

Új prognosztikai markerek tüdő adenokarcinómában

Doktori tézisek

Horváth-Rózsás Anita

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulensek:

Dr. Döme Balázs MD, Ph.D, osztályvezető főorvos
Dr. Tóvári József Ph.D, osztályvezető

Hivatalos bírálók:

Dr. Szász A. Marcell MD, Ph.D, egyetemi tanársegéd
Dr. Bittner Nóra MD, Ph.D, osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Szende Béla DSc, professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Süttő Zoltán MD, Ph.D, egyetemi adjunktus
Dr. Czebe Krisztina MD, Ph.D, osztályvezető főorvos

Budapest
2016

1 BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedések közül a legmagasabb halálozási rátával rendelkező tüdődaganatok komoly egészségügyi problémát jelentenek világszerte. A tüdő adenokarcinóma (ADC) molekuláris patológiájában ma már néhány úgynevezett „driver” onkogén mutáció is rendelkezésünkre áll, melyek meghatározása mind prognosztikai mind prediktív jelentőséggel bírnak. A három legismertebb ilyen komponens az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és Kirsten patkány szarkóma virális onkogén homológ gén (KRAS) mutációi, valamint az anaplasztikus limfóma kináz (ALK) génátrendeződése. Mivel számottevő különbségek vannak az azonos stádiumú ADC betegek prognózisában, nagy szükség van további, klinikailag megbízható, nem invazív biomarkerekre, melyek segítséget nyújtanak a megfelelő kezelés kiválasztásában és a betegség prognózisának előrejelzésében.

Kutatásunk célja volt feltárni az erythropoietin receptor (EPOR) expressziójának valamint a keringő activin A (ActA) és follisztatin (FST) szintjének jelentőségét tüdő adenokarcinómában.

Az erythropoietin (EPO) egy glikoprotein-hormon, alapvetően a vese peritubuláris sejtjeiben, kisebb mennyiségben azonban a májban is termelődik. A csontvelőben történő vörösvérsejtképzés legfontosabb stimuláló faktora, serkenti a sejtosztódást és differenciálódást, valamint anti-apoptotikus hatása is van. A humán rekombináns formáit régóta használják a klinikumban tumor indukálta anémia valamint vesebetegségek esetében.

Az erythropoietin receptora egy 59 kDa molekulásúlyú glikoprotein transzmembrán receptor, a citokin receptor szupercsalád tagja. Az EPOR expressziója nem-hematopoetikus szövetekben is megfigyelhető, ami az EPO

pleiotrop hatására enged következtetni. Megannyi különböző tumor sejtvonalban (többek között NSCLC-ben), illetve a daganat-strómát alkotó érhálózat komponensein is kimutatták már az EPOR expressziója. Ebből következik, hogy jogosan kérdőjeleződik meg a rekombináns humán EPO (rHuEPO) egyértelműen jótékony hatása, ugyanis az EPOR szignalizáción keresztül, iatrogén hatásaként, felgyorsíthatja a tumorsejtek proliferációját illetve az angiogenezist.

A másik, vizsgálatainkba bevont molekula az ActA. A transforming growth factor (TGF)- β szupercsalád tagja. Különböző sejtfunkciókat szabályozó, multifunkcionális citokinek tartoznak ide, amit az összetett intracelluláris jelátviteli rendszerük tesz lehetővé. Először a hypophysis folliculus stimuláló hormon (FSH) szekrécióját szabályozó citokinként írták le. Az activin A két inhibin β A (IHNB) alegységből épül fel, melyek kovalens kötéssel alkotnak homodimer formát. Receptorai egyszeres transzmembrán doménnel rendelkező szerin/treonin kinázok. Az ActA intracelluláris jelátvitelében a SMAD útvonal mellett számos alternatív mechanizmus aktivációját megfigyelték több sejttypusban. Mindemellett számos szabályozó mechanizmusát leírták már az ActA szignalizációnak. Ezek közül tanulmányunk során a legjobban ismert, a keringésben is megtalálható ActA specifikus kötőfehérjére, a follisztatinra koncentráltunk. Az ActA molekula multifunkcionális biológiai jelentőségét már leírták számos sejttypusban és szövetben egyaránt. Sejt szinten a differenciálódásban, a sejtszám szabályozásában és a szöveti szerkezet kialakításában van fontos szerepe. Az ActA, mint szekretált fehérje, hatását kifejtheti mind a tumorsejtekre, mind a sztrómára. Irodalmi adatok alapján a tumoros környezetben szintén hozzájárulhat az alábbi folyamatokhoz: gyulladás, fibrózis, angiogenezis, makrofágok aktiválása, nitric oxid felszabadítása, extracelluláris matrix fehérjék szabályozása és az emelkedett

MMP-k expressziója. Az ActA-t, mint a tumorsejtek osztódását gátló molekulát írták le emlő-, máj- és vastagbél- daganatban, valamint a tumorszövetben csökkent ActA expressziót, az ActA antagonisták emelkedett szintjét vagy éppen az activin receptorok vagy a SMAD fehérjék csökkent működését figyelték meg. Ezzel ellentétben a fej-nyaki laphám karcinómában (HNSCC), a nyelőcső adenokarcinómában és a malignus pleurális mezoteliómában az emelkedett ActA expresszió agresszívabb tumorsejteket eredményezett. Ezidáig két tanulmányban számoltak be az ActA jelentőségéről tüdő ADC-ben, bár az eredmények ellentmondásosak.

2 CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során az EPO/EPOR és az ActA/FST rendszer jelentőségének feltárását tűztük ki célul, illetve mint prognosztikai és diagnosztikai markereket vizsgáltuk tüdő adenokarcinómában.

1. Erythropoietin-receptor expressziójának meghatározása, illetve a rHuEPO α és gemcitabine kezelések *in vitro* hatása humán tüdő adenokarcinóma sejtek proliferációjára.
2. rHuEPO α és gemcitabine kezelések hatásának vizsgálata xenograft tumorokban.
3. Humán bronchoszkópos minták EPOR mRNS szintjének meghatározása és összefüggések keresése a betegek klinikopatológiai adataival. EPOR expressziós szint vizsgálata, mint prognosztikai marker.
4. ActA és FST szekréciónak és az activin receptorok expressziójának meghatározása, valamint a rekombináns

humán (rh) ActA és rhFST kezelések *in vitro* hatása humán tüdő adenokarcinóma sejtek proliferációjára és migrációjára.

5. Cirkuláló ActA és FST szintjének meghatározása és összefüggések keresése a betegek klinikopatológiai adataival. Keringő ActA, FST szint, mint diagnosztikai és prognosztikai marker vizsgálata.

6. ActA szint és KRAS mutációs státusz összefüggéseinek vizsgálata tüdő adenokarcinómában.

3 MÓDSZEREK

Beteganyag

Klinikai vizsgálatunk során 43 előrehaladott stádiumú (III-IV stádium) ADC beteg bronchoszkópos kefe mintájában határoztuk meg az EPOR expresszióját. A keringő activin A és follisztatin szint meghatározásához pedig 64 ADC beteg vér mintáját használtuk fel. Kontroll (n=46) kohortnak egészséges egyéneket, illetve olyan betegeket vontunk be a vizsgálatba, akiknek a betegségeik megegyeztek az ADC betegek társbetegségeikkel. Az ActA - KRAS státusz összefüggésének vizsgálatához olyan ADC betegek vérplazma mintájában határoztuk meg az ActA szintet (n=34), akiknek ismert volt a KRAS státusza.

Sejtvonalak

Az *in vitro* és *in vivo* kísérleteinkhez humán tüdő adenokarcinóma vonalakat A549, H1975, H358, H1650 és HCC827, kontroll sejtvonalnak K562, humán erythroleukémia sejtvonalat és HUVEC, humán köldökzsínór véna endotél sejtvonalat, activin A bioaktivitásának teszteléséhez pedig a HepG2, hepatocelluláris karcinóma sejtvonalat használtuk.

Hatóanyagok

In vitro és *in vivo* kezelések során az alábbi hatóanyagokkal dolgoztunk: rekombináns humán erythropoietin-alfa, gemcitabine, rekombináns humán activin A és rekombináns humán follisztatin.

***In vitro* tesztek**

A tüdő adenokarcinóma sejtvonalak EPOR és activin receptorok expresszióját valós idejű PCR-el határoztuk meg. Az activin A és follisztatin szekréciónak sejtvonalak felülűszójában ELISA kit segítségével mértük meg a gyártó által megadott protokollnak megfelelően. Az activin A és follisztatin ELISA kit tesztelése során arra kerestük a választ, hogy csak a szabad ActA és FST molekulákat mérjük, vagy a FST által kötött ActA komplexet is. Frissen vett humán plazma mintát kezeltünk különböző koncentrációjú rhFST-vel (2ng/ml, 50ng/ml, 100 ng/ml, illetve egy kezelés nélküli kontroll minta) majd 2 órát inkubáltuk 37°C-on. A follisztatin ELISA tesztelése során, rhActA kezelést alkalmazva, hasonlóképpen jártunk el.

Proliferációs vizsgálataink során rHuEPO α és gemcitabine kezelés *in vitro* hatását vizsgáltuk humán ADC sejtvonalakra 48 óra inkubáció után szulforodamin B (SRB) kolorimetriás teszt segítségével. A rhActA és rhFST kezelés *in vitro* hatását a sejtproliferációra 72 óra inkubáció után az EZ4U kit segítségével határoztuk meg a gyártó által megadott protokollnak megfelelően.

Migrációs teszttel (Scratch assay) vizsgáltuk a rhActA és rhFST hatását a sejtek motilitási képességére.

A human tüdő ADC sejtvonalak által termelt activin A molekula biológiai aktivitásának méréséhez a sejtvonalak felülűszójával kezeltük a HepG2 sejteket, majd lízis pufferrel begyűjtöttük őket. Western blot analízissel szemléltettük a p-

SMAD2; total SMAD2 illetve beta-actin expressziók változását.

***In vivo* vizsgálat**

H1975 tumorsejtet oltottunk szubkután nőstény SCID egerekbe és rHuEPO α , gemcitabin valamint rHuEPO α és gemcitabine kombinációs kezelésben részesítettük őket. Kontroll csoportunkat fiziológiás sóoldattal kezeltük. A tumorok méretét kaliperrel mértük. Endotél- ill. tumorsejtek osztódásának mértékét 5-bróm-2'-deoxiuridinnel (BrdU) határoztuk meg. Az ereket anti-egér CD31 ellenanyaggal tettük láthatóvá, a sejtmagokat TOTO-3-al reagáltattuk. Független intratumorális területeken számoltuk mind a jelölt (osztódó) és mind a nem-jelölt (nem osztódó) H1975 tumor és egér endotél sejtmagok százalékát.

Statisztikai módszerek

A statisztikai analízisek elvégzéséhez a PASW Statistics 18.0 csomagot, GraphPad Prism 5.0 és a Statistica 9.0 programokat használtuk.

4 EREDMÉNYEK

Erythropoietin-receptor expressziója, rHuEPO α és gemcitabine kezelések *in vitro* hatása humán tüdő adenokarcinóma sejtek proliferációjára

Kvantitatív valós idejű PCR-rel határoztuk meg a három humán tüdő ADC sejtvonal EPOR mRNS szintjét. A H1650 és a H358 sejtvonalak igen alacsony szinten, míg a H1975 magasabb szinten expresszálta az EPOR-t. Az exogén rHuEPO α nem befolyásolta a három ADC sejtvonal *in vitro* osztódási képességét a kezeletlen sejtekhez képest, a gemcitabine kezelés, a vártaknak megfelelően, szignifikánsan lecsökkentette mind a három sejtvonal proliferációját, míg

rHuEPO α -val kombinálva nem fokozta annak anti-proliferatív hatását.

rHuEPO α és gemcitabine kezelések *in vivo* hatása

In vivo tanulmányoztuk a rHuEPO α és gemcitabine hatását az EPOR-t legmagasabb szinten expresszáló H1975 sejtvonal növekedésére. A tumornövekedés szignifikánsan lecsökkent a gemcitabinnal kezelt csoportban. Kevésbé markáns, de szintén szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a tumorméret tekintetében a rHuEPO α -val kezelt csoportban, míg a két szer kombinációjával kezelt csoportban nem tudtuk kimutatni azok szinergisztikus hatását. Az rHuEPO α kezelt xenograftokban BrdU jelöléssel detektáltuk az osztódó H1975 tumorsejteket, illetve az osztódó egér érendotél sejteket. Az rHuEPO α kezelés nem csak fokozta az érendotélsejtek *in vivo* proliferációját, de meglepő módon szignifikánsan lecsökkentette az EPOR-t magas szinten expresszáló H1975 ADC sejtvonal *in vivo* növekedési mutatóját.

Humán bronchoszkópos minták EPOR mRNS szintje és a betegek klinikopatológiai adatai közötti összefüggések

A tumorszövet EPOR expressziójának klinikai relevanciájának megállapításához, bronchoszkópos kefe minták EPOR expressziójával és a betegek klinikopatológiai adataival végeztünk összehasonlító statisztikai analízist. Nem találtunk összefüggést az életkor, dohányzás, nem, stádium és a kezelések tekintetében.

EPOR expressziós szint, mint prognosztikai marker

Kaplan-Meier analízissel elemeztük az előrehaladott stádiumú ADC betegek túlélési adatait magas és alacsony EPOR szint függvényében. A rendelkezésünkre álló 43 beteg adataiból azt kaptuk, hogy a betegek magas EPOR szintje szignifikánsan hosszabb túléléssel párosult az alacsony EPOR szinttel

rendelkező betegekhez képest. Multivariáns analízis során a kezelés előtti EPOR szint a többi változótól független prognosztikai faktornak bizonyult.

ActA/FST szekréciója, receptorok expressziója

Öt különböző humán tüdő adenokarcinóma sejtvonal ActA és FST termelését ELISA-val határoztuk meg. Ötből három sejtvonal felülűszójában tudtuk kimutatni az ActA jelenlétét (H1650, HCC827 és H358). Ezek közül két sejtvonal esetében viszonylag alacsony, míg a H358 esetében magas koncentrációban volt jelen a fehérje. A FST esetében, mind az öt sejtvonal termelte a fehérjét. Kvantitatív valós idejű PCR-el mérve mindegyik sejtvonal expresszálta mind a II. típusú, mind az I. típusú activin receptorokat.

Adenokarcinóma sejtvonalak által termelt activin A molekula biokativitásának mérése

Korábbi irodalmi adatokból tudjuk, hogy a HepG2 hepatocelluláris karcinóma sejtek érzékenyen reagálnak az ActA molekulára. Mivel az exogén ActA kezelés ezekben a sejtekben a SMAD2 foszforilációját eredményezi, a rendszer kiváló a különböző eredetű ActA bioaktivitásának tesztelésére. A mérés során az öt különböző humán tüdő ADC sejtvonal felülűszójával kezeltük a HepG2 sejteket. Az öt sejtvonal közül, az ActA-t legmagasabb szinten szekretáló H358 sejtvonal felülűszója indukálta a SMAD2 foszforilációját, valamint a két, ActA-t igen alacsony szinten szekretáló sejtvonalak közül a H1650 esetében látható kisebb fokú SMAD2 foszforiláció, míg a HCC827 esetében nem figyelhető meg eltérés.

rhActA és rhFST kezelések *in vitro* hatása humán tüdő adenokarcinóma sejtek proliferációjára és migrációs képességére

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a rhActA és rhFST kezelés milyen hatást gyakorol az activin receptorokkal rendelkező sejtvonalak proliferációjára. Azt tapasztaltuk, hogy a rhActA és a rhFST 72 órás kezelés során egyik koncentrációban sem befolyásolta az ADC sejtvonalak *in vitro* proliferációs képességét. Mivel a klinikai adatainkban a keringő ActA koncentrációja összefüggést mutatott a távoli szervi illetve a nyirokcsomó metasztázisokkal (ld. lentebb), megvizsgáltuk, hogy a rhActA és a rhFST *in vitro* befolyásolja-e az ADC sejtvonalak motilitási képességét. A kezelések egyik sejtvonal esetében sem befolyásolták szignifikánsan a sejtek *in vitro* migrációs képességét.

Activin A és follisztatin ELISA tesztelése

Mivel a FST az ActA fehérje természetes antagonistája, fontosnak tartottuk tisztázni, hogy a méréseinkhez használt ActA és FST ELISA kitek csak a szabad ActA-t és FST-t mérik vagy esetleg a kötött formában lévő ActA/FST komplexet is. Ennek megítéléséhez a mérés előtt rhActA-val és rhFST-nal kezeltük a humán plazma mintánkat. Az ActA ELISA esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a kezeletlen és a különböző koncentrációjú rhFST-nal kezelt plazma ActA szintje között. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az ActA ELISA méri mind a szabad (aktív), mind a FST által kötött (inaktív) ActA molekulát. A fentiekkel ellentétben, a plazmában az 50 és 100 ng/ml rhActA kezelést követően lecsökkent az ELISA-val detektálható FST szintje a kezeletlenhez viszonyítva, ami arra utal, hogy a FST ELISA kit csak a szabad formában lévő FST-t detektálja, míg az ActA által kötöttet nem.

Cirkuláló activin A szintje és összefüggések a betegek klinikopatológiai adataival

64 ADC beteg és 46 életkor- és nem-azonos kontroll kohort szérumban határoztuk meg az ActA szintet. A betegek szérumban az átlag ActA szint szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. Szintén megállapítottuk a keringő ActA koncentráció és a stádium, a T és az N státusz összefüggését.

ActA szint, mint diagnosztikai és prognosztikai marker

Metasztázis tekintetében a szérumban ActA koncentráció szignifikánsan magasabb volt a metastázissal rendelkező betegek vérében, mint az M0 státuszú betegekéiben. Annak megítélésére, hogy a szérumban ActA szint alkalmas-e a metastázissal rendelkező ADC csoport és a M0 státuszú betegcsoport elkülönítésére ROC curve analízist használtunk: szenzitivitás 82.6% (95% CI: 61.2-95.1%), specificitás 63.4 %, (95 % CI: 46.9-77.9 %), AUC=0.806 (95% CI: 0.693- 0.919). Mivel a nyirokcsomó metastázisok és a távoli szervi metastázisok esetében is szignifikánsan emelkedett ActA szintet detektáltunk az ADC betegek vérében, következő lépésként Kaplan-Meier analízissel vizsgáltuk a betegek teljes túlélését magas és alacsony szérumban ActA szint függvényében. A vizsgálatba bevont beteg kohortunk osztályozását az ActA koncentráció medián értékével hajtottuk végre. Azt találtuk, hogy a magas szérumban ActA szinttel rendelkező betegek túlélése szignifikánsan rövidebb volt, mint azon betegeké, akiknek alacsony volt a szérumban ActA szintjük. Multivariáns analízissel kimutattuk, hogy a szérumban ActA koncentráció a teljes ADC kohortunkban egy, a többi paramétertől (betegek életkora, neme és tumor stage) független prognosztikai marker.

Activin A szint és KRAS mutációs státusz összefüggése tüdő adenokarcinómában

34 ADC beteg és 66 kontroll kohort plazma szérumban határoztuk meg az ActA szintet, majd megvizsgáltuk az ActA

koncentráció és KRAS státusz tekintetében a metasztázist és a túlélést. A betegek mintájában szignifikánsan magasabb ActA értéket detektáltunk a kontrollhoz képest. Az ADC kohortunkat KRAS vad (wt) és KRAS mutáns státusz szerint szétválasztva, nem találtunk szignifikáns különbséget az ActA szint tekintetében. Továbbá a KRAS státusz nem befolyásolta a betegek M státuszának eloszlását és a betegek teljes túlélése között sem volt szignifikáns eltérés a KRAS vad és KRAS mutáns ADC betegek között. A KRAS vad ADC betegek adataiban látható, hogy a magas ActA szinthez valamivel több M1 státuszú beteg tartozik, mint az alacsony ActA szinttel rendelkező betegek körében, de a teljes ADC kohort esetében tapasztalt szignifikáns különbséget ez meg sem közelíti. Hasonlót láthatunk a KRAS vad ADC betegek teljes túlélését vizsgáló Kaplan-Meier analízis során kapott görbén, vagyis nincs eltérés a magas és alacsony ActA szinttel rendelkező betegek teljes túlélésében. A KRAS mutáns ADC betegek adataiban a teljes kohortban is tapasztalt tendenciák láthatóak. A magas ActA szinttel rendelkező betegek körében jóval magasabb a metasztázis megjelenése és a teljes túlélés szignifikánsan rövidebb, mint az alacsony ActA plazma koncentrációval rendelkező betegek esetében.

FST szint jelentősége humán tüdő adenokarcinómában

Mivel a cirkuláló ActA molekula aktivitását részben a FST molekulához való kötődése szabályozza, az ActA mérésekhez használt szérumban határoztuk meg a FST koncentrációt és kerestük az összefüggéseket a betegek klinikopatológiai adataival.

Nem találtunk különbséget a beteg és a kontroll kohort szérumban FST szintje között. Nemek függvényében azt találtuk, hogy mind a férfi kontroll, nő kontroll és férfi ADC beteg kohort vérében hasonló koncentrációban van jelen a FST, a nő ADC betegek szérumban viszont szignifikánsan magasabb FST

szintet detektáltunk. A szérumban ActA eredményeinkre alapozva, valamint az ADC beteg kohortban mért magasabb szórás értékek miatt megvizsgáltuk, hogy a szérumban FST szint is összefüggésben van-e a stádiummal, TNM státusszal, és teljes túléléssel. Az ActA-tól eltérően, sem a stádium, sem a TNM státusz esetében nem találtunk összefüggést a FST szérumban szintjével. ROC curve analízissel pedig sem a teljes kohortban, sem a női kohortban nem volt kimutatható, hogy a FST ADC specifikus diagnosztikai markerként lenne értékelhető, illetve nem találtunk összefüggést a betegek teljes túlélése és a FST koncentrációja között sem.

5 KÖVETKEZTETÉSEK

1. Valós idejű PCR-rel mutattuk ki az EPOR mRNS expressziót a humán tüdő ADC sejtvonalakban. A legmagasabb szinten a H1975 ADC sejtvonal expresszálta az EPOR-t. Az rHuEPO α kezelés viszont sem önmagában, sem a gemcitabinnal kombinálva nem befolyásolta az ADC sejtek *in vitro* osztódását.

2. Exogén rHuEPO α hatására lecsökkent a H1975 sejtek *in vivo* növekedése SCID egerekben, valamint felgyorsította az érendotél sejtek *in vivo* proliferációját valamint lecsökkentette az EPOR-t magas szinten expresszáló H1975 ADC sejtvonal *in vivo* növekedési mutatóját.

3. Az alacsony EPOR expresszió rosszabb túléléssel párosult előrehaladott stádiumú humán tüdő adenokarcinómában, illetve a kezelés előtti EPOR szint a többi változótól független prognosztikai faktor.

4. Az ActA-t ötből három, a FST-t mind az öt vizsgált ADC sejtvonal szekretálta, illetve mind az öt sejtvonalban

detektálható volt a három activin receptor jelenléte. Ennek ellenére a rhActA és rhFST kezelések *in vitro* nem befolyásolták az ADC sejtvonalak proliferációs és migrációs képességét.

5. Szérum ActA koncentráció szoros összefüggést mutatott az ADC betegek TNM státuszával és túlélésükkel. A FST szint csak az ADC nő kohort esetében volt emelkedett. Az ActA szint egy jó prognosztikai marker és egy lehetséges biomarker a metasztatikus ADC betegek szűrésére.

6. KRAS mutáns ADC betegek körében a magas ActA szint esetében emelkedett a metasztázisok száma és a teljes túlélés szignifikánsan rövidebb volt az alacsony ActA szinttel rendelkező betegekhez képest, míg a KRAS vad ADC betegeknél a magas és alacsony ActA szintű betegek között nem volt különbség sem a metasztázisokban sem a túlélésben.

6 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Hoda MA*, **Rózsás A***, Lang E, Klikovits T, Lohinai Z, Torok S, Berta J, Bendek M, Berger W, Hegedus B, Klepetko W, Rényi-Vamos F, Grusch M, Dome B**, Laszlo V**. (2016) High circulating activin A level is associated with tumor progression and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 7(12):13388-99.

*megosztott első szerző, **megosztott utolsó szerző

Rózsás A, Berta J, Rojkó L, Horváth LZ, Keszthelyi M, Kenessey I, László V, Berger W, Grusch M, Hoda MA, Török S, Klepetko W, Rényi-Vámos F, Hegedús B, Döme B, Tóvári J. (2013) Erythropoietin receptor expression is a potential

prognostic factor in human lung adenocarcinoma. PLoS One, 8(10):e77459.

Rózsás A, Ostoros Gy, Hegedűs B, Döme B, Tóvári J. (2013) Az erythropoietin jelátvitel szerepe humán nem-kissejtes tüdőrákban. Medicina Thoracalis, 66(1):21-30.

A disszertációtól független közlemények:

Hoda MA, Pirker C, Dong Y, Schelch K, Heffeter P, Kryeziu K, van Schoonhoven S, Klikovits T, Laszlo V, **Rózsás A**, Ozsvár J, Klepetko W, Doeme B, Grusch M, Hegedues B, Berger W. (2016) Trabectedin is active against malignant pleural mesothelioma cell and xenograft models and synergizes with chemotherapy and bcl-2 inhibition in vitro. Mol Cancer Ther., pii: molcanther.0846.2015.

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

Hegedűs B, Moldvay J, Berta J, Lohinai Z, **Rózsás A**, Cserepes MT, Fábrián K, Ostoros G, Tóvári J, Rényi-Vámos F, Tímár J, Döme B. (2015) Excerpts from the collaborative lung cancer research program of Semmelweis University, the National Institute of Oncology and Korányi Institute of TB and Pulmonology (2010-2015)]. Magy Onkol, 59(4):282-5.

Kirschner MB, Pulford E, Hoda MA, **Rozsas A**, Griggs K, Cheng YY, Edelman JJ, Kao SC, Hyland R, Dong Y, László V, Klikovits T, Vallely MP, Grusch M, Hegedus B, Dome B, Klepetko W, van Zandwijk N, Klebe S, Reid G. (2015) Fibulin-3 levels in malignant pleural mesothelioma are associated with prognosis but not diagnosis. *Br J Cancer*, 113(6):963-9.

Laszlo V, Hoda MA, Garay T, Pirker C, Ghanim B, Klikovits T, Dong YW, **Rozsas A**, Kenessey I, Szirtes I, Grusch M, Jakopovic M, Samarzija M, Brcic L, Kern I, Rozman A, Popper H, Zöchbauer-Müller S, Heller G, Altenberger C, Ziegler B, Klepetko W, Berger W, Dome B, Hegedus B. (2015) Epigenetic down-regulation of integrin $\alpha 7$ increases migratory potential and confers poor prognosis in malignant pleural mesothelioma. *J Pathol*, 237(2):203-14.

Lohinai Z, Hoda MA, Fabian K, Ostoros G, Raso E, Barbai T, Timar J, Kovalszky I, Cserepes M, **Rozsas A**, Laszlo V, Grusch M, Berger W, Klepetko W, Moldvay J, Dome B, Hegedus B. (2015) Distinct Epidemiology and Clinical Consequence of Classic Versus Rare EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 10(5):738-46.

Garay T, Kenessey I, Molnár E, Juhász É, Réti A, László V, **Rózsás A**, Dobos J, Döme B, Berger W, Klepetko W, Tóvári J, Tímár J, Hegedüs B. (2015) Prenylation inhibition-induced cell death in melanoma: reduced sensitivity in BRAF mutant/PTEN wild-type melanoma cells. *PLoS One*, 10(2):e0117021.

Ghanim B, Klikovits T, Hoda MA, Lang G, Szirtes I, Setinek U, **Rozsas A**, Renyi-Vamos F, Laszlo V, Grusch M, Filipits M, Scheed A, Jakopovic M, Samarzija M, Brcic L, Stancic-Rokotov D, Kern I, Rozman A, Dekan G, Klepetko W, Berger

W, Glasz T, Dome B, Hegedus B. (2015) Ki67 index is an independent prognostic factor in epithelioid but not in non-epithelioid malignant pleural mesothelioma: a multicenter study. *Br J Cancer*, 112(5):783-92.

Torok S, Vegvari A, Rezeli M, Fehniger TE, Tovari J, Paku S, Laszlo V, Hegedus B, **Rozsas A**, Dome B, Marko-Varga G. (2015) Localization of sunitinib, its metabolites and its target receptors in tumour-bearing mice: a MALDI-MS imaging study. *Br J Pharmacol*, 172(4):1148-63.

Berta J, Hoda MA, Laszlo V, **Rozsas A**, Garay T, Torok S, Grusch M, Berger W, Paku S, Renyi-Vamos F, Masri B, Tovari J, Groger M, Klepetko W, Hegedus B, Dome B. (2014) Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncotarget*, 5(12):4426-37.

Cserepes M, Ostoros G, Lohinai Z, Raso E, Barbai T, Timar J, **Rozsas A**, Moldvay J, Kovalszky I, Fabian K, Gyulai M, Ghanim B, Laszlo V, Klikovits T, Hoda MA, Grusch M, Berger W, Klepetko W, Hegedus B, Dome B. (2014) Subtype-specific KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma: a retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy. *Eur J Cancer*, 50(10):1819-28.

Höftberger R, Titulaer MJ, Sabater L, Dome B, **Rózsás A**, Hegedus B, Hoda MA, Laszlo V, Ankersmit HJ, Harms L, Boyero S, de Felipe A, Saiz A, Dalmau J, Graus F. (2013) Encephalitis and GABAB receptor antibodies: novel findings in a new case series of 20 patients. *Neurology*, 81(17):1500-6.

Zimmermann M, Nickl S, Lambers C, Hacker S, Mitterbauer A, Hoetzenecker K, **Rozsas A**, Ostoros G, Laszlo V, Hofbauer H, Renyi-Vamos F, Klepetko W, Dome B, Ankersmit HJ.

(2012) Discrimination of clinical stages in non-small cell lung cancer patients by serum HSP27 and HSP70: a multi-institutional case-control study. Clin Chim Acta, 413(13-14):1115-20.

Berta J, Kenessey I, Dobos J, Tovari J, Klepetko W, Jan Ankersmit H, Hegedus B, Renyi-Vamos F, Varga J, Lorincz Z, Paku S, Ostoros G, **Rozsas A**, Timar J, Dome B. (2010) Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. J Thorac Oncol, 5(8):1120-9.

7 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Döme Balázs és Tóvári József témavezetőimnek sokéves segítségüket és támogatásukat.

Köszönöm az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet, a Bécsi Orvostudományi Egyetem Mellkassebészeti Klinika és Transzlációs Onkológiai Kutatólaboratórium, az Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály valamint a Semmelweis Egyetem Mellkassebészeti Klinika vezetőinek, hogy támogatták munkámat, lehetőséget biztosítva kutatásaim elvégzéséhez. Külön köszönettel tartozom az OKTPI Tumorbiológiai Osztály, valamint a Transzlációs Onkológiai Kutatólaboratórium minden egyes dolgozójának, hogy munkám során mindig segítségemre voltak. Köszönöm a Magyar Pulmonológiai Alapítvány, az Osztrák-Magyar Akció Alapítvány és az EACR támogatását.

Végezetül köszönöm férjemnek, családomnak és barátaimnak a kitartást, biztatást és a biztos hátteret.