

# A függetlenül kialakuló rezisztencia vizsgálata 29 rezisztens sejtvonalon

Doktori értekezés

Dr. Tegze Bálint

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók:

Dr. Döme Balázs, osztályvezető főorvos, Ph.D.

Dr. Langmár Zoltán, egyetemi tanársegéd, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Losonczy György, egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Masszi András, egyetemi tanársegéd, Ph.D.

Dr. Réz Gábor, egyetemi docens, az MTA doktora

Budapest

2012

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	1
Rövidítések jegyzéke .....	3
1 Irodalmi háttér .....	5
1.1 Az emlőrák .....	5
1.1.1 Az emlőtumorról általában .....	5
1.1.2 Az emlőrák szisztémás terápiaja .....	5
1.1.3 Alkalmazott gyógyszerek .....	14
1.2 Biomarkerek .....	18
1.2.1 Prognosztikai és prediktív markerek .....	18
1.2.2 Biomarkerek emlőrákban .....	19
1.3 Modell-rendszerek .....	23
1.3.1 Sejkultúrás modellek .....	23
2 Módszerek .....	26
2.1 Sejtvonalak .....	26
2.2 Gyógyszerek .....	26
2.3 Sejtkultúra .....	26
2.4 Sejtproliferáció mérése .....	27
2.5 Sejtszám meghatározás .....	28
2.6 Rezisztens sejtvonalak kialakítása .....	28
2.7 Nukleinsav izolálás .....	29
2.8 Minőségellenőrzés .....	30
2.9 RT-PCR .....	31
2.10 RT-PCR statisztikai kiértékelése .....	32
2.11 Citogenetika .....	32
2.12 Áramlási citometria .....	32
3 Eredmények .....	34
3.1 Sejtvonal fejlesztés .....	34
3.2 RT-PCR .....	35
3.3 Citogenetika .....	39
3.4 Áramlási citometria .....	43

4	Megbeszélés .....	45
5	Következtetések .....	48
6	Összefoglalás.....	50
7	Summary .....	52
8	Irodalomjegyzék.....	54
9	Publikációk jegyzéke.....	85
9.1	Disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke.....	85
9.2	Disszertációtól független publikációk jegyzéke .....	86
10	Köszönetnyilvánítás .....	87

## Rövidítések jegyzéke

HER2: humán epidermális növekedési faktor jelfogó 2

CMF: ciklofoszfamid, metotrexát, 5-fluorouracil

FAC: 5-fluorouracil, doxorubicin, ciklofoszfamid

FEC: 5-fluorouracil, epirubicin, ciklofoszfamid

AC: doxorubicin, ciklofoszfamid

CMFP: ciklofoszfamid, metotrexát, 5-fluorouracil, prednizolon

TAC: docetaxel, doxorubicin, ciklofoszfamid

MDR : multidrog rezisztencia

Pgp: P-glikoprotein

MRP1: multidrog rezisztencia fehérje 1 (multidrog resistance protein)

BCRP: emlőrák rezisztencia fehérje (breast cancer resistance protein)

ABC transzporter: ATP-binding cassette transzporter

MXR: multixenobiotikum rezisztencia fehérje (multixenobiotic resistance protein)

CYP450: citokróm P450

SXR: szteroid és xenobiotikum jelfogó (steroid and xenobiotic receptor)

EGFR: epidermális növekedési faktor jelfogó

FDA: Food and Drug Administration

IC<sub>50</sub>: fél maximális gátlás koncentráció

MEK: Mitogén-aktivált Erk aktiváló kináz (mitogen-activated Erk activating kinase)

MET: hepatocita növekedési faktor jelfogó

TGF $\alpha$  : transzformáló növekedés faktor  $\alpha$

PBS: foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólium bromid

DMSO: dimetil szulfoxid

HSP: hősokk fehérje

CIN : kromoszómális instabilitás

MVP: tüdő rezisztencia fehérje (lung resistance protein, major vault protein)

MAP4: mikrotubulus asszociált fehérje 4

## **1 Irodalmi háttér**

### **1.1 Az emlőrák**

#### **1.1.1 Az emlőtumorról általában**

Világszerte évente több mint 1,000,000 új emlőrákos beteget diagnosztizálnak és 370 000-en halnak meg emlőrák következtében. Nők esetén az emlőrák a leggyakoribb rosszindulatú daganat az USA-ban, és a második leggyakoribb oka a női daganatos halálozásnak, valamint a leggyakoribb oka a 40 és 59 éves kor közötti daganatos halálozásnak [1]. Hazánkban a női emlőrák mortalitása és előfordulása 100,000 főre viszonyítva 34,5 és 81,5. Évente több, mint 2300 nő hal meg emlőrákban Magyarországon [2]. Az emelkedő gyakoriság ellenére a betegségre specifikus halálozás a legtöbb fejlett országban csökkent [3], a javulás a szisztémás kezelés fejlődésének és az emlőrák szűrésnek köszönhető. A legfontosabb rizikótényezők a kor, a szülési anamnézis, hormonális faktorok és a családi kórelőzmény. Bár a családi érintettség gyakori az emlőrákos betegek körében, a betegek kevesebb, mint 10%-a hordoz csírasejtes mutációt. Kezelésében a sebészeti, radioterápia, kemoterápia, endokrin és célzott terápia is szerepet kap [4].

#### **1.1.2 Az emlőrák szisztémás terápiája**

Az emlőrák heterogén betegségecsoport, amely több alcsoportból áll, melyeket különböző genetikai változások jellemeznek, más a prognózisuk és az egyes kezelési protokollokra adott válaszuk [5]. Az emlőrákot klinikai szempontból ösztrogén receptor pozitív, HER2 pozitív és a tripla negatív fő alcsoportokra tudjuk osztani. Az emlődaganatok utóbbi csoportja is több alcsoportból áll, melyek különböző expressziós profillal és eltérő prognózissal bírnak [6].

### **Endokrin kezelés**

Az emlőrások körülbelül 70%-a fejezi ki az ösztrogén receptor  $\alpha$ -át, melynek fontos szerepe van a daganat túlélésében, növekedésében, progressziójában, ezáltal kiváló daganatellenes terápiás célpont is egyben. Több terápiás lehetőség is

rendelkezésre áll az ösztrogén receptor mediálta útvonal gátlására. Lehetőség van a receptor közvetlen blokkolására, például tamoxifen révén, a ligand mennyiségének csökkentése menopauza előtt petefészek eltávolítással, sugárterápiával, vagy GHRH agonista alkalmazásával, menopauza után aromatáz gátlókkal lehetséges. Ezen utóbbiak hatékonyak, kedvező mellékhatásprofilal rendelkeznek, emiatt az ösztrogén receptor pozitív emlőrák esetén széles körben használják korai, áttétes és kiújuló emlőrák esetén őket [7]. A válaszadási arány 30 és 75% között változik [8]. A sebészi petefészek eltávolítás nem előnyösebb, mint a tamoxifen kezelés a kezdeti endokrin terápia esetén, ugyanakkor tamoxifen kezelés hatástalansága esetén a petefészek eltávolítása után még terápiás válasz várható [9]. A GHRH analógok használatával a sebészi kezeléssel elérhető teljes túléléstől szignifikánsan nem különböző teljes túlélés érhető el [10]. Előrehaladott emlőrákban szenvedő premenopauzában levő betegek esetén a tamoxifen kezelés és a petefészek gátlás kombinációja bizonyult jobbnak a tamoxifen monoterápiával, illetve a petefészek gátlással szemben válaszadás, progressziómentes túlélés és teljes túlélés tekintetében [11, 12]. Ez alapján a kombinált endokrin kezelés ajánlható a monoterápiával szemben.

A szelektív ösztrogén receptor modulátorok a receptor és a ligand közötti kölcsönhatást gátolják. A tamoxifen antagonistaként hat az emlő esetén, ugyanakkor a májban, csontban és a méhben agonista hatásai vannak. A válaszadási arány az ösztrogén és progeszteron receptor pozitív daganatok esetében 65%, az ösztrogén vagy progeszteron receptor pozitív esetekben 30%, a receptor negatív esetekben 5% alatti [9].

A fulvesztrant egy tisztán ösztrogén antagonistá tulajdonságokkal bíró gyógyszer. Az ösztrogén receptorhoz nagyobb az affinitása, mint a tamoxifennek, az ösztrogén receptor által szabályozott gének transzkripcióját teljes mértékben gátolja. Mivel nincs ösztrogénszerű hatása, mint a tamoxifennek, nem nő a tromboembóliás szövődmények kockázata, és a méhtrák kockázata sem [13]. Áttétes emlőrákos betegek esetén másodvonalbeli kezelésként hatásossága nem különbözik az anasztrozolétól [14, 15]. Aromatáz gátló anasztrozol kezelés után is hatásos lehet [16].

„Az androgének aromatizációja révén keletkező ösztradiol az ösztrogénhatás fő mediátora a menopauzát követően. Az aromatáz enzim a zsírszövetben, a mellékvesében, az izmokban, a májban, az agyban és az emlőben van jelen” [9]. A harmadik generációs aromatáz gátlók szelektívek, és az aromatáz okozta perifériás

szteroid átalakulást képesek 90%-ban gátolni. A harmadik generációs aromataz inhibitorok közül az anasztrozol használata túlélési előnnyel jár tamoxifennel szemben menopauza utáni kezelés esetén áttétes, ösztrogén receptor pozitív emlőrákban [17-19]. A letrozolt tamoxifennel összehasonlító fázis III vizsgálat igazolta, hogy a letrozol kezelésben részesülők esetén a válaszadási arány 32% volt szemben a másik csoportban tapasztalt 21%-kal. A progressziómentes túlélés szignifikánsan hosszabbnak (9,4 szemben 6 hónappal) bizonyult. A teljes túlélés tekintetében szintén szignifikáns különbség mutatkozott 24 hónapot követően [20].

### **Célzott terápia**

Az emlőrák jól definiált altípusainak azonosítása, illetve a daganat kialakulásában és progressziójában jelentős genetikai változások azonosítása lehetővé tette a célzott terápiás szerek sikeres alkalmazását. 1987 óta ismert, hogy a humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2) amplifikációja és megnövekedett expressziója összefügg a gyakoribb relapszussal, a rosszabb túléléssel, az apoptózis iránti rezisztenciával és megnövekedett áttétképző képességgel [21-23]. Az emlőrákok ~30 %-ában mutatható ki a HER2 amplifikáció és/vagy expressziónövekedés. A HER2 kiváló támadáspont, gátlószerei közül jelenleg kettő van klinikai használatban (trasztuzumab, lapatinib) [24]. A trasztuzumab egy humanizált HER2 elleni IgG1 monoklonális antitest. A trasztuzumabot citotoxikus kemoterápiával kombinálva 2006-óta használják korai, HER2 pozitív emlőrák esetén [25, 26]. A lapatinib egy kis molekulású tirozin kináz gátlószer, a HER1-et és a HER2-t gátolja. Hatékony szer olyan betegek esetén, akik daganata HER2 pozitív és trasztuzumab kezelés ellenére progresszió jelentkezik [27]. A két jelenleg engedélyezett célzott terápiás gyógyszer érdemi változást hozott a HER2 pozitív emlőrákos betegek korábban igen rossz prognózisában [28, 29].

Számos további célzott terápiás gyógyszer mutatott figyelemre méltó eredményeket a preklinikai és a klinikai vizsgálatokban, ezek a szerek további javulást eredményezhetnek a HER2 pozitív emlőrákos betegek túlélésében. Ezen gyógyszerek közé tartozik a pertuzumab, ami egy humanizált monoklonális antitest, ami a HER2 kettős dimerizációs doménjéhez kötődik. Preklinikai vizsgálatokban a HER2 kombinált gátlása trasztuzumabbal és pertuzumabbal szinergista hatást mutatott [30]. Jelenleg a



trasztuzumabbal való kombinált kezelés hatékonyságát fázis III vizsgálatban próbálják igazolni, a fázis II vizsgálatok sikere után [31, 32]. A T-DM1 egy trastuzumab maytanazin konjugátum. A trastuzumab a konjugátumot a HER2 pozitív sejtekhez irányítja, a receptorhoz való kötődés hatására internalizálódik, proteolitikus degradáció révén felszabadul a mikrotubulusokat gátló maytanazin [33]. A gyógyszerrel végzett fázis II vizsgálat során trastuzumab kezelésre progresszió nélküli HER2 pozitív betegcsoporton 25,9% volt az objektív válaszadási ráta, a progressziómentes túlélés mediánja 4,6 hónap volt [34].

### **Kemoterápia**

A célzott terápiás gyógyszerek és az endokrin terápia alkalmazásának előretörése ellenére a kemoterápia alkalmazása továbbra is indikált lehet neoadjuváns, adjuváns vagy önálló kezelési módként, az előző gyógyszer csoportokkal kombinálva vagy önállóan.

A kemoterápia alkalmazása során a betegség anatómiai kiterjedtségét, a progresszió fokát, az ösztrogén receptor és humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2) státuszt, illetve beteg állapotát (esetleges komorbiditást, általános egészségi állapotot) figyelembe kell venni. A korábbi kemoterápiás kezelés során észlelt választ, illetve a korábbi kezelése során előforduló mellékhatásokat szintén figyelembe kell venni [35].

A kemoterápia alkalmazása során figyelembe kell venni, hogy:

1. A kezelés túlélésbeli és tumor válaszbeli előnyének egyensúlyban kell lennie az életminőséggel, és a tolerálhatósággal.
2. A kemoterápia lehet monoterápia és kombinált terápia. Jelentős túlélési előny nélkül a monoterápia választandó, ugyanis ebben az esetben a toxicitás kisebb mértékű, ami jobb életminőséggel jár. A kombinációs kezelés elsővonalbeli kezelésként akkor választandó, ha gyors progressziót mutat a betegség, ugyanis nagyobb az objektív válaszadás valószínűsége [35].

Bár nincs világosan meghatározott optimális alkalmazási mód, általában elmondható, hogy a különösen agresszív, tünetekkel járó betegség esetén lehet magasabb válaszadási arányra számítani kemoterápia hatására. A válaszadási arány

doxorubicin esetében magasabb, ha elsőként alkalmazzuk áttétes emlőrák esetén. Ebben az esetben 41% a válaszadási arány, paklitaxel után alkalmazva 30%. [36, 37]. Az antraciklin/taxán kombinációknak (doxorubicin + paklitaxel és doxorubicin + docetaxel) magasabb a teljes válaszadási arányuk, és a progressziómentes túlélés aránya is magasabb összehasonlítva a taxánokat nem tartalmazó antraciklin kombinációkkal, ugyanakkor a toxicitásuk is nagyobb [38]. A teljes túlélést a kezelések sorrendje nem befolyásolja szignifikánsan.

### **Adjuváns kemoterápia**

Az adjuváns szisztémás terápiát eredetileg a reziduális mikrometasztázisok eradikálására alkalmazták a sebészi ellátást követően, azért, hogy a daganat kiújulását megakadályozzák és a túlélést növeljék. A korai emlőrák esetén a daganat vagy az emlőre korlátozódik vagy nyirokcsomó pozitívitás esetén minden érintett nyirokcsomó eltávolítható. Csak ezekben az esetekben alkalmazható adjuváns kemoterápia. Adjuváns kezelés nélkül a nyirokcsomó negatív esetek 10-30%-ában, a nyirokcsomó pozitív betegek 35-90%-ában sebészi kezelést követően relapszus következik be az okkult mikrometasztázisok miatt [39]. Randomizált klinikai vizsgálatok megerősítették az adjuváns kezelés túlélést meghosszabbító hatását. Kezeléstől függően a halálozás éves kockázatsökkenése 8 és 28% között van. Ezek az előnyök a szűrőprogramokkal karöltve járultak hozzá az emlőrák mortalitásának 1975 és 2000 között bekövetkezett csökkenéséhez [40].

Az 1960-as évek végén végeztek először klinikai vizsgálatokat adjuváns terápiával nyirokcsomó pozitív betegek bevonásával [41]. Többféle kemoterápiás kezelési sémát is kipróbáltak [42]. Az eredmények igazolták az adjuváns kemoterápia sikerességét [43, 44]. A ciklofoszfamidot, metotrexátot és 5-fluorouracilt (CMF) tartalmazó kezelési séma hatékonynak mutatkozott nyirokcsomó pozitív betegek kezelése során [45]. CMF-hez hasonló kezelési sémák képesek voltak a kiújulás és a halálozás esélyét 24%-kal, illetve 14%-kal csökkenteni [41, 46].

Antraciklint tartalmazó kombinációkat az 1970-es évek végétől vizsgálták adjuváns kezelésként. A FAC (5-fluorouracil, doxorubicin, ciklofoszfamid), FEC (5-fluorouracil, epirubicin, ciklofoszfamid) és AC (doxorubicin, ciklofoszfamid) kezelési

sémák a kiújulás kockázatát 11,2%-kal, a halálozás kockázatát 16%-kal csökkentették CMF kezelési sémához viszonyítva [47]. Az antraciklint tartalmazó kezelési sémákat a CMF-fel közvetlenül is összehasonlították. Négy ciklus AC betegségmentes túlélés és teljes túlélés tekintetében ekvivalens 6 ciklus CMF-fel [48]. Több randomizált vizsgálat és metaanalízis is megerősítette, hogy 6 ciklus antraciklint tartalmazó kombináció (FAC, FEC, ciklofoszfamid+ doxorubicin + 5-fluorouracil és ciklofoszfamid + epirubicin + 5-fluorouracil (CEF)) hatékonyabb, mint 6 ciklus CMF [46, 47, 49]. Kimutatták, hogy 6 ciklus FEC hatékonyabb, mint 3 ciklus [50]. Ezen adatok alapján alakult ki az 1990-es évekre az adjuváns kezelés tekintetében konszenzus, ami szerint a 6 ciklusból álló, antraciklint tartalmazó hármas kombináció az ideális kezelés a nyirokcsomó pozitív emlőrákos betegek számára.

A taxánokat az 1990-es évek óta használják emlőrákos betegek kezelésében. A taxánok hatásosságát vizsgáló egyik klinikai metaanalízisben [51] kilenc vizsgálat eredményét összegezték. A taxánok az addigi standard kemoterápiával szemben szignifikánsan jobbnak bizonyultak betegségmentes túlélés tekintetében a teljes populációban (relatív kockázat=0,86,  $p < 0,00001$ ), és a nyirokcsomó pozitív populációban (relatív kockázat=0,84,  $p < 0,0001$ ), illetve teljes túlélés tekintetében mindkét populációban (relatív kockázat=0,87,  $p < 0,0001$  és relatív kockázat=0,84;  $p < 0,0001$ ). Egy másik metaanalízis során 12 vizsgálat eredményeit értékelték ki, az esetszám meghaladta a 18000-et, az utánkövetés medián értéke 60,4 hónap volt. A kockázati arány 0,81 ( $p < 0,00001$ ) volt a betegségmentes túlélés és a teljes túlélés tekintetében. Az eddigi legnagyobb metaanalízis 22903 beteg adatait összegezte, melyek 13 különböző vizsgálatból származnak [52]. A teljes túlélés tekintetében a kockázati arány 0,83 ( $p < 0,00001$ ) volt. A kockázatcsökkenést nem befolyásolta a taxán típusa (paklitaxel esetén a kockázati arány 0,83 volt,  $p < 0,0004$ , docetaxel esetén a kockázati arány 0,87 volt,  $p < 0,003$ ), az ösztrogén receptor státusz (ösztrogén receptor pozitív csoportban a kockázati arány 0,83 volt,  $p < 0,00001$ , ösztrogén receptor negatív esetben a kockázati arány 0,79 volt,  $p < 0,0001$ ), az axilláris nyirokcsomó áttétek száma (1-3 metasztázis esetén a kockázati arány 0,71 volt,  $p < 0,0001$ , négyenél több metasztázis esetén a kockázati arány 0,75 volt,  $p < 0,0001$ ). A taxán kezelés az 5 éves betegségmentes túlélést 5%-kal, a teljes túlélést 3%-kal növelte meg. Ezen eredmények alapján a taxánok az adjuváns kezelés arany standardjává váltak [41].

## **Neoadjuváns kemoterápia**

A neoadjuváns szisztémás kemoterápia a sebészi kezelés előtt végzett kezelés, amelyet korai emlőrák inoperábilis eseteiben vezetnek be, azért, hogy a daganat operálhatóvá váljon [53]. Azonban egyre nagyobb mértékben használják operálható emlőrákos betegek esetén is. A neoadjuváns kezelés lehetővé teszi az emlőmegtartó műtétek nagyobb arányát, és a klinikai válasz *in vivo* monitorozását. A kezelést követően a tumor méretváltozása összefüggött a betegség kimenetével, így prognosztikus markerként is használható. A patológiai komplett remisszió, a betegségmentes túlélés, és a teljes túlélés közötti összefüggést több klinikai vizsgálat is igazolta. Az összefüggés független volt a tumor altípustól, és a betegség kezdeti stádiumától [54, 55]. Emiatt a patológiailag teljes remissziót a hosszú távú prognózis megbízható markerének tekintik, és a neoadjuváns vizsgálatok végpontjaként használják. A túlélési mutatók, adjuváns és neoadjuváns kezelés esetén megegyeznek [55]. A betegek 70-90%-ánál figyelhető meg klinikai válasz, amely a kezelési sémától és a kezelési ciklusok számától függ [56].

## **Metasztatikus emlőrák kemoterápiás kezelése**

Az áttétes emlőrák általában gyógyíthatatlan, azonban rendszerint jól reagál kemoterápiára, így alkalmazása meghosszabbítja a túlélést, és daganat okozta tünetek esetén palliatív terápiként jön szóba alkalmazása.

Az antraciklinek hatékony szerek kemoterápiában még nem részesült betegek esetén, illetve ha az adjuváns kezelés keretében több mint 12 hónapja történt a kezelés. A válaszadási arány 30-40% metastatikus emlőrák esetében [37, 57]. Áttétes emlőrák kezelése esetén mellékhatásai gátolják az alkalmazását. Harminc vizsgálat metaanalízise kimutatta, hogy az antraciklint tartalmazó kezelési sémák válaszadási aránya jobb a többihez viszonyítva, azonban nem társult jobb túlélés az antraciklin alapú kezelésekhöz. A gyomor-bélrendszeri, a kardiális mellékhatások, illetve az alopecia gyakoribbnak bizonyult [58]. A vizsgálatok azonban heterogének voltak a megelőző kezelés és a betegcsoportok tekintetében. Egy másik vizsgálat kimutatta, hogy az antraciklin alapú kezelések meghosszabbították a teljes túlélést [59].

Az 1990-es években végzett vizsgálatok derítették fel, hogy a paklitaxel jelentős hatékonysággal bír áttétes emlőrákban, az objektív válaszadási arány 50% volt [60]. Azok a betegek, akik az adjuváns kezelés részeként antraciklin kezelést kaptak, illetve akik esetében progresszió alakult ki metasztatikus emlőrák esetén, antraciklin kezelés mellett taxán kezelést kaptak. Több randomizált kontrollált vizsgálat támasztja alá a taxán kezelés létjogosultságát. Naboltz és munkatársai a docetaxel monoterápiát hasonlították össze mitomicint és vinblasztint magába foglaló kombinált terápiával. A teljes túlélés a docetaxel kezelés esetén szignifikánsan jobbnak bizonyult (11,4 vs 8,7 hónap,  $p=0,0097$ ). A válaszadási arány (30 és 12%) és a progresszióig eltelt idő (4,4 és 2,5 hónap) is szignifikánsan jobb volt a docetaxellel kezelt csoportban. Egy másik vizsgálatban docetaxel kezelést hasonlítottak össze metotrexát, 5-fluorouracil kombinált terápiával. A válaszadási arány 42% volt a docetaxellel kezelt csoportban és 21% a kombinált kezelés esetén. A progresszióig eltelt idő 6,3 hónap és 3 hónap volt. Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a teljes túlélésben [61]. Több klinikai vizsgálat is összehasonlította az antraciklin kezelésben még nem részesült betegek esetén a taxán kezelés hatékonyságát az antraciklin kezelés hatékonyságával. Chan és munkatársai 326 beteg bevonásával hasonlították össze a docetaxel kezelést a doxorubicin kezeléssel [57]. Az objektív válaszadási arány 48% volt a docetaxel karon és 33% a doxorubicin karon. A progresszióig eltelt idő 26 hét és 21 hét volt a docetaxel kar javára, azonban ez a különbség nem volt szignifikáns. Egy másik vizsgálatban paklitaxel kezelés kevésbé bizonyult hatékonynak doxorubicin kezeléssel szemben [37]. A válaszadási arány 25% és 41% ( $P=0,003$ ), a progressziómentes túlélés 3,9 és 7,5 hónap volt a doxorubicin kar javára. Ezek mellett a teljes túlélés 15,6 és 18,3 hónap volt, ez a különbség nem volt szignifikáns.

### **Protokollok**

Az emlőrák szisztémás kezelésében számos kezelési sémát alkalmaznak, ezeket vagy önállóan elsődlegesen (például tripla negatív emlőrák távoli áttéttel) vagy egyéb kezelési módokkal kombinálva alkalmazzák. Az 1. táblázat a protokollok legfontosabb tulajdonságait foglalja össze.

**1. táblázat:** Az táblázat a jelenleg emlőrákban használt kezelési sémákat, illetve főbb tulajdonságaikat összegzi. Forrás: NCCN emlőrákra vonatkozó útmutatója (verzió: 2.2011, <http://www.nccn.org/>).

Kezelési séma	Gyógyszerek	Trasztuzumab	Neoadjuváns és adjuváns	Preferált /egyéb
TAC	docetaxel, doxorubicin, ciklofoszfamid	-	Adjuváns	Preferált
AC (nagy dózisé)	doxorubicin, ciklofoszfamid	-	Adjuváns	Preferált
AC+T	doxorubicin, ciklofoszfamid, paklitaxel	-	Adjuváns	Preferált
TC	docetaxel, ciklofoszfamid	-	Adjuváns	Preferált
AC	doxorubicin, ciklofoszfamid	-	Adjuváns	Preferált
FAC/CAF	fluorouracil, doxorubicin, ciklofoszfamid	-	Adjuváns	Egyéb
FEC/CEF	ciklofoszfamid, epirubicin, fluorouracil	-	Adjuváns	Egyéb
CMF	ciklofoszfamid, metotrexát, fluorouracil	-	Adjuváns	Egyéb
AC+T	doxorubicin, ciklofoszfamid, docetaxel	-	Adjuváns	Egyéb
EC	epirubicin, ciklofoszfamid	-	Adjuváns	Egyéb
A+T+C	doxorubicin, paklitaxel, ciklofoszfamid	-	Adjuváns	Egyéb
FEC+T	fluorouracil, epirubicin, ciklofoszfamid, docetaxel	-	Adjuváns	Egyéb
FEC+T	fluorouracil, epirubicin, ciklofoszfamid, paklitaxel	-	Adjuváns	Egyéb

Kezelési séma	Gyógyszerek	Trasztuzumab	Neoadjuváns és adjuváns	Preferált /egyéb
AC+T+ trasztuzumab	Doxorubicin, ciklofoszfamid, paklitaxel, trasztuzumab	+	Adjuváns	Preferált
TCH	docetaxel, karboplatin, trasztuzumab	+	Adjuváns	Preferált
T+ trasztuzumab +FEC	docetaxel, trasztuzumab, fluorouracil, epirubicin, ciklofoszfamid	+	Adjuváns	Egyéb
AC+T+ trasztuzumab	doxorubicin, ciklofoszfamid, docetaxelm trasztuzumab	+	Adjuváns	Egyéb
T+ trasztuzumab után CEF+ trasztuzumab	paklitaxel+ trasztuzumab után ciklofoszfamid, epirubicin, 5-fluorouracil, trasztuzumab	+	Neoadjuváns	Preferált

### 1.1.3 Alkalmazott gyógyszerek

#### Doxorubicin

A doxorubicin egy antraciklin szerkezetű antibiotikum, melyet számos rosszindulatú daganat kezelésére használnak. Központi szerepet játszik az emlőrák [62], a húgyhólyagrák [63], a gyomorrák [64], a tüdőrák [65-67], a petefészekrák [68], a pajzsmirigyrák [69], a lágyrész szarkóma [70], a myeloma multiplex [71], a leukémiák és a limfómák [72, 73] kezelésében. A leggyakrabban használt doxorubicint tartalmazó kezelési sémákat a 2. táblázat foglalja össze.

**2. táblázat:** A leggyakoribb doxorubicint tartalmazó kezelési sémák

Kezelési séma	Gyógyszerek
AC	doxorubicin, ciklofoszfamid
TAC	docetaxel, doxorubicin, ciklofoszfamid
ABVD	doxorubicin, bleomicin, vinblasztin, dakarbazin
BEACOPP	blelomicin, etopozid, doxorubicin, ciklofoszfamid, prokarbazin, prednizolon
CHOP	ciklofoszfamid, doxorubicin, vinblasztin, prednizolon
FAC	5-fluorouracil, doxorubicin, ciklofoszfamid

Daganatellenes hatását több mechanizmus biztosítja. A DNS-sel való interkalációja az elsődleges hatásmechanizmus, a DNS-hez kötődött doxorubicin kapcsolódik a topoizomeráz II enzimhez, aminek hatására az enzim nem képes a kettős DNS törések egyesítésére [74]. Ezen hatások mellett a doxorubicin reaktív oxigéngyökök keletkezéséhez vezethet, ami szintén hozzájárul citotoxikus hatásához [75]. A reaktív oxigéngyökök a DNS közvetlen károsításával, illetve lipid peroxidációval képesek károsítani a sejteket [76]. Antioxidáns enzimek (kataláz, glutation-peroxidáz, szuperoxid-dizmutáz), illetve antioxidáns anyagok (glutation, vitaminok) képesek ártalmatlanítani a reaktív oxigén gyököket, mielőtt sejtkárosító hatásukat kifejthetnék. A reaktív gyökök daganatellenes hatását a keletkezett reaktív gyökök mennyisége és az antioxidáns védelem határozza meg. A sejtkárosodás hatására a p53 fehérje indukálódik, a sejtosztódás leáll, apoptózis következhet be [77, 78]. Gyakoribb mellékhatásai közé tartozik a kardiotoxicitás [79], csontvelő szuppresszió [80] és a reverzibilis hajhullás [81].

**Paklitaxel**

A taxánok 1992-ben történő bevezetése óta széles körben elterjedtek, a kemoterápiás szerek között jelenleg az egyik leghatékonyabb gyógyszer csoportot alkotják [82]. Emlőrák, prosztaták, petefészekrák, nem kissejtes tüdőrák, Kaposi szarkóma és ismeretlen eredetű primer daganat esetén használják a taxánokat, melyek



gyakran egyéb daganatellenes gyógyszerekre rezisztens daganatok esetén is hatékonyak [83-91].

A mikrotubulusok számos sejtfunkció ellátásában vesznek részt, mint például a sejt mozgásában, sejtalk meg határozásában, mitózisban és a sejten belüli transzportban. A paklitaxel a mikrotubulusok egyik alkotóeleméhez, a  $\beta$ -tubulinhoz kötődik reverzibilisen, és elősegíti a mikrotubulus további polimerizációját [92-94]. A paklitaxel a  $\beta$ -tubulin T konformációjához képes kötődni, melynek hatására a kapcsolat a szomszédos  $\alpha$ -tubulinnal stabilizálódik [95-97]. A mikrotubulusok GTP kötődés hatására képesek polimerizálódni, míg a hidrolízis révén kialakult GDP-tubulin instabil, a mikrotubulus depolimerizációjához vezet. Ha paklitaxel kötődik a  $\beta$ -tubulinhoz a GDP-t kötő tubulinok közti kapcsolat stabil marad, a depolimerizáció nem megy végbe, ugyanakkor GTP hiányában is végbe tud menni polimerizáció [98, 99], melynek hatására a sejtciklus továbbhaladása gátolt és apoptózis következik be [100, 101].

### **Multidrog rezisztencia**

Régóta ismert a daganatoknak azon képessége, hogy egyidejűleg több gyógyszerrel szemben rezisztensekké válhatnak, ami a kemoterapiás kezelés hatékonyságát nagymértékben csökkenti. A daganatok ezen képessége multidrog rezisztencia (MDR) néven ismert. A multidrog rezisztencia létrejöttében több mechanizmus is szerepet játszik: oka lehet a gyógyszer tumorhoz történő csökkent szállítása, a rossz felszívódás, a megnövekedett metabolizmus vagy a megnövekedett kiválasztás. A tumor rossz érellátása is csökkent terápiás koncentráció elérését eredményezi. A csökkent biológiai hozzáférhetőség mellett a tumor genetikai és epigenetikai változásai, az extracelluláris mátrix és a tumor geometria is fontos tényezőt jelenthetnek a MDR kialakulásában. A megnövekedett kiáramlás, a lecsökkent beáramlás, a DNS hibajavítás aktiválódása, a méregtelenítő enzimek aktiválódása és a blokkolt apoptózis szintén MDR kialakulását eredményezheti. Egyes betegekben ezen mechanizmusok közül egyidejűleg több is jelen lehet, egymást kölcsönösen erősítve és keresztrezisztenciát eredményezve [102].

A hidrofób szerekkel szemben efflux mechanizmussal létrejövő MDR-t nevezik klasszikus MDR-nek, amely széles szubsztrátspecifitású ATP-függő pumpák működése révén valósul meg. A legtöbb pumpa a 7 alcsaládot magába foglaló ABC

transzporterek közé tartozik, melyek génjei közül eddig 48-at azonosítottak [103]. A legtöbbet vizsgált transzporterek a Pgp, az MRP1, és a BCRP. A többi transzporter MDR-ban játszott szerepe ellenére kevésbé jellemzett. A vinka alkaloidok (vinblastin, vincristin), az antracilinek (doxorubicin, daunorubicin), az actinomycin-D, a paklitaxel egyaránt szubsztrátjai lehetnek az ABC transzportereknek [104].

Az ABC transzporterek széles szubsztrátspecifitással jellemezhetők. A molekula megköti a szállítandó neutrális vagy pozitívan töltött molekulát, és ATP hidrolízisből származó energia terhére kipumpálja az extracelluláris térbe [105]. A multidrog rezisztencia protein 1 (MRP1) semleges, anionos, hidrofób anyagokat, konjugátumokat szállít [106]. A emlőrák rezisztencia protein (breast cancer resistance protein) mitoxanthron rezisztenciát okozhat. A transzporter génjének létezik olyan pontmutációja, amely segítségével szubsztrátspecifitása megnő. Az ABCB11 élettani működése során egyes epekomponenseket szállít. A paklitaxel szintén szubsztrátja, alacsony mértékű rezisztenciát képes létrehozni paklitaxellel szemben [107]. Az MDR3 fiziológiás körülmények között foszfolipideket szállít az epébe, azonban a paklitaxelt és a vinblastint is szubsztrátja [107, 108]. Az ABCA2 egyes rezisztens tumorokban estramustin rezisztenciát okoz [109]. Az LRP (lung resistance protein) nem az ABC transzporter család tagja, de az ABC transzporterekhez hasonló stratégiával okoz rezisztenciát [110].

### **ABC transzporterek humán tumorokban**

A humán tumorokban az ABC transzporter család egyes tagjainak expresszió-növekedése a rezisztencia egyik fontos tényezője. Megnövekedett Pgp expressziót számos daganattípus esetén leírtak, például colon, vese, mellékvese és máj daganatokban [111]. A Pgp expresszió és a klinikai kimenetel között azonban nem sikerült összefüggést kimutatni. A tüdő daganataiban a MDR1 expresszió növekedését figyelték meg, míg szarkómák esetén a Pgp expresszió korrelál a túléléssel [112, 113]. Leukémia esetén találták a legszorosabb korrelációt a Pgp expresszió és a klinikai kimenetel között. Daunorubicin és AraC kezelés esetén a Pgp megnövekedett expressziója összefüggött a rosszabb prognózissal [114]. Emlőrákban szenvedő betegeknél a Pgp expresszió növekedése valószínűsítheti a kezelés hatástalanságát.

Ugyancsak összefüggés figyelhető meg a MRP1 expresszió és a visszaesésmentes túlélés között is [115]. Egyéb szolid tumorokban nehéz korrelációt találni a klinikai kimenetel és egyes MDR-ben szerepet játszó ABC transzporterek expressziója között, ami a transzporterek lokalizációjának nagyfokú variabilitására vezethető vissza [102].

A transzportmechanizmusokon kívül számos egyéb rezisztencia-mechanizmus is ismert. A csökkent felvétellel kialakuló rezisztencia a vízdékony vegyületekre jellemző, melyek vagy transzporter segítségével vagy endocitózis útján jutnak be a sejtbe, ilyen mechanizmussal kialakuló rezisztenciát metotrexát, 5-fluorouracil, 8-azaguanin, ciszplatin esetében írtak le [116, 117].

A méregtelenítő enzimek koordinált aktiválódása is okozhat MDR-t. A DNS támadásponttal rendelkező gyógyszerek elleni rezisztenciában a DNS javítómechanizmusok aktiválódása meghatározó lehet. Ugyancsak meghatározó lehet a CYP450 enzimek aktiválódása, ugyanis egyes gyógyszerek lebontásában fontos szerepet játszanak. Megfigyelték egyes tumorokban a Pgp és a CYP450 A3 koordinált indukcióját is, ami támogatja azt az elképzelést, hogy a MDR egyszerre több párhuzamos mechanizmus segítségével alakul ki [118].

A MDR-hoz kapcsolódó jelátvitel vizsgálatok több ismeretlen ligandú (orphan) magi jelfogót azonosítottak, például az SXR-t melynek szerepe lehet a MDR kialakulásában, ezért a hozzá tartozó jelátviteli elemek felderítése teljesebbé teheti a MDR-ről eddig kialakult képet. Egyes kemoterápiás szerek hatásukat a programozott sejthalál aktiválása révén érik el, ha az apoptotikus utak nem működnek megfelelően, akkor az adott szertől terápiás haszon nem vagy csökkent mértékben várható. Hibásak lehetnek az apoptotikus utak, ha a sejt ceramid szintje megváltozik, ha a sejtciklus szabályozásában szereplő fehérjék nem működnek megfelelően (pl. P53) [119, 120].

## **1.2 Biomarkerek**

### **1.2.1 Prognosztikai és prediktív markerek**

A biomarkerek jellemző biológiai ismertetőjelek, melyeket objektíven meg lehet határozni, és valamilyen fiziológiai vagy patológiai folyamatra utalnak. A biomarkereket diagnosztikus, prediktív és prognosztikus alcsoportokra tudjuk osztani.

Daganatos megbetegedések esetén számos diagnosztikus, prognosztikai és prediktív biomarker van használatban a klinikai gyakorlatban. A prognosztikus biomarkerek a daganatos betegség kimenetelét, míg a prediktív biomarkerek egy adott kezelésre adott választ hivatottak előre jelezni. Az utóbbiak segítségével személyre szabott kezelés valósítható meg [121].

## 1.2.2 Biomarkerek emlőrákban

### Monogénes markerek

Jelenleg a klinikai és patológiai gyakorlatban három egygénes prediktív biomarkert használnak: az ösztrogén receptort, a HER2-t és a progeszteron receptort [122].

A magi ösztrogén és a progeszteron receptor jelenléte és mennyisége alapján az endokrin kezelés hatékonyságát lehet előre jelezni. A receptor státusz meghatározását a gyakorlatban immunhisztokémiai módszerrel végzik, melyet paraffinba ágyazott blokkokból készítenek. Az ösztrogén és progeszteron receptor pozitív esetek 75%-ában lehet számítani a kezelésre adott válasszal, míg az ösztrogén receptor negatív, progeszteron receptor pozitív, illetve az ösztrogén receptor pozitív, progeszteron receptor negatív betegpopulációban ettől az értéktől szerényebb terápiás válasz várható, míg a receptor negatív daganatok esetében a hormonterápia hatástalan [122, 123].

A trastuzumab egy monoklonális antitest, amely a humán epidermális növekedési faktor receptor 2-höz kötődik. A lapatinib egy kis molekulású tirozin kináz gátló, ami a HER2 és az EGFR tirozin kináz doménjét gátolja. Emlőrák esetén a HER2 emelkedett expresszója, vagy a gén sokszorozódása esetén használják a fenti két gyógyszert, így a HER2 státusz a trastuzumab és lapatinib kezelés prediktív biomarkerének tekinthető [124]. A HER2 felülexpresszió és/vagy amplifikáció a daganatok körülbelül 25-30 %-ában következik be. A 3+ eredmény egyértelműen pozitívnak számít, míg a 2+ eredmény esetén fluoreszcens *in situ* hibridizáció végzendő az esetleges amplifikáció kimutatásának céljából. A prediktív biomarker használatával és a két célzott terápiás gyógyszer alkalmazásával, a HER2 pozitív emlőrákok

kedvezőtlen prognózisán szignifikánsan javítani lehetett [125]. A HER2 meghatározása nem csak a HER2 elleni kezelés hatékonyságát jelezheti előre. Genari és munkatársai demonstrálták, hogy a HER2 amplifikált és/vagy felülexpresszált daganatokban az antraciklint tartalmazó kemoterápiás protokollok szignifikánsan jobbnak bizonyultak betegségmentes és teljes túlélés tekintetében. A HER2 negatív betegpopulációban nem volt szignifikáns különbség megfigyelhető az antraciklint tartalmazó és antraciklint nem tartalmazó kezelési sémák között. Ezek alapján kijelenthető, hogy a HER2 státusz nem csak a HER2 elleni kezelések prediktív biomarkere, hanem az antraciklin kezelésé is [126].

A Ki-67 egy magi fehérje, melyet proliferációs markerként használnak. Feltehetőleg fontos szerepet tölt be a sejtciklus szabályozásában, ugyanis neutralizáló antitesttel történő blokkolása, illetve defoszforilációjának gátlása a sejtciklusból történő kilépéshez vezet [127, 128]. A sejtciklus G0 fázisában nem mutatható ki, azonban a G1, S, G2 és M fázisban megjelenik, ami miatt ideális proliferációs biomarkernek tekinthető [129]. Ugyanakkor mások kiemelik, hogy G1 és korai S fázisban az expresszió minimális lehet, ami a kimutathatóságot megnehezítheti, ezzel csökkentve a Ki-67 marker hatékonyságát [130-132]. Prognosztikus jelentősége abban van, hogy képes a távoli áttétmentes túlélés előrejelzésére is több daganattípus esetén [122, 133-135]. Emlőrák esetén gyakran kiegészítő markerként használják [136].

A P-glikoprotein egy széles szubsztrátspecificitással jellemezhető ABC transzporter (részletes leírás a kemorezisztencia mechanizmusai részben található). Számos vizsgálatot végeztek, kimutatták jelentőségét mind a doxorubicin, mind a paklitaxel kezelés hatékonyságának előrejelzésében. Metchetner és munkatársai 359 emlőrákban szenvedő betegből származó mintákon demonstrálták, hogy a P-glikoprotein expresszió a kezeletlen emlőrákos betegek 11%-ában volt emelkedett, míg a kemoterápiában részesülő csoportban 30%-nak bizonyult ez az arány. A Pgp expressziót nem mutató tumorokhoz képest szignifikáns mértékű rezisztencia mutatható ki a Pgp-t kifejező tumorokban, ami a megelőző kezeléstől független [137]. Penson és munkatársai hasonló eredményeket publikáltak petefészekrák esetén, ahol a Pgp kifejeződés fordított korrelációt mutatott a túléléssel a paklitaxellel kezelt betegeknél [138]. Paklitaxellel kezelt nem kissejtes tüdőrák esetén a kezelésre reagáló betegek 100%-a esetén Pgp expresszó nem volt kimutatható, ugyanakkor a kezelésre nem

reagáló esetek 68%-ában volt megfigyelhető emelkedett expresszió [139]. Más vizsgálatok vagy nem találtak Pgp expressziót emlőrák esetében, illetve a korábbiakkal ellentétben nem találtak összefüggést a fehérje kifejeződése és a teljes túlélés között ovárium daganatok esetén [140, 141]. Ezek az ellentmondó adatok miatt a Pgp, mint prediktív biomarker nem került be a klinikai gyakorlatban is használt biomarkerek körébe. További vizsgálatok tisztázhatják a Pgp prediktív hatékonyságát doxorubicin és paklitaxel kezelés esetén.

A topoizomeráz II a DNS mindkét szálát elhasítja, ennek következtében a DNS képes a feltekeredett állapotát megváltoztatni, így transzkripcionálisan és replikáció tekintetében aktívvá tud válni. A doxorubicin-DNS komplexhez kötődve nem képes a DNS lánc egyesítésére. A lánctörések hatására apoptózis indukálódik. Preklinikai vizsgálatok során kimutatták, hogy a topoizomeráz II expressziója és aktivitása jelentősen befolyásolja a doxorubicin hatékonyságát, és emiatt potenciális prediktív biomarkernek tekinthető [82, 142-148].

A proteaszóma a sérült illetve feleslegessé vált fehérjék lebontását végző multikatalitikus proteínáz komplex [149]. A PSMB7 gén a proteaszóma  $\beta$  alegységének egyik fehérjéjét kódolja. Vizsgálatunkban a PSMB7-ről bebizonyítottuk, hogy *in vitro* modellen oki szerepet játszhat a doxorubicin rezisztencia kialakulásában. Eredményeinket 1592 emlőrákban szenvedő beteg adatainak *in silico* vizsgálata során igazoltuk [150]. Ezen eredmények alapján felvetődött, hogy a PSMB7 alkalmas prediktív biomarker lehet, azonban további klinikai vizsgálatok szükségesek klinikai prognosztikus erejének meghatározására.

Számos egyéb egygénés prediktív biomarkert írtak le emlőrák esetén, mint a ciklin D1 [151], a c-myc [152], metalloproteinázok [153-155], az urokináz típusú plazminogén aktivátor és a plazminogén aktivátor inhibitor-1 [156-159], a metallothionein [160] és a tau [161-163]. Ezek a biomarkerek nem kerültek gyakorlati felhasználásra a klinikai vizsgálatok hiánya vagy ellentmondásos eredmények miatt [122].

## Multigénes markerek

Számos többgénes prediktív és prognosztikus tesztet fejlesztettek ki emlőrákos betegek számára, melyek közül több klinikai használatban van jelenleg is. A tesztek közül a BNL-t (Breast Lymph Node assay) és a MammaPrintet fogadta el a FDA (Food and Drug Administration) az USA-ban. Az Oncotype DX-et ugyan nem fogadta el, azonban szakmai útmutatókban már szerepel.

A jóváhagyott multigénes biomarkerek közül a Breast Lymph Node assay a 0,2 milliméternél nagyobb áttét kimutatására alkalmas az őrszemnyirokcsomóból. A kimutatás alapja az emlőspecifikus mammaglobin mRNS expressziójának, illetve az epiteliális markerként ismert citokeratin-19 meghatározása [164, 165]. A MammaPrint a nyirokcsomó negatív betegek esetén használható, a teszt a betegek prognózisát 70 gén mRNS expressziójának meghatározásával képes megbecsülni [166-172]. A fenti két teszt esetén az ösztrogén receptor státusztól függetlenül használható [122].

Az Oncotype DX nyirokcsomó-negatív, ösztrogén receptor pozitív emlőrák esetén jelzi előre a távoli kiújulás esélyét, illetve segít annak eldöntésében, hogy szükséges-e az adott betegnél a kemoterápiás kezelés. A teszt 21 gén (16 tumorasszociált és 5 háztartási) mRNS expresszióját határozza meg, melyek segítségével a kiújulás valószínűségét jellemző recurrence score-t számol, mely korrelál a kemoterápia iránti érzékenységgel, a 10 éven belüli kiújulás esélyével, illetve a mortalitással. Számos korábbi, illetve jelenlegi vizsgálat hivatott a teszt független validálására [173-176]. A 16 gén között megtalálható az ösztrogén receptor, a progeszteron receptor, a HER2 a Ki-67, melyek meghatározása ugyan más módszerrel, de korábban is használatban voltak. Ezeknek nagy a súlyuk a recurrence score számításánál, a többi gén azokban az esetekben befolyásolhatja jelentősen a végeredményt, ha a kulcsgének segítségével nem lehet pontos előrejelzést adni [122].

Számos FDA által el nem ismert, kezelési útmutatókban sem szereplő multigénes prediktív és prognosztikus teszt létezik emlőrákos betegek részére. A Theros H/I teszt ösztrogén receptor pozitív, nyirokcsomó-negatív betegek esetén a HOXB13 és az IL17BR génexpresszió aránya alapján jelzi előre a kiújulás esélyét. A betegeket alacsony és magas rizikójú csoportba sorolja kiújulás szempontjából, valamint az endokrin kezelésre adott válaszkészséget meghatározza. A THEROS MGI teszt grade meghatározást végez 5 gén expressziója alapján, melynek prediktív értékét számos

vizsgálat igazolta [177-183]. A MapQuant DX 97 gén mRNS expressziójának meghatározásával a primer ösztrogén receptor pozitív, nyirokcsomó-negatív, grade II tumorokat osztja alacsony és magas rizikójú csoportokba [184, 185]. Számos további multigén tesztet fejlesztenek, mint az ARUP Breast Bioclassifier [172, 175, 186], a Metastatic score [187-189], az Invasive Gene Signature [190-193], a Wound Response Indicator [194-196], a Mammostrat [197, 198], az eXagenBC [199]. Ezek alapján a jövőben feltételezhető, hogy további multigén tesztek kerülnek az ajánlásokba, illetve a klinikai gyakorlatba [122].

### 1.3 Modell-rendszerek

#### 1.3.1 Sejkultúrás modellek

A sejtvonalak, mint modell rendszerek alkalmazása a daganatos megbetegedések vizsgálatára 1951-ben vált lehetővé, mikor a John Hopkins kórházban Dr. George O. Gey laboratóriumában sikerült először daganatos sejteket hosszú ideig tenyészteni [200]. Ezt követően számos daganattípus esetén rendkívül sok sejtvonalat hoztak létre, ezáltal lehetővé vált a technikailag könnyen kivitelezhető kontrollált vizsgálatok véghezvitele, ami jelentősen elősegítette a daganatok kialakulásának genetikai és epigenetikai hátterének feltárását [201, 202]. Lehetővé vált a daganatellenes kezelések hatékonyságának *in vitro* meghatározása, az elsődleges [203] és a szerzett rezisztencia [204] vizsgálata, prognosztikus és prediktív biomarker jelöltek azonosítása [205].

Az extracelluláris mátrix, a strómasejtek, a daganat érellátása, oxigénellátása mind olyan paraméterek, melyek képesek befolyásolni a daganatos sejtek működését, azonban a sejtvonalak *in vitro* tenyésztése esetén ezek a körülmények nincsenek jelen, vagy nem abban a formában, ahogy *in vivo* jelen lennének, így a sejtvonalak vizsgálatával nyert eredmények mindig a modell korlátainak figyelembe vételével értelmezhetőek. Számos vizsgálat kimutatta, hogy az extracelluláris mátrix képes befolyásolni a daganatellenes szerek iránti érzékenységet [206-214], ugyanakkor az *in vitro* modellek nagy része ezt nem veszi figyelembe. A daganat fibroblasztokat, hemopoetikus eredetű sejteket, endotél sejteket tartalmaz, melyek fontos szerepet játszanak számos tumor-biológiai esemény létrejöttében, mint a daganat kialakulása,



progressziója, növekedése, és a rezisztencia [215, 216]. Ezeket a tényezőket szintén nem lehet figyelembe venni a sejtvonalak *in vitro* tenyésztése esetén.

Egy adott daganatellenes szer hatékonyságát, illetve az elsődleges és a másodlagos rezisztencia jelenlétét, kialakulását szintén hatékonyan lehet *in vitro* modellek segítségével vizsgálni. A modell a preklinikai vizsgálatok egyik alappillére lett. Voskoglou-Nomikos és munkatársai bebizonyították, hogy az *in vitro* és xenograft vizsgálatokat megfelelően végezve az eredmények alkalmasak a fázis II vizsgálatok eredményének előrejelzésére [217].

Győrffy és munkatársai demonstrálták, hogy az *in vitro* modell alkalmas prediktív biomarkerek azonosítására. Vizsgálatukban 30 sejtvonal  $IC_{50}$  értékét határozták meg 11 daganatellenes szer esetében. A sejtvonalakat rezisztencia indexük alapján érzékeny és rezisztens csoportra osztották, majd olyan géneket azonosítottak, melyek eltérnek a két csoportban. Az így kapott gének egy részét TaqMan segítségével is igazolták. A leírt genetikai különbségek alkalmasak lehetnek a klinikai gyakorlatban a kezelésre adott reakció előrejelzésére, amennyiben további klinikai vizsgálatok igazolják az *in vitro* eredményeket [203].

A rezisztencia hátterében rejlő mechanizmusok azonosítása is egy fontos alkalmazási területe a sejtkultúra alapú vizsgálatoknak. Számos vizsgálat igazolta, hogy sejtvonalak segítségével azonosíthatók primer és szerzett rezisztenciához vezető mechanizmusok, és biomarkerek, melyek segítségével a rezisztenciát előre lehet jelezni [218-228].

Az egy sejtvonalból származó több rezisztens sejtvonal modell esetén a többféle rezisztencia-mechanizmus is kialakulhat [229-231], melynek hátterében a daganat heterogenitás játszhat fontos szerepet. A humán daganatok esetében daganaton belüli heterogenitás figyelhető meg génexpresszió, sejtmorfológia, anyagcsere, motilitás, proliferatív, érzékszervi, immunogén és áttétképző képesség tekintetében [232-236]. A daganat növekedésekor a sejtek osztódása során törvényszerűen keletkeznek genetikai hibák, illetve az egyes daganatokban megfigyelhető genetikai instabilitás is hozzájárul a daganatok genetikai heterogenitásához. A heterogén sejtpopuláció a kezelés során szelekción megy keresztül, mely során kisselektálódnak a rezisztens sejtpopulációk. Mivel több mechanizmussal is létrejöhet a rezisztencia, a különböző rezisztencia-mechanizmusokkal jellemezhető sejtpopulációk száma fogja meghatározni a

rezisztenciáért felelős eltérések számát az adott daganatban. A daganaton belül eltérő rezisztencia-mechanizmusokkal jellemezhető területek alakulhatnak ki, így egy minta nem feltétlenül reprezentálhatja a heterogén daganat prediktív biomarker és rezisztencia-mechanizmus mintázatát [236].

### **Kérdésselvetés**

Vizsgálataim során arra a kérdésre kerestem választ, hogy egy sejtvonalból több rezisztens sejtvonal létrehozása megfelelőbb modell-e egy daganatellenes szerrel szembeni szerzett rezisztencia modellezésére, mint egy rezisztens és az eredeti sejtvonal összehasonlítása. Eközben ennek a modellnek a segítségével a multidrog rezisztencia jelenségét is vizsgáltam. Kísérleteimmel a következő kérdéseket akartam/szerettem volna megválaszolni:

- 1 Több, egy sejtvonalból származó rezisztens sejtvonal vizsgálatával **lehetséges-e a doxorubicinnal szembeni szerzett rezisztenciában szereplő géneket azonosítani?**
- 2 Több, egy sejtvonalból származó rezisztens sejtvonal vizsgálatával lehetséges-e a **paklitaxellel szembeni szerzett rezisztenciában szereplő géneket azonosítani?**
- 3 Több, egy sejtvonalból létrehozott rezisztens sejtvonal esetén **a rezisztencia az egyes sejtvonalakban azonos módon alakul ki doxorubicin kezelés hatására?**
- 4 Több, egy sejtvonalból létrehozott rezisztens sejtvonal esetén **a rezisztencia az egyes sejtvonalakban azonos módon alakul ki paklitaxel kezelés hatására?**
- 5 Egy kemoterápiás szerrel történő hosszú távú kezelés során **kialakul-e multidrog rezisztencia?**

## 2 Módszerek

### 2.1 Sejtvonalak

Vizsgálatom során két humán emlőrák sejtvonalat, az MCF-7-et és az MDA-MB-231-et használtam. A sejtvonalatokat az American Type Culture Collection-től szereztem be, tulajdonságaikat a 3. táblázat foglalja össze.

### 3. táblázat: A vizsgálat során használt sejtvonalak jellemzői

	MDA-MB-231	MCF-7
Elsődleges daganat	emlő	emlő
Szövettan	adenokarcinóma	adenokarcinóma
Származási hely	pleurális effúzió	pleurális effúzió
Sejttípus	epitheliális	epitheliális
Növekedési jellemző	letapadó	letapadó
Beteg életkora (év)	51	69
Beteg neme	nő	nő
Ösztrogén receptor státusz	Negatív	Pozitív

### 2.2 Gyógyszerek

Vizsgálataim során két gyógyszert, doxorubicint (EBEWE Pharma, Unterach, Ausztria) és paklitaxelt (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország, katalógusszám: T7402) használtam. A koncentrációsor a klinikai dózis 0,0001-szeresétől az 1000-szereséig terjedt. A klinikai dózist a gyógyszer egyszeri dózisa alapján számoltam, feltételezve, hogy egyenlően oszlik el a szervezetben. Az egyszeres klinikai dózis doxorubicin esetén 0,02 µg/ml, paklitaxel esetén pedig 0,1 µg/ml volt.

### 2.3 Sejtkultúra

A sejtek Leibovitz-15 médiumban (PAA, katalógusszám: E15-821) nőttek, amit foetális borjúsérummal (végső koncentráció: 10%, PAA, katalógusszám: A15-105), transferrinnel (végső koncentráció: 2,5 mg/l, Sigma-Aldrich, katalógusszám: T8158),

fetuinnal (végső koncentráció: 500 mg/l, Sigma-Aldrich katalógusszám: F6131), nátrium-bikarbonáttal (végső koncentráció: 1,1 g/l, PAA, katalógusszám: S11-002), MEM vitaminnal (végső arány: 1%, GIBCO katalógusszám: 11120), Amphotericin B-vel (végső koncentráció: 2,5 mg/l, GIBCO katalógusszám:15070-063), Penicillin-Streptomycin oldattal (penicillin végső koncentrációja: 50 000 U/l, streptomycinnel végső koncentráció: 50 mg/l, Sigma-Aldrich katalógusszám: P0781) egészítettem ki. A sejtek 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó, 37°C-os hőmérsékletet biztosító inkubátorban nőttek.

## 2.4 Sejtproliferáció mérése

A sejtvitalitást MTT sejtproliferációs próba (Roche, katalógusszám: 11 465 007) segítségével határoztam meg. Lyukanként 2000 sejtet pipettáztam 80 µl végtérfogatban a 96 lyukú lemezre. 24 órával később 20 µl doxorubicint vagy paklitaxelt tartalmazó PBS-t pipettáztam a kezelendő sejteket tartalmazó lyukakba. A gyógyszerek végkoncentrációja a klinikai dózis 0,0001-szeresétől 1000-szereséig terjedt. A klinikai dózis doxorubicin esetén 0,02 µg/ml, paklitaxel esetén 0,1 µg/ml volt. A kontrollnak, illetve a prekontrollnak megfelelő lyukakba 20 µl PBS-t pipettáztam. A prekontroll lyukakhoz azonnal, a kontroll és a kezelt lyukakhoz 72 óra elteltével 10 µl MTT festéket (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólium bromid) adtam, melyet az élő sejtek formazánná alakítanak. 4 órával később 100 µl szolubilizáló oldatot adtam. A keletkező formazán termék mennyiségét 24 órával később Multiscan FC spektrofotométerrel mértem le 595 nm-es (formazán abszorpciós maximuma) és 690 nm-es (háttér) hullámhosszon. Minden koncentráció esetén háromszoros ismétléssel végeztem a méréseket. A további számításokat a három mérés átlagával végeztem. A sejtnövekményt a (kezelt-prekontroll)/(kontroll-prekontroll) képlet alapján számoltam ki. Adott sejtvonal koncentrációértékeihez tartozó értékekre görbét illesztettem, és meghatároztam az IC<sub>50</sub> értéket GraphPad Prism szoftver segítségével.

A rezisztens sejtvonalak keresztrezisztenciáját is meghatároztam doxorubicin, paklitaxel, 5-fluorouracil és ciszplatin kezelés esetén is. A fentiekhez azonos módon végeztem az IC<sub>50</sub> érték meghatározását. 5-fluorouracil esetén a klinikai koncentráció (1x es kezelési koncentráció) 64,65 µg/ml ciszplatin esetében 14,3 µg/ml volt.

## 2.5 Sejtszám meghatározás

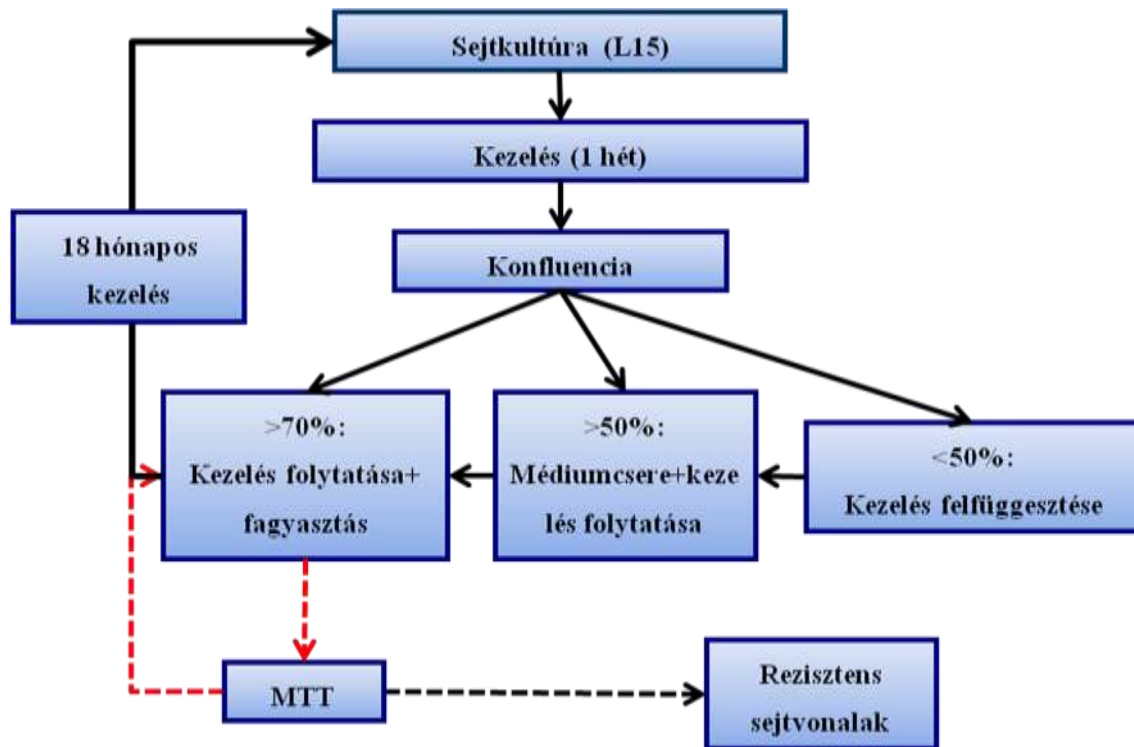
A sejtszámot Casy DT automata sejtszámlálóval határoztam meg. A Casy mérőhengereket 10 ml Casy Ton izotóniás oldattal töltöttem fel, a lecentrifugált sejteket 1 ml médiumban reszuszpendáltam és 20 µl sejtszuspenziót adtam 10 ml Casy Ton-t tartalmazó Casy mérőhengerhez, majd a mérőhengereket lezárás után háromszor lassan átfordítottam, majd lemértem a mintákat.

## 2.6 Rezisztens sejtvonalak kialakítása

Sejtvonalanként és gyógyszerenként tíz szubpopulációt különítettem el. A sejtvonalakat doxorubicinnal (EBEWE Pharma, Unterach, Ausztria) vagy paklitaxellel (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország) kezeltem. A kezelés fokozatosan emelkedő dózissal történt. A konfluenciát (ami megmutatja, hogy a sejtek milyen arányban nőttek be a sejtenyésző edény alját) hetente többször becsültem meg. Ha a konfluencia 50% alatti volt egy hetes kezelést követően, a kezelést felfüggesztettem: ha a konfluencia 50% és 70% között volt, a kezelést folytattam médiumcsere után; 70 % feletti konfluencia esetén a médium eltávolítása után a sejteket 2 ml PBS pufferrel mostam, majd eltávolítottam a puffert és 3 ml tripszinnel (PAA, katalógusszám: L11 001) 15 percig 37°C-on inkubáltam. A leemésztett sejteket tartalmazó folyadékot 15 ml-es centrifuga csövekbe helyeztem, majd 1700 1/perc fordulatszámon 5 percig centrifugáltam. A felülúszót eltávolítottam, a sejteket 1 ml médiumban feloldottam. A sejtek felét 5 ml médiumhoz adtam, és a tenyésztőedénybe pipettáztam, majd egy nappal később kezeltem. A sejtek másik feléhez DMSO-t (végső arány:10%, Sigma-Aldrich, katalógusszám: D2650) adtam, fagyasztócsőbe pipettáztam, 4 °C-on 15 percig, majd -20 °C-on ismét 15 percig inkubáltam, majd -86 °C-os hűtőbe helyeztem. Ha az adott sejtvonal az adott koncentrációjú kezelés mellett 3 hétig megfelelően nőtt (nem kellett a kezelést felfüggeszteni), akkor a kezelés dózisait emeltem. A koncentrációemelés mértéke 10x-es volt a 0,1x-es klinikai koncentráció eléréséig, utána kisebb mértékű koncentrációemelést hajtottam végre (0,3x, 0,5x, 1x, 1,5x, 2x, 3x). A koncentrációemelések előtt MTT sejtproliferációs vizsgálatot végeztem a kezelt sejtek érzékenységének meghatározására. A kezelés időtartama alatt a gyógyszerek oldószerével kezelt sejtvonalat is fenntartottam, melyeket kontrollként használtam

vizsgálataimhoz. A rezisztens sejtvonalak létrehozásának folyamatát az 1. ábra mutatja be.

**1. ábra:** a rezisztens sejtvonalak létrehozásának folyamatábrája



## 2.7 Nukleinsav izolálás

A minták homogenizálása Qiashredder (Qiagen, katalógusszám: 79656) segítségével, az RNS izolálás Qiagen RNEasy Mini kittel (Qiagen, katalógusszám: 74106) történt a felhasználási útmutató alapján. A sejtek tripszinnel történő leválasztása után a sejteket 15 ml-es centrifugacsőbe pipettáztam, 1700 1/perc fordulatszámon 5 percig centrifugáltam, majd a felülúszót eltávolítottam. Ezt követően az alábbi lépéseket végeztem el:

1. A mintához 600 µl RLT puffert adtam, majd többször fel-le pipettáztam.
2. A mintát Qiashredderre pipettáztam, majd 14000 1/perc fordulatszámon 2 percig centrifugáltam.
3. Minden mintához adtam 600 µl 70 %-os etanolt, közben pipettával át is kevertem.
4. Az RNS izoláló oszlopot ráillesztettem a 2 ml gyűjtőcsőre, majd rámértem 700 µl mintát. Azután 15 másodpercig 10 000 1/perc fordulatszámon centrifugáltam. Az

átfolyó folyadékot kiöntöttem. Mindezt megismételtem a minta megmaradt részével. Az izoláló oszlopot új gyűjtőcsőre helyeztem.

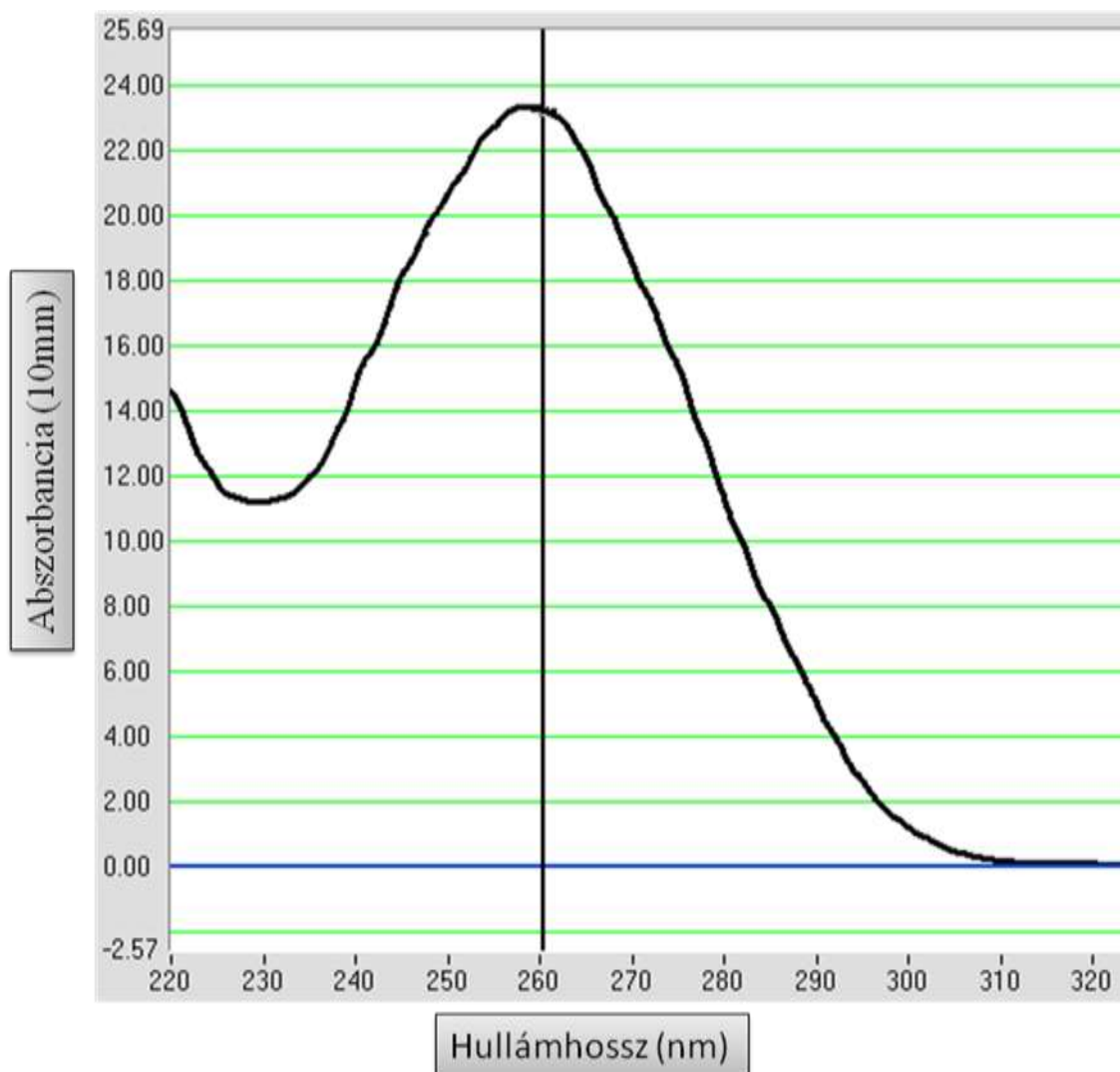
5. 700 µl RW1 puffert pipettáztam az oszlopra, majd 15 másodpercig 10 000 1/perc fordulatszámon centrifugáltam. Az átfolyó folyadékot kiöntöttem.
6. 500 µl (etanollal hígított) RPE puffert pipettáztam az oszlopra. Ezután 15 másodpercig 10 000 1/perc fordulatszámon centrifugáltam. Az átfolyó folyadékot kiöntöttem.
7. Ismét 500 µl RPE puffert pipettáztam az oszlopokra és 120 másodpercig 10 000 1/perc fordulatszámon centrifugáltam (a szilikamembrán száradásáig). A gyűjtőcsövet kidobtam.
8. Az oszlopot a végleges Eppendorf csőbe helyeztem, majd 2x30 µl RNáz mentes desztillált vizet pipettáztam közvetlen a membránra, 60 másodpercig állni hagytam, majd 60 másodpercig 10 000 1/perc fordulatszámon centrifugáltam.
9. A 6. lépést megismételtem, 60 helyett 120 másodpercig centrifugáltam 10 000 1/perc fordulatszámon a mintát.
10. Az RNS mennyiségét és minőségét meghatároztam és -86 °C -on tároltam.

## 2.8 Minőségellenőrzés

Az RNS mennyiséget és minőséget Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) és Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.) rendszer segítségével határoztam meg.

A Nanodrop mérések során az A260/A280 és az A260/A230 arányt vizsgáltam meg, az A260/A280 arány esetében a 2-nél nagyobb értékeket fogadtam el, míg az A260/A230 esetében ez az érték 1,7 volt. A 2. ábra az MDA-MB-231-R19 sejtvonalból származó RNS minta Nanodrop minőségvizsgálatának eredményét mutatja.

**2. ábra:** Az MDA-MB-231-R19 sejtvonalból származó RNS-t tartalmazó oldat abszorbancia értékei a hullámhossz függvényében. A 260 nm-nél elhelyezkedő függőleges vonal az RNS-re jellemző csúcsot jelöli.



## 2.9 RT-PCR

TaqMan valós idejű polimeráz láncreakciót használtam a kiválasztott gének mRNA expressziójának meghatározásához. Micro Fluidic Card (Applied Biosystems) rendszert használtam a 31 minta (29 rezisztens sejtvonal, és a két kontroll sejtvonal) leméréséhez. A méréseket ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection rendszerrel végeztük, a felhasználói útmutatónak megfelelően ([http:// www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com), CA, USA). A géneket irodalmi adatok alapján választottam ki. Olyan gének kerültek be a listába, melyekről korábban leírták, hogy doxorubicin vagy paklitaxel rezisztenciával összefüggő az expresszió-változásuk. Ezekon kívül a hormonreceptorok és prognózissal összefüggő gének expresszióját vizsgáltuk meg.



## 2.10 RT-PCR statisztikai kiértékelése

SDS 2.2 szoftvert használtunk az adatelemzéshez. A  $\Delta C_t$  értékeket a három háztartási gén (18S, HPRT1 and RPLP0) átlagához normalizáltam. A gének expressziója és a doxorubicinnal, illetve a paklitaxellel szembeni rezisztencia közti korrelációt Spearman-féle rangkorrelációs teszt segítségével állapítottam meg. Step-up többszörös tesztelési korrekciót végeztünk, statisztikailag szignifikánsnak a  $p \leq 0,01$  értéket fogadtam el.

## 2.11 Citogenetika

A kontroll (gyógyszer oldószerével kezelt) sejtvonalakat és a kezelt sejtvonalakat 3-5 napig tenyésztettem. A ~80%-os konfluencia elérésekor kolcemiddel (végső koncentráció: 0,02-0,06  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubáltam 24 órán át. A sejtek 1x tripszin-EDTA-val történő leválasztása után a kromoszómapreparálás standard technika szerint zajlott. 0,067 M-os KCl hipotóniás kezelést követően a fixálás metanol/ecetsav oldatban történt. Kromoszóma vizsgálatot metafázisban levő G-sávozott, tripszinizált és Wright Giemsa festékkel festett sejteken végeztük. Tíz metafázist értékeltünk mintánként Cytovision 3.6 és Mac Ktype 5.6 (Scientific Systems, UK) kariotípus elemző szoftver segítségével. A kariotípusokat a International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2009) segítségével írtam le.

## 2.12 Áramlási citometria

A sejtek P-glikoprotein (Pgp) aktivitását a Pgp szubsztrát rhodamin 123 segítségével vizsgáltam.  $5 \times 10^5$  sejtet pipettáztam hatlyukú lemezek mélyedéseibe, a sejtek 24 óra alatt letapadtak. Ezt követően rhodamin 123-at (végső koncentráció: 10  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich, katalógusszám:R8004) adtam a sejtekhez és 30 percig inkubáltam a sejteket, majd hideg (4°C-os) PBS-sel mostam. A sejteket 2 ml tripszin-EDTA segítségével választottam le, majd centrifugálás (fordulatszám: 1700 1/perc, idő:5 perc) után a felülúszót leöntöttem, és a sejteket hideg (4°C-os) PBS-ben reszuszpendáltam. Végül áramlási citométerrel (Becton-Dickinson FACSCalibur) vizsgáltam a sejteket.

$10^4$  sejt fluoreszcencia értékeit mértem le mintánként, a sejtszámot a rhodamin 123 fluoreszcencia intenzitásának függvényében ábrázoltam.

### 3 Eredmények

#### 3.1 Sejtvonal fejlesztés

18 hónapig tartó fokozatosan emelkedő koncentrációjú kezelés során 29 rezisztens sejtvonal alakult ki (10 doxorubicin és 4 paklitaxel rezisztens MCF-7, 6 doxorubicin és 9 paklitaxel rezisztens MDA-MB-231 sejtvonal). A relatív rezisztencia értékek (az eredeti sejtvonalakhoz viszonyított) doxorubicin rezisztens sejtvonalak esetében átlagosan 18,5-szörös, paklitaxel rezisztens sejtvonalak esetén átlagosan 15,4-szeres növekedést mutattak. A 4. táblázat mutatja a rezisztencia és keresztrezisztencia értékeket.

**4. táblázat:** Keresztrezisztencia doxorubicinnal (DOX), paklitaxellel (PAX), ciszplatinnal (CISP) és 5-fluorouracillal (5-FU) szemben az eredeti és a rezisztens sejtvonalakban. Bár egyes sejtvonalak esetén nagyfokú keresztrezisztenciát mutattam ki, nem találtam szignifikáns összefüggést a relatív rezisztencia szint és az IC<sub>50</sub> értékek között.

Sejtvonal	Kezelés	IC50 (PAX)	IC50 (DOX)	IC50 (CISP)	IC50 (5-FU)
MCF-7	Vehikulum	2,33	2	2,55	0,07
MDA-MB-231		2,05	2,12	2,46	0,09
MDA-MB-231-R1	Doxorubicin	7,06	8,06	9,13	0,03
MDA-MB-231-R4		8,34	8,11	2,75	0,05
MDA-MB-231-R5		6,06	7,79	2,98	0,09
MDA-MB-231-R8		5,83	9	2,39	0,3
MDA-MB-231-R9		6,93	98,45	3,3	0,09
MDA-MB-231-R10		6,55	62,44	2,46	0,06
MDA-MB-231-R11		Paklitaxel	49,66	5,9	3,46
MDA-MB-231-R12	9,32		3,46	6,82	2,15
MDA-MB-231-R13	7,89		6,4	2,95	45,04
MDA-MB-231-R15	5,34		8,38	5,51	49,9
MDA-MB-231-R16	18,54		4,82	0,84	3,2

Sejtvonal	Kezelés	IC50 (PAX)	IC50 (DOX)	IC50 (CISP)	IC50 (5-FU)
MDA-MB-231-R17		8,49	4,1	5,96	0,01
MDA-MB-231-R18		6,35	2,94	4,48	0,09
MDA-MB-231-R19		58,18	1,98	1,07	0,07
MDA-MB-231-R20		6,69	7,75	2,1	0,1
MCF-7-R1	Doxorubicin	6,88	4,46	3,14	0,4
MCF-7-R2		5,22	6,79	6,63	57,27
MCF-7-R3		4,24	4,3	3,81	0,07
MCF-7-R4		5,16	8,52	3,02	0,06
MCF-7-R5		0,7	4,19	3,45	1,61
MCF-7-R6		6,61	24,13	1,3	0,04
MCF-7-R7		6,65	9,42	4,34	0,09
MCF-7-R8		2,41	19,26	2,11	0,05
MCF-7-R9		5,34	6,28	3,1	0,05
MCF-7-R10		6,31	15,21	0,15	0,04
MCF-7-R12	Paklitaxel	6,61	4,74	6,02	0,04
MCF-7-R13		5,86	7,91	0,44	58,12
MCF-7-R14		7,48	26,94	1,16	3,95
MCF-7-R20		9,93	57,39	4,35	0,23

### 3.2 RT-PCR

Spearman-féle rang korrelációs tesztet végeztem a doxorubicin és paklitaxel rezisztenciával összefüggő gének expressziós értékei és a sejtvonalak IC<sub>50</sub> értéke között. Az eredményeket az 5. táblázatban foglaltam össze. A doxorubicin rezisztens sejtvonalakban a TOP2A gén és két tubulin izoforma expressziója mutatott összefüggést a sejtvonalak IC<sub>50</sub> értékeivel. A paklitaxel rezisztens sejtvonalakban a MVP, négy tubulin izoforma és a mikrotubulus-asszociát protein 4 gén expressziója függött össze a rezisztenciával. Korábbi vizsgálatunkban összefüggést mutattunk ki a PSMB7 gén expressziójának megváltozása és a doxorubicin rezisztencia között [150]. Ugyanakkor jelen vizsgálat során nem volt szignifikáns összefüggés kimutatható a PSMB7 gén

expressziója és a doxorubicin rezisztens sejtvonalak  $IC_{50}$  értékei között. Az ABCB1 gén p értéke 0,03 és 0,07 volt a doxorubicin és paklitaxel rezisztens sejtvonalakban.

**5. táblázat:** Spearman-féle rang korrelációs teszt eredménye a génexpresszió és a doxorubicin és paklitaxel rezisztens sejtvonalak  $IC_{50}$  értéke között. A szignifikancia szint felső határa 0,01 volt, a szignifikáns eredményeket \*-gal jelöltem.

Próba azonosító	Gén azonosító	Gén név	Referencia	Spearman	p-érték	Spearman	p-érték
<b>Doxorubicin rezisztenciához társuló gének</b>				<b>vs, Doxorubicin rezisztens sejtvonalak</b>		<b>vs, Paklitaxel rezisztens sejtvonalak</b>	
Hs00184500_m1	ABCB1	P-glikoprotein	[237]	0,42	0,030	0,33	0,072
Hs00219905_m1	ABCC1	Mitoxantron rezisztencia protein	[238]	0,00	0,492	0,27	0,073
Hs00184979_m1	ABCG2	BCRP	[239]	-0,25	0,085	0,01	0,470
Hs03063307_m1	TOP2A	topoizomeráz II $\alpha$	[142-144]	<b>0,48</b>	<b>0,003*</b>	0,08	0,331
Hs00245438_m1	MVP	major vault protein	[110, 240]	-0,26	0,077	<b>0,42</b>	<b>0,009*</b>
Hs00946084_g1	HSPA5	HSP 70kDa protein 5	[241]	0,20	0,142	0,37	0,019
Hs00160607_m1	PSMB7	proteaszóma $\beta$ alegység (type 7)	[150]	-0,14	0,221	-0,18	0,164
<b>Paklitaxel rezisztenciához társuló gének</b>							
Hs00362387_m1	TUBA1A	tubulin, $\alpha$ 1a	[242]	-0,34	0,033	0,38	0,018
Hs00744842_sH	TUBA1B	tubulin, $\alpha$ 1b	[242]	-0,40	0,012	0,14	0,229
Hs00733770_m1	TUBA1C	tubulin, $\alpha$ 1c	[242]	-0,32	0,042	<b>0,49</b>	<b>0,003*</b>
Hs00258236_m1	TUBB1	tubulin, $\alpha$ 1	[243]	0,05	0,455	0,10	0,411
Hs00742533_s1	TUBB2A	tubulin, $\beta$ 2A	[243]	-0,35	0,026	<b>0,42</b>	<b>0,009*</b>
Hs00603550_g1	TUBB2B	tubulin, $\beta$ 2B	[243]	-0,21	0,130	-0,21	0,127
Hs00607181_g1	TUBB2C	tubulin, $\beta$ 2C	[243]	<b>-0,49</b>	<b>0,003*</b>	0,19	0,157
Hs00964962_g1	TUBB3	tubulin, $\beta$ 3	[243, 244]	<b>-0,45</b>	<b>0,006*</b>	<b>0,42</b>	<b>0,010*</b>

Próba azonosító	Gén azonosító	Gén név	Referencia	Spearman	p-érték	Spearman	p-érték
Hs00893144_g1	TUBB4	tubulin, $\beta$ 4	[243]	-0,34	0,033	<b>0,45</b>	<b>0,005*</b>
Hs00902188_m1	MAPT	mikrotubulus-asszociát protein tau	[163]	0,28	0,066	-0,10	0,299
Hs00737065_m1	MAP4	mikrotubulus-asszociát protein 4	[245, 246]	-0,20	0,138	<b>0,53</b>	<b>0,001*</b>
<b>Breast cancer hormone receptors</b>							
Hs01046815_m1	ESR1	ösztrogén receptor 1		0,11	0,273	-0,28	0,060
Hs01105519_m1	ESR2	ösztrogén receptor 2 (ER $\beta$ )		-0,01	0,489	-0,45	0,085
Hs00172183_m1	PGR	progeszteron receptor		0,09	0,350	-0,13	0,297
Hs00170433_m1	ERBB2	HER2		-0,05	0,401	-0,26	0,075

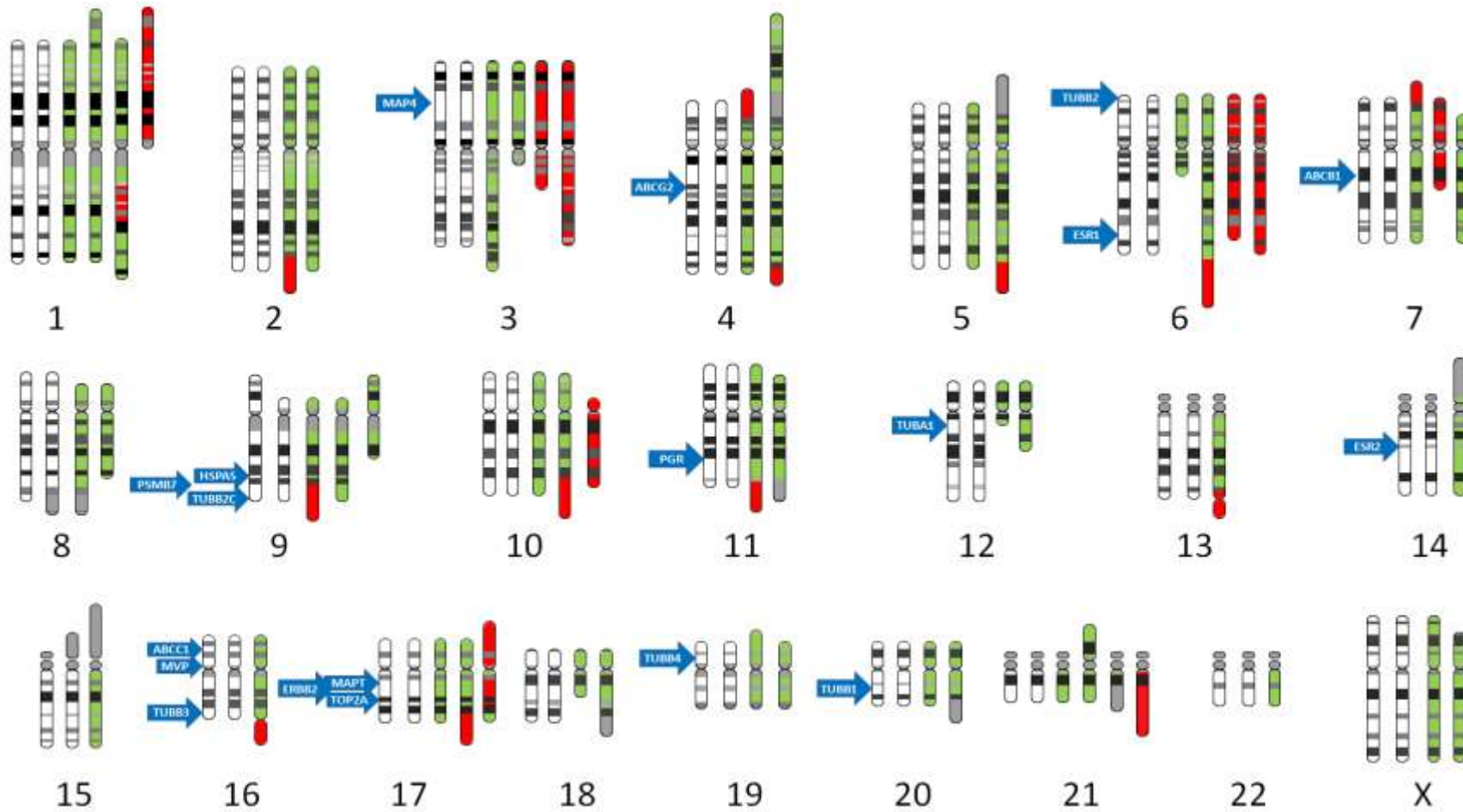
### 3.3 Citogenetika

Citogenetikai vizsgálatot végeztünk az összes rezisztens MDA-MB-231, az eredeti MDA-MB-231 és a vehikulummal kezelt MDA-MB-231 sejtvonalon. A rezisztens sejtvonalakban számos citogenetikai változás következett be. Az átlagos ploiditás és a kromoszómális aberrációk száma hasonló mértékű volt a rezisztens és az eredeti sejtvonalakban két tetraploid sejtvonal kivételével. Az rezisztens sejtvonalaknak 60-110 kromoszómájuk volt. Az 1-es 17-es és 21-es kromoszóma rendelkezett a legtöbb másolattal. A legnagyobb mértékű variabilitás a 3-as, 7-es, 17-es, 20-as és 21-es kromoszómán volt megfigyelhető, míg az X, a 10-es, a 13-as és a 16-os kromoszómák bizonyultak a legstabilabbnak. Leggyakrabban a 15-ös, 18-as és 21-es kromoszómán tapasztaltam állománynyerést, a leggyakoribb deléció a 9p21 és a 18q21 volt. Két sejtvonal, a doxorubicin rezisztens MDA-MB-231-R5 és a paklitaxel rezisztens MDA-MB-231-R11 közel tetraploid kromoszómakészlettel rendelkezett. A kromoszómális változásokat a 3. ábra, a ploiditást és az új aberrációk számát a 4. ábra, az MDA-MB-231-R18 sejtvonal reprezentatív kariotípusát a 5. ábra mutatja be. A fő különbség a rezisztens és az eredeti sejtvonalak között az új típusú strukturális átrendeződések nagyobb száma volt.

A Shannon diverzitási index segítségével az eltérő citogenetikai tulajdonságokkal jellemezhető sejtpopulációk számát és gyakoriságát felhasználva meghatároztam az egyes rezisztens MDA-MB-231 sejtvonalak genetikai instabilitását. Az eredeti sejtvonal Shannon indexe 2,05 volt, az átlag 2,03 volt. Kromoszómális instabilitás 4 sejtvonalban volt megfigyelhető (4. ábra). A kromoszómális instabilitással jellemezhető sejtvonalak esetén nagyobb mértékű keresztrezisztencia volt megfigyelhető paklitaxel kezelés ( $IC_{50}$  értékek: 6,7 és 7,1  $\mu\text{g/ml}$ ), ciszplatin kezelés ( $IC_{50}$  értékek: 3,5 és 4,2  $\mu\text{g/ml}$ ), illetve 5-fluorouracil kezelés ( $IC_{50}$  értékek: 5,1 és 10,1  $\mu\text{g/ml}$ ) esetén, azonban ezek a különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak Mann-Whitney teszt alkalmazása esetén. A Shannon diverzitási index segítségével kapott eredményeket a 6. ábra foglalja össze.

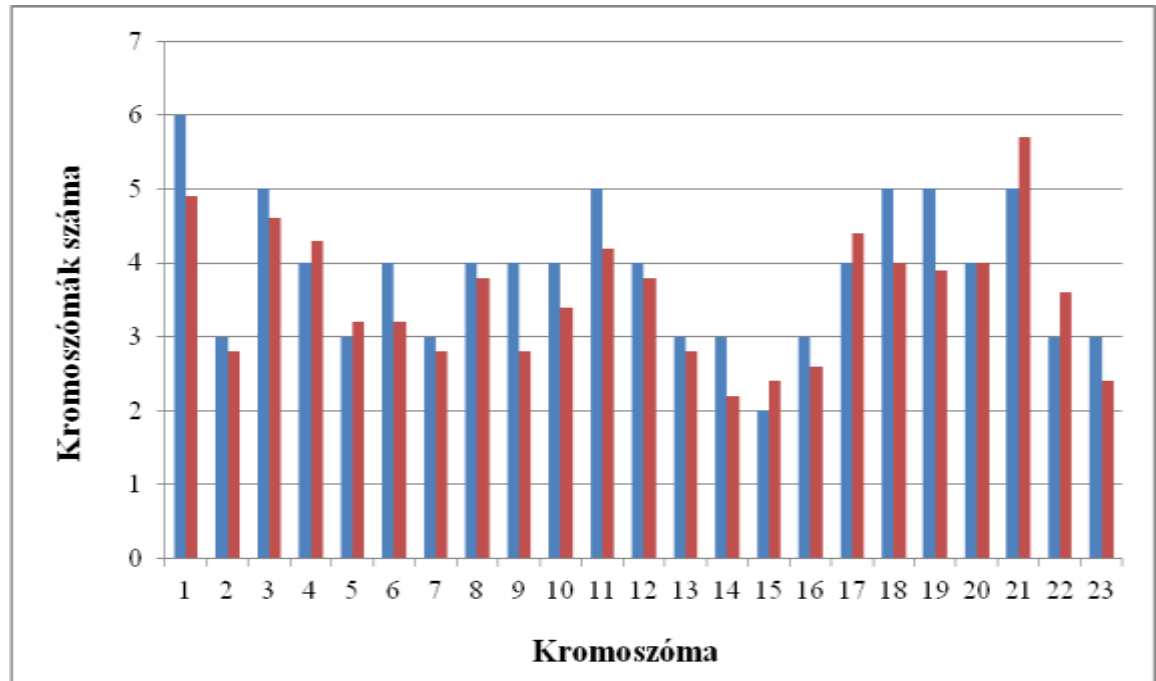


**3. ábra:** A rezisztens MDA-MB-231 sejtvonalak citogenetikai aberrációinak áttekintő ábrája. Fehér háttér: normál kromoszómák, zöld háttér: az eredeti MDA-MB-231 sejtvonál kromoszómái, piros háttér: kromoszómális változások a rezisztens sejtvonalakban. A rezisztenciában szerepet játszó legfontosabb gének pozícióit kék nyilakkal jelöltem.

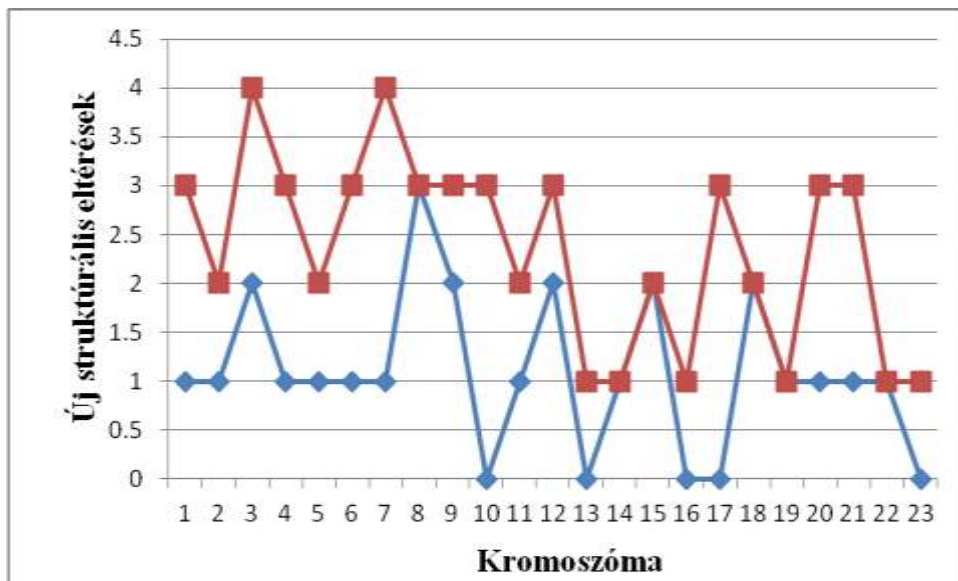


**4. ábra:** (A.) ploiditás és (B.) az új aberrációk száma kromozómanként az eredeti (kék) és az összes rezisztens sejtvonal (piros) esetén.

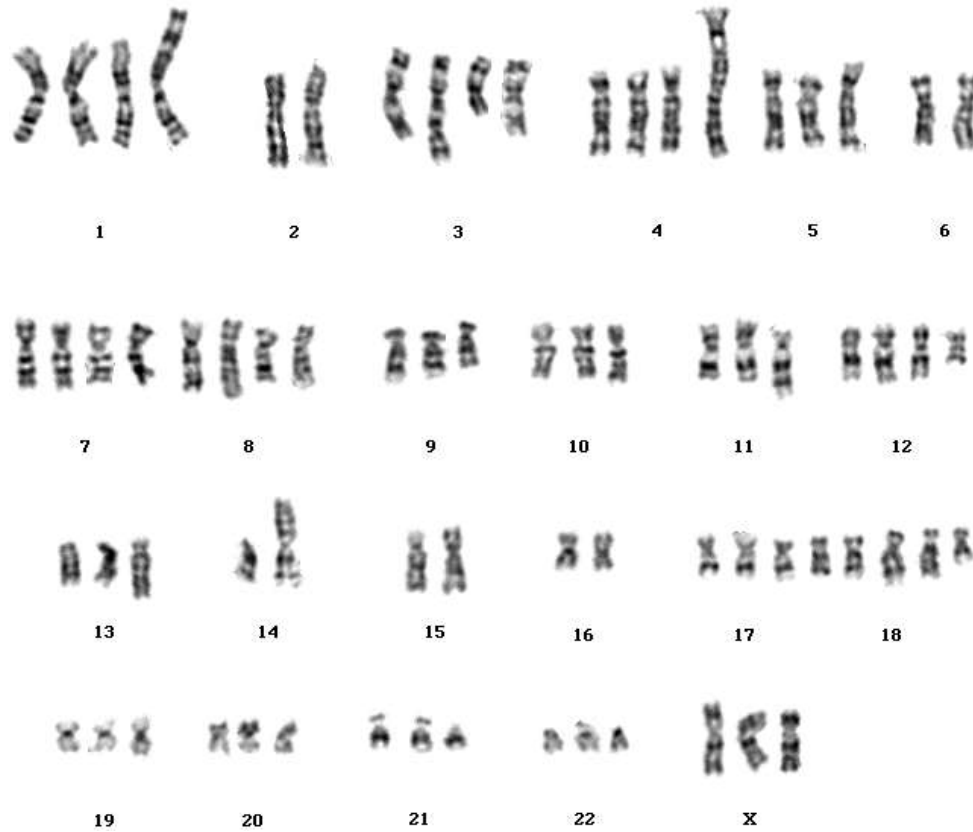
A.



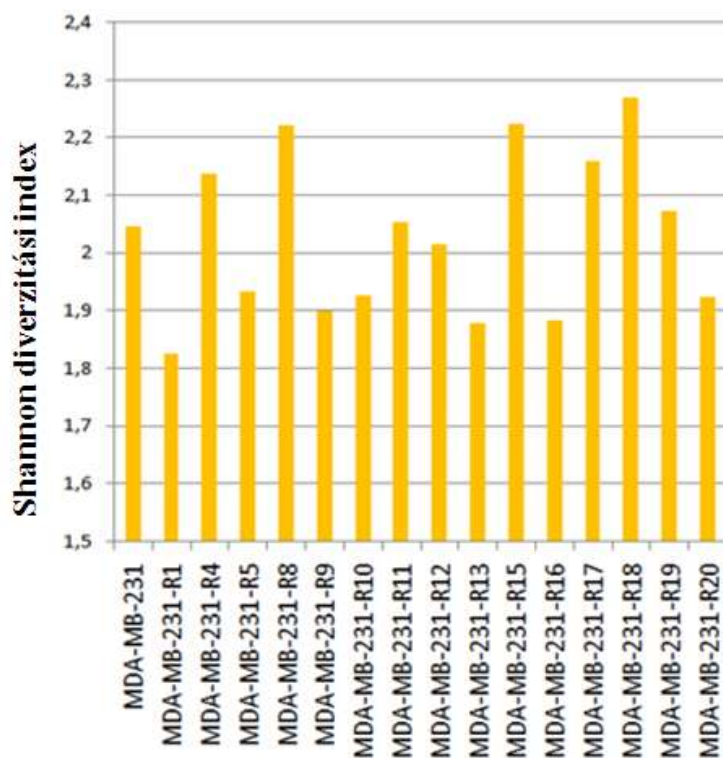
B.



**5. ábra:** Egy példa a citogenetikai vizsgálatok eredményére: A MDA-MB-231-R18 sejt vonal reprezentatív kariotípusa.



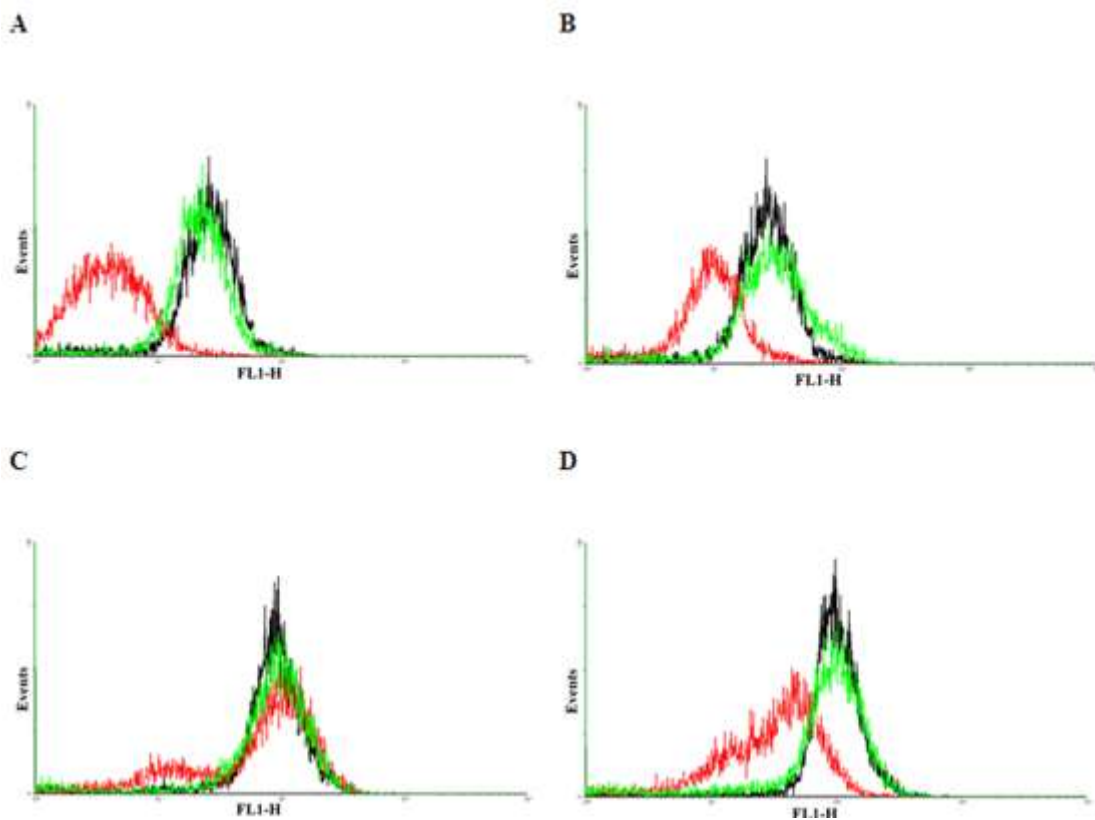
**6. ábra:** A kromoszómális instabilitást (CIN) a Shannon diverzitási index alapján számoltam a 3-as 17-es és a 21-es kromoszóma eltérései alapján (10 metafázis eredményei alapján). A kromoszómális instabilitás küszöbértéke 2,1 volt.



### 3.4 Áramlási citometria

A sejtvonalak P-glikoprotein funkcióját a Pgp szubsztrát rhodamin 123 akkumuláció áramlási citometriai vizsgálatával határoztam meg. A paklitaxel kezelt MCF-7-R20 sejtvonal mutatta a legnagyobb keresztrezisztenciát doxorubicinnal szemben. A paklitaxel kezelt MDA-MB-231-R19 sejtvonal mutatta a legnagyobb mértékű rezisztenciát paklitaxellel szemben, ugyanakkor nagyfokú rhodamin 123 effluxot is tapasztaltam ennél a két sejtvonalnál. Két paklitaxel rezisztens sejtvonal (MCF-6-R5 és MCF-7-R7) doxorubicinnal és ciszplatinnal szemben is rezisztensnek bizonyult. Bár nem volt megfigyelhető összefüggés a rhodamin 123 efflux és a rezisztencia között, az áramlási citometriai mérések eredményei arra utalnak, hogy egyes sejtvonalokban nagy szerepe lehet a rezisztencia kialakulásában a Pgp funkció megváltozásának (7.ábra).

**7. ábra:** Az eredeti és rezisztens MDA-MB-231 és MCF-7 sejtvonalak rhodamin 123 akkumulációjának vizsgálata áramlási citométerrel. (fekete: eredeti sejtvonal, piros: rezisztens sejtvonal megváltozott Pgp funkcióval, zöld: rezisztens sejtvonal normál Pgp funkcióval. **A**, MDA-MB-231-R19 (piros), MDA-MB-231-R11 (zöld); **B**, MDA-MB-231-R1 (piros), MDA-MB-231-R8 (zöld); **C**, MCF7-R7 (piros), MCF7-R2 (zöld); **D**, MCF7-R20 (piros), MCF7-R12 (zöld). A rezisztens sejtvonalak Pgp funkcióbeli eltérései csak a rezisztens sejtvonalak egy részében magyarázzák meg a rezisztencia létrejöttét.



## 4 Megbeszélés

Két humán emlőrák sejtvonalból kiindulva fokozatosan emelkedő koncentrációjú doxorubicin vagy paklitaxel kezelés segítségével egymástól függetlenül 29 rezisztens sejtvonalat hoztam létre, hogy a szerzett rezisztencia kialakulását modellezsem. A saját korábbi vagy az irodalmi vizsgálatoknál lényegesen több rezisztens sejtvonalat hoztam létre [230] a megbízhatóbb eredmények reményében. Érdekes módon a sejtvonalak nagyfokú heterogenitást mutattak a rezisztencia kialakulását, illetve az igazolt genetikai eltérések tekintetében. A rezisztencia heterogenitását az egyes sejtvonalakon belüli genetikai heterogenitás magyarázhatja.

Két kérdésre összpontosítottam: Vajon több, azonos sejtvonalból álló rezisztens panel segítségével azonosítani lehet-e a korábban leírt, klinikailag igazolt prediktív biomarkereket? Eredményeim igenlő választ adnak a kérdésre, ígéretes a modell a több rezisztens sejtvonalat tartalmazó panel klinikailag releváns prediktív biomarkerek azonosítására. Ugyanakkor ennek a modellnek is vannak korlátai. Az ABCB1 gén és a P-glikoprotein vizsgálata során bebizonyosodott, hogy ez a modell sem képes minden esetben kimutatni minden rezisztencia-mechanizmust, ugyanis a rezisztencia az azonos eredet ellenére más-más mechanizmussal jött létre az egyes sejtvonalakon. Az áramlási citometriai vizsgálat demonstrálta, hogy az adott sejtvonalból, adott szerrel szemben rezisztens sejtvonalak közül van, amelyikben kimutatható a P-glikoprotein fokozott aktivitása, mely oki szerepet játszik a doxorubicinnal és paklitaxellel szembeni rezisztenciában. Ugyanakkor más rezisztens sejtvonalban nem változott a P-glikoprotein aktivitása, ezért ebben az esetben más mechanizmusok vezethetnek a rezisztencia kialakulásához.

Második kérdésem arra vonatkozott, hogy milyen gyakorisággal jelenik meg a multidrog rezisztens fenotípus egy szerrel történő kezelés során? A 29 rezisztens sejtvonalból 25 mutatott legalább kétszeres rezisztenciát egy másik szerrel szemben. Tizenkét sejtvonalban alakult ki legalább kétszeres rezisztencia egyszerre két szerrel szemben, és két sejtvonalban alakult ki legalább kétszeres rezisztencia három szerrel szemben. Az eredmények alapján elmondható, hogy a szelekciós hatás eredménye révén egy szerrel szembeni keresztrezisztencia gyakori, azonban a valódi multidrog rezisztens fenotípus kialakulása jóval ritkább. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a

megfigyeléssel, hogy az elsővonalbeli kezelés sikertelenségét követően, a másod-, illetve harmadvonalbeli kezelés sikeres lehet [247].

Korábbi vizsgálatokban [203, 248] igazolták az ABC transzporterfehérje család tagjainak szerepét a multidrog rezisztencia kialakulásában. Igazoltam az ABC-transzporterek szerepét a rezisztencia kialakításában. Az áramlási citometriai és a TaqMan vizsgálatok eredményét összevetve megállapítottam, hogy összefüggés áll fenn az ABCB1 gén mRNS expressziója és a P-glikoprotein aktivitás között. Ugyanakkor az áramlási citometriai és a TaqMan vizsgálatok nem minden rezisztens sejtvonal esetében mutattak ki expresszió- vagy funkcióváltozást, azaz az ABCB1 expresszióváltozás nem minden sejtvonalban járul hozzá a rezisztencia kialakításához. A rezisztencia tehát az ABC transzporterektől független alternatív mechanizmusokkal is létrejöhet.

Figyelemre méltó, hogy két korábban paklitaxel rezisztenciával összefüggésbe hozott gén, a TUBB2C és a TUBB3 expressziója összefüggést mutatott a doxorubicin rezisztenciával, azonban a paklitaxellel szemben nem. Irodalmi adatok arra utalnak [249], hogy az antraciklin származékok képesek megakadályozni a tubulin monomerek polimerizációját, azaz hatásmechanizmusukban ez is szerepet játszhat. A tubulin izoformák expressziójának megváltozása hozzájárulhat a rezisztencia kialakulásához, ilyen módon magyarázható meg az ebben a vizsgálatban kapott meglepő eredmény. Ugyanakkor az eddigi eredmények nem igazolják a rezisztenciában betöltött oki szerepet, ehhez további funkcionális vizsgálatokra van szükség.

Eredményeim rávilágítanak arra, hogy a heterogenitás többféle rezisztens sejtpopuláció kialakulásához vezethet, melyek eltérő geno- és fenotípussal jellemezhetők. A tumoron belül különböző rezisztencia-mechanizmusokkal bíró sejtpopulációk jelenléte új diagnosztikus és kezelési kihívást jelentenek, új megközelítést kívánnak. Egy adott tumorból származó több minta nagyobb valószínűséggel reprezentálja a tumor heterogenitásából fakadó különbségeket. Hátránya, hogy nem költséghatékony több prediktív tesztet végezni egy adott mintából, ami megnehezíti a klinikai alkalmazás elterjedését. Szintén lehetséges, hogy több prediktív teszt elvégzésével sem lehet azonosítani egy vagy több eltérő rezisztencia-mechanizmussal rendelkező sejtpopulációt, melyek a kezelés megkezdése után fontos szerepet töltenek be a rezisztens tumor kialakulásában. A mintán belüli genetikai

heterogenitás meghatározása alkalmas lehet a kezelés hatékonyságát javító döntések meghozatalában [236]. Barret-nyelőcső esetén demonstrálták, hogy a daganat heterogenitásának egy mintából történő meghatározásával a daganatos progresszió folyamatát előre lehet jelezni. Egy mintán belül a daganat heterogenitásának meghatározása is hasznos információt hordoz. További lehetőséget kínál a tumor klonális geno- és fenotípusának megállapítására a keringő tumorsejtek vizsgálata [250].

Összehasonlítva a korábban használt *in vitro* modelleket az általam használt modellel, az új modell alkalmasnak bizonyult több klinikailag igazolt rezisztencia-mechanizmus azonosítására, így ez a modell hatékonyabb, mint egy rezisztens és az eredeti sejtvonal összehasonlítása.



## 5 Következtetések

Célom a szerzett rezisztencia vizsgálata volt egy újszerű sejt kultúra alapú modell segítségével. Korábbi irodalmi adatok alapján feltételeztem, hogy több azonos eredetű, rezisztens sejtvonal kialakítása eredményeképpen hatékonyabban lehet klinikailag igazolt rezisztencia-mechanizmusokat azonosítani.

Az eredményeim alapján levonható **következtetések**:

- 1. Több, egy sejtvonalból származó rezisztens sejtvonal vizsgálatával lehetséges több klinikailag igazolt rezisztencia-mechanizmus azonosítása.** Paklitaxel rezisztens sejtvonalak esetén négy korábban leírt rezisztencia-mechanizmust sikerült azonosítani az *in vitro* modellel, míg korábbi közlemények rendszerint egy-egy rezisztencia-mechanizmust írtak le.
- 2. A multidrog rezisztencia kialakulása egy daganatellenes szerrel történő kezelés esetén ritka.** A 29 rezisztens sejtvonalból 25 mutatott legalább kétszeres rezisztenciát egy másik szerrel szemben, és 12 sejtvonalban alakult ki legalább kétszeres rezisztencia egyszerre két szerrel szemben, és két sejtvonalban alakult ki legalább kétszeres rezisztencia három szerrel szemben. Az eredmények alapján elmondható, hogy a szelekciós hatás eredménye révén az egy szerrel szembeni keresztrezisztencia gyakori, azonban a valódi multidrog rezisztens fenotípus kialakulása jóval ritkább.
- 3. A rezisztencia nagyfokú heterogenitást mutat.** Az áramlási citometriai mérések alapján egyes rezisztens sejtvonalak esetén transzportpumpa aktivitás-növekedés következett be, míg más rezisztens sejtvonalak esetén az eredeti sejtvonallal megegyező aktivitást mutattam ki. A

TaqMan mérések hasonló eredményeket mutattak ki más rezisztencia-mechanizmusok esetén.

## 6 Összefoglalás

A szerzett rezisztencia egy komplex multifaktoriális probléma, melyben számos tényező egyidejűleg szerepet játszhat, melyek a szisztémás kezelés kudarcához vezetnek. Azért, hogy a klinikailag releváns és a “passenger” molekuláris változásokat el tudjuk különíteni, egy új *in vitro* modellt alkalmaztam. Több rezisztens sejtvonalat hoztam létre, melyek azonos sejtvonalból származnak, és azonos kezelésben részesültek. Várakozásaink szerint a rezisztencia következetesen azonos módon jöhet létre. Azonosítottam korábban leírt rezisztencia-mechanizmusokat, ugyanakkor a rezisztens sejtvonalak heterogénnek bizonyultak a kialakuló rezisztencia tekintetében.

A kemoterápiás szerek hatékonyságát a kialakuló rezisztencia gátolja, ami a kezelés sikertelenségéhez vezet. Számos stratégia létezik a rezisztencia-mechanizmusok azonosítására, például sejtvonalak érzékenységének meghatározása, és a rezisztens és szenzitív sejtvonalak összehasonlítása. Ugyanakkor ezzel a megközelítéssel kis hatékonysággal lehet klinikumban is alkalmazható biomarkereket azonosítani. Egyidejűleg több rezisztens sejtvonal párhuzamos létrehozása egy sejtvonalból javíthatja a hatékonyságot. Több doxorubicin és paklitaxel rezisztens, azonos eredetű sejtvonalat hoztam létre két emlőrák sejtvonalból. Feltételeztem, hogy a rezisztencia hasonló módon alakul ki azonos származás és kezelés esetén és azért a klinikailag releváns rezisztencia mechanizmusait ilyen módon hatékonyabban lehet azonosítani.

Több MDA-MB-231 és MCF7 sejtvonalat kezeltem doxorubicin és paklitaxel fokozatosan emelkedő koncentrációjával. A sejtek érzékenységét MTT segítségével vizsgáltam. Keresztrezisztenciát doxorubicin, paklitaxel, 5-fluorouracil és ciszplatin kezelés esetén határoztam meg. A doxorubicin és paklitaxel rezisztenciához társuló géneket kigyűjtöttem irodalmi adatok alapján, és TaqMan RT-PCR segítségével megmértem expressziójukat. Rhodamin 123 akkumuláció vizsgálatával a sejtek P-glikoprotein aktivitását jellemeztem. Citogenetikai vizsgálat során a szerzett rezisztenciához társuló kromoszómális elváltozásokat kerestem.

A 18 hónapos kezelés hatására 10 doxorubicin és 4 paklitaxel kezelt MCF7 sejtvonal, illetve 6 doxorubicin és 9 paklitaxel kezelt MDA-MB-231 sejtvonal vált rezisztenssé. Hét doxorubicin rezisztenciához és 11 paklitaxel rezisztenciához társuló gén expresszióját határoztam meg. A topoizomeráz II $\alpha$  és két tubulin izoforma

expressziója korrelált a rezisztencia mértékével a doxorubicin rezisztens sejtvonalakban, míg a paklitaxel rezisztensekben a MVP (major valult protein, lung resistance protein), 4 tubulin izoforma és a MAP4 (mikrotubulus asszociált protein 4) expresszió korrelált a rezisztencia mértékével.

A sejtek P-glikoprotein aktivitását áramlási citometria segítségével vizsgáltam a rhodamin 123 akkumuláció mérésén keresztül. Bár nem volt szignifikáns a korreláció a rhodamin 123 efflux és a multidrog rezisztencia között, egyes rezisztens sejtvonalakban nagyfokú csökkenés volt tapasztalható a rhodamin 123 akkumulációt illetően, míg másokban nem változott az eredeti szinthez képest.

Az MDA-MB-231 sejtvonalon és rezisztens változatain citogenetikai vizsgálatot végeztem. A rezisztens sejtvonalakban számos genetikai változást mutattam ki citogenetikai vizsgálat során. A fő különbség az eredeti és a rezisztens sejtvonalak között az új strukturális átrendeződések nagyobb száma volt.

Vizsgálataim alapján az egy sejtvonalból létrehozott több rezisztens sejtvonal modell alkalmas klinikailag releváns biomarkerek azonosítására. A korábbi *in vitro* vizsgálatokhoz képest több rezisztens sejtvonalat hoztam létre egy sejtvonalból. annak reményében, hogy a kapott eredmények megbízhatósága növekszik. Várakozásaimmal ellentétben a sejtvonalak heterogénnek bizonyultak a kialakuló rezisztencia és a genetikai változások tekintetében.

## 7 Summary

Breast cancer chemotherapy resistance is a complex multifactorial problem, where several factors may act simultaneously, leading to failure of systemic treatment. In order to distinguish between relevant and “passenger” molecular changes emerging during development of resistance I parallel developed resistant cell lines expecting that changes responsible for drug resistance will develop in a consistent fashion across an entire cell line panel. I identified previously described predictors of chemotherapy resistance. The resistant cell lines proved to be highly heterogeneous in the development of drug resistance and in confirmed genetic alterations, which may be result of genetic heterogeneity of the cell lines.

Efficacy of chemotherapy agents is limited by the development of drug resistance, leading to disease progression and patient mortality. There are several strategies to develop chemotherapy response predictors, for example investigation of sensitivity of cancer cell lines, and comparison of resistant and sensitive cell lines. The efficacy of the identification of clinically relevant biomarkers using *in vitro* studies is often low. Developing parallel more resistant cell lines to a given agent and then comparing the resistant and the sensitive original cell line may circumvent this problem and increase the value of such studies . I established multiple doxorubicin and paclitaxel resistant cell line derivatives from two breast cancer cell lines. I assumed, that truly robust and relevant resistance mechanisms will emerge in multiple cell lines and a clinically relevant convergent pattern of resistance can be identified.

Multiple MDA-MB-231 and MCF7 cell lines were treated with gradually increasing concentrations of doxorubicin and paclitaxel. Sensitivity of the cell lines was measured by MTT cell proliferation assay. Cross-resistance measurements were done using doxorubicin, paclitaxel, 5-fluorouracil and cisplatin treatment. Genes associated with doxorubicin and paclitaxel resistance were identified, and gene expression of the resistant and original cell lines was measured by TaqMan real-time PCR. Rhodamine 123 flow cytometric assay was performed to compare the Pgp function in the original and resistant cell lines. Conventional cytogenetics was used to determine chromosomal changes associated to acquired resistance.

As a result of 18 months of treatment 10 doxorubicin and 4 paclitaxel treated MCF-7 cell lines and 6 doxorubicin and 9 paclitaxel treated MDA-MB-231 cell lines became resistant. I also determined the level of cross-resistance against four anti-cancer agents (doxorubicin, paclitaxel, cisplatin and 5-fluorouracil).

I measured the expression of 7 doxorubicin resistance associated genes, 11 paclitaxel resistance associated genes, 4 genes of hormone receptors playing an important role in breast cancer, and additionally 3 housekeeping genes. In the doxorubicin resistant cell lines the expression of topoisomerase II alpha and two tubulin isoforms were significantly correlated to the level of resistance. In the paclitaxel resistant cell lines, the expression of MVP, of four tubulin isoforms and of MAP4 correlated to resistance.

The ability to export drugs via Pgp-activity was assessed by flow cytometry using the Pgp substrate rhodamine 123. However, a general correlation between rhodamine efflux and multidrug resistance for other agents could not be validated, as some resistant cell lines showed altered rhodamine 123 efflux, and some of the cell lines showed no change in Pgp activity at all compared to parental cell line.

Cytogenetics was performed on all cell lines derived from the MDA-MB-231 cell line. There were numerous genetic changes in the resistant cell lines. The main difference between the parental and the resistant cell lines is in the higher number of new type structural rearrangements in the derivative cell lines.

I established a significantly higher number of resistant cell lines compared to previous studies in the hope of achieving increased reliability and robustness. Interestingly, at the end the cell lines were proved to be highly heterogeneous in the development of drug resistance and in confirmed genetic alterations.

In summary, my main question was, whether the multiple resistant cell line panel can re-identify previously validated predictors of chemotherapy resistance. The results suggest an affirmative answer and therefore validate this model as a promising tool for the identification of clinically relevant biomarkers.

## 8 Irodalomjegyzék

1. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2011; 61(4):212-236.
2. Otto S, Kasler M. [Trends in cancer mortality and morbidity in Hungarian and international statistics. Characteristics and potential outcome of public health screening programs]. *Magy Onkol*, 2005; 49(2):99-101, 103-107.
3. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJ, Naghavi M. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*, 2011; 378(9801):1461-1484.
4. Lodha RS, Nandeshwar S, Pal DK, Shrivastav A, Lodha KM, Bhagat VK, Bankwar VV, Saxena DM. Risk Factors for Breast Cancer among Women in Bhopal Urban Agglomerate: A Case-Control Study. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 2011; 12(8):2111-2115.
5. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001; 98(19):10869-10874.
6. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000; 406(6797):747-752.
7. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*, 1998; 351(9114):1451-1467.

8. Klijn JG, Berns PM, Bontenbal M, Alexieva-Figusch J, Foekens JA. Clinical breast cancer, new developments in selection and endocrine treatment of patients. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 1992; 43(1-3):211-221.
9. Rodriguez Lajusticia L, Martin Jimenez M, Lopez-Tarruella Cobo S. Endocrine therapy of metastatic breast cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 2008; 10(8):462-467.
10. Taylor CW, Green S, Dalton WS, Martino S, Rector D, Ingle JN, Robert NJ, Budd GT, Paradelo JC, Natale RB, Bearden JD, Mailliard JA, Osborne CK. Multicenter randomized clinical trial of goserelin versus surgical ovariectomy in premenopausal patients with receptor-positive metastatic breast cancer: an intergroup study. *J Clin Oncol*, 1998; 16(3):994-999.
11. Klijn JG, Beex LV, Mauriac L, van Zijl JA, Veyret C, Wildiers J, Jassem J, Piccart M, Burghouts J, Becquart D, Seynaeve C, Mignolet F, Duchateau L. Combined treatment with buserelin and tamoxifen in premenopausal metastatic breast cancer: a randomized study. *Journal of the National Cancer Institute*, 2000; 92(11):903-911.
12. Klijn JG, Blamey RW, Boccardo F, Tominaga T, Duchateau L, Sylvester R. Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials. *J Clin Oncol*, 2001; 19(2):343-353.
13. Howell A, Sapunar F. Fulvestrant revisited: efficacy and safety of the 500-mg dose. *Clinical breast cancer*, 2011; 11(4):204-210.
14. Howell A, Robertson JF, Quaresma Albano J, Aschermannova A, Mauriac L, Kleeberg UR, Vergote I, Erikstein B, Webster A, Morris C. Fulvestrant, formerly ICI 182,780, is as effective as anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing after prior endocrine treatment. *J Clin Oncol*, 2002; 20(16):3396-3403.
15. Osborne CK, Pippen J, Jones SE, Parker LM, Ellis M, Come S, Gertler SZ, May JT, Burton G, Dimery I, Webster A, Morris C, Elledge R, Buzdar A. Double-blind,



randomized trial comparing the efficacy and tolerability of fulvestrant versus anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing on prior endocrine therapy: results of a North American trial. *J Clin Oncol*, 2002; 20(16):3386-3395.

16. Ingle JN, Suman VJ, Rowland KM, Mirchandani D, Bernath AM, Camoriano JK, Fishkin PA, Nikcevich DA, Perez EA. Fulvestrant in women with advanced breast cancer after progression on prior aromatase inhibitor therapy: North Central Cancer Treatment Group Trial N0032. *J Clin Oncol*, 2006; 24(7):1052-1056.

17. Mauri D, Pavlidis N, Polyzos NP, Ioannidis JP. Survival with aromatase inhibitors and inactivators versus standard hormonal therapy in advanced breast cancer: meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 2006; 98(18):1285-1291.

18. Bonneterre J, Thurlimann B, Robertson JF, Krzakowski M, Mauriac L, Koralewski P, Vergote I, Webster A, Steinberg M, von Euler M. Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in 668 postmenopausal women: results of the Tamoxifen or Arimidex Randomized Group Efficacy and Tolerability study. *J Clin Oncol*, 2000; 18(22):3748-3757.

19. Nabholz JM, Buzdar A, Pollak M, Harwin W, Burton G, Mangalik A, Steinberg M, Webster A, von Euler M. Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: results of a North American multicenter randomized trial. Arimidex Study Group. *J Clin Oncol*, 2000; 18(22):3758-3767.

20. Mouridsen HT. Letrozole in advanced breast cancer: the PO25 trial. *Breast cancer research and treatment*, 2007; 105 Suppl 1:19-29.

21. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987; 235(4785):177-182.

22. Faltus T, Yuan J, Zimmer B, Kramer A, Loibl S, Kaufmann M, Strebhardt K. Silencing of the HER2/neu gene by siRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *Neoplasia*, 2004; 6(6):786-795.

23. Lopez-Guerrero JA, Llombart-Cussac A, Noguera R, Navarro S, Pellin A, Almenar S, Vazquez-Alvadalejo C, Llombart-Bosch A. HER2 amplification in recurrent breast cancer following breast-conserving therapy correlates with distant metastasis and poor survival. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 2006; 118(7):1743-1749.
24. Higgins MJ, Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. *The Journal of clinical investigation*, 2011; 121(10):3797-3803.
25. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Ruschoff J, Suto T, Grotzer T, Ward C, Strahle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 2005; 353(16):1659-1672.
26. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 2005; 353(16):1673-1684.
27. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature reviews Cancer*, 2009; 9(7):463-475.
28. Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Giordano SH. Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. *J Clin Oncol*, 2010; 28(1):92-98.
29. Ferretti G, Fabi A, Felici A, Papaldo P. Improved prognosis by trastuzumab of women with HER2-positive breast cancer compared with those with HER2-negative disease. *J Clin Oncol*, 2010; 28(20):e337; author reply e338-339.
30. Scheuer W, Friess T, Burtscher H, Bossenmaier B, Endl J, Hasmann M. Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination

treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. *Cancer research*, 2009; 69(24):9330-9336.

31. Baselga J, Swain SM. CLEOPATRA: a phase III evaluation of pertuzumab and trastuzumab for HER2-positive metastatic breast cancer. *Clinical breast cancer*, 2010; 10(6):489-491.

32. Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, Bianchi G, Cortes J, McNally VA, Ross GA, Fumoleau P, Gianni L. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol*, 2010; 28(7):1138-1144.

33. Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, Blattler WA, Lambert JM, Chari RV, Lutz RJ, Wong WL, Jacobson FS, Koeppen H, Schwall RH, Kenkare-Mitra SR, Spencer SD, Sliwkowski MX. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer research*, 2008; 68(22):9280-9290.

34. Burris HA, 3rd, Rugo HS, Vukelja SJ, Vogel CL, Borson RA, Limentani S, Tan-Chiu E, Krop IE, Michaelson RA, Girish S, Amler L, Zheng M, Chu YW, Klenske B, O'Shaughnessy JA. Phase II study of the antibody drug conjugate trastuzumab-DM1 for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive breast cancer after prior HER2-directed therapy. *J Clin Oncol*, 2011; 29(4):398-405.

35. Hassan MS, Ansari J, Spooner D, Hussain SA. Chemotherapy for breast cancer (Review). *Oncology reports*, 2010; 24(5):1121-1131.

36. Henderson IC, Allegra JC, Woodcock T, Wolff S, Bryan S, Cartwright K, Dukart G, Henry D. Randomized clinical trial comparing mitoxantrone with doxorubicin in previously treated patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 1989; 7(5):560-571.

37. Paridaens R, Biganzoli L, Bruning P, Klijn JG, Gamucci T, Houston S, Coleman R, Schachter J, Van Vreckem A, Sylvester R, Awada A, Wildiers J, Piccart M. 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; 18(4):724-733.

38. Piccart-Gebhart MJ, Burzykowski T, Buyse M, Sledge G, Carmichael J, Luck HJ, Mackey JR, Nabholz JM, Paridaens R, Biganzoli L, Jassem J, Bontenbal M, Bonnetterre J, Chan S, Basaran GA, Therasse P. Taxanes alone or in combination with anthracyclines as first-line therapy of patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 2008; 26(12):1980-1986.
39. Valagussa P, Bonadonna G, Veronesi U. Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. Analysis of 716 consecutive patients. *Cancer*, 1978; 41(3):1170-1178.
40. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, Mandelblatt JS, Yakovlev AY, Habbema JD, Feuer EJ. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med*, 2005; 353(17):1784-1792.
41. Lopez-Tarruella S, Martin M. Recent advances in systemic therapy: advances in adjuvant systemic chemotherapy of early breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 2009; 11(2):204.
42. Fisher B, Ravdin RG, Ausman RK, Slack NH, Moore GE, Noer RJ. Surgical adjuvant chemotherapy in cancer of the breast: results of a decade of cooperative investigation. *Annals of surgery*, 1968; 168(3):337-356.
43. Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, Rossi A, Brugnatelli L, Brambilla C, De Lena M, Tancini G, Bajetta E, Musumeci R, Veronesi U. Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. *N Engl J Med*, 1976; 294(8):405-410.
44. Fisher B, Carbone P, Economou SG, Frelick R, Glass A, Lerner H, Redmond C, Zelen M, Band P, Katrych DL, Wolmark N, Fisher ER. 1-Phenylalanine mustard (L-PAM) in the management of primary breast cancer. A report of early findings. *N Engl J Med*, 1975; 292(3):117-122.

45. Bonadonna G, Valagussa P, Moliterni A, Zambetti M, Brambilla C. Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer: the results of 20 years of follow-up. *N Engl J Med*, 1995; 332(14):901-906.
46. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*, 1998; 352(9132):930-942.
47. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 2005; 365(9472):1687-1717.
48. Fisher B, Anderson S, Tan-Chiu E, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER, Dimitrov NV, Atkins JN, Abramson N, Merajver S, Romond EH, Kardinal CG, Shibata HR, Margolese RG, Farrar WB. Tamoxifen and chemotherapy for axillary node-negative, estrogen receptor-negative breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-23. *J Clin Oncol*, 2001; 19(4):931-942.
49. Martin M, Villar A, Sole-Calvo A, Gonzalez R, Massuti B, Lizon J, Camps C, Carrato A, Casado A, Candel MT, Albanell J, Aranda J, Munarriz B, Campbell J, Diaz-Rubio E. 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. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 2003; 14(6):833-842.
50. Fumoleau P, Kerbrat P, Romestaing P, Fargeot P, Bremond A, Namer M, Schraub S, Goudier MJ, Mihura J, Monnier A, Clavere P, Serin D, Seffert P, Pourny C, Facchini T, Jacquin JP, Sztermer JF, Datchary J, Ramos R, Luporsi E. Randomized trial comparing six versus three cycles of epirubicin-based adjuvant chemotherapy in premenopausal, node-positive breast cancer patients: 10-year follow-up results of the French Adjuvant Study Group 01 trial. *J Clin Oncol*, 2003; 21(2):298-305.
51. Bria E, Nistico C, Cuppone F, Carlini P, Ciccarese M, Milella M, Natoli G, Terzoli E, Cognetti F, Giannarelli D. Benefit of taxanes as adjuvant chemotherapy for

early breast cancer: pooled analysis of 15,500 patients. *Cancer*, 2006; 106(11):2337-2344.

52. De Laurentiis M, Canello G, D'Agostino D, Giuliano M, Giordano A, Montagna E, Lauria R, Forestieri V, Esposito A, Silvestro L, Pennacchio R, Criscitiello C, Montanino A, Limite G, Bianco AR, De Placido S. Taxane-based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol*, 2008; 26(1):44-53.

53. Kaufmann M, von Minckwitz G, Smith R, Valero V, Gianni L, Eiermann W, Howell A, Costa SD, Beuzeboc P, Untch M, Blohmer JU, Sinn HP, Sittek R, Souchon R, Tulusan AH, Volm T, Senn HJ. International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations. *J Clin Oncol*, 2003; 21(13):2600-2608.

54. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, Theriault RL, Singh G, Binkley SM, Sneige N, Buchholz TA, Ross MI, McNeese MD, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Singletary SE. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*, 1999; 17(2):460-469.

55. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, Wickerham DL, Begovic M, DeCillis A, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB, Jr., Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV, Bear HD. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol*, 1998; 16(8):2672-2685.

56. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, Margolese RG, Hoehn JL, Vogel VG, Dakhil SR, Tamkus D, King KM, Pajon ER, Wright MJ, Robert J, Paik S, Mamounas EP, Wolmark N. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol*, 2008; 26(5):778-785.

57. Chan S, Friedrichs K, Noel D, Pinter T, Van Belle S, Vorobiof D, Duarte R, Gil Gil M, Bodrogi I, Murray E, Yelle L, von Minckwitz G, Korec S, Simmonds P, Buzzi F, Gonzalez Mancha R, Richardson G, Walpole E, Ronzoni M, Murawsky M, Alakl M,

Riva A, Crown J. Prospective randomized trial of docetaxel versus doxorubicin in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 1999; 17(8):2341-2354.

58. Fossati R, Confalonieri C, Torri V, Ghislandi E, Penna A, Pistotti V, Tinazzi A, Liberati A. Cytotoxic and hormonal treatment for metastatic breast cancer: a systematic review of published randomized trials involving 31,510 women. *J Clin Oncol*, 1998; 16(10):3439-3460.

59. Cocconi G. Chemotherapy with and without anthracycline. *J Clin Oncol*, 2000; 18(6):1392-1393.

60. Holmes FA, Walters RS, Theriault RL, Forman AD, Newton LK, Raber MN, Buzdar AU, Frye DK, Hortobagyi GN. Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1991; 83(24):1797-1805.

61. Bonnetterre J, Spielman M, Guastalla JP, Marty M, Viens P, Chollet P, Roche H, Fumoleau P, Mauriac L, Bourgeois H, Namer M, Bergerat JP, Misset JL, Trandafir L, Mahjoubi M. Efficacy and safety of docetaxel (Taxotere) in heavily pretreated advanced breast cancer patients: the French compassionate use programme experience. *Eur J Cancer*, 1999; 35(10):1431-1439.

62. Perez EA. Doxorubicin and paclitaxel in the treatment of advanced breast cancer: efficacy and cardiac considerations. *Cancer investigation*, 2001; 19(2):155-164.

63. Roberts JT, von der Maase H, Sengelov L, Conte PF, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Zimmermann A, Arning M. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine/cisplatin and methotrexate/vinblastine/doxorubicin/cisplatin in patients with locally advanced and metastatic bladder cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 2006; 17 Suppl 5:v118-122.

64. Paoletti X, Oba K, Burzykowski T, Michiels S, Ohashi Y, Pignon JP, Rougier P, Sakamoto J, Sargent D, Sasako M, Van Cutsem E, Buyse M. Benefit of adjuvant chemotherapy for resectable gastric cancer: a meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 2010; 303(17):1729-1737.

65. Schmittel A. Second-line therapy for small-cell lung cancer. Expert review of anticancer therapy, 2011; 11(4):631-637.
66. Pronzato P, Vigani A, Tognoni A, Vaira F, Canessa P. Anthracyclines in non-small cell lung cancer. Lung Cancer, 2001; 34 Suppl 4:S57-59.
67. Azim HA, Jr., Ganti AK. Treatment options for relapsed small-cell lung cancer. Anti-cancer drugs, 2007; 18(3):255-261.
68. Sugarbaker PH. Cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy for the treatment of advanced primary and recurrent ovarian cancer. Current opinion in obstetrics & gynecology, 2009; 21(1):15-24.
69. Nocera M, Baudin E, Pellegriti G, Cailleux AF, Mechelany-Corone C, Schlumberger M. Treatment of advanced medullary thyroid cancer with an alternating combination of doxorubicin-streptozocin and 5 FU-dacarbazine. Groupe d'Etude des Tumeurs a Calcitonine (GETC). Br J Cancer, 2000; 83(6):715-718.
70. Almeida GF, Castro G, Jr., Snitcovsky IM, Siqueira SA, Akaishi EH, Camargo OP, Oliveira CR, Federico MH. Sequential dose-dense Doxorubicin and Ifosfamide in advanced soft-tissue sarcoma patients in an out-patient-basis schedule. Sarcoma, 2011; 2011:984340.
71. Kaufman J, Gleason C, Lonial S. Treatment of relapsed and refractory myeloma. Current hematologic malignancy reports, 2009; 4(2):99-107.
72. Straus DJ. Chemotherapy Alone for Early-Stage Hodgkin's Lymphoma. N Engl J Med, 2011.
73. Dincol D, Buyukcelik A, Dogan M, Akbulut H, Samur M, Demirkazik A, Senler FC, Onur H, Icli F. Long-term outcome of mesna, ifosfamide, mitoxantrone, etoposide (MINE) regimen as a consolidation in patients with aggressive non-Hodgkin lymphoma responding to CHOP. Med Oncol, 2010; 27(3):942-945.
74. Wang H, Mao Y, Zhou N, Hu T, Hsieh TS, Liu LF. Atp-bound topoisomerase ii as a target for antitumor drugs. The Journal of biological chemistry, 2001; 276(19):15990-15995.



75. Minotti G, Licata S, Saponiero A, Menna P, Calafiore AM, Di Giammarco G, Liberi G, Animati F, Cipollone A, Manzini S, Maggi CA. 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. *Chemical research in toxicology*, 2000; 13(12):1336-1341.
76. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends in biochemical sciences*, 1996; 21(3):83-86.
77. Muller I, Niethammer D, Bruchelt G. Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review). *International journal of molecular medicine*, 1998; 1(2):491-494.
78. Kemp CJ, Sun S, Gurley KE. p53 induction and apoptosis in response to radio- and chemotherapy in vivo is tumor-type-dependent. *Cancer research*, 2001; 61(1):327-332.
79. Ludke AR, Al-Shudiefat AA, Dhingra S, Jassal DS, Singal PK. A concise description of cardioprotective strategies in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 2009; 87(10):756-763.
80. Hofland KF, Thougard AV, Sehested M, Jensen PB. Dexrazoxane protects against myelosuppression from the DNA cleavage-enhancing drugs etoposide and daunorubicin but not doxorubicin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2005; 11(10):3915-3924.
81. Giaccone G, Di Giulio F, Morandini MP, Calciati A. Scalp hypothermia in the prevention of doxorubicin-induced hair loss. *Cancer nursing*, 1988; 11(3):170-173.
82. Chien AJ, Moasser MM. Cellular mechanisms of resistance to anthracyclines and taxanes in cancer: intrinsic and acquired. *Seminars in oncology*, 2008; 35(2 Suppl 2):S1-S14; quiz S39.
83. Piccart M. The role of taxanes in the adjuvant treatment of early stage breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 2003; 79 Suppl 1:S25-34.

84. Sparano JA. Taxanes for breast cancer: an evidence-based review of randomized phase II and phase III trials. *Clinical breast cancer*, 2000; 1(1):32-40; discussion 41-32.
85. Obasaju C, Hudes GR. Paclitaxel and docetaxel in prostate cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*, 2001; 15(3):525-545.
86. du Bois A, Neijt JP, Thigpen JT. First line chemotherapy with carboplatin plus paclitaxel in advanced ovarian cancer--a new standard of care? *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 1999; 10 Suppl 1:35-41.
87. Conlin AK, Seidman AD. Taxanes in breast cancer: an update. *Current oncology reports*, 2007; 9(1):22-30.
88. Rowinsky EK. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annual review of medicine*, 1997; 48:353-374.
89. Grossi F, Kubota K, Cappuzzo F, de Marinis F, Gridelli C, Aita M, Douillard JY. Future scenarios for the treatment of advanced non-small cell lung cancer: focus on taxane-containing regimens. *The oncologist*, 2010; 15(10):1102-1112.
90. Kim SY, Kim DH, Lee HJ, Seo YJ, Lee JH, Lee Y. Treatment of Disseminated Classic Type of Kaposi's Sarcoma with Paclitaxel. *Annals of dermatology*, 2011; 23(4):504-507.
91. Greco FA, Hainsworth JD. The evolving role of paclitaxel for patients with carcinoma of unknown primary site. *Seminars in oncology*, 1999; 26(1 Suppl 2):129-133.
92. Manfredi JJ, Parness J, Horwitz SB. Taxol binds to cellular microtubules. *The Journal of cell biology*, 1982; 94(3):688-696.
93. Parness J, Horwitz SB. Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *The Journal of cell biology*, 1981; 91(2 Pt 1):479-487.
94. Nogales E, Wolf SG, Khan IA, Luduena RF, Downing KH. Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature*, 1995; 375(6530):424-427.

95. Rao S, He L, Chakravarty S, Ojima I, Orr GA, Horwitz SB. Characterization of the Taxol binding site on the microtubule. Identification of Arg(282) in beta-tubulin as the site of photoincorporation of a 7-benzophenone analogue of Taxol. *The Journal of biological chemistry*, 1999; 274(53):37990-37994.
96. Snyder JP, Nettles JH, Cornett B, Downing KH, Nogales E. The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001; 98(9):5312-5316.
97. Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annual review of biochemistry*, 2000; 69:277-302.
98. Schiff PB, Horwitz SB. Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule-associated proteins. *Biochemistry*, 1981; 20(11):3247-3252.
99. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 1979; 277(5698):665-667.
100. Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, Wilson L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993; 90(20):9552-9556.
101. Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer research*, 1996; 56(4):816-825.
102. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews Cancer*, 2002; 2(1):48-58.
103. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome research*, 2001; 11(7):1156-1166.

104. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 1999; 39:361-398.
105. Senior AE, Bhagat S. P-glycoprotein shows strong catalytic cooperativity between the two nucleotide sites. *Biochemistry*, 1998; 37(3):831-836.
106. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer research*, 1996; 56(5):988-994.
107. Childs S, Yeh RL, Hui D, Ling V. Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein. *Cancer research*, 1998; 58(18):4160-4167.
108. Borst P, Zelcer N, van Helvoort A. ABC transporters in lipid transport. *Biochimica et biophysica acta*, 2000; 1486(1):128-144.
109. Laing NM, Belinsky MG, Kruh GD, Bell DW, Boyd JT, Barone L, Testa JR, Tew KD. Amplification of the ATP-binding cassette 2 transporter gene is functionally linked with enhanced efflux of estramustine in ovarian carcinoma cells. *Cancer research*, 1998; 58(7):1332-1337.
110. Scheffer GL, Schroeijers AB, Izquierdo MA, Wiemer EA, Scheper RJ. Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Current opinion in oncology*, 2000; 12(6):550-556.
111. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987; 84(1):265-269.
112. Oka M, Fukuda M, Sakamoto A, Takatani H, Soda H, Kohno S. The clinical role of MDR1 gene expression in human lung cancer. *Anticancer research*, 1997; 17(1B):721-724.

113. Chan HS, Thorner PS, Haddad G, Ling V. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol*, 1990; 8(4):689-704.
114. van den Heuvel-Eibrink MM, Sonneveld P, Pieters R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 2000; 38(3):94-110.
115. Nooter K, Brutel de la Riviere G, Look MP, van Wingerden KE, Henzen-Logmans SC, Scheper RJ, Flens MJ, Klijn JG, Stoter G, Foekens JA. The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *Br J Cancer*, 1997; 76(4):486-493.
116. Shen DW, Goldenberg S, Pastan I, Gottesman MM. Decreased accumulation of [14C]carboplatin in human cisplatin-resistant cells results from reduced energy-dependent uptake. *Journal of cellular physiology*, 2000; 183(1):108-116.
117. Shen D, Pastan I, Gottesman MM. Cross-resistance to methotrexate and metals in human cisplatin-resistant cell lines results from a pleiotropic defect in accumulation of these compounds associated with reduced plasma membrane binding proteins. *Cancer research*, 1998; 58(2):268-275.
118. Schuetz EG, Beck WT, Schuetz JD. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Molecular pharmacology*, 1996; 49(2):311-318.
119. Kim SW, Kim HJ, Chun YJ, Kim MY. Ceramide produces apoptosis through induction of p27(kip1) by protein phosphatase 2A-dependent Akt dephosphorylation in PC-3 prostate cancer cells. *Journal of toxicology and environmental health Part A*, 2010; 73(21-22):1465-1476.
120. Chang E, Donahue J, Smith A, Hornick J, Rao JN, Wang JY, Battafarano RJ. Loss of p53, rather than beta-catenin overexpression, induces survivin-mediated resistance to apoptosis in an esophageal cancer cell line. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2010; 140(1):225-232.

121. James CR, Quinn JE, Mullan PB, Johnston PG, Harkin DP. BRCA1, a potential predictive biomarker in the treatment of breast cancer. *The oncologist*, 2007; 12(2):142-150.
122. Penzvalto Z, Mihaly Z, Gyorffy B. [Gene expression based multigene prognostic and predictive tests in breast cancer]. *Magy Onkol*, 2009; 53(4):351-359.
123. 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; 21(10):1973-1979.
124. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992; 89(10):4285-4289.
125. Guarneri V, Barbieri E, Dieci MV, Piacentini F, Conte P. Anti-HER2 neoadjuvant and adjuvant therapies in HER2 positive breast cancer. *Cancer treatment reviews*, 2010; 36 Suppl 3:S62-66.
126. Gennari A, Sormani MP, Pronzato P, Puntoni M, Colozza M, Pfeffer U, Bruzzi P. HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials. *Journal of the National Cancer Institute*, 2008; 100(1):14-20.
127. Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell proliferation*, 1996; 29(7):413-425.
128. Starborg M, Gell K, Brundell E, Hoog C. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *Journal of cell science*, 1996; 109 ( Pt 1):143-153.

129. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 1983; 31(1):13-20.
130. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 1984; 133(4):1710-1715.
131. du Manoir S, Guillaud P, Camus E, Seigneurin D, Brugal G. Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry*, 1991; 12(5):455-463.
132. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell proliferation*, 1992; 25(1):31-40.
133. Drach J, Gattringer C, Glassl H, Drach D, Huber H. The biological and clinical significance of the KI-67 growth fraction in multiple myeloma. *Hematological oncology*, 1992; 10(2):125-134.
134. 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. *American journal of hematology*, 2009; 84(6):338-343.
135. Ueda T, Aozasa K, Tsujimoto M, Ohsawa M, Uchida A, Aoki Y, Ono K, Matsumoto K. Prognostic significance of Ki-67 reactivity in soft tissue sarcomas. *Cancer*, 1989; 63(8):1607-1611.
136. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol*, 2005; 23(28):7212-7220.
137. Mechetner E, Kyshtoobayeva A, Zonis S, Kim H, Stroup R, Garcia R, Parker RJ, Fruehauf JP. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 1998; 4(2):389-398.

138. Penson RT, Oliva E, Skates SJ, Glyptis T, Fuller AF, Jr., Goodman A, Seiden MV. Expression of multidrug resistance-1 protein inversely correlates with paclitaxel response and survival in ovarian cancer patients: a study in serial samples. *Gynecologic oncology*, 2004; 93(1):98-106.
139. Yeh JJ, Hsu WH, Wang JJ, Ho ST, Kao A. Predicting chemotherapy response to paclitaxel-based therapy in advanced non-small-cell lung cancer with P-glycoprotein expression. *Respiration; international review of thoracic diseases*, 2003; 70(1):32-35.
140. Yang X, Uziely B, Groshen S, Lukas J, Israel V, Russell C, Dunnington G, Formenti S, Muggia F, Press MF. MDR1 gene expression in primary and advanced breast cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1999; 79(3):271-280.
141. Ozalp SS, Yalcin OT, Tanir M, Kabukcuoglu S, Etiz E. Multidrug resistance gene-1 (Pgp) expression in epithelial ovarian malignancies. *European journal of gynaecological oncology*, 2002; 23(4):337-340.
142. Gieseler F, Bauer E, Nuessler V, Clark M, Valsamas S. Molecular effects of topoisomerase II inhibitors in AML cell lines: correlation of apoptosis with topoisomerase II activity but not with DNA damage. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*, 1999; 13(11):1859-1863.
143. Lage H, Helmbach H, Dietel M, Schadendorf D. Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. *Br J Cancer*, 2000; 82(2):488-491.
144. Ramachandran C, Samy TS, Huang XL, Yuan ZK, Krishan A. Doxorubicin-induced DNA breaks, topoisomerase II activity and gene expression in human melanoma cells. *Biochemical pharmacology*, 1993; 45(6):1367-1371.
145. Eijdemans EW, de Haas M, Timmerman AJ, Van der Schans GP, Kamst E, de Nooij J, Astaldi Ricotti GC, Borst P, Baas F. Reduced topoisomerase II activity in multidrug-resistant human non-small cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer*, 1995; 71(1):40-47.



146. 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 treatment reviews*, 2007; 33(1):64-77.
147. Pritchard KI. Are HER2 and TOP2A useful as prognostic or predictive biomarkers for anthracycline-based adjuvant chemotherapy for breast cancer? *J Clin Oncol*, 2009; 27(24):3875-3876.
148. Tanner M, Isola J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, Malmstrom P, Wilking N, Nilsson J, Bergh J. 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; 24(16):2428-2436.
149. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer research*, 1999; 59(11):2615-2622.
150. Munkacsy G, Abdul-Ghani R, Mihaly Z, Tegze B, Tchernitsa O, Surowiak P, Schafer R, Gyorffy B. PSMB7 is associated with anthracycline resistance and is a prognostic biomarker in breast cancer. *Br J Cancer*, 2010; 102(2):361-368.
151. Steeg PS, Zhou Q. Cyclins and breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 1998; 52(1-3):17-28.
152. Bieche I, Lidereau R. Genetic alterations in breast cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, 1995; 14(4):227-251.
153. Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*, 2004; 23(16):2950-2966.
154. Duffy MJ. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clinical chemistry*, 2005; 51(3):494-503.
155. Duffy MJ, McCarthy K. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and targets for therapy (review). *International journal of oncology*, 1998; 12(6):1343-1348.

156. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC, Jr. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2007; 25(33):5287-5312.
157. Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *Journal of the National Cancer Institute*, 2001; 93(12):913-920.
158. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Ferno M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brunner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broet P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex LV, Klijn JG, O'Higgins N, Eppenberger U, Janicke F, Schmitt M, Foekens JA. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 2002; 94(2):116-128.
159. Molina R, Barak V, van Dalen A, Duffy MJ, Einarsson R, Gion M, Goike H, Lamerz R, Nap M, Soletormos G, Stieber P. Tumor markers in breast cancer- European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 2005; 26(6):281-293.
160. Surowiak P, Matkowski R, Materna V, Gyorffy B, Wojnar A, Pudelko M, Dziegiel P, Kornafel J, Zabel M. Elevated metallothionein (MT) expression in invasive ductal breast cancers predicts tamoxifen resistance. *Histology and histopathology*, 2005; 20(4):1037-1044.
161. Andre F, Hatzis C, Anderson K, Sotiriou C, Mazouni C, Mejia J, Wang B, Hortobagyi GN, Symmans WF, Pusztai L. Microtubule-associated protein-tau is a bifunctional predictor of endocrine sensitivity and chemotherapy resistance in estrogen

receptor-positive breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2007; 13(7):2061-2067.

162. Bhat KM, Setaluri V. Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2007; 13(10):2849-2854.

163. Rouzier R, Rajan R, Wagner P, Hess KR, Gold DL, Stec J, Ayers M, Ross JS, Zhang P, Buchholz TA, Kuerer H, Green M, Arun B, Hortobagyi GN, Symmans WF, Pusztai L. Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005; 102(23):8315-8320.

164. Blumencranz P, Whitworth PW, Deck K, Rosenberg A, Reintgen D, Beitsch P, Chagpar A, Julian T, Saha S, Mamounas E, Giuliano A, Simmons R. Scientific Impact Recognition Award. Sentinel node staging for breast cancer: intraoperative molecular pathology overcomes conventional histologic sampling errors. *American journal of surgery*, 2007; 194(4):426-432.

165. Mansel RE, Goyal A, Douglas-Jones A, Woods V, Goyal S, Monypenny I, Sweetland H, Newcombe RG, Jasani B. Detection of breast cancer metastasis in sentinel lymph nodes using intra-operative real time GeneSearch BLN Assay in the operating room: results of the Cardiff study. *Breast cancer research and treatment*, 2009; 115(3):595-600.

166. Glas AM, Floore A, Delahaye LJ, Witteveen AT, Pover RC, Bakx N, Lahti-Domenici JS, Bruinsma TJ, Warmoes MO, Bernardis R, Wessels LF, Van't Veer LJ. Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC genomics*, 2006; 7:278.

167. Bueno-de-Mesquita JM, Linn SC, Keijzer R, Wesseling J, Nuyten DS, van Krimpen C, Meijers C, de Graaf PW, Bos MM, Hart AA, Rutgers EJ, Peterse JL, Halfwerk H, de Groot R, Pronk A, Floore AN, Glas AM, Van't Veer LJ, van de Vijver MJ. Validation of 70-gene prognosis signature in node-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 2009; 117(3):483-495.

168. Straver ME, Glas AM, Hannemann J, Wesseling J, van de Vijver MJ, Rutgers EJ, Vrancken Peeters MJ, van Tinteren H, Van't Veer LJ, Rodenhuis S. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 2010; 119(3):551-558.
169. Mook S, Schmidt MK, Viale G, Pruneri G, Eekhout I, Floore A, Glas AM, Bogaerts J, Cardoso F, Piccart-Gebhart MJ, Rutgers ET, Van't Veer LJ. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast cancer research and treatment*, 2009; 116(2):295-302.
170. Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, Ewend MG, Glas AM, Perou CM, Van't Veer LJ. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer research*, 2005; 65(20):9155-9158.
171. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Bernardis R, Friend SH. Expression profiling predicts outcome in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 2003; 5(1):57-58.
172. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernardis R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*, 2002; 347(25):1999-2009.
173. Bast RC, Jr., Hortobagyi GN. Individualized care for patients with cancer - a work in progress. *N Engl J Med*, 2004; 351(27):2865-2867.
174. Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, Alexander C, Pho M, Baker J, Walker M, Watson D, Hackett J, Blick NT, Greenberg D, Fehrenbacher L, Langholz B, Quesenberry CP. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast cancer research : BCR*, 2006; 8(3):R25.

175. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 2004; 351(27):2817-2826.
176. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D, Bryant J, Costantino JP, Geyer CE, Jr., Wickerham DL, Wolmark N. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, 2006; 24(23):3726-3734.
177. Goldhirsch A, Coates AS, Gelber RD, Glick JH, Thurlimann B, Senn HJ. First--select the target: better choice of adjuvant treatments for breast cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 2006; 17(12):1772-1776.
178. Goetz MP, Suman VJ, Ingle JN, Nibbe AM, Visscher DW, Reynolds CA, Lingle WL, Erlander M, Ma XJ, Sgroi DC, Perez EA, Couch FJ. A two-gene expression ratio of homeobox 13 and interleukin-17B receptor for prediction of recurrence and survival in women receiving adjuvant tamoxifen. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2006; 12(7 Pt 1):2080-2087.
179. Jerevall PL, Brommesson S, Strand C, Gruvberger-Saal S, Malmstrom P, Nordenskjold B, Wingren S, Soderkvist P, Ferno M, Stal O. Exploring the two-gene ratio in breast cancer--independent roles for HOXB13 and IL17BR in prediction of clinical outcome. *Breast cancer research and treatment*, 2008; 107(2):225-234.
180. Jansen MP, Sieuwerts AM, Look MP, Ritstier K, Meijer-van Gelder ME, van Staveren IL, Klijn JG, Foekens JA, Berns EM. HOXB13-to-IL17BR expression ratio is related with tumor aggressiveness and response to tamoxifen of recurrent breast cancer: a retrospective study. *J Clin Oncol*, 2007; 25(6):662-668.
181. Ma XJ, Hilsenbeck SG, Wang W, Ding L, Sgroi DC, Bender RA, Osborne CK, Allred DC, Erlander MG. The HOXB13:IL17BR expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*, 2006; 24(28):4611-4619.

182. Ma XJ, Salunga R, Dahiya S, Wang W, Carney E, Durbecq V, Harris A, Goss P, Sotiriou C, Erlander M, Sgroi D. A five-gene molecular grade index and HOXB13:IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2008; 14(9):2601-2608.

183. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, Muir B, Mohapatra G, Salunga R, Tuggle JT, Tran Y, Tran D, Tassin A, Amon P, Wang W, Enright E, Stecker K, Estepa-Sabal E, Smith B, Younger J, Balis U, Michaelson J, Bhan A, Habin K, Baer TM, Brugge J, Haber DA, Erlander MG, Sgroi DC. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer cell*, 2004; 5(6):607-616.

184. Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Lallemand F, Tutt AM, Gillet C, Ellis P, Harris A, Bergh J, Foekens JA, Klijn JG, Larsimont D, Buyse M, Bontempi G, Delorenzi M, Piccart MJ, Sotiriou C. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *J Clin Oncol*, 2007; 25(10):1239-1246.

185. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, Nordgren H, Farmer P, Praz V, Haibe-Kains B, Desmedt C, Larsimont D, Cardoso F, Peterse H, Nuyten D, Buyse M, Van de Vijver MJ, Bergh J, Piccart M, Delorenzi M. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*, 2006; 98(4):262-272.

186. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*, 2009; 27(8):1160-1167.

187. Tutt A, Ashworth A. Can genetic testing guide treatment in breast cancer? *Eur J Cancer*, 2008; 44(18):2774-2780.

188. Tutt A, Wang A, Rowland C, Gillett C, Lau K, Chew K, Dai H, Kwok S, Ryder K, Shu H, Springall R, Cane P, McCallie B, Kam-Morgan L, Anderson S, Buerger H,

Gray J, Bennington J, Esserman L, Hastie T, Broder S, Sninsky J, Brandt B, Waldman F. Risk estimation of distant metastasis in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer patients using an RT-PCR based prognostic expression signature. *BMC cancer*, 2008; 8:339.

189. Iverson AA, Gillett C, Cane P, Santini CD, Vess TM, Kam-Morgan L, Wang A, Eisenberg M, Rowland CM, Hessling JJ, Broder SE, Sninsky JJ, Tutt A, Anderson S, Chang SY. A single-tube quantitative assay for mRNA levels of hormonal and growth factor receptors in breast cancer specimens. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 2009; 11(2):117-130.

190. Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, Parker LM, Anderson KS, Harris LN, Garber JE, Richardson AL, Schnitt SJ, Nikolsky Y, Gelman RS, Polyak K. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer cell*, 2007; 11(3):259-273.

191. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer research*, 2005; 65(13):5506-5511.

192. Liu R, Wang X, Chen GY, Dalerba P, Gurney A, Hoey T, Sherlock G, Lewicki J, Shedden K, Clarke MF. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med*, 2007; 356(3):217-226.

193. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003; 100(7):3983-3988.

194. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J, Jr., Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*, 1999; 283(5398):83-87.

195. Chang HY, Nuyten DS, Sneddon JB, Hastie T, Tibshirani R, Sorlie T, Dai H, He YD, van't Veer LJ, Bartelink H, van de Rijn M, Brown PO, van de Vijver MJ. Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005; 102(10):3738-3743.
196. Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, Sood R, West RB, Montgomery K, Chi JT, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS biology*, 2004; 2(2):E7.
197. Ross DT, Kim CY, Tang G, Bohn OL, Beck RA, Ring BZ, Seitz RS, Paik S, Costantino JP, Wolmark N. Chemosensitivity and stratification by a five monoclonal antibody immunohistochemistry test in the NSABP B14 and B20 trials. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2008; 14(20):6602-6609.
198. Ring BZ, Seitz RS, Beck R, Shasteen WJ, Tarr SM, Cheang MC, Yoder BJ, Budd GT, Nielsen TO, Hicks DG, Estopinal NC, Ross DT. Novel prognostic immunohistochemical biomarker panel for estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, 2006; 24(19):3039-3047.
199. Davis LM, Harris C, Tang L, Doherty P, Hraber P, Sakai Y, Bocklage T, Doeden K, Hall B, Alsobrook J, Rabinowitz I, Williams TM, Hozier J. Amplification patterns of three genomic regions predict distant recurrence in breast carcinoma. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 2007; 9(3):327-336.
200. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 2009; 133(9):1463-1467.
201. Pories SE, Summerhayes IC, Steele GD. Oncogene-mediated transformation. An in vitro model for colon carcinogenesis. *Arch Surg*, 1991; 126(11):1387-1389.



202. Ehm I, Denner J, Jandrig B, Nissen E. In vitro transformation of rat cells by 3-methylcholanthrene: activation of the ras oncogene. *Experimental pathology*, 1988; 34(3):133-139.
203. Gyorffy B, Surowiak P, Kiesslich O, Denkert C, Schafer R, Dietel M, Lage H. Gene expression profiling of 30 cancer cell lines predicts resistance towards 11 anticancer drugs at clinically achieved concentrations. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 2006; 118(7):1699-1712.
204. Bradshaw TD, Stone EL, Trapani V, Leong CO, Matthews CS, te Poele R, Stevens MF. Mechanisms of acquired resistance to 2-(4-Amino-3-methylphenyl)benzothiazole in breast cancer cell lines. *Breast cancer research and treatment*, 2008; 110(1):57-68.
205. Kim JE, Koo KH, Kim YH, Sohn J, Park YG. Identification of potential lung cancer biomarkers using an in vitro carcinogenesis model. *Experimental & molecular medicine*, 2008; 40(6):709-720.
206. Miyamoto H, Murakami T, Tsuchida K, Sugino H, Miyake H, Tashiro S. Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas*, 2004; 28(1):38-44.
207. Berube M, Talbot M, Collin C, Paquet-Bouchard C, Germain L, Guerin SL, Petitclerc E. Role of the extracellular matrix proteins in the resistance of SP6.5 uveal melanoma cells toward cisplatin. *International journal of oncology*, 2005; 26(2):405-413.
208. Vincent T, Mehti N. Extracellular matrix in bone marrow can mediate drug resistance in myeloma. *Leukemia & lymphoma*, 2005; 46(6):803-811.
209. Harisi R, Dudas J, Nagy-Olah J, Timar F, Szendroi M, Jeney A. Extracellular matrix induces doxorubicin-resistance in human osteosarcoma cells by suppression of p53 function. *Cancer biology & therapy*, 2007; 6(8):1240-1246.

210. Hodkinson PS, Mackinnon AC, Sethi T. Extracellular matrix regulation of drug resistance in small-cell lung cancer. *International journal of radiation biology*, 2007; 83(11-12):733-741.
211. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C, Chilvers ER, Dransfield I, Donnelly SC, Strieter R, Haslett C. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nature medicine*, 1999; 5(6):662-668.
212. Rintoul RC, Sethi T. Extracellular matrix regulation of drug resistance in small-cell lung cancer. *Clin Sci (Lond)*, 2002; 102(4):417-424.
213. Elliott T, Sethi T. Integrins and extracellular matrix: a novel mechanism of multidrug resistance. *Expert review of anticancer therapy*, 2002; 2(4):449-459.
214. Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, Shock T, Morin PJ. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer cell*, 2003; 3(4):377-386.
215. Udagawa T, Wood M. Tumor-stromal cell interactions and opportunities for therapeutic intervention. *Current opinion in pharmacology*, 2010; 10(4):369-374.
216. Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, Kong B, Esposito I, Friess H, Kleeff J. The Impact of the Activated Stroma on Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Biology and Therapy Resistance. *Current molecular medicine*, 2012.
217. Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2003; 9(11):4227-4239.
218. Balabanov S, Gontarewicz A, Keller G, Raddrizzani L, Braig M, Bosotti R, Moll J, Jost E, Barrett C, Rohe I, Bokemeyer C, Holyoake TL, Brummendorf TH. Abcg2 overexpression represents a novel mechanism for acquired resistance to the multi-kinase inhibitor Danusertib in BCR-ABL-positive cells in vitro. *PloS one*, 2011; 6(4):e19164.

219. Lechler P, Renkawitz T, Campean V, Balakrishnan S, Tingart M, Grifka J, Schaumburger J. The antiapoptotic gene survivin is highly expressed in human chondrosarcoma and promotes drug resistance in chondrosarcoma cells in vitro. *BMC cancer*, 2011; 11:120.
220. Holleman A, Chung I, Olsen RR, Kwak B, Mizokami A, Saijo N, Parissenti A, Duan Z, Voest EE, Zetter BR. miR-135a contributes to paclitaxel resistance in tumor cells both in vitro and in vivo. *Oncogene*, 2011; 30(43):4386-4398.
221. Zhu H, Cheng H, Ren Y, Liu ZG, Zhang YF, De Luo B. Synergistic inhibitory effects by the combination of gefitinib and genistein on NSCLC with acquired drug-resistance in vitro and in vivo. *Molecular biology reports*, 2011.
222. Meyer zu Schwabedissen HE, Kroemer HK. In vitro and in vivo evidence for the importance of breast cancer resistance protein transporters (BCRP/MXR/ABCP/ABCG2). *Handbook of experimental pharmacology*, 2011;(201):325-371.
223. Hu S, Yu L, Li Z, Shen Y, Wang J, Cai J, Xiao L, Wang Z. Overexpression of EZH2 contributes to acquired cisplatin resistance in ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer biology & therapy*, 2010; 10(8):788-795.
224. Bruneau M, Rynkowski M, Smida-Rynkowska K, Brotchi J, De Witte O, Lubicz B. Long-term follow-up survey reveals a high yield, up to 30% of patients presenting newly detected aneurysms more than 10 years after ruptured intracranial aneurysms clipping. *Neurosurgical review*, 2011; 34(4):485-496.
225. Guo T, Hajdu M, Agaram NP, Shinoda H, Veach D, Clarkson BD, Maki RG, Singer S, Dematteo RP, Besmer P, Antonescu CR. Mechanisms of sunitinib resistance in gastrointestinal stromal tumors harboring KITAY502-3ins mutation: an in vitro mutagenesis screen for drug resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2009; 15(22):6862-6870.
226. Stengel C, Newman SP, Leese MP, Potter BV, Reed MJ, Purohit A. Class III beta-tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents. *Br J Cancer*, 2010; 102(2):316-324.

227. Mitchell MA, Johnson JE, Pascarelli K, Beeharry N, Chiourea M, Gagos S, Lev D, von Mehren M, Kipling D, Broccoli D. Doxorubicin resistance in a novel in vitro model of human pleomorphic liposarcoma associated with alternative lengthening of telomeres. *Molecular cancer therapeutics*, 2010; 9(3):682-692.
228. Fan P, Yue W, Wang JP, Aiyar S, Li Y, Kim TH, Santen RJ. Mechanisms of resistance to structurally diverse antiestrogens differ under premenopausal and postmenopausal conditions: evidence from in vitro breast cancer cell models. *Endocrinology*, 2009; 150(5):2036-2045.
229. Qi J, McTigue MA, Rogers A, Lifshits E, Christensen JG, Janne PA, Engelman JA. Multiple mutations and bypass mechanisms can contribute to development of acquired resistance to MET inhibitors. *Cancer research*, 2011; 71(3):1081-1091.
230. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Janne PA. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*, 2007; 316(5827):1039-1043.
231. Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, Chitale D, Motoi N, Szoke J, Broderick S, Balak M, Chang WC, Yu CJ, Gazdar A, Pass H, Rusch V, Gerald W, Huang SF, Yang PC, Miller V, Ladanyi M, Yang CH, Pao W. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007; 104(52):20932-20937.
232. Fidler IJ, Hart IR. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science*, 1982; 217(4564):998-1003.
233. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, 2008; 112(13):4793-4807.
234. Nicolson GL. Generation of phenotypic diversity and progression in metastatic tumor cells. *Cancer metastasis reviews*, 1984; 3(1):25-42.

235. Heppner GH. Tumor heterogeneity. *Cancer research*, 1984; 44(6):2259-2265.
236. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochimica et biophysica acta*, 2010; 1805(1):105-117.
237. Burger H, Foekens JA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Wiemer EA, Stoter G, Nooter K. 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; 9(2):827-836.
238. Hipfner DR, Deeley RG, Cole SP. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta*, 1999; 1461(2):359-376.
239. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; 95(26):15665-15670.
240. Dalton WS, Scheper RJ. Lung resistance-related protein: determining its role in multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst*, 1999; 91(19):1604-1605.
241. Jiang CC, Mao ZG, Avery-Kiejda KA, Wade M, Hersey P, Zhang XD. Glucose-regulated protein 78 antagonizes cisplatin and adriamycin in human melanoma cells. *Carcinogenesis*, 2009; 30(2):197-204.
242. Han EK, Gehrke L, Tahir SK, Credo RB, Cherian SP, Sham H, Rosenberg SH, Ng S. Modulation of drug resistance by alpha-tubulin in paclitaxel-resistant human lung cancer cell lines. *Eur J Cancer*, 2000; 36(12):1565-1571.
243. Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA, Regl DL, Norris MD, Haber M, Horwitz SB. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isoforms. *J Clin Invest*, 1997; 100(5):1282-1293.
244. Kavallaris M, Burkhart CA, Horwitz SB. Antisense oligonucleotides to class III beta-tubulin sensitize drug-resistant cells to Taxol. *Br J Cancer*, 1999; 80(7):1020-1025.

245. Zhang CC, Yang JM, White E, Murphy M, Levine A, Hait WN. The role of MAP4 expression in the sensitivity to paclitaxel and resistance to vinca alkaloids in p53 mutant cells. *Oncogene*, 1998; 16(12):1617-1624.
246. Poruchynsky MS, Giannakakou P, Ward Y, Bulinski JC, Telford WG, Robey RW, Fojo T. Accompanying protein alterations in malignant cells with a microtubule-polymerizing drug-resistance phenotype and a primary resistance mechanism. *Biochem Pharmacol*, 2001; 62(11):1469-1480.
247. Saad ED, Katz A, Buyse M. Overall survival and post-progression survival in advanced breast cancer: a review of recent randomized clinical trials. *J Clin Oncol*, 2010; 28(11):1958-1962.
248. Györffy B, Serra V, Jurchott K, Abdul-Ghani R, Garber M, Stein U, Petersen I, Lage H, Dietel M, Schafer R. Prediction of doxorubicin sensitivity in breast tumors based on gene expression profiles of drug-resistant cell lines correlates with patient survival. *Oncogene*, 2005; 24(51):7542-7551.
249. Fromes Y, Gounon P, Tapiero H, Fellous A. Effects of fluoro-doxorubicin (ME2303) on microtubules: influence of different classes of microtubule-associated proteins. *Journal of protein chemistry*, 1996; 15(6):561-573.
250. Gerlinger M, Swanton C. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br J Cancer*, 2010; 103(8):1139-1143.

## **9 Publikációk jegyzéke**

### **9.1 Disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke**

1. Tegze B, Szállási Z, Haltrich I., Péntzváltó Z, Tóth Z, Likó I, Györffy B. Parallel evolution under chemotherapy pressure in 29 breast cancer cell lines results in dissimilar mechanisms of resistance. *PLoS ONE*, 2012; 7(2):e30804.

2. Munkácsy G, Abdul-Ghani R, Mihály Z, Tegze B, Tchernitsa O, Surowiak P, Schäfer R, Györffy B. PSMB7 is associated with anthracycline resistance and is a prognostic biomarker in breast cancer. *Br J Cancer*, 2010; 102(2):361-8.

## **9.2 Disszertációtól független publikációk jegyzéke**

1. Fekete T, Rásó E, Pete I, Tegze B, Liko I, Munkácsy Gy, Sipos N, Rigó J. jr., Györffy B. Meta-analysis of gene expression profiles associated with histological classification and survival in 829 ovarian cancer samples. *Int J Cancer*, 2011: közlésre elfogadva.
  
2. Tegze B, Tulassay Z, Györffy B. Chemotherapy agents, response rates and mechanisms of resistance in the therapy of the colorectal carcinoma. *Magy Onkol*: 2006;50(4):315-23.

## 10 Köszönetnyilvánítás

Elsőként témavezetőmnek, Dr. Györffy Baláznak szeretnék köszönetet mondani, aki lehetőséget biztosított munkám elvégzéséhez, a munkámat javaslataival és tanácsaival segítette.

Szeretnék köszönetet mondani az I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika igazgatójának, Dr. Prof. Tulassay Tivadarnak, hogy kutatásaimat az I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinikán végezhettem.

Köszönettel tartozom a munkacsoport tagjainak, Munkácsy Gyöngyinek és Pénzváltó Zsófia PhD hallgató társaimnak, illetve a laboratóriumban dolgozó munkatársaimnak, akik munkámat segítették.

Szeretném megköszönni Dr. Haltrich Irénnek és Tóth Zsuzsának a citogenetikai vizsgálatokhoz nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom Dr. Cselenyák Attilának és Dr. Lacza Zsombornak az áramlási citometriai vizsgálatokhoz nyújtott segítségükért.

Szeretném megköszönni Dr. Likó Istvánnak, hogy lehetőséget biztosított a munkámhoz szükséges TaqMan mérések lebonyolításához.

Szeretném hálás köszönetemet kifejezni családomnak, akik támogattak munkám során.