

A kemoterápia-rezisztencia jelentősége és kezelési lehetősége rosszindulatú daganatokban

Doktori (Ph. D.) tézisek

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 A. 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.

Bevezetés

A rosszindulatú daganatos betegségek világszerte a vezető halálozási okok között szerepelnek, évente több, mint 18 millió beteg életét követelve. A sebészi és sugárterápiás megközelítések mellett kemoterápiás lehetőségek állnak rendelkezésre. A gyógyszeres terápiában számos hatóanyag alkalmazása lehetséges, ugyanakkor általános problémát jelent a terápia-rezisztencia és az áttétképzés, mely folyamatok a daganatos halálozások kétharmadáért felelősek.

A kemoterápia hatékonysága a gyógyszer felvételétől, eloszlásától, a tumor mikrokörnyezetétől, a tumorba és a tumorsejtekhez való eljutásától, a sejtek általi felvételtől és metabolizálástól, a sejtekből és a szervezetből való kiürüléstől is függ. Ennek a komplex rendszernek a hatóanyag, a tumor környezete, és maga a tumorsejt mind fontos résztvevője, tulajdonságaik alapvetően befolyásolják a terápiás hatást.

Dolgozatomban a rezisztencia három aspektusát vizsgáltam: Mutáció hatására kialakuló célzott terápiás nehézségeket, hipoxiás környezet hatására megjelenő mozgékony- és áttétképzés-növekedést, valamint efflux transzporter megnövekedett kifejeződése miatti hatóanyag eltávolítást. Ezek a folyamatok mind közvetlenül a terápia hatástalanságához, a betegek életkilátásainak romlásához vezetnek.

Dolgozatom első részében a K-Ras onkogén aktiváló mutációinak hatását vizsgáltam nem-kissejtes tüdőrák esetén. A Ras mutációi nagy gyakoriságúak és jól ismert hatásúak több daganattípusban. Nem-kissejtes tüdőrákban a K-Ras izoforma mutációinak (mely a betegek közel egyharmadában van jelen) nagy jelentősége van az epidermális növekedési faktor receptort (EGFR) célzó kezelések során. A zoledronsav hatásmechanizmusában a K-Ras posztranzlációs módosítása (prenilációja), így a fehérje membránasszociált lokalizációjának gátlása központi szerepű. A zoledronsav a klinikumban is alkalmazott szer nem-kissejtes tüdőrák csontáttéteinek kezelésére, mely azonban az esetek egy részében hatástalan. Ez alapján feltételezhető, hogy a K-Ras genetikai módosulásai hozzájárulhatnak a zoledronsav-érzékenység megszűnéséhez.

A dolgozat második részében a tumorok hipoxiás környezetének hatásait vizsgáltam. A szolid tumorokban a tumorsejtek gyors, szabályozatlan osztódását legtöbbször az érhálózat fejlődése nem képes követni, amely az oxigén- és tápanyagellátottság elégtelenségéhez vezet. Ez azonban nem jár együtt a tumorsejtek pusztulásával, mert a tumorsejtek képesek alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez. A hipoxia sejten

belüli hatásait a Hif-1 α transzkripciós faktor szintje szabályozza. Hipoxiás körülmények között a máskor gyors citoplazmatikus lebomlás gátlódik, a Hif-1 α felhalmozódik, és a sejtmagba kerül, ahol transzkripciós komplex részeként több, mint hatvan gén átírásáért felel. A célgénnek alapvető hatással vannak a sejtek túlélésére és proliferációjára, emellett azonban az anyagcsere, a tumorsejtek és a környező mátrix kapcsolódása, és a tumorsejtek mozgékonyága is változik. A mozgékonyág növekedésével a sejt képes elhagyni eredeti helyét, ami kedvez a távoli áttétek kialakulásának. A tumorsejt-motilitás fontos irányítói a Rho GTPáz fehérjék, melyek közül a legismertebbek a RhoA, Rac1 és Cdc42. Korábbi vizsgálataink azonban azt mutatták, hogy a tumorsejtek hipoxiára adott válasza nem minden esetben jár együtt a motilitás növekedésével. Mivel a motilitás és az áttétképzés egyben a terápia rezisztenciához is hozzájárul, nagyon fontos megértenünk, hogy hogyan alakul különböző tumorok mozgékonyága hipoxia hatására.

A harmadik részben az ABCB1 gén terméke, a P-glycoprotein (Pgp) efflux transzporter által okozott multidrog-rezisztenciát vizsgáltam. A transzmembrán fehérje Pgp képes számos vegyület felismerésére és a sejtől a környezetbe való exportjára. Emiatt megghiúsul a sejtben a hatóanyag kellő koncentrációban való felhalmozódása. Több tumortípusban kimutatták, hogy a megnövekedett ABCB1 expresszió negatív prediktív és prognosztikus faktor egyben, így célzott terápiás kezelése kulcsfontosságú lehet. Az *in vitro* modellekben sikeresen alkalmazott hatékony Pgp-gátlószerek azonban a transzporter más szövetekben fontos fiziológiás szerepe miatt a klinikumban nem használhatók. Bár a transzporter kifejeződése sok tumorellenes vegyülettel szemben védelmet (multidrog rezisztenciát, MDR) biztosít, leírtak olyan molekulákat, amelyek éppen az MDR fenotípusú sejtekkel szemben bizonyultak toxikusabbnak. Ezt az MDR-szelektív sejtölő hatást később nagyszámú vegyület esetében sikerült igazolni. Míg a Pgp efflux-aktivitása megmagyarázza a rezisztenciát, addig az MDR-szelektív toxicitás jelenségének sejten belüli mechanizmusa nem ismert, bár több hipotézis felmerült. A Pgp aktív transzporter, mely ATP hidrolízise segítségével juttatja a sejten kívülre a szubsztrát molekulákat. Az egyik elképzelés szerint az Pgp-t expresszáló sejtek szelektív pusztulásának kiváltó oka lehet a transzporter ATP-áz aktivitásának intenzív stimulálása, így az intracelluláris ATP-szint kritikus csökkenése, mely a sejt pusztulásához vezet. A munkacsoportunk által igazoltan hatékony MDR-szelektív vegyületeket tartalmazó 8-hidrokinolin alapú építő molekulák családjának szerkezetét és aktivitását vizsgálva

kiderült, hogy ezek a vegyületek hatékony fémion kelátorok, így elméletileg képesek lehetnek a sejtbe jutva fémionokat komplexálni. Számos létfontosságú enzim működése vasfüggő, mely a tumorsejtek általános vasérzékenységevel együtt arra utal, hogy az MDR-szelektív toxicitás folyamatában fontos tényező lehet a vas elvonása a sejt enzimeitől.

Cékitűzések:

A tumorok kemoterápiával szembeni rezisztenciájához hozzájárulhat a tumorsejtek kulcsfehérjéinek mutációja, a hipoxia hatására megnövekedett mozgékonyág, és az ABCB1-függő intenzív hatóanyag export. Munkám során ezért a következő célkitűzéseket tettem:

- 1. A K-Ras mutáció szerepének vizsgálata NSCLC tumorok zoledronsav terápiájának hatékonyságában**
- 2. A hipoxia és a Hif-1 α kifejeződés szerepének tisztázása a motilitás és az áttétképzés folyamatában különböző tumormodellekben**
- 3. Az MDR-szelektív vegyületek tumorsejtek ATP-szintjére gyakorolt hatásainak vizsgálata**
- 4. Az MDR-szelektív vegyületek által a Pgp-t kifejező sejtekben okozott kritikus vashiány és a Pgp funkció kapcsolatának leírása**

Anyagok, módszerek:

Felhasznált kezelőszerek

Az NSC297366 a DTP vegyületkönyvtárból származik (NCI, NIH). A zoledronsavat (Zometa) és a ciszplatin a Novartistól, a doxorubicint a TEVA-tól vásároltuk. A P-gp inhibitor tariquidart (XR9576) Dr. Susan Bates (NCI) laborjából kaptuk ajándékként. A kobalt-klorid, vas-klorid ($\cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), deferasirox (DFS), deferiprone (DFPR), hidroxiurea, verapamil, humán holotranszferrin, chetomin, colchicine, 2-deoxi-glükóz, vinblasztin, MTT és szulforodamin B a Sigma-Aldrich-től kerültek beszerzésre.

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

Sejtek

KRAS G12C mutációt hordozó H358 és G12S mutáns A549, és vad típusú KRAS fehérjét expresszáló H1650, H1975 és LCLC-103H nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) sejtvonalakat használtunk. A hipoxia vizsgálatokban A2058 malignus melanóma *in vivo* májmetasztázisra szelektált HT-168-M1 változata, HT-1080 humán fibroszarkóma, HT-25 és HT-29 humán colon adenokarcinóma, és PE/CA PJ15 fej-nyaki laphámrák sejtvonalakkal dolgoztunk. Az MDR-szelektív toxicitás vizsgálatához ABCB1-negatív MES-SA humán uterin szarkóma, doxorubicin-szelektált ABCB1-pozitív MES-SA/DX5 sejtvonalat, és A431 epidermoid carcinoma sejtvonalat használtuk. A sejtekből lentivirális transzdukcióval ABCB1-et, illetve ABCG2-t stabilan expresszáló MES-SA/B1, A431/B1 és A431/G2 sejtvonalakat állítottunk elő (Német Katalin és Kucsma Nóra munkája). Méréseinket ABCB1-et különböző mértékben kifejező, KB-3-1, KB-8, KB-8-5 illetve KB-8-5-11 humán méhnyak adenokarcinóma sejtvonalakon is megismételtük. A Hif-1 α csendesítést shRNS (Sigma) rendszer segítségével végeztük. Az A431, MES-SA és KB sejtvonalakat DMEM (Gibco), a PE/CA PJ15 sejteket IMDM (Lonza), a többi sejtet RPMI-1640 médiumban (Sigma) tartottuk, 10% FBS és 50 egység/ml penicillin/streptomycin jelenlétében.

Hipoxia kezelés

Az oxigénszegény környezetet hipoxiás kamra (Billups-Rothenberg) használatával állítottuk elő, melyben csökkentett oxigéntartalmú (5%, 1%) levegőt juttattunk a sejtekhez. A kamrát 37°C-os inkubátorban tartottuk a kísérlet ideje alatt. A kamra nyitását követően a mintákat jégen tárolva 5 percen belül feldolgoztuk (Western Blot, RT-PCR), a reoxigenizáció hatásait megelőzendő.

Sejtproliferációs kísérletek

A 96-lyukú sejtenyészítő lemezek kamráiban letapadt sejteket a kezelőszerek különböző koncentrációjával kezeltük. A kezelést követően a sejtek életképességét Sulphorodamine B (SRB) vagy MTT teszttel mértük. A gyógyszer kombinációs kísérletekben (Tóth Szilárd munkája) 384-lyukú lemezekre kitapadt sejteket kezeltük a

két vizsgált hatóanyag különböző töménységű oldataival. A lemezeken 96 óra után olvastuk le a sejtszámmal arányos fluoreszcencia értékeket.

A sejtek ATP-mennyiségének meghatározása

A sejtek ATP-szintjét ATPLite (PerkinElmer) lumineszcens alapú ATP meghatározó kit segítségével mértük. Átlátszó aljú, fehér falú 96-lyukú OptiPlate (PerkinElmer) kamráiban letapadt sejtek 4 órás kezelése után a sejteket lizáltuk, majd a szubsztrát (luciferin) hozzáadását követően az ATP bomlása, oxiluciferin képződése lumineszcens mérésrel volt detektálható. A kezeletlen kontrollhoz viszonyítottuk az értékeket.

Western blot

A kezelt sejtkultúrákból fehérje lizátumot készítettünk. A manuálisan homogenizált NSCLC sejtkultúrák különböző sejten belüli egységek frakcióinak (intracelluláris, membrán) szétválasztásához centrifugálás-alapú szeparáló módszert alkalmaztunk. A mintákat fehérje mérettől függően 7,5-10%-os SDS-poliakrilamid gélben futtattuk, majd PVDF membránra blotoltuk nedves elektroblot rendszer segítségével (BIO-RAD). Elsődleges antitestek: anti-K-Ras (ab55391, Abcam) anti-Na/K-ATPase (BML-SA247-0100, Enzo Life Sciences), anti-Rho (-A, -B, -C) (#17-294, Millipore), anti-Rac1 (23A8 klón, Millipore), anti-cdc42 (#17-441, Millipore), anti-HIF-1 α (ab51608, Abcam), sejtciklus és sejtciklus-szabályozó minta kitek antitestjei (#9932 & #9870, Cell Signaling Technologies), anti- (#2524, Cell Signaling), anti- β -aktin (AC-15 klón, Sigma). Tormaperoxidáz (HRP) konjugált másodlagos szamar anti-egér és anti-nyúl IgG-t használtunk, melynek jelét enhanced WesternBright kemilumineszcens rendszerrel tettük láthatóvá.

RNS expresszió meghatározása

A szükséges RNS expressziós vizsgálatokhoz a biológiai mintákat 6-lyukú sejtenyészítő lemez kamráiban növesztettük, $0,5-1 \times 10^6$ maximális sejtszámig. A Trizolban (Life Technologies) felvett sejtekből teljes RNS mennyiséget tisztítottunk, cDNS átírást végeztünk. Az RNS expresszió meghatározásához Taqman próbákat (HIF-1 α , RHOA, RAC1, CDC42, β -actin, TFR1, RPLP0) használtunk (Thermo Scientific). Belső kontrollként RPLP0, illetve β -aktin mRNS expresszióját használtuk, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszerrel számítottuk ki a relatív a génexpressziókat.

Áramlási citometriás mérések

A sejtciklus elemzéshez Propidium Jodid és 5-Bromo-2'-deoxyuridine kettős jelölést alkalmaztunk. Az apoptózis jellemzéséhez az Annexin V – Propidium Iodide Apoptosis kitet használtuk (Dojindo), a gyártó utasításai szerint. A Calcein-AM esszében az ABCB1 transzporter funkcióját mértük. A méréseket Attune és Attune NxT áramlási citométerrel (Life Technologies) végeztük.

ATPáz aktivitás mérések

Az ABCB1 transzporter aktivitása közben a szubsztrát transzportja ATP hidrolízise mellett valósul meg. A felszabaduló szerves foszfátgyökök mennyisége kolorimetriásan detektálható. Spodoptera frugiperda (Sf9) rovar sejtvonalban termelt, ABCB1-et kifejező membránokon az elegyhez adott ATP átalakulását detektáltuk. Pozitív kontrollként verapamil használtunk. NSC297366, illetve a 8-hidroxikinolin vasionokat tartalmazó komplexe 1:2 fémion:ligand arány mellett készült. A méréseket Telbisz Ágnes és Gera Melinda végezték.

dNTP szintek meghatározása

A sejtek 24 órás kezelését (DMSO kontroll; NSC297366; hidroxürea) követően a sejteket tripszinezés után 60% metanolban tártuk fel. A centrifugált minta felülúszóját vákuumcentrifuga segítségével beszárítottuk, nukleázmentes vízben oldottuk. A sejtek dNTP-készletét fluoreszcens polimeráz-alapú esszében Szabó Judit Eszter mérte.

Videomikroszkópia

A mérésekhez a sejteket 24-lyukú lemezen tartottuk. A sejteket egy egyedi építésű, iverz fázis kontraszt mikroszkóp köré épült inkubátorba (World precision Instruments) helyeztük. 5 percenként készítettünk felvételt, kamránként 3 látótérrel készült képsorozat. A hipoxiás minták esetében az oxigén tenzióját 5%-ra, illetve 1%-ra csökkentettük. A munkacsoport által fejlesztett kiértékelő szoftverrel a vizsgálati idő alatt megtett távolságot manuálisan számítottuk. A méréseket Garay Tamás Márton végezte.

Teljes röntgen fluoreszcencia mérések

A sejtek intracelluláris vaskészletét holotranszferrin hozzáadásával töltöttük fel (25 μM , 37°C, 4h), majd 8 órán keresztül szérumentes tápoldatban, avagy 5 μM kelátor: vas-klorid 2:1 arányú komplexével kezeltük. A kezelések végén a mintákat tripszinezettük, savas feltárás után kvarclemezre szárítottuk. A teljes röntgen fluoreszcencia méréseket Atomika 8030C (atomika Instruments GmbH) műszerrel végezte Gaál Anikó, Pape Veronika és Szoboszlai Norbert, belső kontrollként Gallium mennyiségét használva.

Tömegspektrometriás mérések

6-lyukú lemez kamráiban kelátor: vas-klorid 2:1 komplexével kezeltük a sejteket (5 μM , 37°C, 4h). A tripszinezés után kapott sejtpeleketeket dezintegráltuk. A mintákat Sciex 3200 Qtrap hybrid tandem tömegspektrométerrel (Applied Biosystems) összeépített HPLC rendszerben (series 200, PerkinElmer) mérte Szabó Pál.

Sejtmigrációs kísérletek

Módosított 48-lyukú Boyden-kamra segítségével, 8 μm pórusméretű membrán (Whatman) használatával, 100 $\mu\text{g/ml}$ fibronektin (Sigma) kemoattraktáns alkalmazásával vizsgáltuk a sejtek migrációját. 6-20 óra inkubációs idő elteltével a migrált sejteket metanolos fixálást követően toluidinkék festéssel jelöltük, és mikroszkóp segítségével számoltuk. A méréseket Tátrai Enikő végezte.

***In vivo* tumornövekedés és metasztázis modellek**

Az állatkísérletes modellek tervezése és kivitelezése az Országos Onkológiai Intézet állatházában történt, Dr Tóvári József vezetésével. A hipoxiás állapot *in vivo* hatásainak vizsgálatára HT-168-M1 melanómasejtek lépbe való oltását követő májkolónizációs modellt, valamint szubkután nött HT29 szövetdarab ortotopikus (bélfalra történő) rögzítését követő tüdő/máj metasztázis modellt használtunk. Az állatok kontroll (fiziológias sóoldat i.p. injekció hetente kétszer), hipoxiát előidéző (260mg/l CoCl_2 4 héten át ivóvízbe keverve), illetve Hif-1 α aktivitást gátló (1mg/ttkg chetomin i.p. injekció, hetente kétszer) kezelést kaptak. Az állatok máját és tüdejét formalinban fixálva mikroszkóp alatt makrometasztázisokat számoltunk.

Az NSCLC sejtek (LCLC-103H, A549, H1650) vizsgálatában szubkután beültetett tumorok növekedését mértük. Ciszplatin (0,2mg/ttkg, intraperitonealisan, hetente) terápiával, vagy anélkül vizsgáltuk a tumorok növekedését a kontroll (fiziológiás sóoldat i.p. hetente), humán dóziszú zoledronsav (50µg/ttkg i.p.), és nagy dóziszú zoledronsav (500 µg/ttkg i.p.) csoportokban. 41 nap után a tumorok tömegét mértük, és formalinban fixáltuk.

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 (SMA-1) antitest jelölés (Agilent) felhasználásával határoztuk meg az NSCLC mintákban az izmos fallal rendelkező erek számát. A vizsgálatokat Derecskei Katalin és Kenessey István végezték.

Statisztikai módszerek:

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, majd ezeket felhasználva a kombinációs mérésekben kombinációs index (CI) kiszámításával jellemeztük a vegyületeket. A csoportátlagok összehasonlításához Student-féle t-tesztet használtunk, Statistica 12.0 (Statsoft) programcsomag használatával.

Eredmények

KRAS mutációk hatása zoledronsav-terápia hatékonyságára

NSCLC sejtvonalakon vizsgáltuk a zoledronsav hatását K-Ras prenilációjára és transzlokációjára. Az irodalmi adatok alapján a gátolt preniláció a membránasszociált K-Ras fehérje felhalmozódást gátolja. Kísérleteinkben 25µM zoledronsav kezelést alkalmaztunk 24 órán keresztül, majd a sejtekből intracelluláris és membránfrakciót készítve a preparátumokban western blot segítségével vizsgáltuk a K-Ras fehérje

expresszióját. A vad típusú sejtek közül az LCLC-103H esetében a transzlokáció teljes gátlását tapasztaltunk, a H1975 esetén részleges gátlás valósult meg, míg a H1650 sejteken nem volt mérhető változás. Megjegyzendő, hogy a két utóbbi sejtvonal a K-Ras aktiváló EGF receptor mutációját, illetve delécióját hordozza, melyek hozzájárulhatnak a zoledronsav hatásának gyengüléséhez. Ugyanakkor a K-Ras G12C mutációját hordozó H358 és G12S mutációját hordozó A549 sejtekben nem volt képes a kezelés gátolni a fehérje membránhoz való kötődését, ami arra utal, hogy a K-Ras mutációk szerepet játszhatnak a zoledronsavval szembeni rezisztenciában.

A sejtek in vitro citotoxicitási vizsgálata megmutatta, hogy a K-Ras vad típusú sejtekben a zoledronsav alacsonyabb koncentrációban (10 µM) is hatékonyan gátolja a proliferációt, szemben a mutációt hordozó sejtekkel (50-100 µM). A sejtek Boyden-kamrában vizsgált migrációs képességére általánosan szuppresszív hatást fejtett ki a zoledronsav kezelés, bár a hatékony koncentráció sejtmolekuláknak eltérőnek mutatkozott. Ugyanakkor a vizsgálat eredményei nem mutattak K-Ras státusszal összefüggő mintázatot. Megmértük a sejtek apoptózisát zoledronsav monoterápiában, illetve megvizsgáltuk a klinikumban gyakran alkalmazott ciszplatin terápia citotoxikus hatásának változását zoledronsavval való kombinációban. A monoterápia esetén egyedül az LCLC-103H sejt esetén tapasztaltunk szignifikáns apoptotikus aktivitás növekedést. A ciszplatin citotoxikus hatását hatékonyan potenciózza a zoledronsav a K-Ras vad típusú NSCLC sejtek esetében, míg K-ras mutáns sejtvonalak közül csak mérsékelt hatást vált ki H358 modellen, és nincs szinergisztikus hatása A549 sejtek esetén. Ezek az eredmények összhangban állnak a zoledronsav kezelésnek K-Ras fehérje plazmamembránhoz való kötődését gátló képességével.

Az in vitro vizsgálatok mellett megvizsgáltuk a zoledronsav hatását az in vivo tumornövekedésre is. A SCID egerekbe szubkután oltott NSCLC xenograftok növekedését 21 nap után a tumor tömegével jellemeztük. A sejtek közül a vad típusú K-Ras hordozó LCLC-103H és H1650, valamint a K-Ras mutációt hordozó A549 modellt vizsgáltuk. A kontroll, humán dóziszú és magas dóziszú zoledronsav kezelést monoterápiában, és ciszplatinnal kombináltan is teszteltük. A vizsgálatok során csak az LCLC-103H tumorok mutatkoztak érzékenynek a zoledronsav terápiára. Ez a hatás trendszerűen jelent meg kombinációs kezelés esetén. A tumorok immunhisztokémiai vizsgálata során kimutattuk, hogy az LCLC-103H tumorok szerkezetében a zoledronsav-

kezelés hatására változás indul be, mely intenzív érképződéssel jár, felhívva a figyelmet az angiogén környezet fontosságára a zoledronsav hatékonyságához.

Eredményeink alapján elmondható, hogy modellrendszerünkben valóban ellenállóbbnak mutatkoznak a zoledronsav kezeléssel szemben a K-Ras mutációt hordozó tumorsejtek, azonban a vad típusú sejtek között tapasztalt heterogenitás arra utal, hogy más rezisztencia mechanizmusok is hozzájárulhatnak a zoledronsav terápia hatékonyságához.

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

Vizsgálatainkban öt különböző tumorsejt modellt használtunk. HT1080 humán fibroszarkóma, HT168-M1 malignus melanóma, HT25 és HT29 vastagbél adenokarcinóma, illetve PE/CA PJ15 fej-nyaki laphámrák sejtvonalakban vizsgáltuk a hipoxiás környezetre adott választ. A sejteket 5% és 1% oxigén tenzió mellett vizsgáltuk, illetve kobalt-klorid kezeléssel indukáltuk a sejtek hipoxiás válaszreakcióját. A sejtproliferáció vizsgálatában változatos, ám nem hangsúlyos változásokat tapasztaltunk a kontroll sejtnövekedéshez képest. A sejtek nem irányított helyváltoztatását (motilitás) és irányított mozgását (migrációs aktivitás) videomikroszkópia, illetve Boyden-kamra segítségével végeztük. A HT-29 és a HT-25 vonalak lényegesen alacsonyabb motilitással rendelkeznek, míg a HT-168-M1, a HT1080 és a PE/CA PJ15 sejtek mozgékonyabbnak mutatkoztak. A magasabb motilitású sejtek mozgékonyága hipoxiás környezetben tovább növekedett, ugyanakkor az alacsony motilitásúaké nem változott. A migrációs aktivitást a HT-168-M1 és a HT-1080 esetén serkentette a hipoxia, míg a PE/CA PJ15 esetében 1% oxigén mellett egy visszazabályozás volt megfigyelhető.

A hipoxia sejten belüli effectora a Hif-1 α , illetve ismert kapcsolata a sejtek alakját és mozgását közvetlenül befolyásoló Rho GTPázokkal (RhoA, Rac1, CDC42), ezért ezek mRNS expresszióját vizsgáltuk a sejten belüli válaszkészség felmérésére. A sejtek közül a HT168-M1 mind a négy gén expresszió növekedésével reagált a hipoxiás környezetre. A HT1080 és a PE/CA PJ15 esetén 1% oxigén alkalmazásakor ismét visszazabályozást tapasztaltunk. Ugyanakkor a HT-25 sejtek esetében nem találtunk expresszió növekedést, a HT-29 sejtekben pedig mind a négy gén kifejeződésének csökkenését tapasztaltuk.

A további vizsgálatokhoz a mozgékony, hipoxia hatására stimulálható HT168-M1 és az alacsony motilitással rendelkező, hipoxiás kezelésre nem reagáló HT-29 sejteket használtuk. A sejtek fehérje expresszió vizsgálata során megmutattuk, hogy a hipoxiás környezet a Hif-1 α expresszió növekedése mellett a HT168-M1 sejtekben nem jár változással a RhoA, Rac1, CDC42 expresszióban, míg a HT-29 sejtek esetén e három fehérje expressziója markánsan lecsökken, mely hozzájárulhat a motilitás növekedésének elmaradásához.

Az in vitro tesztek mellett in vivo kolonizációs és metasztázis modellekben vizsgáltuk a tumorok viselkedését. Az in vivo hipoxia indukálására kobalt-klorid itatást, míg a Hif-1 α hatás gátlására chetomin kezelést alkalmaztunk. A lépbe oltott HT168-M1 sejtek a májban képeznek áttéteket, melyek száma a Hif-1 α stimulálására megnövekedett, míg a Hif-1 α gátlásával lecsökkent. Ugyanakkor a bélfalról kiinduló HT-29 xenograftok által képzett tüdő- és májjátétek száma nem változott a Hif-1 α aktivitásának függvényében.

Annak tisztázására, hogy a mozgékonyág és az áttétképzés valóban a Hif-1 α aktivitásától függ, shRNS segítségével a HT168-M1 és a HT-29 sejtekben hatékonyan csendesítettük a Hif-1 α expressziót. Az in vitro motilitási teszteket megismételve a HT168-M1 esetében a hipoxiában tapasztalt megnövekedett mozgékonyág Hif-1 α csendesítéssel megelőzhető volt, a HT-29 esetén nem tapasztaltunk Hif-1 α függő hatást. A HT168-M1 tumorok in vivo áttétképzését vizsgálva kimutattuk, hogy a Hif-1 α expressziója nélkül a megnövekedett áttétképzési aktivitás megakadályozható.

Eredményeink alapján in vitro és in vivo rendszerekben is azonosítottunk különböző viselkedésű tumorokat, melyek felhívják a figyelmet, hogy a Hif-1 α -függő és a Hif-1 α -független motilitás és áttétképzési folyamatok jellemzői lehetnek egyes tumoroknak, és befolyásolhatják a hatékony terápiai lehetőségeket.

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

Az ABCB1-et expresszáló, multidrog-rezisztens sejteket hatékonyan pusztító MDR-szelektív vegyületek közül a jelenség mechanizmusát célzó vizsgálatainkhoz a nagy szelektivitású NSC297366 (6-Chloro-3-[(2-fluorophenyl)methyl]-2,4-dihydropyrido

[3,2-h][1,3]benzoxazine) molekulát választottuk ki. Különböző ABCB1-expressziójú MES-SA és KB-3-1 sejtekből kialakított sejtek paneljén kimutattuk, hogy az NSC297366 toxicitása arányosan nő a sejtekben található transzporter kifejeződésével.

A Pgp transzportaktivitásával járó ATP hidrolízis, és így az esetleges ATP-depléciónak szerepét vizsgálva arra jutottunk, hogy sem az ismert szubsztrát vinblasztin, sem az ATP-áz aktivitást stimuláló inhibitor verapamil, sem az NSC297366 nem volt képes jelentősen csökkenteni a sejtek ATP-szintjét. A glikolízist gátló 2-deoxi-glükóz hasonló mértékben csökkentette a nem-MDR A431 és az MDR A431/B1 sejtek ATP készletét. Kombinációs vizsgálatok megmutatták, hogy az ATP-termelés gátlása mellett sem csökkenthető tovább a sejtek ATP-szintje a Pgp transzportaktivitásának stimulálásával.

A számos MDR-szelektív vegyületet (így az NSC297366) magába foglaló, 8-hidroxikinolin alapvázra épülő molekulák szerkezeti vizsgálata megmutatta, hogy a vegyületek hatékony fémion-kelátorok. A vas szigorúan szabályozott, esszenciális fém számos enzimatikus folyamat számára a sejtekben. Pgp-t nem expresszáló MES-SA, valamint Pgp-t expresszáló MES-SA/B1 sejtekben az NSC297366 MDR-szelektív toxicitást mutat. Ezt a szelektív hatást azonban külső vas hozzáadásával képesek voltunk felfüggeszteni. Bár a vas jelenléte mindkét sejtet védte az NSC297366 toxicitással szemben, a hatás sokkal kifejezettebb volt MES-SA/B1 sejtek esetén. Ráadásul a nem-szelektív kelátor deferiprone-nal való kombinációs vizsgálatban az NSC297366 szinergisztikus hatást mutatott MES-SA/B1 sejteken, amely hatás a Pgp-aktivitástól függött.

A valószínűsíthető sejt belüli vashiányos állapot jeleit vizsgálva megállapítottuk, hogy a sejtes vasfelvételt irányító transferrin receptor expressziója szelektíven MES-SA/B1 sejtekben emelkedik meg NSC297366 kezelést követően, mely a transzporter gátlásával (tariquidar), vagy külső vaspótlással felfüggeszthető. A Hif-1 α fehérje lebontását végző prolin hidroxilázok aktivitásához szintén vasra van szükség, így vashiányos állapotban a Hif-1 α fehérje akkumulációja következik be. Kimutattuk, hogy a MES-SA/B1 sejtekben szelektíven alacsonyabb NSC297366 koncentráció mellett következik be a Hif-1 α akkumulációja, mely folyamat Pgp aktivitásától függ. A Hif-1 α aktivitását vizsgálva a transzkripció célgén VEGFA expressziójában is kimutattuk az MDR-szelektív hatást.

Tovább vizsgálva a sejt belüli hatásokat a sejtciklus szintetikus fázisában kulcsfontosságú, szintén vasfüggő ribonukleotid-reduktáz enzim működését vizsgálva igazoltuk, hogy míg az enzimet gátló hidroxürea mindkét sejtben, az NSC297366 kezelés szelektíven a MES-SA/B1 sejtekben gátolja a dNTP-szintézist. Ezzel párhuzamosan kimutattuk a sejtciklus szelektív leállítását a G1/S fázisban, mely a G2 fázisú sejtek ritkulásával írható le. Mindezen hatások a Pgp gátlásával visszafordíthatónak bizonyultak. A sejtciklus szabályozását vizsgálva kimutattuk, hogy több fehérje szintjének változása (Cyclin B1, Cyclin D3, p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1}, CDK4, p53) a sejtciklus felfüggesztése irányába hat már 24 órás kezelést követően. A p53 MDR-szelektív indukciója arra utalt, hogy az apoptotikus aktivitás is szelektíven változik. Áramlási citometriás mérésünkben igazoltuk az NSC297366 apoptotikus hatását MES-SA/B1 sejteken, mely Pgp-gátlással megakadályozható volt.

A sejt belüli reakciók tehát mind a vas sejtbeli eltávolítására utaltak, szükséges volt azonban a Pgp-vel összefüggő hatás direkt vizsgálata is. A sejtek teljes vasszintjét követve méréseink megmutatták, hogy a nem MDR-szelektív kelátor 8-hidroxikinolinnal ellentétben az NSC297366 kezelésre a MES-SA/B1 sejtekben szelektíven csökken az intracelluláris vas mennyisége, míg a MES-SA sejtben, vagy a Pgp gátlásával ilyen hatást nem tapasztaltunk. Az NSC297366:FeCl₃ komplex használatával akkumulációs vizsgálatokat végeztünk, melyek során kimutattuk, hogy a MES-SA/B1 sejtben mind a vas, mind az NSC297366 felhalmozódása gátolt a MES-SA sejtekhez képest, mely hatás a Pgp aktivitás gátlásával felfüggeszthető. Sejtmentes membránrendszerben továbbá a Pgp ATP-áz aktivitását követve kimutattuk, hogy a kelátor-vas komplex valóban szubsztrátként viselkedik, és a Pgp-n keresztül juthat ki a sejtekből.

A klinikumban is alkalmazott vaskelátor deferasirox, illetve további kelátor aktivitású molekulák vizsgálatával kimutattuk, hogy a hatékony vaskeláció önmagában nem elegendő a megfigyelt MDR-szelektív hatásokhoz, és az MDR-szelektív toxicitáshoz. Hif-1 α csendesített MES-SA és MES-SA/B1, valamint funkcionáló p53-at nem expresszáló A431 és A431/B1 sejtek segítségével igazoltuk, hogy a folyamatban nincs kulcsfontossága a fehérjéknek, azonban hatékony szenzorai lehetnek a vasdeplíciónak.

Eredményeink alapján felépítettünk egy modellt, melyben az MDR-szelektív vegyületek képesek a sejtekbe bejutni, ott a vasionokkal komplexet képezni, ezáltal a felfokozott anyagcseréjű, erősen vasfüggő tumorsejtekben vasszegény állapotot

előidézni. A kelátor-vas komplex Pgp általi felismerése és exportja a Pgp-t expresszázó multidrog-rezisztens tumorsejtekben tovább súlyosbítja a hatást, kritikus vashiányt okozva, amely az MDR-sejtek szelektív pusztulásához vezet. Ez a korábban nem ismert mechanizmus hatékony tumorelles vegyületek fejlesztésének alapja lehet.

Következtetések:

A KRAS G12C mutáció szerepe a zoledronsav terápiával szembeni ellenállásra NSCLC tumorokban

Megmutattuk, hogy a zoledronsav *in vitro* proliferáció gátló és migrációt gátló hatása nem érvényesül K-Ras mutációt hordozó NSCLC daganatokban.

Igazoltuk, hogy a membrán-asszociált lokalizáció, és ezzel a K-Ras aktivitás vad típusú K-Ras expresszázó sejtekben, bár különböző mértékben, de gátolható zoledronsav terápiával, míg a K-Ras mutációt hordozó sejtmodellekben nem.

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

In vivo kísérletekben igazoltuk a zoledronsav tumorelles és angiogén hatását vad típusú K-Ras fehérjét expresszázó LCLC-103H xenograft daganatokban.

A tumor hipoxia, és a Hif-1 α expresszió szerepének változatos mintázata a tumorsejtek motilitására, és az áttétképzésre

Kimutattuk, hogy a hipoxiás környezet a sejtek proliferációját nem befolyásolja nagy mértékben.

Megmutattuk, hogy az *in vitro* motilitás és irányított migráció, valamint ezek hipoxia általi indukálhatósága tekintetében alapvetően különböznek a tumorsejt modellek.

Kimutattuk, hogy a sejtek motilitásában fontos szerephez jutó kis GTP-áz fehérjéket kódoló gének expressziója, és az átírt fehérjék expressziója eltérő változásokat mutat *in vitro* hipoxiás környezetben.

Az *in vivo* xenograft modellek metasztatizáló képességének Hif-1 α függésében különbségeket igazoltunk: míg a magas motilitású HT-168-M1 modell intenzívebb metasztatikus aktivitást mutatott a Hif-1 α indukálásra, a HT-29 modell nem mutatott változást.

A Hif-1 α közvetlen hatását az motilitásra és áttétképző képességre shRNS általi Hif-1 α csendesítést követően igazoltuk *in vitro* és *in vivo*.

A multidrog rezisztenciát okozó Pgp expresszió nem csupán terápiás akadály, hanem lehetséges célpont is a tumorsejtek vashiányon keresztüli elpusztításához

Igazoltuk a 8-hidroxi-kinolin vegyületsalád számos tagjának MDR-szelektív toxicitását modellrendszerünkben.

Bemutattuk, hogy a leírt szelektív toxicitás külső többlet vas jelenlétében felfüggeszthető, illetve, hogy az MDR-szelektív NSC297366 szinergisztikus kölcsönhatásban áll más vaskelátor toxikus hatásával.

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

Igazoltuk, hogy az NSC297366 hatására kialakuló vashiányos állapot a ribonukleotid reduktáz gátlásával, a sejtciklus G1/S fázisban történő megakasztásával, és a Pgp-t kifejező sejtek szelektív apoptózisával jár.

Direkt méréssel igazoltuk a sejten belüli vasmennyiség, valamint a sejten akkumulálódó NSC297366 és vas csökkenését funkcionál Pgp-t hordozó sejtekben. ATP-áz aktivitás méréseinkkel bizonyítottuk, hogy az NSC297366:vas komplex a transzporter szubsztrátjaként viselkedik, lehetséges a Pgp által a sejtől való exportjuk.

Igazoltuk, hogy a vasionok kelációja önmagában nem elegendő az MDR-szelektív hatás kialakításához. Bizonyítottuk, hogy az NSC297366 vashiányon keresztüli sejtölő hatása független a Hif-1 α és a p53 aktivációjától.

Felállítottuk az MDR-szelektív NSC297366 működése alapján a Pgp-n keresztüli vasdepleció modelljét, amely ígéretes stratégia kiindulópontja lehet a multidrog-rezisztens tumorok kezelésében.

Az értekezés témájában megjelent saját közlemények

1. 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
2. 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
3. Kenessey I, Kóti 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

Egyéb közlemények

1. Szabó J E, Surányi E V, Mébold B S, 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 Research*, 2020 (doi: 10.1093/nar/gkaa116)
2. Baska F, Sipos A, Örfi Z, Nemes Z, Dobos J, Szántai-Kis C, Szabó E, Szénási G, Dézsi L, Hamar P, Cserepes M, Tóvári J, Garamvölgyi R, Kreko M, Örfi 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>
3. 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>

4. Füredi A, Szebényi K, 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>
5. 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.
6. 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>
7. 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.
8. 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>
9. 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>