonként változó a meghatározási kötelezettség – pl. Angliában nem vizsgálják a PR mennyiségét. Az ER-státusz nem csak prediktív, de kemoterápiával szembeni prognosztikus információt is hordoz: ER-pozitívítás a visszaesésmentes túlélés idejét jelzi előre adjuváns tamoxifen monoterápiával kezelt betegekben (78). A

hormonreceptorok vizsgálatát rendszerint paraffinba ágyazott szövetmintán végzik immunhisztokémiai eljárással.

A **HER2** (human epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa) az összes emberi sejt felszínén megtalálható receptor. Az emlőben normális körülmények között fontos szerepük van a tejelvezető csatornák kifejlődésében azáltal, hogy a sejteknek üzeneteket küldve, növekedésre és szaporodásra készítetik őket. Ha valamilyen génhiba folytán túl sok ilyen receptor alakul ki a sejtek felszínén (a normálisan előforduló 20-50 ezres nagyságrend helyett milliós számban), akkor emlődaganat fejlődése következhet be. Ilyenkor a daganatsejtben a gén két kópiája helyett sokkal több, 50-100 is lehet a 17-es kromoszómán. A tumor akkor tekinthető pozitívnak, ha az immunhisztokémia 3-as fokozatúnak ítéli a fehérjereakciót, a FISH-nél pedig az átlagos *HER2* gén/17-es kromoszóma aránya 2,2 vagy az átlagos *HER2* kópiaszám/sejt aránya 6 vagy annál több. Ez a betegek 20-25%-ánál fordul elő. A HER2 a trastuzumab (Herceptin) monoklonális antitest-terápia (79) prediktív markere, pozitivitás esetén mind primer, mind metasztatikus emlőrák esetében hatásos lehet.

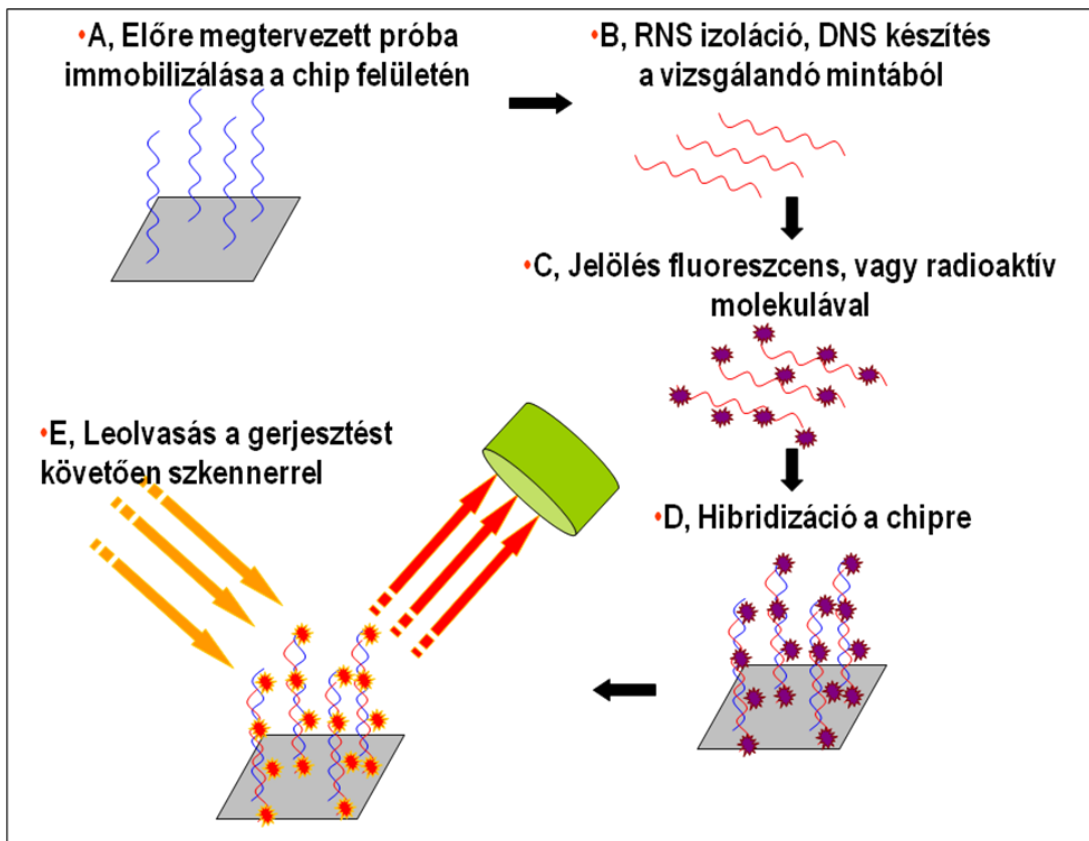
A **hormonreceptorok és HER2-amplifikáció** együttesen is meghatározza a hatékony terápia kiválasztását. Kimutatták, hogy a HER2-amplifikáció egy ER-aktivátornak a működését függeszti fel, ami tamoxifen-rezisztenciához vezet. A HER2+ tumorok esetében így a tamoxifen hatékonysága sokkal alacsonyabb, még akkor is, ha az ER-t fokozottan expresszáló tumorról van szó. Egyes vizsgálatok szerint az ER+ emlőrákokban a HER2-amplifikáció nem egyszerűen csak felfüggeszti a tamoxifen hatékonyságát, hanem még adverz hatású is lehet. Ezek alapján azt is állítják, hogy a tamoxifen hatékonysága jobban függ az emlőrák HER2 státuszától, mint magától az ER-étől.

A továbbiakban felsorolt gének expressziójának rutin klinikai vizsgálata nem jellemző. A **Ki-67** egy proliferációs marker, mely korrelációt mutat a hisztológiai grade-del (80). Jelen van a sejtciklus minden aktív fázisában (G1, S, G2, M), ugyanakkor nem detektálható G0 fázisban, így a proliferáló sejtek tökéletes markere (81). A Ki-67-expresszió prognosztikus értékét számos vizsgálat bizonyította, a betegség kimenetelére, távoli metasztázis mentességre egyaránt (82-84). Ugyanakkor az újabb vizsgálatok már megkérdőjelezzik a Ki-67-expresszió jelentőségét (85).

Az antraciklin-terápia hatását a **TOP2A** gén felülexpressziója előrejelezheti, bár az irodalomban a különböző kutatások és vizsgálatok szignifikáns prediktív erőt nem mutattak ki (86-90). Lehetséges továbbá, hogy a *Tau* gén a neoadjuváns paklitaxellel szembeni rezisztencia előrejelzésében alkalmazható biomarkerként (91-93). Szérum-alapú prognosztikus marker a **tumor-asszociált antigén 15-3 (CA-15-3)** (94). Előrehaladott emlőrákos betegekben magas CA-15-3 értékeket találtak (95, 96), amelyek érzékenysége áttétes emlőrák esetén magas, ám az alacsony koncentráció nem zárja ki a metasztázist (97). Meghatározása elsősorban a visszaesés diagnózisában és kezelésének monitorozásában játszhat szerepet (88, 98, 99). Az azonos csoportba tartozó detektálható **antigének** (pl. *BR 27.29*) magas szintje szintén rossz prognózissal és kemorezisztenciával társul (100). Preoperatív stádiumban mért magas **karcioembrionális antigén (CEA)** szintek szintén rossz prognózissal társulnak (101-103).

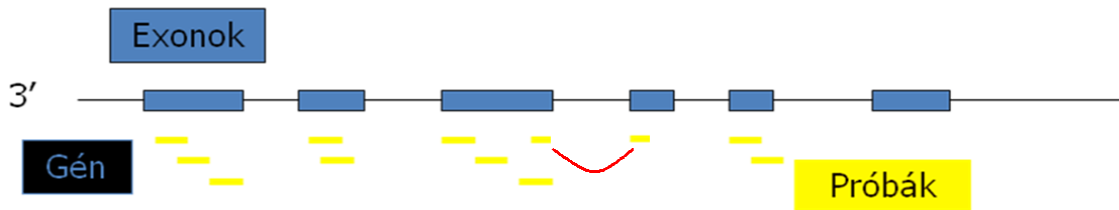
5. Microarray

Az mRNS-expressziós microarray-ek segítségével nagyszámú gén expressziójának összehasonlítása lehetséges különböző sejtekben, szövetekben, vagy ugyanazon típusú sejtek/szövetek eltérő állapotaiban (pl. fiziológias és patológias állapot; adott gyógyszer adagolásával, ill. anélkül). Az mRNS-expressziós microarray-technika lényege az, hogy a vizsgálni kívánt génekkel komplementer, ún. target oligonukleotidokat szilárd hordozóhoz kötik. Ezekhez hibridizáltatják az adott sejttypusból származó RNS-ről készített, általában fluoreszcensen jelölt egyszálú cDNS vagy cRNS molekulákat, a próbákat (4. ábra). A vizsgált gének expressziós szintjére a hibridizáció mértékéből következtetnek. A microarray-technikák nemcsak új információt adhatnak a betegség okaira vonatkozóan, hanem új diagnosztikus, differenciáldiagnosztikus lehetőséget jelentenek (104-106).



4. ábra: A microarray-ek működési elve. A target génekkel komplementer próbákat szilárd hordozó mátrixon rögzítik. Ehhez hibridizálják a vizsgálni kívánt mintából származó, jelölt cDNS-eket. A mintában lévő gének expressziójuknak megfelelő intenzitással kötődnek a microarray-en lévő komplementer oligonukleotidokhoz. Hibridizáció után a jelölés következtében szkennelvel kiértékelhető a mintában lévő gének expressziója (107).

Egy Affymetrix expressziós chip több ezer transzkriptum expressziójának egyidejű vizsgálatát teszi lehetővé. A HG-U133A és HG-U133A+ expressziós array-ek minden gént 11 különböző 25-ös oligo-próbával fednek le (5. ábra). A tökéletesen kapcsolódó próbák mellett úgynevezett partnerpróbák helyezkednek el. Ezek a partnerpróbák az eredeti próbákhoz képest centrális pozícióban 1 nukleotidtranszverziót tartalmaznak. A rövid egyszálú oligonukleotid array-ek ilyen irányú felépítettsége teszi lehetővé, hogy kereszthibridizáció nélkül rövid DNS-szekvenciákkal az expressziót vizsgálni lehessen.



5. ábra: A microarray-en lévő próbák megfelelése a gén 1-1 szakaszaival. Minden, a mintában jelenlévő gén expressziójára 11 próba expressziós értékeiből következtetünk egy Affymetrix microarray-n. Az ábra a próbák egy lehetséges elhelyezkedését szemlélteti egy 6-exonos génen. A 2 exonon átfedő, piros vonallal összehúzott próbák egy ún. junction próbát ábrázolnak.

5.1. Génexpressziós mintázat a multidrog-rezisztencia vizsgálatában

DNS array technológiával számtalan vizsgálatot végeztek a doxorubicin-rezisztenciával összefüggő géneket azonosítására (41, 108-113). Chang és mtsai bemutatták, hogy az emlődaganat génexpressziós mintázata meghatározza a docetaxelre adott választ. A rezisztens sejtek fokozott transzkripcionális és szignáltranszdukcióért felelős géneket expresszáltak. Microarray-vizsgálataik segítségével bebizonyították, hogy nem bizonyos gének, hanem sok gén expresszióváltozásának rajzolata adhat kielégítő választ a gyógykezelés sikerességét illetően (114). Több hasonló tanulmány igazolta, hogy a sejtvonalak (115, 116) és elsődleges neoplazmák (117, 118) komplex génexpressziós mintázatával előre lehet jelezni a sejtek kemoterápiára adott válaszát.

Kang és mtsai 5-fluorouracilra, ciszplatinra, ill. doxorubicinra rezisztens és szenzitív gyomorráksejtek expressziós mintázatát hasonlították össze. Arra következtettek, hogy a legkonstansabb molekuláris változásokon mennek át a sejtek a topoizomeráz II célpontú DOX-kezelés esetén a rezisztencia megszerzésében. A legtöbb felülexpresszált gén a sejtproliferációban, metabolikus utakban, DNS regulációjában, sejtnövekedésben, és sejtszervezésben vesz részt, kisebb csoport pedig a jelátvitelben és a külső inger-válaszban, valamint a sejt-kapcsolódásban játszik szerepet, egyes gének pedig a stressz-válaszért, sejt-sejt kapcsolódásért, és transzportfunkciókért felelős (113). Hasonló eredmények születtek a szintén topoizomeráz II célpontú etopozid-rezisztencia vizsgálatoknál melanoma sejtvonalakban (119). A közös célpont miatt összefüggő a rezisztencia a különböző sejt típusoknál (113).

Győrffy és mtsai egy korábbi vizsgálatukban kemoterápiára rezisztens és szenzitív tumorsejtek génexpressziós mintázatát kutatták a gyógyszerrezisztenciában kiemelt szerepet játszó gének azonosítására. A különböző eredetű sejtvonalak vizsgálatával szövettől függetlenül történt a terápia választ előrejelző gének meghatározása. A kapott gének tesztelését 44 emlőrákos mintán végezték. Azok a betegek, amelyek génexpressziós mintázata a gyógyszerre érzékeny sejtvonalakéhoz hasonlított, 50%-kal hosszabb túlélést mutattak, mint a gyógyszerre rezisztens sejtekhez hasonló profilú betegek (70).

Összességében tehát, a DNS array technológia segítségével a rákos sejtek RNS-expressziós profilja meghatározható, és e mintázatok alapján számos gén kapcsolatba hozható valamely gyógyszerrel szembeni rezisztenciával. Önmagában a kapott génlisták nem mutatnak rá a rezisztenciában oki szereppel bíró egyedi gének jelentőségére, ehhez újabb módszerek bevonására van szükség. Az alábbiakban az általam is alkalmazott RNS interferencia elméleti hátterét és technikáját mutatom be.

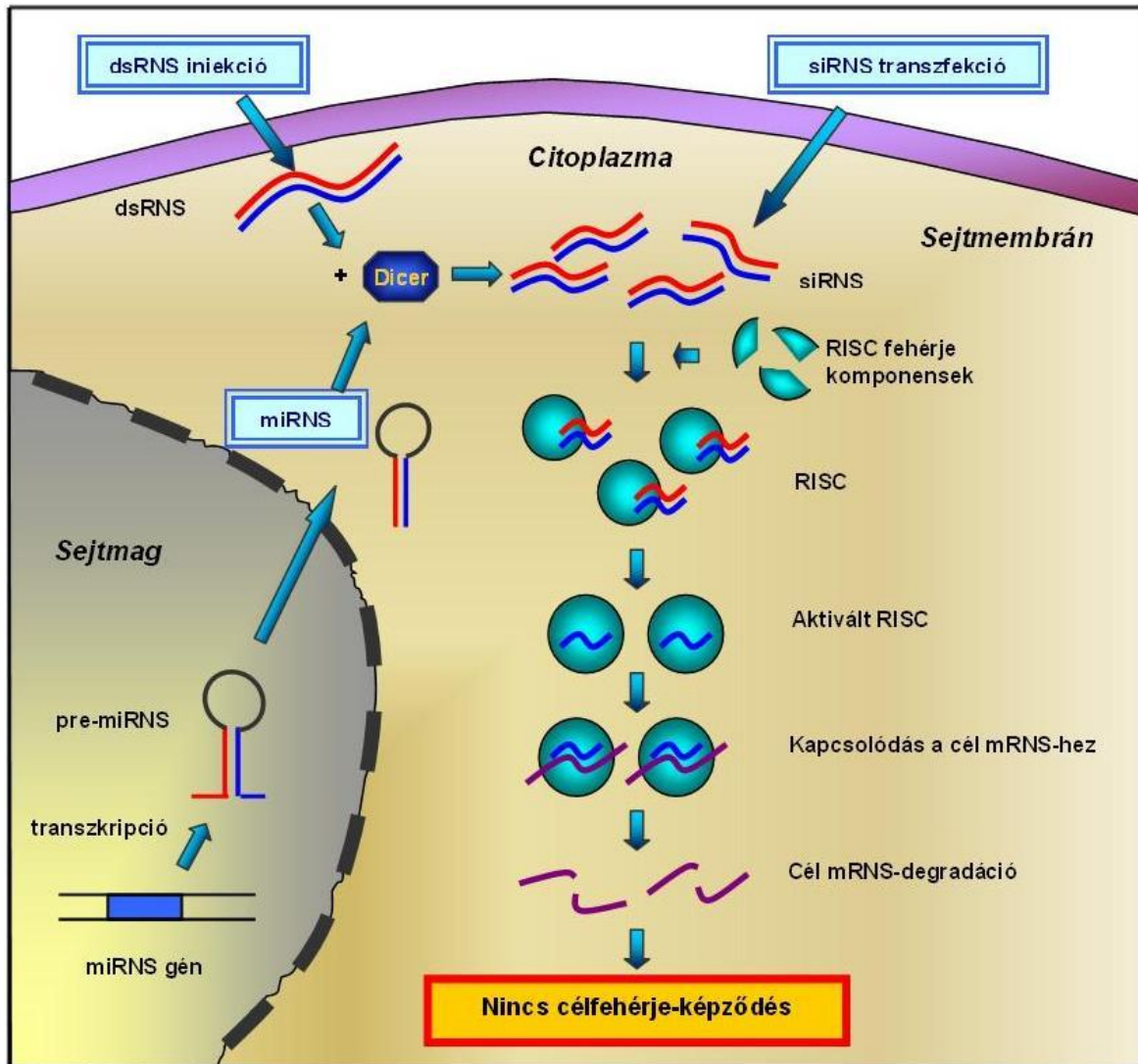
6. RNS interferencia

Az RNS interferencia olyan molekuláris mechanizmus, amelynek során rövid, specifikus RNS molekulák elnyomják a gének kifejeződésében kulcsszerepet játszó mRNS-ek működését (120). A létrejövő posztranszkripciós géncsendesítés során (PTGS, posttranscriptional gene silencing) a DNS-ről mRNS-re átíródó információ a gén által kódolt fehérje szintézisének megkezdődése előtt gátlódik (121). Az RNS interferencia a genetikai információ kifejeződésének ősi szabályozási folyamata, amelynek klinikai alkalmazása új távlatokkal kecsegtet.

6.1. Mechanizmusa

Az RNS interferencia a posztranszkripciós, azaz a DNS-ről képződő mRNS-en keresztül ható génelcsendesítés egyik formája (122). A mechanizmus kialakulásában hosszú dsRNS-ek (>200 bp) vesznek részt, amelyek a sejten belüli folyamatokhoz kapcsolódva fajoként eltérő hosszúságú, általában 20-25 nukleotid hosszúságú RNS-

ekre bomlanak (siRNS, small interfering RNS) (6. ábra). Az siRNS-ek képződéséért egy ATP-független, RNáz aktivitású enzim, a Dicer felelős (123). Miután a Dicer specifikusan hasítja a dsRNS-eket, a keletkező kettősszálú siRNS-ek beépülnek az siRNS által indukált elcsendesítő komplexbe (RNA-induced silencing complex, RISC).



6. ábra: Az RNS interferencia mechanizmusa. A génelcsendesítést okozó kettősszálú RNS molekulákat (dsRNS) a Dicer enzim 20-25 bp hosszúságú siRNS-ekké hasítja, amely ezután egyszálúvá alakul a RISC enzimei által, majd az antiszenz szállal komplementer cél-mRNS feldarabolódik, így a célfehérje képződése gátlódik. A sejtbe szintetikus siRNS bejuttatásával ugyanez az eredmény érhető el. Ez a folyamat természetes módon is lejátszódik: a sejtmagban lévő miRNS génről transzkripció, majd további átalakulások útján miRNS képződik, amelyet a Dicer a dsRNS-hez hasonlóan hasít.

A komplexben található enzimek egyszálúvá alakítják az siRNS-t (124). Ezután ez az egyszálú siRNS a vele komplementer részeket tartalmazó mRNS-ekhez irányítja a komplexet, amelyeket a RISC enzimek feldarabolnak. A génről így nem képződik a normális hosszúságú és adott működésért felelős fehérje; az adott gén tehát nem tud kifejeződni.

A géncsendesítés létrejöttéhez a dsRNS kis mennyisége is elegendő sejtenként. A rendszer hatékonyságának oka eddig ismeretlen, de feltételezik, hogy az siRNS-ek ma még nem ismert mechanizmussal felszaporodnak. Ez két módon lehetséges: a dsRNS-ek sokszorozódásával (125), ill. ha maga az siRNS amplifikálódik. Az RNS interferencia ugyanakkor nem végleges folyamat: nem a gén kiütéséről („knockout”) van szó, hanem a gén elcsendesítéséről („knockdown”). Az osztódó sejtekbe kerülve az siRNS-ek csupán 2-3 napig fejtik ki hatásukat, és legfeljebb 1 hétig képesek géncsendesítésre. Ahogyan az osztódó sejtekben hígul az siRNS-ek mennyisége, úgy csökken a csendesítés mértéke is (126).

6.2. Az RNSi élettani működése

A poszttranszkripció génelcsendesítés valószínűleg korán megjelent az evolúció során. Egyes kutatások szerint bizonyos vírusok és transzpozonok elleni védekezésben lehetett és van ma is fontos szerepe (127). Az RNS-interferenciának a sejt, ill. a szervezet vírusellenes védekezésében betöltött szerepe különösen alacsonyabb rendű szervezetekben jelentős. Számos vírus örökítőanyaga dsRNS, ezért ha egy ilyen vírus megtámad egy sejtet, és örökítőanyagát bejuttatja a sejtbe, a Dicer azt rögtön lebontja. Aktiválódik a RISC-komplex, és lebontja a vírus örökítőanyagát (128).

A transzpozonok a sejt genetikai anyagának részeként sokszorozódnak és újra beépülnek a sejt genomjába. Működésük során a DNS-ről először RNS képződik, majd ismét átíródik DNS-sé, és így épül vissza a genomba. A képződő RNS-molekula sokszor kettősszálúvá alakul, ez elindítja az RNS-interferencia folyamatát, amellyel a sejt a genetikai állományt védi a transzpozonokkal szemben (129).

Az RNS interferencia további működése a hibás RNS-ek lebontása és a sejtől való eltávolítása. Az RNS-interferenciában szerepet játszó gének meghibásodása fejlődési rendellenességet okozhat (130).

Az RNS-interferencia szerepe fontos a génkifejeződés szabályozásában az egész élővilágban. Az emberben is több száz olyan gént fedeztek már föl, amelyek mikroRNS-eket (miRNS) kódolnak. A miRNS-ek 50-60 bp hosszúságú RNS-ek, amelyek más, fehérjéket kódoló géneknek a darabjait hordozzák. Sajátosságuk, hogy önmagukkal párba állva hajtúket képezhetnek, amit a sejt dsRNS-ként értelmez. Így aktiválódik a sejt RNS-interferenciáért felelős molekuláris rendszere, s megtörténik a miRNS-nek megfelelő gén elcsendesítése. A szervezet fejlődésének szabályozásában és a sejtek működésében fontos szerep jut a miRNS-eken keresztül történő szabályozásnak (131).

6.3. RNSi vizsgálatok

Az 1998-as felfedezése óta az RNS interferencia megfigyelésére irányuló vizsgálatok száma rohamosan megnőtt. Létezését már korábban kimutatták egysejtűekben (132), növényekben (127, 133) és állatokban egyaránt (134, 135). Az RNSi segítségével több génnek a szerepét sikerült tisztázni muslicában (136) és a *C. elegans* féregben (120). Mivel olyan molekuláris biológiai módszerről van szó, amely emlős-rendszerekben is alkalmazható, az RNS interferenciát széles körben alkalmazzák az alapkutatásokban az egyes gének működésének megállapítására.

Emlősállatok közül elsőként egéren vizsgálták a szintetikus dsRNS génelcsendesítő hatását (137). Az egérembrióba vagy petesejtbe juttatott hosszú dsRNS, amelynek gátolnia kellett volna a vele azonos szekvenciájú, komplementer RNS-eket, a sejtben lévő összes RNS szintjének csökkenését okozta. Nem konkrét gént gátolt, hanem apoptotikus folyamatokat indított el. A feltételezések szerint ennek oka az, hogy a sejt a hosszú dsRNS darabokat vírustól származóként ismeri fel. Ez elindítja az interferonok transzkripcióját, és a dsRNS-függő protein kináz (PKR) aktiválásán keresztül a fertőzött sejtben a fehérje-átíródáshoz szükséges faktorok képződése (pl. eIF2a) gátlódik. Más esetben olyan enzimeket aktivál (RNáz L), amely a sejtben lévő

RNS-ek lebontását végzi (122). Mindkét esetben a sejt számára nélkülözhetetlen fehérjék képződése gátlódik, így a sejt elpusztul.

Az RNS interferencia jelensége a daganatok kialakulásának kutatása során lehetőséget nyújt nemcsak a célgének azonosítására, hanem a gének közti interakciók felfedezésére is (138). Azoknak a géneknek az azonosítása, amelyek inaktíválása szinergista módon hat a citotoxikus anyagokra, fontos lehet az újonnan fejlesztett gyógyszerek összetételének megtervezésében.

Az új terápiás módszerek fejlesztése során az egyik kérdés az, hogy vajon a célgén gátlása fog-e hatni a fenotípusra is. McKeigan és mtsai vizsgálatukban több olyan célgént azonosítottak (*FER*, *JIK*, *PLK2*, *mTOR*), amelyek elcsendesítésével emlősejtekben nő az apoptózisra való hajlam. Ezzel egyidőben az is kiderült, hogy a *MK-STYX* foszfatáz gén elcsendesítésével apoptózis elleni rezisztencia alakult ki (139).

A terápiás fejlesztés során az is kérdéses, hogy az RNSi-t okozó molekulákat hogyan juttassák a sejtbe/szövetbe. Az egereken végzett vizsgálatok során sikerrel alkalmaztak siRNS-t prosztatarák regressziójában közvetlenül a tumorszövetbe történő injekcióval (140). Vírus- és vektorbázisú short hairpin RNS (shRNS)-injekció adenokarcinóma (141) és Ewing-szarkóma (142, 143) esetén szintén eredményes volt.

Liposzómába csomagolt siRNS-ek méhráksejtekbe történő juttatásával is eredményesen gátolták a tirozin kináz receptor *EphA2* génjét egerekben (143). E vizsgálat során kéthetente történt kezelés, és 4 hét alatt a tumor mérete 50%-kal csökkent. Ha pedig az RNSi terápiát kemoterapeutikummal együtt alkalmazták, a csökkenés mértéke a 90%-ot is elérte. Ezek az eredmények igazolják, hogy az RNSi-terápia hatékonysága jelentősen növelhető a hagyományos kezelések kombinálásával.

A kemoterápiával szembeni rezisztencia kimutatására is folyamatban vannak olyan vizsgálatok, amelyekben a multidrog rezisztenciával (MDR) kapcsolatba hozható fehérjék képződéséért felelős géneket csendesítenek el (*ABCB1*, *ABCB4*, *ABCB5*). Elterjedőben vannak olyan módszerek is, amelyek a kemo- vagy radioterápia hatására kialakuló, a DNS-repair mechanizmusban szerepet játszó gének felülexpressziójának gátlását célozzák. Így módon az siRNS-k transzfekciójával a tumoros sejtek érzékenyebbek a kemoterápiára (144).

A koleszterinszint csökkentésére történő RNSi-val összefüggő vizsgálatok eddig sikeresnek bizonyultak egereken *in vitro* és *in vivo* körülmények között is (145). Az

ApoB génnel homológ siRNS-t juttattak be a szervezetbe úgy, hogy azt koleszterinhez kapcsolták hozzá, így az RNS csak olyan sejtekbe juthatott be, amelyeknek a felszínén a koleszterint megkötő sejt felszíni receptorok vannak. Mivel ezek a sejtek érzékelik a vér koleszterinszintjének változását a májban és a vékonybélben, ezért a gátló RNS célzottan a koleszterinszint szabályozásáért felelős sejtekbe jut be. A vizsgálatok során az egerek vérében az LDL-szint csökkenése mellett (44%) a HDL-szint is csökkent (25%). A mesterségesen bevitt RNS más gének normális működését nem befolyásolta, tehát a kezelésnek nem voltak káros mellékhatásai.

Az RNS interferencia vírusfertőzésekkel szembeni hatékonyságát először növényeken mutatták ki (146, 147). A kezdeti felfedezés után megszorodtak az állati sejteken történő vizsgálatok is. Sikerrel alkalmazták az RNS-interferencia módszerét a kéz-láb-száj betegség (HFMD, hand-foot-mouth disease), egy főként gyermekeket érintő vírusos betegség egyik kórokozójának semlegesítéséhez (148). A kutatás során enterovíussal (EV71) fertőztek meg emlőssejteket sejt kultúrában. Vírusellenes shRNS-sel kezelve a sejteket, a vírus koncentrációjának 91%-os csökkenését tapasztalták. Hasonló eredményt értek el a HIV-1 (149, 150), hepatitis B (151) és influenza B (152) vírus esetében is.

A dominánsan öröklődő neurodegeneratív kór, a Spinocerebelláris ataxia (SCA) esetében hatékonyan alkalmaztak RNSi-t egereken. Az SCA kialakulását a CAG nukleotidok ismétlődése okozza a mutáns *SCA1* gén szekvenciájában, aminek következtében az idegsejtekre toxikus poliglutaminok halmozódnak fel. A vizsgálat során shRNS vektorok agyszövetbe történő injektálásával ezek termelését sikerült meggátolni (153).

Egy másik neurodegeneratív kór, az amiotrofikus laterális szklerózis (ALS) vizsgálatában is hosszú távú, stabil génelcsendesítést tapasztaltak mutáns szuperoxid diszmutázt (Sod1) gátló vektorral, amelynek eredményeképp a motoros neuronok túlélését, és a betegségre jellemző fenotipusos változások későbbi jelentkezését tapasztalták (154).

A Skinetics Biosciences Inc. siRNS-technológiával foglalkozó cégben 2004 óta új típusú szőrnövekedésgátló-szert fejlesztenek. A leendő termék hatóanyaga olyan siRNS, amely az ún. *hairless* gén működését gátolja. A termék alternatív és fájdalommentes szőrtelenítési lehetőséget jelenthet a jövőben.

Az RNS interferenciával kapcsolatos korai vizsgálatok biztató sikerei ellenére az emlősökön kapott eredmények egy részére még ma sem tudunk pontos magyarázatot adni. Az egereken végzett vizsgálatok eredményessége azonban előrevetíti az RNSi mechanizmusában rejlő terápiás lehetőségeket.

6.4. RNSi a klinikai gyakorlatban

Mióta Tuschl és mtsai igazolták, hogy emlősökben lehetséges a specifikus célgének gátlása mesterségesen szintetizált siRNS-sel (155), az ún. siRNS-alapú hatóanyagok gyorsan fejlődtek. A bejuttatott siRNS molekulák nem befolyásolják a beteg saját genetikai állományát, ami más génterápiás eljárások során rendszeres nehézséget jelent. A vizsgálat kivitelezésében azonban továbbra is kérdéses az, hogy a gátló RNS-eket miként juttathatjuk legcélszerűbben a megfelelő helyre. A következőkben azokat az alkalmazási lehetőségeket foglaltam össze, amelyeket sikerrel alkalmaztak betegségek gyógyításában.

Az időskori makuladegeneráció (AMD, age-dependent macula degeneration) során új, kóros szerkezetű erek kialakulása a látás visszafordíthatatlan károsodásához vezet. E világszerte milliókat érintő betegség kezelésével foglalkozik egy amerikai biotechnológiai cég. A közvetlenül szembe injekciózott siRNS a vaszkuláris endotheliális növekedési faktort kötő receptor (VEGFR-1) képződését gátolja, így akadályozva meg a vérerek kóros képződését. Az állatkísérletek sikeresnek bizonyultak, és a kezelés hatását már klinikailag is bizonyították: a gyógyszer intraokuláris injekciójának hatására a betegek szemében csökkent az új erek képződése, és kismértékben javult a látásélességük is. A kedvező hatás tartóssága a gyógyszer adagjától függött. Káros mellékhatásokat nem tapasztaltak, csak a gyógyszer bejuttatásának helyén alakult ki a szem ödémája és gyulladása (156).

Az eddig legszélesebb körben kipróbált siRNS-alapú terápiás szer az *RSV* (*respiratory syncytial virus*), egy főként csecsemőket és kisgyermeket veszélyeztető, légúti megbetegedést okozó vírus szaporodását gátolja. A több mint 100 egészséges felnőttön tesztelt intranazális gyógyszert biztonságosnak és jól tolerálhatónak minősítették a szakértők. Ennek a fázis II. vizsgálatnak az eredménye reménykeltő (157).

6.5. Az RNSi -alapú terápia nehézségei

A klinikai alkalmazás legnagyobb kérdése a célének azonosítása, ill. a kérdéses mRNS-eket gátló siRNS-ek megtalálása. A sikeres génelcsendesítéshez az siRNS-t úgy kell megtervezni, hogy a legnagyobb hatékonysággal a cél-mRNS-re hasson és a legkisebb valószínűséggel csendesítsen el más, hasonló szekvenciájú transzkriptumot. Ma már számos algoritmus létezik az siRNS-k tervezéséhez, ezért a hagyományos szerekekkel ellentétben ez a folyamat viszonylag gyorsan elvégezhető (158). Általánosságban 5 bioinformatikailag kiválasztott siRNS közül csupán 1 lesz hatékony.

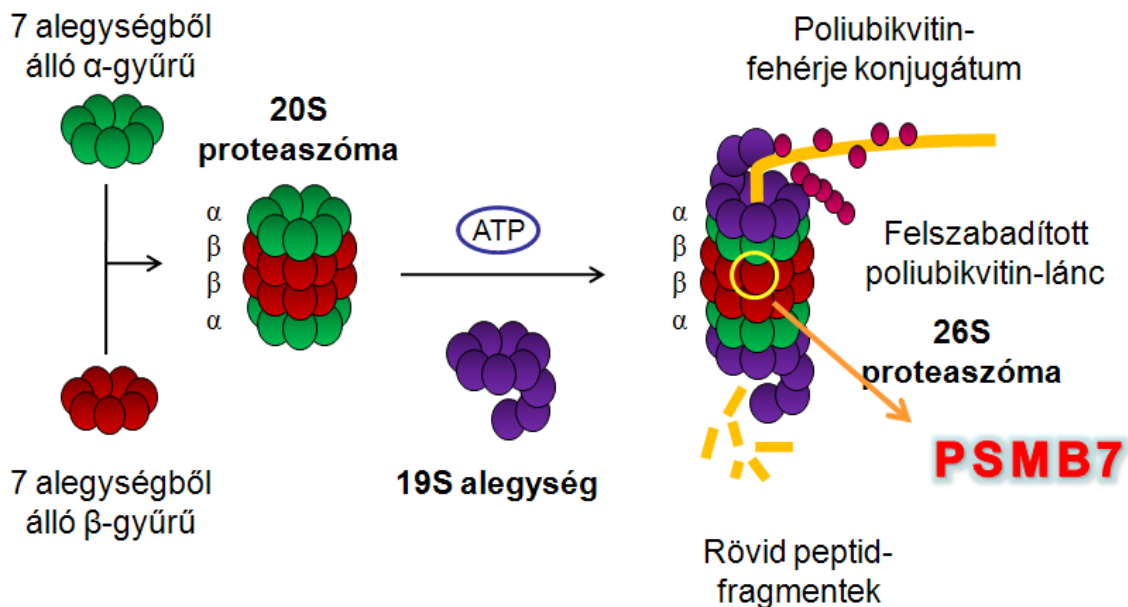
Mivel jelenlegi ismereteink szerint csupán génelcsendesítő hatását ismerjük, terápiás felhasználhatósága korlátozott: csak olyan esetekben alkalmazható, amelyekben a tünetek enyhülését vagy a gyógyulást a kívánt célfehérje képződésének gátlása okozza (antagonista hatás).

Az RNS interferencia klinikumban történő felhasználása során azonban a legnehezebb feladat olyan módszerek, ill. vivőanyagok fejlesztése, amellyel hatékonyan lehet a terápiás szert a szervezeten belül a szükséges helyre, a szervbe, a szövetbe eljuttatni. A dsRNS sejtvonalakba történő bevitelére már előállítottak olyan vektorokat, amelyek hosszú távú hatást biztosítanak (138). Fontos feladat azonban az, hogy kísérleti állatokban és emberben is megoldhatóvá váljon az siRNS bevitele a szervezet valamennyi szövetébe, de a módszer sikeressége esetén is kérdéses a klinikai alkalmazás során felmerülő jelentős költségek megfizethetősége az egyes betegek számára.

Összefoglalva tehát, az RNSi -alapú kezelés előnye, hogy olyan bonyolult, nehezen gátolható fehérjék esetében is hatékonyan alkalmazható, amelyekre a hagyományos szerek nehezen vagy egyáltalán nem hatnak. Ennek oka az, hogy a siRNS a génekről képződő RNS szintjén gátol, így hatását még a fehérje képződése előtt fejti ki. Kiterjedt vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy olyan bejuttatási módszert lehessen alkalmazni, amely a génelcsendesítés hatékonyságát nem befolyásolja.

7. Proteaszóma

A 26S proteaszóma az eukarióta sejtek magjában és citoplazmájában magas koncentrációban megtalálható; feladatuk a sérült és szükségtelenné vált fehérjék lebontása. Funkcióját illetően egy ún. multikatalitikus proteináz komplex, amely egy jól elrendezett gyűrűalakú 20S magi struktúrával (2100 kDa) és két végén egy-egy 19S regulációs egységből (700 kDa) áll (7. ábra). A magját hengerszerűen 4 gyűrű alkotja, amely 28 alegységből tevődik össze; két gyűrűt a 7 α , a másik kettőt a 7 β alegységek alkotják.



7. ábra: A proteaszóma felépítése. A 26S proteaszóma egy 20S magi struktúrából és két 19S regulációs egységből áll. A magi struktúra 2 db α - és 2 db β -gyűrűből áll, mindegyik 7-7 alegységből tevődik össze. A regulációs alegységek ATP felhasználásával kapcsolódnak a magi struktúrához (159).

A belső gyűrűben elhelyezkedő β -alegységek katalitikus aktivitással rendelkezve hasítják a gyűrűn végighaladó fehérjét. Ezen a β -gyűrűn három proteolitikus hely van, amelyek mindegyike más-más specificitású: a β 5 alegység (*PSMB5* gén) a hidrofób részeket bontja (mint a kimotripszin), a β 1 alegység (*PSMB6* gén) a bázikus részeket (mint a tripszin) és a β 2 alegység (*PSMB7* gén) felel a savas részek lebontásáért (mint a kaszpázok) (160). A külső, konzervatívabb szerkezetű gyűrű feladata, hogy lehetővé

tegye az ATP-áz tartalmú regulációs alegységek lehorgonyzását. A két regulációs alegység 17 elemből áll, amelyből 6 fehérje ATP-áz. A két regulációs alegység feladata, hogy megnyissa a 20S központi csatornája felé vezető utat, amelyet normális esetben az α -alegységek amino-terminálisai gátolnak. Másodsorban ATP megkötésével és hidrolizálásával kicsavarja az ubikvitinálódott fehérjét, hogy áthaladhasson a csatornán. A kitekeredett fehérjék a 20S mag központi csatornájába kerülve a β -alegység révén progresszív degradáción mennek keresztül (161).

A proteaszóma a fehérjék lebontását egy ATP/ubikvitin-függő nemlizozómális útvonalon keresztül végzi, a többi proteolitikus enzimmel ellentétben nem a membránhoz kötötten (162). Az ubikvitin-proteaszóma útvonal (UPS) egy szigorúan szabályozott és sokoldalú folyamat, amely során a sejtek fehérjéi ubikvitinizálódnak. Ez az útvonal segít meghatározni az összetett intracelluláris fehérjék lebontásának ütemét. Egy ubikvitin-molekula kovalens kötással ATP bontása közben hozzákapcsolódik a lebontandó fehérjéhez (163), ami további ubikvitin-molekulák kapcsolódását teszi lehetővé egészen 7 molekula kapcsolódásáig. Az ubikvitinálásban háromféle enzim vesz részt, az ubikvitin-aktiváló (E1), az ubikvitin-konjugátor (E2) és az ubikvitin protein ligáz (E3). Az így létrejött farok a 19S regulációs egység számára felismerhetővé teszi a degradációra ítélt proteint, így a proteaszómában csak poliubikvitinizált fehérjék lebontása folyik, kivéve az 5-7 aminosav hosszúságú kis fehérjéket, amelyeket a 20S mag ubikvitin jelölés nélkül is degradál (164).

A proteaszóma amellet, hogy szükségtelen fehérjéket bont le, rendkívül fontos szereppel bír a legkülönbözőbb sejt folyamatok modulálásában – mint például a gyulladás, a sejt ciklus, az apoptózis vagy a növekedés-irányító fehérjék lebontása (165). A proteaszómális fehérjelebontás degradálja a ciklin A, B, D, és E, a tumorszuppresszor p53 és a proapoptotikus Bax fehérjéket (166) éppúgy, mint a ciklindependens kináz inhibitor p27-et (167), valamint az NFkappaB inhibitor és Ikappa-B-alfa-t (168).

Manapság léteznek ún. proteaszómagátlók, amelyek a hidrofób részeket bontó kimotriptikus β 5 alegységhez kötődve megakadályozzák a komplex fehérjetördelő mechanizmusát. Sejt kultúrában igazolódott tumorellenes hatásuk, melynek során a sejt ciklusban szerepet játszó fehérjék szabályozásának megzavarásával apoptózis indukálódnak (169). A bortezomib volt az első proteaszómagátló, amelyet már a klinikumban is használnak kemoterápiás szerként (170). A bortezomib hatásos

ellenszere a myeloma multiplexnek azáltal, hogy aktiválja az endoplazmatikus retikulum stressz apoptotikus útvonalát (171). Mindezidáig számtalan tanulmányban vizsgálták a szer proteaszómára gyakorolt hatását eltérő körülmények között (172-175). A proteaszómagátlók valószínűleg a kemoterapeutikumra való érzékenységet is növelik: doxorubicin és bortezomib együttes kezelésével mindkettő hatása nőtt (176). E sok ismeret ellenére máig nem tudjuk, hogy milyen kapcsolatban van a doxorubicin-rezisztenciával, és hogy a proteaszóma alegységek között találunk-e olyat, amely prognosztikus vagy prediktív szereppel bír a rezisztenciában.

CÉLKITŰZÉSEK

A vizsgálat során az volt a céлом, hogy betekintést nyerjek az emlőrák doxorubicinnal szembeni rezisztenciájának genetikai hátterébe, és a génexpressziós adatok ismeretében új, klinikumban is használható potenciális marker(ek)e)t azonosítsak az alábbiakban ismertetett módon.

1. In vitro vizsgálat rákos sejtvonalakon

A rezisztencia genetikai hátterének vizsgálatához különböző szöveti eredetű tumoros sejtvonalak szenzitív, és rezisztens származékait használtam. **Feltételeztem**, hogy amennyiben a rezisztens sejtekben a gének expressziója eltér a szenzitív sejtekéhez képest, úgy az a gén rezisztenciában betöltött szerepére utalhat. Az expressziós vizsgálatához microarray vizsgálatokat végeztünk. Kiküszöbölve a rövidtávú gyógyszeres kezelés okozta genetikai változásokat, rezisztens, szenzitív és 24 órán át kezelt szenzitív emlőrák sejtvonalakon egyaránt elvégeztük a microarray vizsgálatot.

Feltételeztem, hogy azok a gének, amelyek a rezisztens vs. szenzitív sejtekben igen, de a szenzitív és 1 napig kezelt szenzitív sejtvonalakban nem felülexpresszáltak, azok oki szereppel bírnak a rezisztencia kialakulásában. Ennek igazolására kiválasztottam a kapott génlistáról a *PSMB7* gént, amely a citoplazmában lévő fehérjebontó proteaszóma egyik alegysége. A gén doxorubicin-rezisztenciában betöltött szerepét RNS interferenciával vizsgáltam. **Feltételeztem**, hogy ha a rezisztens sejteken felülexpresszált *PSMB7* gént elcsendesítem, a sejtek szenzitizálódnak a gyógyszerre. Az elcsendesítés után a sejtek gyógyszeres kezelést kapnak, hogy a rezisztencia változása kimutatható legyen. Mivel a proteaszómának szerepe van a sejtben eltöredezett és/vagy feleslegessé vált fehérjék degradációjában, a funkcióvesztés kiesésével olyan folyamatok indulhatnak meg a sejtben, amely a rezisztenciamechanizmusok kiesését eredményezik, vagy apoptózist indukálnak.

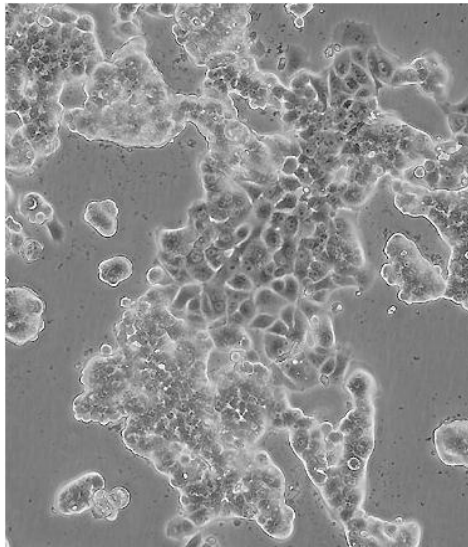
2. In silico vizsgálat emlőrákos betegeken

Az *in vitro* vizsgálat után megvizsgáltam, hogy a sejtvonalakon kapott eredmények klinikai mintán is igazolhatóak-e. A vizsgálatához a kutatócsoportunk által létrehozott adatbázist használtam, amely a GEO adatbázisból letölthető összes, nyilvánosan elérhető Affymetrix HG-U133A és A+ microarray-jel mért emlőrákos beteg génexpressziós adataival dolgozik. E vizsgálat során **feltételeztem**, hogy a rezisztens sejtekben felülexpresszált *PSMB7* expresszió a klinikai mintákon prognosztikus jelleggel bír: a magas *PSMB7* expresszió jelzi az antraciklinnel szembeni rezisztenciát. Ennek érdekében a túlélési adatokkal rendelkező betegek adatán vizsgáltam a választott gén klinikai relevanciáját.

MÓDSZEREK

1. Sejtvonalak

A vizsgálatokhoz négyféle sejtvonalat használtunk: EPG85-257P humán gyomor karcinóma, EPP85-181P hasnyálmirigy-rák, HT-29 vastagbél-rák és MCF-7 emlő-rák (8. ábra) sejtvonalatokat, valamint ezek doxorubicin/daunorubicin-rezisztens származékait használtuk, amelyhez nemzetközi kooperáció révén jutottunk (177). A sejteket Leibovitz L-15 sejt kultúrák médiumban tenyésztettük (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) 10% FCS (Life Sciences, Grand Island, NY, USA), 1mM L-glutamin, 80 IE/l inzulin, 2,5 mg/l transferrin, 1 g/l glükóz, 1,1 g/l NaHCO₃, 1% esszenciális vitamin és 20.000 kIE/l trazilol jelenlétében. A sejteket 5% CO₂-tartalom mellett 37°C-os inkubátorban tartottuk. A rezisztens sejtek médiuma daunorubicint tartalmazott, HT-29 esetében 0,125 µg/ml, EPP85-181 és EPG-257 esetében 2,5 µg/ml koncentrációban; az MCF-7 sejt vonal médiumában 0,05 µg/ml koncentrációban volt jelen a doxorubicin (Farmitalia Carlo Erba, Freiburg, Germany). A 24 órán át gyógyszerrel kezelt szenzitív sejtek a kezelést az előbb leírtaknak megfelelő koncentrációban kapták.



8. ábra: MCF-7 szenzitív sejt fénymikroszkópos képe.

2. A gyógyszerre való szenzitivitás megállapítása

A sejtek doxorubicinra való érzékenységének megállapítására sejtproliferációs esszé készült (Cell Proliferation Kit I (MTT) Roche, IN, USA.). A vizsgálat a gyártó által javasolt protokoll alapján történt. Egy 96-lyukú lemez minden kísérleti terébe 5.000 sejtet ülepítettünk, a lemezeket inkubátorba helyeztük. A sejtek másnap a klinikailag alkalmazott dózis (0,02 mg/ml) 0,0001x–100x mennyiségét kapták tízszeresével növekvő koncentrációban, háromszoros ismétlésben. (A klinikai gyógyszerkoncentráció kiszámításához az aktuális Gyógyszer Kompendium szerint a klinikumban ajánlott testsúly kg/mg dózist egy átlagos, 70 kg-os ember testfelületét véve alapul átszámoltuk m²/mg-os dózissra.). Annak érdekében, hogy a bekövetkező proliferáció változását számszerűsíthessük, egy oszloponyi mintát, a „prekontrollt”, ami a kiindulási sejtmennyiséget mutatja, a gyógyszeres kezeléssel egyidőben MTT-vel (3-[4, 5-dimetiltiazolil-2]-2, 5-difeniltetrazolium bromid) megfestettük. A későbbiekben ehhez viszonyítottuk a gyógyszeres kezelést kapott sejtek, valamint az intakt sejtek proliferációját. Hat nappal később MTT-t adtunk minden kísérleti térhez, majd 4 óras inkubáció után a még élő sejtekben keletkező lila színű formazán kristályokat szolubilizáló oldatban feloldottuk. Egy nappal később Microplate Olvasóval (BioTek PowerWave XS Microplate Spectrophotometer) elvégeztük a mennyiségi meghatározást 550-600 nm közötti hullámhosszon. Referencia hullámhossznak a 690 nm-t vettük.

3. RNS izolálás

Az RNS izolálást 1×10^7 logaritmusos növekedési fázisban lévő sejtől végeztem el a Qiagen RNeasy Mini Kit reagenssel (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) az alább leírtak alapján. A szobahőmérsékleten lecentrifugált sejtekről a felülúszót leöntöttem, majd 600 µl guanidinsót tartalmazó RLT puffer és β-merkaptotanol (β-ME) 100:1 arányú elegyével a sejteket fecskendővel fel-le szívogatva homogenizáltam. Erre azért volt szükség, mert a β-ME a diszulfidkötések csökkentésével irreverzibilisen denaturálja az RNázokat, így megváltoztatva az enzim működéséhez szükséges natív konformációt. Az erős, guanidinium-izotiocianát tartalmú, de csupán időleges denaturáló hatással bíró RLT pufferrel való kombinációjával teljes mértékben

inaktiválható bármely, mintánkban jelenlévő RNáz. A lízis után minden mintához adtam 600 µl 70%-os etanolt, majd minden mintát rámerem 1-1 RNS izoláló oszlopra max. 700 µl mennyiségenként. 15 másodperc 10.000 rpm fordulatszámú centrifugálás után az átfolyó levet kiöntöttem, és az eljárást megismételtem a maradék mintával is. Ezután 700 µl guanidinsót tartalmazó RW1 puffert pipettáztam az oszlopra, és újból centrifugáltam az előzőek szerint. Ezt követően kétszer egymás után 500 µl, négyszeres mennyiségű etanollal hígított RPE puffert pipettáztam az oszlopra, ezt is centrifugáltam 2 percig 10.000 rpm fordulatszámon, a szilikamembrán száradásáig. Végezetül 2x30 µl RNáz-mentes desztillált vízzel oldottam le a membránról az RNS-t. A kész RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel mértem meg (BCM, Houston, TX, USA), majd felhasználásig -80°C-on tároltam.

4. Array hibridizáció

Az Affymetrix HG-U133A microarray-jel (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) 14.500 gén 18.400 transzkriptumának ill. variánsának expressziós szintje vizsgálható. Ez több mint 22.000 próba szettet és 500.000 elkülönült oligonukleotidot jelent. A cDNS szintézisét 5 mg total RNS-ből végeztük 5 pmol/ml HPLC-tisztítású T7- (dT)24 primerrel (MWG-Biotech, Ebersberg, Németország) 70°C-on 10 percen át. A reverz transzkripció és tisztítási folyamatok az Affymetrix protokollja szerint történtek (<http://www.affymetrix.com/index.affx>). A biotinnal-jelölt cRNS szintézisét BioArray High Yield RNA Transcription kittel végeztük (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY, USA). A cRNS koncentrációjának meghatározása UV-spektrofotométerrel, a fragmentek méretét LabChip-en ellenőriztük (BioAnalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

A fragmentált cRNS-t egy arra alkalmas hibridizációs készülékben ezekhez a microarray-ekhez hibridizáltuk 45°C-on 16 óra alatt. Ezt követően az array-ek mosása és festése történt a GeneChip fluidics station protocol EukGE-WS2 alapján, majd az array-eket a GeneChip System konfokális szkennere segítségével lefényképeztük későbbi elemzés céljából (Hewlett-Packard, Santa Clara, CA, USA). Minden sejtvonalhoz három array-t használtunk fel a szenzitív, rezisztens és 24 órán át kezelt

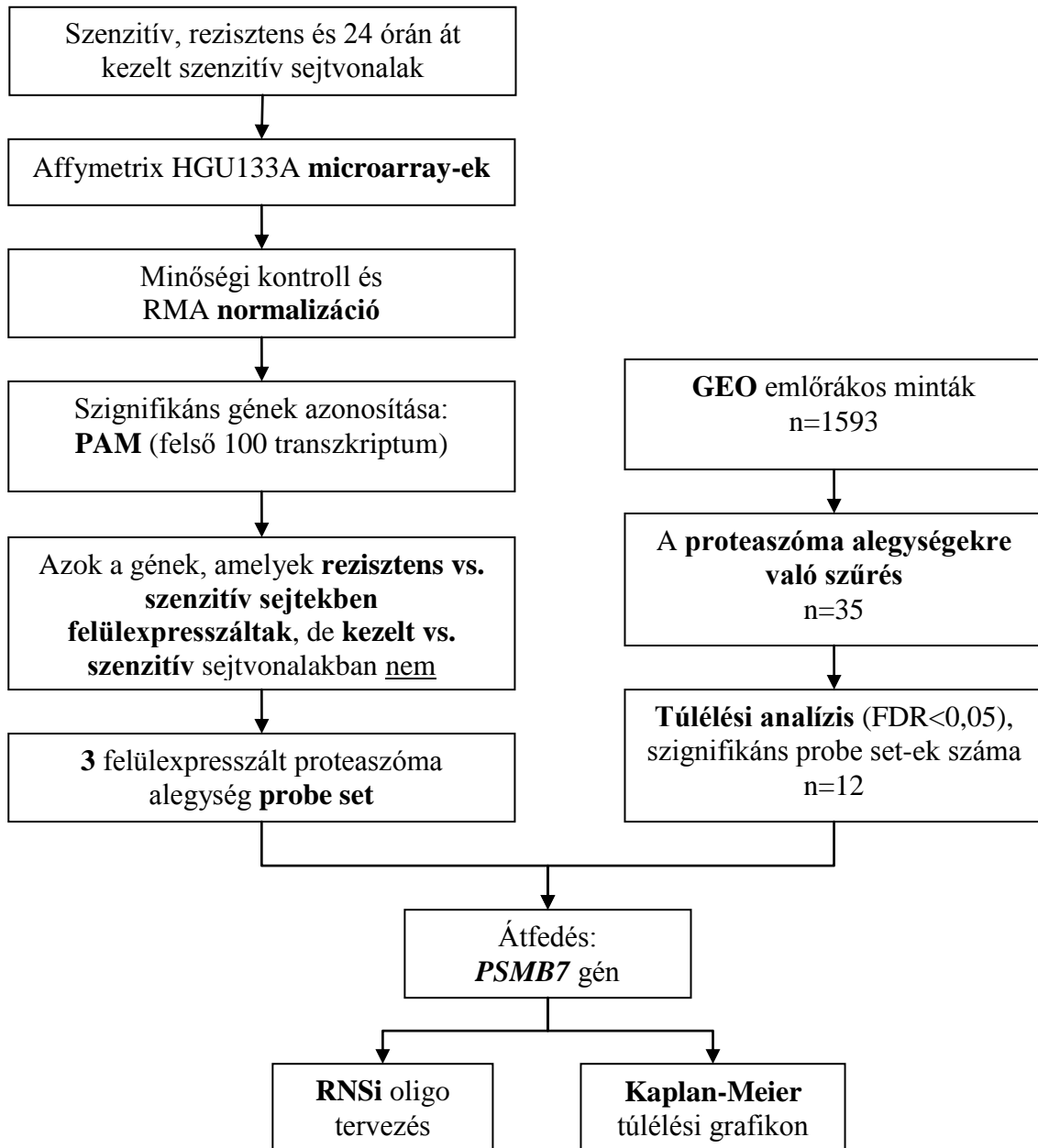
szenzitív vonaloknak megfelelően, így összesen 12 hibridizáció történt. A microarray adatok a GEO adatbázisból letölthetők (GSE3926).

5. Adatok feldolgoása, szignifikáns gének azonosítása

A minőségi vizsgálatot a The Tumor Analysis Best Practices Working Group javaslati alapján végeztük el (178). A szkennelt képeket tekintettük kiindulási alapnak. A hibridizációs intenzitások normalizálásához az array-ekhez specifikusan használható és nagy érzékenységgel bíró Robust Multichip Average-t (RMA) használtunk (179). Az adatfeldolgozást a Bioconductor programcsomaggal, R statisztikai környezetben végeztük.

A teljes adathalmazt három osztályba soroltuk a sejtvonalak rezisztenciája és kezeltsége alapján, majd összehasonlítottuk a gyógyszerre szenzitív, a doxorubicinnal/daunorubicinnal kezelt szenzitív és gyógyszerre rezisztens sejtvonalakat. Az egyes csoportok különbségét meghatározó géneket a Prediction Analysis for Microarrays (PAM v.1.23) programcsomaggal végeztük, amint azt korábban leírták (180). PAM módszer enyhe határértékeket használ egy ún. shrunken centroid meghatározására, amelynek eredményeképp erős diszkriminációs potenciállal rendelkező géneket kapunk. A végzett statisztikai tevékenységek áttekintését az 9. ábra mutatja be. A vizsgálat során önkényesen mindegyik összehasonlításból kiemeltük az első 100 gént, hogy megkapjuk a csoportokat leginkább meghatározó géneket. Azokra a génekre összpontosítottunk, amelyek különböznek a szenzitív és 24 órán át kezelt sejtvonalban (ezek tükrözik a rövidtávú gyógyszeres kezelés hatását) valamint a rezisztens és szenzitív sejtvonalakban (ezek a rezisztenciát meghatározó gének).

Hierarchikus klaszteranalízist végeztünk a Genesis programmal (181). Klaszterezés előtt az adatokat még egyszer normalizáltuk a gének szintjén, így minden transzkriptum átlagos expressziója 0 lett, hogy a gének expresszióinak növekedése ill. csökkenése összehasonlítható legyen. A gének annotációit a Netaffx Analysis Centre (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>) szolgáltatta.



9. ábra: A statisztikai analízis áttekintése. Az *in vitro* kísérleti elrendezésben szenzitív, rezisztens és 24 órán át gyógyszerrel kezelt szenzitív sejtvonalatokat microarray-hez hibridizáltunk. Normalizálás és szelekció után kiválasztottuk azokat a géneket, amelyek eltérő módon expresszálódnak rezisztens és szenzitív vonalak között, de kezelt és szenzitív vonalak között nem. Így 3 proteaszóma alegységet kaptunk, amelyek expressziója rezisztensben magasabb. Az *in silico* analízis során a GEO adatbázisból emlőrákos vonalak adatait töltöttük le ($n=1592$). A proteaszóma alegységekre való szűrés és a túlélési analízis kritériumait figyelembe véve egyetlen gén, a PSMB7 fedett át az *in vitro* analízisben kapott gének közül.

6. További in silico analízisek

A rezisztens vs. parentál összehasonlításban igen, de a rezisztens vs. kezeltben nem szereplő 100 legszignifikánsabb gén promoter szekvenciáin jelen lévő TFBS-eket vizsgáltuk. A vizsgálat során olyan további gének azonosítása volt a cél, amelyek direkt nem, de közvetve, a transzkripció regulálásán keresztül részt vehetnek a kemorezisztencia létrejöttében (182). A promoter szekvencián (1 kb upstream és 0,05 kb downstream a transzkripcionális kezdőponttól) lévő TFBS-eket azonosítottuk és hasonlítottuk össze gyakoriságukat a humán háttérmodellel a korábban már leírt módszer segítségével (183). Azonban szignifikánsan eltérő prevalenciával rendelkező TFBS-t nem találtunk.

7. Immunhisztokémia

A sejteket tárgylemezekre ülepítettük, majd jéghideg metanol–aceton 1:1 arányú keverékével fixáltuk. Az endogén peroxidáz aktivitását 1% H₂O₂-dal inkubálva blokkoltuk. Az immunhisztokémiai festést háromszoros ismétlésben végeztük az PSMB7 elsődleges antitest elleni poliklonális antiszérummal (1:200 oldás; GenWay Biotech, Inc., CA, USA). Ezt követően a tárgylemezeket anti-egér, -nyúl és -kecske elleni másodlagos biotinilált antitesttel inkubáltuk egy előre elkészített oldattal az LSAB+, HRP Kitből (DakoCytomation, Glostrup, Dánia); majd pedig előre feloldott streptavidin–biotinilált peroxidáz komplexszel (LSAB+, HRP, DakoCytomation) és a kromogén NovaRed-del (VectorLaboratories, Peterborough, UK) szobahőmérsékleten. Az antigénexpresszió intenzitását a Lucia-G/F digitális képalkotó rendszerével mértük (Nikon, Tokyo, Japán). Az átlagos telítettséget a mikroszkópon 4 látómezőből határoztuk meg 200-szoros nagyítás mellett. A sejtmagok láthatóvá tételére DAPI festést használtunk (40,6-diamidino-2-fenilindol).

8. siRNS oligok tervezése, szintetizálása

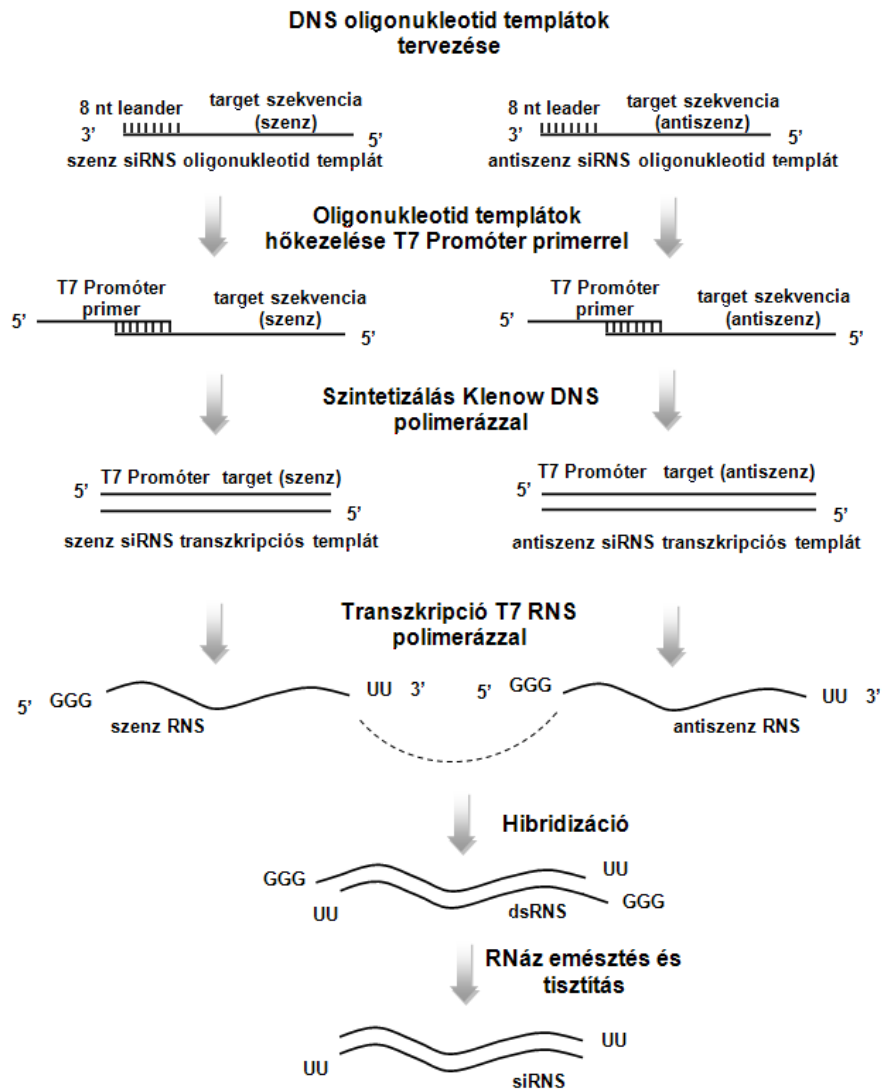
A *PSMB7* gén elcsendesítéséhez használt siRNS oligok célszakaszait a siRNA Target Finder (<http://www.ambion.com>) és siDESIGN Center (<http://www.dharmacon.com>) programok közös találatából választottam ki. A választott három cél mRNS-hez (200, 548 és 562 bp-nál hasítókat) megrendeltem páronként a szenz és antiszenz DNS oligonukleotid templátokat (Csertex Kft, Budapest, Magyarország), majd ezekből Silencer siRNA Construction Kitet használva (Applied Biosystems, Darmstadt, Németország) előállítottam az siRNS oligokat a később ismertetett módon. Érdeemes megjegyezni, hogy míg a legtöbb RNS interferenciás vizsgálat *Drosophilában*, *C. elegansban* és más nememlős sejtben az *in vitro* átírt RNS molekulák géncsendesítő hatását vizsgálta, az emlőssejtekben végzett korai siRNS vizsgálatok főleg kémiailag szintetizált RNS oligomereket használnak. Az általam is használt kémiailag szintetizált siRNS-ek alkalmazása valószínűleg azért kedvezőbb, mert a kémiai szintézisnek nincsenek szekvencia limitációi. Ezzel ellentétben a T7 RNS polimerázzal történő *in vitro* transzkripció során az RNS transzkriptum első két nukleotidjának GG-nek vagy GA-nak kell lennie a hatékony szintézis biztosítása érdekében (184). GG vagy GA végződés szükséges az siRNS mind a szenz, mind az antiszenz 5' végén, továbbá az UU végződés a 3' végen nagyban csökkenti a siRNS vizsgálat lehetséges céljainak számát. Ez a megszorítás lényegében kiküszöböli az *in vitro* transzkripciót, mint a siRNS preparáció egy járható útját. A szintézis folyamatát 3 fő lépésben hajtottam végre, amelyeket a következőkben részletezek:

1. A *transzkripció templát előkészítéséhez* a templát oligonukleotidokat nukleázmentes vízzel hígítottam, majd ezek koncentrációját meghatároztam NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel. A kapott µg/ml eredményt 9,7-tel osztva kaptam meg a templát moláris koncentrációját µM egységben. Ezt követően mindegyik nukleotidból 100µM oldatot készítettem nukleázmentes vízzel vagy TE-vel (10mM Tris-HCl pH=8, 1mM EDTA). A kit felolvasztott templát reagenseit használat előtt vortexelve minden templát oligonukleotidot hibridizáltam a T7 Promoter Primerhez: 2 µl T7 Promoter Primer, 6 µl DNA Hyb Buffer és 2 µl szenz vagy antiszenz templát oligonukleotid elegyét inkubáltam 70°C-on 5 percig, majd szobahőn ismét 5 percig. Ezután 2 µl 10X Klenow-Reaction Buffert, 2 µl 10X dNTP Mixet, 4 µl nukleázmentes vizet és 2 µl

Exo-Klenow reagenst adtam a csövekhez, majd kis centrifugálás után 30 perc 37 ± 2 °C-os inkubáció következett. Az így elkészített templátokat a dsRNS-szintézis megkezdéséig -20 °C-on tároltam.

2. A *dsRNS szintézis*hez szobahőn felolvasztott reagenseket vortexeltem (kivéve a T7 Enzyme Mixet), majd mindegyik siRNS-hez 2 reakcióban a megadott sorrendben összeraktam a transzkripcióhoz szükséges anyagokat: 2 µl szenz vagy antiszenz templát, amit az előzőekben elkészítettem, 4 µl nukleázmentes víz, 10 µl 2X NTP Mix, 2 µl 10X T7 Reaction Buffer és 2 µl T7 Enzyme Mix. Az összetevők kis centrifugálása után a kondenzáció megelőzésére 2 óra 37 °C-os inkubáció következett, majd a szenz és antiszenz transzkripciót összeöntve 37 °C-os overnight inkubációval maximalizáltam az RNS hozamot és segítettem a 2 szál hibridizációját.

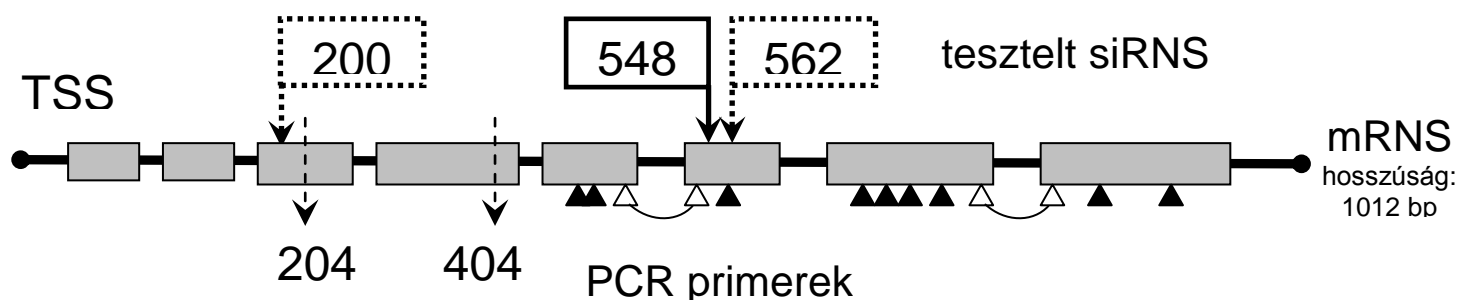
3. Ezután következett a kész *siRNS-ek emésztése RNázzal és DNázzal*, amelyet a következő módon hajtottam végre: a megjelölt sorrendben a dsRNS-eket tartalmazó tubushoz adtam 6 µl Digestion Buffert, 48,5 µl nukleázmentes vizet, 3 µl RNázt és 2,5 µl DNázt. Az elegyet összekeverés után 2 órán át inkubáltam 37 °C-on. A reakcióhoz 400 µl etanollal hígított siRNA Binding Buffer-t adtam, majd szobahőn inkubáltam 2-5perc-ig. Minden siRNS-hez előkészítettem egy 2 ml-s tubusra helyezett ún. Filter Cartridge-ot, amelynek szűrőjére 100 µl etanollal hígított siRNA Wash Buffert pipettáztam. A siRNA Binding Bufferban lévő siRNS-t ezután a Filter Cartridge-ra pipetázva 10.000 rpm-en centrifugáltam 1 percig. Az átfolyó levet kiöntve 500µl siRNA Wash Bufferrel kétszer lemostam a filtert 10.000 rpm-en 1 percig centrifugálva a csöveket, majd az átfolyó levet kiöntöttem a gyűjtőcsőből. Végző lépésként az elkészített siRNS-t 100 µl 70 °C-on előmelegített nukleázmentes vízzel oldottam le a filterről 2 perces szobahőmérsékleten való inkubációval, majd 12.000 rpm-en való centrifugálással. A létrehozott siRNS duplexek koncentrációját NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel mértem meg, majd hígítottam a későbbi vizsgálathoz. Felhasználásig a szintetizált siRNS-t -80 °C-on tároltam. Az siRNS-ek szintetizálásának folyamatát az 10. ábra mutatja be részletesen.



10. ábra: A tervezett siRNS oligok szintetizálásának folyamata (Ambion, siRNA Construction Kit). A szintetizálás alapjául két, 29 bp hosszúságú oligonukleotid templát szolgál, amely a 21 bp hosszúságú siRNS-t kódoló és a 8 bp T7 Promóter primerrel komplementer szakaszból áll. A két templát-oligonukleotidhoz külön-külön reakcióban szintetizáljuk a T7 promóter primert. A DNS oligonukleotidok hibridizált 3' végeit a DNS polimeráz Klenow fragmentjeivel meghosszabbítva duplaszálú siRNS transzkripció templátokat kapunk. A szenz és antiszenz siRNS templátokat a T7 RNS polimeráz átírja és a kapott RNS transzkriptumokból hibridizációval dsRNS-eket kapunk. A dsRNS az 5' végén szimplaszálú vezető (leader) szekvenciát tartalmaz, ezt követi a 19 bp hosszúságú célspecifikus dsRNS, UU végződéssel a 3' végen. A vezető szekvenciát egyszálú specifikus ribonukleázzal emésztve távolítjuk el a dsRNS-ről. A túlnyúló UU dinukleotid az siRNS-en marad, hiszen az RNáz nem hasítja az U reziduumokat. A megmaradt DNS templátokat ugyanekkor deoxiribonukleázzal tüntetjük el. A kapott siRNS-t üvegszálás szűrőn megkötve megtisztítjuk a felesleges nukleotidoktól, rövid oligomerektől, fehérjéktől és sóktól. A végeredmény egy 21 bp hosszúságú duplaszálú siRNS, a melynek 3' végén UU dimer található, így lesz a cél-mRNS elcsendesítése a leghatékonyabb az emlősejtekbe való transzfekciónál.













9. Az siRNS oligok hatékonyságának vizsgálata

A tervezett és szintetizált siRNS oligok hatékonyságának vizsgálatához siRNS transzfekeiót végeztem a gént felülexpresszáló doxorubicin-rezisztens MCF-7 emlőrák sejteken (MCF-7-RAdr). 230.000 sejtet ülepítettem egy 6-lyukú lemez egyes kísérleti tereibe, majd 5 ml SiPORT NeoFX transzfekeióos reagenssel (Applied Biosystems, Budapest, Magyarország) 10 nM végső koncentrációjú siRNS-t transzfekeióáltam 2,5 ml szérum- és antibiotikummentes médiumban. 24 órás inkubáció után a médiumot kétszeres steril PBS-sel való lemosást követően normál növekedési médiumra cseréltem. Ezt a transzfekeió után 48 órával RNS kivonás követte Qiagen RNeasy Mini Kit-tel a korábban ismertetett módon. A cDNS-szintézis és DNS-amplifikációhoz OneStep RT-PCR Kit-et és génspecifikus primereket használtam (Qiagen GmbH, Hilden, Németország). A PCR primereket a Primer3 programmal terveztem (<http://frodo.wi.mit.edu/>), a primerek kizárólagos génnel való homologitását az Pubmed adatbázis BLAST programjával igazoltam (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Az amplifikációhoz 24 ciklust végeztem, pozitív kontrollnak a β -aktin gént vettem. A PCR terméket etídium-bromiddal festett 2%-os agaróz gélen futtattam. A csendesítés mértékét Adobe Photoshop CS2 programmal számszerűsítettem. Az siRNS oligok hatékonyságát RT-PCR-rel vizsgáltam (3. táblázat). Három szintetizált siRNS oligoból egyetlen csendesítette hatékonyan (>80%) a *PSMB7* gént. A 11. ábra mutatja a szintetizált siRNS oligok és PCR primerek kötés helyeit a gén sematikus ábráján. Az egyetlen hatékony siRNS nevét folytonos vonallal kereteztem be.



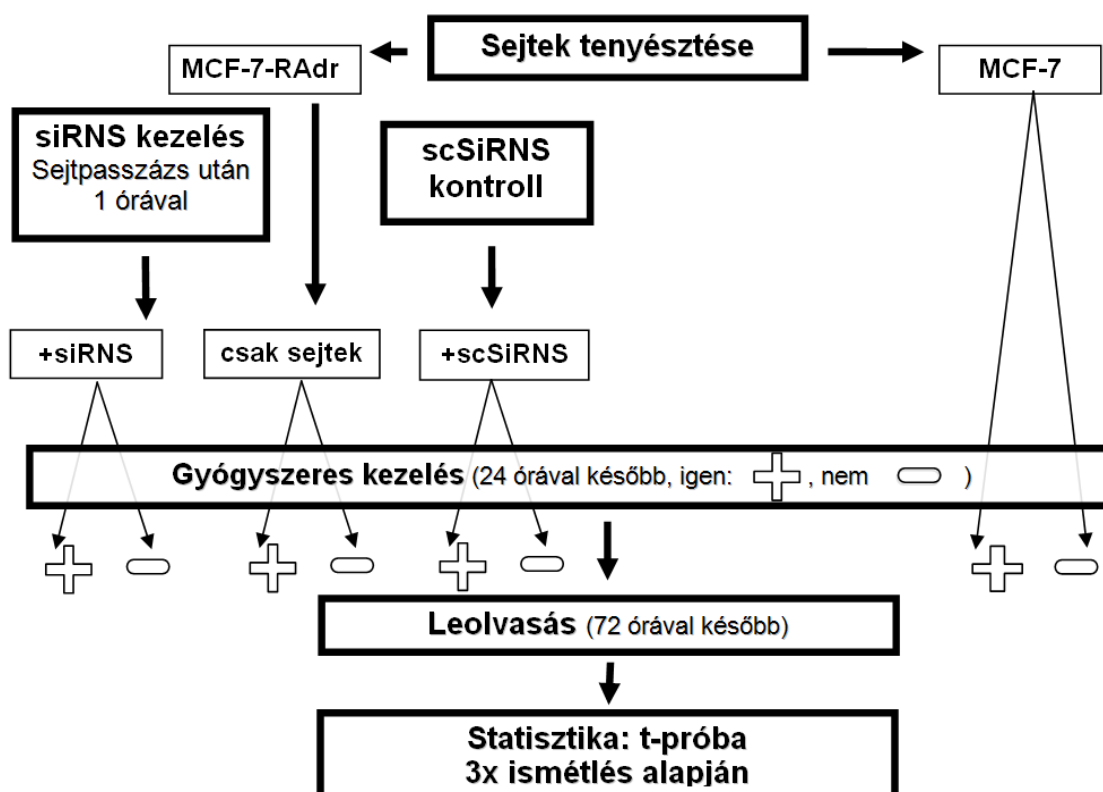
11. ábra: A 8-exonos *PSMB7* gén sematikus ábrája. A tesztelt siRNS oligok hasítási helyeit mutatják a nyilak (↓); a leghatásosabb siRNS-t folytonos vonallal határolva jelzem. A *PSMB7* génhez specifikusan tervezett PCR primerek kötődési helyeit az ábra alatt szaggatott nyíllal jelöltem (↓). Az Affymetrix HG-UI33A array a 200786_at probe set szekvenciáinak helyzetét teli ill. üres háromszögekkel jelöltem (▲ = match-próbák, △ = 2 szomszédos exonon átfedő junction-próbák).

3. táblázat: A tervezett siRNS oligok adatai. A 3 tervezett és szintetizált siRNS oligo közül csupán 1 (az 548 bp-nál hasító) csendesített hatékonyan az siRNS-kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. A β -aktint vettük belső kontrollnak mind a kezelt, mind a kezeletlen minták esetén. Az 548 bp-nál hasító siRNS esetén a csendesítés mértéke 87% volt.

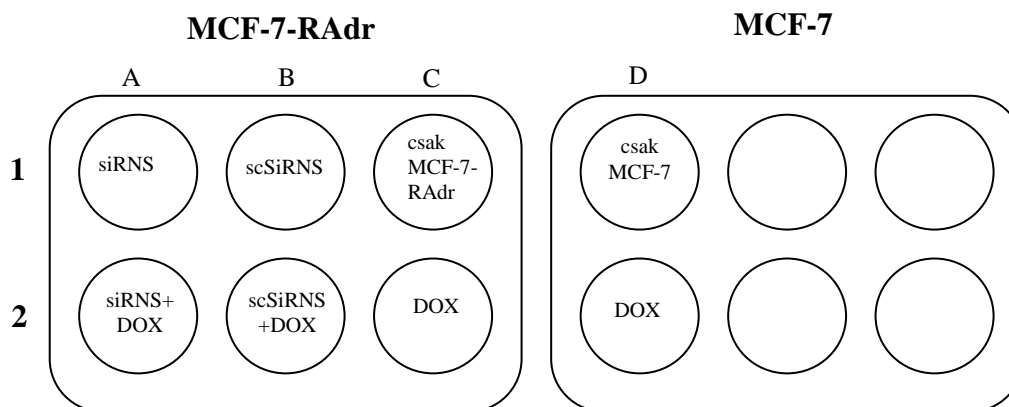
siRNS kapcsolódás helye (bp)	PSMB7		β -aktin		siRNS szekvenciája (5' → 3')
	Kontrol	PSMB7 siRNS	Kontrol	PSMB7 siRNS	
200					AAGAGCAACTGAAGGGATGGT
548					AATGGCTGTATTTGAAGATAA
562					AAGATAAGTTTAGGCCAGACA

10. Transzfekció és gyógyszeres kezelés

A választott gén kemorezisztenciában betöltött szerepének vizsgálatára ötvöztem a géncsökkentést a gyógyszeres kezeléssel. A rezisztens sejtekben felülexpresszált *PSMB7* gént MCF-7-RAdr sejtvonalban elcsökkentettem, majd transzfekció után 24 órával, médiumcserével megállítottam a reakciót. Az újonnan hozzáadott normál növekedési médium 0,2 mg/ml koncentrációban tartalmazta a gyógyszert. A sejteket a 3. napon tripszinizáltam és számoltam meg CASY DT sejtszámlálóval (Innovatis AG, Reutlingen, Németország). Kontrollnak negatív siRNS-sel kezelt (scRNS, AllStars Negative Control siRNA, Qiagen GmbH, Hilden, Németország) MCF-7-RAdr sejtek, siRNS-sel nem kezelt MCF-7-RAdr sejtek és siRNS-sel nem kezelt MCF-7 sejteket használtam, a doxorubicinnal kezelt párjukkal (12. ábra). A statisztikai analízishez a kísérlet végén élő sejtek számát vettem figyelembe minden egyes kísérleti körülménynél. A teljes vizsgálatot háromszor végeztem el, és minden kísérleti körülmény sejtszámát is háromszor mértem meg. A statisztikai analízishez a gyógyszerrel kezelt sejtek számát normalizáltam a kezeletlen párjuk számával, majd a csoportok közti különbség meghatározására t-tesztet végeztem. A szignifikanciaszintet $p=0,05$ -nél húztam meg. A kísérleti elrendezés a 13. ábrán látható.



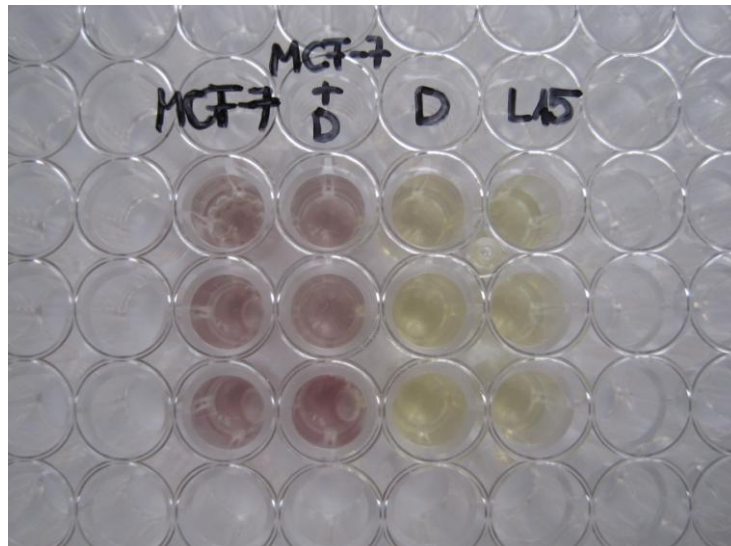
12. ábra: A kísérlet sémája: PSMB7 gén szerepének vizsgálata a doxorubicinnal szembeni rezisztencia vizsgálatában.



13. ábra: A vizsgálathoz használt 6-lyukú lemez kísérleti elrendezése. Az egyik lemezen rezisztens (MCF-7-RAdr) sejteket, a másikon szenzitív (MCF-7) sejteket ülepítettem. A rezisztens sejtek génspecifikus (1A), egy génnel sem homológ kontroll (1B) siRNS kezelést kaptak. Kontrollként a harmadik csoport siRNS-kezelést nem kapott (1C). Ezen három csoport megfelelői gyógyszeres kezelést is kaptak (2A, 2B, 2C). A kontrollnak használt MCF-7 sejtek siRNS-kezelést nem kaptak (1D), és egyiküket doxorubicin-kezelésben részesítettem (2D).

11. Doxorubicin autofluoreszcenciája

A doxorubicin fluoreszcens hidroxí-szubsztituált antrakinon kromofórja lehetővé teszi a szer lokalizációjának monitorozását (185), ugyanakkor felmerült, hogy az MTT eredményét befolyásolhatja. Az autofluoreszcencia a sejtproliferáció-mérést befolyásoló hatását a következőkben ismertetett kísérletben cáfoltam. 50.000 szenzitív MCF-7 sejtet ülepítettünk háromszoros ismétlésben egy 96-lyukú lemez kísérleti tereibe, amelyekben a következő 4 kísérleti körülményt hasonlítottuk össze: (1) doxorubicinnal kezelt sejtek, (2) kezeletlen sejtek, (3) doxorubicin és L15 médium sejtek nélkül, és (4) L15 médium sejtek nélkül. A doxorubicin-kezelést (0,2 mg/ml) az ülepítést követő napon végeztük 1,5 órás időtartamban. Az MTT-festés és az eredmények leolvasása az előbbieken leírtak alapján történt. Ebben az esetben prekontroll alkalmazására nem került sor, mert a cél nem a sejtproliferáció mérése, hanem a doxorubicin mérést befolyásoló hatásának vizsgálata volt. A 14. ábrán látható a leolvasás előtti lemez (a leolvasás a zárt spektrofotométerben zajlik, így az ábrán a normál fényben készült kép látható). A különbségek mérésére t-tesztet végeztünk.



14. ábra: A kísérleti elrendezésről készült kép, amely normál fényben mutatja a lemezt a spektrofotométeres leolvasás előtt. A szenzitív MCF-7-RAdr sejtek az első oszlopban (MCF-7), a doxorubicinnal kezelt MCF-7 sejtek a második oszlopban (MCF-7+D), a L15-t és doxorubicint tartalmazó lyukak a harmadik oszlopban (D) és a negyedik oszlopban a csak L15 médiumot tartalmazó lyukak láthatók (L15).

12. A gén jelentőségének igazolása klinikai mintákon

A gén *in silico* validálásához egy, a kutatócsoportunk által létrehozott, GEO microarray mintákat tartalmazó adatbázist használtunk fel (186). Az adatbázis a következő azonosítójú sorozatokat tartalmazta: GSE12276, GSE16391, GSE12093, GSE11121, GSE9195, GSE7390, GSE6532, GSE5327, GSE4922, GSE3494, GSE2990, GSE2034 és GSE1456. Az adatbázis összerakása a korábban már leírt módon történt (187).

A program használata során először kiszűrtem a proteaszóma alegységeket tartalmazó géneket (n=35), majd megnéztük mindegyik probe set túlélési analízisét a BRB Arraytools 3.8.0- β _1 programcsomaggal (Dr. Richard Simon and Amy Peng Lam fejlesztése, <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>). A téves elutasítási arány (false discovery rate, FDR) határát 0,05-nek szabtuk meg. A honlap segítségével a *PSMB7* expressziók mediánjánál nagyobb ill. kisebb csoportba sorolt betegekre Kaplan-Meyer túlélési analízist végeztem.

EREDMÉNYEK

1. A doxorubicin autofluoreszcenciája

A doxorubicin autofluoreszcenciáját vizsgálva az MTT eredményeken (4. táblázat), nem kaptunk különbséget a doxorubicinnal kezelt és kezeletlen sejtek között ($p=0,38$). A doxorubicin-tartalmú L15 médium fluoreszcenciája szignifikánsan különbözött a doxorubicinnal kezelt sejtektől ($p<0,01$), de nem különbözött a kezeletlen L15 médiumétól ($p=0,065$). Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a doxorubicin autofluoreszcenciája nem befolyásolta a sejtproliferáció mérés eredményét, és a későbbiekben használt, sejtproliferációt gátló doxorubicin-koncentrációk valószínűleg tekinthetők.

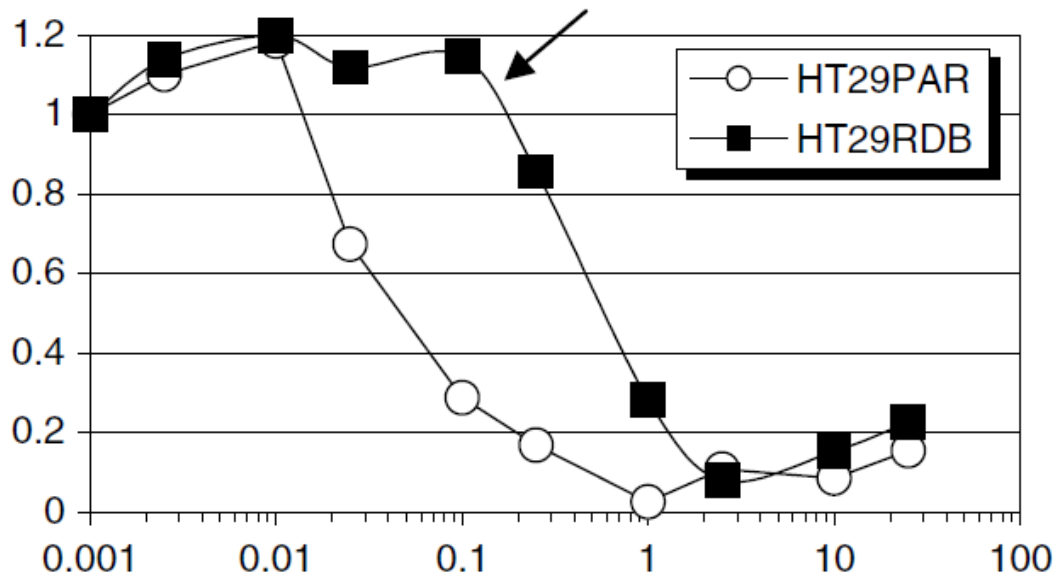
4. táblázat: A 14. ábrán látható lemez spektrofotométeres leolvasásával kapott, majd normalizált eredményeket mutatja a táblázat. Az átlagok alapján jól látszik, hogy a doxorubicinnal kezelt és kezeletlen szenzitív sejtek átlagai szignifikánsan nem különböznek egymástól ($p=0,38$), és nincs különbség a normál és doxorubicin-tartalmú L15 médium között sem ($p=0,065$). A doxorubicin-tartalmú médium viszont szignifikánsan eltér a gyógyszerrel kezelt sejtektől ($p<0,01$), tehát a doxorubicin autofluoreszcenciája a mérési eredményeinket nem befolyásolja.

	MCF-7	MCF-7+DOX	L15+DOX	L15
Mérés 1	0,585	0,6	0,057	0,075
Mérés 2	0,611	0,576	0,052	0,087
Mérés 3	0,63	0,63	0,08	0,08
Átlag	0,608	0,602	0,063	0,08

2. A sejtek doxorubicinnal szembeni rezisztenciájának igazolása

MTT sejtproliferációs méréssel bizonyítottuk, hogy a doxorubicinnal szemben rezisztens sejtek klinikai gyógyszerkoncentráció mellett a szenzitív párjukhoz képest proliferációt mutatnak. A 15. ábrán látható, hogy az szenzitív és rezisztens sejtek

prekontrollhoz normalizált proliferációja (ami arányos a relatív rezisztenciával) a klinikumban használt gyógyszerdózis (0,02 mg/ml) mellett eltérő. A görbe a rezisztens sejtek esetében jobbra tolt. A rezisztenciavizsgálatot minden vizsgált sejtvonalra elvégeztük. Az ábrán a HT-29 sejtvonal szenzitív (HT29PAR) ill. rezisztens (HT29RDB) származékának rezisztenciagörbéje látható.

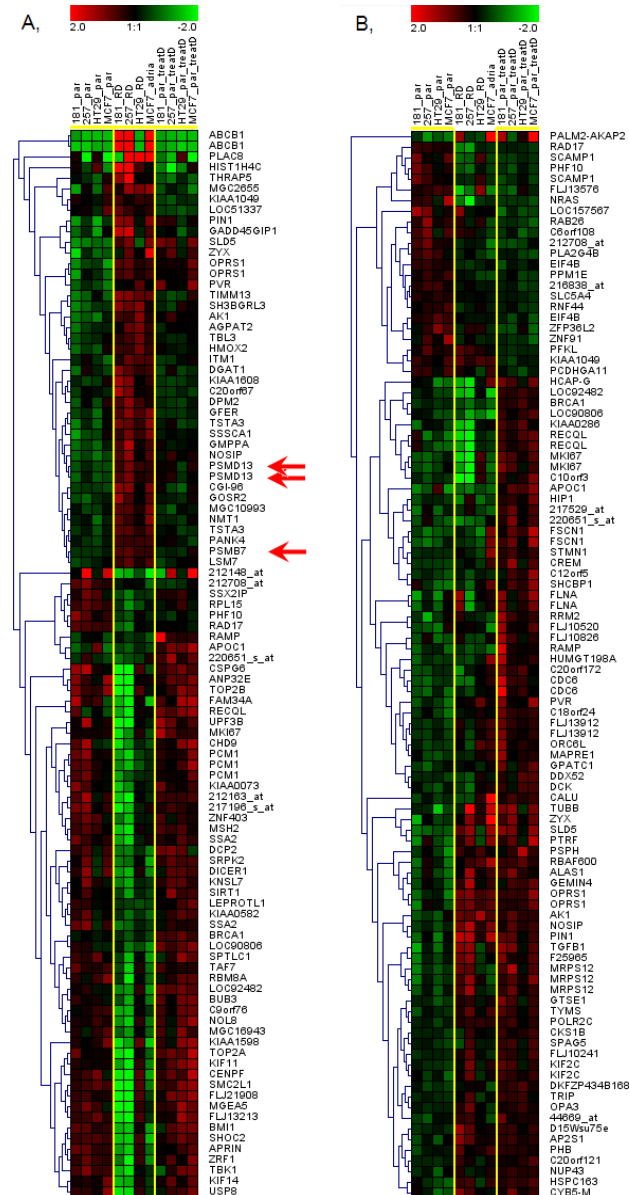


15. ábra: Szenzitív (HT29PAR) és rezisztens (HT29RDB) sejtvonalak proliferációja növekvő doxorubicin-koncentráció adagolása után. Az x-tengelyen logaritmikus skálán a klinikai koncentráció, míg az y-tengelyen a prekontrollhoz képest normalizált relatív rezisztencia látható. Jól látható, hogy a szenzitív sejtekhez viszonyítva a rezisztens sejtvonalak proliferációjának csökkenése nagyobb koncentráció esetén következik be. A nyíl jelzi azt a koncentrációt, amely már a rezisztens sejtekre is hatással van.

3. Gének azonosítása

A doxorubicin/daunorubicin-rezisztenciával összefüggő gének azonosításához a gyógyszerre rezisztens és szenzitív sejtvonalak génexpressziós profilját hasonlítottuk össze emlő-, hasnyálmirigy-, vastagbél- és gyomorráknál. A microarray vizsgálathoz az RNS-t kezeletlen szenzitív, 24 órán át gyógyszerrel kezelt szenzitív és folyamatosan doxorubicinban tartott rezisztens származékukból nyertük. Ez utóbbi esetben a doxorubicin koncentrációja a szenzitív sejtekre letális volt. A nyers adatokat tartalmazó adatbázis, és az Affymetrix .CEL fájlok a GEO adatbázisból letölthetőek (GSE3926). A microarray-ek predikciós analíziséhez kiválasztottuk az első 100 gént, amelyek expressziója szövettípustól függetlenül eltér az egyes kísérleti körülmények között. Az

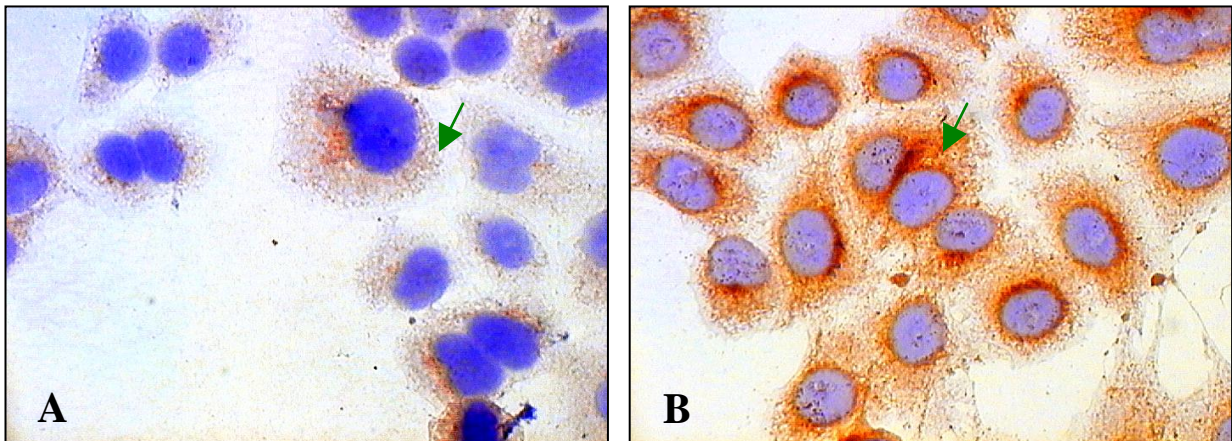
expressziós eltérések megjelenítésére a legfőbb géneket csoportokba rendeztük (16A és B ábra). Ezekben 3 olyan proteaszóma alegységet jelölő probe set volt, amelynek expressziója a doxorubicin-rezisztens sejtvonalakban nagyobb volt, de a doxorubicinnal 24 órán át kezelt szenzitív sejtekben nem (ld. 16A ábra nyilait).



16. ábra: A microarray-en kapott eltérő transzkriptumok: A, hierarchikus klaszteranalízis mindhárom csoport között (szenzitív, kezelt szenzitív, rezisztens sejtvonal) B, hierarchikus klaszteranalízis a szenzitív és kezelt szenzitív sejtvonalak között. A piros nyilak mutatják a rezisztenciával összefüggő génlistában szereplő 3 proteaszóma-alegységet.

4. Proteaszóma alegységek prognosztikus jellege

A GEO adatbázisból letöltött, túlélési adattal rendelkező 1592 emlőrákos minta normalizált génexpressziójából kiszűrtem a HG-U133A microarray-en jelenlévő proteaszóma alegységeket. A 35 alegység probe set-jeinek prognosztikus potenciálját úgy határoztuk meg, hogy a mediánhoz képest a betegeket alul- ill. felülexpresszált csoportokba soroltuk, így 531 beteg került minden csoportba). Az analízis eredményeképpen 12 szignifikáns gént kaptam $FDR < 0,05$ mellett. Ezek közül egyetlen alegységet mutatott ki a microarray analízis, a *PSMB7*-et, amit így tovább vizsgáltunk. Az immunhisztokémiai vizsgálat igazolta a *PSMB7* microarray-en megfigyelt felülexpresszióját (17A és B ábra).

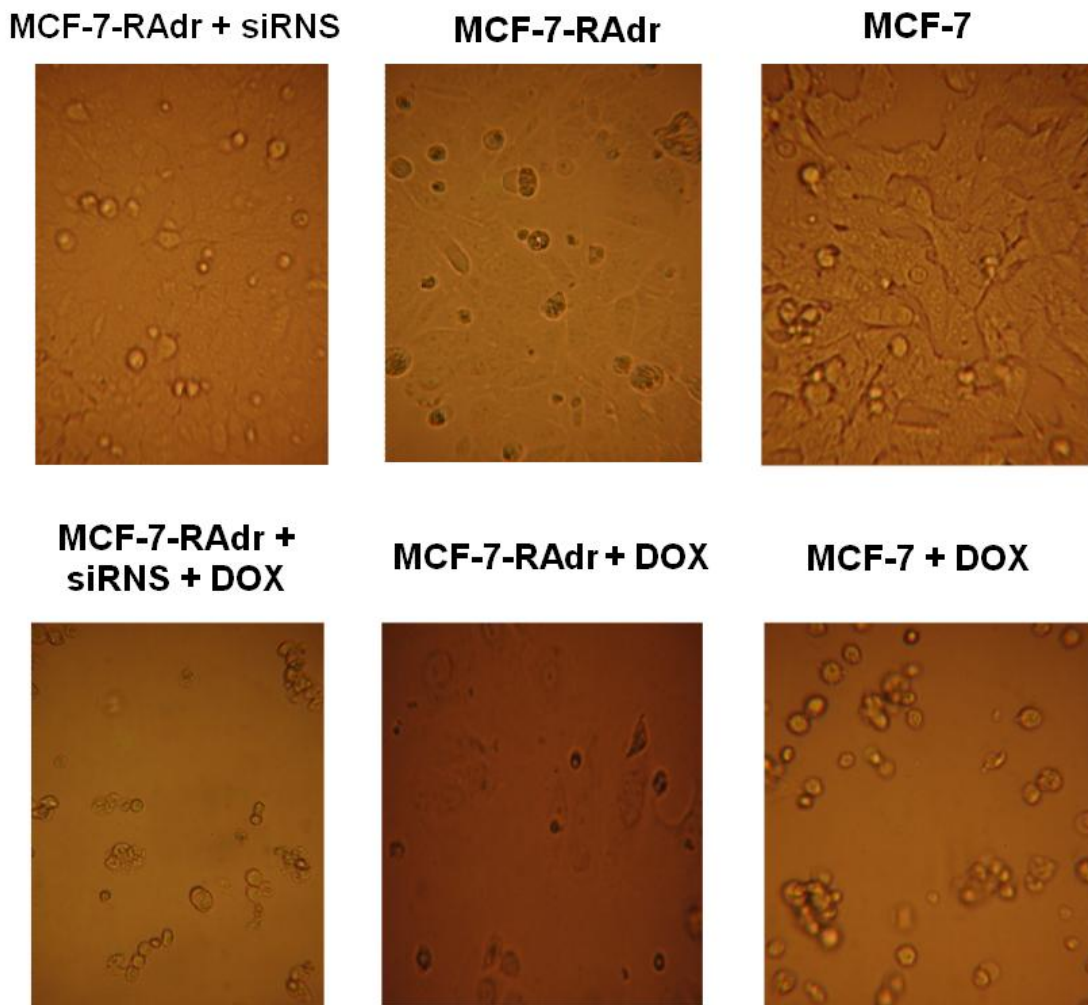


17. ábra: A *PSMB7* immunhisztokémiai lokalizációja szenzitív (A) és rezisztens sejtekben (B). A fehérje citoplazmában való felhalmozódása (zöld nyíl) a szenzitívekhez képest rezisztens sejtekben sokkal kifejezettebb.

5. A sejtek túlélése a géncsendesítés és doxorubicin-kezelés után

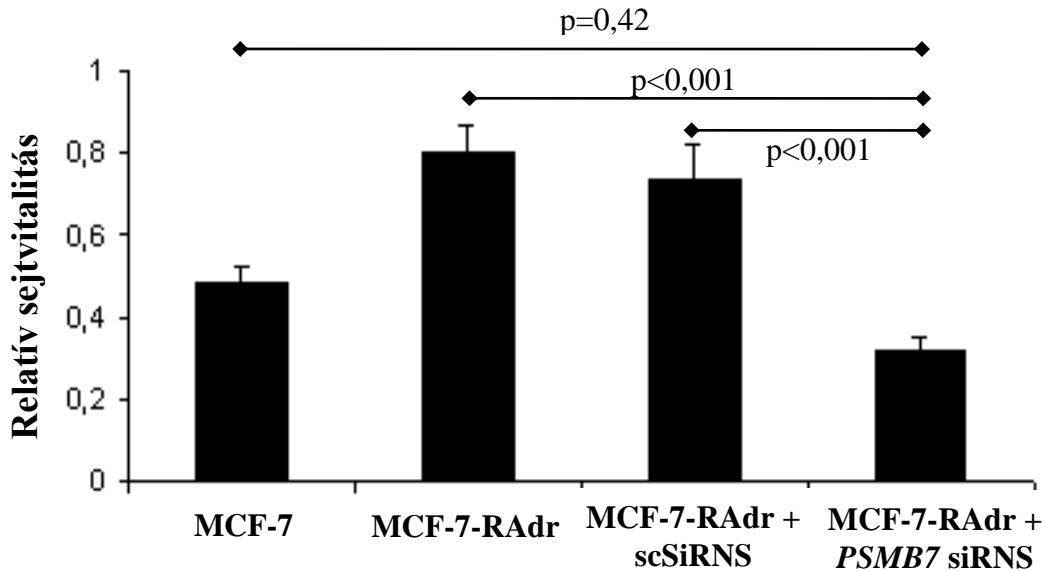
A *PSMB7* doxorubicin-rezisztenciában betöltött szerepének vizsgálatához a géncsendesítést ötvöztem a gyógyszeres kezeléssel, hogy megállapítsuk a sejtek túlélésére gyakorolt hatását. A sejtek életképessége doxorubicin-kezelés nélkül mind a siRNS-kezeletlen és siRNS kezelt körülmények között jobb volt, a doxorubicinnal

kezelt megfelelőjükhöz viszonyítva. A negatív kontrollnak használt siRNS citotoxikus hatása elhanyagolható volt a génspecifikus siRNS hatásához képest (18. ábra).



18. ábra: A doxorubicin-kezelés hatására a második sor sejtjeinek száma és morfológiája nagyban eltér az MCF-7 és az siRNS kezelésben részesített MCF-7-RAdr sejtek (MCF-7-RAdr+siRNS) esetén, míg az MCF-7-RAdr esetében a gyógyszeres kezelés hatására nincs markáns morfológiai és sejtszámbeli eltérés.

A normalizálás után kapott adatokat a 19. ábra mutatja be. A doxorubicin-kezelést a rezisztens sejtek $79,8 \pm 13,3\%$ -a, a géncsendesítés és kezelés kombinációját a sejtek csupán $31,8 \pm 6,4\%$ élte túl. Az siRNS-kezelt és -kezeletlen MCF-7-RAdr sejtek elsőfajú hibája doxorubicin kezelést követően $p < 0,001$ volt. Gyógyszeres kezelés után a szenzitív sejtek $48,3 \pm 8,1\%$ -a, a negatív kontrol siRNS-sel kezelt sejtek $73,3\%$ -a maradt életben.



19. ábra: A *PSMB7* gén csendesítésének hatása a doxorubicin-rezisztens MCF-7-RAdr sejtekre. A rezisztens és géncsenedesített rezisztens sejtek túlélése között szignifikáns különbséget kaptam ($p < 0,001$), míg a szenzitív és géncsenedesített rezisztens sejtek túlélése között különbséget nem találtam ($p = 0,42$).

6. *PSMB7* gén mint biomarker klinikai mintákon

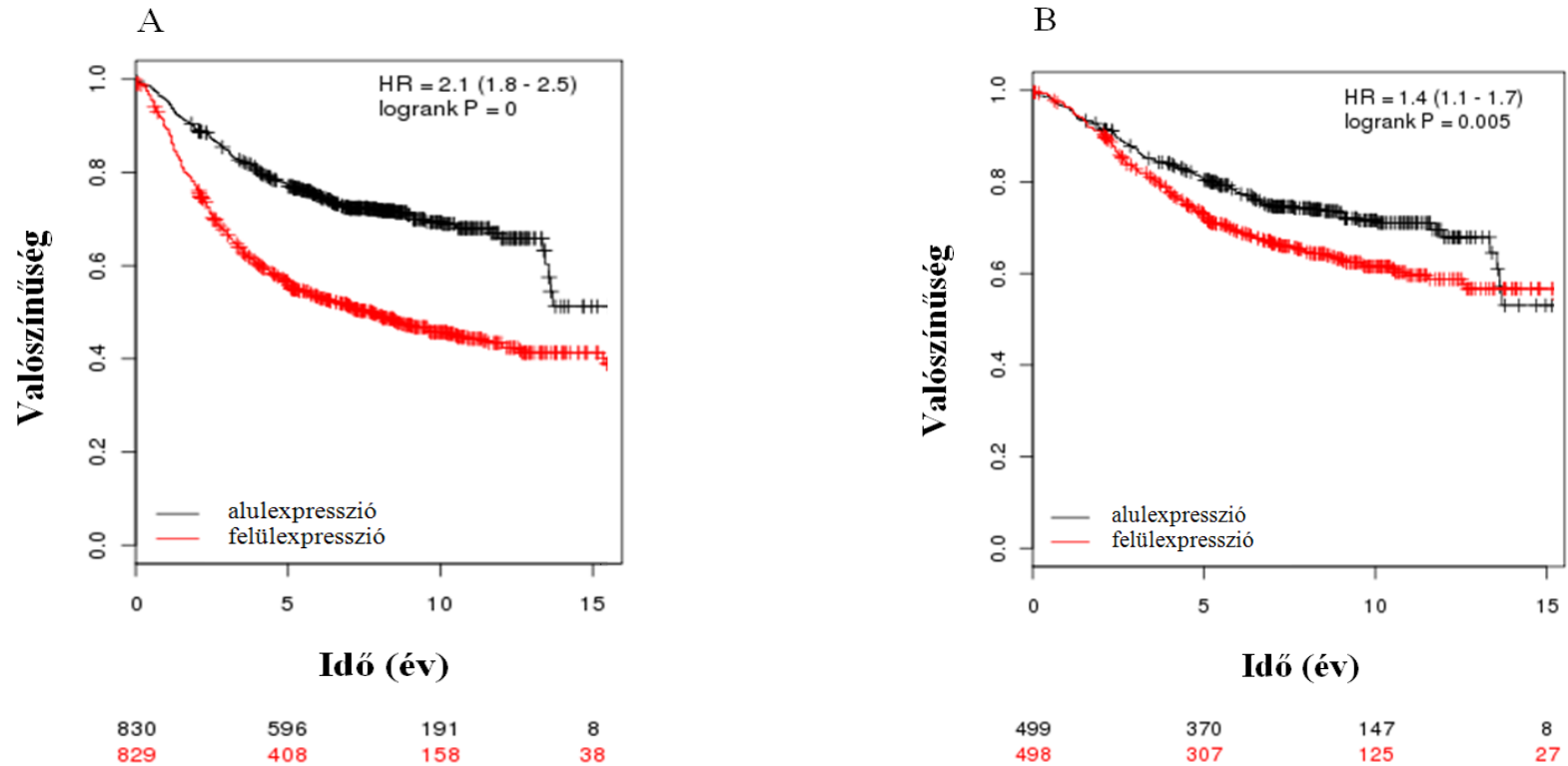
A *PSMB7* gén rezisztenciában való prognosztikus jellegének kimutatására klinikai mintákon igazoltam a sejtkultúrán bemutatott modellt. A betegek közül 1220-ból 968 beteg ER pozitív, 1156-betegből 190 nyirokcsomó pozitív volt. Az átlagos visszaesésmentes túlélés 6,42 év volt. A betegek túlélési adatait a 5. táblázat foglalja össze (188).

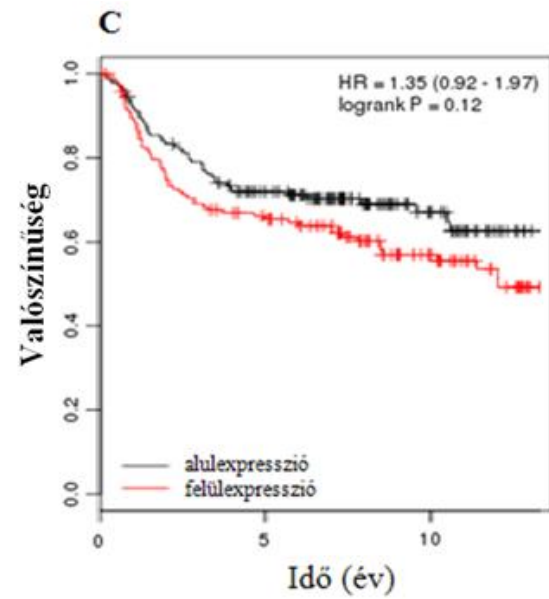
A *PSMB7* gén Affymetrix HG-U133A microarray 200786_at azonosítójú probe set-jének expressziója alapján az 1592 emlőrákos beteget 2 csoportba osztottam aszerint, hogy a mediánnál nagyobb vagy kisebb a *PSMB7* expressziójuk. Az eredmény szerint azoknak a betegeknek, akik a mediánnál magasabb expressziójú csoportba kerültek, szignifikánsan kisebb volt a túlélésük, mint a mediánnál alacsonyabb csoportba kerülteknek ($p < 0,001$, 20. ábra A). Ez a megállapítás érvényes ER+ ($p = 0,005$, 20B), nyirokcsomó negatív ($p < 0,001$ 20E) ill. grade 2 betegeket ($p = 0,005$, 20F) néztem. ER- ($p = 0,12$, 20C) ill. LN+ betegeknél ($p = 0,24$, 20D) hasonló összefüggés nem volt kimutatható. Az egyszerre ER+ és LN- betegek túlélése magas *PSMB7* gén expressziója esetén szintén kedvezőtlennek ígérkezik ($p = 0,002$, 20G), de az ugyanilyen, grade 2-es tumorú betegek esetén mindez már nem mondható el ($p = 0,15$, 20H ábra).

5. táblázat: Az *in silico* analízishez használt microarray vizsgálatok betegadatai (n=1592) (188). (NA= nincs adat).

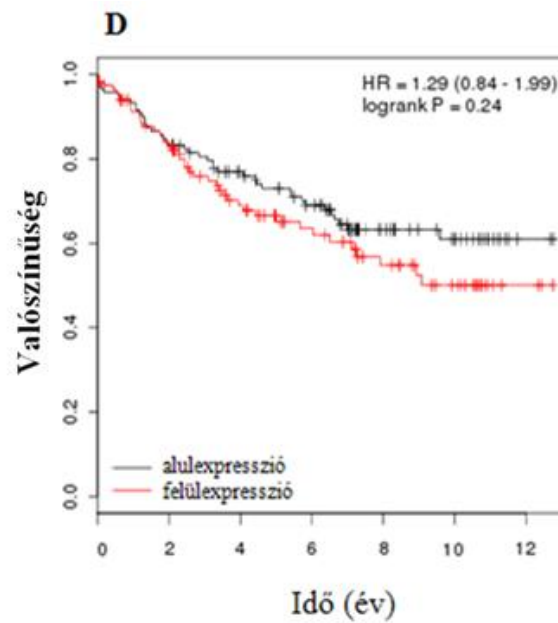
GEO azonosító	Platform	ER+	nyirokcsomó pozitivitás	visszaesések száma	átlagos visszaesés-mentes túlélés	Grade (1/2/3)	Életkor (év)	Tumor mérete (cm)
GSE12276	GPL570	NA	NA	204 (100%)	2,2 ± 1,8	NA	NA	NA
GSE16391	GPL570	55 (100%)	33 (60%)	55 (100%)	3,0 ± 1,2	2/35/18	61 ± 9	NA
GSE12093	GPL96	136 (100%)	0 (0%)	20 (15%)	7,7 ± 3,2	NA	NA	NA
GSE11121	GPL96	NA	0 (0%)	46 (23%)	7,8 ± 4,2	58/136/35	NA	2,1 ± 1
GSE9195	GPL570	77 (100%)	36 (47%)	13 (17%)	7,8 ± 2,5	14/20/24	64 ± 9	2,4 ± 1
GSE7390	GPL96	134 (68%)	NA	91 (46%)	9,3 ± 5,6	30/83/83	46 ± 7	2,2 ± 0,8
GSE6532	GPL96	70 (86%)	22 (27%)	19 (23%)	6,1 ± 3,1	0/54/1	64 ± 10	2,5 ± 1,2
GSE5327	GPL96	0 (0%)	NA	11 (19%)	6,8 ± 3,1	NA	NA	NA
GSE3494	GPL96	213 (85%)	84 (33%)	NA	NA	67/128/54	62 ± 14	2,2 ± 1,3
GSE2990	GPL96	73 (72%)	15 (15%)	40 (39%)	6,6 ± 3,9	27/20/36	58 ± 12	2,3 ± 1,1
GSE2034	GPL96	209 (73%)	0	107 (37%)	6,5 ± 3,5	NA	NA	NA
GSE1456	GPL96	NA	NA	40 (25%)	6,2 ± 2,3	28/58/61	NA	NA
<i>Összesen</i>		<i>967 (78%)</i>	<i>190 (15%)</i>	<i>689 (43%)</i>	<i>6,4 ± 4,1</i>	<i>197/534/312</i>	<i>57 ± 13</i>	<i>2,2 ± 1,1</i>

20. ábra: **A**, 1592 emlőrákos beteg Kaplan-Meyer predikciós túlélése a PSMB7 expresszió alapján, medián alatt (piros) vagy felett (fekete) csoportosítva (200786_at probe set). Az eredmények szerint a gént magasan expresszáló betegek túlélése szignifikánsan kisebb az alacsony expressziójúakhoz viszonyítva ($p < 0,001$). **B**, ER+ emlőrákos betegek Kaplan-Meyer predikciós túlélése a PSMB7 expresszió alapján. A gént magasan expresszáló betegek túlélése szignifikánsan alacsonyabb. **C**, ER- emlőrákos betegek predikciós túlélésére vonatkozóan nem kaptam szignifikáns eltérést a gént eltérő módon expresszáló csoportok között, hasonlóan a nyirokcsomó negatív betegekre sem (**D**). Nyirokcsomó negatív (**E**) valamint grade 2 (**F**) tumorok esetén a PSMB7 expresszió szintén befolyásolja a túlélést, és ez igaz az ER+ LN-betegekre is (**G**). ER+, LN- és grade 2 tumorokra a felülexpresszió nem társul rosszabb prognózissal (**H**).

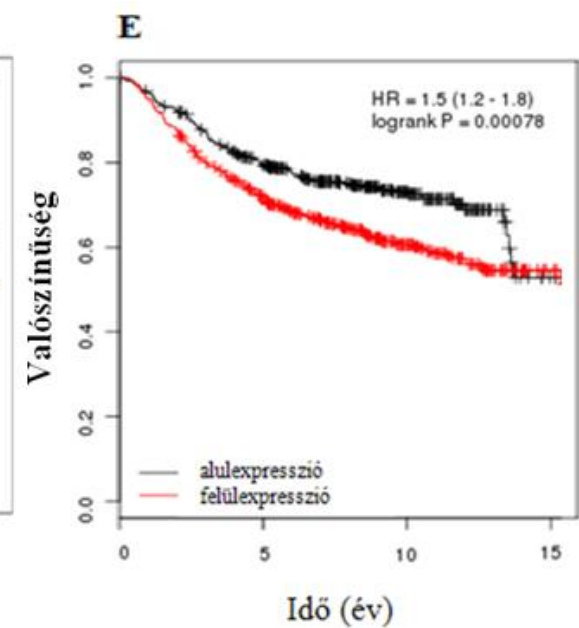




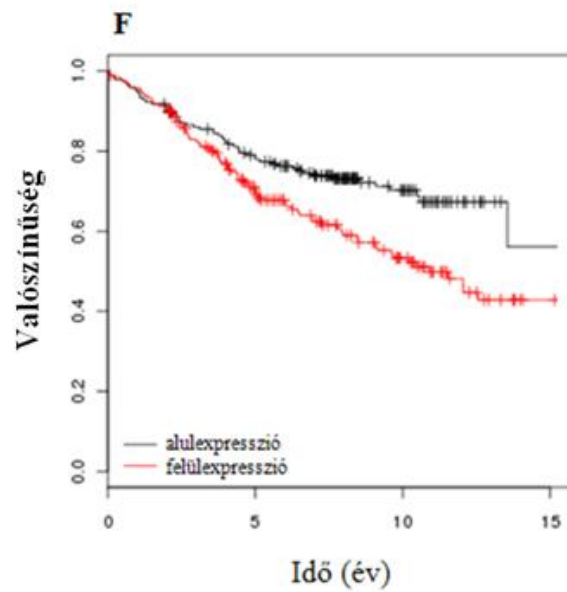
145	93	33
145	87	40



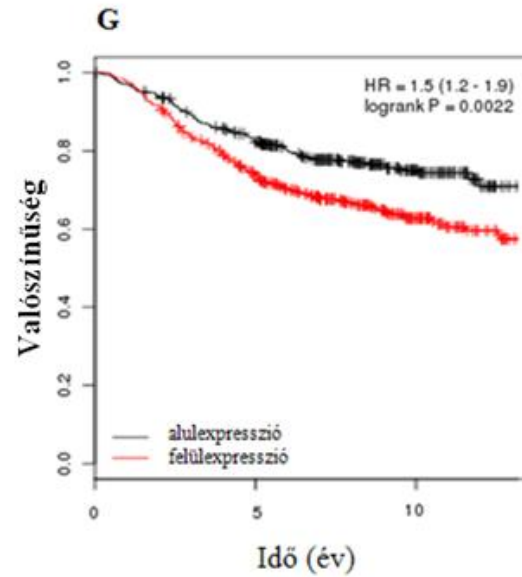
119	99	80	67	38	26	2
119	91	58	40	28	18	3



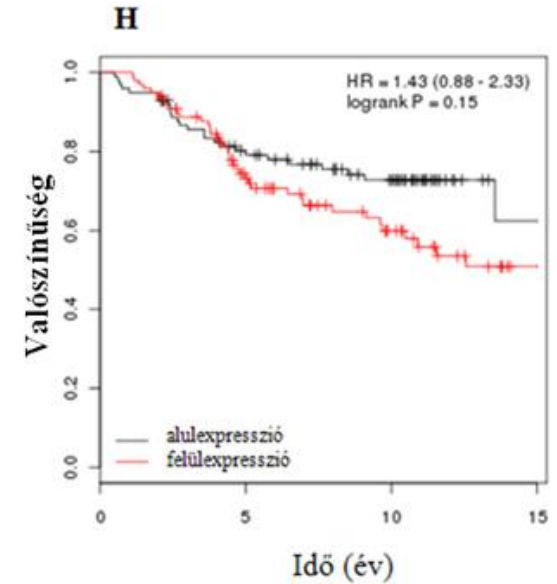
493	366	155	8
492	324	140	38



195	144	66	5
194	105	51	15



391	305	125
390	263	106



99	72	49	6
99	60	34	13

MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A PhD munkám során a proteaszóma PSMB7 alegységének szerepét vizsgáltam a gyógyszerrezisztenciában négy, különböző szöveti eredetű sejtvonalakon és emlőrákos betegeken. Mindezidáig semmilyen vizsgálat nem készült a gyógyszerrezisztencia és a PSMB7, sem valamely más proteaszóma alegység összefüggésére. Sejtkultúramodellen RNS interferencia és gyógyszeres kezelés kombinálásával igazoltam a gén kemorezisztenciában betöltött szerepét. 1592 emlőrákos beteg vizsgálatával rámutattam arra, hogy a gén felülexpressziója kisebb várható túlélést eredményez.

A vizsgálat kezdő lépéseként összehasonlítottunk 4 pár, különböző szöveti eredetű – gyomor, hasnyálmirigy, vastagbél és emlő - tumoros sejtvonal expressziós mintázatát. Minden sejtvonalnak a topoizomeráz enzim működését gátló daunorubicinra ill. doxorubicinra rezisztens, szenzitív, valamint 24 órás kezelésben részesült szenzitív származékait is hibridizáltuk Affymetrix HG-U133A microarray-hez. Végül, azonosítottuk a doxorubicin-/daunorubicin-rezisztenciával igen, de a rövidtávú kezelésre adott válasszal nem összefüggő géneket.

Eddig a microarray-alapú kemorezisztenciával összefüggő gének inkább a rezisztenciával való összefüggésre koncentráltak, és nem a gyógyszerre adott válasz és gyógyszerrel szembeni rezisztencia közti különbségre. Meglepő módon olyan gént találtunk a vizsgálatunk során, mint a proteaszóma alegységeket kódoló *PSMB7* és *PSMD13* gének, melyek funkcióját a rezisztenciamechanizmusban eddig nem írták le. Ezek közül csak a *PSMB7* expressziója tudta jelezni klinikai mintákon a túlélést, és így ezt vizsgáltuk tovább RNS interferenciával.

Karukstis és mtsai összehasonlító vizsgálatukban kimutatták, hogy a fluoreszcencia intenzitását és a fluoreszcens tartomány csúcspontját több tényező befolyásolhatja (185). Különböző oldószerekben vizsgálták a doxorubicin és a daunorubicin autofluoreszcenciáját például metanolban és etanolban, amelyeknél eltérő eredményeket kaptak. A mi vizsgálatunkban kizártuk a doxorubicin autofluoreszcenciájának eredményeinket befolyásoló hatását.

Az RNS interferencia jelenségét az 1990-es évek elején figyelték meg először petúnián (133, 189). A jelenséget nem sokkal később a *Neurospora crassa* gombán is

megfigyelték (134). Az RNS specifikus szerepét a génelcsendesítésben elsőként a Nematodák törzsébe tartozó *Caenorhabditis elegans* félégnél erősítették meg (120). Ma már számos felfedezés alapjául szolgál a módszer, és nagymértékben hozzájárul a genetikai információ kifejeződésének szabályozásában fontos szerepet játszó molekuláris rendszer megértéséhez.

A vizsgálatom során a hagyományos *in vitro* transzkripciós stratégiákkal ellentétben olyan siRNS templátot használtam, amelynek előnye, hogy maximális RNS hozam elérésére van optimalizálva, másodsorban pedig az siRNS szenz és antiszenz szálának transzkripciója és hibridizációja után a felesleges leader szekvencia szakaszok 1 lépésben eltávolíthatók a dsRNS preparáció során, kiküszöbölve annak szükségességét, hogy a T7 transzkripciójával kompatibilis cél-mRNS szekvenciát kelljen választani (10. ábra). A saját siRNS tervezésének nehézsége viszont, hogy a géncsendesítés sikerességében hosszú munka, kísérletezés, energia- és költségfordítás után sem lehetünk bizonyosak. A vizsgálatom során a 3 különböző helyen hasító, megtervezett és szintetizált siRNS közül csupán eggyel sikerült megfelelő géncsendesítést elérni (3. táblázat).

A humán *PSMB7* gén a proteaszóma (más néven prozóma) β gyűrűjének 7-es fehérjéjét kódolja. A mikroba *Haloarchaeon Haloferax Volcanii* növekedéséhez a proteaszóma 20S alegysége szükséges (190). A proteaszóma és tRNS módosító gének transzkripciója együtt történik, rávilágítva arra a tényre, hogy ugyanabban a fajban számos egyéb enzim is együtt szabályozódik a proteaszómával a transzkripció szintjén (191). A proteaszóma és immunológia vonatkozásában állatkísérleteket is végeztek, japán gömbhalon (192) és zebrahalon (193).

A proteaszóma megismerésének fontossága az elmúlt pár évben megnőtt, hiszen rendkívül fontos szerepe van a sejtciklus szabályozásában, apoptózisban és angiogenezisben szerepet játszó fehérje lebontásában. Mivel ezek az útvonalak alapvetőek a sejt túlélése és proliferációja szempontjából, különösen a rákos sejteknek, a proteaszóma gátlása minden bizonnyal egy jó kiindulási pont lehet a rákellenes terápiák tervezéséhez. A proteolízist a 20S proteaszóma vezérli, amely 28 alegységből áll, és 4 ún. heteroheptamer gyűrűből áll: sorban egymás után α , β , β , α gyűrűk, mindegyik 7-7 különböző alegységből (7. ábra). A proteaszóma katalitikus alegységei a β -1 (PSMB6), β -2 (PSMB7) és β -5 (PSMB5) fehérjék. Három további alegységet, a β -

1i (PSMB9), β -2i (PSMB10) és β -5i (PSMB8), a γ -interferon (IFNG) indukál és a beépülve a proteaszómába, immunproteaszómává alakítják azt. A PSMB11, vagy β -5t, egy katalitikus alegység, melyek a csecsemőmirigy kortikális epiteliális sejtjeiben expresszálódnak (194).

Az általunk vizsgált katalitikus alegység, a *PSMB7* gén szerepe a rák kialakulásában mindaddig a molekuláris biológia feltáratlan területe volt. A *PSMB7* gén a 9. kromoszómán a 9q34.11-q34.12 lokalizációban elhelyezkedő, 1012 nukleotid hosszúságú gén. Génterméke a β 2 alegységet kódolja, amely a proteaszóma fehérje bontásában a három közül az egyik proteolitikus bontóhely, a savas fehérje alkotók lebontásáért felel. Misszenz mutációját legújabban kapcsolatba hozták német dogok színmintázatának kialakulásával (195). A korábbi irodalmi adatokban proteomikai módszerekkel a *PSMB7* fehérje felülexpresszióját mutatták ki vastagbél adenokarcinomatózis daganatokban. Immunhisztokémia segítségével a heterogén tumorokban a fehérjét citoplazmatikus és a magi régióban észlelték. Ezek alapján a vastagbél daganatokban biomarkerként jelölték meg (196). Eang és mtsai különböző tumoros és nem tumoros sejtvonalakban a *PSMB7* foszforiláltságát vizsgálva megállapították, hogy a tumoros sejtvonalakban sokkal alacsonyabb a *PSMB7* foszforiláltsága. Ez alapján a gén foszforiláltságát lehetséges biomarkernek jelölték meg (197). A proteaszómagátlóhoz való alkalmazkodást követően a *PSMB5* expressziója megnőtt, de más proteaszóma alkotóké, mint a *PSMB7* géné nem változott (198). RNAi screen vizsgálatban a PSMA5, PSMB2, PSMB3, and PSMB7 proteaszóma alegységek gátlásával a bortezomibra való érzékenység növekedését tapasztalták (199). A proteaszóma alegységek szövetspecifikus jellegét kutatva kutatók egereket kezeltek 3H-1,2-ditiol-3-tionnal (D3T), amely rákmegelőző anyagként működik állati és humán vizsgálatokban egyaránt; 24 órával később a 20S katalitikus magja, a *PSMB5*, *PSMB6* és *PSMB7* expressziója növekedett az egerek májában, tüdejében, vékony- és vastagbélében (200). A proteaszóma katalitikus alegységeinek megemelkedett expressziója a proteaszómális peptidáz-aktivitás növekedéséhez vezetett ezekben a szövetekben. A D3T orális adagolása farmakodinamikus tevékenységhez vezetett az agy némely területein, és a proteaszómális peptidáz aktivitás szignifikánsan nőtt az agykéreg és hipocampus területén. *Ezek az eredmények is arra utalnak, hogy a megnövekedett*

proteaszóma expresszióinak funkciója lehet a fehérjecsoportosulást okozó rendellenességek elleni védelem és csillapítás terén (200).

A rezisztens sejtekben felülexpresszált *PSMB7* gén elcsendesítése után a sejtek 24 óra elteltével 0,2 mg/ml koncentrációban doxorubicin kezelést kaptak. A gyógyszer hatását követően a rezisztens sejtek túlélése jelentősen csökkent a nem-géncsendesített sejtekéhez képest ($p < 0,001$). Szignifikáns különbséget nem kaptam a génspecifikus és kontroll siRNS-sel kezelt rezisztens sejtek túlélésében a gyógyszeres kezelést követően. *Ezen eredmény szerint tehát a rezisztens sejtek a PSMB7 gén elcsendesítésével szenzitizálhatók, vagyis a gén felülexpressziója jelentős szereppel bírhat a doxorubicinnal szembeni rezisztencia meglétében.*

Amint azt az elmúlt évtizedben vizsgálták, az egyes gének felülexpressziója kapcsolatban állhat bizonyos szerekekkel szembeni rezisztenciával. Az *ABCB1* gén expressziója erősen korrelál a kemorezisztenciával (201-204), a *TOP2A* az antraciklin-rezisztencia egy lehetséges markere (86-88, 90). A methallotioneinek expressziója tamoxifen-rezisztenciához köthető (205), és a *Tau* gén a neoadjuváns paklitaxel terápia markere (91, 93). *E tanulmány kedvező kimenetele felveti annak valószínűségét, hogy a PSMB7 gén fontos feladattal bír a doxorubicin-rezisztenciában.*

Az *in vitro* megközelítés igazolására tovább vizsgáltam a *PSMB7* expressziójának megkülönböztetett szerepét 1592 nyilvánosan is elérhető microarray adatán. Jelenleg ez a legtöbb mintát tartalmazó vizsgálat, amely az emlőrákos betegek túlélési és génextpressziós adatait egyaránt tartalmazó adatbázison alapul (188). A betegeket 2 csoportba osztottam aszerint, hogy a *PSMB7* gént a mediánhoz viszonyítva felül- vagy alulexpresszálják. A két csoport túlélését tekintve jelentős különbséget kaptam: a gént felülexpresszáló betegek túlélése jóval kisebb a gént alulexpresszáló betegcsoporthoz képest ($p < 0,001$, 20A ábra). *Az eredmény szerint tehát a PSMB7 felülexpresszió rossz prognózisra utal, és az antraciklin-rezisztencia markere lehet.* ER+ ($p = 0,005$, 20B ábra), LN- ($p < 0,001$, 20E ábra), valamint grade 2 ($p = 0,005$, 20F ábra) betegek esetében a felülexpresszió szintén a rövidebb túlélés markere. A biztató eredményeket azonban fenntartással kell kezelni, mert a betegek kezeléséről nincs pontos információnk.

Egyelőre ismeretlen, hogy a *PSMB7* gén, ill. a proteaszóma fokozott működése milyen útvonalakon keresztül okozza a rezisztencia kialakulását. A proteaszóma-

inhibitorok hatásos antitumor aktivitást mutatnak a sejt kultúrákban, apoptózist indukálnak a szaporodás irányába ható sejt ciklusfehérjék szabályozott degradációjának megzavarása által (169). Ez a megközelítés a tumor sejtekben szelektíven indukált apoptózisnak bizonyítottan hatékony formája állatmodelleken és emberi kezelésben. A bortezomib a proteaszóma-inhibícióval növelheti a kemoszenzitivitását más szereknek, és legyőzheti a gyógyszerrezisztenciát is. A doxorubicin és a bortezomib kölcsönösen növeli egymás hatékonyságát (176). *Ezek alapján a magas PSMB7 expresszió valószínűleg az apoptotikus útvonalak gátlásán keresztül járul hozzá a tumor sejtek túléléséhez.*

A vizsgálati eredmények finomítására a jövőben az expressziós küszöbök pontos meghatározását egy *PSMB7* expressziót mérő RT-PCR és egy nagy klinikai utánkövetést is tartalmazó mintagyűjtemény finom összehangolásával lehetne elvégezni. Ezzel a klinikai gyakorlatban is meg lehetne erősíteni a gén megkülönböztetett erejét.

Felmerülhet bennünk az ötlet, hogy a felülexpresszált PSMB7 csendesítése kemoterápia része lehet majd a jövőben. Mégis, az ígéretes *in vitro* eredmények ellenére, a hatékony RNS interferencia feltételei *in vivo* még mindig nem teljesülnek. A legnagyobb akadály az RNS interferencia klinikai gyakorlatban való bevezetésében az, hogy a makromolekulák bejuttatása minden egyes ráksejtbe a célirányos és specifikus hatás érdekében még mindig nem megoldott. Számos tanulmányban sikeres *in vivo* eredményről számoltak be; ezekben az siRNS-t különböző stratégiákkal, mint pl. kationos fehérjékkel, nanopartikulumokkal, ciklodextrinnel, kitozánnal és kollagénnel való elvegyítéssel juttattak be (206). Xenograft egér modellen szintén sikerrel jártak több tanulmányban is (207-211). Az emberi szervezeteket illetően az RNSi már makuladegeneráció és respirációs szinciciális vírusfertőzésben klinikai gyakorlatban van, de a hatékony RNSi-bázisú tumorprogresszió-gátlás jelenleg nem ismert. Amint ez megoldhatóvá válik, számos kapu megnyílik az orvostudomány számára.

ÖSSZEFOGLALÁS

Bár a daganatok diagnosztizálásában bekövetkezett fejlődés következtében egyre specifikusabb ismereteink vannak a betegség jellemzői felől, a halálozások számát ez a változás nem csökkentette. Ennek elsődleges oka az alkalmazott gyógyszerrel szembeni egyedülálló rezisztencia, aminek kimutatása a kezelés megkezdése előtt biomarkerekkel lehetséges. A HER2 és ösztrogén receptorok (ER, PR) vizsgálata emlőrák hormonterápiájában már bevett gyakorlat, ez utóbbi petefészekrákos betegek teljes túlélés előrejelzésére is használható (187). A kutatóközösség ezek ellenére híján van olyan eszközöknek, amelyek a citosztatikumokkal szembeni rezisztencia kimutatására megoldást szolgáltatnának.

A doxorubicin egy antraciklin-származék, amelyet többek között emlődaganat kemoterápiájában is használnak. Microarray-vizsgálatokkal azonosítottuk azokat a géneket, amelyek expressziója eltér különböző eredetű, gyógyszerre rezisztens ill. szenzitív rákos sejtvonalakon. A *PSMB7* gén, amely a fehérjebontó proteaszóma alegysége, mindegyik doxorubicin-rezisztens sejtvonalban felülexpresszálódik. PhD munkám során e gén kemorezisztenciában betöltött szerepét vizsgáltam RNS interferenciával (212) sejtkultúrában és 1592 emlőrákos beteg *in silico* vizsgálatával.

A rezisztens MCF-7 emlőrákos sejtvonalban felülexpresszálódó *PSMB7* gén elcsendesítése után 24 órával a sejtek gyógyszeres kezelést kaptak, majd 72 óra múlva vizsgáltam a sejtek túlélését. Sikertelenül kimutatni, hogy a géncsökkentett rezisztens sejtvonalak a doxorubicin-kezelést kevésbé élték túl, mint a nem géncsökkentett társaik. Vitalitásuk szignifikánsan nem tért el azon szenzitív sejtektől, amelyek gyógyszeres kezelést kaptak. Ezt követően 1592 emlőrákos beteg adatán is igazoltam a gén kiemelt szerepét a visszaesésmentes túlélés előrejelzésében.

Összességében sikerült azonosítani egy olyan gént, amely minden bizonnyal jelentős feladattal bír a kemoterápiával szembeni rezisztencia kifejlődésében. A *PSMB7* gén elcsendesítésével a rezisztens sejteket a gyógyszerrel szemben szenzitivizáltuk, és igazoltam klinikai mintán is a gén kemorezisztenciában betöltött szerepét (213). Ezen eredmény felveti annak lehetőségét, hogy a *PSMB7* gént biomarkerként használják emlőrákos betegek kemoterápiával szembeni rezisztenciájának az előrejelzésében.

SUMMARY

While diagnosis of cancer has been developed from the 60's, number of deaths did not regress in our days. The root cause is the resistance against applied drug that can be detected by biomarkers so sorting out the ineffective treatment. HER2 and estrogen receptor (ER) are analyzed routinely in breast cancer for hormone therapy, and ER indicates overall survival in ovarian cancer patients also (187). So far biomarkers for prognosticating resistance against chemotherapy do not exist.

Doxorubicin is a derivative of anthracyclin used in breast and ovarian cancer, gastric solid tumors, lung cancer, leukemia's and lymphomas, Wilms-tumour, neuroblastoms and bladder cancer. With microarray we identified those genes whose expressions distinct in drug-sensitive and drug-resistant cancer cell lines of different origin. Gene *PSMB7* - encodes proteolytic peptide of proteasome - was overexpressed in all doxorubicin-resistant cell line. In my Thesis I examined the role of *PSMB7* gene in chemoresistance with RNA interference (212) on breast cancer cell lines and with survival data of 1592 breast cancer patients.

Doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cell line was used for knockdown of overexpressed *PSMB7* gene for *in vitro* analysis. 24 hours after transfection cells were treated by doxorubicin, and in the 72th hours cell viability was measured. According to the results, resistant cell lines with *PSMB7* knockdown died more than those without knockdown. Their vitality did not differ significantly from sensitive cells having doxorubicin treatment. After *in vitro* inspection, results were confirmed *in silico* with data of 1592 breast cancer patients.

In summary, I identified a gene playing significant role in development of resistance against chemotherapy. After knockdown of *PSMB7* gene resistant cells could have been sensitized to drug. In a huge database of breast cancer patients could have been also validated the power of gene in chemoresistance (213). This result raises an important issue to consider *PSMB7* gene as a biomarker that predicts resistance against chemotherapy in breast cancer.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

- **Munkácsy Gy, Abdul-Ghani R, Mihály Zs, Tegze B, Tchernitsa O, Surowiak P, Schäfer R, Győrffy B:** PSMB7 is associated with anthracycline resistance and is a prognostic biomarker in breast cancer. (Br J Canc. 2010 Jan 19;102(2):361-8. IF: 4,831)
- **Fekete T, Rásó E, Pete I, Tegze B, Liko I, Munkácsy Gy, Sipos N, Rigó J, Győrffy B:** Meta-analysis of gene expression profiles associated with histological classification and survival in 829 ovarian cancer samples. (2011, in press, IF: 4,926)
- **Győrffy A, Baranyai Zs, Cseh Á, Munkácsy Gy, Jakab F, Tulassay Zs, Győrffy B:** Promoter analysis suggests the implication of nf b/c-rel transcription factors in biliary atresia. (Hepatogastroenterology. 2008 Jul-Aug; 55(85):1189-92. IF: 0,68)
- **Munkácsy Gy, Tulassay Zs, Győrffy B:** RNS interferencia és klinikai alkalmazása. (Orv Hetil. 2007 Nov 25;148(47):2235-40.)

Független közlemények:

- **Győrffy B, Rosivall L, Prohászka Z, Falus A, Füst Gy, Munkácsy Gy, Tulassay T:** Danubian Biobank Konzorcium: a Duna-menti egyetemek „biobanking” tevékenységének az összehangolása. (Orv Hetil. 2007 Oct 21;148(42):1999-2002.)

Összesített IF: 10,437

IRODALOMJEGYZÉK

1.Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.

2.Sankhala KK, Pandya DM, Sarantopoulos J, Soefje SA, Giles FJ, Chawla SP. Prevention of chemotherapy induced nausea and vomiting: a focus on aprepitant. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009 Dec;5(12):1607-14.

3.....Giaccone G, Pinedo HM. Drug Resistance. *Oncologist.* 1996;1(1 & 2):82-7.

4.Luqmani YA. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract.* 2005;14 Suppl 1:35-48.

5.Chien AJ, Moasser MM. Cellular mechanisms of resistance to anthracyclines and taxanes in cancer: intrinsic and acquired. *Semin Oncol.* 2008 Apr;35(2 Suppl 2):S1-S14; quiz S39.

6.Gatti L, Zunino F. Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods Mol Med.* 2005;111:127-48.

7.Burkhart CA, Kavallaris M, Band Horwitz S. The role of beta-tubulin isotypes in resistance to antimetabolic drugs. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1471(2):O1-9.

8.McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Apr;1785(2):96-132.

9.Hasegawa S, Miyoshi Y, Egawa C, Ishitobi M, Taguchi T, Tamaki Y, et al. Prediction of response to docetaxel by quantitative analysis of class I and III beta-tubulin isotype mRNA expression in human breast cancers. *Clin Cancer Res.* 2003 Aug 1;9(8):2992-7.

10.Engi H. [Perspectives of inhibition of multidrug resistance during cancer chemotherapy, in vitro and in vivo experiments]. *Orv Hetil.* 2009 Mar 29;150(13):607-14.

11.Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jan;2(1):48-58.

12.Leonessa F, Clarke R. ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2003 Mar;10(1):43-73.

13.Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005 Jan;205(2):275-92.

14.Choudhuri BS, Sen S, Chakrabarti P. Isoniazid accumulation in *Mycobacterium smegmatis* is modulated by proton motive force-driven and ATP-dependent extrusion systems. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Mar 24;256(3):682-4.

15.Paridaens R, Biganzoli L, Bruning P, Klijn JG, Gamucci T, Houston S, et al. Paclitaxel versus doxorubicin as first-line single-agent chemotherapy for metastatic breast cancer: a European Organization for Research and Treatment of Cancer Randomized Study with cross-over. *J Clin Oncol*. 2000 Feb;18(4):724-33.

16.Kuo MT. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Jan;11(1):99-133.

17.Gottesman MM, Pastan I, Ambudkar SV. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev*. 1996 Oct;6(5):610-7.

18.Mickley LA, Spengler BA, Knutsen TA, Biedler JL, Fojo T. Gene rearrangement: a novel mechanism for MDR-1 gene activation. *J Clin Invest*. 1997 Apr 15;99(8):1947-57.

19.Trock BJ, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst*. 1997 Jul 2;89(13):917-31.

20.Larkin A, O'Driscoll L, Kennedy S, Purcell R, Moran E, Crown J, et al. Investigation of MRP-1 protein and MDR-1 P-glycoprotein expression in invasive breast cancer: a prognostic study. *Int J Cancer*. 2004 Nov 1;112(2):286-94.

21.Rudas M, Filipits M, Taucher S, Stranzl T, Steger GG, Jakesz R, et al. Expression of MRP1, LRP and Pgp in breast carcinoma patients treated with preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2003 Sep;81(2):149-57.

22.Burger H, Foekens JA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Wiemer EA, et al. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res*. 2003 Feb;9(2):827-36.

23.Schneider J, Lucas R, Sanchez J, Ruibal A, Tejerina A, Martin M. Modulation of molecular marker expression by induction chemotherapy in locally advanced breast cancer: correlation with the response to therapy and the expression of MDR1 and LRP. *Anticancer Res*. 2000 Nov-Dec;20(6B):4373-7.

24.Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Aug 16;92(16):1295-302.

25.Filipits M, Pohl G, Rudas M, Dietze O, Lax S, Grill R, et al. Clinical role of multidrug resistance protein 1 expression in chemotherapy resistance in early-stage breast cancer: the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 2005 Feb 20;23(6):1161-8.

26.Han B, Zhang JT. Multidrug resistance in cancer chemotherapy and xenobiotic protection mediated by the half ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2004 Jan;4(1):31-42.

27.Bunting KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells*. 2002;20(1):11-20.

28. Staud F, Pavek P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Apr;37(4):720-5.

29. Berger W, Steiner E, Grusch M, Elbling L, Micksche M. Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Jan;66(1):43-61.

30. Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJ, et al. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol.* 1996 Mar;148(3):877-87.

31. Pohl G, Filipits M, Suchomel RW, Stranzl T, Depisch D, Pirker R. Expression of the lung resistance protein (LRP) in primary breast cancer. *Anticancer Res.* 1999 Nov-Dec;19(6B):5051-5.

32. Kanzaki A, Toi M, Nakayama K, Bando H, Mutoh M, Uchida T, et al. Expression of multidrug resistance-related transporters in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 2001 Apr;92(4):452-8.

33. Schneider J, Gonzalez-Roces S, Pollan M, Lucas R, Tejerina A, Martin M, et al. Expression of LRP and MDR1 in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2001;3(3):183-91.

34. Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Shoemaker RH, Rome LH, Scheper RJ. Relationship of LRP-human major vault protein to in vitro and clinical resistance to anticancer drugs. *Cytotechnology.* 1996;19(3):191-7.

35. Deng HB, Parekh HK, Chow KC, Simpkins H. Increased expression of dihydrodiol dehydrogenase induces resistance to cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2002 Apr 26;277(17):15035-43.

36. Schulz C, Boeck S, Heinemann V, Stemmler HJ. UGT1A1 genotyping: a predictor of irinotecan-associated side effects and drug efficacy? *Anticancer Drugs.* 2009 Nov;20(10):867-79.

37. McLellan LI, Wolf CR. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance. *Drug Resist Updat.* 1999 Jun;2(3):153-64.

38. Gamcsik MP, Dubay GR, Cox BR. Increased rate of glutathione synthesis from cystine in drug-resistant MCF-7 cells. *Biochem Pharmacol.* 2002 Mar 1;63(5):843-51.

39. Kretz-Remy C, Mehlen P, Mirault ME, Arrigo AP. Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression. *J Cell Biol.* 1996 Jun;133(5):1083-93.

40. Ward NE, Pierce DS, Chung SE, Gravitt KR, O'Brian CA. Irreversible inactivation of protein kinase C by glutathione. *J Biol Chem.* 1998 May 15;273(20):12558-66.

41. Gyorffy B, Surowiak P, Kiesslich O, Denkert C, Schafer R, Dietel M, et al. Gene expression profiling of 30 cancer cell lines predicts resistance towards 11 anticancer drugs at clinically achieved concentrations. *Int J Cancer.* 2006 Apr 1;118(7):1699-712.

42. Dumontet C, Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J Clin Oncol.* 1999 Mar;17(3):1061-70.

43. Drukman S, Kavallaris M. Microtubule alterations and resistance to tubulin-binding agents (review). *Int J Oncol.* 2002 Sep;21(3):621-8.

44. Kamath K, Wilson L, Cabral F, Jordan MA. BetaIII-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability. *J Biol Chem.* 2005 Apr 1;280(13):12902-7.

45. Berrieman HK, Lind MJ, Cawkwell L. Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy? *Lancet Oncol.* 2004 Mar;5(3):158-64.

46. Paradiso A, Mangia A, Chiriatti A, Tommasi S, Zito A, Latorre A, et al. Biomarkers predictive for clinical efficacy of taxol-based chemotherapy in advanced breast cancer. *Ann Oncol.* 2005 May;16 Suppl 4:iv14-9.

47.Chu G. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J Biol Chem.* 1994 Jan 14;269(2):787-90.

48.Xu Z, Chen ZP, Malapetsa A, Alaoui-Jamali M, Bergeron J, Monks A, et al. DNA repair protein levels vis-a-vis anticancer drug resistance in the human tumor cell lines of the National Cancer Institute drug screening program. *Anticancer Drugs.* 2002 Jun;13(5):511-9.

49.Silber JR, Bobola MS, Blank A, Schoeler KD, Haroldson PD, Huynh MB, et al. The apurinic/apyrimidinic endonuclease activity of Ape1/Ref-1 contributes to human glioma cell resistance to alkylating agents and is elevated by oxidative stress. *Clin Cancer Res.* 2002 Sep;8(9):3008-18.

50.Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res.* 1996 Jul 1;56(13):3087-90.

51.Swanton C, Marani M, Pardo O, Warne PH, Kelly G, Sahai E, et al. Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs. *Cancer Cell.* 2007 Jun;11(6):498-512.

52.Dive C, Hickman JA. Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br J Cancer.* 1991 Jul;64(1):192-6.

53.Grunicke HH. Molecular basis of targeted chemotherapy: novel concepts with special reference to the treatment of Hodgkin's disease. *Ann Oncol.* 1998;9 Suppl 5:S125-8.

54.Burger H, Nooter K, Boersma AW, van Wingerden KE, Looijenga LH, Jochemsen AG, et al. Distinct p53-independent apoptotic cell death signalling pathways in testicular germ cell tumour cell lines. *Int J Cancer.* 1999 May 17;81(4):620-8.

55.Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* 2001 Aug 3;293(5531):876-80.

56.Miller WR. Biological rationale for endocrine therapy in breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004 Mar;18(1):1-32.

57.Laginha KM, Verwoert S, Charrois GJ, Allen TM. Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clin Cancer Res.* 2005 Oct 1;11(19 Pt 1):6944-9.

58.Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1999 Apr 1;57(7):727-41.

59.Sabourin M, Osheroff N. Sensitivity of human type II topoisomerases to DNA damage: stimulation of enzyme-mediated DNA cleavage by abasic, oxidized and alkylated lesions. *Nucleic Acids Res.* 2000 May 1;28(9):1947-54.

60.Minotti G, Licata S, Saponiero A, Menna P, Calafiore AM, Di Giammarco G, et al. Anthracycline metabolism and toxicity in human myocardium: comparisons between doxorubicin, epirubicin, and a novel disaccharide analogue with a reduced level of formation and [4Fe-4S] reactivity of its secondary alcohol metabolite. *Chem Res Toxicol.* 2000 Dec;13(12):1336-41.

61.Benjamin RS. Adriamycin and other anthracycline antibiotics under study in the United States. *Recent Results Cancer Res.* 1978;63:230-40.

62.Canellos GP, DeVita VT, Whang-Peng J, Chabner BA, Schein PS, Young RC. Chemotherapy of the blastic phase of chronic granulocytic leukemia: hypodiploidy and response to therapy. *Blood.* 1976 Jun;47(6):1003-9.

63.Martin M, Villar A, Sole-Calvo A, Gonzalez R, Massuti B, Lizon J, et al. Doxorubicin in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. FAC regimen, day 1, 21) versus methotrexate in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. CMF regimen, day 1, 21) as adjuvant chemotherapy for operable breast cancer: a study by the GEICAM group. *Ann Oncol.* 2003 Jun;14(6):833-42.

64.A'Hern RP, Smith IE, Ebbs SR. Chemotherapy and survival in advanced breast cancer: the inclusion of doxorubicin in Cooper type regimens. *Br J Cancer*. 1993 Apr;67(4):801-5.

65.Couch RD, Loh KK, Sugino J. Sudden cardiac death following adriamycin therapy. *Cancer*. 1981 Jul 1;48(1):38-9.

66.Saltiel E, McGuire W. Doxorubicin (adriamycin) cardiomyopathy. *West J Med*. 1983 Sep;139(3):332-41.

67.Gralow J, Rugo H, Gradishar W, O'Shaughnessy JA, Jahanzeb M, Perez E, et al. Novel taxane formulations in the treatment of breast cancer: a thought leader discussion and consensus roundtable. *Clin Breast Cancer*. 2008 Feb;8(1):33-7.

68.Muss HB, Case LD, Richards F, 2nd, White DR, Cooper MR, Cruz JM, et al. Interrupted versus continuous chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. The Piedmont Oncology Association. *N Engl J Med*. 1991 Nov 7;325(19):1342-8.

69.Arancia G, Calcabrini A, Meschini S, Molinari A. Intracellular distribution of anthracyclines in drug resistant cells. *Cytotechnology*. 1998 Sep;27(1-3):95-111.

70.Gyorffy B, Serra V, Jurchott K, Abdul-Ghani R, Garber M, Stein U, et al. Prediction of doxorubicin sensitivity in breast tumors based on gene expression profiles of drug-resistant cell lines correlates with patient survival. *Oncogene*. 2005 Nov 17;24(51):7542-51.

71.Smith L, Watson MB, O'Kane SL, Drew PJ, Lind MJ, Cawkwell L. The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. *Mol Cancer Ther*. 2006 Aug;5(8):2115-20.

72.Shim GS, Manandhar S, Shin DH, Kim TH, Kwak MK. Acquisition of doxorubicin resistance in ovarian carcinoma cells accompanies activation of the NRF2 pathway. *Free Radic Biol Med*. 2009 Dec 1;47(11):1619-31.

73.Maxwell SA, Li Z, Jaye D, Ballard S, Ferrell J, Fu H. 14-3-3zeta mediates resistance of diffuse large B cell lymphoma to an anthracycline-based chemotherapeutic regimen. *J Biol Chem*. 2009 Aug 14;284(33):22379-89.

74.Houldsworth J, Petlakh M, Olshen AB, Chaganti RS. Pathway activation in large B-cell non-Hodgkin lymphoma cell lines by doxorubicin reveals prognostic markers of in vivo response. *Leuk Lymphoma*. 2008 Nov;49(11):2170-80.

75.Li Y, Zou L, Li Q, Haibe-Kains B, Tian R, Desmedt C, et al. Amplification of LAPT4B and YWHAZ contributes to chemotherapy resistance and recurrence of breast cancer. *Nat Med*. 2010 Feb;16(2):214-8.

76.Ross JS, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. Standardizing slide-based assays in breast cancer: hormone receptors, HER2, and sentinel lymph nodes. *Clin Cancer Res*. 2007 May 15;13(10):2831-5.

77.Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol*. 2003 May 15;21(10):1973-9.

78.Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007 Oct 1;25(28):4414-22.

79.Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 May 15;89(10):4285-9.

80.Wiesner FG, Magener A, Fasching PA, Wesse J, Bani MR, Rauh C, et al. Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients. *Breast*. 2009 Apr;18(2):135-41.

81.Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983 Jan 15;31(1):13-20.

82.Broyde A, Boycov O, Strenov Y, Okon E, Shpilberg O, Bairey O. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol.* 2009 Jun;84(6):338-43.

83.Drach J, Gatringer C, Glassl H, Drach D, Huber H. The biological and clinical significance of the KI-67 growth fraction in multiple myeloma. *Hematol Oncol.* 1992 Mar-Apr;10(2):125-34.

84.Ueda T, Aozasa K, Tsujimoto M, Ohsawa M, Uchida A, Aoki Y, et al. Prognostic significance of Ki-67 reactivity in soft tissue sarcomas. *Cancer.* 1989 Apr 15;63(8):1607-11.

85.Miyabe S, Okabe M, Nagatsuka H, Hasegawa Y, Inagaki A, Ijichi K, et al. Prognostic significance of p27Kip1, Ki-67, and CRTCl-MAML2 fusion transcript in mucoepidermoid carcinoma: a molecular and clinicopathologic study of 101 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Jul;67(7):1432-41.

86.Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007 Nov 20;25(33):5287-312.

87.Mano MS, Rosa DD, De Azambuja E, Ismael GF, Durbecq V. The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-IIalpha and their importance to the biology of solid tumours. *Cancer Treat Rev.* 2007 Feb;33(1):64-77.

88.Molina R, Barak V, van Dalen A, Duffy MJ, Einarsson R, Gion M, et al. Tumor markers in breast cancer- European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biol.* 2005 Nov-Dec;26(6):281-93.

89.Pritchard KI. Are HER2 and TOP2A useful as prognostic or predictive biomarkers for anthracycline-based adjuvant chemotherapy for breast cancer? *J Clin Oncol.* 2009 Aug 20;27(24):3875-6.

90.Tanner M, Isola J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, Malmstrom P, et al. Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant

chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. *J Clin Oncol.* 2006 Jun 1;24(16):2428-36.

91.Andre F, Hatzis C, Anderson K, Sotiriou C, Mazouni C, Mejjia J, et al. Microtubule-associated protein-tau is a bifunctional predictor of endocrine sensitivity and chemotherapy resistance in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 1;13(7):2061-7.

92.Bhat KM, Setaluri V. Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007 May 15;13(10):2849-54.

93.Rouzier R, Rajan R, Wagner P, Hess KR, Gold DL, Stec J, et al. Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jun 7;102(23):8315-20.

94.Duffy MJ. Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? *Clin Chem.* 2006 Mar;52(3):345-51.

95.Dnistrian AM, Schwartz MK, Greenberg EJ, Smith CA, Schwartz DC. CA 15-3 and carcinoembryonic antigen in the clinical evaluation of breast cancer. *Clin Chim Acta.* 1991 Aug 30;200(2-3):81-93.

96.Hayes DF, Zurawski VR, Jr., Kufe DW. Comparison of circulating CA15-3 and carcinoembryonic antigen levels in patients with breast cancer. *J Clin Oncol.* 1986 Oct;4(10):1542-50.

97.Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 1996 Oct;14(10):2843-77.

98.Vizcarra E, Lluch A, Cibrian R, Jarque F, Alberola V, Belloch V, et al. Value of CA 15.3 in breast cancer and comparison with CEA and TPA: a study of specificity in disease-free follow-up patients and sensitivity in patients at diagnosis of the first metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;37(3):209-16.

99.Vizcarra E, Lluch A, Cibrian R, Jarque F, Garcia-Conde J. CA 15.3, CEA and TPA tumor markers in the early diagnosis of breast cancer relapse. *Oncology*. 1994 Nov-Dec;51(6):491-6.

100.Ren J, Agata N, Chen D, Li Y, Yu WH, Huang L, et al. Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell*. 2004 Feb;5(2):163-75.

101.Ebeling FG, Stieber P, Untch M, Nagel D, Konecny GE, Schmitt UM, et al. Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 2002 Apr 22;86(8):1217-22.

102.Molina R, Filella X, Alicarte J, Zanon G, Pahisa J, Munoz M, et al. Prospective evaluation of CEA and CA 15.3 in patients with locoregional breast cancer. *Anticancer Res*. 2003 Mar-Apr;23(2A):1035-41.

103.Molina R, Jo J, Filella X, Zanon G, Pahisa J, Munoz M, et al. c-erbB-2 oncoprotein, CEA, and CA 15.3 in patients with breast cancer: prognostic value. *Breast Cancer Res Treat*. 1998 Sep;51(2):109-19.

104.Galamb O, Molnar B, Tulassay Z. [DNA chips for gene expression analysis and their application in diagnostics]. *Orv Hetil*. 2003 Jan 5;144(1):21-7.

105.Galamb O, Sipos F, Fischer K, Tulassay Z, Molnar B. The results of the expression array studies correlate and enhance the known genetic basis of gastric and colorectal cancer. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005 Nov;68(1):1-17.

106.Sipos F, Galamb O, Molnar B, Tulassay Z. [Use of DNA-chips technology in colorectal cancer]. *Orv Hetil*. 2004 May 9;145(19):993-9.

107.Gyorffy A, Gyorffy B, Molnar B, Tulassay Z. [Hybridization and their application in the DNA array technology]. *Orv Hetil*. 2005 Jul 3;146(27):1447-52.

108.Ayers M, Symmans WF, Stec J, Damokosh AI, Clark E, Hess K, et al. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and

fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Jun 15;22(12):2284-93.

109.Cleator SJ, Powles TJ, Dexter T, Fulford L, Mackay A, Smith IE, et al. The effect of the stromal component of breast tumours on prediction of clinical outcome using gene expression microarray analysis. *Breast Cancer Res*. 2006;8(3):R32.

110.Folgueira MA, Carraro DM, Brentani H, Patrao DF, Barbosa EM, Netto MM, et al. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Oct 15;11(20):7434-43.

111.Gianni L, Zambetti M, Clark K, Baker J, Cronin M, Wu J, et al. Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 10;23(29):7265-77.

112.Hess KR, Anderson K, Symmans WF, Valero V, Ibrahim N, Mejia JA, et al. Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Sep 10;24(26):4236-44.

113.Kang HC, Kim IJ, Park JH, Shin Y, Ku JL, Jung MS, et al. Identification of genes with differential expression in acquired drug-resistant gastric cancer cells using high-density oligonucleotide microarrays. *Clin Cancer Res*. 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):272-84.

114.Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R, et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet*. 2003 Aug 2;362(9381):362-9.

115.Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet*. 2000 Mar;24(3):236-44.

116.Szakacs G, Annereau JP, Lababidi S, Shankavaram U, Arciello A, Bussey KJ, et al. Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell*. 2004 Aug;6(2):129-37.

117.Hofmann WK, de Vos S, Elashoff D, Gschaidmeier H, Hoelzer D, Koeffler HP, et al. Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *Lancet*. 2002 Feb 9;359(9305):481-6.

118.Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, Kazemier KM, et al. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med*. 2004 Aug 5;351(6):533-42.

119.Wittig R, Nessling M, Will RD, Mollenhauer J, Salowsky R, Munstermann E, et al. Candidate genes for cross-resistance against DNA-damaging drugs. *Cancer Res*. 2002 Nov 15;62(22):6698-705.

120.Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.

121.Vaucheret H, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, et al. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J*. 1998 Dec;16(6):651-9.

122.Sharp PA. RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev*. 1999 Jan 15;13(2):139-41.

123.Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001 Jan 18;409(6818):363-6.

124.Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000 Mar 16;404(6775):293-6.

125. Fire A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet*. 1999 Sep;15(9):358-63.

126.Racz Z, Hamar P. Can siRNA technology provide the tools for gene therapy of the future? *Curr Med Chem*. 2006;13(19):2299-307.

127.Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13959-64.

128.Kumar M, Carmichael GG. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Dec;62(4):1415-34.

129.Sijen T, Plasterk RH. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature*. 2003 Nov 20;426(6964):310-4.

130.Affar el B, Gay F, Shi Y, Liu H, Huarte M, Wu S, et al. Essential dosage-dependent functions of the transcription factor yin yang 1 in late embryonic development and cell cycle progression. *Mol Cell Biol*. 2006 May;26(9):3565-81.

131.Engels BM, Hutvagner G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene*. 2006 Oct 9;25(46):6163-9.

132.Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14687-92.

133.Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 1990 Apr;2(4):279-89.

134.Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol*. 1992 Nov;6(22):3343-53.

135.Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, Selker EU, Macino G. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J*. 1996 Jun 17;15(12):3153-63.

136.Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*. 1998 Dec 23;95(7):1017-26.

137.Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol*. 2000 Feb;2(2):70-5.

138.Bumcrot D, Manoharan M, Koteliensky V, Sah DW. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol*. 2006 Dec;2(12):711-9.

139.MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol*. 2005 Jun;7(6):591-600.

140.Pulukuri SM, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Estes N, Gujrati M, et al. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem*. 2005 Oct 28;280(43):36529-40.

141.Gurzov EN, Izquierdo M. RNA interference against Hec1 inhibits tumor growth in vivo. *Gene Ther*. 2006 Jan;13(1):1-7.

142.Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res*. 2005 Oct 1;65(19):8984-92.

143.Landen CN, Jr., Chavez-Reyes A, Bucana C, Schmandt R, Deavers MT, Lopez-Berestein G, et al. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res*. 2005 Aug 1;65(15):6910-8.

144.Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther*. 2006 Mar;13(6):464-77.

145.Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):173-8.

146.Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*. 1997 Jun 6;276(5318):1558-60.

147.Vaucheret H, Beclin C, Fagard M. Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci*. 2001 Sep;114(Pt 17):3083-91.

148.Tan EL, Tan TM, Chow VT, Poh CL. Enhanced potency and efficacy of 29-mer shRNAs in inhibition of Enterovirus 71. *Antiviral Res*. 2007 Apr;74(1):9-15.

149.Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*. 2002 Jul 25;418(6896):435-8.

150.Rossi JJ. RNAi as a treatment for HIV-1 infection. *Biotechniques*. 2006 Apr;Suppl:25-9.

151.Ying C, De Clercq E, Neyts J. Selective inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Sep 19;309(2):482-4.

152.Ge Q, McManus MT, Nguyen T, Shen CH, Sharp PA, Eisen HN, et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 4;100(5):2718-23.

153.Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med*. 2004 Aug;10(8):816-20.

154.Raoul C, Barker SD, Aebischer P. Viral-based modelling and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference. *Gene Ther*. 2006 Mar;13(6):487-95.

155.Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 1999 Dec 15;13(24):3191-7.

156.Michels S, Schmidt-Erfurth U, Rosenfeld PJ. Promising new treatments for neovascular age-related macular degeneration. *Expert Opin Investig Drugs.* 2006 Jul;15(7):779-93.

157.DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, Cehelsky J, Nochur S, Walsh E, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 May 11;107(19):8800-5.

158.Snove O, Jr., Nedland M, Fjeldstad SH, Humberstet H, Birkeland OR, Grunfeld T, et al. Designing effective siRNAs with off-target control. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Dec 17;325(3):769-73.

159.McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P. Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Aug;2(8):589-94.

160.Groll M, Heinemeyer W, Jager S, Ullrich T, Bochtler M, Wolf DH, et al. The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):10976-83.

161.Goldberg AL. Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. *Science.* 1995 Apr 28;268(5210):522-3.

162.Etlinger JD, Goldberg AL. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Jan;74(1):54-8.

163.Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:425-79.

164.Goldberg AL, Stein R, Adams J. New insights into proteasome function: from archaeobacteria to drug development. *Chem Biol.* 1995 Aug;2(8):503-8.

165.Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*. 1994 Oct 7;79(1):13-21.

166.Li B, Dou QP. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Apr 11;97(8):3850-5.

167.Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*. 1995 Aug 4;269(5224):682-5.

168.Perkins ND. The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci*. 2000 Sep;25(9):434-40.

169.Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res*. 1999 Jun 1;59(11):2615-22.

170.Kane RC, Farrell AT, Sridhara R, Pazdur R. United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res*. 2006 May 15;12(10):2955-60.

171.Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. Inhibition of eIF2alpha dephosphorylation maximizes bortezomib efficiency and eliminates quiescent multiple myeloma cells surviving proteasome inhibitor therapy. *Cancer Res*. 2009 Feb 15;69(4):1545-52.

172.Ludwig H, Khayat D, Giaccone G, Facon T. Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies. *Cancer*. 2005 Nov 1;104(9):1794-807.

173.Montagut C, Rovira A, Mellado B, Gascon P, Ross JS, Albanell J. Preclinical and clinical development of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer treatment. *Drugs Today (Barc)*. 2005 May;41(5):299-315.

174.Montagut C, Tusquets I, Ferrer B, Corominas JM, Bellosillo B, Campas C, et al. Activation of nuclear factor-kappa B is linked to resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Jun;13(2):607-16.

175.Sterz J, von Metzler I, Hahne JC, Lamottke B, Rademacher J, Heider U, et al. The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008 Jun;17(6):879-95.

176.Ciulli S, Leoni F, Casini C, Breschi C, Santini V, Bosi A. The addition of liposomal doxorubicin to bortezomib, thalidomide and dexamethasone significantly improves clinical outcome of advanced multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2008 Jun;141(6):814-9.

177.Lage H, Dietel M. Multiple mechanisms confer different drug-resistant phenotypes in pancreatic carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2002 Jul;128(7):349-57.

178.Expression profiling [mdash] best practices for data generation and interpretation in clinical trials. *Nat Rev Genet*. 2004;5(3):229-37.

179.Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*. 2003 Feb 15;31(4):e15.

180.Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 14;99(10):6567-72.

181.Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics*. 2002 Jan;18(1):207-8.

182.Szoke D, Gyorffy A, Surowiak P, Tulassay Z, Dietel M, Gyorffy B. Identification of consensus genes and key regulatory elements in 5-fluorouracil resistance in gastric and colon cancer. *Onkologie*. 2007 Sep;30(8-9):421-6.

183.Gyorffy A, Baranyai Z, Cseh A, Munkacsy G, Jakab F, Tulassay Z, et al. Promoter analysis suggests the implication of NFkappaB/C-Rel transcription factors in biliary atresia. *Hepatology*. 2008 Jul-Aug;55(85):1189-92.

184.Milligan JF, Groebe DR, Witherell GW, Uhlenbeck OC. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res*. 1987 Nov 11;15(21):8783-98.

185.Karukstis KK, Thompson EH, Whiles JA, Rosenfeld RJ. Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. *Biophys Chem*. 1998 Jul 27;73(3):249-63.

186.Gyorffy B, Schafer R. Meta-analysis of gene expression profiles related to relapse-free survival in 1,079 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Dec;118(3):433-41.

187.Fekete T RE, Pete I, Tegze B, Liko I, Munkácsy Gy, Sipos N, Rigó J., Györffy B. Meta-analysis of gene expression profiles associated with histological classification and survival in 829 ovarian cancer samples. *IJC*. 2011;IJC-11-0578.R1(in press).

188.Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Oct;123(3):725-31.

189.van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*. 1990 Apr;2(4):291-9.

190.Zhou G, Kowalczyk D, Humbard MA, Rohatgi S, Maupin-Furlow JA. Proteasomal components required for cell growth and stress responses in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *J Bacteriol*. 2008 Dec;190(24):8096-105.

191.Gil MA, Sherwood KE, Maupin-Furlow JA. Transcriptional linkage of *Haloferax volcanii* proteasomal genes with non-proteasomal gene neighbours including

RNase P, MOSC domain and SAM-methyltransferase homologues. *Microbiology*. 2007 Sep;153(Pt 9):3009-22.

192.Clark MS, Shaw L, Kelly A, Snell P, Elgar G. Characterization of the MHC class I region of the Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*). *Immunogenetics*. 2001;52(3-4):174-85.

193.Michalova V, Murray BW, Sultmann H, Klein J. A contig map of the Mhc class I genomic region in the zebrafish reveals ancient synteny. *J Immunol*. 2000 May 15;164(10):5296-305.

194.Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, et al. Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science*. 2007 Jun 1;316(5829):1349-53.

195.Clark LA, Tsai KL, Starr AN, Nowend KL, Murphy KE. A missense mutation in the 20S proteasome beta2 subunit of Great Danes having harlequin coat patterning. *Genomics*. 2011 Apr;97(4):244-8.

196.Rho JH, Qin S, Wang JY, Roehrl MH. Proteomic expression analysis of surgical human colorectal cancer tissues: up-regulation of PSB7, PRDX1, and SRP9 and hypoxic adaptation in cancer. *J Proteome Res*. 2008 Jul;7(7):2959-72.

197.Eang R, Girbal-Neuhauser E, Xu B, Gairin JE. Characterization and differential expression of a newly identified phosphorylated isoform of the human 20S proteasome beta7 subunit in tumor vs. normal cell lines. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009 Apr;23(2):215-24.

198.Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, Berkers CR, et al. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2489-99.

199.Zhu YX, Tiedemann R, Shi CX, Yin H, Schmidt JE, Bruins LA, et al. RNAi screen of the druggable genome identifies modulators of proteasome inhibitor sensitivity in myeloma including CDK5. *Blood*. 2011 Apr 7;117(14):3847-57.

200.Kwak MK, Huang B, Chang H, Kim JA, Kensler TW. Tissue specific increase of the catalytic subunits of the 26S proteasome by indirect antioxidant dithiolethione in mice: enhanced activity for degradation of abnormal protein. *Life Sci.* 2007 Jun 6;80(26):2411-20.

201.Clarke R, Currier S, Kaplan O, Lovelace E, Boulay V, Gottesman MM, et al. Effect of P-glycoprotein expression on sensitivity to hormones in MCF-7 human breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 1992 Oct 7;84(19):1506-12.

202.Kamata S, Kishimoto T, Kobayashi S, Miyazaki M. Expression and localization of ATP binding cassette (ABC) family of drug transporters in gastric hepatoid adenocarcinomas. *Histopathology.* 2008 May;52(6):747-54.

203.Larbcharoensub N, Leopairat J, Sirachainan E, Narkwong L, Bhongmakapat T, Rasmeepaisarn K, et al. Association between multidrug resistance-associated protein 1 and poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma treated with radiotherapy and concurrent chemotherapy. *Hum Pathol.* 2008 Jun;39(6):837-45.

204.Shi H, Lu D, Shu Y, Shi W, Lu S, Wang K. Expression of multidrug-resistance-related proteins P-glycoprotein, glutathione-S-transferases, topoisomerase-II and lung resistance protein in primary gastric cardiac adenocarcinoma. *Cancer Invest.* 2008 May;26(4):344-51.

205.Surowiak P, Paluchowski P, Dziegiel P, Wysocka T, Wojnar A, Spaczynski M, et al. Lack of relationship between metallothionein (MT) expression and proliferation exponents in cells of primary ductal breast cancer of G2 grade of differentiation. *Med Sci Monit.* 2004 Aug;10(8):BR300-5.

206.Nguyen T, Menocal EM, Harborth J, Fruehauf JH. RNAi therapeutics: an update on delivery. *Curr Opin Mol Ther.* 2008 Apr;10(2):158-67.

207.Shi XH, Liang ZY, Ren XY, Liu TH. Combined silencing of K-ras and Akt2 oncogenes achieves synergistic effects in inhibiting pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther.* 2009 Mar;16(3):227-36.

208.Xiao H, Wu Z, Shen H, Luo AL, Yang YF, Li XB, et al. In vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by efficient delivery of stealth RNAi. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008 Oct;103(4):342-8.

209.Xie SM, Fang WY, Liu Z, Wang SX, Li X, Liu TF, et al. Lentivirus-mediated RNAi silencing targeting ABCC2 increasing the sensitivity of a human nasopharyngeal carcinoma cell line against cisplatin. *J Transl Med.* 2008;6:55.

210.Zhang W, Chen Y, Wei H, Zheng C, Sun R, Zhang J, et al. Antiapoptotic activity of autocrine interleukin-22 and therapeutic effects of interleukin-22-small interfering RNA on human lung cancer xenografts. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 15;14(20):6432-9.

211.Zhang X, Ge YL, Tian RH. The knockdown of c-myc expression by RNAi inhibits cell proliferation in human colon cancer HT-29 cells in vitro and in vivo. *Cell Mol Biol Lett.* 2009;14(2):305-18.

212.Munkacsy G, Tulassay Z, Gyorffy B. [RNA interference and its clinical applications]. *Orv Hetil.* 2007 Nov 25;148(47):2235-40.

213.Munkacsy G, Abdul-Ghani R, Mihaly Z, Tegze B, Tchernitsa O, Surowiak P, et al. PSMB7 is associated with anthracycline resistance and is a prognostic biomarker in breast cancer. *Br J Cancer.* 2010 Jan 19;102(2):361-8.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Gyórfy Baláznak a közvetlen szakmai irányításért, a mindennapi problémák megoldásában nyújtott mérhetetlen és fáradhatatlan segítségéért. Vezetése alatt tanultam meg szakmánk szeretetét és ismertem meg módszereink nagy részét. Segítségével tanultam meg a helyes kérdésfelvetés, adatgyűjtés, elemzés és értékelés módszereit. Ő irányította a kutatást és biztosította a módszerek beállításához és a mérések elvégzéséhez szükséges eszközök anyagi és technikai hátterét. Meghatározó szerepe volt tudományos érdeklődésem alakulásában.

Szeretnék köszönetet mondani az I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika igazgatójának, Dr. Tulassay Tivadarnak, a helyi feltételek biztosításáért. Köszönettel tartozom a munkacsoport valamennyi tagjának, Dr. Tegze Bálint és Pénzváltó Zsófia PhD hallgató társaimnak és Mihály Zsuzsa TDK hallgatónak, akiknek támogatása és jelenléte nélkül nem lett volna ilyen tartalmas és kedves ez a pár év. A munkák egy része az Ő segítségükkel és közreműködésükkel történt, hálás köszönet illeti Őket a segítségükért. Hálás vagyok továbbá a laboratóriumban dolgozó összes munkatársamnak, hogy lehetőséget biztosítottak a mérések elvégzésére és segítettek a technikai akadályok leküzdésében.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Reinhold Shaeffernek, aki a tanulóéveim alatt befogadott laboratóriumába, és szakmai irányításával, tapasztalatával önzetlenül támogatta munkámat. Csoportjából hálával tartozom munkatársainak, Oleg Tchernitsanak és Iwona Stelniecnek a sok ötletért, figyelmes támogatásáért, az alapos és kiváló tanácsokért.

Végül, de nem utolsósorban hálával tartozom Szüleimnek és egész Családomnak, akik szeretettel és mérhetetlen odafigyeléssel támogattak munkám során.