

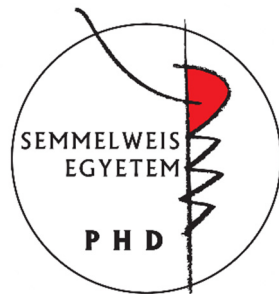
A kemoterápia-rezisztencia jelentősége és kezelési lehetősége rosszindulatú daganatokban

Doktori (Ph. D.) értekezés

Cserepes Tamás Mihály

Semmelweis Egyetem

Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Tóvári József, PhD, osztályvezető
Dr. Szakács Gergely, PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Szász Attila Marcell, PhD, tudományos főmunkatárs
Dr. Monostory Katalin, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hidvégi Edit, PhD, főorvos
Dr. Kardon Tamás, PhD, docens

Budapest
2020.

TARTALOMJEGYZÉK

1	Rövidítések.....	6
2	Bevezetés.....	8
2.1	A kemoterápiával szembeni rezisztencia az onkológiai betegségekben	8
2.1.1	Malignus megbetegedések általában.....	8
2.1.2	Daganatellenes terápiák formái.....	9
2.1.3	A terápia rezisztencia	13
2.2	A K-Ras onkogén szerepe a tumorbiológiában, mutációinak sejtes és klinikai jelentősége	17
2.2.1	A Ras onkogén fehérje szerepe a tumorsejtekben	17
2.2.2	A K-Ras fehérje változásai daganatokban, terápiás következményei ..	18
2.2.3	A K-Ras mutációt hordozó tumorokkal kapcsolatos terápiás eredmények áttekintése	19
2.2.4	Zoledronsav terápia a K-Ras poszttranszlációs aktivitásának gátlására	20
2.3	A tumorsejtek hipoxiás mikrokörnyezete, a tumorsejtek HIF-1 α fehérje által vezérelt változásai, és összefüggései terápia rezisztenciával	20
2.3.1	A sejtek anyagcseréje oxigénhiányos szövetekben.....	20
2.3.2	A tumor mikrokörnyezete, vérellátása, tumor hipoxia	21
2.3.3	A tumor hipoxia általános következményei.....	21
2.3.4	A HIF-1 α szerepe a hipoxiás stresszre adott sejtes válaszokban.....	22
2.3.5	HIF-1 α -t célzó terápiás lehetőségek	24
2.4	Az ABCB1 multidrog transzporter szerepe a kemoterápia rezisztenciában, terápiás lehetőségek multidrog-rezisztens tumorok kezelésére.....	27
2.4.1	Multidrog rezisztencia, és az ABCB1 multidrog transzporter.....	27
2.4.2	A multidrog-rezisztens tumorok kezelésének lehetőségei.....	30
2.4.3	A kollaterális szenzitivitás, MDR-szelektív hatás	31

2.4.4	ATP-áz aktivitás, mint lehetséges terápiás célpont	33
2.4.5	Vas homeosztázis tumorsejtekben, a vashiányos állapot, mint tumorterápiás célpont	34
3	Célkitűzések	36
4	Módszerek	37
4.1	Felhasznált kezelőszerek:	37
4.2	Sejtek	37
4.3	Hipoxia kezelés	39
4.4	Sejtproliferációs kísérletek	39
4.5	A sejtek ATP-mennyiségének meghatározása	40
4.6	Western blot kísérletek	40
4.7	RNS expresszió meghatározása	42
4.8	Áramlási citometriás mérések	43
4.9	ATPáz aktivitás mérések	44
4.10	dNTP szintek meghatározása	44
4.11	Videomikroszkópia	45
4.12	Teljes röntgen fluoreszcencia mérések	45
4.13	Tömegspektrometriás mérések	46
4.14	Sejtmigrációs kísérletek	46
4.15	<i>In vivo</i> tumornövekedés és metasztázis modellek	47
4.16	Immunhisztokémiai vizsgálatok:	48
4.17	Statisztikai analízis:	48
5	Eredmények	49
5.1	K-Ras mutációk hatása a zoledronsav terápia hatékonyságára	49
5.1.1	A zoledronsav más hatást fejt ki a vad típusú és a mutáns K-Ras működésére NSCLC sejtekben	49

5.1.2	A zoledronsavval szemben ellenállóbbak a K-Ras G12C mutációt hordozó NSCLC tumorsejtek in vitro.	50
5.1.3	A K-Ras genotípus hatással van az NSCLC sejtek in vivo xenograftban történő növekedésére és beereződésére.....	52
5.2	A hipoxiás környezet, illetve a HIF-1 α jelátvitel szerepe a tumorok növekedésében, tumorsejtek mozgékonyágában, viselkedésében.....	54
5.2.1	A hipoxiás környezet a sejtek in vitro proliferációját és migrációs képességét sejtfüggő módon befolyásolja.....	54
5.2.2	Hipoxia hatására egyedi változások történnek a sejtvonalak HIF-1 α , és a citoskeletonális szabályozó kis GTP-áz fehérjék (RhoA, Rac-1, Cdc-42) génexpressziójában.....	56
5.2.3	A kísérleti hipoxia különböző változásokat indukál in vivo xenograftok metasztázis képeességében.....	57
5.2.4	A Hif-1 α csendesítés hatása az in vitro migrációra, és az in vivo metasztázis képző képeességre	59
5.3	Az MDR-szelektív vegyület NSC297366 hatásmechanizmusa, az ABCB1-et expresszáló sejtek célzott elpusztítása az intracelluláris vaskészlet kiürítésével	61
5.3.1	A sejtek ATP-szintje nem változik Pgp-szubsztráttal, vagy MDR-szelektív vegyülettel történő kezeléskor.....	61
5.3.2	A 8-hidroxikinolin vegyületkönyvtár vizsgálata során talált nagy szelektivitású vegyületek toxicitása a P-glycoprotein működéstől függ.....	63
5.3.3	A sejten belüli vasszintek módosítása befolyásolja az MDR-szelektív NSC297366 molekula toxicitását.....	66
5.3.4	Korai sejes válaszok: Az NSC297366 P-glycoprotein függő módon befolyásolja a sejtekben a vashiányos állapotra reagáló TFR1 és HIF-1 α expressziót.....	68
5.3.5	Elegendő-e a kelációs képeesség egy vegyület MDR-szelektív toxicitásához?.....	70

5.3.6	A vashiányos állapot a Pgp-t kifejező sejtekben a ribonukleotid reductáz (RNR) gátláshoz, sejtciklus blokkoláshoz, apoptózis indukáláshoz vezet.....	73
5.3.7	A tumorsejtek P-gp aktivitása az NSC297366:vas komplexet kipumpálja a sejtekből, kritikus szintre csökkentve a sejt vaskészletét	76
5.3.8	Szükséges-e az NSC297366 MDR-szelektív hatásához a p53 és a Hif-1 α aktiválódása?	79
6	Megbeszélés	81
6.1	K-Ras mutációk és kemoterápia-rezisztencia	81
6.2	A tumor hipoxia és a Hif-1 α szerepe tumorsejtek motilitásában és metasztatizáló képességében	83
6.3	A multidrog-rezisztens tumorok célzott elpusztításának lehetősége vas elvonásával.	86
7	Következtetések.....	94
7.1	A K-Ras aktiváló mutációiak szerepe a zoledronsav terápiával szembeni ellenállásra NSCLC tumorokban.....	94
7.2	A tumor hipoxia, és a Hif-1 α szerepének változatos kimenetele a tumorsejtek viselkedésére, így a tervezett terápiai lehetőségekre.....	94
7.3	A multidrog rezisztenciát okozó Pgp működés egyben lehetséges célpont is a szelektív vasdepleció kihasználásával MDR tumorok kezelésében	95
8	Összefoglalás.....	96
9	Summary	97
10	Irodalomjegyzék.....	98
11	Saját publikációk jegyzéke.....	120
11.1	Az értekezés témájában megjelent saját közlemények	120
11.2	Egyéb közlemények	120
12	Köszönetnyilvánítás	122

1 RÖVIDÍTÉSEK

A gének, mRNS-ek és fehérjék nevének írásmódja a dolgozatban a HUGO Gene Nomenclature Committee humán gén nevezéktani szabályzatát követi. Kivétel: a P-gp írásmódja a könnyebb olvashatóság miatt Pgp formára módosult.

ABC transzporter: ATP binding cassette (ATP-kötő alegységgel rendelkező) transzporter

ABCB1: ABC transporter coding gene B1 (más néven MDR1)

AR: Androgén receptor

ATP: adenzin-trifoszfát

ATP-áz, GTP-áz: az ATP illetve GTP hidrolízisével járó foszfát hasító folyamat

BCRP: Breast cancer resistance protein, az ABCG2 gén terméke

BRAF: Rapidly accelerated fibrosarcoma homolog B – onkogén

CRC: colorectalis carcinoma – a vastagbél és a végbél daganatai

CBP: cAMP rezponzív elem-kötő protein (CREB) kötő protein

CDC42: Cell division control protein 42 homolog – sejtosztódást szabályozó fehérje

CTLA4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

CYP: citokróm 450

DTP: developmental therapeutic program

EGFR: epitheliális növekedési faktor receptor

EMT: epitheliális-mezenchymális átmenet

ER: Ösztrogén receptor

ErbB: epitheliális növekedési faktor receptorok

FGFR: fibroblaszt növekedési faktor receptor

FIH-1: faktor inhibitor HIF-1 ellen

GnRH: gonadotropin Releasing Hormon

GTP: guanidin-trifoszfát

Her2: Epitheliális növekedési faktor receptor 2

HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor 1 alpha – hipoxia által indukálható faktor

HRE: hipoxia-rezponzív elem

IL: interleukin

INF: interferon

KRAS: Kirsten RAt Sarcoma protein gén

K-Ras: a KRAS gén fehérjeterméke

LDHA: laktát dehidrogenáz A

MAPK: mitogén-aktiválta protein kináz
MDR: multidrog rezisztencia
MDR1: Multidrug resistance 1, az ABCB1 gén terméke
MRP1: Multidrug resistance protein 1, az ABCC1 gén terméke
MYC: Myelocytomatosis oncogene cellular homolog
NCI-60: hatvan sejtvonalat tartalmazó panel, az NCI szűrőrendszerének alapja
NSCLC: nem-kissejtes tüdőrák
SERM: szelektív ösztrogén receptor módosító
SD: standard deviáció
TKI: tirozin kináz inhibitor
RAS: Rat Sarcoma protein
p14^{ARF}: alternatív leolvasási keret (ARF) tumorszuppresszor fehérje
p300: hiszton acetiltranszferáz aktivitású fehérje
PD-1: Programmed cell death protein 1
PDGFR: vérlemezke-eredetű növekedési faktor receptor
PHD: Prolil-hidroxiláz-dioxigenáz
PI3K: foszfoinozitol-3-kináz
Pgp: P-glycoprotein, az ABCB1 gén terméke
PR: Progeszteron receptor
PTEN: Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 – tumorszuppresszor gén
TP53: 53 kDa méretű tumorszuppresszor fehérje
Rac-1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Ral: Ras-related protein
RhoA: Ras homológ fehérje A
ROS: reaktív oxigénszármazékok
SCLC: kissejtes tüdőrák
SRC: Szteroid receptor koaktivátor gén
TfR1: transferrin receptor 1
VEGF: vascular endothelial growth factor
VHL: Von Hippel-Lindau tumorszuppresszor gén

2 BEVEZETÉS

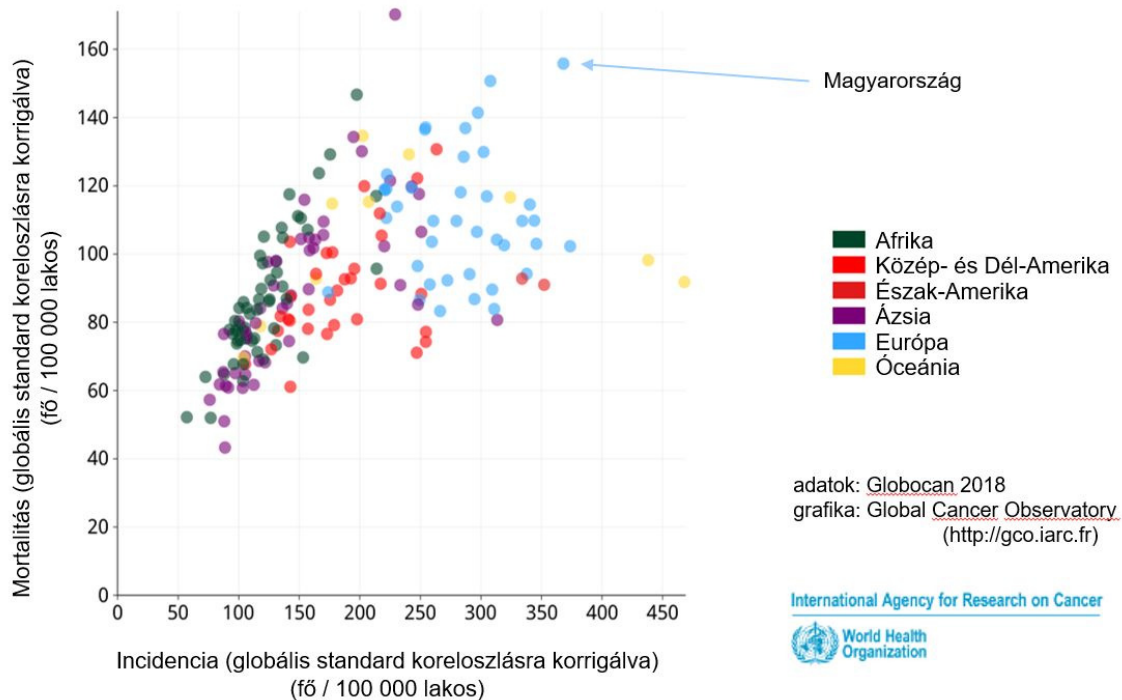
2.1 A kemoterápiával szembeni rezisztencia az onkológiai betegségekben

2.1.1 *Malignus megbetegedések általában*

A malignus daganatos betegségeket genetikai betegségeként tartjuk számon, amelyek a sejt normális ciklusának, anyagcseréjének, környezetéhez való viszonyának, illetve a programozott sejthalálnak a szabályozásában bekövetkező zavarok miatt a sejtek fokozott proliferációjával (a sejtciklus előrehaladásával, a sejtek osztódásával), illetve a sejthalál elmaradásával jellemezhető elsősorban. A daganat kialakulása mögött többnyire a proliferációt és túlélést segítő gének (onkogének) aktiválódása, illetve az ezt szabályozó, akadályozó gének (tumorszuppresszor gének) inaktiválódása áll. Különböző szöveti háttérű daganatokra más és más génhiba kombinációk jellemzőek, amelyek mintázata személyenként is jelentősen változhat^{1,2}.

A legfrissebb összesítések alapján a rosszindulatú daganatok világszerte a vezető halálokok között szerepelnek, az Egyesült Államokban 40-80 év közötti korosztályban a legtöbb életet a daganatos megbetegedések követelik³. 2018-ban több, mint 18 millió új beteget regisztráltak, és több, mint 9,5 millió ember halálát követelték a malignus kórképek⁴. Magyarországon kiemelkedően nagy az új megbetegedések (a világon a negyedik legmagasabb) és a halálozások (a világon a második legmagasabb) gyakorisága is (*1. ábra*).

A Nemzeti Rákregiszter rendszerében közölt megbetegedési statisztikák adatai szerint 2016-ban 54 358 nő és 51 249 férfi volt érintett daganatos megbetegedésben⁵. A statisztikai adatok szerint az elmúlt tíz évben évi 32-33 ezer fő veszítette életét hazánkban malignus kórképek következtében⁶. Bár több daganattípusnál jelentős eredményeket ért el a terápia fejlődése, vannak olyan tumorok is, ahol alig észlelhető a terápiás válasz, így sürgető a további kezelési lehetőségek feltérképezése³. Tovább növeli ennek a küldetésnek a jelentőségét, hogy a globális népesség növekedése és a várható élettartam emelkedése miatt 2040-re világszerte már évi 29,5 Millió főre becsülik az újonnan diagnosztizált daganatos betegek számát, amely 63%-os növekedést jelent⁴.



1. ábra: A malignus megbetegedések és halálozások gyakorisága országoként.

Az új diagnózisok (incidencia) és a halálozások (mortalitás) 2018. évben történő előfordulását a Global Cancer Observatory elemzése 100 000 lakosra vetítve adja meg országoként. A globális standard koreloszlásra korrigált értékek szerepelnek az ábrán⁴.

2.1.2 Daganatellenes terápiák formái

A hagyományos terápiák ebben a változatos betegcsoportban általában az érintett sejtek, az érintett szövet eliminálására koncentrálnak. Ez jelenthet fizikai eltávolítást különböző sebészi technikák alkalmazásával, amelyek a malignus szövet teljes kivételét jelentik a beteg szervezetéből. Ezen terápiák hatékonysága a legjobb, velük teljes gyógyulás érhető el, azonban a gyakorlatban való alkalmazásuk korlátozott. Amennyiben a daganat inoperábilis, a szervezet több helyén távoli áttét van jelen, vagy éppen a keringő sejteket érinti, a sebészeti kezelés többnyire nem jön szóba. Mivel sok esetben a beteg panaszait követően kerül felismerésre a betegség, ebben a stádiumban az esetek egy komoly részében már túlságosan előrehaladott a daganat kiterjedése, szervezeten belüli szétszóródása.

Ahol a sebészeti eljárásokkal való teljes tumormentesség nem érhető el, szisztémás kemoterápiás, illetve sugárterápiás kezelésre is szükség van. Az 1940-es évek óta a kemoterápiás kezelések sok új vegyület, illetve vegyületkombináció bevezetésével bővült, sok gyógyszer mellékhatásait sikerült kontrollálni. Ugyanakkor a fő vezérelv hasonló maradt: a cél a tumorsejtek elpusztítása/ártalmatlanná tétele a szervezet egészséges sejteinek károsítása nélkül. Ez az elv a sugárterápia esetében térbeli elhatárolás segítségével teljesülhet, azaz a térben célzott, fókuszált, akár valós időben, képalkotó eljárások által korrigált sugárzási hely és dózis csak a tumoros szövetet roncsolja, a környező szövetek minél kisebb fokú károsítása mellett.

A kemoterápiás stratégiák túlnyomó többsége esetén a beteg teljes szervezetére kiterjedő (szisztémás) kezelés történik. A klasszikus kemoterápiás kezelések célja a tumorsejtek direkt mérgezése, vagy a tumorsejtek kiemelkedő sejtosztódási, proliferációs potenciáljának célzása. A direkt toxicitás a genom károsodásához, és a sejt pusztulásához vezet. Ilyen szerek a DNS-alkilálók: mustárnitrogének (pl. ciklofoszfamid), nirozoureák (pl. carmustine), tetrazinek (pl. dakarbazin), platinaszármazékok (pl. ciszplatin). Kovalensen kötődnek a sejt DNS-éhez, a sejtciklus bármely pontján tudják támadni a sejteket. Az antimetabolitok a sejtosztódáshoz szükséges DNS-szintézist gátolják, így a sejtciklus S (szintézis) fázisában hatékonyak. Ilyen hatású a metotrexát, a pemetrexed, a fluorouracil, a capecitabin, vagy a gemcitabin is a klinikai gyakorlatban. A mikrotubulus gátlók a sejtosztódás mechanikai tartószerkezetét célozzák. Míg a vincaalkaloidok (például vinkrisztin, vinblasztin) a mikrotubulusok felépülését, így a mitózist gátolják meg, addig a taxánok (paclitaxel, docetaxel) a felépült mikrotubulusok lebomlását akadályozzák, így akadályozva a sejtciklus menetét. A topoizomeráz-gátlók a DNS szuperhélix szerkezetének nyitását-zárását végző fontos topoizomeráz enzimeket gátolják, így ellehetetlenítve mind az mRNS szintézis (transzkripció), mind a DNS kettőződés folyamatát, sőt, hatásuk a DNS-szál töréséhez vezethet. Ilyen hatású az irinotecan, topotecan, etopozid, doxorubicin, vagy mitoxantron. A citotoxikus antibiotikumok a sejtciklus gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat. Az antraciklinek (doxorubicin, daunorubicin) a DNS-szálak közé kötődve gátolják annak átíródását. A bleomycin emellett reaktív oxigénradikálok képzésével is a sejt pusztulásához járul hozzá⁷.

A szervezet legtöbb sejtje a tumorsejtekkel ellentétben sokkal kisebb sejtosztódási aktivitást mutat, vagy akár egyáltalán nem osztódnak. Ezen sejtekben a sejtosztódást

célzó vegyületek nem fejtenek ki mérgező hatást. A szervezet osztódó szövetei (ilyenek a nyálkahártyák, bélhám, bőr, vagy éppen a szőr folliculusok) azonban szintén célpontjaivá válhatnak a kezelésnek. Nem meglepő módon a terápia szervezetszintű mellékhatásai is elsősorban ezeket a szöveteket érintik. Emellett kritikus a vegyületek anyagcseréjét folytató, a szervezetből eltávolító szervek (pl. máj, vese) védelmének fenntartása is. A citotoxikus kemoterápia ezért csak olyan dózisban adagolható, amelyben hatékonyan elpusztítja a tumorsejteket, azonban a szervezetre kifejtett toxikus hatásai (mellékhatásai) tolerálhatóak, vagy kontrollálhatóak. A célsejtekben hatékony dózis, és a toxikus mellékhatásokkal jellemezhető maximálisan tolerálható dózis közötti tartományt nevezzük terápiás ablaknak. Amennyiben a szervezet sejtjei megnövekedett érzékenységet mutatnak, avagy a tumorsejtek ellenállóbbá válnak az adott citotoxikus szer adására, a terápiás ablak szűkül, esetleg megszűnik. Ez a hatékony terápiát ellehetetleníti, a klinikumban tumor progresszióhoz vezet.

Az osztódóképesség mellett azonban a tumorsejtek más tulajdonságait is célozhatják a terápiás megközelítések, így a célzott molekuláris terápiák, a hormonterápia, vagy a különböző biológiai kezelések.

Egyes célpont molekulák kizárólagosan, specifikusan tumorsejteken expresszálódnak⁸. Ilyen egyedi marker az BCR-ABL1 transzlokációval létrejövő fúziós gén, illetve az azt célzó imatinib terápia⁹. Más molekulák, bár előfordulnak más sejteken is, de a tumorsejteken megnövekszik az expressziójuk, vagy genetikai változat miatt elkülöníthetők. E molekulák expressziójuk és funkciójuk alapján direkt terápiás célpontként felmerülnek. Ilyen elven működik az emlőtumorok Her2 célzott terápiája a monoklonális antitest trastuzumabbal a Her2 felülexpresszáló tumorokban¹⁰, vagy EGFR érzékenyítő mutációt hordozó nem-kissejtes tüdőrákok EGFR-tirozin-kináz gátló terápiája (erlotinib, gefitinib)¹¹. A malignus melanómák közel felében jelen lévő B-Raf V600E pontmutáció lehetővé teszi a mutáció specifikus gátlószer, a vemurafenib alkalmazását¹². Előfordulhat, hogy a hagyományos toxikus gyógyszerek egy-egy specifikus sejtfelszíni molekulát felismerő antitesttel¹³, fehérjemozívummal¹⁴, vagy kismolekulával¹⁵ konjugálva válnak kiemelkedően hatékonyá, hiszen kifejezetten a tumorsejtekhez való eljuttatására és a célsejt elpusztítására egyaránt alkalmas az összetevők összehangolt működése. Bár nem molekuláris célzás az alapja, de célzott gyógyszereljuttatási stratégia egy formája lehet a liposzómális kemoterápia, mely a

tumorok gyorsan növekvő, folytonossági hiányokkal jellemezhető érstruktúráin keresztül tud szelektíven csak a tumor területén kilépni a keringésből, lokálisan hatékony koncentrációt hozva létre¹⁶.

A hormonterápia olyan daganattípusok kezelésében merül fel, melyek növekedése hormonfüggő. Ilyen a prosztatákarcinómák tesztoszteronfüggése, vagy egyes emlődaganatok ösztrogéntől függő növekedése. A tesztoszteronhatás gátlására kialakított terápiás lehetőségek között szerepel a tesztoszteronszintet csökkentő gonadotropin-releasing hormon (GnRH) agonista (goserelin) használata, az androgén receptort (AR) gátló antiandrogének (flutamid, nilutamid, bicalutamid), vagy a tesztoszteron metabolizmus gátlószerének (finasterid) alkalmazása. A hormonfüggő emlőtumorokban a szelektív ösztrogén jelfogó módosítók (SERM) az ösztrogén receptorhoz (ER) kötve gátolják annak működését. Ilyen például az elsőként, az 1970-es években kidolgozott célzott hormonterápiás módszer, a tamoxifen is, mely az emlő sejteiben gátolja az ösztrogénreceptort. Tiszta antiösztrogén fulvestrant is a terápia része lehet. Az aromatázgátlók (anastrozol, letrozol, exemestan) az ösztrogéntermelés hiányában a mellékvesében történő androgén-ösztrogén átalakítást gátolják. Goserelin kezelés szintén hatásos lehet emlőtumorok kezelésében. Ritkábban az olykor túlexpresszázó progesteronreceptor (PR) gátlása is lehetőségként merül fel (progesztinek, antiprogrsztinok), bár használatuk visszaszorult¹⁷.

A keringésben részt vevő citokinek fontos növekedést serkentő jeleket közvetíthetnek, ezért a biológiai terápiák célja ezen jelek tumornövekedést serkentő hatását gátolni. Az interferonok (például $INF\alpha$, $INF\gamma$) az immunhatást erősítik, míg az onkogének kifejeződését gátolják. Hematológiai megbetegedések, és melanóma kezelésében is használják. Az interleukinok a limfoid rendszer működését befolyásolják. Az interleukin-2 (IL-2) melanóma és vesesejtes karcinóma kezelésében sikeres, az immunsejtek aktiválásán keresztül fejti ki hatását. A hemopoetikus növekedési faktorok (eritropoetin, granulocita kolóniaserkentő faktor, granulocita-makrofág kolóniaserkentő faktor) az immunválasz sejteinek érését, aktivitását, sejtölő hatását segítik, mely segíthet ellensúlyozni a citotoxikus terápiák immuncsökkentő hatását¹⁸.

A tumorsejtek molekuláris feltérképezése számos olyan sejtfelszíni, illetve sejten belüli célmolekulát azonosított, melyek expressziója különbözik a tumorsejtekben és a normál szöveti sejtekben. Egyrészt ez az egyedi mintázat alkalmas adhat a tumorok

azonosítására (például keringő tumorsejtek, vagy keringő DNS elemzésével), korai diagnózisára, másrészt az ellenük irányuló célzott terápia képes lehet a mellékhatások jelentős csökkentése mellett tumorelles hatást elérni. Elsősorban a sejtfelszíni receptorok elleni monoklonális antitestek, illetve a sejten belüli jeltovábbítást felfüggesztő tirozin-kináz gátlók (TKI) elterjedtek a klinikai terápiaiban, bár újabban megjelent az epigenetikai szabályozást módosító szerek alkalmazása is¹⁹.

Az újabb lehetséges terápia lehetőségek közt kiemelkedő a tumorok immunterápia kezelése is, melyet az elmúlt években sikeresen vezettek be a klinikai gyakorlatba is. Ezen terápia során nem közvetlenül a tumorsejtek célzása a cél, hanem az általuk sok esetben toleránssá tett citotoxikus T-sejtek újbóli érzékenyítése, „élesítése”. Ilyen sikeres terápia ma már a T-sejtek inaktiválódását megakadályozó, citotoxikus T-limfocita-asszociált antigén 4-et (CTLA-4) és a programozott sejthalál protein-1-et (PD-1) célzó antitestek (ipilimumab, nivolumab) használata melanóma, tüdőtumorkok, veserákok, Hodgkin-limfóma, fej-nyaki laphámdaganatok, vastagbélrákok, májrákok esetén, melyek mellett intenzíven kutatott több új ígéretes immunmódosító hatású terápia lehetőség²⁰.

2.1.3 A terápia rezisztencia

Bár sok kemoterápia lehetőség áll a modern onkológiai kezelésben rendelkezésre, a kifejlesztett terápia hatásossága sokszor elmarad, vagy éppen idővel megszűnik. A terápia ellenálló, arra rezisztens tumorok a továbbiakban nem gátlódnak növekedésükben, áttétképző képességükben. Ez a jelenség kulcsfontosságú, hiszen a daganatos halálesetek legalább kétharmadáért a rezisztencia és a tumor progresszió, metasztatizálás tehető felelőssé²¹.

A kemoterápia kezeléssel szembeni ellenállás sok forrásból eredhet. A rezisztencia okai a tumorsejtek tulajdonságaiból, a tumor mikrokörnyezetének sajátjaiból, avagy a korábbi terápia hatására kialakuló változásokból levezethetők, és általában nem csupán egy ilyen tényező határozza meg a terápia hatásosságát, hanem több jellemző kölcsönhatásai alakítják ki a terápia választ, vagy annak hiányát. A gyakran előforduló, a terápia elégtelenségéhez vezető tényezőket foglalom össze, és hozzá tartozó példákat mutatok be az alábbiakban.

Terápiás célpont kifejeződésének hiánya a tumorsejteken. Példaként említhető az ER/PR negatív emlőtumorok esetén a hormonterápia hatástalansága, vagy EGFR-t (nagy mennyiségben) nem expresszáló NSCLC tumoros betegekben az EGFR-TKI terápia hatástalansága²².

A terápiás célpont célozhatósága nem megoldott.) Ennek lehet a fehérje szerkezetéből adódó oka, hiszen bizonyos fehérjék nem tartalmazzak a felszínükön gátló molekula kötődéssel a funkció gátlására alkalmas kötőhelyet. Emellett hasonló akadály az univerzálisan magas expresszió, amely azt jelenti, hogy nem csak a tumorokban, hanem a szervezet egészséges sejtjeiben is fontos szerepet töltenek be, így gátlásuk a mellékhatások miatt nem vállalható. Ez a probléma áll például az onkogén MYC, RAS, TP53 általános gátlószereinek fejlesztésének útjában, hiszen a szervezet minden sejtjének túlélésére kihatással lenne egy hasonló gátlás²³.

Terápia által célzott fenotípus hiánya – megfigyelhető a legtöbb malignus megbetegedésben az „alvó” (dormant) tumorsejtek jelenléte, melyek gyakorlatilag felfüggeszti a sejtosztódást, ezáltal az intenzív sejtciklust célzó kemoterápiás szerek általi elpusztítást ellehetetleníti, így ezen sejtek szinte minden esetben a daganat terápiát követő kiújulásával fenyegetnek²⁴.

A tumorsejt elrejtése: az immunsejtek által való felismerést, és célzott elpusztítást megakadályozhatja a tumorsejtek keletkezése vagy átjutása olyan szervekbe, amelyek az immunrendszer sejtjei számára nem elérhetők. Ezek között az úgynevezett „immunszentélyek” között található a szem belseje²⁵, a központi idegrendszer²⁶, a méhlepény és a magzat²⁷, a haj follikulusai²⁸, a here²⁹, vagy akár a tumorsejtek parakrin toleranciát kiváltó hatásának köszönhetően az anatómiailag a tumort követő regionális nyirokcsomó is³⁰. Hasonló, tumorsejtet elrejtő hatást írtak le a podoplanin-clec2 sejtközötti kölcsönhatás kapcsán, amely segítségével a tumorsejtek képesek maguk köré vérelemekből álló réteget szervezni, és emögé, mint pajzs mögé bújni az ellenőrzés, felismerés, eltávolítás elől³¹.

A tumorsejtek a terápia hatására komplex funkcionális, morfológiai, anyagcsere változásokon mennek át, rövid idő alatt. Tipikus folyamat karcinómák esetén az eredetileg epitheliális jellegű sejtek hirtelen változása, átalakulása mezenchymális sejtekké (epitheliális-mezenchymális átmenet, EMT). Ezt a rugalmasságot, úgy tűnik, a sejtleletani folyamatok nagyfokú epigenetikai szabályozottsága is lehetővé teszi, mely

gyors, genomszintű választ adhat egy kemoterápiás stressz esetén³². Ez egyben a sejtek proliferációját (így terápiás célozhatóságát), molekuláris profilját is megváltoztatja, ugyanakkor a motilitásra való képesség növelésével egyúttal az áttétképzés folyamatának kedvezhet³³.

Más gének működésének (például mutáció általi) megváltozása a célpont hatásának pótlására alkalmas. Az általában EGFR-függő K-Ras fehérje mutációja lehetővé teszi a K-Ras EGF szignáltól független aktivációját. Ez a tüdő³⁴ és coloncarcinomákban³⁵ az EGFR-TKI terápia hatástalanságához vezet. Emiatt a célzott EGFR-terápia megkezdése előtt minden esetben rutinszerűen tisztázásra kerül a RAS genotípus.

Egy molekula sikeres célzott gátlásakor előfordulhat egy vagy több alternatív jelátviteli útvonal aktiválódása, helyettesítendő az eredeti gátolt célpont vitális funkcióját. Az emlőtumorok 20%-ának kezelésében fontos szerepet kap a túlzott expressziójú Her2 növekedési faktor receptor célzott antitestes terápiája (trastuzumab), amely olykor a sikeres, komplett receptor funkció gátlás ellenére sem fejt ki kellő tumorelles hatást bizonyos idő elteltével. Ennek gyakori oka a sejten belüli jelátviteli utak egymást segítő alkalmazkodása (mutációk, vagy expressziós változások révén). Trastuzumab terápia esetén elsősorban a PI3K útvonal aktivitásának erősödése figyelhető meg, mely függetleníti a sejtet a Her2 receptor aktivitásától³⁶.

A tumor mikro környezet hatásai, például a nem megfelelő érszerkezet miatt a terápiás szer célsejtekhez jutása akadályozott, vagy a megváltozott pH- és O₂-szint miatt a tumorsejtek anyagcseréje, viselkedése átalakul, ellenállóvá téve őket a terápiával szemben³⁷. A daganatos hipoxia hatásait a későbbiekben részletesen tárgyalom a dolgozatban.

A tumorsejtek a terápia során szelekciós környezetben vannak, így kifejezetten a terápia hatására is fejlődhetnek és stabilizálódhatnak olyan sejtes tulajdonságok, amelyek megvédik a sejtet a kemoterápia sejtölő hatásától. Ilyen mechanizmus például olyan transzportfehérjék kifejeződése a sejtek felszínén, amelyek felismerik, és kiürítik a sejtől a mérgező hatású szereket, mely a terápiának ellenálló tumor növekedéséhez vezet. Jól ismert példa az ATP-kötő doménnel rendelkező ABC multidrog transzporter fehérjék kifejeződése, melyek széles specificitással rendelkező transzportaktivitásuk révén képesek a tumorsejtől eltávolítani a citotoxikus molekulákat. A kemoterápiás kezelés során folyamatos szelekció zajlik a magasabb transzporter-expresszió irányába, míg

végül már a klinikailag adható legmagasabb gyógyszer koncentráció is hatástalannak bizonyul a tumorsejtekkel szemben³⁸.

A tumorban kifejtett hatás mellett megváltozhat a kemoterápiás hatóanyagoknak az egészséges szövetekre gyakorolt hatása is. Amennyiben a test szövetei érzékenyebbé válnak az adott gyógyszerre, a mellékhatások elkerülése végett csökkenteni kell a dózist, a terápiás ablak beszűkül, végül ellehetetlenítve a kezelést. A betegek várható terápiás reakciója előre jósolhatóvá válik a molekuláris faktorok feltérképezésével³⁹. Bizonyos esetekben a vegyületek módosításával a szervezet általános terhelése csökkenthető, avagy a tumorsejtekben a relatív dózis növelhető, így helyreállítva a terápiás lehetőséget⁴⁰.

Tumor heterogenitás, azaz a tumorsejtek tumoron belüli sokfélesége szinte minden kemoterápiás törekvés útjába áll, hiszen a terápia célpontja (legyen az akár molekuláris célpont - például egy sejtfelszíni receptor, akár fenotípusos - például az intenzív sejtosztódás) nem minden sejten fejeződik ki a hatásosság eléréséhez szükséges mértékben⁴¹. A tumorok heterogenitása az idővel és a tumor méretével folyamatosan növekszik⁴², ezért a korai felismerés és a kezelés elkezdésének fontossága kiemelkedő.

Egyes kemoterápiás szerek nem aktívak, önmagukban csak citotoxikus molekulák előanyagaiként („prodrug”) szolgálnak, és a tumorsejtek enzimaktivitása révén alakulnak át hatékony kemoterápiás szerré. Leggyakrabban a citokróm p450 (CYP) enzimek különböző izoformái módosítják, aktiválják ezeket⁴³. Ismert példája ennek a ciklofoszfamid, ifoszfamid (CYP2B6), dakarbazin (CYP1A2, 2E1, 1A1), tegafur (CYP1A2, 2A6, 2C8), tamoxifen (CYP2D6) hatóanyagok csoportja, melyek a megfelelő enzim izoforma hiányában (vagy mutáció miatti inaktivitása esetén) nem tudnak toxikus hatású gyógyszerre alakulni. Ugyanakkor más, eredendően aktív kemoterapeutikum hatását éppen inaktíváló CYP enzimek túlműködése lehetetlenít el. Így például a CYP3A4 a taxánok, vinca-alkaloidok, imatinib, gefitinib, és más gyógyszerek hatástalanításáért lehet felelős⁴⁴.

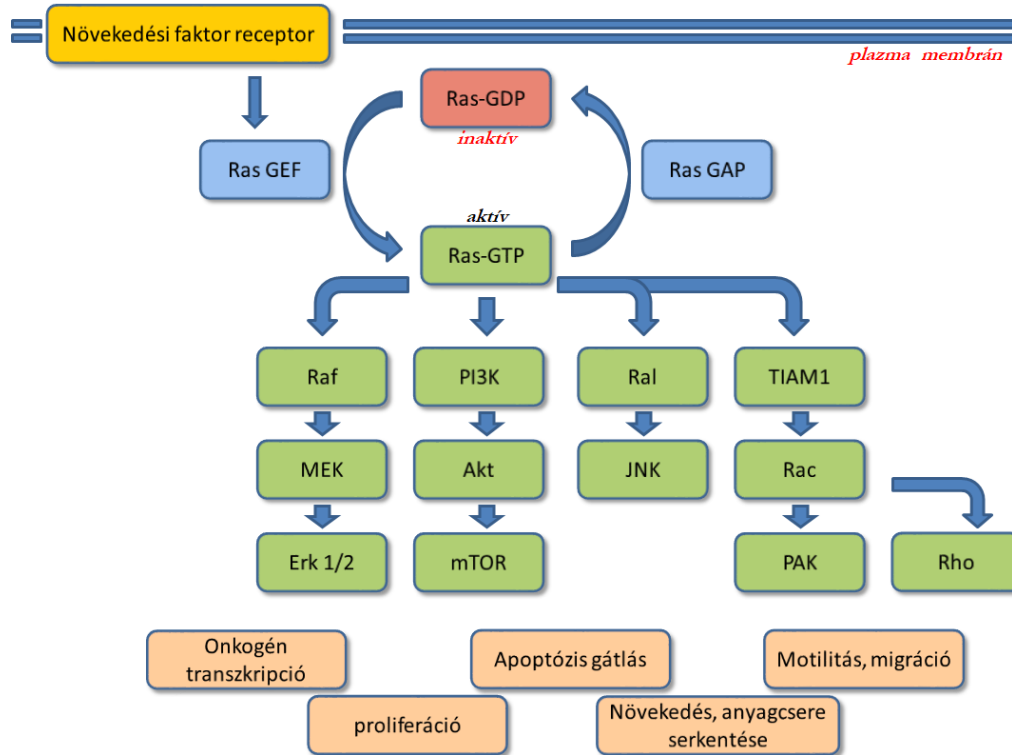
Dolgozatom további részében a terápia rezisztencia három kiemelt területével, a K-Ras onkogén mutációjával, a tumorok hipoxiás sajátágaival, és a tumorsejteken kialakuló ABCB1-mediált multidrog rezisztencia jelenségével foglalkozom részletesen

2.2 A K-Ras onkogén szerepe a tumorbiológiában, mutációinak sejtes és klinikai jelentősége

2.2.1 A Ras onkogén fehérje szerepe a tumorsejtekben

Az EGF receptorhoz kapcsolódó jelátviteli útvonal a tumorsejtek proliferációjának és túlélésének fontos letéteményese, így nem meglepő, hogy az egyik legelső molekuláris célpont a rákterápiában szintén az EGFR volt. Mára a klinikai rutinban széles körben elterjedt mind a receptort felismerő monoklonális antitest (pl. cetuximab), mind a receptor tirozin-kináz aktivitását (és így a foszforilációs jelátvitel kezdetét) gátló kismolekulák (pl. gefitinib, erlotinib) alkalmazása a kemoterápiás protokollok részeként akár monoterápia, akár kombinációs terápia formájában.

A növekedési faktorok által közvetített külső ingereket a növekedési faktor receptorok (pl. ErbB család tagjai, FGF receptorok, PDGFR), más, sejten kívülről érkező szignálokat pedig integrinek, vagy éppen G-proteinhez kapcsolt receptorok közvetítenek, melyek (más és más kontextusban) mind részben vagy egészében a Ras fehérje aktiválásán keresztül fejtik ki hatásukat, juttatják el a beérkező jelet a sejtmag transzkripció apparátusához⁴⁵. A Ras három izoformája (KRAS, HRAS, NRAS) ismert. A Ras GTP-t kötő és hidrolizáló, más fehérjéket kötődésekor aktiválni képes fehérje, mely többek között a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) útvonal, a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) útvonal, a Rac, vagy a Ral útvonal szabályozásáért felel. A Ras jelátvitel főbb résztvevőit az 2. ábra mutatja.



2. ábra: A Ras fehérje sejtben belüli jelátvitelben betöltött szerepe, aktivitásának hatásai

A növekedési faktoroktól érkező jel aktiválja a Ras fehérjét, melyet az aktiváló (GEF) és inaktiváló (GAP) fehérjék tartanak egyensúlyban. Amennyiben az aktív forma túlsúlyba kerül, több jelátviteli folyamat, és sejtleletani válasz indul be. Készült Gimple és Wang (2019) munkája⁴⁵ nyomán, módosítva.

2.2.2 A K-Ras fehérje változásai daganatokban, terápiai következményei

Az irodalomból jól ismert, hogy a RAS gén pontmutációi gyakran előfordulnak tumorokban, többek között pancreas-daganatokban (KRAS, a betegek 98%-ában) vastagbél-karcinómában (KRAS, 52%), , tüdő nem-kissejtes adenokarcinómájában (KRAS, 32%), myeloma multiplexben (KRAS/NRAS, 43%) malignus melanóma esetén (NRAS, 29%), vagy fej-nyaki daganatokban (HRAS, 6%)⁴⁶. A mutáció aktivitást előidéző (gain of function) változással jár, amelynek következtében a RAS fehérje GTP-t kötő és hidrolizáló aktivitása, ezáltal jelátviteli funkciója folyamatosan aktívvá válik. Ez maga után vonja azt a sajátságot, hogy a növekedési faktor receptor aktiválódása és az onnan induló jelátviteli lánc aktiválódása nem szükséges a jelátvitel második felének intenzív működéséhez, és tartós aktivitása a sejtek viselkedésének (prolifерáció, túlélés,

metabolizmus változás, motilitás növekedés) változásához vezet. Így az aktiváló mutáció érthető módon magában hordozza a jelátvitel Ras-t megelőző szintjén alkalmazott (pl. EGFR-t célzó terápiák) gátlás hatástalanságát⁴⁷.

Ugyanakkor más terápiáknak a hatásosságára is kihatással van a Ras aktiválódása. Bár nem egységes a megjelent tanulmányok konklúziója, úgy tűnik, hogy önmagában a Ras mutáció jelenléte nem jár együtt a klasszikus terápiára adott válasz megváltozásával. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy egyre nagyobb figyelem övezi a Ras mutációinak kodon- és aminosavsztintú vizsgálatát, mely a különböző mutációs típusok eltérő epidemiológiájáról és várható terápiás kihatásokról adnak információt⁴⁸.

2.2.3 *A K-Ras mutációt hordozó tumorokkal kapcsolatos terápiás eredmények áttekintése*

A Ras onkogén hamar terápiás célponttá vált, hiszen igazolt, hogy gátlása a tumorsejtek, *in vivo* tumorok növekedését egyaránt felfüggesztheti⁴⁹. Ugyanakkor nem szabad szem elől téveszteni, hogy a szervezet egészséges sejtjeinek jelátviteli folyamataiban is központi szerep hárul a Ras aktivitására⁵⁰. Emiatt az általános Ras-gátlók használata nem váltotta be a terápiás reményeket, hiszen a Ras gátlása, úgy tűnik, az étellel összeegyeztethetetlen.⁴⁹ Emellett a célzott terápia másik nehezítő tényezője, hogy a kisméretű fehérje nem tartalmaz túl sok hatékonyan célozható dokkolásra alkalmas zsebet, a nukleotidkötő és –cserélő zseb pedig a nukleotidok magas sejten belüli koncentrációja miatt nem használható⁵¹.

Ugyanakkor a kutatási irányok megváltozásával továbbra is az érdeklődés középpontjában maradt a Ras célzott terápiája. A fehérje direkt gátlása helyett azonban szabályozóinak, és az általa befolyásolt jelátvitelnek a gátlása merül fel. Magát a Ras onkogént célzó terápiák pedig a tumorspecifikus mutáns allélek sajátosságait igyekeznek kihasználni. Ez sok esetben nem csupán egy adott pozíció célzását jelenti (a Ras 12, 13, és 61. pozíciójában lévő aminosavak mutációját írták le daganatokban), hanem a konkrét aminosav csere befolyásolja a hatóanyag kötődését. A különböző misszensz mutációkra specifikusan készülnek irányított gátlószerkezetek, így a K-Ras G12C specifikus gátlók, melyek közül kettőt már klinikai tesztekben vizsgálnak^{52, 53}, vagy a G12D specifikus gátlók⁵⁴ fejlesztése is ígéretesen alakul.

2.2.4 Zoledronsav terápia a K-Ras poszttranszlációs aktivitásának gátlására

A K-Ras fehérje poszttranszlációs módosítás (preniláció) és az azt követő transzlokáció során kerül membrán-asszociált pozícióba, ahol aktivitását ki tudja fejteni⁵⁵. A nitrogéntartalmú biszfoszfonát vegyületek, így a zoledronsav is, hatását úgy fejti ki, hogy a mevalonát anyagcsereút köztes termékeinek, a farnezil-pirofoszfátnak és a geranilgeranil-profoszfatnak a képződését pirofoszfát-analóggént viselkedve gátolják, megakadályozva így többek között a Ras prenilációját, így annak onkogén aktivitása gátlódik^{55, 56}. A zoledronsav, kihasználva a csontok ásványos anyagához való kötődést, képes az oszteoklasztok funkcióját célzottan gátolni⁵⁷. Emellett kísérletes modellekben a tumorsejtek invázióját is képes gátolni⁵⁸. Éppen ezért a biszfoszfonát terápia széles körben használható szolid daganatok csontátátéjeinek, valamint myeloma multiplex kezelésére⁵⁹.

Ugyanakkor a betegek egy része nem reagál a zoledronsav terápiára. Mivel a Ras fehérje fontos célpontja a kezelésnek, a klinikai válasz hiányának okaként felmerül a Ras mutációinak szerepe is. Ezért fontos a K-Ras mutációs státusz zoledronsav-terápia hatékonyságára gyakorolt hatásának tisztázása, hiszen segíthet a megfelelő célcsoport kiválasztásában, illetve megoldási módok kifejlesztésének fontosságára hívhatja fel a figyelmet K-Ras mutáns daganatok csontátátéjeinek kezelésére.

2.3 A tumorsejtek hipoxiás mikrokörnyezete, a tumorsejtek HIF-1 α fehérje által vezérelt változásai, és összefüggései terápia rezisztenciával

2.3.1 A sejtek anyagcseréje oxigénhiányos szövetekben

A szövetek energiaháztartásának szabályozásában és fenntartásában a legfontosabb mechanizmus a glükóz lebontásából származó adenzin-trifoszfát (ATP) előállítása, melynek hidrolízise a legtöbb sejten belüli folyamat energiaigényes lépéseiben biztosítja a szükséges energiát. A mitokondriális oxidatív foszforiláció oxigén jelenlétében zajlik csak le. Oxigénhiányos környezetben (hipoxiában, szélsőséges esetben az oxigén teljes hiányában, anoxiában) a piruvát anaerob glikolízissel laktáttá vagy etanollá alakul, mely során kevesebb ATP szintézise valósul meg. A tumorsejtekben Otto Warburg és munkacsoportja figyelte meg először az aerob glikolízis (Warburg-effektus) jelenségét, mely során az oxigén jelenléte ellenére a sejtek anyagcseréje során a piruvát jelentős része

(akár 85%-a) glikolízisen keresztül laktáttá oxidálódik, míg csak kis része kerül az oxidatív foszforilációs rendszerbe^{60, 61}. Ez a fenotípus gyakran összefügg a tumorsejtek laktát-dehidrogenáz (az anaerob/aerob glikolízis kulcsenzime) emelkedett expressziójával, mely csökkent terápiás hatékonysághoz vezet⁶². A tumorsejtek metabolikus plaszticitása mellett azonban nagy jelentősége van a sejtszintű oxigénellátottságnak is, mely mind a fenti folyamatok befolyásolásán keresztül, mind a hipoxia-mediált szignalizáció aktiválásán át jelentős változásokat ér el a tumor tulajdonságaiban, és terápiás célozhatóságában.

2.3.2 *A tumor mikrokörnyezete, vérellátása, tumor hipoxia*

A szöveti sejtek oxigénellátását alapvetően az artériás rendszerben szállított oxigén mennyisége és a sejtek vérerektől számított távolsága határozza meg. A szöveti sejtek osztódásának, növekedésének szabályozója az érrendszeren keresztül megvalósuló oxigénellátottság. Modellek számításai szerint a véredényekből az oxigén diffúziója körülbelül 100-200 μm távolsáig elégséges, ennél nagyobb távolságban lévő sejtek már erős hipoxiának vannak kitéve⁶³. A szolid tumorokban a tumorsejtek folyamatos, gyors proliferációja hirtelen nagy sejtömeget hoz létre, amely magában hordozza a tumor sejteinek elégtelen oxigénellátását. Bár a környezet kezdeti érellátottsága erősen függ a kiindulási szövetről, általánosságban a tumor 1mm átmérő feletti méreténél már számolni kell a hipoxia hatásával.

2.3.3 *A tumor hipoxia általános következményei*

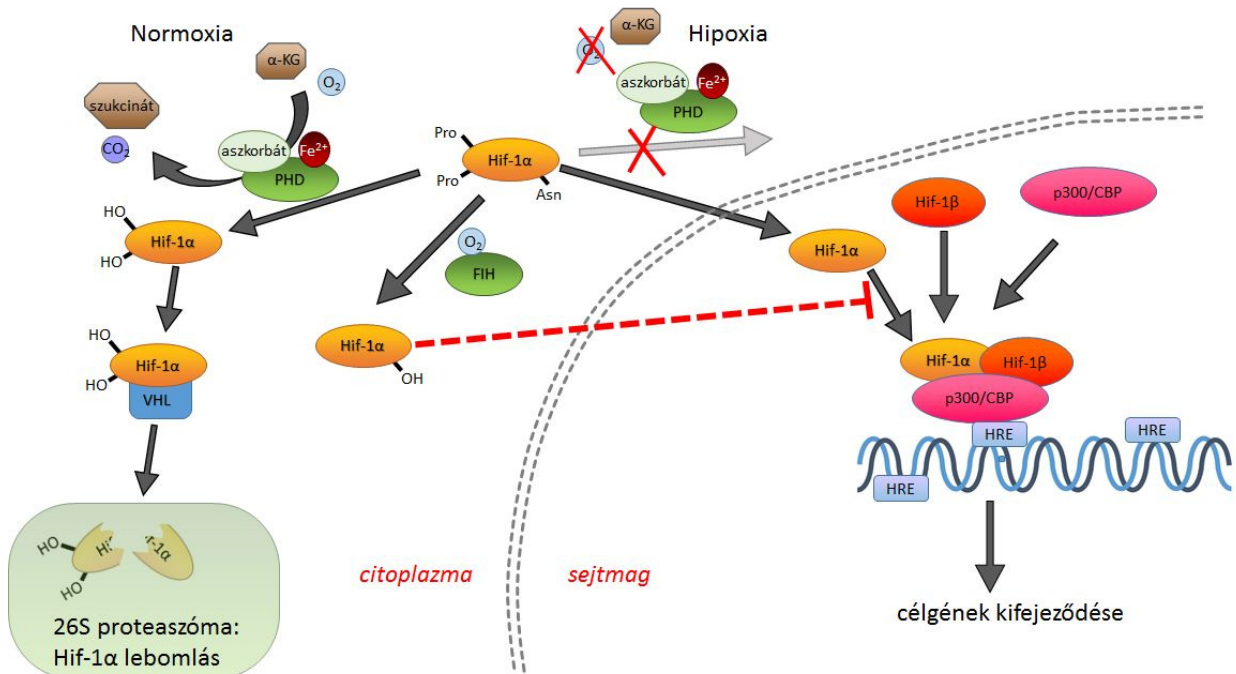
A tumor hipoxiás állapotának több következménye is van. Egyrészt a csökkent tápanyagellátás és oxigénszint a proliferációs készség csökkenéséhez vezet, mely a terápia szempontjából előnyös lehet. Ugyanakkor a sejtek a külső stressz hatására fenotípust váltanak, a kedvezőtlen körülményekre adott válaszreakcióként általában morfológiájuk átalakul (EMT), mozgékonyáguk fokozódik (mobilizálódás, migrációs készség növekedése), így klinikailag a hipoxiás tumorok agresszivitása, áttétképző képessége (progressziós potenciálja) megnövekszik⁶⁴. Ráadásul a tumorelles terápiaikat több módon is gátolhatja a hipoxiás állapot. Egyrészt a keringésen keresztül beadott hatóanyagok (az oxigénhez hasonlóan) nem, vagy nem elegendő mennyiségben képesek a tumorsejtek környezetébe jutni. Másrészt bizonyos terápiaik (ilyen például a

sugárterápia) kihasználják a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződését, és sejtölő hatását, így természetesen az oxigénhiány ezen terápiák hatékonyságát is jelentősen csökkenti (radioterápia rezisztencia)⁶⁵. Végül fontos megjegyezni, hogy a tumorsejtek változásai parakrin hatásokat is kifejtenek a közeli artériás rendszer endotélsejtjeire (angiogén hatás), melyek így gyors, viszonylag szabályozatlan érnövekedést indítanak a tumorszövetbe, próbálva helyreállítani a keringési ellátottságot. Ezekben az erekben jellemzően elégtelen a pericita-borítás, hiányzik az eret ölelő izomszövet is, mely a tumorszövetben uralkodó magas szövetközi hidrosztatikus nyomással párosulva tovább tudja fokozni a keringés elégtelenségét⁶⁶. Összességében a terápia szempontjából akadályozó hatásként értékelhetjük a tumor krónikus hipoxiás állapotát.

2.3.4 *A HIF-1 α szerepe a hipoxiás stresszre adott sejtes válaszokban*

Az oxigénhiány legfontosabb érzékelő és egyben effektor fehérjéje a sejtekben a hipoxia-indukált faktor 1 (Hif-1). A fehérje két alegységből (α , β) áll, melyek közül a β folyamatosan jelen van a sejtben. A Hif-1 α transzkripciója és translációja is folyamatosan aktív, a fehérje mennyiségét poszttranszlációs mechanizmusok szabályozzák. A citoplazmában prolin hidroxiláz domén proteinek (PHD1-PHD3) végzik a Hif-1 α 402-es és 564-es pozícióban lévő prolin aminosavainak hidroxilációját. A faktor inhibitor Hif-1 α (FIH-1) pedig a 803-as pozícióban lévő aszparagin hidroxilációját végzi⁶⁷. A PHD és FIH általi Hif-1 α hidroxiláció az oxigén mellett az enzimek aktív centrumában koordinált vas (Fe^{2+}) ionok jelenlététől is függ, így vaskelátorok (például deferoxamin, kobalt (Co^{2+}) ionok) jelenlétében a hidroxiláció gátlódik⁶⁸. A PHD aktivitásához továbbá α -ketoglutársav szubsztrát jelenléte is elengedhetetlen, melyből a reakció során szukcinát képződik. A hidroxilált aszparagin gátolja a Hif-1 α komplexbe épülését, és transzkripció aktivitásának kifejeződését. A prolinok hidroxilációja pedig lehetővé teszi a Von Hippel-Lindau fehérje kötődését, és a hozzá kapcsolódó 26S ubikvitin fehérje ligáz komplex segítségével a Hif-1 α lebontását. Így normoxiás körülmények között nem tud felhalmozódni, és a sejtmagba transzlokálódni a Hif-1 α ⁶⁹. Oxigénhiányos állapotban (vagy vas, illetve α -ketoglutársav megvonásakor) a hidroxiláció elmarad, így a Hif-1 α nem degradálódik, akkumulációja akár néhány perc után megfigyelhető a sejtben⁶⁸. Képes transzlokálódni a sejtmagba, ahol p300 és CBP koaktivátorok segítségével aktív komplexet alkot a Hif-1 β alegységgel, és transzkripció

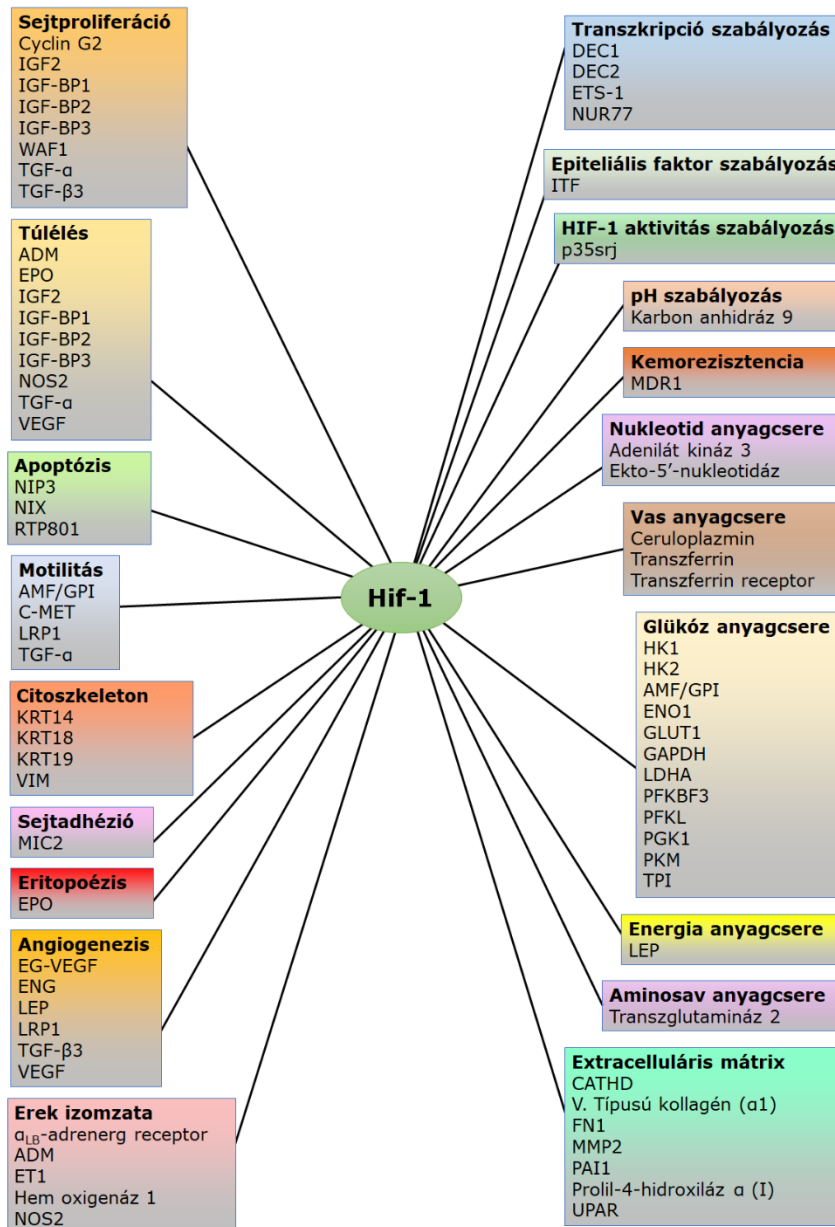
faktorként közvetlenül a DNS-hez köt. A hipoxia-reszponzív elemet (HRE) tartalmazó promoterral rendelkező célgének átíródását aktiválja ezáltal⁷¹. A Hif-1 α szabályozását végző mechanizmusokat a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra: A Hif-1 α fehérje sejtben belüli szabályozása normoxiás és hipoxiás körülmények között.

Normoxiás viszonyok között a Hif-1 α hidroxilációja megakadályozza egyrészt annak aktiválódását (FIH), másrészt lehetővé teszi ubiquitinálódását, és gyors eliminálását a sejtéből (PHD, VHL). Oxigén hiányában a hidroxilációs lépések elmaradnak, így a fehérje a sejtmagba jutva komplexet formál (Hif-1 β , p300/CBP), és a DNS specifikus (HRE) régióhoz kötődve segíti elő célgénjeinek átíródását.

A Hif-1 célgénjei számos sejtéletlen folyamatra kihatással vannak. Befolyásolják a sejtek energiaháztartását, glükóz- vas-, nukleotid-, anyagcseréjét, az extracelluláris tér szabályozását, a sejtek proliferációját, túlélését, differenciációját, migrációját, terápiával szembeni ellenállását is. Angiogén fenotípus felé mozdítja a tumorsejteket, mely az érújdonképződés, tumor beereződés fontos beindítója szolid tumorokban. Ez a jelenség, a morfológiai és motilitási változásokkal együtt elősegíti a tumorsejtek invázióját, áttétek megjelenését⁶⁴. A fontosabb célgéneket, és a velük kapcsolatos folyamatokat a 4. ábra foglalja össze.



4. ábra: A Hif-1 α által aktivált célgének és sejttéletani folyamatok áttekintése

A Hif-1(α) központi szerepet tölt be a stresszválaszban: a sejt stresszhez való alkalmazkodásában több, mint 60 célgénje vesz részt. Készült Gregg L. Semenza 2003-as összefoglalója⁶⁴ nyomán.

2.3.5 HIF-1 α -t célzó terápiás lehetőségek

A fentiekben leírt, tumorokra jellemző sajátos Hif-1 α aktivitás felveti lehetőségét, hogy egyrészt mutációjának vagy expressziós szintjének változásai hozzájárulhatnak a daganatok progressziójához, másrészt felveti a Hif-1 α gátlásán alapuló terápiás módok kifejlesztésének lehetőségét.

A genomikai vizsgálatok nem mutattak a daganatokban jelentős Hif-1 α mutáció felhalmozódást, bár a fehérje degradációját gátló ritka mutációt írtak már le prosztata daganatok esetében⁷². Ugyanakkor a Hif-1 α expressziójának növekedése, illetve regulációjának megváltozása gyakori, és sok esetben a betegség rossz prognózisával⁷³, vagy a kemoterápia⁷⁴, illetve radioterápia⁷⁵ hatékonyságával szoros összefüggést mutat, rávilágítva, hogy a Hif-1 α lebontása mellett más folyamatok is szabályozzák a Hif-1 α -függő folyamatok aktivitását. A PI3K/AKT/FRAP útvonal aktivitása, az SRC aktiváló mutációja, vagy éppen a tumor szuppresszor PTEN funkcióvesztő mutációja a HIF-1 α expresszió emelkedéséhez vezet. Hipoxiában, vagy a Von Hippel-Lindau fehérjének⁷⁶, illetve a p53 fehérjének az inaktiváló mutációja esetén a Hif-1 α gyors degradációja nem tud megtörténni, így a Hif-1 α felhalmozódásához vezet. A p14^{ARF} mutációja pedig a Hif-1 α és Hif-1 β dimerizációját, és így a célgének aktiválódását gátolja meg⁷⁷.

A terápiás lehetőségek tárháza tehát széles, hiszen a direkt gátláson kívül a Hif-1 α expresszióját, stabilitását, aktivitását befolyásoló fehérjék célzása is hatékony terápia alapja lehet. Számos vegyület mutat egy vagy több támadásponton aktivitást a Hif-1 α szuppresszójára irányuló terápiás küzdelemben, a transzkripciót gátló szerek (EZN-2968 antiszenz RNS⁷⁸, PX478 topoizomeráz-gátló⁷⁹), a Hif-1 α protein szintézis gátlói (2-metoxi-ösztadiol - 2ME2⁸⁰), a fehérje lebontását előidéző molekulák (tanespymicin⁸¹, Bisphenol A⁸²), a sejtmagban a Hif-1 β -val való dimerizáció gátlói (PS2385⁸³, Acriflavin⁸⁴), a Hif-1 komplex DNS-hez való kötődés gátlása (echinomycin⁸⁵), a Hif-1 α által szabályozott transzkripció gátlószerei (chetomin⁸⁶, indenopirazol-2I⁸⁷) jelentős része jelenleg is klinikai kipróbálás alatt áll, így remélhető a későbbi sikeres bevezetésük, bár egyelőre nem jutottak még el a rutin klinikai gyakorlatba való bevezetésig^{88, 89}. Ugyanakkor több, már betegeken alkalmazott tumorelles vegyületről kiderült, hogy más, korábban ismert hatásmechanizmusa mellett a Hif-1 α expressziót, vagy funkciót is gátolni képes⁹⁰. Látható tehát, hogy mind a tumor hipoxia, mind a Hif-1 α , mind az általa befolyásolt célgének széles palettája lehetséges kulcselemek a tumor progresszió elleni terápiás stratégiák kidolgozásában.

Ismert, hogy a konkrét transzkripció célgéneken kívül más fehérjékre is hatással van a Hif-1 α kifejeződése, stabilitása. A Rho GTPáz fehérjék 21kDa méretű, aktivitásuk során GTP/GDP cserét végrehajtó molekulák, melyek legfontosabb feladata a sejt citoskeletális aktin hálózatának fenntartásában, a sejtmozgás irányításában (sejtpolaritás

kialakítása, mikrotubulus rendszer szerveződése) ismert, de fontos szerepet töltenek be a membrán transzportban, vagy éppen transzkripciós faktorként is⁹¹. Klasszikus tagjai e fehérjecsoportnak a RhoA, Rac-1 és CDC42 fehérjék. Bár expressziójuk nem kizárólagosan a Hif-1 α aktivitásától függ, de több vizsgálat bizonyította, hogy aktivitásuk összefügg a hipoxiás állapottal, illetve a Hif-1 α expressziójával⁹²⁻⁹⁴. Ugyanakkor expressziójuk egyben képes a Hif-1 α felhalmozódását tovább indukálni⁹⁵. A fehérjék tehát bonyolult kölcsönhatás-rendszer szerint szabályozzák egymás működését⁹⁶, melynek megértése és feltérképezése fontos állomása a hipoxiás szolid tumorok aggresszív fenotípusának célzott terápiájában. A közvetlen szabályozás alatt álló génekkel szemben a hipoxia hatása más gének expressziójára nem univerzális, igen nagy különbségek adódhatnak a tumorsejtek válaszreakciói között⁹⁷. A Rho GTP-ázok változásai, és rajtuk keresztül a sejtek mozgékonyságának megváltozása hipoxiás környezetben még feltérképezés alatt állnak. A tumorok áttétképzésének stimulálása olyan kritikus pont a tumor progresszióban, mely mindenképpen megköveteli, hogy több információval rendelkezünk a hipoxia sejtmozgásra kifejtett hatásaival. Az összefüggések segíthetnek megjósolni különböző tumorok esetén a hipoxiás válasz típusát, egyben fogékonyságukat egy Hif-1 α -t célzó terápiás lehetőség alkalmazására.

2.4 Az ABCB1 multidrog transzporter szerepe a kemoterápia rezisztenciában, terápiás lehetőségek multidrog-rezisztens tumorok kezelésére

2.4.1 Multidrog rezisztencia, és az ABCB1 multidrog transzporter

A terápiával szembeni rezisztencia csoportosítható a mechanizmus szerint, azonban nagyon fontos annak ismerete is, hogy egy adott terápiával szemben ellenálló tumor esetén milyen alternatív terápiás lehetőségek jöhetnek szóba a betegek kezelésében. Ez esetben egy adott terápiás mód (például EGFR-t célzó terápia K-Ras-mutáns daganatokban) ellehetetlenülése esetén a gyógyszeres terápia váltásával törhető meg a tumor ellenállása.

Akadnak azonban olyan rezisztencia mechanizmusok, amelyek nem csupán egy hatóanyaggal szemben nyújtanak védelmet a tumorsejteknek. Ezt a jelenséget multidrog-rezisztenciának nevezzük. A legismertebb ilyen mechanizmus a többféle vegyület sejtből való eltávolítására képes multidrog-transzporterek megjelenése a tumorsejteken⁹⁸.

Az ATP hidrolíziséből nyert energia felhasználásával az ABC (ATP Binding Cassette = ATP kötő régiót tartalmazó) transzporterek változatos szerkezetű szubsztrátok biológiai membránokon keresztüli transzportjára képesek. Az ABCB1 gén által kódolt P-glycoprotein széles spektrumú szubsztrát felismerő képessége jól ismert tulajdonság, mely a fiziológias védekezés mellett nagy számú gyógyszermolekula transzportálásáért is felelős, így gátolja a hatóanyagoknak a sejtekben történő felhalmozódását⁹⁹.

A humán ABC- transzporterek családjába 48 fehérje tartozik, melyek változó szubsztrát-felismerési képességűek. Ionok, aminosavak, lipidek, cukrok, fémek, peptidek, fehérjék, és gyógyszerhatóanyagok széles palettáját képesek felismerni és átjuttatni a membránokon. A transzport irányulhat a sejtbe befelé, illetve a különböző sejt-kompartimentumok között. A működésükben azonban közös, hogy ATP kötésével, majd hidrolízisével egyidejűleg képesek a szubsztrátjaik aktív transzportjára koncentrációgradiens ellenében is¹⁰⁰. A szervezet fiziológias működéséhez elengedhetetlen a multidrog-transzporterek jelenléte, hiszen a szövetek közti biológiai szűrőrendszer központi elemei. Megfigyelhető expressziójuk a fiziológias körülmények között (például a bélfal sejtjeiben, a vér-agy-gát struktúráiban, a szöveti sejtek plazmamembránjában, a vér-here gáton, a placentában, a tüdő felszínén, vagy a vesében)⁹⁹, hiányuk pedig különböző kórképek kialakulásához vezet¹⁰¹.

A multidrog-rezisztenciáért felelős transzporterek közül háromnak a jelentősége kiemelkedő a tumorbiológiában. Az ABCC1 által kódolt MRP1 fehérje, az ABCG2 gén terméke (BCRP), és az ABCB1 génről átíródó MDR1 (multidrog rezisztencia protein 1), más néven P-glycoprotein (Pgp).

A P-glycoprotein funkcióját már 1976-ban leírták¹⁰². 2009 óta térbeli szerkezetéről is információkkal rendelkezünk¹⁰³, számos tumortípusban kimutatták a megnövekedett expressziója és a kemoterápiás válasz elégtelensége közötti összefüggést. Kimutatták, hogy szájüregi rákokban független negatív prognosztikus faktorként viselkedik a magas Pgp expresszió¹⁰⁴. Hasonló jelentősége bizonyított akut mieloid leukémiás (AML) betegek körében is¹⁰⁵, gyomorrákok esetén is a rezisztencia fő letéteményeseként azonosították¹⁰⁶. Bár nincs teljes konszenzus arról, hogy egygénes rezisztencia mechanizmusról van szó, az általánosan elfogadott, hogy a Pgp, melynek expressziója gyakran a kezelés hatására emelkedik meg a tumorsejtek klonális szelekciójával, sok esetben ellehetetleníti a hatékony terápia folytatását, hiszen a rezisztencia olyan magas koncentrációkkal szemben is megjelenhet, ahol már a szisztémás mellékhatások elfogadhatatlanok, így gyakorlatilag a terápia ablak megszűnését okozza. További nehézséget okoz, hogy a Pgp rendkívül széles szubsztrátfelismerő képességgel bír¹⁰⁷, ezáltal nem csak az expresszióját kiváltó gyógyszer, hanem egy sor más kezelés hatékonyságát is gátolja.

A klinikumban is alkalmazott citotoxikus, vagy célzott terápia szerek közül tehát sok a Pgp szubsztrátjaként viselkedik, ezeket a hatóanyagokat az *1. táblázat* foglalja össze⁹⁹,

¹⁰⁸.

1. táblázat A Pgp által felismert és exportált kemoterápiás szerek és alkalmazásuk

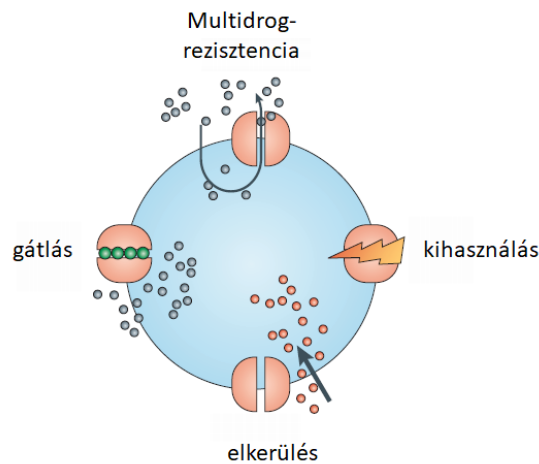
A klinikai gyakorlatban használt kemoterápiás vegyületek közül a Pgp számos anyagot transzportál, megnehezítve a terápia hatásosságát. Készült Szakács és mtsai. (2006), valamint a MedScape adatbázisa alapján.

Vegyületcsalád	Szubsztrát	Érintett tumortípusok
Vinca-alkaloidok	Vinblastine	Hodgkin limfóma, nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC), melanóma, ovarium-, prosztata-, here-, hólyagtumorok
	Vincristine	Limfómák, neuroblasztóma, szarkómák, kissejtes tüdőrák (SCLC), Wilms-tumor, agytumorok
Antraciklinek	Daunorubicin	Akut leukémiák
	Doxorubicin	SCLC, emlő-, ovarium-, prosztata-, gyomor-, pajzsmirigy-, máj-, fej-nyaki tumorok, myeloma multiplex, Hodgkin-kór, akut leukémiák
	Epirubicin	emlőtumorok
Epipodofillotoxinok	Etoposide	heredaganatok, SCLC
	Teniposide	akut limfoblasztos leukémia, nem-Hodgkin limfóma
Taxánok	Docetaxel	NSCLC, emlő-, gyomor-, prosztata-, fej-nyaki tumorok
	Paclitaxel	Kaposi szarkóma ovarium-, emlő-, tüdő-, , pancreasdaganatok
Kinázgátlók	Imatinib (Gleevec)	Akut limfoblasztos leukémia, krónikus mieloid leukémia, gasztrointesztinális strómatumorok
Camptotecinek	Irinotecan(CPT-11)	Colon-, pancreas-, ovariumtumorok
Egyéb	Methotrexate	Limfómák, leukémiák, oszteoszarkóma, emlő-, fej-nyaki tumorok
	Mitoxantrone	Akut leukémiák, limfómák, prosztatatumorok
	Actinomycin D	Wilms-tumor, rhabdomyosarkóma, Ewing szarkóma, , here-, ovariumdaganatok

2.4.2 *A multidrog-rezisztens tumorok kezelésének lehetőségei*

A Pgp MDR-fenotípust okozó tulajdonságára, és terápia által indukálható expressziójára az 1990-es években derült fény, amely nagyban fellendítette a Pgp célzásával történő terápiás lehetőségek iránti tudományos érdeklődést a. Az ezt követő két évtizedben specifikus gátlószerek több generációja került kifejlesztésre, melyek a Pgp transzportaktivitását függesztik fel. A biztató *in vitro* eredmények mellett azonban a klinikai tesztek elbuktak, aminek egyik tényezője a szervezet más szöveteiben található Pgp aktivitás kulcsfontosságú szerepe a xenobiotikumok és citotoxikus hatások elleni védekezésben. A vér-agy-gát Pgp aktivitásának felfüggesztésével például letális toxicitás érheti a központi idegrendszert. Érdekes módon éppen egy ezen alapuló véletlen eset, majd tervezett kísérlet mutatott rá a Pgp funkciójára is, amikor egy állattenyésztési rutinban használatos féreghajtó szer, az ivermectin alkalmazását követően az ABCB1-hiányos állatok esetén komoly neurotoxikus hatást írtak le, míg a funkcionáló Pgp-vel felvértezett vér-agy-gát megvédte az állatokat a toxikus hatástól¹⁰⁹.

A Pgp gátlók klinikai kudarcra némileg visszavetette a multidrog-rezisztencia Pgp-fókuszú kutatását, ám a direkt gátláson kívül megjelentek új alternatív stratégiák az MDR tumorok kezelésének lehetőségére. A docetaxel molekulák formulálásával például megelőzhető a Pgp expresszió kezelés hatására bekövetkező növekedése, így tovább fenntartható a terápia hatékonysága¹¹⁰. A már kialakult Pgp-expresszáló tumorsejtek kezelésére ígéretes megközelítések többek között olyan toxikus vegyületek alkalmazását javasolják, amelyek képesek megkerülni a tumorsejtek Pgp-n alapuló önvédelmi rendszerét, így hatékony terápiás koncentráció érhető el intracellulárisan^{16, 111, 112}. Végül elképzelhető a Pgp jelenlétének és működésének kihasználása is a sejt elpusztítása érdekében. A hipotéziseket az 5. ábra foglalja össze⁹⁹.



5. ábra: Az MDR tumorsejtek működése, és elpusztításuk lehetséges stratégiái

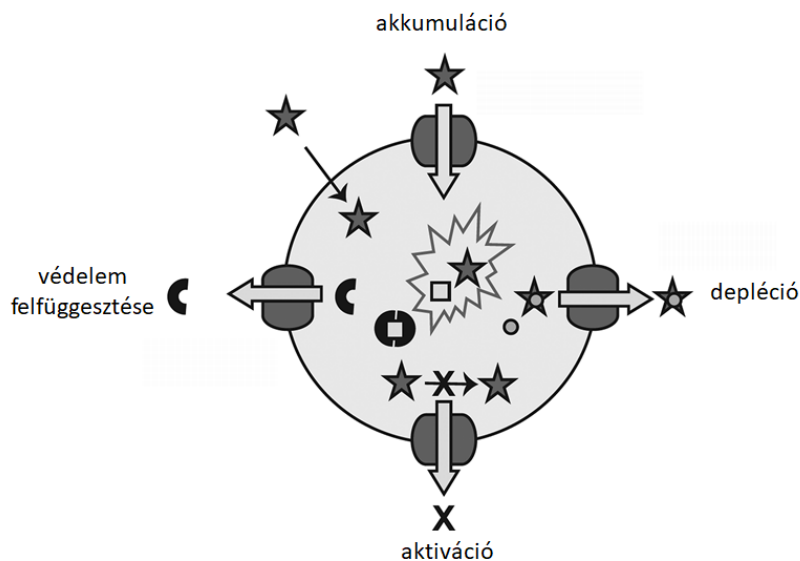
A Pgp funkció gátlásán kívül annak elkerülése és kihasználása is felmerül. Szakács és mtsai. (2006) nyomán.

2.4.3 A kollaterális szenzitivitás, MDR-szelektív hatás

A transzporter aktivitásának terápiás kihasználására többféle lehetőség is elképzelhető. Ami közös bennük, hogy bizonyos kezeléssel szemben a Pgp-t kifejező sejtek túlérzékenységet mutatnak, így célzottan elpusztíthatók. Ezt a jelenséget hívjuk kollaterális szenzitivitásnak: egy vagy több vegyület elleni rezisztencia ez esetben együtt jár más vegyületekkel szemben mutatott túlérzékenységgel. Ilyen párhuzamos túlérzékenységre már más rezisztencia összefüggésekben is ismerünk példákat, akár a baktériumok multidrog rezisztenciájához hozzájáruló mutációs profilok által okozott speciális érzékenység¹¹³, akár az ABCC1 expressziója kapcsán szerzett rezisztencia és a fokozott glutation-függés kapcsolata¹¹⁴ is említhető. A Pgp működése kapcsán is intenzív kutatás indult a lehetséges kollaterális szenzitivitások felderítésére. Az Egyesült Államokban működő nemzeti rákkutató intézet, a National Cancer Institute (NCI) által működtetett, nyilvánosan elérhető, terápiás szerek felfedezésén dolgozó Developmental Therapeutics Program (DTP) adatbázisában szereplő nagyszámú gyógyszerjelölt molekula toxicitását különböző humán tumorokból származó, hatvan sejtvonalat tartalmazó sejtpanel (NCI-60) minden sejtvonalán rutinszerűen vizsgálják. A sejtek Pgp-expressziójának meghatározásával lehetővé vált a Pgp-szubsztrátok (melyek a Pgp-n keresztül exportálódnak a sejtől, így magasabb koncentrációt képesek a Pgp-t expresszáló sejtek tolerálni), és különleges, MDR-szelektív vegyületek (melyek

magasabb Pgp-szintű sejtek ellen alacsonyabb koncentrációban is hatékonyak) meghatározása^{115,116}. Munkacsoportunk több hasonló vegyületet azonosított sikeresen¹¹⁷, majd az MDR-szelektív vegyületek matematikai és kémiai vizsgálatával, valamint nagy áteresztő képességű *in vitro* tesztrendszer segítségével nagyszámú, nagy szelektivitású vegyületeket írt le¹¹⁸. Sok vegyület felmerült a Pgp-t expresszáló tumorsejtek szelektív elpusztításának lehetséges eszközeként, beszámoltak már szteroid hormonok¹¹⁹, fémion kelátorok¹¹⁷, energia-anyagcsere gátlószerek¹²⁰ MDR-szelektív hatásáról is. Fontos azonban kiemelni, hogy a sejtes modellekben a Pgp-expresszáló és a Pgp-t nem expresszáló sejtek között sok esetben nem csupán a Pgp mennyisége és működése különbözik, így a hasonló rendszerekben elért eredmények óvatosan kezelendők. Árnyalhatja a képet nagyobb, heterogén sejtvonalakból álló sejtpanelen történő vizsgálat, ami az NCI-60 sejtpanel esetében valós lehetőségként szolgál¹¹⁵. Emellett fontos a Pgp specifikus inhibíciójával kontrollálni a kísérleteket, hogy ki lehessen szűrni: a két sejt közötti különbségek valóban Pgp-funkciótól függenek-e¹²¹. Mivel a legtöbb esetben a hosszan tartó szelekció révén kialakított MDR sejtvonalak nagy számú genetikai változáson esnek át, szükséges lehet expressziós vektor konstrukciók segítségével Pgp-t kifejező sejteket létrehozni Pgp-t nem expresszáló sejtekből. Ennek a módszernek az előnye a várhatóan kevesebb nem tervezett genetikai változás mellett való MDR fenotípus kialakítása.

A kollaterális szenzitivitás jelenségének magyarázatára több hipotézis is felmerült, de korábban nem azonosították a mögöttes mechanizmust, mechanizmusokat. A 6. ábra foglalja össze a felmerült elméleteket a kollaterális szenzitivitás lehetséges okaira¹²². Az MDR-szelektív vegyületek esetében a transzporter, és a hatékonynak talált vegyületek sajátosságai adhatnak támpontot a valós működést illetően.



6. ábra: A Pgp által mediált kollaterális szenzitivitást magyarázó lehetséges folyamatok

A transzporter működés segítségével elképzelhető egy toxikus vegyület ellenirányú beáramlása, felhalmozódása. A transzporterén keresztül segítheti egy, a sejtet védő mechanizmus megszűnését is. Aktiválhatja a transzporter működését. Szubsztrátként pedig exportjával kapcsolatban valamely nélkülözhetetlen összetevő is eltávolításra kerülhet a sejtéből, illetve a Pgp ATP-áz aktivitás ATP deplációhoz vezethet. Szakács és mtsai. (2014) nyomán.

2.4.4 ATP-áz aktivitás, mint lehetséges terápiás célpont

Mivel jól ismert, hogy a Pgp-n keresztüli transzport aktív folyamat, mely ATP hidrolízise mellett megy végbe, felmerülhet a gyanú, hogy vagy az MDR-szelektív vegyület, vagy jelenlétében valamely sejtben belüli molekula exportja valósul meg, mely a Pgp folyamatos működtetése az ATP intenzív hidrolízisével jár, esetlegesen kritikusan alacsony szintre csökkentve a sejt ATP-készletét, energia hiányában a programozott sejthalál felé sodorva a tumorsejtet¹²³. Ezt a hipotézist támogatta néhány korábbi közvetett irodalmi adat is, amely szerint a P-glycoprotein aktiválása nagy mennyiségű ATP fogyasztással járhat, mely az ATP-termelés gátlásával együtt szelektív ATP hiányhoz vezethet a Pgp-expresszáló sejtekben¹²⁴. Érdeemesnek tűnt tehát megvizsgálni az MDR-szelektív szerek sejtben belüli ATP-mennyiségre gyakorolt hatását (lásd célkitűzések).

2.4.5 *Vas homeosztázis tumorsejtekben, a vashiányos állapot, mint tumorterápiás célpont*

Az általunk ismert MDR-szelektív vegyületek több fémion mellett a vasionok komplexálására is képesek, amely hozzájárulhat a toxikus hatás kifejtéséhez. A sejtek vasháztartása szigorúan szabályozott folyamat, mely kihatással van a sejtciklus szabályozására¹²⁵, az angiogenezisre¹²⁶, vagy éppen a mitokondriális energiatermelő és anyagcsere folyamatokra is¹²⁷. A szervezet túlzott vasterhelése elsősorban reaktív oxigénszármazékok (ROS) termelése révén igazoltan elősegíti a DNS károsodását, és a tumorok kialakulását. Kiemelkedő fontosságú lehet tehát a csökkentett vasbevitel, illetve a vas kelációjára képes molekulák alkalmazásának stratégiája a tumoros betegségek megelőzésében¹²⁸. A tumorsejtek megváltozott anyagcseréjük és viselkedésük miatt csak magasabb vasmennyiség mellett képesek működésüket fenntartani. Igazolható, hogy a vaskelátorokkal kiegészített terápia segíti a citotoxikus¹²⁹, illetve a molekuláris célzott¹³⁰ kemoterápia hatékonyságát, sőt, önmagában is képes a tumor növekedését gátolni^{131, 132}.

A szöveti sejtekben a vas felvétele elsősorban a transferrinhez kötött formában történik, melyet a transferrin-receptor (TFR1) mediál. A rendszert a sejt vasszintje szabályozza, melyért a vas-reszponzív elemhez kötődő fehérjék (IRP) poszttranszkripciósi regulációja a felelős. A visszacsatolás vashiány esetén növeli a transferrin receptor expresszióját, és így a sejt vasfelvételi kapacitását¹²⁸.

A TFR1 szintje mellett azonban más fehérjék vasfüggő működése is ismert. A Hif-1 α fehérje degradációjáért felelős prolin hidroxilázok (PHD) működéséhez elengedhetetlen a vas jelenléte, hiányában a Hif-1 α fehérje (a hipoxiás állapothoz hasonlóan) stabilizálódik, akumulálódik a sejtben. Ez az akumuláció együtt jár a transzkripciósi aktivitás növekedésével is, amely a célgénnek (például a TFR1, és a VEGFA) expressziójának növekedésével jár. A ribonukleotid trifoszfátok (NTP) dezoxi-ribonukleotid trifoszfátokká (dNTP) alakítását a ribonukleotid reduktáz (RNR) enzim végzi, melynek aktivitásához szintén szükség van a vasionok jelenlétére. Ezen funkció hiányában a dNTP készlet nem elégséges a sejtciklus S fázisában a DNS-szintézis megvalósításához. Ezért vaskelátorok hatására az RNR aktivitás blokkolása, és a dNTP-egyensúly felborulása jellemző. Az RNR és a vaskeláció kapcsolata már a sejtek proliferációját is érinti, így egy tumorelles stratégia célpontja is lehet az RNR gátlása.

Munkacsoportunk az MDR-szelektív vegyületek szerkezetének és funkciójának elemzésekor arra a megállapításra jutott, hogy bár több, egymástól különböző kémiai szerkezetű vegyületcsaládról van szó¹¹⁷, a szelektív molekulák képesek fémion kelációra, ezáltal potenciálisan – a sejtekbe való fémion bejutást segítve – toxicitás, vagy fémion depléción előidézésére a sejtekben¹¹⁸. Mivel a Pgp transzporter ismert működése során a sejtplazma felől a sejten kívüli tér irányába továbbítja szubsztrátjait, logikus feltételezni, hogy a sejt számára nélkülözhetetlen vas sejtben belüli szintjét is befolyásolhatja a kelátorok jelenléte. Elsősorban az enzimatis folyamatok számára hozzáférhető szabad vasmennyiség (Labile Iron Pool) mennyisége tűnik kritikusnak e szempontból¹³³. Korábban azonban nem volt ismert a vaskeláció és a Pgp transzportaktivitás között semmilyen kapcsolat. Fontos tehát az MDR-szelektív vegyületeknek a sejtek vasháztartására gyakorolt hatását felderíteni, hogy azonosíthassuk a vasdepléción esetleges szerepét a Pgp-függő toxicitásban.

3 CÉLKITŰZÉSEK

A KRAS gén pontmutációi többféle terápia hatásosságára is kihatással lehetnek. Tekintettel a preniláció szerepére a K-Ras fehérje posztranszlációs aktiválásában, a folyamat gátlásán keresztül ható zoledronsav terápia hatékonysága függhet a K-Ras státusztól.

1. K-Ras aktiváló G12C és G12S mutációk szerepének vizsgálata különböző nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) modellek zoledronsav-terápiájának hatékonyságában *in vitro* K-Ras lokalizáció, proliferáció, migráció, apoptózis vizsgálatok, valamint *in vivo* tumornövekedés elemzésével.

A tumor hipoxiás mikroölynyezte, és az emiatt kilakult sejtes változások kihatnak a tumorsejtek mozgékonyaságára, áttétképző képességére, terápiával való célozhatóságukra.

2. A hipoxia és a Hif-1 α kifejeződés szerepének tisztázása a motilitás és az áttétképzés folyamatában különböző tumormodellekben. *In vitro* hypoxia vizsgálatokban a proliferáció, a motilitás és migrációs aktivitás, a Hif-1 α és a Rho kis GTPáz fehérjék (RhoA, Rac-1, Cdc42) kifejeződésének vizsgálata. *In vivo* Hif-1 α -indukált és -gátolt modellekben a Hif-1 α expresszió változásainak tumor progresszióra gyakorolt hatásainak vizsgálata.

A daganatok kemoterápiával szembeni rezisztenciájában meghatározó a P-glycoprotein fokozott működése. Csoportunk korábbi munkái során felfedezett olyan molekulákat, melyek képesek a multidrog-rezisztens daganatokat célzottan elpusztítani.

3. Az MDR-szelektív vegyületek tumorsejtek ATP-szintjére gyakorolt hatásainak vizsgálata, az ATP depléciós hipotézis értékelése.

4. Az MDR-szelektív vegyületek által a Pgp-t kifejező sejtekben okozott kritikus vashiány és a Pgp funkció kapcsolatának leírása *in vitro* modellekben végzett toxicitási, a sejten belüli mechanizmusokat követő, valamint a transzportaktivitást vizsgáló kísérletek alapján.

4 MÓDSZEREK

4.1 Felhasznált kezelőszerek:

Az NSC297366 a DTP vegyületkönyvtárából származik (NCI, NIH). A zoledronsavat (Zometa) és a ciszplatint a Novartistól, a doxorubicint a TEVA-tól (Petah Tikva, Izrael) vásároltuk. A P-gp inhibitor tariquidart (XR9576) Dr. Susan Bates (NCI) laborjából kaptuk ajándékként. A , kobalt-klorid, vas-klorid ($6 \text{ H}_2\text{O}$), deferasirox (DFS), deferiprone (DFPR), hidroxürea, verapamil, humán holotranszferrin, chetomin, colchicine, 2-deoxiglükóz, vinblasztin, MTT és szulfurodamin B a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MI) kerültek beszerzésre.

A vas-klorid, kobalt-klorid, transzferrin, zoledronsav MTT, szulfurodamin B és ciszplatin vizes oldatát használtuk, míg a többi por alapú vegyületet DMSO-ban oldottuk.

4.2 Sejtek

Vizsgálatainkhoz humán tumorsejt kultúrákat használtunk, illetve belőlük újakat hoztunk létre. NSCLC sejtvonalak közül K-Ras G12C mutációt hordozó H358 és G12S mutációt hordozó A549, míg vad típusú K-Ras fehérjét expresszáló sejtvonalak közül H1650, H1975 és LCLC-103H sejtvonalakat használtunk (a különböző EGFR státusz szerepének vizsgálata végett rendre EGFR 19-es exon delécióját (dele746-A750) hordozó, EGFR-TKI rezisztenciát okozó (T790M) és aktiváló (L858R) mutációval rendelkező, illetve vad típusú sejtek). A hipoxia vizsgálatokban A2058 malignus melanóma sejtvonal *in vivo* májmetasztázisra szelektált HT-168-M1 változata, HT-1080 humán fibroszarkóma, HT-25 és HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma, és PE/CA PJ15 fej-nyaki laphámrák sejtvonalakat használtunk. A HT-168-M1 és a HT-29 sejtvonalakból HIF-1 α csendesítéssel hoztunk létre újabb származtatott sejtvonalakat. Ehhez HIF-1 α specifikus shRNS-t (gene ID 3091) használtunk, MegaTran 1.0 transzfekciós reagenssel (OriGene, Rockville, MD), a gyártó útmutatása alapján (Tátraí Enikő munkája). A sikeres transzfekciót puromycin szelekcióval válogattuk, a géncsökkentést western blottal igazoltuk. PE/CA PJ15 sejteinket IMDM médiumban (Lonza, Basel, CH), a többi sejtet RPMI-1640 médiumban (Sigma) tartottuk és szaporítottuk, 10% FBS (embrionális marha szérum, Sigma) és 50 egység/ml Penicillin/Streptomycin törzsoldat (Sigma) hozzáadásával.

A multidrog-rezisztencia vizsgálatokban MES-SA humán uterin szarkóma, és a belőle származó MES-SA/DX5 doxorubicin-szelektált sejtvonalat, valamint A431 nem-melanóma bőrrák sejtvonalat használtuk. A parentális MES-SA és A431 sejtekből lentivirális transzdukcióval ABCB1-et stabilan expresszáló MES-SA/B1 és A431/B1 sejtvonalat hoztunk létre (Német Katalin és Kucsma Nóra munkája). A fluoreszcens MES-SA mCherry és MES-SA/B1 mOrange sejtvonalak előállítása további transzdukcióval, pRRL-EF1 plazmid segítségével történt (Kucsma Nóra munkája). shRNS technológiával, MISSION® TRC2 pLKO.5-puro vektor plazmid (Sigma) segítségével a MES-SA és MES-SA/B1 sejtekben HIF-1 α csendesítéssel hoztunk létre új sejtvonalakat a molekuláris hatások tisztázására. A sikeres csendesítést ebben az esetben is puromycin szelekció, valamint western blot követte. Emellett vizsgálatainkat kiegészítettük a korábban már leírt, ABCB1-et (hosszan tartó Colchicine szelekció hatására) különböző mértékben kifejező, KB-3-1, KB-8, KB-8-5 illetve KB-8-5-11 humán méhnyak adenokarcinóma sejtvonalakon végzett mérésekkel. A MES-SA és a KB sejtvonal-családok sejtjeit DMEM tápoldatban (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) tartottuk és szaporítottuk, 10% FBS (Thermo) 50 egység/ml Penicillin/Streptomycin (Merck KGaA, Dramstadt, Németország) törzsoldat, valamint 5mmol/L L-glutamin (Thermo) hozzáadásával.

A sejtek beszerzése az ATCC gyűjteményéből (H358, A549, H1650, H1975, A2058, HT1080, HT29, MES-SA, MES-SA/DX5, A431), a DSMZ gyűjteményéből (LCLC-103H), Prof. Tímár József ajándékaaként (HT-25), illetve Prof. Michael M. Gottesman felajánlásaként (KB-3-1, KB-8, KB-8-5, KB-8-5-11) történt. A sejtek a kísérletek idején sosem voltak 30 passzási ciklus, vagy 3 hónap kultúrában tartott idő felett. Kultúráink fertőzésektől mentesek voltak, mycoplasma mentességüket minden kísérletbe való bevonás előtt MycoAlert mycoplasma detektáló kit (Lonza) segítségével ellenőriztük. Az ABCB1-kifejeződést rendszeresen ellenőriztük áramlási citometria alapú Calcein-AM vizsgálat segítségével. A sejtek expresszió alapján történő további válogatása Calcein-AM, MRK-16 P-glycoprotein elleni antitestes jelölés, vagy a fluoreszcens transzdukció után BD FACS Aria fluoreszcens sejtszorter segítségével történt.

4.3 Hipoxia kezelés

A sejtek hipoxiás környezetét egy hipoxiás kamra (Billups-Rothenberg, San Diego, CA) használatával állítottuk elő, melyben túlnyomással csökkentett oxigéntartalmú (5%, 1%) levegőt juttattunk a sejtekhez. A kamrát 37°C-os inkubátorban tartottuk a kísérlet ideje alatt. Emellett oxigén szenzorral rendelkező inkubátor segítségével, N₂ gáz segítségével szorítottuk ki az oxigént, így érve el a kívánt tenziót. A kamra vagy inkubátor nyitását követően a mintákat jégen tárolva, legkésőbb 5 percen belül feldolgoztuk (Western Blot, RT-PCR), a reoxigenizáció viszonylag gyors hatását megelőzve.

4.4 Sejtproliferációs kísérletek

Sejtvonaltól függő állandó értékű (1000-5000 db) sejtszámot tettünk 96-lyukú lemezek egyes kamráiba, szokásos tápoldatukban. A sejtek letapadását követően másnap a kezelőszerek különböző koncentrációjával kezeltük a sejteket. Az NSCLC sejtek esetében 48 óra inkubációs idő után MTT esszében mértük meg a sejtek életképességét. A hipoxiás kísérleteknél (72 órás inkubációt követően) Sulphorodamine B (SRB) tesztet alkalmaztunk. A P-glycoproteinnel kapcsolatos méréseinkben szintén 72 óra elteltével, MTT esszével mértük a sejt kultúrákat. A gyógyszer kombinációs kísérletekben (Tóth Szilárd munkája) 384-lyukú lemezekre tettük ki a sejteket (2500 sejt 20 µl tápoldatban), majd másnap még 20-20 µl került a két vizsgált hatóanyag különböző töménységű oldataiból a kamrákba. A teljes pipettázási folyamatot egy Hamilton Starlet automata pipettázórobot végezte. A lemezeket 6 napig követtük, 24 óránként leolvasva a különböző csatornák fluoreszcencia-értékeit (mOrange: excitáció 545nm / emisszió 567nm; mCherry: excitáció 585nm / emisszió 610nm), melyek az élő sejtek számával egyenesen arányosak. A két vegyület monoterápiás alkalmazásaiból határoztuk meg a vegyületre és sejtre jellemző GI₅₀ értékeket, majd ezeket felhasználva a kombinációs kezelések eredményeit izobologram segítségével ábrázoltuk. Kombinációs index (CI) kiszámításával jellemeztük a vegyületeket. Additív hatás esetén $0,85 < CI < 1,2$ értéket kaptunk, szinergisztikus hatás esetén $CI < 0,85$, erős szinergisztikus hatás esetén $CI < 0,7$. Ugyanakkor $CI > 1,2$ illetve $CI > 1,45$ értékek rendre antagonisztikus, illetve erős antagonisztikus hatást jeleztek. A módszer részletes leírása Chou és mtsai közleményében szerepel¹³⁴.

Az SRB teszt esetében az inkubációs időt követően 10% triklórecetsavval fixáltuk a sejteket 60 percen keresztül, majd mosást követően a fehérjéket 0,4%-os Szulfuródamin-B oldattal festettük 15 percig. Újabb mosások (1% ecetsavval) után a fehérjékhez kötődött festéket 10mM-os TRIS oldatban oldottuk fel, és 570 nm-nél mért abszorbancia értékeket határoztunk meg. Az MTT teszt esetében a kezelő folyadék eltávolítása után a sejteket 0,5mg/ml koncentrációjú (3(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) oldatot mértünk, majd 37°C-os inkubátorban 2-3 órán keresztül hagytuk a lemezt. Az élő sejtek az MTT formazánná való átalakításával kolorimetriáisan mérhető kristályok képződését idézik elő. Az oldat eltávolítása után a sejtekre 1:9 arányú 2-propanol:1N HCl elegyét mérjük (100 µl kamránként), ezzel feloldva a formazán kristályokat. A reakciót 570 nm-es hullámhosszon végzett abszorbancia méréssel számszerűsítettük. A lemezek leolvasását EnSpire multimód lemezolvasó készülékkel (PerkinElmer) végeztük. Az életképességi értékeket GraphPad Prism programcsomag segítségével dózis-hatás modellben vizsgáltuk, az illesztett normalizált görbék alapján határoztuk meg a sejtek 50%-ának pusztulásához vezető IC50 értékeket.

4.5 A sejtek ATP-mennyiségének meghatározása

Az MDR-szelektív folyamatok megértéséhez megmértük a kezeléseknél a sejtekben lévő ATP-szintre gyakorolt hatását. Ehhez az ATPLite (PerkinElmer) lumineszcens alapú ATP meghatározó kitet használtuk, a gyártó utasításait követve. Átlátszó aljú, fehér falú 96-lyukú lemez (PerkinElmer OptiPlate) kamráiba 2×10^4 sejtet tettem, majd a sejtek letapadását követően másnap különböző kezeléseket kaptak a sejtek. 4 órás kezelést követően a sejteket a kamrán belül lizáltuk, majd a szubsztrát (luciferin) hozzáadását követően az ATP bomlása és oxiluciferin képződése mellett lumineszcens jelet tudunk lemezolvasó segítségével érzékelni. Kezeletlen kontrollhoz viszonyítva adható meg a kezeléseknél ATP-szintekre gyakorolt relatív hatása.

4.6 Western blot kísérletek

A megfelelő biológiai kezeléseket követően a sejt kultúrákból fehérje lizátumot készítettünk. Ehhez a fehérje izoláló sejt lízis puffert (MLB-20-168, Merck) használtunk, melyhez minden esetben 10 µg/ml aprotinin és 10 µg/ml leupeptin proteínázgátlót kevertünk. A sejt kultúrát tartalmazó flaskákat jégen tartva eltávolítottuk a tápoldatot,

majd jéghideg PBS (foszfát pufferolt sóoldat) segítségével óvatosan lemostuk a maradék tápoldatot a sejtekről. Ezt követően az előkészített lízis puffert a sejtekre tettük, és sejtkaparó segítségével a sejteket eltávolítottuk a flaska felületéről. Ultrahangos szonikátorral végzett rövid homogenizálást követően a fehérje-lizátumot 1:1 arányban hígítottuk Laemmli fehérje pufferben, és a mintákat felhasználásig (legfeljebb 14 napig) -80°C -on tároltuk.

Az NSCLC sejtkultúrák esetében a különböző sejten belüli egységek frakcióinak szétválasztásához azonban centrifugálás-alapú szeparáló módszert kellett alkalmaznunk. Ezért ezeket a mintákat a jéghideg PBS mosást követően flaskánként 1ml jéghideg PBS oldat hozzáadásával, sejtkaparó segítségével távolítottuk el a műanyag felszínről. Ezután 5 perc, $300 \times \text{g}$ centrifugálás során leültettük a sejteket. A felülúszó eltávolítása után az első szeparáló pufferben (10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris (pH 7.4) MQ vízben oldva, proteáz inhibitorok hozzáadásával (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMSF és 2 mM DTT). A mintákat Potter-Elvehjem típusú homogenizátorban kézzel homogenizáltuk, 2,5-szeres mennyiséget adtunk hozzá az oldathoz a második szeparáló pufferből (525 mM mannitol, 175 mM sucrose, 12.5 mM Tris (pH 7.4), and 2.5 mM EDTA MQ vízben, a korábbival egyező proteináz tartalommal). A magi/mitokondriális frakció elkülönítésére először 15 percig $20\,000 \times \text{g}$, majd a felülúszóból membrán frakció leültetésére 60 percig $100\,000 \times \text{g}$ centrifugálást alkalmaztunk. Az organelláris és membrán frakciókat használtuk, 1:1 arányban hígítottuk Laemmli pufferben, és felhasználásig (legfeljebb 14 napig) -80°C -on tároltuk. A fehérjék bomlásának megakadályozása érdekében az egész szétválasztási folyamatot jégen, avagy 4°C -on végeztük.

A mintákból minden esetben Lowry által leírt módszer¹³⁵ segítségével határoztuk meg a fehérje koncentrációt, és számoltuk az egységes mintafelvitelhez szükséges térfogatokat. A mintákat fehérje mérettől függően 7,5-10%-os SDS-poliakrilamid gélben futtattuk, majd PVDF membránra lottoltuk át. Ehhez egy nedves elektroblot készüléket használtunk (Bio-Rad, Hercules, CA), a gyártó előírásai szerint.

Elsődleges antitestek: anti-K-Ras (ab55391, Abcam, Cambridge, MA; $2\mu\text{g}/\text{ml}$) anti-Na/K-ATPase (BML-SA247-0100, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY; $1\mu\text{g}/\text{ml}$), anti-Rho (-A, -B, -C) 55-ös klón (#17-294, Millipore; $3\mu\text{g}/\text{ml}$), anti-Rac1 (23A8 klón; $1\mu\text{g}/\text{ml}$), anti-cdc42 egér monoklonális antitest (#17-441, Millipore; $1\mu\text{g}/\text{ml}$), anti-HIF-

1 α nyúl monoklonális antitest (ab51608, Abcam; 2 μ g/ml), sejtciklus és sejtciklus-szabályozó minta kitek antitestjei (#9932 & #9870, Cell Signaling Technology Inc.; gyártó által javasolt hígítások). Anti-p53 antibody (#2524, Cell Signaling Technology; 2 μ g/ml). Anti- β -aktin (AC-15 klón, Sigma; 0,25 μ g/ml).

Torma-peroxidáz (HRP) konjugált másodlagos számár anti-egér és anti-nyúl IgG-t használtunk (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) melynek jelét enhanced WesternBright kemilumineszcens rendszerrel (Advansta, Menlo Park, CA) tettük láthatóvá.

A fehérjesávok kvantifikálását és kiértékelését GelAnalyzer 2010a programmal (Lazar Software, Debrecen, Hungary) végeztük. A fehérjék mennyisége Na/K ATPáz, illetve β -aktin jelre, mint belső kontrollra normalva került elemzésre.

4.7 RNS expresszió meghatározása

A szükséges RNS expressziós vizsgálatokat minden esetben valós idejű kvantitatív PCR (RT-PCT) segítségével végeztük. Ehhez a biológiai mintákat 6-lyukú sejttenyésztő lemez kamráiban növesztettük, 0,5-1 * 10⁶ maximális sejtszámot használva. Minden esetben kerültük a teljesen összefüggő sejtréteg kialakulását, hiszen ezt követően a sejtek viselkedése, génexpressziója erősen változik. A kezelési idő végén a mintákról a tápoldatot eltávolítottuk, majd egy gyors PBS-sel történő mosást követően a sejteket 350 μ l TRIzol reagens (Life technologies, Carlsbad, CA) segítségével oldatba vittük, egyben megóvva azok RNS-tartalmát. A mintákból RNEasy RNS izoláló kit segítségével (ZYMO Research) a teljes sejtes RNS mennyiséget tisztítottuk, és RNáz mentes vízben eluáltuk. Ezekben az RNS-mintákban spektrofotométer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Waltham, MA) segítségével RNS koncentrációt mértünk, majd minden friss mintából 600 ng RNS templát felhasználásával, AMV reverz transzkripció kit segítségével (Promega) 20 μ l térfogatban cDNS átírást végeztünk. Az egyes RNS-ek mennyiségi meghatározásához Taqman próbákat (primer ID: HIF-1 α (Hs00936366_m1), RHOA (Hs00236938_m1), RAC1 (Hs01902432_s1), CDC42 (Hs00741586_mH), β -actin (FAM/MGB 4333762), TFR1 (Hs00951083_m1), illetve Taqman 2x Gene expression master mix reagenst (Life Technologies) használtunk. Belső kontrollként a riboszómális 60s fehérjét kódoló RPLP0, illetve β -aktin mRNS expresszióját használtuk. Az RT-PCR reakciót minden esetben 10 μ l térfogatban végeztük (Step One Plus RT-PCR, Applied Biosystems). Az

expressziós értékek meghatározásához a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszert használtuk, a belső kontrollhoz viszonyított relatív értékekkel számoltunk.

4.8 Áramlási citometriás mérések

A vizsgálatok során három alkalmazásban használtunk áramlási citometriás méréseket a sejtek egyedi jellemzésére: Sejtciklus vizsgálatokban, apoptózis vizsgálatokban, illetve az ABCB1-aktivitás jellemzésére Calcein-AM vizsgálatokban. Minden esetben a kezelést követően a letapadó sejtek mosásával (PBS) és felszedésével (0,1% Tripszin PBS-ben oldva) kezdődött a minta készítés. Ezt követően sejtek számoltunk, és egy újabb PBS-es hígítás, és centrifugálás (300 x g, 5 perc) után a felülúszóval a maradék tripszin eltávolítására került sor. Ezt követően mintánként 20 μ l térfogatú PBS-ben $5 \cdot 10^5$ sejtet készítettünk elő.

A sejtciklus elemzéshez Propidium Jodid (PI) és 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) kettős jelölést alkalmaztunk. A mintavétel előtt 30 perccel a sejt tápoldathoz adtunk 10 μ M koncentrációban BrdU-t, melyet a DNS szintézist folytató sejtek inkorporáltak. A mintákat 1 ml 70%-os etanollal fixáltuk: hozzáadáskor folyamatos vortexelés mellett, majd -20°C-on a következő napig inkubálva. PBS-es mosást követően a sejtek feltárását 1 ml 2M HCl oldattal végeztük, 0,5% Triton X-100 jelenlétében, 30 percig. A feltárás után három mosási ciklust követően 10x hígítású anti-BrdU reagenssel inkubáltuk a mintákat (50 μ l PBS-ben, mely 0,05% Tween 20-at, és 1% BSA-t is tartalmazott. A jelölés után két mosási ciklus, majd a másodlagos jelölés következett: PBS-ben oldott anti-egér IgG-ALEXA-488 antitesttel, 45 percig, sötétben. Újabb mosási lépés után a sejteket 0,5ml PBS-ben vettük fel, mely 10 μ g/ml koncentrációban propidium-jodidot, és 20 μ g/ml koncentrációban RNáz A-t tartalmazott. Vortexes keverés és 30 perc inkubálás után mértük a mintákat.

Az apoptózis jellemzéséhez az Annexin V – Propidium Iodide Apoptosis kitet használtuk (Dojindo), a gyártó utasításai szerint jelölve a sejteket. A mintákat jelölést követően 60 percen belül megmértük a sejthalalozás előrehaladását elkerülendő. Az NSCLC sejtek esetén Propidium-jodid jelölést, és szub-G1 frakció elemzést használtunk.

A Calcein-AM esszében az ABCB1 transzporter funkciójának érzékeny elemzése vált lehetségessé¹³⁶. A módszer lényege, hogy az élő sejtekbe kerülő Calcein-AM (calcein-acetoxi-metilészter) nem fluoreszcens molekula, mely a sejten belüli észterázok

aktivitásának köszönhetően hasad, és a keletkező calcein molekulák fluoreszcenciája detektálható. Mivel a Calcein-AM molekula szubsztrátja a transzporternek, az ABCB1-et expresszáló sejtekből kikerül, megakadályozva így a fluoreszcencia megjelenését. A fluoreszcens jel csökkenése korrelál a P-gp aktivitással, így használható a P-gp funkciójának számszerűsítésére. A reakciót 37°C-os vízfürdőben, fénytől védve végeztük. A mintákhoz egyesével 20 µl PBS-t, vagy 40 µM verapamil tartalmú PBS-t adtunk, a nem gátolt, illetve gátolt P-gp funkció eléréséhez. Vortexelés és 5 perc inkubáció után 20 µl 0,75µM-os Calcein-AM oldatot adtunk a mintákhoz, és vortexelés után 10 percig folytattuk a reakciót 37°C-on. Az inkubáció végén a reakció leállítására a mintákhoz 700 µl jéghideg PBS-t adtunk, mely 1µg/ml propidium-jodidot, és 0,5% BSA-t tartalmazott, a mintát pedig jégen tároltuk mérésig. A mérések 45 percen belül történtek a sejtek állapotának megőrzése érdekében.

Az áramlási citometriás mérésekben az FSC és SSC attribútumok alapján különítettük el a sejteket a törmeléktől, és PI jel alapján választottuk szét az élő és holt sejteket. A méréseket Attune és Attune NxT áramlási citométerrel (Life Technologies) végeztük.

4.9 ATPáz aktivitás mérések

Az ABCB1 transzporter aktivitása közben a szubsztrát transzmembrán transzportját aktív folyamatként, ATP hidrolízise mellett valósul meg. Ez a hidrolizáló aktivitás mérhető sejtmentes rendszerben, melyben a hidrolízis során felszabaduló szervetlen foszfátgyökök detektálhatók, és mennyiségük kolorimetriásan mérhető¹³⁷. Méréseinkben *Spodoptera frugiperda* (Sf9) rovar sejtvonalon termelt, ABCB1-et kifejező membránt használtunk. A reakció során az elegyhez adott ATP átalakulását detektáltuk különböző molekulák hozzáadása mellett. Az irodalomból jól ismert a verapamil szubsztrátként való viselkedése, melyet ezen méréskor pozitív kontrollként használtunk. Az NSC297366, illetve a 8-hidroxikinolin vasiont tartalmazó komplexe 1:2 fémion:ligand arány mellett készült. A méréseket Telbisz Ágnes és Gera Melinda kollégáim végezték.

4.10 dNTP szintek meghatározása

A sejtek 24 órás kezelését (DMSO kontroll; 4 µM NSC297; 2mM hidroxiurea) követően gyors PBS-es mosás után a dNTP-szintek meghatározására a Wilson és munkatársai¹³⁸ által leírt protokoll módosított változatát¹³⁹ használtuk. A sejteket

tripszinezéssel eltávolítottuk a műanyag felszínről, majd 10ml-re egészítettük jéghideg PBS hozzáadásával. A szuszpenzióból 500 µl mennyiséget sejtszám meghatározásra használtunk fel, míg a minta fennmaradó részét 3 000 x g erővel 10 percig 4°C-on centrifugáltuk. A sejtes pelletet 500 µl 60% metanolban szuszpendáltuk, másnapig -20°C-on állni hagytuk, majd 3 percre 95°C-ra helyeztük. Az így feltárt mintákat 4°C-on 16 000 x g erővel 5 percig centrifugáltuk, és a felülúszót új centrifugacsőbe gyűjtöttük. Innen a folyadékot vákuumcentrifuga segítségével (45°C-on) beszárítottuk, és a keletkező pelletet 50 µl nukleázmentes vízben oldottuk, és mérésig -20°C-on tároltuk. A sejtek dNTP-készletét fluoreszcens polimeráz-alapú esszében mérte Szabó Judit Eszter kollégám.

4.11 Videomikroszkópia

A videomikroszkópiás mérések protokollját korábbi irodalmi leírások szerint (PMID: 10701529, PMID:23973668) végeztük. A mérésekhez a sejteket 24-lyukú lemez középső 8 kamrájába helyeztük tápoldatban. A sejtek letapadását követően a tápoldatot CO₂-szintre nem érzékeny tápoldatra cseréltük (Gibco), 10% FBS és 4mM L-glutamin jelenlétében. A párolgás lassítása érdekében a lemez többi kamráját is tápoldattal töltöttük fel. A sejteket egy egyedi építésű, inverz fázis kontraszt mikroszkóp köré épült inkubátorba (World precision Instruments, Sarasota, FL) helyeztük. A kamrákban 3, egymással nem átfedő látótérrel készült mikroszkópos felvétel minden 5 percben. Az első 24 óra után a hipoxiás minták esetében az oxigén tenzióját lecsökkentettük 5%-ra, illetve 1%-ra, és további 72 órán keresztül készült a látóterekről a képsorozat. A munkacsoport által fejlesztett kiértékelő szoftver segítségével a vizsgálati idő alatt megtett migrációs távolságot manuálisan számítottuk minden sejtvonal esetében. Minden kísérletet két független ismétlésben végzett Garay Tamás Márton kollégám.

4.12 Teljes röntgen fluoreszcencia mérések

A vaskomplex akkumulációs kísérletben a sejteket 4 órán keresztül 5 µM kelátor: vas-klorid 2:1 arányú komplexével kezeltük. A vas depléciós kísérletbe vont sejtek intracelluláris tartalékait 25 µM holotranszferrin hozzáadásával 4 órán keresztül vassal töltöttük fel (37°C), majd 8 órán keresztül szérumentes tápoldatban, avagy 5 µM kelátor: vas-klorid 2:1 arányú komplexével kiegészített tápoldatban tartottuk. A kezelések

végén a mintákat feltripszineztek, tápoldattal, majd PBS-sel mostuk, centrifugálási lépések (300 x g, 5 perc, 4°C) segítségével. A minták feltárása korábban már leírt módon¹⁴⁰, 24 órás savas emésztéssel (20 µl 30% H₂O₂; 80 µl 65% HNO₃, 10 µl 15 µg/ml Gallium) történt. A feltárt oldatból 2 µl-t kvarclemeszre szárítva, a teljes röntgen fluoreszcencia méréseket Atomika 8030C (atomika Instruments GmbH) műszerrel végezte Gaál Anikó, Pape Veronika és Szoboszlai Norbert, kutatópartnerünk bécsi laboratóriumában. A vasra jellemző K α értéket 6,403keV-ra állítottuk. Az így nyert mintákból a sejtekre vonatkozó intracelluláris vas mennyiségét tudtuk meghatározni, Gallium belső kontroll, és sejtszám meghatározás segítségével.

4.13 Tömegspektrometriás mérések

A sejten belüli vasmennyiség változások mellett nyomon kívántuk követni a sejten található NSC297366 mennyiséget is, P-gp aktivitás függvényében. Ehhez 6-lyukú lemez kamráiban 10⁶ sejt kitapadását követően 4 órás kezelésben 5 µM kelátor: vas-klorid 2:1 arányú komplexét alkalmaztuk 37°C-on. A tripszinezést és 4°C-on történő PBS-es mosást követően a sejtpeleket 50 µl Acetonitril (Sigma) segítségével dezintegráltuk. Centrifugálás és hígítás (H₂O, 10x) után a mintákat Sciex 3200 Qtrap hybrid tandem tömegspektrométerrel (Applied Biosystems) összeépített HPLC rendszerben (series 200, PerkinElmer) mértük. A sejtszám, illetve a mintákban található fenilalanin mennyisége szolgált belső kontrollként a mérésekhez. A méréseket Dr. Szabó Pál vezetésével végeztük.

4.14 Sejtmigrációs kísérletek

Módosított 48-lyukú Boyden-kamra segítségével, polikarbonát 8 µm pórusméretű membrán (Whatman, Piscataway, NJ) használatával végeztük a sejtmigrációra vonatkozó kísérleteinket. A kamra felső részébe 2 * 10⁴ feltripszinezett sejtet juttattunk. Az alsó részbe szérumentes médiumot tettünk, 100 µg/ml fibronectin (Sigma) hozzáadásával. A sejteket 6-20 órás migrációs idő után vizsgáltuk. A membrán felső felületét PBS-sel mosvaq eltávolítottuk a nem migráló sejteket. A migrált sejteket metanolos fixálást követően toluidinkék festéssel jelöltük, és mikroszkóp segítségével számoltuk. A migrált sejteket 20x nagyítás mellett, négyzethálót tartalmazó okulár használatával számoltuk, kamránként öt véletlenszerűen kiválasztott mező esetében. Hat párhuzamos kamra

értékeinek átlagát és szórását elemeztük minden mintánál. A méréseket Kenessey István és Tátrai Enikő végezték.

4.15 *In vivo* tumornövekedés és metasztázis modellek

Az állatkísérletes modellek tervezése és kivitelezése az Országos Onkológiai Intézet állatházában a munkahelyi állatvédelmi bizottság (MÁB) tudomásával és engedélyével, az Állatkísérletes Tudományos és Etikai Tanács (ÁTET) engedélyével történt, a hatályos állatvédelmi előírásoknak megfelelően. (Engedély az állattartásra és tenyésztésre: PEI/001/1738-3/2015. Engedély az állatkísérletre: PEI/001/2574-6/2015) 8 hetes hím SCID (CB17/Icr-Prkdc^{scid}) egereket használtunk.

A hipoxiás állapot *in vivo* hatásainak vizsgálatára HT-168-M1 melanómasejtek lépbe való oltását követő májkolonizációs modellt, valamint szubkután nőtt HT29 szövetdarab ortotopikus (bélfalra történő) rögzítését követő tüdő/máj metasztázis modellt használtunk. Az állatok három kezelési csoportba lettek osztva, kontroll (fiziológiás sóoldat injekció hetente kétszer intraperitonealisan), hipoxiát előidéző (260mg/l CoCl₂ 4 héten át ivóvízbe keverve, valamint fiziológiás sóoldat hetente kétszer intraperitonealisan), illetve hif-1 α aktivitásban gátolt (1mg/ttkg chetomin, hetente kétszer intraperitonealisan) kezeléssel. Az állatok máját és tüdejét formalinban fixáltuk, majd sztereomikroszkóp alatt a makrometasztázisokat számoltuk. A kontroll és a hipoxia kezelési protokollt megismételtük HT-168-M1 modell shHIF-1 α géncsendesített változatán is, felmérve a kapott hatás HIF-1 α függését.

Az NSCLC sejtmmodellek (LCLC-103H, A549, H1650) vizsgálatában altatott állatok háti tájékon szubkután beültetett 16mm³-nyi szövetdarabokból kiinduló tumorok növekedését vizsgáltuk. A műtét után 21 nappal hat, véletlenszerűen kiválasztott csoportba osztottuk az állatokat, és ciszplatin (0,2mg/ttkg, intraperitonealisan, hetente) terápiával, vagy anélkül vizsgáltuk a tumorokat a kontroll (fiziológiás sóoldat intraperitonealisan, hetente), humán dózisú zoledronsav (50 μ g/ttkg), és nagy dózisú zoledronsav (500 μ g/ttkg) hasonlóan kezelt csoportjaiban. 41 nap után az állatokat izoflurán gőz segítségével túlaltattuk, termináltuk. A tumorok tömegét mértük, valamint formalinban fixáltuk őket további vizsgálatokhoz.

4.16 Immunhisztokémiai vizsgálatok:

A formalin-fixált tumorok beágyazása, metszése, deparaffinálása után a szövettani metszeteket immunjelölésnek vetettük alá. A tumorokban lévő erek jelölésére anti-humán simaizom aktin antitest (1:100 hígítás) jelölés (Agilent, Santa Clara, CA) felhasználásával határoztuk meg az NSCLC mintákban az izmos fallal rendelkező erek számát. Mintánként 5 látóteret értékeltünk, 200-szoros teljes nagyítás mellett. A mintákat Derecskei Katalin készítette, és Kenessey István értékelte.

4.17 Statisztikai analízis:

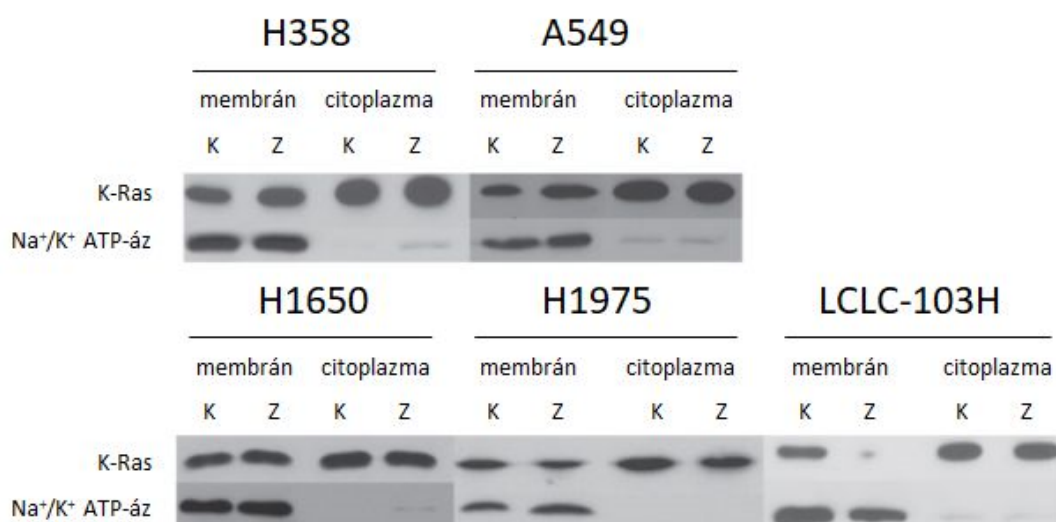
A citotoxicitási adatokhoz az abszorbancia-adatok és a koncentrációk ismeretében dózis-hatás görbéket készítettünk, melyeket iterációs modellekkel pontosítva a sejtekre és a vegyületekre jellemző IC_{50} értékeket határoztunk meg. A különböző csoportok mérési adatainak összehasonlítása két csoport esetén Student-féle t-teszt segítségével történt, míg kettőnél több csoport összehasonlításához varianciaanalízist (ANOVA) használtunk, post hoc Scheffé-teszt alkalmazásával. A regressziós görbéket Graphpad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) programmal állítottuk elő. A vegyületek kölcsönhatásának vizsgálatában az additív izobologramtól való eltérést (CI) a korábban leírt¹³⁴ módszerrel végeztük, míg a statisztikai számításokhoz Statistica 13 programcsomagot használtunk (Statsoft, Tulsa, OK). A dolgozatban szereplő vizsgálatokban a szignifikancia szintek egységesen a következők: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

5 EREDMÉNYEK

5.1 K-Ras mutációk hatása a zoledronsav terápia hatékonyságára

5.1.1 A zoledronsav más hatást fejt ki a vad típusú és a mutáns K-Ras működésére NSCLC sejtekben

Kísérleteinkben kontroll és zoledronsavval kezelt (25 μ M, 24 óra) NSCLC sejtekből készítettünk membrán-asszociált és intracelluláris frakciókat, melyekben Western blot segítségével határoztuk meg a K-Ras fehérje mennyiségét. Eredményeink azt mutatták, hogy a K-Ras G12C pontmutációt hordozó H358 és K-Ras G12S mutációt hordozó A549 sejtekben a membrán-asszociált fehérje mennyisége nem csökken (7. ábra:). Ugyanakkor azonos körülmények között a zoledronsavval történő kezelés a vad típusú K-Rast hordozó LCLC-103H sejtekben hatékonyan gátolta a membránasszociált fehérje megjelenését. Az ugyancsak vad típusú K-Ras fehérjével, azonban EGFR mutációkkal rendelkező H1975 sejtekben enyhébb (50%-os) gátlás volt megfigyelhető. Meglepő módon a K-Ras vad típusú, és EGFR deléciót hordozó H1650 sejtek nem mutattak érzékenységet a K-Ras transzlokációt illetően.



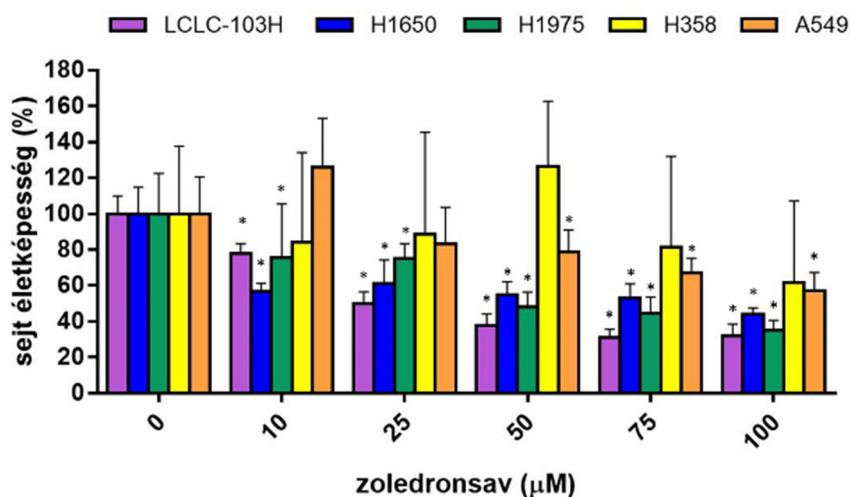
7. ábra: A zoledronsav kezelés hatása a K-Ras lokalizációra.

A zoledronsav (Z) kezelés hatását Western blottal vizsgáltuk különböző K-Ras és EGFR genotípusú humán NSCLC sejtekben kontroll (K) mintákhoz képest. A sejten belüli frakciókat ultracentrifugálással választottuk szét. A K-Ras mutációt hordozó sejtekben

nem változik a membrán-asszociált K-Ras mennyisége. A dupla vad típusú LCLC-103H esetében gyakorlatilag teljes, míg a H1975 K-Ras vad típusú, EGFR rezisztencia mutációt hordozó NSCLC modellben mérsékelt gátlást tapasztaltunk. A H1650 sejten nem volt mérhető hatása a zoledronsav kezelésnek. Endogén kontrollként Na/K ATPáz expressziót vizsgáltunk.

5.1.2 A zoledronsavval szemben ellenállóbbak a K-Ras G12C mutációt hordozó NSCLC tumorsejtek *in vitro*.

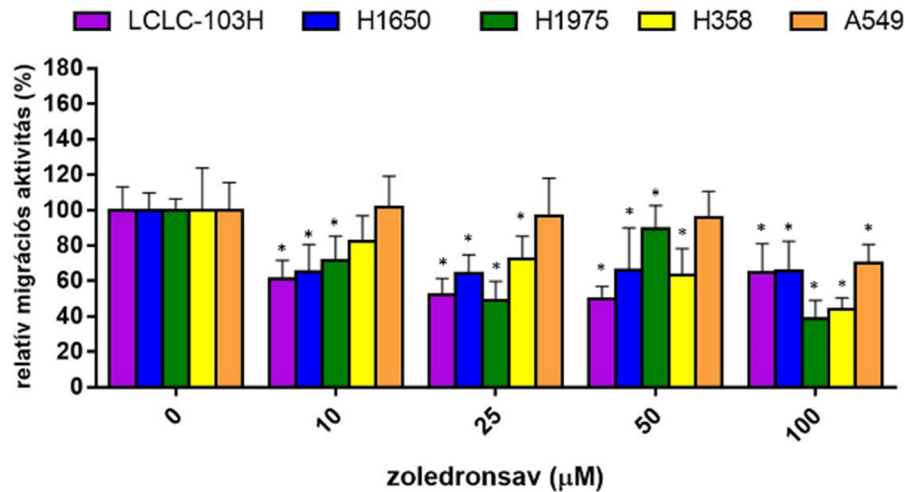
A sejtek *in vitro* vizsgálata során azt találtuk, hogy míg a K-ras vad típusú sejtvonalak már 10 μM zoledronsav koncentráció kezelésnél csökkent proliferációs aktivitást mutattak 48 óra inkubációt követően, addig a K-Ras mutáns H358 és A549 sejtek esetében az *in vitro* gátláshoz 100 μM bizonyult csak hatékonynak, ezek a sejtek tehát *in vitro* rezisztenciát mutatnak a zoledronsav terápiával szemben (9. ábra:).



8. ábra: A zoledronsav-kezelés *in vitro* hatása NSCLC modellek proliferációjára

A K-Ras vad típusú LCLC-103H, H1650 és H1975 sejteken 10 μM koncentráció is proliferációs aktivitás csökkenéséhez vezet, a K-Ras mutáns H358 és A549 esetén 100 μM volt szükséges a hatékony gátláshoz. 48 órás proliferációs tesztben, MTT teszttel számszerűsített proliferációs értékek, átlag ($n=3$) \pm SD ábrázolásban. *: $p < 0,05$.

A sejtek migrációs képességére általánosan szuppresszív hatást fejtett ki a zoledronsav kezelés, bár a hatékony koncentráció sejtmodellenként eltérőnek mutatkozott. Ugyanakkor nem váltak el K-Ras státusz szerint a sejtek migrációs aktivitásai (9. ábra).



9. ábra: A zoledronsav-kezelés *in vitro* hatásai NSCLC modelleken.

A K-Ras vad típusú LCLC-103H, H1650 és H1975 sejteken 10 µM koncentráció is proliferációs, illetve migrációs aktivitás csökkenéséhez vezet, a K-Ras mutáns A549 esetén 100 µM volt szükséges a hatékony gátláshoz. Boyden-kamrában végzett 6 órás migrációs kísérletben mért migrációs értékek. (átlag ± SD, 3 párhuzamos kísérletben, *: $p < 0,05$).

Az *in vitro* vizsgálatok során elvégeztük a zoledronsav kezelés apoptotikus hatásának vizsgálatát (2. táblázat), valamint a klinikai kombinált terápiát modellezendő ciszplatin-zoledronsav kombináció proliferációt gátló t (3. táblázat) is megmértük. A sejthalálózást követő vizsgálatban a zoledronsav egyedül a vad típusú LCLC-103H esetében fejtett ki számottevő apoptotikus hatást, 25 µM koncentráció felett. A ciszplatin citotoxikus hatását kombinációs terápiában hatékonyan potenciózza a zoledronsav a K-Ras vad típusú NSCLC sejtek esetében, míg K-ras mutáns sejtvonalak közül csak mérsékelt hatást vált ki H358 modellel, és nincs szinergisztikus hatása A549 sejtek esetén.

2. táblázat A zoledronsav apoptotikus hatása NSCLC sejteken

Apoptózis meghatározás 48 órás kezelést követően, propidium-jodid jelöléssel, áramlási citometriás mérésben, apoptotikus sejteket jelző szub-G1 frakció meghatározásának módszerével. Minden érték 3 független mérés átlag \pm SD értékét mutatja. *: $p < 0,05$.

Kezelés	Apoptotikus sejtek aránya (%)				
	LCLC-103H	H1650	H1975	A549	H358
Kontroll	1,06 \pm 0,4	6,33 \pm 0,4	1,61 \pm 0,4	6,04 \pm 1,7	2,42 \pm 1,2
25 μ M zoledronsav	4,68\pm0,2*	8,72 \pm 0,4	1,73 \pm 0,3	8,43 \pm 2,6	2,82 \pm 0,6
50 μ M zoledronsav	4,02\pm0,3*	7,19 \pm 0,2	2,94 \pm 0,1	10,6 \pm 2,5	4,77 \pm 1,5
100 μ M zoledronsav	9,89\pm1,2*	5,75 \pm 1,5	4,02\pm0,1*	10,01 \pm 7,0	6,11 \pm 3,3

3. táblázat A zoledronsav ciszplatin citotoxikus terápiát támogató hatása NSCLC sejteken

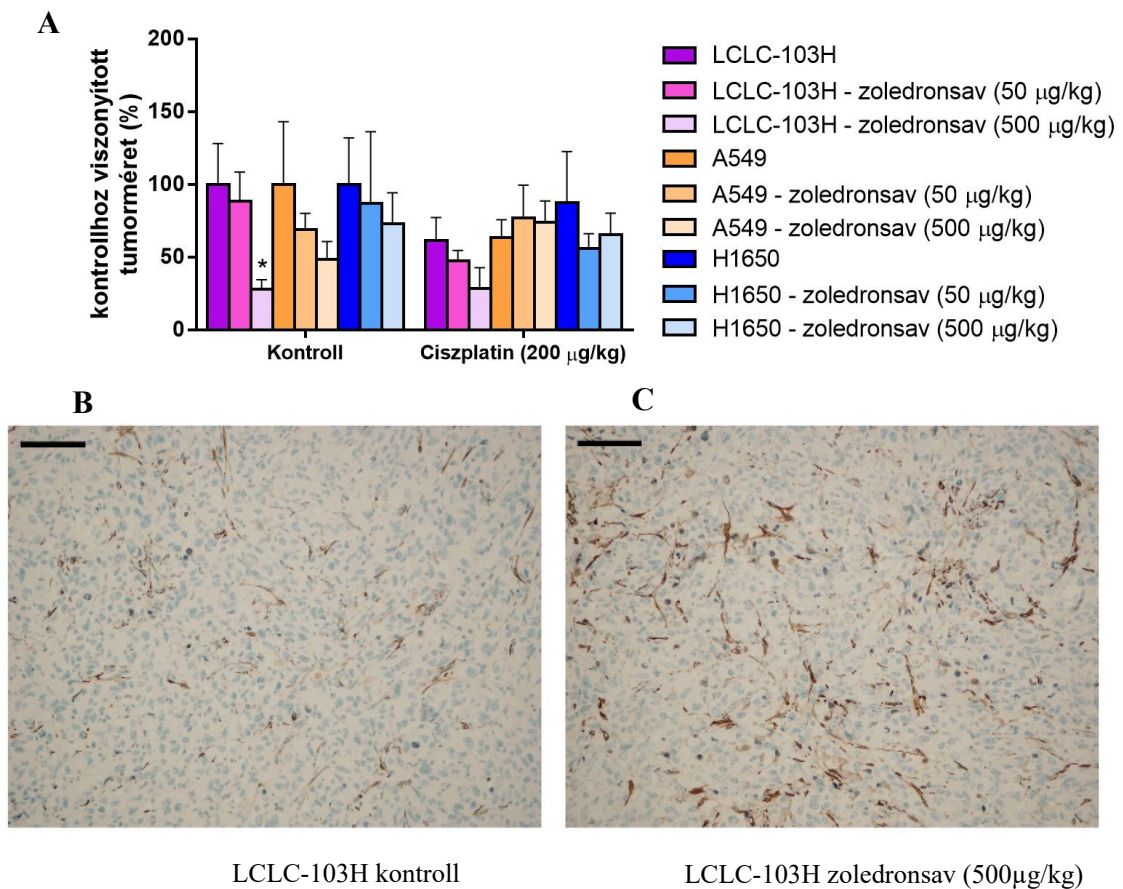
A ciszplatin toxicitásának (IC_{50} értékek, μ M, 48 h) alakulása zoledronsav jelenlétében és anélkül. Minden érték 3 független mérés átlag \pm SD értékét mutatja. *: $p < 0,05$.

Kezelés	IC_{50} értékek (μ M)				
	LCLC-103H	H1650	H1975	A549	H358
Kontroll	0,19 \pm 0,01	4,39 \pm 0,21	0,35 \pm 0,15	1,27 \pm 0,62	8,08 \pm 1,51
10 μ M zoledronsav	0,13\pm0,11*	1,62\pm0,4*	0,37 \pm 0,12	1,7 \pm 0,7	4,9\pm0,71*
25 μ M zoledronsav	0,007\pm0,003*	0,29\pm0,11*	0,15\pm0,07*	1,75 \pm 0,89	2,59\pm0,32*
50 μ M zoledronsav	<0,001*	0,26\pm0,12*	0,024\pm0,01*	0,89 \pm 0,43	1,27\pm0,26*

5.1.3 A K-Ras genotípus hatással van az NSCLC sejtek *in vivo* xenograftban történő növekedésére és beereződésére

Az *in vivo* tumor xenograft kísérletekben vizsgáltuk a tumorok növekedését, melyet a 21 napos kezelési időszak végén a tumor tömegével jellemeztünk. A dupla vad típusú LCLC-103H, K-Ras mutáns A549 és az EGFR rezisztenciát okozó mutációval bíró H1650 modell közül egyedül az LCLC-103H modell mutatott terápiás választ, magas dózisban (500 μ g/ttkg) alkalmazva. Bár az átlagos tumorméret trendje a H1650 és A549 esetében is látható, nem tapasztaltunk szignifikánsan kisebb tumorokat a kezelt csoportokban. A ciszplatin DNS-alkiláló terápiával kombináltan alkalmazva a

zoledronsavat azt láttuk, hogy az LCLC-103H modell esetén lassabb tumornövekedést tapasztaltunk a zoledronsav kezelés hatására, ám a kombináció nem képes szignifikánsan növelni a ciszplatin tumorelles hatását (10A ábra). A tumor szerkezeti vizsgálata azt is feltárta, hogy az LCLC-103H tumorokban (és csak ott) a zoledronsav kezelés hatására a tumoron belüli sűrűbb érhálózat megjelenését eredményezte, amely angiogén környezet kialakulására utal (10B-C ábra). Ezt immunhisztokémiai eljárással, simaizom-aktin (SMA) jelölésével vizsgáltuk. Az angiogén fenotípus kulcsfontosságú tényező lehet a tumor terápia szempontjából.



10. ábra: A zoledronsav *in vivo* hatása a tumornövekedésre és az angiogenezisre

Az *in vivo* kísérletben SCID egerek subcutan oltását követően 100 mm³ tumor térfogat esetén kezdtük az állatok hetente két alkalommal való kezelését. **A.** 21 nap elteltével a tumorok tömegét mértük (n=5, átlag ± SD értékek, Kruskal-Wallis teszt) **B-C.** A kontroll, és zoledronsav-kezelt tumorokból immunhisztokémiai módszerrel SMA jelöléssel (barna) az intratumorális ereződést vizsgáltuk. Derecskei Katalin és Kenessey István munkája.

5.2 A hipoxiás környezet, illetve a HIF-1 α jelátvitel szerepe a tumorok növekedésében, tumorsejtek mozgékonyágában, viselkedésében

5.2.1 A hipoxiás környezet a sejtek *in vitro* proliferációját és migrációs képességét sejtfüggő módon befolyásolja

Ahogy a 4. táblázat mutatja, a hipoxia (5%, illetve 1% O₂) változó hatást gyakorolt a sejtek proliferációjára 72 órás kezelésben. Több sejtmódelben egyáltalán nem változott a mért sejtmennyiség, míg a HT29 sejteknél dózisfüggő proliferáció csökkenést okozott a hipoxia. Meglepő módon a HT1080 sejtekben 5%-os oxigén tenzió mellett nőtt a proliferációs ráta, míg 1% oxigén mellett csökkent. Kijelenthető tehát, hogy nincs univerzális sejtosztódásra gyakorolt hatása az oxigénszint csökkenésének.

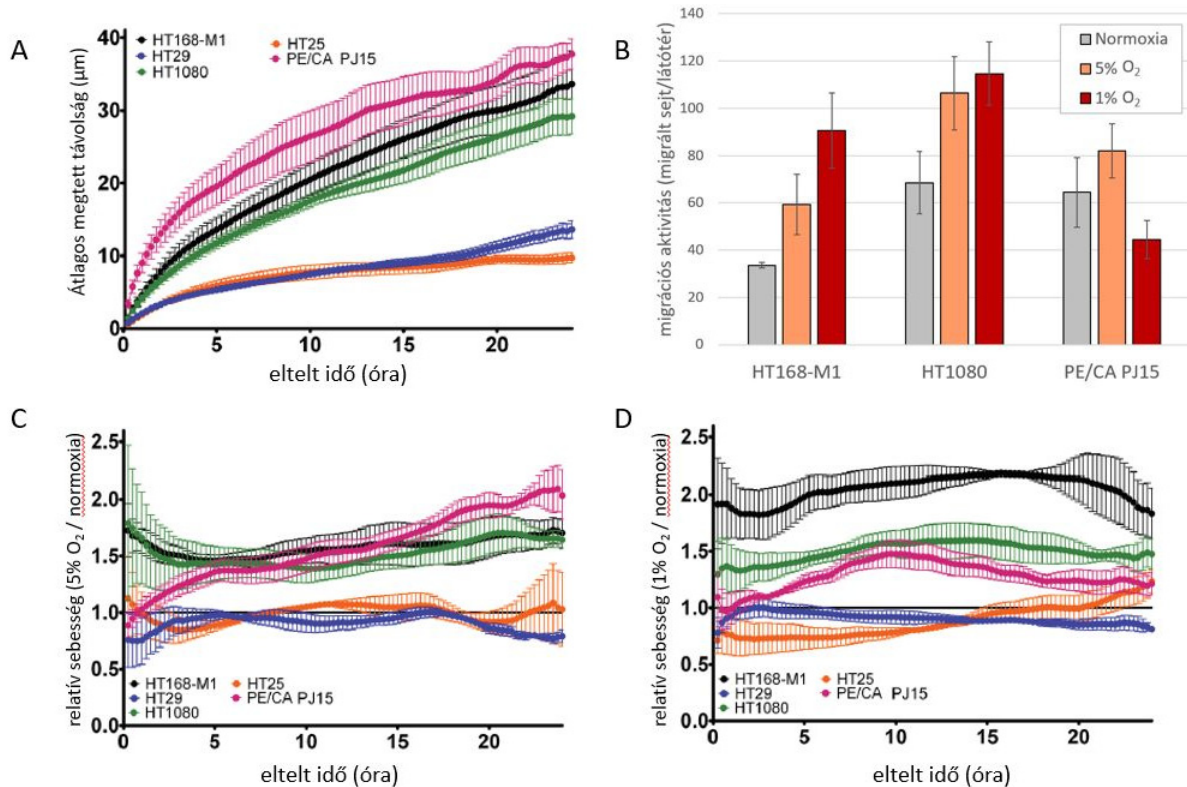
4. táblázat Hipoxia hatása humán tumorsejt kultúrák proliferációjára

A 72 órás hipoxiás kezelést 5% és 1% oxigénszint mellett végeztük, a kísérlet végén SRB teszttel határoztuk meg a sejttömeg relatív alakulását. Az értékek a normoxiás (21% O₂) mérésekhez (100%) viszonyított adatokból, három független kísérletben 6-6 kamra adatait dolgozzák fel (átlag \pm SD; Student t-teszt. *: $p < 0,05$)

sejtvonal	Relatív sejtszám normoxiás kontrollhoz képest (%)	
	5% O ₂	1% O ₂
HT-168-M1	121 \pm 4,9	110 \pm 1,3
HT1080	154\pm16,9 *	65 \pm 16,6
HT25	126 \pm 8,4	107 \pm 5,6
HT29	88 \pm 3,2	66 \pm 16,9
PE/CA PJ15	107 \pm 2,7	106 \pm 5,3

A sejtek mozgékonyágát és migrációs képességét egyrészt videomikroszkópiás követéssel (24h), másrészt Boyden-kamrás vizsgálatban, fibronektin kemoattraktáns használatával vizsgáltuk. A sejtek normoxiában is erős különbözőséget mutattak mozgékonyág tekintetében (11A ábra). A két legkevésbé mozgékony sejttípus (HT25 és HT29) a Boyden kamrával folytatott vizsgálatban nem migrált 24 óra után sem. A PE/CA PJ15 sejtek mozgását 20 órás, míg a HT168-M1 és a HT1080 sejteknél 6 órás inkubáció

után értékeltük. Míg a HT168-M1 és HT1080 sejtek sebességbeli növekedést mutattak a hipoxia erősödésével, a PE/CA PJ15 sejtek 5% oxigén melletti enyhe migráció növekedéssel szemben 1% oxigén jelenlétében migráció csökkenésével válaszoltak (11B ábra). A videomikroszkópiás mérésekben a hipoxia a normoxiás körülmények közt is mozgékonyabb sejtek további sebességnövekedését hozta, míg a normoxiában is kevésbé mozgékony HT25 és HT29 sejtek motilitása nem változott (11C-D ábra).

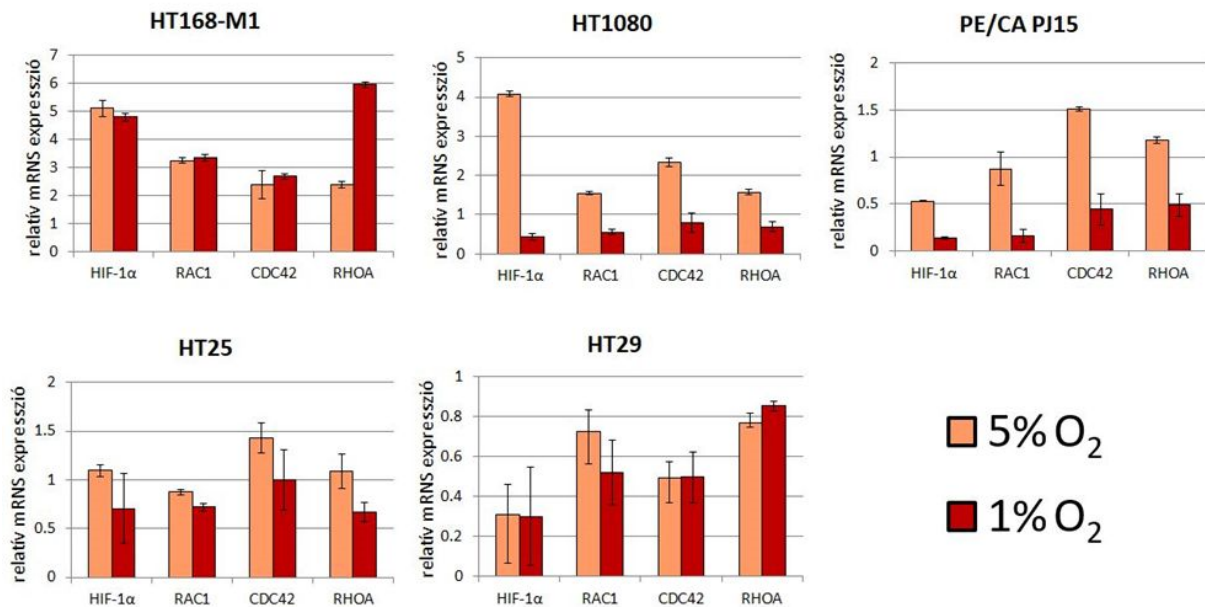


11. ábra: Hipoxia hatása humán tumorsejtek motilitására és migrációjára

A. videomikroszkópiás vizsgálat elemzése a sejtek normoxiás helyváltoztatásáról. **B.** HT168-M1 (6 óra), HT1080 (6 óra), valamint PE/CA PJ15 (20 óra) sejtek irányított mozgásának vizsgálata Boyden-kamrában. Videomikroszkópos vizsgálat 5% O₂ (**C**) és 1% O₂ (**D**) melletti relatív motilitásról, melyben az 1 feletti értékek a normoxiához képest motilitás-növekedést jeleznek. Minden érték 3 független kísérlet átlaga ± SD. A videomikroszkópiás méréseket Garay Tamás Márton, a migrációs tesztekét Tátrai Enikő végezte.

5.2.2 Hipoxia hatására egyedi változások történnek a sejtvonalak HIF-1 α , és a citoskeletális szabályozó kis GTP-áz fehérjék (RhoA, Rac-1, Cdc-42) génexpressziójában

Mint ismert, a hipoxiás környezet egyik központi effektora a Hif-1 α transzkripciós faktor, melynek aktivitása kihat a tőle függő kis GTP-áz fehérjék, így a RhoA, Rac-1 és Cdc42 kifejeződésére. RT-PCR segítségével megmértük a HIF-1 α , RAC1, CDC42, RHOA mRNS szinteket az öt tumorsejtben, és diverz válaszmintázatokat kaptunk (12. ábra). Az expressziós változások nem egy irányban változtak a sejtek körében, amely eltérő expressziós kapacitást, és más-más stratégiát és eszköztárat feltételez a sejtektől a hipoxiás stressz esetén.



12. ábra: Hipoxia hatására bekövetkező mRNS-szint változások

RT-PCR-rel vizsgáltuk a HIF-1 α , RAC1, CDC42 és RHOA mRNS-szinteket normoxiás és hipoxiás környezetben. Belső kontrollként β -aktin expressziót használtunk. Minden oszlop három független kísérlet átlagát és SD értékeit ábrázolja, a normoxiás szintekre normálva. A sejtek erősen eltérő válaszmintázatot mutattak a hipoxiás stresszre.

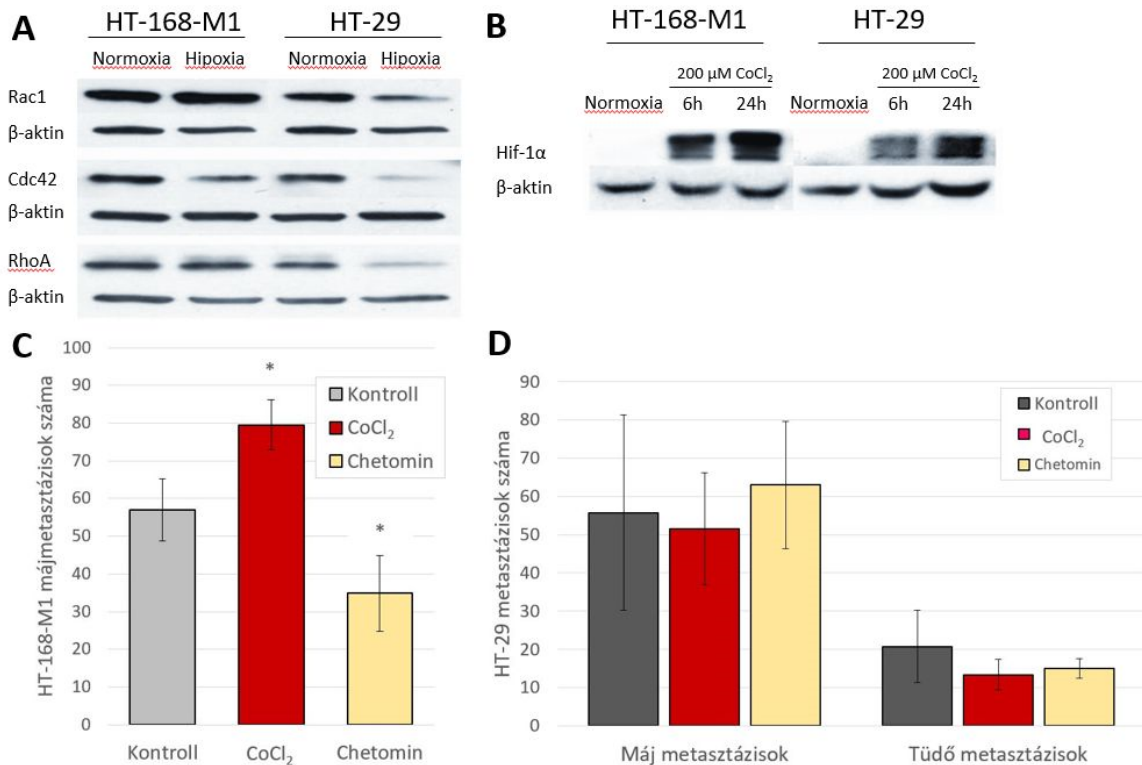
A hipoxiára megnövekedett motilitást mutató sejtek közül a HT168-M1 mind a négy gén expressziójának növekedését mutatja, míg a HT1080 esetében ez kevésbé hangúlyos, ráadásul 1% oxigénszint mellett már gátlódik ez a hatás. A HT25 és HT29 sejtek esetében úgy tűnik, a Hif-1 α aktiváció elmarad, nincs jelentős expresszió emelkedés. A PE/CA PJ15 mérésénél 5% O₂ mellett expresszió csökkenést láttunk, míg 1% O₂ mellett ez a hatás normalizálódni látszik. Érdekes módon a HIF-1 α mRNS (melynek kifejeződése nem áll a hipoxia közvetlen szabályozása alatt) is merőben eltérően változik a különböző sejtekben.

5.2.3 *A kísérleti hipoxia különböző változásokat indukál in vivo xenograftok metasztatizálási képességében*

Erős motilitású HT168-M1 és helyhez kötöttebb HT29 sejteket használtunk további vizsgálatainkhoz. Először Western Blot segítségével térképeztük fel a fehérjeszintű változásokat, melynek során a HT29 sejtekben a 24 órás hipoxia (1% O₂) kezelést követően a Hif-1 α indukálása mellett a RhoA, Rac1, Cdc42 expresszió csökkenését tapasztaltuk, míg a HT168-M1 sejteknél ilyen csökkenés nem volt tetten érhető (*13A ábra*). Ezek az expressziós mintázatok tehát nem követik az mRNS expressziós adatokat, ami a fehérjék poszttranszlációs szabályozására utalhat. A Hif-1 α mindkét sejtben akumulálódik mind hipoxiás kezelésben, mind a hipoxiát kémiai módon mimikáló, a Hif-1 α PHD általi lebontását gátló kobalt-klorid kezelés (200 μ M, 24 óra) esetén. A kobalt a PHD aktív centrumában akadályozza meg a vasionok által biztosított redox reakció lezajlását (*13B ábra*).

A tumorok mozgékonyságának legfontosabb vetülete a rezisztencia szempontjából az áttétképzés folyamata. Egerekbe oltott tumorsejtek, illetve tumorszövet áttétképző képességét vizsgáltuk. A HT168-M1 sejteket az állatok lépébe oltva a közvetlen keringési kapcsolatnak köszönhetően könnyen alapítanak áttét kolóniákat a májban. A HT-29 sejteket pedig ortotopikusan, az állatok bélfalára oltva vizsgáltuk. Ezek a tumorok a májba és a tüdőbe egyaránt képesek áttétet képezni. Összhangban az *in vitro* adatokkal tumor xenograft kísérleteinkben is azt tapasztaltuk, hogy míg a HT168-M1 modellben kémiai Hif-1 α -indukálással (kobalt-klorid itatása) a lép-máj modellben a sejtek májat kolonizáló képessége megnő. A Hif-1 α aktivitását gátló chetomin hatására ez a folyamat visszafordítható (*13C ábra*). Ellenben a HT-29 ortotopikus modelljében tüdő és máj

áttéteket vizsgálva ilyen összefüggés nem áll fenn a Hif-1 α aktivitás és az áttétképzés között (13D ábra).

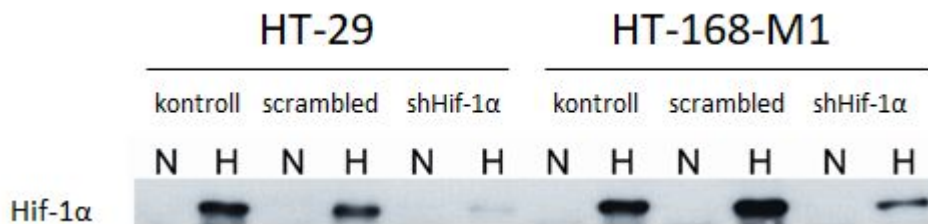


13. ábra: A Hif-1 α indukálásának fehérjeszintű hatásai, és *in vivo* következményei

A. A sejtekben a hipoxiás környezet (1% O₂) jelentősen csökkentette a kis GTP-ázok mennyiségét HT29 sejtek esetében, így hozzájárulva a motilitás gátlásához, ám nem volt megfigyelhető hasonló hatás a HT168-M1 sejtek esetében. **B.** Kobalt-klorid hatására a Hif-1 α fehérje lebontása gátlódik, ami a fehérje felhalmozódásához vezet, így a hipoxia mimikálására használható modellt nyújt. **C.** Egér lépbe oltott HT168-M1 sejtek májkolonizációs képességének vizsgálata. A Kobalt-klorid itatás hatására emelkedett a májkolóniák száma, míg a Hif-1 α aktivitását gátló Chetomin hatására visszafordítható volt a folyamat. **D.** szubkután nőtt HT29 tumor szövetdarab bélfalra oltását követően vizsgáltuk az egerek tüdő és máj státuszát. Az áttét kolóniák számában nem adódott különbség.

5.2.4 A Hif-1 α csendesítés hatása az *in vitro* migrációra, és az *in vivo* metasztázis képző képességre

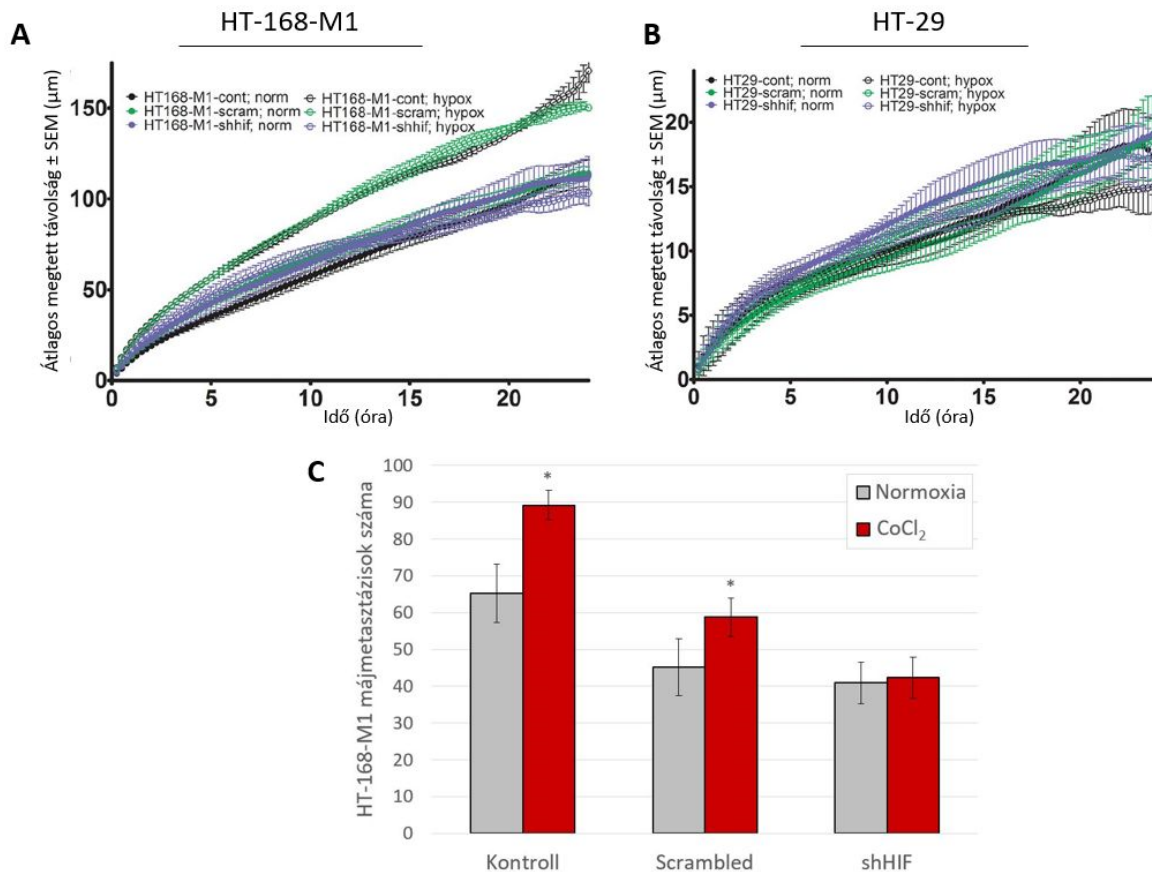
Short haripin RNS (shRNS) technológia segítségével csendesítettük a sejtek HIF-1 α mRNS expresszióját HT168-M1 és HT29 sejtekben. A csendesítés mellett a targetálás nélküli (scrambled) kontroll vektor bevitelének hatását is vizsgáltuk, a vektorhatás kiszűrésére. A csendesítés a várakozásoknak megfelelően csökkentette az indukálható Hif-1 α szintet mindkét sejtben, így a Hif-1 α függő hatások aktiválási kapacitása drasztikusan csökkent (14. ábra).



14. ábra: HIF-1 α géncsökkentett sejtek validálása

A HT29 és HT168-M1 sejteket normoxiás(N) és hipoxiás (H: 1% O₂) körülmények közt tartva a Hif-1 α fehérje felhalmozódását Western blot segítségével mutattuk ki, 50 μ g összfehérjét futtatva mintánként. A csendesített sejtekben (shHIF) hipoxiában (H) a Hif-1 α akkumulációja erősen korlátozottan történhet csak meg.

A sikeres HIF-1 α csendesítést követően a sejtekkel megismételtük az *in vitro* motilitási kísérleteket. A HT29 sejtek sokkal kisebb mértékű mozgása nem függ a Hif-1 α szintjétől, viszont a mozgékonyabb HT168-M1 hipoxia általi motilitás serkentése Hif-1 α függőnek bizonyult (15A-B ábra). A HT168-M1 modellben ezért megismételtük az *in vivo* kolonizációs modell kísérletet is, amely összhangban a korábbiakkal azt az eredményt hozta, hogy a kobalt-kloriddal itatott állatok (hipoxia csoport) májában több áttét kolónia indult el a parentális és a scrambled sejtek esetében, míg a csendesített sejtekben (shHIF) nem volt hasonló hatása a hipoxiának, tehát a Hif-1 α indukálása az áttétképzést is segíti ebben a modellben (15C ábra).



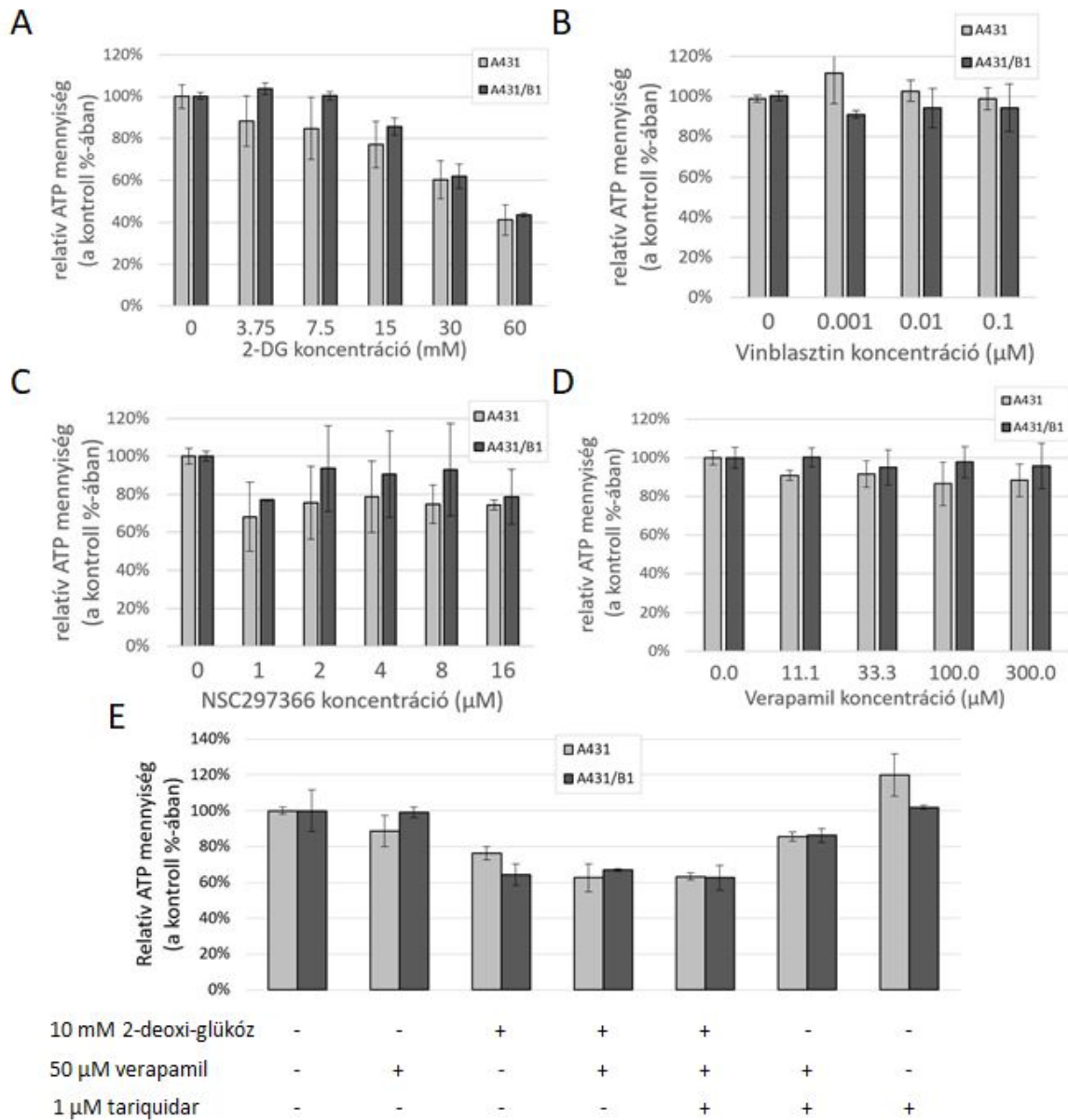
15. ábra: A HIF-1 α csendesítés hatása a sejtek motilitására, és a HT168-M1 áttétképző képességére

A videomikroszkópiás mérésekben parentális, scrambled, illetve HIF-1 α csendesített (shHIF) sejtek mozgását értékeltük ki normoxiában és hipoxiában. A HT168-M1 sejteknél **A.** a hipoxia motilitás növekedése Hif-1 α fehérjétől való függést mutat, míg a HT29 sejtek **B.** motilitását nem befolyásolja e fehérje mennyisége. **C.** HT168-M1 xenograft lép-máj modellben a Hif-1 α indukciója (kobalt-klorid itatás) a metasztatizáló képesség növekedésével jár, shHIF sejtek esetében ez a hatás nem érvényesül. A videomikroszkópiás méréseket Garay Tamás Márton végezte.

5.3 Az MDR-szelektív vegyület NSC297366 hatásmechanizmusa, az ABCB1-et expresszáló sejtek célzott elpusztítása az intracelluláris vaskészlet kiürítésével

5.3.1 A sejtek ATP-szintje nem változik Pgp-szubsztráttal, vagy MDR-szelektív vegyülettel történő kezeléskor.

Egy hipotézis felveti, hogy az MDR-szelektív vegyületek hatásmechanizmusa háttérben az általuk kifejtett intenzív Pgp ATP-áz aktivitás stimulálás miatti fokozott ATP-hidrolízis és sejtszintű ATP-depléció állhat. A sejtek ATP-szintjének méréséhez A431 epidermoid karcinóma Pgp-t nem expresszáló parentális sejt vonalat, illetve A431/B1 Pgp expresszáló izogenikus vonalat használtunk, amelyekben a sejtek teljes ATP készletét mértük. Az ATP-depléció kontrolljaként ismert ATP-szint csökkentő kezeléseket alkalmaztunk. A glikolízist hatékonyan gátló 2-deoxi glükóz illetve oxamát mindkét sejtben koncentráció-függő módon, hatékonyan csökkentette a sejtekben található ATP mennyiségét, azok elpusztítása nélkül, már négyórás kezelés esetén is. A Pgp-szubsztrát (tehát várhatóan ATP-áz aktivitást serkentő) vinblasztin, az ATP-áz aktivitást ismertén stimuláló Verapamil, és a korábban azonosított MDR-szelektív hatású NSC297366 szintén négy órás időtartamban ugyanakkor nem indukált mérhető változást a sejtek ATP-készletében. Tesztjeink során kombinációs kezelésben is megvizsgáltuk a 2-deoxi glükóz és a Pgp ATP-áz stimulátor verapamil együttes hatását. A 2-deoxi-glükóz ATP depletáló hatását a Verapamil kezelés nem fokozta. A Pgp inhibitor tariquidar alkalmazása nem változtatott a kezelt sejtek ATP-szintjén. Az eredményeket a 16. ábra foglalja össze. Eredményeink alapján nem valószínű, hogy az MDR-szelektív toxicitás jelenségében az ATP-depléció komoly szerepet játszana.

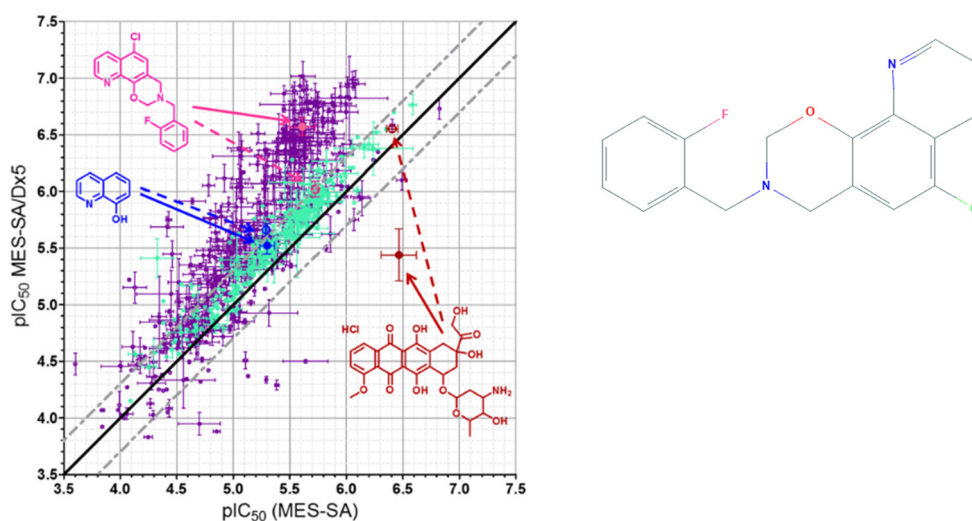


16. ábra: Intracelluláris ATP-szint mérések A431 és A431/B1 sejteken.

A. A 2-deoxi-glükóz kezelés (balra fent) hatékonyan csökkentette mindkét sejt ATP-szintjét, addig a vinblasztin (B), NSC297366 (C), és verapamil (D) nem tudták csökkenteni a sejtek ATP-szintjét, vagy erősíteni a 2-deoxi-glükóz hatását kombinációs kezelésben (E). A Pgp-státusz alapján nem volt különbség a sejtek ATP szintjeinek változása között.

5.3.2 A 8-hidrokinolin vegyületkönyvtár vizsgálata során talált nagy szelektivitású vegyületek toxicitása a P-glycoprotein működéstől függ

Az MDR-szelektív vegyületek azonosítása, fejlesztése, előállítása, és a szerkezet-funkció összefüggések leírása során kutatócsoportunk több vegyületcsoportot is azonosított^{117, 121, 141}. Egy ilyen, MDR-szelektív vegyületekben gazdag vegyületkönyvtár a 8-hidrokinolin alapvázra épülő molekulák csoportja is¹⁴². A funkcionáló Pgp-t tartalmazó és nem tartalmazó sejteken kapott citotoxicitási (IC₅₀) értékek arányának kiszámításával a vegyületek ABCB1-szelektivitása kvantitatívan jellemezhető. Annak bizonyítására, hogy a szelektivitás nem a sejtek egyéb különbségeinek, hanem a Pgp-aktivitásuknak köszönhető, a transzporter specifikus gátlószerét (tariquidar) használtuk. Amint a 17. ábrán látható, a vegyületcsalád különböző tagjai különböző mértékű Pgp-függő szelektivitást mutatnak. Közülük egy magas szelektivitású molekulát, az NSC297366-ot (6-Chloro-3-[(2-fluorophenyl)methyl]-2,4-dihydropyrido[3,2-h][1,3]benzoxazine) választottuk ki referencia vegyületnek a további vizsgálatokhoz.

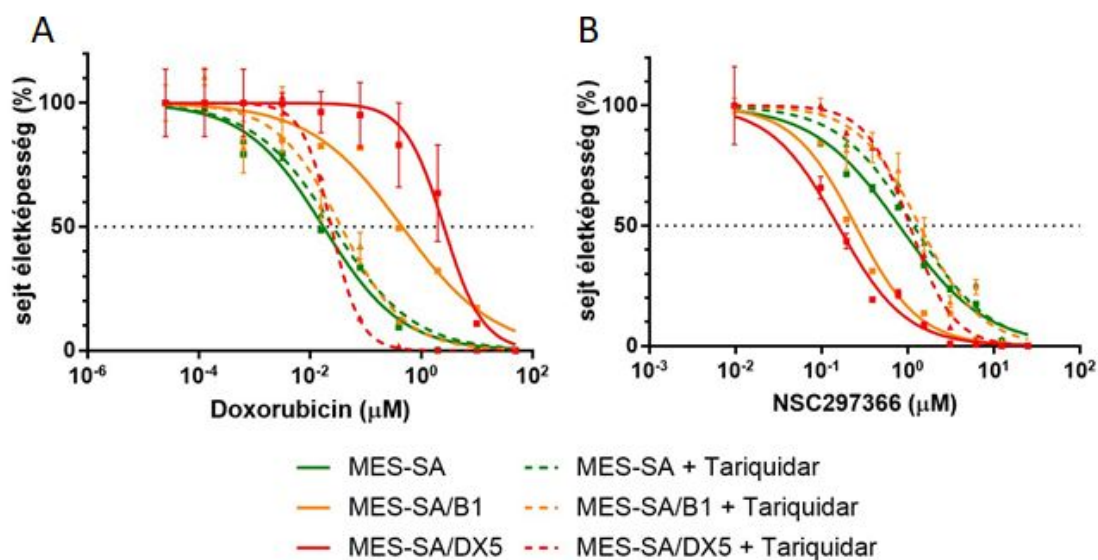


17. ábra: 8-hidrokinolin szerkezetből származó vegyületek MDR-szelektív toxicitásának vizsgálata Pgp-t expresszáló és nem expresszáló sejteken

A 8-hidrokinolin vegyületek toxicitását a Pgp-t nem expresszáló MES-SA és a magas Pgp-expressziójú MES-SA/DX5 sejteken vizsgáltuk. A nem szelektív vegyületek az ábra jelölt átlójának közelében helyezkednek el (szelektivitásuk, selectivity ratio, SR ≈ 1). Az átló alatt jelölt vegyületek a transzportert kifejező sejteken csökkent

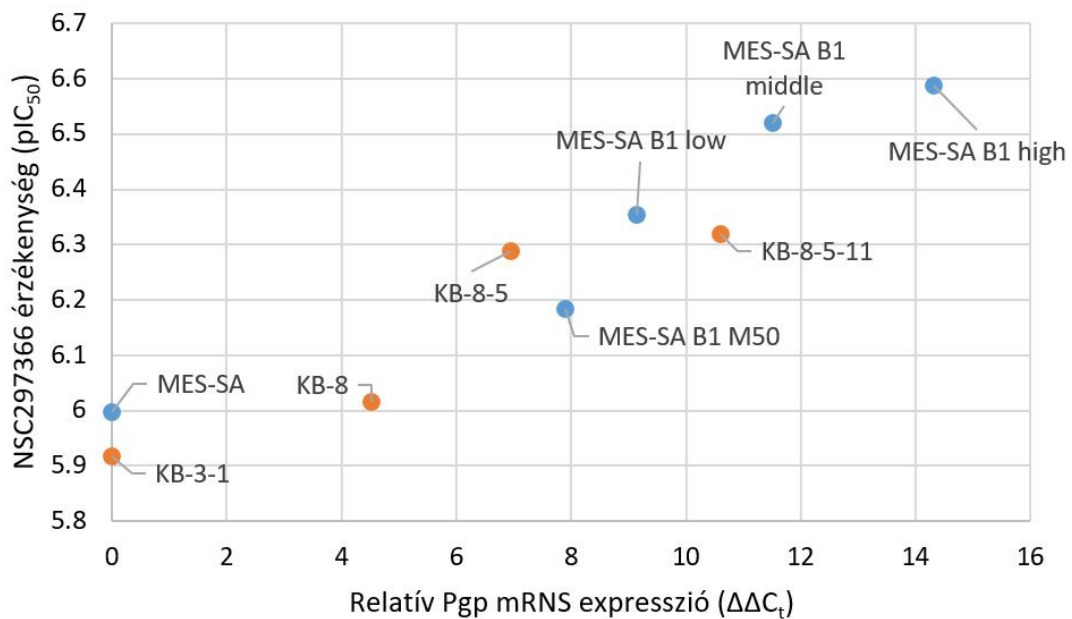
hatékonyságúak, ilyenek a Pgp szubsztrátjai (pl. doxorubicin, piros). A vegyületsalád alapszerkezete a 8-hidrokinolin (kék) önmagában nem mutat szelektivitást, míg az MDR-szelektív NSC297366 (rózsaszín, szerkezet: jobb oldali panel. Forrás: PubChem¹⁴³) hatékonyabbnak mutatkozik a Pgp-expresszáló sejtek elpusztításában, mint a parentális MES-SA sejtek ellen. A hatás visszafordítható Pgp inhibitor tariquidar (zöld pontok, szaggatott vonalak) jelenlétében. Pape Veronika és Tóth Szilárd munkája.

A citotoxicitási kísérletek során megvizsgáltuk a doxorubicin-szelektált MES-SA/DX5 mellett a virális transzdukcióval létrehozott MES-SA/B1 sejtek érzékenységét is különböző kezelésekre. Mind a szubsztrát hatás (doxorubicin), mind az MDR-szelektív hatás (NSC297366) mindkét sejtben megfigyelhető, és a Pgp specifikus gátlásával (tariquidar) mindkét hatás eltüntethető. Az eredményeket a 18. ábra foglalja össze.



18. ábra: **Pgp szubsztrát doxorubicin és MDR-szelektív NSC297366 citotoxikus hatása** A Pgp-expressziótól függő szubsztráthatás (A: doxorubicin), és MDR-szelektív (B: NSC297366) hatás leolvasható a dózis-hatás görbéken, parentális MES-SA, ABCB1-transzdukált MES-SA/B1, és doxorubicin-szelektált MES-SA/DX5 sejtekben. A Pgp expressziója együtt jár a megemelkedett doxorubicin toleranciával, és NSC297366 érzékenységgel, mely hatások a Pgp gátlásával megszűnnek.

Az MDR-szelektív toxicitás jelenségének részletes vizsgálatához különböző Pgp-expressziójú sejteket hoztunk létre. A MES-SA sejtmodell esetén különböző génbeviteli próbák kópiaszám különbségeit használtuk ki, illetve a sejtek Pgp-jelölésével, majd fluoreszcens jelölés alapján sejtszorterrel való szétválogatásával különböző Pgp-expressziójú stabil sejtvonalkat készítettünk. A KB sejtmodell esetén pedig a korábban már leírt⁹⁹, különböző koncentrációjú colchicin-szelekció segítségével létrehozott sejtvonalkat használtuk. Minden sejtben meghatároztuk az ABCB1 mRNS expresszióját, valamint citotoxicitási tesztekben meghatároztuk a jellemző NSC297366 IC₅₀ értékeket. Az eredmények elemzése pozitív korrelációt tárt fel a sejtekben található Pgp mRNS mennyisége, és a sejtek NSC297366-tal szemben való érzékenyebbé válása között. Az eredményeket a 19. ábrán foglaltam össze.

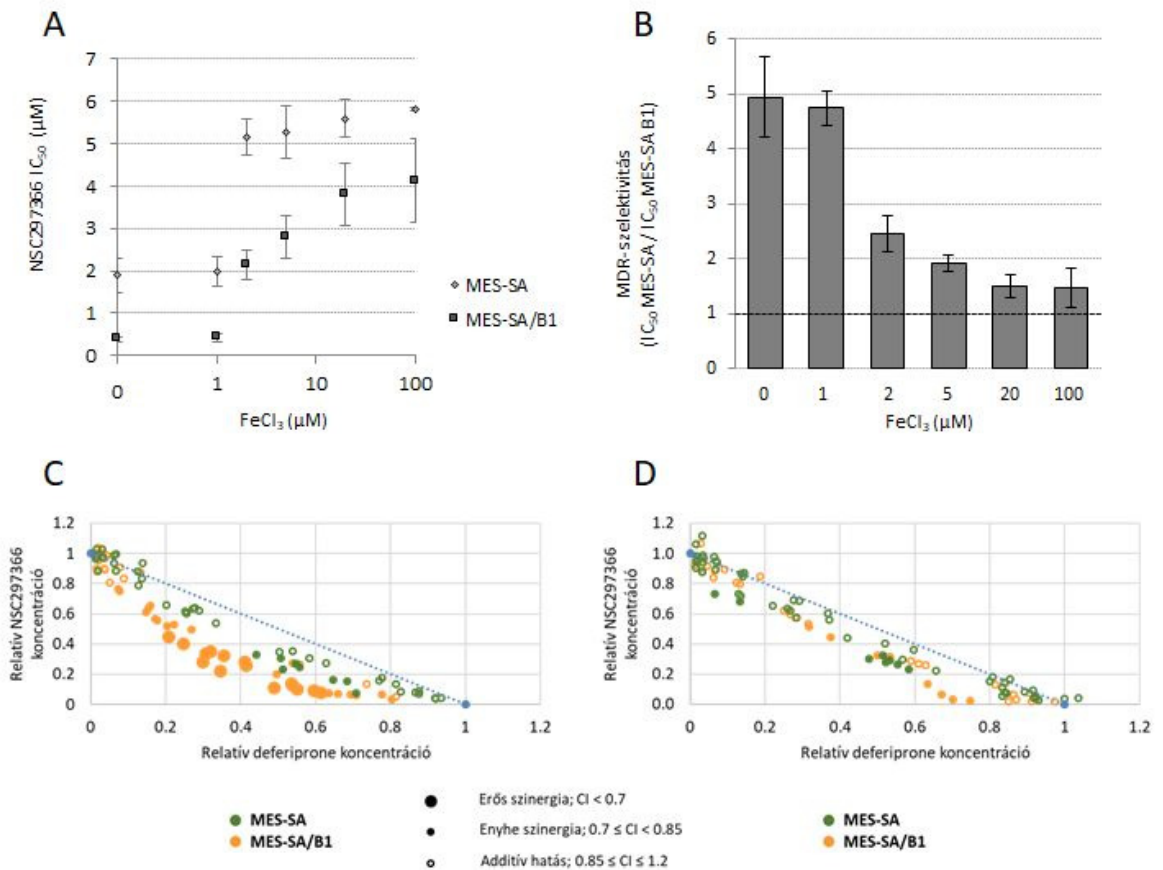


19. ábra: Az NSC297366 toxikus hatása különböző mennyiségű Pgp-t expresszáló tumorsejtekben

A MES-SA (kék) és KB (narancs) modellekből létrehozott sejtvonalkban a Pgp mRNS-szintjével arányosan növekszik az NSC297366-tal szembeni érzékenység. A parentális sejtekben nem volt kimutatható Pgp kifejeződés, így ez esetben a mennyiségre jellemző rt-pcr ciklusszámot (ΔC_t) illetően 40 ciklus értékkel számoltam.

5.3.3 *A sejten belüli vasszintek módosítása befolyásolja az MDR-szelektív NSC927366 molekula toxicitását*

Bár a 8-hidroxikinolin család MDR-szelektív hatásának mechanizmusát nem írták le korábban, a szerkezet alapján ismert, hogy fémionok kelációjára képes molekulákról van szó. Így felmerült az a hipotézis, mely szerint vagy a toxikus fémionok sejten belüli akkumulációja, vagy a sejten belüli esszenciális fémionok sejtéből való eltávolítása fontos szerepet játszhat az MDR-szelektív toxicitás hatásmechanizmusában. Mivel a Pgp egy exporter, ezért logikus volt valamely, a sejt számára fontos fém exportját feltételezni. Kiterjedt irodalma van a sejten belüli vaskészlet és vas eloszlás szabályozottságának, valamint jól ismert, hogy számos enzim és sejtleletani folyamat számára elengedhetetlen a vas mennyiségének fenntartása. Külső többlet vas (anorganikus FeCl_3 só formában) hozzáadásával ismételtük meg az NSC297366 toxicitási teszteket. A vas hozzáadása mind a Pgp-negatív, mind a Pgp-pozitív sejtekben IC_{50} érték növekedéssel járt (ismert a tumorsejtek általános vasfüggése¹⁴⁴, így a vaskelátor kezelés általánosan vassal menekíthető), azonban ez a hatás sokkal erősebb volt a Pgp-t expresszáló MES-SA/B1 sejteknél, így a sejtek közti szelektivitás csökkenése figyelhető meg magas koncentrációjú vas hozzáadásakor (20A-B ábra). Az NSC297366 toxicitását ismert, klinikai használatban lévő, nem MDR-szelektív vaskelátor deferiprone-nal való kombinációs koncentráció mátrixban is megmértük. Az eredményeket a két toxikus vegyület IC_{50} értékét 1-nek véve, az arányos helyettesítés izobologramjait vettük fel, mely additív hatás (helyettesíthetőség) esetén a végpontokat összekötő egyenesen helyezkedik el, az ettől való eltávolodás szinergiát, illetve antagonizmust jelez. Azt tapasztaltuk, hogy a két molekula szinergisztikus, egymást erősítő hatást fejtett ki a MES-SA/B1 sejtekre. A parentális MES-SA sejtben, vagy a Pgp tariquidarral történő gátlásakor a két vegyület hatása additív (20C-D ábra).



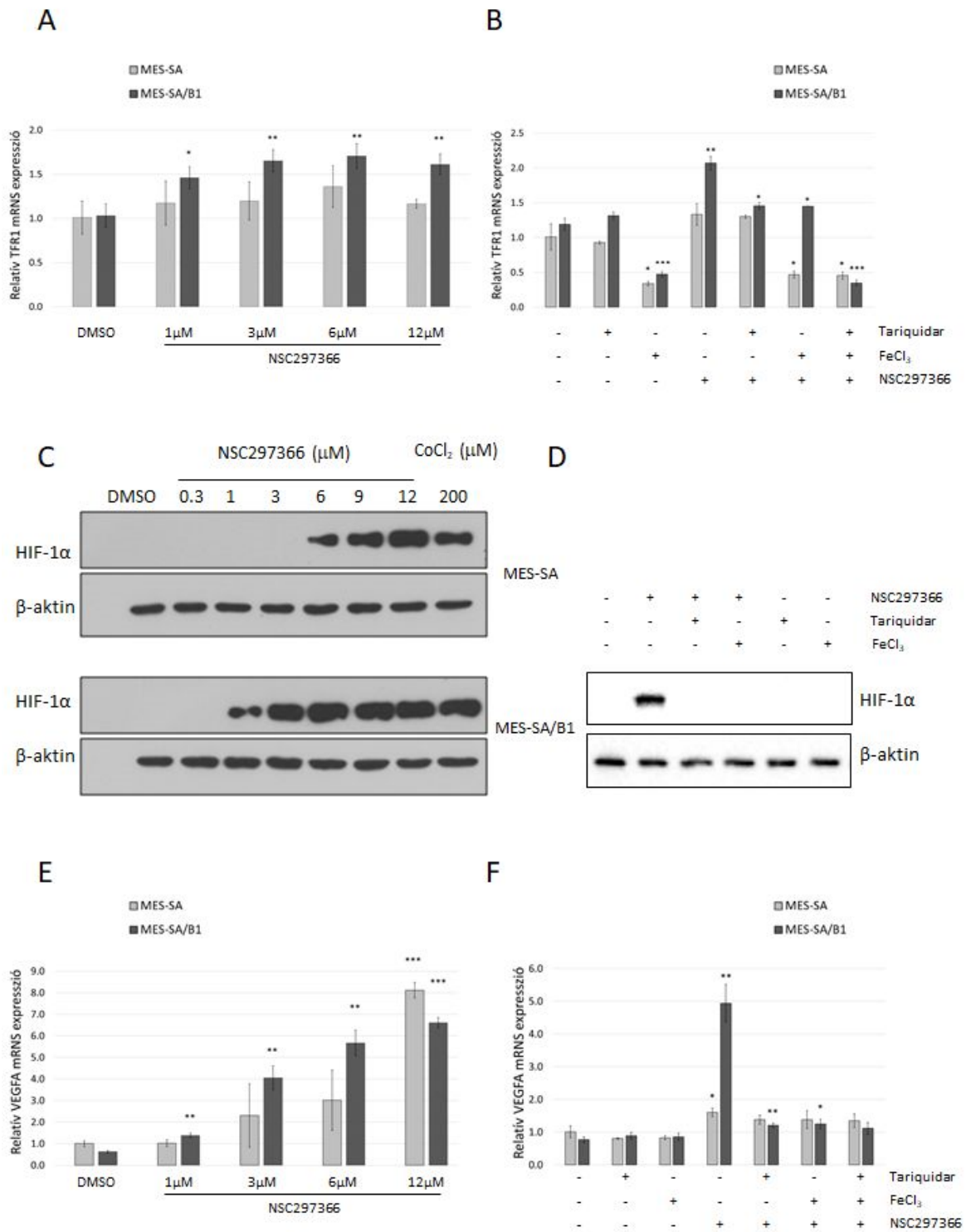
20. ábra: Az NSC297366 MDR-szelektív toxicitásának vasfüggése, és nem MDR-szelektív vaskelátor deferiprone-nal való kölcsönhatása

A-B. külső többlet vas (FeCl_3) hozzáadásával az NSC297366-tal szembeni ellenálló képesség Pgp-függő módon nő, a MES-SA és MES-SA/B1 sejtek közötti szelektivitás pedig csökken. **C-D.** NSC297366 és ismert, nem MDR-szelektív vaskelátor deferiprone kombinált kezelésekor a MES-SA/B1 (sárga) sejteken szinergisztikus hatást tapasztaltunk, mely a Pgp gátlásával (tariquidar) a parentális MES-SA (zöld) sejtekéhez hasonló additív hatássá szelídült. A kombinációs kísérleteket Tóth Szilárd végezte.

5.3.4 *Korai sejes válaszok: Az NC297366 P-glycoprotein függő módon befolyásolja a sejtekben a vashiányos állapotra reagáló TFR1 és HIF-1 α expressziót.*

A vashiányra vonatkozó feltevéseink igazolására elsőként a sejt vasháztartását, illetve vasfüggő működését vizsgáltuk. MES-SA és MES-SA/B1 sejteken vizsgáltuk az NSC297366 hatását a TFR1 expresszióra. Méréseink igazolták, hogy a Pgp-funkció jelenlétében az NSC297366 a vashiánynak megfelelő szelektív TFR1 választ ad (*21A-B ábra*), míg külső többlet vas esetén mind a MES-SA, mind a MES-SA/B1 sejtekben a TFR1 expresszió csökken (*21B ábra*).

A vashiány másik azonnali velejárója a Hif-1 α fehérje hidrolízisét kezdeményező Phd1-3 enzimek aktivitásának felfüggesztése, és így a Hif-1 α fehérje akkumulálódása. Ez fontos momentum egyrészt a gyorsasága miatt (már 2 óra elteltével jól mérhető a hatás, hiszen nincs szükség transzkripciós-transzlációs aktivitásra, elegendő a Hif-1 α lebomlás megakadályozása), másrészt az így aktiválódó, hipoxia-reszponzív elem (HRE) által irányított kiterjedt expressziós profil változás miatt, mely a sejtek anyagcseréjétől a mozgékonyágukig alapvető változásokat indít. Western blottal vizsgálva a Hif-1 α fehérje szintjét azt láttuk, hogy az NSC297366 indukáló hatása mindkét sejtben megjelenik, azonban a Pgp-expresszázó MES-SA/B1 sejtekben jelentősen alacsonyabb koncentrációjú kezelés is elegendő ehhez a hatáshoz (*21C ábra*). Bemutattuk továbbá, hogy a Pgp gátlása, vagy külső vas utánpótlás ezt a hatást visszafordítja (*21D ábra*). Azt, hogy a Hif-1 α aktivitása valóban a célgénjeinek expressziós változásával jár, a VEGFA mRNS szintjeinek mérésével ellenőriztük. Ebben a tekintetben is szelektív hatást tapasztaltunk a két sejt között, amely Pgp gátlással, vagy többlet vas biztosításával visszafordíthatónak bizonyult (*21E-F ábra*).

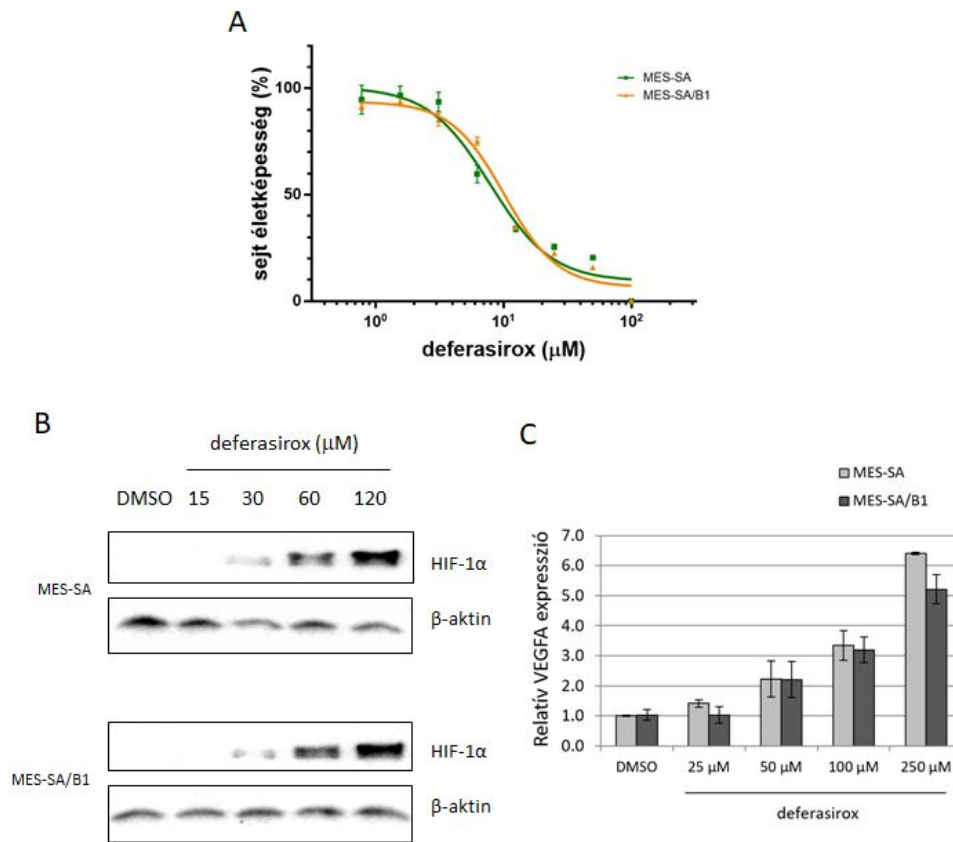


21. ábra: **Az NSC297366 kezelés hatása MES-SA és MES-SA/B1 sejtek vasfüggő TFR1-expressziós, Hif-1 α akkumulációs, és VEGFA indukciós folyamataira**

A-B. A transferrin receptor (TFR1) expresszió Pgp-függő módon nő NSC297366 jelenlétében, ez a hatás a transzporter gátlásával, vagy külső vas hozzáadásával felfüggeszthető. **C-D.** A Hif-1 α expressziójának mérése western blottal NSC297366 kezelést követően. A Pgp-szelektív indukció Pgp gátlással, külső vas hozzáadással megszüntethető. **E-F.** A Hif-1 α transzkripció aktivitása által szabályozott VEGFA expressziója is NSC297366 kezelésre csak funkcionáló Pgp jelenlétében, vasfelesleg hiányában emelkedik.

5.3.5 Elegendő-e a kelációs képesség egy vegyület MDR-szelektív toxicitásához?

Annak ismeretében, hogy az általunk tesztelt MDR-szelektív NSC297366 a sejt számára hozzáférhető vas elvonásán keresztül képes a Pgp-expresszáló sejtek célzott pusztítására, arra is kíváncsiak voltunk, hogy a vaskelátorok általánosan képesek-e Pgp-függő vashiányt és MDR-szelektív sejtpusztulást okozni. Több ismert vaskelátor molekulát teszteltünk, ezek közül néhány (deferasirox, deferiprone) már klinikai gyakorlatban is használt terápiás szer. A sejtek azonban nem mutattak Pgp-függő túlérzékenységet ezen molekulákkal szemben. A deferasirox példáján elvégzett molekuláris vizsgálatok igazolták, hogy a kelátor hatása a MES-SA és MES-SA/B1 sejtekben hasonlóan zajlik (*22. ábra*).



22. ábra: A vaskelátor deferasirox hatása MES-SA és MES-SA/B1 sejteken.

A. A deferasirox hasonló toxicitást mutat MES-SA és MES-SA/B1 sejteken. **B.** Western blottal igazoltuk, hogy a kelátor ugyanazon koncentrációi hasonló hatást érnek el a Hif-1 α indukciójában. **C.** A Hif-1 α indukciója funkcionális hasonlóságot is mutat: a HRE-függő VEGFA mRNS expresszió is egyformán változott a két sejtvonalban deferasirox kezelésre.

A kelátorok szelektivitásának vizsgálatokor a deferasirox mellett több, klinikai gyakorlatban is alkalmazott fémkelátort is vizsgáltunk az MDR-szelektív toxicitás tekintetében. Eredményeinket az 5. táblázat foglalja össze (a méréseket Tóth Szilárd végezte). Az eredmények alapján egyértelmű, hogy a vasionok megkötésének képessége nem feltétlenül jár együtt az MDR-szelektív toxicitással.

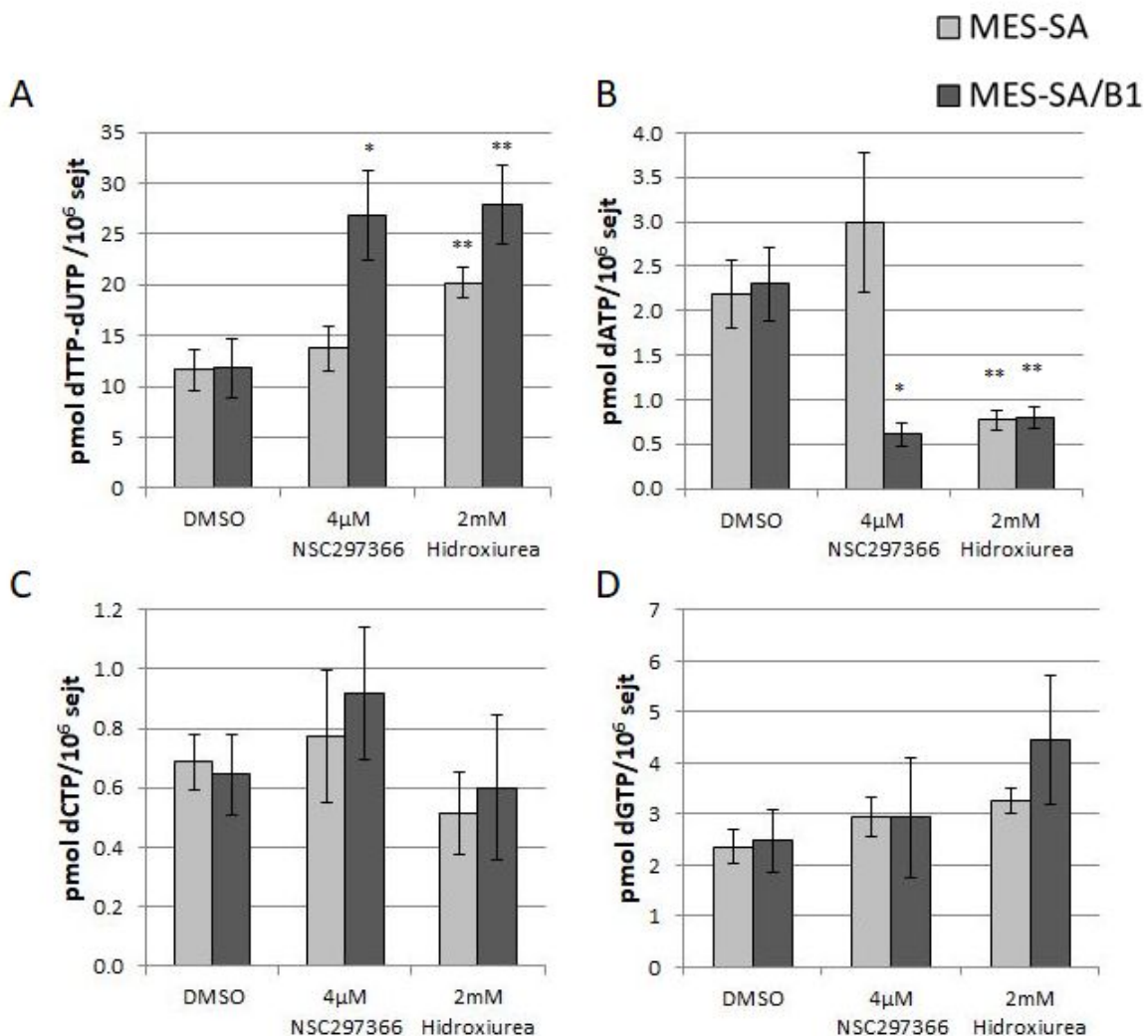
5. táblázat Fémkelátorok toxicitása MES-SA és MES-SA/B1 sejteken

Az eredmények egyértelműen jelzik, hogy a vasionok megkötésének képessége nem feltétlenül jár együtt az MDR-szelektív toxicitással.

Fémkelátor	IC ₅₀ (μM)		Szelektivitás
	MES-SA	MES-SA/B1	$\frac{\text{IC}_{50} \text{ MES-SA}}{\text{IC}_{50} \text{ MES-SA/B1}}$
NSC297366	1.9	0.4	5.0
8-hidroxikinolin	7.8	6.7	1.2
deferiprone	121.0	100.0	1.2
deferasirox	8.2	11.2	0.7
ciclopirox	2.3	2.7	0.9

5.3.6 *A vashiányos állapot a Pgp-t kifejező sejtekben a ribonukleotid reduktáz (RNR) gátláshoz, sejtciklus blokkoláshoz, apoptózis indukáláshoz vezet*

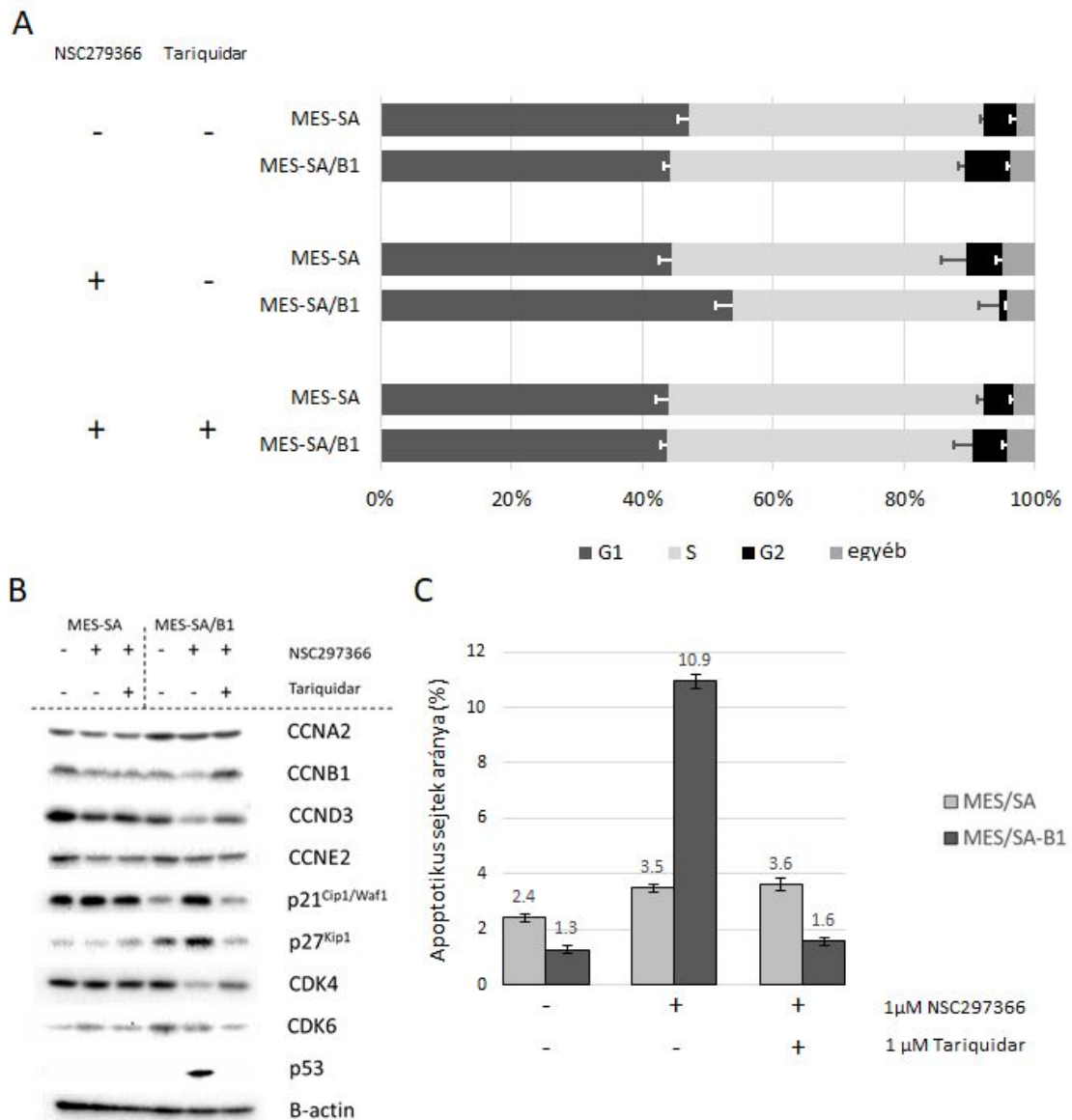
A vashiány által indukált expressziós változások és az MDR-szelektív toxicitás közötti összefüggést még nem ismertük, ám a sejtciklus és az apoptózis folyamatában részt vevő fehérjék között is vannak vasfüggő enzimek, ilyen például a DNS szintézisben kulcsfontosságú RNR vasfüggése. Megvizsgáltuk, hogy az RNR aktivitását, a sejtek proliferációját és túlélését hogyan befolyásolja az NSC297366 kezelés. Az RNR funkciójára irányuló kísérleteinkben dNTP szinteket mértünk a sejtekben. Pozitív kontrollként hidroxü-urea (2mM) kezelést használtunk, mely MES-SA sejteken korábban már leírt módon¹⁴⁵ gátolja a dNTP szintézist. Míg a kontroll vegyület mindkét sejtben, az NSC297366 szelektív módon csak a MES-SA/B1 sejtekben függesztette fel az RNR működését. A legkritikusabb a dATP szintek csökkenése volt, valószínűsítjük, hogy MES-SA sejtekben ez a molekula válik először limitálóvá a DNS-szintézisben (23. ábra).



23. ábra: Az NSC297366 kezelés hatása MES-SA és MES-SA/B1 sejtek dNTP szintjeire **A-D**. dNTP szintek változása 24 órás NSC297366 (4 μ M) vagy hidroxiurea (2 mM) kezelést követően. A sejtciklus hatékony gátlója, a hidroxiurea mindkét sejtvonal esetén megnövekedett dTTP-dUTP szintet, és csökkent dATP szintet eredményez. Az NSC297366 hatására szelektíven a MES-SA/B1 sejtekben a dATP szint drasztikus esése figyelhető meg, ugyanebben a sejtben a dTTP-dUTP növekszik. Ugyanez a kezelés a MES-SA sejtben nem vált ki dNTP-szint változást.

A DNS szintézis gátlásának következménye a sejtciklus felfüggesztése, mely a G₁-S fázis határánál tartja a sejteket. Ezt áramlási citometriás mérésben igazoltuk, melyben a G₂ fázisú sejtek mennyisége csökkent le (*24A ábra*). Ez a hatás szelektíven a MES-SA/B1 sejtekben volt megfigyelhető, és a Pgp gátlása (tariquidar) pedig felfüggesztette. Western blot segítségével megvizsgáltuk több, a sejtciklusban, illetve annak szabályozásában részt vevő fehérje expresszióját. Eredményeink azt mutatták, hogy valóban több fehérje szintjének változása (Cyclin B1, Cyclin D3, p21Cip1/Waf1, p27Kip1, CDK4, p53) a sejtciklus felfüggesztése irányába hat már 24 órás kezelést követően. Nagyon fontos, hogy a p53 Pgp-függő indukciója túlmutathat a sejtciklus befolyásolásán, hiszen ez a fehérje apoptotikus jelátviteli utak kiindulópontja is (*24B ábra*).

Fontos volt tehát a sejtciklus mellett az apoptotikus aktivitást is vizsgálnunk a sejtekben, mely során áramlási citometriás mérésekkel fedeztük fel a korai apoptotikus sejtek (Annexin V pozitív, propidium-jodid negatív) számának szelektív növekedését NSC297366-tal kezelt Pgp-aktivitású sejtek esetében (*24C ábra*).



24. ábra: Az NSC297366 hatása a sejtciklusra és az apoptózisra

A. Sejtciklus vizsgálata áramlási citometriával: a G2 fázisú sejtek Pgp-függő ritkulását okozza az NSC297366 kezelés. **B.** Western blot eredmények különböző, sejtciklusban részt vevő és reguláló fehérjék expressziójának vizsgálatára. A Pgp-pozitív MES-SA/B1 sejtekben a CCNB1, CCND3, p21, p27, CDK4 és p53 fehérjék mennyiségének szelektív változása figyelhető meg. **C.** Apoptózis vizsgálat: a korai apoptotikus (Annexin V pozitív, PI negatív) sejtek Pgp-függő indukcióját okozza az NSC297366, mely Pgp inhibitor tariquidar hozzáadásával megakadályozható.

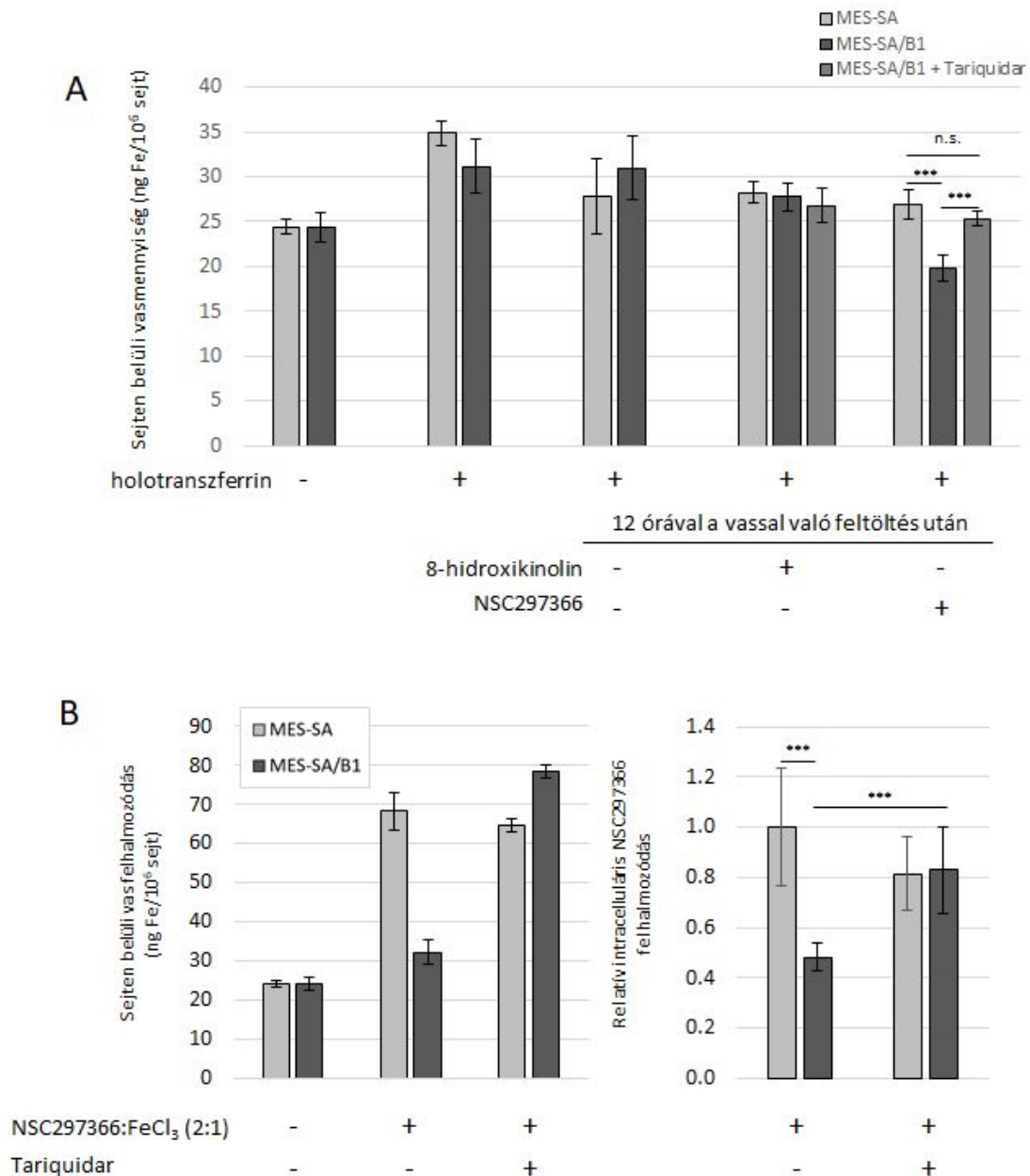
5.3.7 *A tumorsejtek P-gp aktivitása az NSC297366:vas komplexet kipumpálja a sejtekből, kritikus szintre csökkentve a sejt vaskészletét*

Az eddigi eredmények mind alátámasztják az NSC297366 szerepét abban, hogy a sejtekben található vasionokat a Pgp ativitásának segítségével eltávolítsa a sejtéből. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy mindezek indirekt bizonyítékok, s bár határozottan körvonalazzák a keresett mechanizmust, kívánatos volt a vasionok kiáramlását direkt vizsgálni.

Ezt több módszer segítségével végeztük el. Feltételezésünk szerint az NSC297366 és vas komplexét képes felismerni, és a sejten kívülre pumpálni a Pgp, melynek során ATP hidrolízisét végzi.

Az intracelluláris vasszintek vizsgálatát teljes röntgen fluoreszcencia (TXRF) vizsgálattal végeztük, melyben a feltárt sejtek kis szögű röntgennyalábbal való gerjesztése oldalirányban specifikus, az adott kémiai elemre jellemző fluoreszcencia jelet ad. A vizsgálat során a sejtekvaskészletét 4 órán át 25 μ M humán holotranszferrin segítségével töltöttük fel, majd ezt követően 12 órás kezelési időben néztük a vasszintek spontán normalizálódását, vagy kelátorok által elősegített csökkenését. Bár a nem MDR-szelektív 8-hidroxikinolin nem mutatott érdemi változást a kontrollhoz képest, az NSC297366 jelenléte hatékonyan csökkentette a MES-SA/B1 sejtekben mérhető vasszinteket, mely hatás nem volt mérhető sem a MES-SA sejtek esetében, sem a Pgp működésének tariquidar segítségével történő felfüggesztésekor (25A ábra).

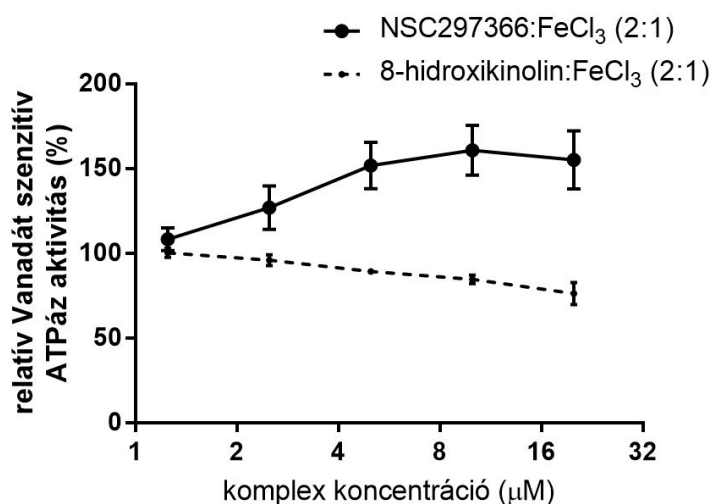
Mivel a Pgp membrántranszporter a feltételezés szerint felismeri és eltávolítja a sejtekből az NSC297366 által kötött vasionokat, logikus elvárás, hogy a kelátor és a vas komplexének hozzáadása a sejtekhez csak Pgp-működés hiányában képes hatékonyan növelni a sejtek intracelluláris vasszintjét. A TXRF mérésekben ezért megmértük az intracelluláris vasszinteket a sejtekben a komplex hozzáadását követően is. Működő Pgp hiányában a MES-SA sejtekben, illetve a tariquidarral kombinált kezeléseknél kaptunk markáns vasszint-emelkedést. Tömegspektrometriás méréseink továbbá azt is megmutatták, hogy a kelátor (felhalmozódás) mennyisége is különböző a Pgp-t expresszáló valamint nem expresszáló sejtekben, amely tariquidar alkalmazásakor a MES-SA sejtek szintjére áll be mindkét sejtben, mutatva, hogy a Pgp működése akadályozza a kelátor akkumulációját (25B ábra).



25. ábra: Az NSC297366 vassal alkotott komplexének Pgp általi eltávolítása a sejtekből

A. TXRF mérések a sejtek kontroll, transferrinnel feltöltött, majd spontán, avagy kelátor jelenlétében változó intracelluláris vasszintek jól mutatják, hogy a MES-SA/B1 sejtben az NSC297366 Pgp-függő módon képes csökkenteni a sejten belüli vasszinteket. **B.** A Pgp hatása az NSC297366:FeCl₃ 2:1 arányú komplexével kezelt sejtekben a sejten belüli vas és NSC297366 felhalmozódásra. A méréseket Pape Veronika, Gaál Anikó, Szoboszlai Norbert és Szabó Pál végezte.

A Pgp szubsztrátjait ATP hidrolízisének energiáját felhasználva exportálja a sejtéből. A Pgp ATPáz aktivitása és transzport folyamata (sztöchiometrikusan) kapcsolt, ezért a szubsztrát hozzáadása koncentráció-függő módon fokozza az ATP hidrolitikus aktivitást. A felszabaduló anorganikus foszfát mennyisége mérhető, és arányos az ATPáz aktivitással. Sejtmentes rendszerben, funkcionáló Pgp-t tartalmazó sejtmembrán preparátumok használatával ATPáz aktivitást mértünk, melyben a magasabb aktivitás emelkedett transzport tevékenységre utal. Az NSC297366 és a vas komplexe eredményesen növelte az ATPáz aktivitást, míg a hasonló szerkezettel rendelkező, erős kelátor aktivitású 8-hidroxikinolin vaskomplexe nem idézett elő hasonló aktivitás változást (26. ábra).



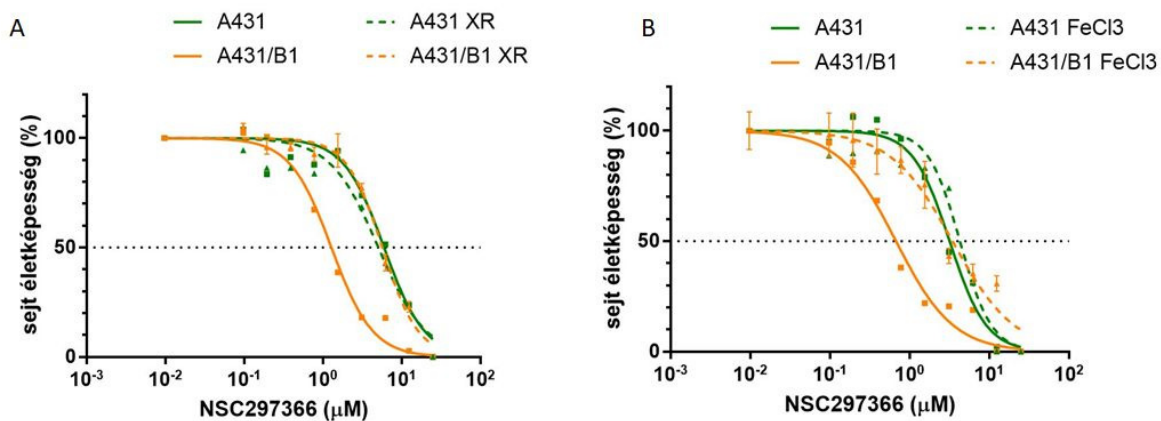
26. ábra: A kelátor-vas komplex transzportálódik a Pgp-n keresztül

ATP-áz aktivitás mérése Pgp-t expresszáló sejtekből készült membránokon NSC297366 és 8-hidroxikinolin vaskomplexének hozzáadását követően. Az NSC297366 vassal alkotott komplexe serkenti a Pgp működéséhez szükséges ATP hidrolízist, melyet a szervesetlen foszfátcsoportok felszabadulását kimutató színreakcióval detektáltunk. A 8-hidroxikinolin nem szelektív hatású kelátor nem stimulálja az ATPáz aktivitást. A méréseket Telbisz Ágnes Gera Melinda végezték.

5.3.8 Szükséges-e az NSC297366 MDR-szelektív hatásához a p53 és a Hif-1 α aktiválódása?

Kísérleteink során megmutattuk, hogy az NSC297366 szelektív vasdepleciót okoz MES-SA/B1 sejtekben, mellyel egyidőben a Hif-1 α és a p53 fehérjék felhalmozódnak a sejtekben. Mivel mindkét fehérje más gének expresszióját szabályozó központi szerepű, felmerült, hogy szerepük lehet az MDR-szelektív toxicitás létrejöttében.

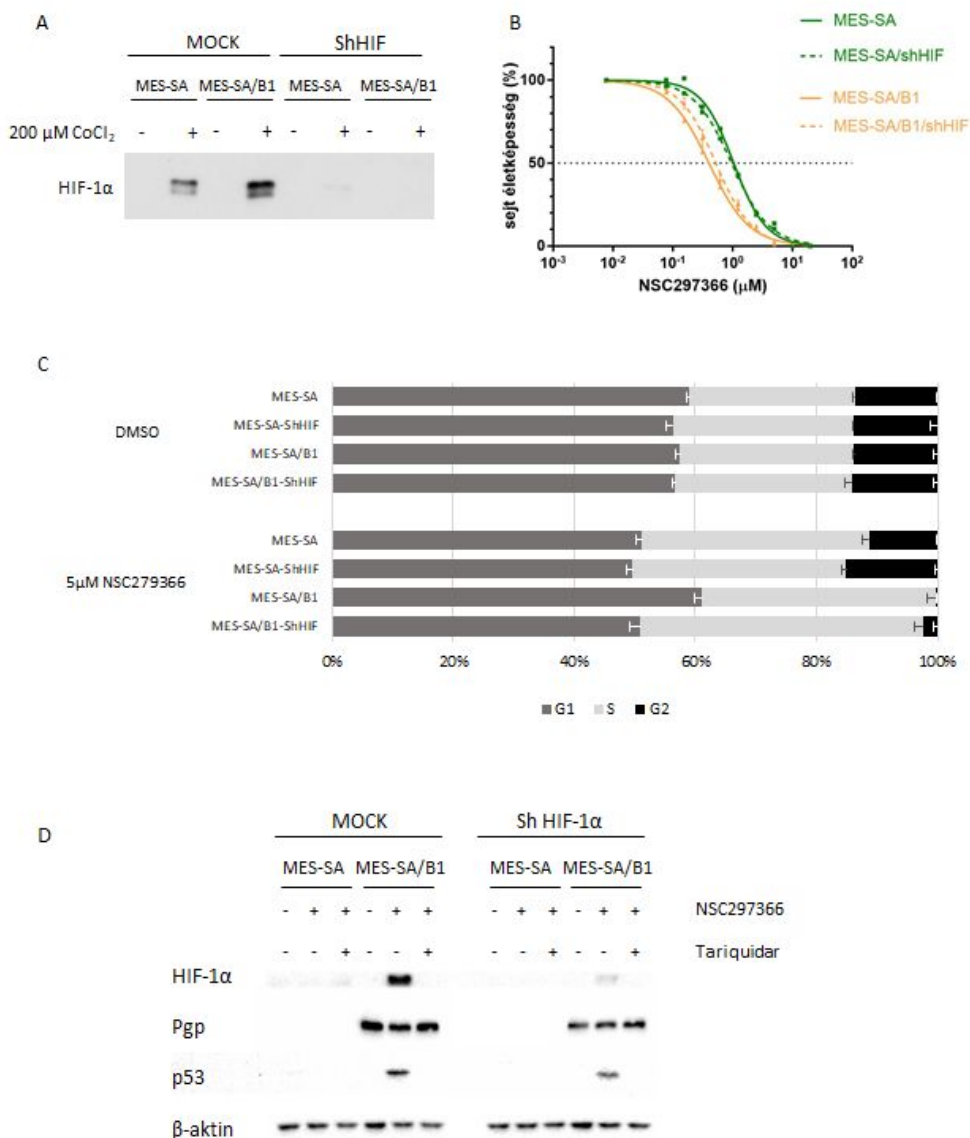
Felmerült a p53 tumorszuppresszor gén közvetlen szerepe az NSC297366 által okozott szelektív toxicitásban, hiszen közvetlenül szabályozza a sejtek vasháztartását¹⁴⁶. Ez a kérdés kiemelt fontosságú tekintettel a tényre, hogy a fehérje gyakori hibájára illetve funkciójának elvesztése a daganatok több, mint 50%-ában jelen van, ezért tisztázni kell a p53-deficiens daganatok esetén az MDR-szelektív kezelés alkalmazhatóságának kérdését. Működőképes p53-at nem tartalmazó A431 és A431/B1 sejteken¹⁴⁷ végzett citotoxicitási esszéink során egyértelműen bebizonyosodott, hogy az NSC 297366 Pgp funkciójától, és vastól függő MDR-szelektív toxicitása ezen sejtekben is megnyilvánul (27. ábra).



27. ábra: A p53-deficiens A431 modellben is MDR-szelektív az NSC297366 toxicitása.

A Pgp-t kifejező A431/B1 sejtek érzékenyebbek az NSC297366 kezelésre, mint a transzportert nem expresszáló A431 sejtek. A Pgp működésének tariquidar (XR) általi gátlásával (A), vagy külső vas hozzáadásával (B) ellenállóbbakká tehetők az NSC297366 kezeléssel szemben.

A Hif-1 α aktivitása képes lehet a sejtciklus és az apoptózis szabályozására. Ahelyzet tisztázására ShRNS rendszer segítségével Hif-1 α csendesített sejtvonalakat hoztunk létre a MES-SA és MES-SA/B1 sejtekből. A kísérletek bizonyították, hogy az MDR-szelektív toxicitás, a sejtciklus szelektív gátlása, illetve a p53 szelektív indukciója Hif-1 α expresszió hiányában is kimutatható NSC297366 kezelés hatására (28. ábra).



28. ábra: A HIF-1 α csendesítés nem befolyásolja érdemben az NSC297366 MDR-szelektív hatását.

A. Az shRNS segítségével HIF-1 α csendesített sejtek Hif-1 α indukálhatósága megszűnik. **B.** A Hif-1 α csendesítés nem befolyásolja az MDR-szelektív toxicitást. **C.** A Hif-1 α indukciója nélkül is megtörténik a sejtciklus gátlása. **D.** A p53 indukciója Hif-1 α hiányában is lezajlik.

6 MEGBESZÉLÉS

6.1 K-Ras mutációk és kemoterápia-rezisztencia

A tüdőrák világszerte a legtöbb emberi életet követelő daganattípus, melynek mortalitása nagyobb, mint a vastagbél- és prosztata daganatok (férfiak), vagy a vastagbél- és emlődaganatok (nők) okozta halálozások együttesen³. Hazánkban évi több, mint 12 ezer új beteget diagnosztizálnak⁵, azonban a jó prognózisú sebészi eltávolítás csak a betegek harmadában kivitelezhető, a betegek többsége már előrehaladott stádiumú betegséggel küzd. A szisztémás terápia alapja a platinabázisú kezelési protokollok alkalmazása, ám ennek válaszadási és túlélési mutatói nem nyújtanak hosszútávú megoldást. Az EGFR-t célzó TKI terápiai lehetőségek (gefitinib, erlotinib) elterjedésével a nem-kissejtes tüdőrák kezelése új lehetőséget kapott, ugyanakkor előtérbe került a betegek EGFR- és K-Ras-státuszának jelentősége is. Az NSCLC-s betegek körülbelül 30%-a hordozza a KRAS gén mutációját, mely a receptor-tirozin-kináz molekulák felől induló jelátviteli folyamatokban központi és kulcsfontosságú fehérjetermék folyamatos aktív állapotban tartásával jár, így az általa elősegített folyamatok (sejtek proliferációja, sejthalál elkerülése, migráció) a receptorok aktivitásától függetlenül, folyamatosan működhetnek³⁴. Az EGFR-t célzó terápia mellett azonban más terápiai modalitások hatásosságára^{148, 149}, sőt, a betegek várható túlélésére is hatással lehet a KRAS mutációja¹⁵⁰.

A zoledronsav, és más nitrogéntartalmú biszfoszfonátok a Ras fehérje poszttranszlációs módosításait befolyásolják. A fehérje a farnezil-pirofoszfát (FPP) és a geranilgeranil-pirofoszfát (GGPP) segítségével preniláción esik át. E szubsztrátok keletkezését hatékonyan képes gátolni a zoledronsav⁵⁶, mely egyben a Ras aktivitását is képes meggátolni¹⁵¹.

Munkánk során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a K-Ras mutációja befolyásolja-e a zoledronsav hatását NSCLC sejtekben. A prenilációt követő transzlokáció során a membránhoz kötődik a K-Ras fehérje, melynek detektálását sejtfrakciók fehérje expresszió vizsgálatával végeztük. Western blot eredményeink megmutatták, hogy míg a vad típusú sejtek közül az LCLC-103H sejtvonalban teljes transzlokáció gátlást sikerült elérni zoledronsavval, és a H1975 modellben is részleges

gátlást tapasztaltunk, addig K-Ras G12C mutációt (H358) vagy G12S mutációt (A549) hordozó sejtekben nem találtunk hasonló hatást. A vad típusú K-Ras és EGFR 19-es exon delécióját (delE746-A750) hordozó H1650 sejtek azonban, meglepő módon, nem mutattak a vad típusú sejtekhez hasonló választ. Felmerül, hogy valamilyen (akár a módosult EGFR-en keresztüli) kompenzációs mechanizmusok, vagy valamely, általunk nem ismert rezisztencia mechanizmus (akár a hatóanyag eltérő anyagcseréje a sejtekben) állhat a jelenség hátterében. Az *in vitro* proliferációs és migrációs tesztekben hasonló eredményeket kaptunk, melyek szerint a K-Ras vad típusú sejtek osztódása és mozgása is érzékenyebb a zoledronsav jelenlétére, alacsonyabb koncentráció is gátolja a folyamatokat. Ugyanakkor a sejtek apoptózisát vizsgálva egyedül az LCLC-103H mutatkozott kiemelkedően érzékenynek. A zoledronsav más daganatellenes terápiát erősítő hatását már más tanulmányok is vizsgálták^{151, 152}, és a mi vizsgálataink is megerősítették, hogy a zoledronsav képes erősíteni a ciszplatin tumorellenes hatását. Megjegyzendő, hogy a ciszplatin toxicitásra jellemző IC₅₀ értékek csökkenése a K-Ras vad típusú sejtek esetében rendre kifejezettebb volt, mint a mutációt hordozó sejteknél. Az *in vitro* vizsgálatok mellett *in vivo* xenograft modellekben követtük a zoledronsav szubkután tumorok növekedésére, és beereződésére kifejtett hatását. A korábbi sejtes rendszerekben kapott eredményekkel párhuzamosan az *in vivo* eredmények is azt mutatták, hogy a vad típusú LCLC-103H tumorok növekedését gátolta legerősebben a zoledronsav terápia úgy monoterápiában, mint ciszplatinnal kombinációban alkalmazva. Ebben a tumorban az is megfigyelhető volt, hogy a zoledronsav kezelés hatására erősen angiogén fenotípusúvá váltak a tumorok, amelyet a nagy sűrűségű intratumorális érhálózattal jellemeztünk.

Eredményeink erősítik azt a feltételezésünket, mely szerint a K-Ras genotípus befolyásolhatja a biszfoszfonát-terápia hatékonyságát. Óvatosságra int bennünket azonban a tény, hogy az általunk vizsgált három, K-Ras vad típusú sejtmodell nem azonos módon reagált minden kísérleti felállásban, így egyelőre nem zárhatók ki más, K-Rastól független befolyásoló tényezők sem. Más csoportok munkáiban a hasonló eredmények egyelőre nem konklúzívak, annak ellenére sem, hogy vastagbédaganatok esetén például heterozigóta mutáns sejtvonalak mutáns alléljeinek rekombináció általi eltüntetésével létrehozott izogénikus sejtvonalakot használtak¹⁵³. Ugyanakkor az említett tanulmány K-Ras G13D mutáns sejtvonalak vizsgálatával foglalkozott, ellentétben az általunk vizsgált

G12C és G12S mutációval. Már korábbi munkánk során is felmerült, hogy az egyes mutációs altípusok erősen különbözhetnek egymástól⁴⁸.

Mindezek fényében megkerülhetetlen, hogy a jövőben további finomításokkal éljünk a sejtmodelleket illetően. Erre megoldást jelenthet mesterséges Ras-mutáció célzott létrehozása vad típusú sejtvonalak széles választékán. Ugyanakkor heterogén primer tumorból származó, egymáshoz genetikailag hasonló, eltérő K-Ras státuszú sejtvonalpárok, sejtvonaltípusok létrehozásával is értékes információkhoz juthatunk. A klinikai alkalmazás szempontjából azonban a leghasznosabb a betegek ismert K-Ras státuszának és a zoledronsav terápia sikerének összevetése lehet nagyszámú beteg bevonásával, mely segíthet eldönteni, hasznos faktor lehet-e a K-Ras státusz ismerete zoledronsav kezelés indikációjához. További figyelemre tarthat számot a zoledronsavval kezelt tumorok migrációs képességének felmérése, hiszen a preniláció gátlása nem korlátozódik a Ras fehérjére, hanem más kis GTP-áz típusú fehérje (így a RhoA, Rac-1, CDC42) prenilációját is felfüggesztheti¹⁵⁴.

6.2 A tumor hipoxia és a Hif-1 α szerepe tumorsejtek motilitásában és metasztatizáló képességében

A tumorsejtek környezetének megváltozása, a tumorsejtek kiemelkedő adaptációs képességei, és az ezekkel a változásokkal járó viselkedési változások az utóbbi idők egyik legizgalmasabb témájává váltak a tumorbiológiai kutatásokban¹⁵⁵. Szolid tumorok esetén már 1mm-nél kisebb átmérő esetén (egyben jóval a klinikailag észlelhető tumorméret elérése előtt) is számolni kell az intenzíven növvő daganatsejtek sokasága miatt a környező erek általi oxigénellátás hiányosságai⁶³. A hipoxiára adott sejtes és szövetszintű válasz elemi effektor molekulája a tumorsejtekben a Hif-1 α fehérje, mely oxigénszegény környezetben a normális, lebontó szabályozás alól felszabadulva transzkripciós faktorként számos gén átírását szabályozza, így a tumorok proliferációjára, anyagcseréjére, apoptózisára, multidrog-rezisztenciájára, angiogén viselkedésére, vagy akár motilitási és migrációs képességeire, így az áttétképzésre és a betegség progressziójára is hatással van¹⁵⁶. Ez a jelenség szolgált alapul az elmúlt évtizedekben az angiogenezist célzó terápiák kifejlesztéséhez. A hipoxia által kiváltott angiogén hatás egyúttal a tumorokra jellemző, hiányos falszerkezetű, szabályozatlan érrendszer

kialakulását okozza. A fő szabályozó jelmolekula, a vaszkuláris endothelialis növekedési faktor (VEGF) és receptora hamar a lehetséges terápia középpontjába kerültek, és az ellenük irányuló specifikus antitest alapú terápia (bevacizumab, sorafenib, sunitinib) mára több tumortípusban a klinikai kezelés alapjaivá váltak. Ugyanakkor az anti-angiogén terápia alkalmazása nem veszélytelen: hosszú távú alkalmazása egyrészt nem kívánt áttétképző aktivitással ruházza fel a tumorokat, másrészt a keringési rendszer egészére hatva súlyos mellékhatásokhoz vezethet. Emiatt a tumor érrendszerét célzó kutatások fókuszosa a tumoros ereződés megakadályozása helyett a tumor érhálózatának normalizálására fókuszál, mely a megfelelő vérellátás mellett a hipoxia problémájára, és a könnyebb terápiás célozhatóságra is megoldást jelenthet¹⁵⁷.

Fontos azonban megjegyezni, hogy a tumorok sokfélesége ebben a tekintetben sem hagyható figyelmen kívül. Ez nem csupán az angiogén fenotípust érinti, hanem általánosabban a hipoxiás környezetváltozásra adott válasz is igen heterogén lehet. Sejtes modellek hipoxiás környezetben való vizsgálatakor derült fény arra, hogy bár a hipoxiára jellemző hatásmechanizmusok aktiválódhatnak a sejtekben, ez mégsem valósul meg minden esetben. Mivel a korábban publikált irodalom az egyes sejtmodelleken talált összefüggésekre fókuszált, fontosnak tartottuk a jelenség átfogóbb vizsgálatát. Ehhez különböző szöveti eredetű, különböző morfológiájú és viselkedésű tumor sejtvonalakból választottunk ötöt, melyeknél vizsgáltuk a hipoxiás környezet hatását a sejtproliferációra, spontán és irányított mozgási kapacitásra (azaz motilitási és migrációs képességre). A proliferációs tesztek nem mutatták a hipoxia komoly befolyásoló hatását, érdekes ugyanakkor a HT1080 esetén tapasztalható változás, amely 5% oxigénszint mellett proliferáció növekedéssel, 1% oxigénszint mellett viszont proliferáció gátlással párosult, felvetve a hipoxia súlyosságának hatását, akár sejtfüggő módon. Eredményünk tükrében mindenképpen átgondolásra érdemesnek tartjuk az általános leírást, mely szerint a tumoros hipoxia elősegíti a sejtek gyors proliferációját¹⁵⁸. Nem várt eredményt kaptunk a sejtek mozgásának vizsgálatakor, melyben bizonyos sejtek a várakozásnak megfelelően reagáltak, így a HT-168-M1 humán melanóma sejtek, a HT1080 fibroszarkóma sejtek, és 5% oxigénszint mellett a PJ15 fej-nyaki laphámrák sejtek is növekedett mozgékonyt mutattak. Ugyanakkor megfigyelhető volt, hogy a vastagbél eredetű HT-25 és HT-29 sejtek motilitása nem változott, az irányított migrációs esszében pedig semmilyen migrációs aktivitást nem mutattak. A normoxiás körülmények között végzett motilitás

vizsgálat is azt mutatta, hogy ezek a sejtek alig rendelkeznek mozgási kapacitással, és erre nincs mérhető hatása az oxigénellátottságnak sem. Ez nagyon fontos lehet a hipoxiától függő illetve nem függő sejtek azonosításában, hiszen a terápia megválasztásakor alapvető fontosságú a tumorsejtek célponttól való függése.

Az eredmények kapcsán kíváncsiak voltunk, hogy a hipoxiával és a motilitással közvetlenül összefüggő Hif-1 α , valamint Rho GTP-ázok (RhoA, Rac-1, CDC42) sejtekben mérhető expressziója is hasonlóan alakul-e. Az RNS-expressziós mintázatok egybecsengenek a korábbi megfigyelésekkel, hiszen míg a HT-168-M1 sejtben mind a négy gén expressziója nőtt, a HT1080 esetén (a proliferációhoz hasonlóan) egy koncentrációtól függő, kompenzálódó hatást tapasztaltunk, a vastagbél karcinóma sejtek esetében viszont nem detektáltunk expresszió növekedést. Meglepő módon a PE/CA PJ15 sejtek megnőtt migrációs kapacitása nem volt tetten érhető az RNS-expressziós mintázatban, amely felveti alternatív effektormolekulák lehetséges szerepét a stresszválaszban. Mivel a fej-nyaki daganatok esetében kifejezetten a Hif-1 α prediktív biomarker szerepét igazolták¹⁵⁹, így különösen izgalmas lehet egy eltérő működésű HNSCC modell megismerése.

Tovább vizsgálva a kérdést a Hif-1 α szerepét kívántuk tisztázni. Ehhez a korábbi vizsgálatokból kiválasztottuk a nagy migrációs aktivitású HT-168-M1 sejt vonalat, valamint az *in vitro* minimális mozgást mutató HT-29 sejt vonalat. A sejtekben fehérjeszinten is megvizsgáltuk a molekuláris résztvevők változását hipoxiában, a fehérjeszinten szabályozott Hif-1 α hasonló válasza mindkét sejtben nem meglepő, és az RNS-expressziós eredményekkel összhangban a HT-29 sejtekben erőteljesen csökkent a kis GTP-ázok mennyisége hipoxiás környezetben. *In vivo* vizsgálva a Hif-1 α központi szerepét sikerült igazolni a HT-168-M1 modell májkolonizációs modelljében, ahol a Hif indukciója növelte, míg szuppressziója csökkentette az áttétképzést. Bár az *in vitro* viszonyokkal szemben *in vivo* rendelkezik metasztatizáló képességgel a HT-29 tumor modell, hasonló kezelése mellett nem volt tapasztalható a Hif-1 α szabályozásának hatása az áttétek számára. Ez az eredmény fontos lehet, hiszen úgy tűnik, a Hif-1 α jelátvitel hatása *in vitro* módszerekkel leírható, és a várható *in vivo* eredmények ez alapján könnyebben jósolhatók, amellyel a felhasznált kísérleti állatok számát csökkenthetjük.

A Hif-1 α hatás igazolására a HT-168-M1 és a HT-29 sejtekből shRNS segítségével Hif-1 α csendesített sejt vonalakat hoztunk létre, mely rendszerben western blot

igazoltuk is a Hif-1 α gátlást. Ezek a sejtek *in vitro* motilitásukat tekintve, valamint a HT-168-M1 sejten korábban bemutatott *in vivo* metasztázis modellben is érzéketlenné váltak a Hif-1 α indukciójára. Ez közvetlen bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a megfigyelt *in vitro* és *in vivo* hatások valóban a Hif-1 α aktivitásához kötöttek. Munkánk során nem merült fel a hipoxiás környezet okozta jelátviteli folyamatok megkérdőjelezése, azonban értékes új információ olyan tumormodellek jellemzése, melyek nem a Hif-1 α által mediált módon jutnak el az áttétképző képességhez. További komoly, ám szükséges feladat ezekre a tumorokra fókuszálva megtalálni a bennük zajló, tumor progressziót segítő folyamatokat. Ugyanakkor a tumor hipoxia közvetlen hatását a tumorsejtek mozgékonyására, és a klinikumban gyakran fatális kimenetelű áttétek képzésére jól leírták kísérleteink, amely támogatja azt az elképzelést, mely szerint a daganatterápia egyik legígéretesebb iránya kétségkívül a rendkívül korai felismerés és kezelés. A képzőképző módszerek lehetőségei fejlődnek, de mind felbontásuk, mind elérhetőségük korlátozott. Éppen ezért sok új fejlesztés zajlik a szolid tumorok egyéb módon történő, gyors és gazdaságos kimutatási módszereinek kidolgozására. A legkézenfekvőbb a keringésbe jutó tumorsejtek (circulating tumor cell, CTC) vérvételből történő azonosítása volna, azonban a gyakorlat azt mutatja, hogy ennek használhatósága, főként a tumorfejlődés korai fázisában elenyésző. Ugyanakkor az utóbbi években fejlesztett, a keringésbe kerülő, tumorsejtekből származó, tumorspecifikus DNS (circulating tumor DNA, ctDNA) szakaszok detektálása és elemzése ígéretes iránya a diagnosztikai kutatásoknak²³, amely segíthet abban, hogy a betegek többségét még a nagy komplexitással, diverzitással, rezisztenciával és áttétképző potenciállal jellemezhető makroszkopikus tumorméret elérése előtt lehessen kezelni, várhatóan sokkal jobb terápiás eredményt elérve.

6.3 A multidrog-rezisztens tumorok célzott elpusztításának lehetősége vas elvonásával.

A nagyszámú terápiás stratégia kidolgozása dacára a tumoros betegek jelentős részében a klinikai gyakorlatban a kezelés során kialakuló terápia rezisztencia és tumor progresszió a betegek halálához vezet. A problémát sok esetben súlyosbítja, hogy a kemoterápiás szelekciónak kitett tumorokban sokszor nem csupán az adott gyógyszerrel

szemben, hanem sok más, szerkezetileg akár különböző vegyülettel szemben alakul ki multidrog-rezisztencia. Az ABCB1 expresszió és a P-glycoprotein membrántranszporter működése a szövetek védelmének fontos eleme, tumorsejtekben való megnövekedett kifejeződése viszont a terápiás szerek exportálásával és rezisztencia kialakulásával jár. A fehérje túlzott expressziója a klinikai tumoros mintákban is kimutatható¹⁶⁰. Míg a kezelésem át nem esett betegek esetén viszonylag ritka a mérhető Pgp-expresszió, a kezelést követő relapszus és a terápia hatástalansága idején vett mintákban már sokkal gyakoribb az ABCB1 magas kifejeződése, mely a kezelés Pgp-expressziót növelő szelektív hatását mutatja¹⁶¹. Terápiás célpontként való kiaknázását ugyanakkor gátolja, hogy az említett fiziológiás szerepe nélkülözhetetlen a szervezet anyagcseréjének és védelmének ellátásában. A Pgp specifikus gátlószereinek alkalmazása emiatt együtt jár a szervezetben fontos szerepet betöltő Pgp aktivitás leállításával, mely súlyosan toxikus, kezelhetetlen mellékhatásokhoz vezet. Emiatt, bár tumorsejtek *in vitro* kultúráiban jól használhatók, az *in vivo* alkalmazásuk nem megoldható¹⁶².

A transzporter gátlás mellett ígéretes azon vegyületek vizsgálata, melyek paradox módon a multidrog rezisztens sejteket képesek célzottan eliminálni. Ezt a kollaterális szenzitivitást ki lehet használni az MDR tumorok terápiajában. A Pgp expresszió és a toxicitás vizsgálata modellrendszerekben rámutatott arra, hogy szerkezetileg erősen különböző molekulák lehetnek képesek a Pgp-expresszáló tumorsejtek szelektív elpusztítására.

Az MDR-szelektív toxicitás mechanizmusa azonban nem volt ismert. Egy hipotézis szerint az ABCG2 transzporterhez hasonlóan¹⁶³ a Pgp működése során történő ATP fogyasztás lehet a felelős a sejtek energiahiányos állapotáért és pusztulásáért. Másrészt korábbi eredményeinknek köszönhetően sok ismeretünk volt az MDR-szelektív vegyületek jellemző szerkezetét illetően. Munkacsoportunk nagyszámú szelektív hatású molekula vizsgálatát végezte el inhibitor kontroll mellett is. Több, különböző molekulászerkezeten alapuló vegyületcsoport is ígéretes, valóban Pgp-funkciótól függő szelektív hatást mutatott, így az 1,10-fenantrólinvegyületek, a tioszemikarbazonok, és a 8-hidroxikinolinok¹¹⁷. Ezek a szerkezetek mind alkalmassá teszik a vegyületeket fémionok kelációjára^{141, 142}. A 8-hidroxikinolin vegyületcsoport nagy MDR-szelektivitású tagjai közül legrészletesebben az NSC297366 molekula hatásait vizsgáltuk munkánk során.

A P-glycoprotein ATP hidrolizáló hatásának vizsgálatában általános anyagcseregátlók, ismert Pgp-szubsztrát aktivitású vegyületek, illetve MDR-szelektív vegyületek hatását vizsgáltuk a sejtek ATP-szintjének mérésével. Eredményeink meggyőzően mutatták, hogy sem a Pgp ATP-áz aktivitását stimuláló verapamil, sem az MDR-szelektív NSC297366 nem volt képes szelektív módon, a működő Pgp-vel rendelkező sejtekben mérhető ATP szint csökkenést elérni. A modellben ugyanakkor nem mutattak sejtölő hatást rövid kezelés során a glikolízis és az oxidatív foszforiláció gátlószerei, melyeknek mérhető ATP depletáló hatása volt, Pgp státuszra való tekintet nélkül. Összegezve az eredmények nem támogatják azt a hipotézist, mely szerint az ATP szint csökkenése felelős lehetne az MDR típusú sejtek szelektív elpusztításáért. Eredményeink egybecsengenek egy másik tanulmány eredményeivel, melyben ATP-depletált sejtekben a Pgp funkciójának, és a multidrog rezisztenciának a felfüggesztését igazolták¹⁶⁵. Ezen eredmények alapján valószínűsíthető, hogy ATP hiány esetén a Pgp aktivitása gátlódik, amely új MDR tumorokat célzó stratégiák kidolgozásakor továbbra is fontos tényező lehet.

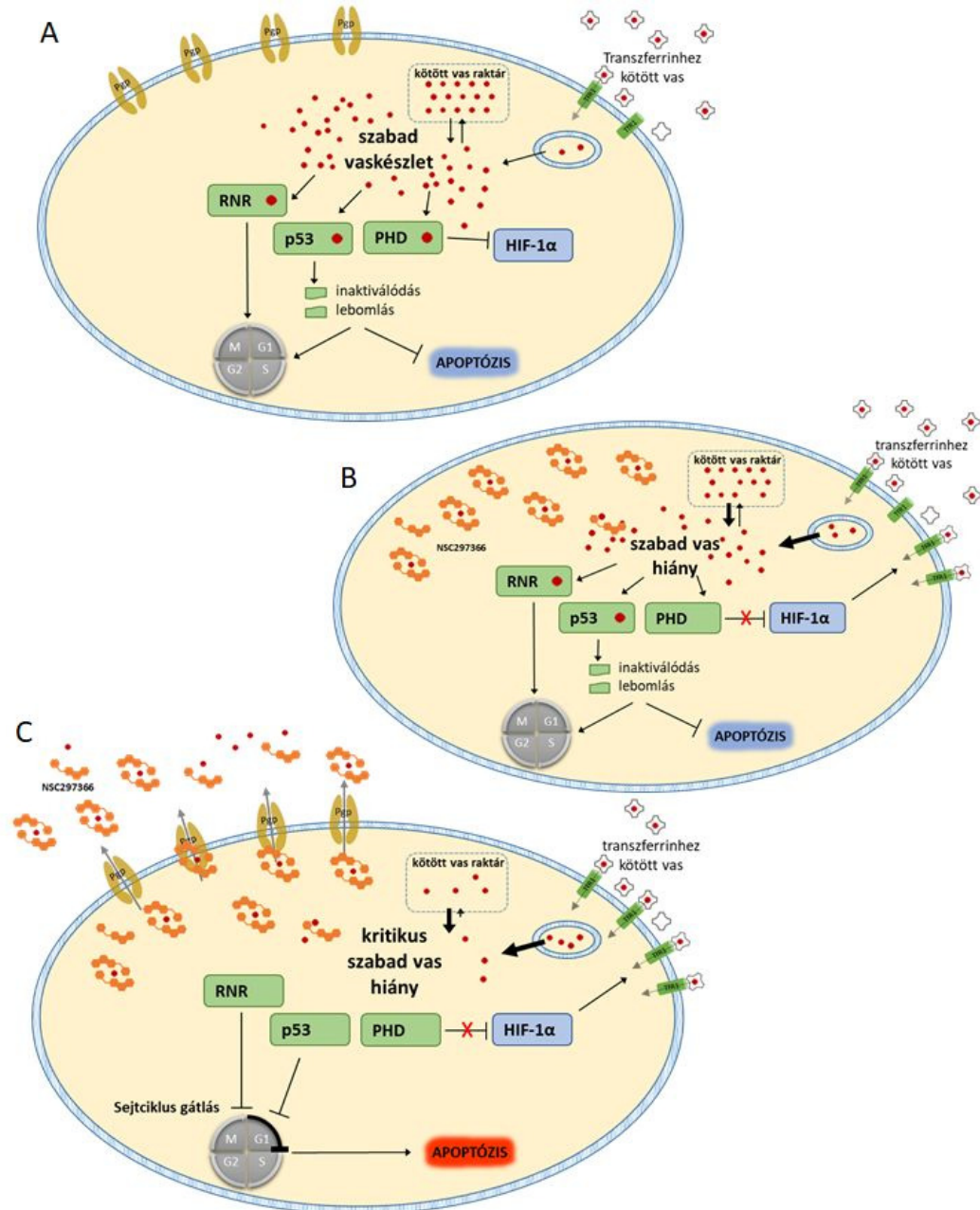
A vaskeláció, és a sejten belüli vasmennyiség depléciója a tumorok terápiájában ígéretes lehetőség, mely kihasználhatja a sejtekben lévő létfontosságú folyamatok függését a vasionok jelenlététől¹²⁸. Az MDR-szelektív NSC297366 hatása méréseink szerint függ a Pgp funkciótól, hiszen a transzporter gátlásával a szelektív hatás eltűnik. A vegyület kémiai sajátosságai alapján hatékony vaskelátor, az MDR-szelektív toxicitás vasfüggésének igazolásához azonban összetett kísérletsorozat vezetett. A legtisztábban értelmezhető eredmények érdekében izogenikus sejtvonalpárok vizsgálatával foglalkoztunk. Az NSC297366 többlet vas hozzáadásakor elveszíti szelektív toxicitását, amely utal rá, hogy vashiány keletkezett, amely pótolható. A vashiány további vizsgálata során a sejt alapvető vasháztartását vizsgáltuk, mely a szervezetben transferrinhez kötött vas felvételétől függ. A folyamatot végrehajtó sejtfelszíni jelfogó molekula, a transferrin receptor (TFR1) szintjének szabályozása vasfüggő, vashiány esetén expresszió növekedés, míg vastöbblet esetén csendesítés történik. Ezért a szabályozásért a vas-reszponzív elemhez kötődő fehérjék (IRP) felelnek¹²⁸. Kísérleteinkben MDR-szelektív kelátor NSC297366 hatására koncentrációfüggő módon változik a transferrin receptor expressziója. Emellett sikeresen igazoltuk, hogy a szintén vasfüggő prolil hidroxiláz dioxigenáz (PHD) enzimek gátlásával a Hif-1 α stabilizálódása, és hozzá kapcsolódóan az

által regulált gének (VEGFA, NDRG1, LDHA) expressziója is a vashiányos állapotnak megfelelően alakult NSC297366 kezelés hatására. Az erős indirekt bizonyítékok mellett szükséges volt a sejtpusztulással kapcsolatos hatások nyomon követésére is, melyet az NSC297366 sejtciklusra, a ribonukleotid-reduktáz aktivitásra, és az apoptózisra kifejtett, Pgp-függő hatások igazolásával végeztünk. Minden esetben kimutattuk a szelektív hatást ezekre a faktorokra Pgp-t expresszáló MES-SA/B1 sejtekben, mely a transzporter működését gátló tariquidar jelenlétében megszűnt. Fontos megemlíteni, hogy bár a 8-hidroxi-kinolin alapú ismert a vaskelációs képességéről¹⁶⁶, sem ez a molekula, sem a klinikai gyakorlatban már alkalmazott kelátor deferaxirox nem képes Pgp-függő módon hatni a sejtekben. Ennek a jelenségnek a megértéséhez mindenképpen a transzporter vasdeplecióhoz kapcsolódó funkcióját kellett mérhetővé tennünk. A sejtek teljes vastartalmát mérve egyrészt kimutattuk, hogy a kelátor és a vas komplexének együttes adásakor a Pgp működése megakadályozza a vas sejten belüli felhalmozódását a MES-SA/B1 sejtekben, amennyiben a Pgp funkció nem gátolt. Továbbmenve megvizsgáltuk, hogy már a sejten lévő vasmennyiség mobilizálható-e a sejtből a kelátor hozzáadásával. Mind a MES-SA, mind a KB sejtpanel esetében azt tapasztaltuk, hogy a Pgp expresszió lehetővé teszi az NSC297366 szelektív vasdepletáló hatását, míg a transzporter gátlás ezt a hatást is felfüggesztette. A mechanizmus konkrét megismeréséhez megvizsgáltuk az NSC297366 sejten belüli mennyiségének alakulását is, mely azt mutatta, hogy a funkcionáló Pgp akadályozza a kelátor sejten belüli felhalmozódását MES-SA/B1 sejtekben, míg a MES-SA sejtek, vagy Pgp gátlás esetén nagy mennyiségű kelátor tud felhalmozódni a sejtekben. Ez a mintázat arra utal, hogy maga a kelátor és a vas komplex a Pgp exportáló szubsztrátja. A szubsztrát aktivitást sejtmertes membrán modellrendszerben sikerült is igazolni, amely során mérhetően fokozódott a Pgp ATPáz aktivitása a vas:NSC297366 komplex jelenlétében, ami annak Pgp-szubsztrát voltát jelzi. Ezzel szemben a bizonyítottan kelátor hatású 8-hidroxi-kinolin nem stimulálta az ATPáz aktivitást, azaz nem szubsztrát, ami megmagyarázza esetében az MDR-szelektív toxicitás hiányát.

Eredményeink árnyaltabb értékeléséhez több kiegészítő vizsgálatot végeztünk. Hif-1 α csendesített sejteken megismételve a vizsgálatot azt kaptuk, hogy a Hif-1 α stabilizálódása nem feltétele a szelektív sejttölő hatásnak, de jele annak a stresszválasznak, amely a vashiány hatására korán kialakul. Kimutattuk továbbá, hogy a p53 is aktiválódik

NSC297366 hatására Pgp-pozitív sejtekben. Felmerült, hogy az MDR-szelektív toxicitás kizárólagos effektora a p53 akkumulációja, ezt azonban a funkcióképtelen mutáns p53-at expresszáló A431 és A431/B1 sejtek vizsgálatával sikerült megcáfolni. Eredményeink alátámasztják azt a korábbi megállapítást, hogy a ribonukleotid reduktáz enzim gátlása a Hif-1 α és a p53 státusztól függetlenül szabályozódhat¹⁶⁷.

A vizsgálataink alapján egy olyan, korábban ismeretlen mechanizmus képzelhető el, mely során az NSC297366 a sejtbe jut, ott a vasionokkal komplexet képezve képes fontos sejtélettani folyamatoktól elvonni azokat. Ezt az elvonó hatást szinergisztikusan erősíti a Pgp transzportfunkciója, mely a vas-kelátor komplexet eltávolítja a sejtet, kritikus vashiányos állapotba sodorva a sejtet. A vasfüggő enzimek gátlásával a sejtciklus előrehaladása, RNR funkció hiányában a DNS szintézise is gátlódik. Emellett ismert, hogy a DNS hibajavításban részt vevő gének is érzékenyek a vas hiányára¹⁶⁸, amely DNS károsodások felhalmozódásához, és végül a sejtek pusztulásához vezet. A folyamatokat a 29. ábra foglalja össze.



29. ábra: Az NSC297366 MDR-szelektív vegyület hatásmechanizmusa

A. A tumorsejtekben található, szigorúan ellenőrzött szabad vaskészlet (labile iron pool, LIP) a sejtekben számos enzim aktivitásához, és sejtleletani folyamathoz elengedhetetlen. B. Pgp nélküli sejtekben az NSC297366 a szabad vaskészlet egy részét elvonja a sejtől, melyet a sejt külső és belső forrásból pótolni képes, így a sejtleletani folyamatok változatlanul képesek működni. C. Pgp-expresszáló sejtekben az NSC297366 vassal alkotott komplexe a transzporter segítségével eltávolítódik a sejtől, ezzel a kelátor erőteljesebb, a sejt eszköztárával már nem kompenzálható, végzetes vashiányt tud okozni.

Megjegyzendő, hogy bár meggyőző bizonyítékok állnak rendelkezésre a vashiány okozta MDR-szelektív hatásmechanizmusra, elképzelhető, hogy más folyamatok is segítik ezt a hatást. Felmerül, hogy a kelátorok kölcsönhatása vassal (és emellett például réz ionokkal) fontos redukciós-oxidációs folyamatok szabályozását is módosítja¹⁴². Az MDR-szelektív hatással párhuzamosan többször leírták reaktív oxigénszármazékok (ROS) mennyiségét szabályozó glutathion mennyiségének csökkenését, ami közvetlenül is a sejtek pusztulásához vezethet. A sejt ATP mennyiség csökkenése, bár nem tűnik önmagában drámainak mérésünk alapján, az oxidatív foszforiláció aktivációján keresztül szintén hozzájárulhat a mitokondriumból felszabaduló, és a sejtet károsító ROS felhalmozódáshoz. Emellett a fémionok homeosztázisának felborulása az oxigénszármazékok lebontásában kulcsfontosságú szuperoxid-diszmutáz enzim működését is veszélyezteti¹⁶⁹. Az NSC297366 hatásmechanizmusában egyelőre nem ismert a ROS képződés jelentősége. Ugyanakkor a vas komplexálásától független mechanizmusok sem kizártak, hiszen közöltek már korábban olyan MDR-szelektív vegyületeket, melyek nem rendelkeznek vaskeláló aktivitással¹²². Bár sok leírt MDR-szelektív vegyület Pgp-működéstől függő hatékonyságát még ellenőrizni kell, a sejtben található molekulákat érintő, kezelés során megváltozott transzport- és metabolikus folyamatok elképzelhetőek alternatív mechanizmusként (a fémeket nem komplexáló vegyületek esetében), avagy a fémkeláció hatását támogató párhuzamos hatásként is, további izgalmas megoldási lehetőségeket vetítve elő az MDR tumorok terápiájában.

Az általunk leírt mechanizmus fontos lehet a további, terápiás célú gyógyszerfejlesztés szempontjából. A fejlesztések további fázisai azonban még sok kihívást tartogatnak. Egyrészt az NSC297366 oldhatósága, illetve a keringésből történő gyors lebomlása egyelőre akadályozza *in vivo* rendszerekben való vizsgálatát. Azonban, mint ahogyan a kelátor terápia klinikai tesztekben való vizsgálata is ígéretes^{131, 170}, úgy tűnik, a farmalokógiai akadály leküzdhető, illetve a további vegyületfejlesztés egyik szempontja lehet. A másik nehézség a rendkívül változó, sokszor nagyon alacsony Pgp-expresszió mellett kialakuló klinikai terápia-rezisztencia, mely felveti a kérdést, hogy mely Pgp mennyiség mellett tud már hatékonyvá válni az MDR-szelektív terápia. A MES-SA és KB sejtpanelen végzett kísérleteink azt mutatták, hogy bár az NSC297366 szelektív toxicitása arányos a Pgp mennyiségével, alacsonyabb expresszió mellett is kimutatható a hatás. Szintén biztató az az adat, hogy a vér-agy-gát sejtjei kísérletes

körülmények között ellenállónak tűnnek az MDR-szelektív terápiával szemben¹²¹. A harmadik megoldandó probléma a szisztémás és lokális hatások egyensúlyának beállítása. A tumoros betegek több, mint harmada már a terápiás protokoll kezdetén is a vörösvértestek vashiányából adódó anémiában szenved, amely a kemoterápiát követően már kétharmadukban mérhető¹⁷¹. Leggyakrabban a tumor által kiváltott krónikus gyulladás, vérzés, illetve a terápia során kialakuló vérképzési zavarok állnak a háttérben. Mivel az anémia mindenképpen megoldandó probléma, sok esetben a betegek fokozott vasbevitelére, vérképzésük serkentésére kezdődik. Ugyanakkor a vasszint emelése egyrészt a tumorok kialakulásának, másrészt növekedésének is kedvez¹²⁸. Így felmerül annak szükségessége, hogy a vas szervezetben belüli eloszlását (mely a fertőzés vagy tumor esetén lehetőséget ad a vaskészlet visszatartására), és a tumorsejtekben lévő vas elvonását szabályozó terápiák összehangolt alkalmazására lehet szükség.

7 KÖVETKEZTETÉSEK

7.1 A K-Ras aktiváló mutációiak szerepe a zoledronsav terápiával szembeni ellenállásra NSCLC tumorokban

NSCLC tumorsejt vonalak vizsgálatában megmutattuk, hogy a zoledronsav *in vitro* proliferációt és migrációt gátló hatása nem érvényesül K-Ras mutációt hordozó daganatokban.

Western Blot segítségével igazoltuk, hogy a membrán-asszociált lokalizáció, és ezzel a K-Ras aktivitás vad típusú K-Ras expresszálo sejtekben gátlható zoledronsav terápiával, míg mutációt hordozó sejtmodellekben nem.

Kimutattuk a zoledronsav apoptózisra gyakorolt sejtvonalfüggő hatását, és a zoledronsav ciszplatin toxicitását erősítő képességét K-Ras vad típusú tumorokban.

In vivo kísérletekben igazoltuk a zoledronsav tumorelles hatásának, és angiogén hatásának meglétét vad típusú K-Ras fehérjét expresszálo xenograft daganatokban.

7.2 A tumor hipoxia, és a Hif-1 α szerepének változatos kimenetele a tumorsejtek viselkedésére, így a tervezett terápiás lehetőségekre

Bemutattuk, hogy a hipoxiás környezet az általunk használt humán tumorsejtek proliferációját nem befolyásolja nagy mértékben.

Az *in vitro* motilitás és migráció vizsgálatában nagy különbségek adódtak a sejtek motilitási kapacitásában, és hipoxia általi mozgékonyáguk indukálhatóságában egyaránt.

A sejtek motilitásában fontos szerephez jutó kis GTP-áz fehérjéket kódoló gének expressziója is sejtvonalfüggést mutatott, rávilágítva a hipoxia hatásait megfogalmazó általános megállapítások limitációira, így körültekintő alkalmazásuk fontosságára.

A Hif-1 α indukció mellett a RhoA, Rac1, Cdc42 fehérjék expressziója eltérő változásokat mutat *in vitro* hipoxiás környezetben.

Az *in vivo* xenograft modellek Hif-1 α függő metasztatizáló képességében is különbségeket tapasztaltunk, míg a magasabb motilitású HT168-M1 modell intenzívebb metasztatikus aktivitást mutat a Hif-1 α indukálást követően, a HT29 modellben ez nem figyelhető meg.

A Hif-1 α közvetlen hatását a Rho GTPázok expressziójára és az áttétképző képességre shRNS általi Hif-1 α csendesítéssel igazoltuk *in vitro* és *in vivo*.

7.3 A multidrog rezisztenciát okozó Pgp működés egyben lehetséges célpont is a szelektív vasdepláció kihasználásával MDR tumorok kezelésében

Alacsony Pgp-expressziójú MES-SA humán uterin szarkóma modellsejtet, illetve ennek kemoterápiás szelekcióval létrehozott (MES-SA/DX5), vagy virális transzdukciónal létrehozott (MES-SA/B1) ABCB1-overexpresszáló sejtes rendszereit használva igazoltuk a 8-hidroxikinolin vegyületcsalád számos tagjának Pgp-függő MDR-szelektív toxicitását. Különböző Pgp-expressziójú MES-SA és KB sejtmodelleken sikeresen igazoltuk az NSC297366 MDR-szelektív hatásának és a sejtekben kifejeződő Pgp mennyiségének összefüggését.

Bemutattuk, hogy a leírt szelektív toxicitás külső többlet vas jelenlétében felfüggeszthető, illetve hogy az MDR-szelektív NSC297366 szinergisztikus kölcsönhatásban áll más vaskelátor toxikus hatásával. Igazoltuk, hogy a toxikus vegyületek vasion kelációja önmagában nem elegendő az MDR-szelektív hatáshoz.

Azonosítottuk a Pgp-expresszáló sejtekben a vashiány korai jeleit, így a vasfelvételért felelős transferrin receptor (TFR1) megnövekedett expresszióját, és a vas hiányában akkumulálódó Hif-1 α fehérjét, illetve annak aktivitását.

Részletesen igazoltuk, hogy az NSC297366 hatására kialakuló vashiányos állapot a ribonukleotid reduktáz gátlásával, a sejtciklus G1/S fázisban történő megakasztásával, később pedig a Pgp-t kifejező sejtek szelektív apoptózisával jár. Bizonyítottuk, hogy ezek a hatások a Pgp aktivitásától függenek.

Bemutattuk a sejten belüli vasmennyiség, valamint a sejten akkumulálódó NSC297366 mennyiség csökkenését funkcionáló Pgp-t hordozó sejtekben. ATP-áz aktivitás méréseinkkel rámutattunk, hogy az NSC297366:vas komplex a transzporter szubsztrátjaként viselkedik.

Bizonyítottuk, hogy az NSC297366 vashiányon keresztül megvalósuló sejtölő hatása független a Hif-1 α és a p53 aktivációjától.

Felállítottunk egy modellt az MDR-szelektív toxicitás magyarázatára, mely a Pgp export aktivitásától függő sejten belüli vasdepláción alapul. A modell szerint bizonyos vaskelátorok, így az NSC297366 is, képesek a multidrog-rezisztens tumorsejtek tulajdonságait kihasználva az MDR sejtek célzott elpusztítására. Eredményeink új irányt adhatnak az MDR tumorokat célzó terápiás szerek fejlesztésének.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori disszertációmban a tumorok terápia elleni rezisztenciájával, és progressziójával kapcsolatos eredményeket foglaltam össze. A K-Ras mutáció hatásait vizsgálva humán nem-kissejtes tüdőrák modelleken sikeresen bemutattuk, hogy a klinikumban is alkalmazott zoledronsav kezelés a K-Ras mutáns daganatokban mind *in vitro*, mind *in vivo* hatástalan, mely azt sugallja, hogy a biszfoszfonátok által kifejtett hatás nem gátolja a mutáns K-Ras fehérje transzlokációját és aktivációját. Ez fontos szempont lehet a terápiás protokoll kiválasztásakor csontáttétes daganatok esetén. A dolgozat második részében bemutattam a hipoxiás környezet, és annak fő sejten belüli szenzora, a Hif-1 α fehérje hatásait a sejtek viselkedésére *in vitro* és *in vivo*. Megmutattam, hogy bár bizonyos tumorokban az általánosan ismert folyamatok révén a hipoxia a tumorsejtek motilitási és áttétképzési potenciálját növeli, más tumorokban nem aktiválódnak hasonló folyamatok, így a tumor részletes elemzése és vizsgálata szükséges, enélkül legfeljebb óvatos jóslások tehetők az oxigénhiány hatásait illetően. A harmadik részben bemutattam a P-glycoprotein membrántranszporter működésével járó multidrog-rezisztencia, valamint a paradox párhuzamos túlérzékenység jelenségét. A munkacsoportunk által azonosított MDR-szelektív vegyületek működési modelljére felállítottunk egy hipotézist, melynek kapcsán vizsgáltuk a drog rezisztens tumorsejtek ATP- és vasháztartását. Kimutattuk, hogy a Pgp szubsztrátjai, valamint az MDR-szelektív vegyületek nem befolyásolják érdemben a sejtek ATP-készletét, így az ATP szelektív hiánya nem magyarázza tapasztalt szelektív sejtpusztulást. A vasszint visszacsatoló mechanizmusai (például a vasfelvételt végző transferrin receptor expressziója), a sejten belüli vasfüggő folyamatok (például a Hif-1 α felhalmozódása, RNR aktivitás felfüggesztése), valamint a sejtciklus és az apoptózis vizsgálatával végigkövettük az MDR-szelektív NSC297366 vegyület hatásait, komplex indirekt bizonyítékot szolgáltatva a szelektív vasdeplációra. Direkt méréseink bebizonyították, hogy mind az MDR-szelektív vegyület, mind a vas sejten belüli szintje csökken a Pgp-funkció függvényében. Ez alapján elsőként írtuk le az MDR daganatsejtek szelektív vas kiáramlason alapuló célzott terápiájának lehetőségét, amely új reményt jelenthet a korábbi terápiák számára elpusztíthatatlannak bizonyuló multidrog rezisztens tumorok kezelésére.

9 SUMMARY

In my Ph. D. thesis I summarized my projects related to cancer chemotherapy resistance and tumor progression. By the investigation of the effects of K-Ras mutation in human non-small cell lung cancer (NSCLC) models we successfully showed that zoledronic acid, a clinically applied anticancer drug treatment has limited therapeutic effect both *in vitro* and *in vivo* on K-Ras mutant tumor cells. Our results suggest that the prenylation inhibited by the bisphosphonates is not needed for the membrane association and activity of the mutated K-Ras protein. This might be an important argument for the selection of clinical regimen for NSCLC patients with bone metastases. The second part of my thesis presents the *in vitro* and *in vivo* effects of hypoxic environment and its central intracellular effector, Hif-1 α on human tumor cell model phenotypes. Our data support accepted theories suggesting that in many solid tumors, hypoxia drives cancer cells towards a motile and metastatic phenotype. On the other hand, in other models we did not experience such changes, which points out that careful investigation is needed to estimate the role of hypoxia in different tumors. In the third part I introduce the challenging field of P-glycoprotein mediated multidrug resistance, and the paradoxical phenomenon of collateral sensitivity, as a possible way to overcome MDR. We examined the detailed effects of the MDR-selective compounds identified by our research group, including testing the feasibility of ATP depletion of Pgp expressing cells due to extensive activation of the transporter ATPase activity. Importantly, we clarified whether and how depletion of intracellular iron pools may induce MDR-selective toxicity. I showed that nor Pgp substrates nor MDR-selective NSC297366 could alter significantly intracellular ATP, thus energy depletion does not explain MDR-selective toxicity. Addition of external iron reversed the MDR-selective toxicity of NSC297366. Feedback mechanisms (expression of the transferrin receptor), signs of iron-deficiency (Hif-1 α accumulation, RNR inhibition), the arrest of cell cycle and apoptosis occurred following MDR-selective NSC297366 treatment. These results served as a complex indirect proof of the role of selective iron depletion. Direct measurements confirmed that intracellular levels of both NSC297366 and iron are decreased in a Pgp-dependent manner. Based on our results we suggest that MDR-selective compounds target MDR cancer by smuggling iron from the cells, opening the way for target-based drug discovery for the eradication of resistant cancer.

10 IRODALOMJEGYZÉK

1. Pon JR, & Marra MA (2015) Driver and passenger mutations in cancer *Annu Rev Pathol* 10 25–50, <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040312>.
2. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, & Kinzler KW (2013) Cancer genome landscapes *Science* 339(6127) 1546–1558, <https://doi.org/10.1126/science.1235122>.
3. Siegel RL, Miller KD, & Jemal A (2019) Cancer statistics, 2019 *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 69(1) 7–34, <https://doi.org/10.3322/caac.21551>.
4. The Lancet (2018) GLOBOCAN 2018: counting the toll of cancer *The Lancet* 392(10152) 985, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32252-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32252-9).
5. Nemzeti Rákregiszter statisztika Retrieved online February 20, 2020 from: <http://stat.nrr.hu/>.
6. (2020) Központi statisztikai hivatal - Halálozások a gyakoribb halálokok szerint (1990–) Retrieved online February 20, 2020 from: https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_wnh001.html.
7. Dank M (2011) Kemoterápia In: *Az Onkológia tankönyve (Szerk.: Tulassay Zsolt, Matolcsy András)* Semmelweis kiadó, 157–162.
8. Wagner S, Mullins CS, & Linnebacher M (2018) Colorectal cancer vaccines: Tumor-associated antigens vs neoantigens *World J Gastroenterol* 24(48) 5418–5432, <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i48.5418>.
9. Ren R (2005) Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia *Nat Rev Cancer* 5(3) 172–183, <https://doi.org/10.1038/nrc1567>.

10. Nagini S (2017) Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players *Anticancer Agents Med Chem* 17(2) 152–163, <https://doi.org/10.2174/1871520616666160502122724>.
11. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, & Haber DA (2004) Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib *New England Journal of Medicine* 350(21) 2129–2139, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938>.
12. Kim A, & Cohen MS (2016) The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma *Expert Opin Drug Discov* 11(9) 907–916, <https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1201057>.
13. Chau CH, Steeg PS, & Figg WD (2019) Antibody–drug conjugates for cancer *The Lancet* 394(10200) 793–804, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31774-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31774-X).
14. Vrettos EI, Mező G, & Tzakos AG (2018) On the design principles of peptide–drug conjugates for targeted drug delivery to the malignant tumor site *Beilstein J Org Chem* 14 930–954, <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.80>.
15. Zhuang C, Guan X, Ma H, Cong H, Zhang W, & Miao Z (2019) Small molecule–drug conjugates: A novel strategy for cancer-targeted treatment *Eur J Med Chem* 163 883–895, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.035>.
16. Füredi A, Szebényi K, Tóth S, Cserepes M, Hamori L, Nagy V, Karai E, Vajdovich P, Imre T, Szabo P, Szuts D, Tovari J, & Szakacs G (2017) Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer *J Control Release* 261 287–296, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.010>.
17. Dank M (2011) Hormonkezelés In: *Az Onkológia tankönyve (Szerk.: Tulassay Zsolt, Matolcsy András)* Semmelweis kiadó, 162–166.

18. Gyergyay F (2011) Biológiai kezelés In: *Az Onkológia tankönyve (Szerk.: Tulassay Zsolt, Matolcsy András)* Semmelweis kiadó, 167–170.
19. Micsik T (2011) A daganatok célzott kezelése In: *Az Onkológia tankönyve (Szerk.: Tulassay Zsolt, Matolcsy András)* Semmelweis kiadó, 170–180.
20. Chen DS, & Mellman I (2017) Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point *Nature* 541(7637) 321–330, <https://doi.org/10.1038/nature21349>.
21. Dillekås H, Rogers MS, & Straume O (2019) Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med* 8(12) 5574–5576, <https://doi.org/10.1002/cam4.2474>.
22. Bareschino MA, Schettino C, Troiani T, Martinelli E, Morgillo F, & Ciardiello F (2007) Erlotinib in cancer treatment *Ann Oncol* 18 Suppl 6 vi35-41, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm222>.
23. Vasan N, Baselga J, & Hyman DM (2019) A view on drug resistance in cancer *Nature* 575(7782) 299–309, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>.
24. Endo H, & Inoue M (2019) Dormancy in cancer *Cancer Sci* 110(2) 474–480, <https://doi.org/10.1111/cas.13917>.
25. Taylor AW (2009) Ocular immune privilege *Eye (Lond)* 23(10) 1885–1889, <https://doi.org/10.1038/eye.2008.382>.
26. Forrester JV, McMenamin PG, & Dando SJ (2018) CNS infection and immune privilege *Nat Rev Neurosci* 19(11) 655–671, <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0070-8>.
27. Hunt JS (2006) Stranger in a strange land *Immunol Rev* 213 36–47, <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00436.x>.

28. Paus R, Ito N, Takigawa M, & Ito T (2003) The hair follicle and immune privilege *J Investig Dermatol Symp Proc* 8(2) 188–194, <https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2003.00807.x>.
29. Fijak M, & Meinhardt A (2006) The testis in immune privilege *Immunol Rev* 213 66–81, <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00438.x>.
30. Munn DH, & Mellor AL (2006) The tumor-draining lymph node as an immune-privileged site *Immunol Rev* 213 146–158, <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00444.x>.
31. Suzuki-Inoue K (2018) Roles of the CLEC-2-podoplanin interaction in tumor progression *Platelets* 1–7, <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1478401>.
32. Tam WL, & Weinberg RA (2013) The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer *Nat Med* 19(11) 1438–1449, <https://doi.org/10.1038/nm.3336>.
33. Chaffer CL, San Juan BP, Lim E, & Weinberg RA (2016) EMT, cell plasticity and metastasis *Cancer Metastasis Rev* 35(4) 645–654, <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9648-7>.
34. Karachaliou N, Mayo C, Costa C, Magrí I, Gimenez-Capitan A, Molina-Vila MA, & Rosell R (2013) KRAS mutations in lung cancer *Clin Lung Cancer* 14(3) 205–214, <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2012.09.007>.
35. Siddiqui AD, & Piperdi B (2010) KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy *Ann Surg Oncol* 17(4) 1168–1176, <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0811-z>.
36. Veeraraghavan J, De Angelis C, Reis-Filho JS, Prat A, Rimawi MF, Pascual T, Osborne CK, & Schiff R (2017) De-escalation of treatment in HER2-positive breast cancer: Determinants of response and mechanisms of resistance *Breast* 34(Suppl 1) S19–S26, <https://doi.org/10.1016/j.breast.2017.06.022>.

37. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, & Tannock IF (2007) Drug resistance and the solid tumor microenvironment *J Natl Cancer Inst* 99(19) 1441–1454, <https://doi.org/10.1093/jnci/djm135>.
38. Goldie JH (1994) Modelling the process of drug resistance *Lung Cancer* 10 Suppl 1 S91-96, [https://doi.org/10.1016/0169-5002\(94\)91671-3](https://doi.org/10.1016/0169-5002(94)91671-3).
39. Tecza K, Pamula-Pilat J, Lanuszewska J, Butkiewicz D, & Grzybowska E (2018) Pharmacogenetics of toxicity of 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer patients *Oncotarget* 9(10) 9114–9136, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24148>.
40. Sau S, Alsaab HO, Kashaw SK, Tatiparti K, & Iyer AK (2017) Advances in antibody–drug conjugates: a new era of targeted cancer therapy *Drug Discov Today* 22(10) 1547–1556, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.011>.
41. Dagogo-Jack I, & Shaw AT (2018) Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies *Nat Rev Clin Oncol* 15(2) 81–94, <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>.
42. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Børresen-Dale A-L, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjörd JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Hutter B, Ilicic T, Imbeaud S, Imielinski M, Imielinsk M, Jäger N, Jones DTW, Jones D, Knappskog S, Kool M, Lakhani SR, López-Otín C, Martin S, Munshi NC, Nakamura H, Northcott PA, Pajic M, Papaemmanuil E, Paradiso A, Pearson JV, Puente XS, Raine K, Ramakrishna M, Richardson AL, Richter J, Rosenstiel P, Schlesner M, Schumacher TN, Span PN, Teague JW, Totoki Y, Tutt ANJ, Valdés-Mas R, van Buuren MM, van 't Veer L, Vincent-Salomon A, Waddell N, Yates LR, Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, ICGC Breast Cancer Consortium, ICGC MMML-Seq Consortium, ICGC PedBrain, Zucman-Rossi J, Futreal PA, McDermott U, Lichter P, Meyerson M, Grimmond SM, Siebert R, Campo E, Shibata T, Pfister SM, Campbell PJ, & Stratton MR (2013)

- Signatures of mutational processes in human cancer *Nature* 500(7463) 415–421, <https://doi.org/10.1038/nature12477>.
43. Fujita K (2006) Cytochrome P450 and anticancer drugs *Curr Drug Metab* 7(1) 23–37, <https://doi.org/10.2174/138920006774832587>.
 44. Pan S-T, Li Z-L, He Z-X, Qiu J-X, & Zhou S-F (2016) Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy *Clin Exp Pharmacol Physiol* 43(8) 723–737, <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12581>.
 45. Gimple RC, & Wang X (2019) RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry *Front Oncol*, <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00965>.
 46. Hobbs GA, Der CJ, & Rossman KL (2016) RAS isoforms and mutations in cancer at a glance *J Cell Sci* 129(7) 1287–1292, <https://doi.org/10.1242/jcs.182873>.
 47. Misale S, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Siena S, & Bardelli A (2014) Resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer: from heterogeneity to convergent evolution *Cancer Discov* 4(11) 1269–1280, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0462>.
 48. 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) 1819–1828, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.04.001>.
 49. McCormick F (2015) KRAS as a Therapeutic Target *Clin Cancer Res* 21(8) 1797–1801, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2662>.
 50. Drosten M, Dhawahir A, Sum EYM, Urosevic J, Lechuga CG, Esteban LM, Castellano E, Guerra C, Santos E, & Barbacid M (2010) Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival *EMBO J* 29(6) 1091–1104, <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.7>.

51. Holderfield M (2018) Efforts to Develop KRAS Inhibitors Cold Spring Harb Perspect Med, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031864>.
52. Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D, Gaida K, Holt T, Knutson CG, Koppada N, Lanman BA, Werner J, Rapaport AS, San Miguel T, Ortiz R, Osgood T, Sun J-R, Zhu X, McCarter JD, Volak LP, Houk BE, Fakih MG, O'Neil BH, Price TJ, Falchook GS, Desai J, Kuo J, Govindan R, Hong DS, Ouyang W, Henary H, Arvedson T, Cee VJ, & Lipford JR (2019) The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity *Nature* 575(7781) 217–223, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1694-1>.
53. Hallin J, Engstrom LD, Hargis L, Calinisan A, Aranda R, Briere DM, Sudhakar N, Bowcut V, Baer BR, Ballard JA, Burkard MR, Fell JB, Fischer JP, Vigers GP, Xue Y, Gatto S, Fernandez-Banet J, Pavlicek A, Velastagui K, Chao RC, Barton J, Pierobon M, Baldelli E, Patricoin EF, Cassidy DP, Marx MA, Rybkin II, Johnson ML, Ou S-HI, Lito P, Papadopoulos KP, Jänne PA, Olson P, & Christensen JG (2020) The KRASG12C Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients *Cancer Discov* 10(1) 54–71, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1167>.
54. Zorde Khvalevsky E, Gabai R, Rachmut IH, Horwitz E, Brunschwig Z, Orbach A, Shemi A, Golan T, Domb AJ, Yavin E, Giladi H, Rivkin L, Simerzin A, Eliakim R, Khalaileh A, Hubert A, Lahav M, Kopelman Y, Goldin E, Dancour A, Hants Y, Arbel-Alon S, Abramovitch R, Shemi A, & Galun E (2013) Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(51) 20723–20728, <https://doi.org/10.1073/pnas.1314307110>.
55. Sebti SM, & Hamilton AD (1997) Inhibition of Ras prenylation: a novel approach to cancer chemotherapy *Pharmacol Ther* 74(1) 103–114, [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(97\)00014-4](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(97)00014-4).
56. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, & Rogers MJ (1998) Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent

- post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras *J Bone Miner Res* 13(4) 581–589, <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.4.581>.
57. Lipton A (2004) Pathophysiology of bone metastases: how this knowledge may lead to therapeutic intervention *J Support Oncol* 2(3) 205–213; discussion 213–214, 216–217, 219–220.
 58. Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, Delmas P, Delaissé JM, & Clézardin P (2000) Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases *Cancer Res* 60(11) 2949–2954.
 59. Polascik TJ, & Mouraviev V (2008) Zoledronic acid in the management of metastatic bone disease *Ther Clin Risk Manag* 4(1) 261–268.
 60. Warburg O, Posener K, & Negelein E (1924) The metabolism of cancer cells *Biochem Z* (152) 319–44.
 61. Heiden MG, Cantley LC, & Thompson CB (2009) Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation *Science* 324(5930) 1029–1033, <https://doi.org/10.1126/science.1160809>.
 62. Mishra D, & Banerjee D (2019) Lactate Dehydrogenases as Metabolic Links between Tumor and Stroma in the Tumor Microenvironment *Cancers* (Basel), <https://doi.org/10.3390/cancers11060750>.
 63. Vaupel P, & Mayer A (2017) Tumor Oxygenation Status: Facts and Fallacies *Adv Exp Med Biol* 977 91–99, https://doi.org/10.1007/978-3-319-55231-6_13.
 64. Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy *Nat Rev Cancer* 3(10) 721–732, <https://doi.org/10.1038/nrc1187>.
 65. Horsman MR, & Overgaard J (2016) The impact of hypoxia and its modification of the outcome of radiotherapy *J Radiat Res* 57 Suppl 1 i90–i98, <https://doi.org/10.1093/jrr/rrw007>.

66. Pugh CW, & Ratcliffe PJ (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system *Nat Med* 9(6) 677–684, <https://doi.org/10.1038/nm0603-677>.
67. Hayashi Y, Yokota A, Harada H, & Huang G (2019) Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer *Cancer Sci* 110(5) 1510–1517, <https://doi.org/10.1111/cas.13990>.
68. Maxwell P, & Salnikow K (2004) HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor *Cancer Biol Ther* 3(1) 29–35, <https://doi.org/10.4161/cbt.3.1.547>.
69. Bruegge K, Jelkmann W, & Metzen E (2007) Hydroxylation of hypoxia-inducible transcription factors and chemical compounds targeting the HIF-alpha hydroxylases *Curr Med Chem* 14(17) 1853–1862, <https://doi.org/10.2174/092986707781058850>.
70. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, & Gassmann M (2001) Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous *The FASEB Journal* 15(7) 1312–1314, <https://doi.org/10.1096/fj.00-0732fje>.
71. Semenza GL (2004) Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level *Physiology (Bethesda)* 19 176–182, <https://doi.org/10.1152/physiol.00001.2004>.
72. Fu XS, Choi E, Bublej GJ, & Balk SP (2005) Identification of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) polymorphism as a mutation in prostate cancer that prevents normoxia-induced degradation *Prostate* 63(3) 215–221, <https://doi.org/10.1002/pros.20190>.
73. Wilson WR, & Hay MP (2011) Targeting hypoxia in cancer therapy *Nat Rev Cancer* 11(6) 393–410, <https://doi.org/10.1038/nrc3064>.
74. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, & Wenger RH (2003) The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy *Oncogene* 22(21) 3213–3220, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206385>.

75. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, & Semenza GL (2001) Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer *Cancer Res* 61(7) 2911–2916.
76. Nabi S, Kessler ER, Bernard B, Flaig TW, & Lam ET (2018) Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology *F1000Res*, <https://doi.org/10.12688/f1000research.13179.1>.
77. Semenza GL (2002) HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics *Trends Mol Med* 8(4 Suppl) S62-67, [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(02\)02317-1](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(02)02317-1).
78. Greenberger LM, Horak ID, Filpula D, Sapra P, Westergaard M, Frydenlund HF, Albaek C, Schröder H, & Ørum H (2008) A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1alpha, EZN-2968, inhibits tumor cell growth *Mol Cancer Ther* 7(11) 3598–3608, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0510>.
79. Lee K, & Kim HM (2011) A novel approach to cancer therapy using PX-478 as a HIF-1 α inhibitor *Arch Pharm Res* 34(10) 1583–1585, <https://doi.org/10.1007/s12272-011-1021-3>.
80. Liu X, Chen Z, Xu C, Leng X, Cao H, Ouyang G, & Xiao W (2015) Repression of hypoxia-inducible factor α signaling by Set7-mediated methylation *Nucleic Acids Res* 43(10) 5081–5098, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv379>.
81. Ibrahim NO, Hahn T, Franke C, Stiehl DP, Wirthner R, Wenger RH, & Katschinski DM (2005) Induction of the hypoxia-inducible factor system by low levels of heat shock protein 90 inhibitors *Cancer Res* 65(23) 11094–11100, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1877>.
82. Kubo T, Maezawa N, Osada M, Katsumura S, Funae Y, & Imaoka S (2004) Bisphenol A, an environmental endocrine-disrupting chemical, inhibits hypoxic response via degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha): structural requirement of bisphenol A for degradation of HIF-1alpha *Biochem*

Biophys Res Commun 318(4) 1006–1011, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.125>.

83. Scheuermann TH, Tomchick DR, Machius M, Guo Y, Bruick RK, & Gardner KH (2009) Artificial ligand binding within the HIF2 α PAS-B domain of the HIF2 transcription factor *Proc Natl Acad Sci USA* 106(2) 450–455, <https://doi.org/10.1073/pnas.0808092106>.
84. Lee K, Zhang H, Qian DZ, Rey S, Liu JO, & Semenza GL (2009) Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization *Proc Natl Acad Sci USA* 106(42) 17910–17915, <https://doi.org/10.1073/pnas.0909353106>.
85. Kong D, Park EJ, Stephen AG, Calvani M, Cardellina JH, Monks A, Fisher RJ, Shoemaker RH, & Melillo G (2005) Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity *Cancer Res* 65(19) 9047–9055, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1235>.
86. Kung AL, Zabludoff SD, France DS, Freedman SJ, Tanner EA, Vieira A, Cornell-Kennon S, Lee J, Wang B, Wang J, Memmert K, Naegeli H-U, Petersen F, Eck MJ, Bair KW, Wood AW, & Livingston DM (2004) Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway *Cancer Cell* 6(1) 33–43, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.009>.
87. Minegishi H, Fukashiro S, Ban HS, & Nakamura H (2013) Discovery of Indenopyrazoles as a New Class of Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 Inhibitors *ACS Med Chem Lett* 4(2) 297–301, <https://doi.org/10.1021/ml3004632>.
88. Yu T, Tang B, & Sun X (2017) Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy *Yonsei Medical Journal* 58(3) 489, <https://doi.org/10.3349/ymj.2017.58.3.489>.
89. Tang W, & Zhao G (2020) Small molecules targeting HIF-1 α pathway for cancer therapy in recent years *Bioorg Med Chem* 28(2) 115235, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115235>.

90. Hsu C-W, Huang R, Khuc T, Shou D, Bullock J, Grooby S, Griffin S, Zou C, Little A, Astley H, & Xia M (2016) Identification of approved and investigational drugs that inhibit hypoxia-inducible factor-1 signaling *Oncotarget* 7(7) 8172–8183, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6995>.
91. Etienne-Manneville S, & Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology *Nature* 420(6916) 629–635, <https://doi.org/10.1038/nature01148>.
92. Vogel S, Wottawa M, Farhat K, Zieseniss A, Schnelle M, Le-Huu S, von Ahlen M, Malz C, Camenisch G, & Katschinski DM (2010) Prolyl hydroxylase domain (PHD) 2 affects cell migration and F-actin formation via RhoA/rho-associated kinase-dependent cofilin phosphorylation *J Biol Chem* 285(44) 33756–33763, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.132985>.
93. Zhou J, Dehne N, & Brüne B (2009) Nitric oxide causes macrophage migration via the HIF-1-stimulated small GTPases Cdc42 and Rac1 *Free Radical Biology and Medicine* 47(6) 741–749, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.006>.
94. Gilkes DM, Xiang L, Lee SJ, Chaturvedi P, Hubbi ME, Wirtz D, & Semenza GL (2014) Hypoxia-inducible factors mediate coordinated RhoA-ROCK1 expression and signaling in breast cancer cells *Proc Natl Acad Sci USA* 111(3) E384-393, <https://doi.org/10.1073/pnas.1321510111>.
95. Turcotte S, Desrosiers RR, & Béliveau R (2003) HIF-1alpha mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma *J Cell Sci* 116(Pt 11) 2247–2260, <https://doi.org/10.1242/jcs.00427>.
96. Zieseniss A (2014) Hypoxia and the modulation of the actin cytoskeleton - emerging interrelations *Hypoxia (Auckl)* 2 11–21, <https://doi.org/10.2147/HP.S53575>.
97. Olbryt M, Habryka A, Student S, Jarzab M, Tyszkiewicz T, & Lisowska KM (2014) Global Gene Expression Profiling in Three Tumor Cell Lines Subjected to Experimental Cycling and Chronic Hypoxia *PLoS One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105104>.

98. Amawi H, Sim H-M, Tiwari AK, Ambudkar SV, & Shukla S (2019) ABC Transporter-Mediated Multidrug-Resistant Cancer *Adv Exp Med Biol* 1141 549–580, https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_12.
99. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, & Gottesman MM (2006) Targeting multidrug resistance in cancer *Nat Rev Drug Discov* 5(3) 219–234, <https://doi.org/10.1038/nrd1984>.
100. Jones PM, & George AM (2004) The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research *Cell Mol Life Sci* 61(6) 682–699, <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3336-9>.
101. Borst P, & Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease *Annu Rev Biochem* 71 537–592, <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055>.
102. Juliano RL, & Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 455(1) 152–162, [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7).
103. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, & Chang G (2009) Structure of P-glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding *Science* 323(5922) 1718–1722, <https://doi.org/10.1126/science.1168750>.
104. Kim JW, Park Y, Roh J-L, Cho K-J, Choi S-H, Nam SY, & Kim SY (2016) Prognostic value of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein expression in oral cavity cancer *Int J Clin Oncol* 21(5) 883–889, <https://doi.org/10.1007/s10147-016-0973-1>.
105. Filipits M, Stranzl T, Pohl G, Heinzl H, Jäger U, Geissler K, Fonatsch C, Haas OA, Lechner K, & Pirker R (2000) Drug resistance factors in acute myeloid leukemia: a comparative analysis *Leukemia* 14(1) 68–76, <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401634>.

106. Yuan J, Yin Z, Tan L, Zhu W, Tao K, Wang G, Shi W, & Gao J (2019) Interferon regulatory factor-1 reverses chemoresistance by downregulating the expression of P-glycoprotein in gastric cancer *Cancer Letters* 457 28–39, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.05.006>.
107. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, & Gottesman MM (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39 361–398, <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361>.
108. Drug, OTCs & Herbals | Medscape Reference Retrieved online February 13, 2020 from: <https://reference.medscape.com/drugs>.
109. Brown KR (1998) Changes in the use profile of Mectizan: 1987-1997 *Ann Trop Med Parasitol* 92 Suppl 1 S61-64, <https://doi.org/10.1080/00034989859564>.
110. Roy A, Murakami M, Ernsting MJ, Hoang B, Undzys E, & Li S-D (2014) Carboxymethylcellulose-based and docetaxel-loaded nanoparticles circumvent P-glycoprotein mediated multidrug resistance *Mol Pharm* 11(8) 2592–2599, <https://doi.org/10.1021/mp400643p>.
111. Ma P, & Mumper RJ (2013) Anthracycline Nano-Delivery Systems to Overcome Multiple Drug Resistance: A Comprehensive Review *Nano Today* 8(3) 313–331, <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2013.04.006>.
112. Dubikovskaya EA, Thorne SH, Pillow TH, Contag CH, & Wender PA (2008) Overcoming multidrug resistance of small-molecule therapeutics through conjugation with releasable octaarginine transporters *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(34) 12128–12133, <https://doi.org/10.1073/pnas.0805374105>.
113. Pál C, Papp B, & Lázár V (2015) Collateral sensitivity of antibiotic-resistant microbes *Trends Microbiol* 23(7) 401–407, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.009>.
114. Lorendeau D, Dury L, Nasr R, Boumendjel A, Teodori E, Gutschow M, Falson P, Di Pietro A, & Baubichon-Cortay H (2017) MRP1-dependent Collateral

- Sensitivity of Multidrug-resistant Cancer Cells: Identifying Selective Modulators Inducing Cellular Glutathione Depletion *Curr Med Chem* 24(12) 1186–1213, <https://doi.org/10.2174/0929867324666161118130238>.
115. Szakács G, Annereau J-P, Lababidi S, Shankavaram U, Arciello A, Bussey KJ, Reinhold W, Guo Y, Kruh GD, Reimers M, Weinstein JN, & Gottesman MM (2004) Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells *Cancer Cell* 6(2) 129–137, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.026>.
 116. Ludwig JA, Szakács G, Martin SE, Chu BF, Cardarelli C, Sauna ZE, Caplen NJ, Fales HM, Ambudkar SV, Weinstein JN, & Gottesman MM (2006) Selective toxicity of NSC73306 in MDR1-positive cells as a new strategy to circumvent multidrug resistance in cancer *Cancer Res* 66(9) 4808–4815, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3322>.
 117. Türk D, Hall MD, Chu BF, Ludwig JA, Fales HM, Gottesman MM, & Szakács G (2009) Identification of compounds selectively killing multidrug-resistant cancer cells *Cancer Res* 69(21) 8293–8301, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2422>.
 118. Pape VFS, Tóth S, Füredi A, Szebényi K, Lovrics A, Szabó P, Wiese M, & Szakács G (2016) Design, synthesis and biological evaluation of thiosemicarbazones, hydrazinobenzothiazoles and arylhydrazones as anticancer agents with a potential to overcome multidrug resistance *Eur J Med Chem* 117 335–354, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.078>.
 119. Laberge R-M, Ambadipudi R, & Georges E (2014) P-glycoprotein mediates the collateral sensitivity of multidrug resistant cells to steroid hormones *Biochem Biophys Res Commun* 447(4) 574–579, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.045>.
 120. Bentley J, Bell SE, Quinn DM, Kellett GL, & Warr JR (1996) 2-deoxy-D-glucose toxicity and transport in human multidrug-resistant KB carcinoma cell lines *Oncol Res* 8(2) 77–84.

121. Füredi A, Tóth S, Szabéni K, Pape VFS, Türk D, Kucsma N, Cervenak L, Tóvári J, & Szakács G (2017) Identification and Validation of Compounds Selectively Killing Resistant Cancer: Delineating Cell Line-Specific Effects from P-Glycoprotein-Induced Toxicity *Mol Cancer Ther* 16(1) 45–56, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0333-T>.
122. Szakács G, Hall MD, Gottesman MM, Boumendjel A, Kachadourian R, Day BJ, Baubichon-Cortay H, & Di Pietro A (2014) Targeting the Achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance *Chem Rev* 114(11) 5753–5774, <https://doi.org/10.1021/cr4006236>.
123. Georges E, Lian J, & Laberge R (2014) A tamoxifen derivative, N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl) phenoxy] ethanamine, selectively targets P-glycoprotein-positive multidrug resistant Chinese hamster cells *Biochem Pharmacol* 90(2) 107–114, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.04.017>.
124. Kabanov AV, Batrakova EV, & Alakhov VYu (2003) An essential relationship between ATP depletion and chemosensitizing activity of Pluronic® block copolymers *J Control Release* 91(0) 75–83.
125. Yu Y, Kovacevic Z, & Richardson DR (2007) Tuning cell cycle regulation with an iron key *Cell Cycle* 6(16) 1982–1994, <https://doi.org/10.4161/cc.6.16.4603>.
126. Richardson DR (2005) Molecular mechanisms of iron uptake by cells and the use of iron chelators for the treatment of cancer *Curr Med Chem* 12(23) 2711–2729, <https://doi.org/10.2174/092986705774462996>.
127. Paul BT, Manz DH, Torti FM, & Torti SV (2017) Mitochondria and Iron: Current Questions *Expert Rev Hematol* 10(1) 65–79, <https://doi.org/10.1080/17474086.2016.1268047>.
128. Torti SV, Manz DH, Paul BT, Blanchette-Farra N, & Torti FM (2018) Iron and Cancer *Annu Rev Nutr* 38 97–125, <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082117-051732>.

129. Wang L, Li X, Mu Y, Lu C, Tang S, Lu K, Qiu X, Wei A, Cheng Y, & Wei W (2019) The iron chelator desferrioxamine synergizes with chemotherapy for cancer treatment *J Trace Elem Med Biol* 56 131–138, <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.07.008>.
130. Urano S, Ohara T, Noma K, Katsube R, Ninomiya T, Tomono Y, Tazawa H, Kagawa S, Shirakawa Y, Kimura F, Nouse K, Matsukawa A, Yamamoto K, & Fujiwara T (2016) Iron depletion enhances the effect of sorafenib in hepatocarcinoma *Cancer Biol Ther* 17(6) 648–656, <https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1177677>.
131. Corcé V, Gouin SG, Renaud S, Gaboriau F, & Deniaud D (2016) Recent advances in cancer treatment by iron chelators *Bioorg Med Chem Lett* 26(2) 251–256, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.11.094>.
132. Lui GYL, Obeidy P, Ford SJ, Tselepis C, Sharp DM, Jansson PJ, Kalinowski DS, Kovacevic Z, Lovejoy DB, & Richardson DR (2013) The iron chelator, deferasirox, as a novel strategy for cancer treatment: oral activity against human lung tumor xenografts and molecular mechanism of action *Mol Pharmacol* 83(1) 179–190, <https://doi.org/10.1124/mol.112.081893>.
133. Kakhlon O, & Cabantchik ZI (2002) The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1) *Free Radic Biol Med* 33(8) 1037–1046, [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01006-7](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01006-7).
134. Chou T-C (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies *Pharmacol Rev* 58(3) 621–681, <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>.
135. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent *J Biol Chem* 193(1) 265–275.
136. Homolya L, Holló M, Müller M, Mechetner EB, & Sarkadi B (1996) A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells. *Br J Cancer* 73(7) 849–855.

137. Sarkadi B, Price EM, Boucher RC, Germann UA, & Scarborough GA (1992) Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase *J Biol Chem* 267(7) 4854–4858.
138. Wilson PM, Labonte MJ, Russell J, Louie S, Ghobrial AA, & Ladner RD (2011) A novel fluorescence-based assay for the rapid detection and quantification of cellular deoxyribonucleoside triphosphates *Nucleic Acids Res* 39(17) e112, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr350>.
139. Szabó JE, Surányi ÉV, Mébold BS, Trombitás T, Cserepes M, & Tóth J A user-friendly, high-throughput tool for the precise fluorescent quantification of deoxyribonucleoside triphosphates from biological samples *Nucleic Acids Res* 48(8) e45, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa116>.
140. Polgári Z, Ajtony Z, Kregsamer P, Strelci C, Mihucz VG, Réti A, Budai B, Kralovánszky J, Szoboszlai N, & Zárny G (2011) Microanalytical method development for Fe, Cu and Zn determination in colorectal cancer cells *Talanta* 85(4) 1959–1965, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.015>.
141. Pape VFS, Türk D, Szabó P, Wiese M, Enyedy EA, & Szakács G (2015) Synthesis and characterization of the anticancer and metal binding properties of novel pyrimidinylhydrazone derivatives *J Inorg Biochem* 144 18–30, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.12.015>.
142. Pape VFS, May NV, Gál GT, Szatmári I, Szeri F, Fülöp F, Szakács G, & Enyedy ÉA (2018) Impact of copper and iron binding properties on the anticancer activity of 8-hydroxyquinoline derived Mannich bases *Dalton Trans* 47(47) 17032–17045, <https://doi.org/10.1039/c8dt03088j>.
143. PubChem: 6-Chloro-3-[(2-fluorophenyl)methyl]-2,4-dihydropyrido[3,2-h][1,3]benzoxazine Retrieved online March 2, 2020 from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/326326>.

144. Le NTV, & Richardson DR (2002) The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1603(1) 31–46, [https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(02\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(02)00068-9).
145. Machon C, Jordheim LP, Puy J-Y, Lefebvre I, Dumontet C, & Guitton J (2014) Fully validated assay for the quantification of endogenous nucleoside mono- and triphosphates using online extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry *Anal Bioanal Chem* 406(12) 2925–2941, <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7711-1>.
146. Zhang J, & Chen X (2019) p53 tumor suppressor and iron homeostasis *FEBS J* 286(4) 620–629, <https://doi.org/10.1111/febs.14638>.
147. Reiss M, Brash DE, Muñoz-Antonia T, Simon JA, Ziegler A, Vellucci VF, & Zhou ZL (1992) Status of the p53 tumor suppressor gene in human squamous carcinoma cell lines *Oncol Res* 4(8–9) 349–357.
148. Renaud S, Guerrera F, Seitlinger J, Reeb J, Voegeli A-C, Legrain M, Mennequier B, Santelmo N, Falcoz P-E, Quoix E, Chenard M-P, Weingertner N, Beau-Faller M, & Massard G (2018) KRAS-specific Amino Acid Substitutions are Associated With Different Responses to Chemotherapy in Advanced Non-small-cell Lung Cancer *Clinical Lung Cancer* 19(6) e919–e931, <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.08.005>.
149. Dong Z-Y, Zhong W-Z, Zhang X-C, Su J, Xie Z, Liu S-Y, Tu H-Y, Chen H-J, Sun Y-L, Zhou Q, Yang J-J, Yang X-N, Lin J-X, Yan H-H, Zhai H-R, Yan L-X, Liao R-Q, Wu S-P, & Wu Y-L (2017) Potential Predictive Value of TP53 and KRAS Mutation Status for Response to PD-1 Blockade Immunotherapy in Lung Adenocarcinoma *Clin Cancer Res* 23(12) 3012–3024, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2554>.
150. Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, Haller A, Lothaire P, Meert A-P, Noel S, Lafitte J-J, & Sculier J-P (2005) The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the

- literature with meta-analysis *Br J Cancer* 92(1) 131–139, <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602258>.
151. Xu J, Pan Q, & Ju W (2019) Ras inhibition by zoledronic acid effectively sensitizes cervical cancer to chemotherapy *Anticancer Drugs* 30(8) 821–827, <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000779>.
 152. Dai X, Xia H, Zhou S, Tang Q, & Bi F (2019) Zoledronic acid enhances the efficacy of the MEK inhibitor trametinib in KRAS mutant cancers *Cancer Lett* 442 202–212, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.10.022>.
 153. Baranyi M, Rittler D, Molnár E, Shirasawa S, Jalsovszky I, Varga IK, Hegedűs L, Németh A, Dank M, Aigner C, Tóvári J, Tímár J, Hegedűs B, & Garay T (2020) Next Generation Lipophilic Bisphosphonate Shows Antitumor Effect in Colorectal Cancer In Vitro and In Vivo *Pathol Oncol Res*, <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00789-9>.
 154. Cheng H-L, Lin C-W, Yang J-S, Hsieh M-J, Yang S-F, & Lu K-H (2016) Zoledronate blocks geranylgeranylation not farnesylation to suppress human osteosarcoma U2OS cells metastasis by EMT via Rho A activation and FAK-inhibited JNK and p38 pathways *Oncotarget* 7(9) 9742–9758, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7138>.
 155. Zhang Q, Yan Q, Yang H, & Wei W (2019) Oxygen sensing and adaptability won the 2019 Nobel Prize in Physiology or medicine *Genes Dis* 6(4) 328–332, <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.10.006>.
 156. Semenza GL (2007) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway *Sci STKE* 2007(407) cm8, <https://doi.org/10.1126/stke.4072007cm8>.
 157. Viallard C, & Larrivée B (2017) Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets *Angiogenesis* 20(4) 409–426, <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>.

158. Macklin PS, McAuliffe J, Pugh CW, & Yamamoto A (2017) Hypoxia and HIF pathway in cancer and the placenta *Placenta* 56 8–13, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.03.010>.
159. Swartz JE, Pothen AJ, Stegeman I, Willems SM, & Grolman W (2015) Clinical implications of hypoxia biomarker expression in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review *Cancer Med* 4(7) 1101–1116, <https://doi.org/10.1002/cam4.460>.
160. Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, & Gottesman MM (2018) Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer *Nat Rev Cancer* 18(7) 452–464, <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>.
161. Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, & Brodeur GM (1989) Expression of a multidrug resistance gene in human cancers *J Natl Cancer Inst* 81(2) 116–124, <https://doi.org/10.1093/jnci/81.2.116>.
162. Robey RW, Massey PR, Amiri-Kordestani L, & Bates SE (2010) ABC Transporters: Unvalidated Therapeutic Targets in Cancer and the CNS *Anticancer Agents Med Chem* 10(8) 625–633.
163. Rao DK, Liu H, Ambudkar SV, & Mayer M (2014) A combination of curcumin with either gramicidin or ouabain selectively kills cells that express the multidrug resistance-linked ABCG2 transporter *J Biol Chem* 289(45) 31397–31410, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576819>.
164. Zheng X, Andruska N, Lambrecht MJ, He S, Parissenti A, Hergenrother PJ, Nelson ER, & Shapiro DJ (2018) Targeting multidrug-resistant ovarian cancer through estrogen receptor α dependent ATP depletion caused by hyperactivation of the unfolded protein response *Oncotarget* 9(19) 14741–14753, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10819>.

165. Oliveri V, & Vecchio G (2016) 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective *Eur J Med Chem* 120 252–274, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.007>.
166. Foskolou IP, Jorgensen C, Leszczynska KB, Olcina MM, Tarhonskaya H, Haisma B, D'Angiolella V, Myers WK, Domene C, Flashman E, & Hammond EM (2017) Ribonucleotide Reductase Requires Subunit Switching in Hypoxia to Maintain DNA Replication *Mol Cell* 66(2) 206-220.e9, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.005>.
167. Puig S, Ramos-Alonso L, Romero AM, & Martínez-Pastor MT (2017) The elemental role of iron in DNA synthesis and repair *Metallomics* 9(11) 1483–1500, <https://doi.org/10.1039/c7mt00116a>.
168. Liou G-Y, & Storz P (2010) Reactive oxygen species in cancer Free Radic Res, <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>.
169. Merlot AM, Kalinowski DS, & Richardson DR (2013) Novel chelators for cancer treatment: where are we now? *Antioxid Redox Signal* 18(8) 973–1006, <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4540>.
170. Abiri B, & Vafa M (2019) Iron Deficiency and Anemia in Cancer Patients: The Role of Iron Treatment in Anemic Cancer Patients *Nutr Cancer* 1–9, <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1658794>.

11 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1 Az értekezés témájában megjelent saját közlemények

Cserepes M, Türk D, Tóth S, Pape V F S, Gaál A, Gera M, Szabó J E, Kucsma N, Várady G, Vértessy B G, Strehli C, Szabó P T, Tóvári J, Szoboszlai N, Szakács G, (2020). Unshielding multidrug resistant cancer through selective iron depletion of P-glycoprotein expressing cells. *Cancer Research* 80(4):663-674. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1407

Tátrai E., Bartal A., Gacs A., Paku S., Kenessey I., Garay T., Hegedűs B., Molnár E., Cserepes M., Hegedűs Z., Kucsma N, Szakács G, Tóvári J. (2017). Cell type-dependent HIF1 alpha-mediated effects of hypoxia on proliferation, migration and metastatic potential of human tumor cells. *Oncotarget* 8, 44498–44510. doi: 10.18632/oncotarget.17806

Kenessey I., Kói K., Horváth O., Cserepes M., Molnár D., Izsák V., Dobos J., Hegedűs B., Tóvári J., Tímár J. (2016). KRAS-mutation status dependent effect of zoledronic acid in human non-small cell cancer preclinical models. *Oncotarget* 7, 79489–79500. doi: 10.18632/oncotarget.12806

11.2 Egyéb közlemények

Szabó J. E., Surányi E. V., Mébold B. S., Trombitás T., Cserepes M., Tóth J. (2020): A user-friendly, high-throughput tool for the precise fluorescent quantification of deoxyribonucleoside triphosphates from biological samples. *Nucleic Acids Research*, 48(8):e45 (doi: 10.1093/nar/gkaa116)

Baska F., Sipos A., Órfi Z., Nemes Z., Dobos J., Szántai-Kis C., Szabó E., Szénási G., Dézsi L., Hamar P., Cserepes M., Tóvári J., Garamvölgyi R., Krekó M., Órfi, L. (2019). Discovery and development of extreme selective inhibitors of the ITD and D835Y mutant FLT3 kinases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 184, UNSP 111710. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111710>

Kenessey I., Kramer Z., István L., Cserepes M., Garay T., Hegedűs B., Dobos J., Tímár J., Tóvári J. (2018). Inhibition of epidermal growth factor receptor improves

antitumor efficacy of vemurafenib in BRAF-mutant human melanoma in preclinical model. *Melanoma Research*, 28(6), 536–546. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000488>

Füredi A., Szabó P., Tóth S., Cserepes M., Hámori L., Nagy V., Karai E., Vajdovich P., Imre T., Szabó P., Szüts D., Tóvári J., Szakács G. (2017). Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer. *Journal of Controlled Release*, 261, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.010>

Lohinai Z., Moldvay J., Fábíán K., Cserepes M., Rózsás A., Ostoros G., Rásó E., Kovalszky I., Badalian-Very G., Tímár J., Klepetko W., Döme B., Hegedűs B. (2015). Metastatic Site-Specific Variation of KRAS Status in Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9), S453–S453.

Lohinai Z., Hoda M. A., Fábíán K., Ostoros G., Rásó E., Barbai T., Tímár J., Kovalszky I., Cserepes M., Rózsás A., László V., Grusch M., Berger W., Klepetko W., Moldvay J., Döme B., Hegedűs B. (2015). Distinct Epidemiology and Clinical Consequence of Classic Versus Rare EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(5), 738–746. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000492>

Hegedűs B., Moldvay J., Berta J., Lohinai Z., Rózsás A., Cserepes M., Fábíán 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)]. *Magyar Onkologia*, 59(4), 282–285.

Cserepes M., Ostoros G., Lohinai Z., Rásó E., Barbai T., Tímár J., Rózsás A., Moldvay J., Kovalszky I., Fábíán K., Gyulai M., Ghanim B., László V., Klikovits T., Hoda M. A., Grusch M., Berger W., Klepetko W., Hegedűs B., & Döme B. (2014). Subtype-specific KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma: A retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy. *European Journal of Cancer*, 50(10), 1819–1828. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.04.001>

Török S., Cserepes M., Rényi-Vámos F., & Döme B. (2012). [Nintedanib (BIBF 1120) in the treatment of solid cancers: An overview of biological and clinical aspects]. *Magyar Onkologia*, 56(3), 199–208. <https://doi.org/MagyOnkol.2012.56.3.199>

12 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás vagyok témavezetőimnek, Dr. Tóvári Józsefnek, akivel immár több, mint tíz éve töretlen mind a szakmai, mind az emberi partneri viszonyunk. Példaértékűnek látom a munkatársaihoz való viszonyulását ugyanúgy, mint az állatkísérletek világával történő megismerkedésem óta bennem élő szakmai tanácsait. Hálás vagyok, hogy a munkám mellett a jókedvről, a bátorságról, és az életről is tanulhatok.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Szakács Gergelynek, hogy befogadott a csoportjába, és hogy beleláthattam egy professzionális csapatmunka mindennapjaiba. A megbeszéléseink tartalmasak, előremutatóak, és egyben tanulságosak is voltak mindig. Sokat tanulhattam mellette a tervezett kísérletezésről, az alapos, kimunkált eredményközlésről, saját munkánk kritikai elemzéséről, és az új kérdések folyamatos felmerüléséről. Örülök, hogy a munka mellett a sportpályán is gyakran találkozhattunk.

Köszönettel tartozom családomnak, és barátaimnak, amiért töretlen bizalmukkal, türelmükkel, támogatásukkal segítettek, hogy munkám elkészülhessen, és amiért sok olyan tulajdonsággal ajándékoznak meg, amelyet gyakran tudok használni úgy a szakmai előmenetelben, mint az esetleges kudarckok feldolgozásában.

Nehéz szavakba önteni elegendő hálát, ami Dr. Türk Dórát illeti, aki az elmúlt öt évben a módszerek tanításától kezdve a tudományos kíváncsiságon át a kutatói élet sajátosságai közt való eligazodásig mindenben fantasztikus társnak bizonyult. Dóri sok türelmére és munkájára volt szükség ahhoz, hogy a kezdő hallgatóból többé-kevésbé önálló kutatóvá értem, igazi mentoromként tekintek rá.

Központi szerepet tölt be a Lendület Membránfehérje kutatócsoport életében, és az én kísérleteim során egyaránt Kucsma Nóra munkája, aki a lelkiismeretesség, alaposág, munkabírási, és a mindenre kiterjedő szakmai ismeretek révén nem csupán kísérletes módszerekre tanított meg, hanem szép lassan egy kutatólabor szervezésével járó hatalmas háttérmunkával kapcsolatban is türelemmel viselte kérdéseim végtelen sorát.

Nagyon hálás vagyok, Dr. Füredi András ismeretségéért, aki számomra mindig a szakma (tágabban értelmezve az élet) iránti határtalan elköteleződésével, meg nem alkuvásával és odaadásával mutatott példát a környezete Ph.D. hallgatói számára. Mellette Dr. Tóth Szilárd, Dr. Pape Veronika, Dr. Lovrics Anna, Kiss Dániel Dezső, Hámori Lilla, Mohos Krisztina a munkámban közvetlenül is sokat segítettek, ám a

csoportunk, a dolgozószobánk hangulatáért, így a jó munkamorálért is hálával tartozom nekik, valamint a Lendület Membránfehérje kutatócsoport többi tagjának.

Köszönöm a munkám során nyújtott sok szakmai segítséget Dr. Várady Györgynek, Dr. Bakos Évának, Gera Melindának, Szoboszlai Norbertnek, Gaál Anikónak, Szabó Judit Eszternek és Szabó Pálnak.

Az Enzimológiai Intézetben külön köszönöm Dr. Váradi András, Dr. Sarkadi Balázs, és Dr. Apáti Ágota szakmai támogatását és segítségét, és hogy az intézetben töltött évek során olyan légkörben dolgozhattam, ahol a tapasztalat mellett sok barátsággal is gazdagabb lettem. Köszönöm mindazoknak a fiatal kollégáknak, akik velem együtt fogékonyak arra, hogy a munkahely egyben élettér is lehessen.

Az állatkísérletek kapcsán tisztelettel és köszönettel tartozom az Országos Onkológiai Intézet állatháza valamennyi dolgozójának, különösképp Bodroginé Mayer Irénnek, Tóth Annának és Hidvégi Anitának, akik nélkül aligha valósulhatnának meg hasonló munkáink.

Az Onkológiai Intézetben köszönöm továbbá Dr. Kenessey Istvánnak a statisztikai módszerek terén nyújtott útmutatásait, Parragné Derecskei Katalinnak a támogatást és az immunhisztokémiai mintákat, Dr. Ladányi Andreának a munkám építő kritikákkal történő segítségét.

Sokat köszönhetek közvetlen munkatársaimnak, Hegedüs Zitának és Ivan Randelovičnak, akik a mindennapok megélésében cinkostársaim, és egyben olyan kollégák, akikre mindig számíthatok.

Köszönöm Dr. Döme Balázsnak, Dr. Hegedüs Balázsnak, Dr. Paku Sándornak és Dr. Dezső Katalinnak, hogy 2010 óta egyengették a szakmában megtett első lépéseimet.

Hálával tartozom Dr. Kigyós Attilának, aki mind emberileg, mind anyagilag lehetővé tette az elmúlt években, hogy a doktori munkám elkészülhessen, egyben felkészülhessek egy új típusú, izgalmas munkakör ellátására.

Végül hálás vagyok magamnak, hogy kitartottam a dolgozat elkészülése mellett.