

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2724.

KERESZTES DÁVID

Urológia
című program

Programvezető: Dr. Nyirády Péter, egyetemi docens
Témavezető: Dr. Szarvas Tibor, tudományos főmunkatárs

A prosztatatarák kemoterápia-rezisztenciájában szerepet játszó fehérjék és szérum biomarkerek azonosítása

Doktori értekezés

Keresztes Dávid

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szarvas Tibor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Dezső Katalin, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Fullár Alexandra, Ph.D., igazságügyi nyomszakértő

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Dank Magdolna, MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Szász Attila Marcell, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Füle Tibor, Ph.D., szaktanácsadó

Budapest
2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	9
1.1. A prosztata anatómiája, hisztológiája, szerepe	9
1.2. A prosztatarák etiológiája, epidemiológiája, prevenciója	9
1.3. A prosztatarák tünettana, szűrése, diagnosztikája	11
1.4. A prosztatarák patológiája, prognosztikája	13
1.5. Androgének szerepe a prosztatarákban	15
1.6. A prosztatarák kezelési lehetőségei	17
1.6.1. Szervre lokalizált, illetve lokálisan előrehaladott prosztatarák kezelése	17
1.6.2. Előrehaladott prosztatarák kezelése	18
1.6.2.1. Hormon-érzékeny prosztatarák kezelése	18
1.6.2.2. Kasztráció-rezisztens prosztatarák kezelése	19
1.7. Ismert kemoterápia-rezisztencia mechanizmusok, lehetséges biomarkerek és célzott kezelések	22
2. Célkitűzések	29
3. Módszerek	30
3.1. Docetaxel-érzékeny és -rezisztens prosztatarák sejtvonalpárok tenyésztése	30
3.1.1. Sejtvonalpárok komparatív proteomikai összehasonlítása tömegspektrometriai módszerrel	30
3.1.2. LC-MS/MS analízis részletei	31
3.2. A tömegspektrometria alapú proteomikai vizsgálat adatfeldolgozása	32
3.2.1. Előzetes szűrési kritériumok alkalmazása	32
3.2.2. Kandidáns fehérjék kiválasztásának bioinformatikai módszerei	32
3.2.2.1. Szekretálódó fehérjék predikciója	33
3.2.2.2. Összehasonlító elemzés	33
3.2.2.3. Összetett szűrési módszer	34
3.3. Fehérjék szérumkoncentrációinak meghatározása	34
3.3.1. Szérum minták	34
3.3.2. Betegcsoportok	35
3.3.3. Szérum ELISA vizsgálatok	36
3.4. Sejtkultúras vizsgálatok	36

3.4.1.	Gén- és fehérjeexpresszió validációja	37
3.4.1.1.	RNS izolálás, reverz transzkripció	37
3.4.1.2.	Fehérje izolálás	37
3.4.1.3.	Valós idejű kvantitatív PCR vizsgálat	38
3.4.1.4.	Western blot analízis	39
3.4.2.	Sejtkultúras funkcionális vizsgálatok	40
3.4.2.1.	Géncsendesítés (siRNS transzfekció)	40
3.4.2.2.	Sejt életképességi vizsgálatok (MTT-teszt)	41
3.4.2.3.	Apoptózis analízis áramlási citometriával	42
3.5.	Statisztikai módszerek	43
4.	Eredmények	44
4.1.	Komparatív proteomikai analízis kiértékelése	44
4.1.1.	Kandidáns fehérjék kiválasztása további vizsgálatokra	47
4.1.1.1.	Szekretált fehérjék kiválasztása	47
4.1.1.2.	Összehasonlító elemzés által kiválasztott fehérjék	47
4.1.1.3.	Összetett szűrési módszer által kiválasztott fehérjék	49
4.2.	Szérumvizsgálatok eredményei	51
4.2.1.	A szérumvizsgálatba bevont betegek adatai	51
4.2.2.	ELISA vizsgálatok eredményei	52
4.2.2.1.	A szérum NAMPT koncentrációk összefüggései a betegek klinikopatológiai paramétereivel és túlélésével	52
4.2.2.2.	A szérum GAP43, CD44, MET, IL13RA2, LNPEP és GSN koncentrációk ELISA vizsgálatai	56
4.2.2.3.	A GAP43 kezelés előtti szérumkoncentrációinak összefüggései a betegek klinikai adataival és túlélésével	56
4.2.2.4.	A kezelés előtti CD44, MET, LNPEP ELISA szérumkoncentrációinak összefüggései a betegek klinikai adataival és túlélésével	59
4.3.	Sejtkultúras vizsgálatok eredményei	62
4.3.1.	A CD44, NAMPT és GAP43 gén- és fehérjeexpressziója a használt PC sejtvonalakban	63
4.3.1.1.	Géncsendesítés monitorozása	64
4.3.2.	Docetaxel dózis-hatás görbe	65

4.3.3.	Sejtviabilitás-változás mérése géncsendesítés hatására	67
4.3.4.	Apoptózis vizsgálat	70
5.	Megbeszélés	74
6.	Következtetések	84
7.	Összefoglalás	86
8.	Summary	87
9.	Irodalomjegyzék	88
10.	Saját publikációk jegyzéke	102
11.	Köszönetnyilvánítás	104

Rövidítések jegyzéke

ABC - *ATP-binding cassette* (ABCB1, ABCB4, ABCB5)
ABI - Abirateron
ACTN1 - *Actinin alpha 1*
ADT - Androgén deprivációs terápia
AGR2 - *Anterior Gradient 2*
ANXA – Annexin (ANXA3, ANXA6)
APC - *Allophycocyanin*
AR - Androgén receptor (variánsok: AR-V7, AR^{v567})
ARE - Androgén-reszponzív elem (*Androgen responsive element*)
AREG - *Amphiregulin*
ATM - *Ataxia-telangiectasia mutated*
AUP1 - *Ancient ubiquitous protein 1*
BAIAP2L1 - *BAR/IMD domain containing adaptor protein 2 like 1*
BCA - *Bicinchoninic acid assay*
BPH - benignus prosztata hiperplázia
BRCA - *Breast cancer antigen* (BRCA1, BRCA2)
BSA - Borjú szérum albumin (*Bovine serum albumin*)
C19orf21 - *Uncharacterized protein C19orf21*
CABA - *Cabazitaxel*
CALD1 - *Caldesmon 1*
CALU - *Calumenin*
CD44 - *Cluster of differentiation 44*
CDH1 - *Cadherin 1*
CDKN1B - *Cyclin dependent kinase inhibitor 1B*
cDNS - Komplementer dezoxiribonukleinsav
CHEK2 - *Checkpoint kinase 2*
CI - Konfidencia intervallum
CKAP4 - *Cytoskeleton associated protein 4*
COASY - *Coenzyme A synthase*
COL6A1 - *Collagen type VI alpha 1 chain*
(m)CRPC – (metasztatikus) Kasztráció-rezisztens prosztatarák

CT - Computer tomográfia
C_t - Küszöb ciklus (*threshold cycle*)
CTC - Keringő tumorsejt (*circulating tumor cell*)
DHT - 5 α -dihidrotesztoszteron
DLC1 - *Rho GTPase-activating protein 7*
DMSO - Dimetil-szulfoxid
DNS - Dezoxiribonukleinsav
DOC - Docetaxel
DR - Docetaxel-rezisztens
DTT - Ditiotretiol
ECOG PS - *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*
EFHD2 - *EF-hand domain-containing protein D2*
EGFR - Epidermális növekedési faktor receptor (*Epidermal growth factor receptor*)
ELISA - Enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)
EMP - Empirin
EMT - *Epithelialis-mesenchymalis* tranzíció
ENZA - Enzalutamid
EPCAM - *Epithelial cell adhesion molecule*
ERAP1 - *Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1*
ESR2 - Ösztrogén receptor 2
FBS - Fötális borjú savó (*fetal bovine serum*)
FDR - Hamis felfedezési arány (*false discovery rate*)
FLNB - Filamin B
FLNC - Filamin C
GAP43 - *Growth associated protein 43*
GAPDH - *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
GSN - *Gelsolin*
HBS1L - *HBS1 like translational GTPase*
HCC - Hepatocelluláris karcinóma
HGFR - Hepatocita növekedési faktor receptor (*hepatocyte growth factor receptor*)
HOXB13 - *Homeobox B13*

HPRT1 - *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*
HR - Kockázati arány (*hazard ratio*)
HSP - Hősokk fehérje (*Heat shock protein*) (Hsp27, Hsp70, Hsp90A)
(m)HSPC - (metasztatikus) Hormon-érzékeny prosztatatarák
IAA - Jódacetamid
IL - Interleukin (IL-4, IL-6)
IL13RA2 - *Interleukin 13 Receptor Subunit Alpha 2*
ISUP - Nemzetközi Urológiai Patológiai Társaság (*International Society of Urological Pathology*)
LC-MS/MS - Folyadékromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (*Liquid chromatography–mass spectrometry*)
LDHA - Laktát-dehidrogenáz A
LHRH - Luteinizáló hormon-felszabadító hormon (*Luteinizing hormone-releasing hormone*)
LIMCH1 - *LIM and calponin homology domains 1*
LMO7 - *LIM domain 7*
LNPEP - *Leucyl and cystinyl aminopeptidase*
MAGED2 - *MAGE family member D2*
MDR - *Multidrug resistance*
MES - *2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid*
MET - *Tyrosine-protein kinase Met*
MIC-1 - *Macrophage inhibitory cytokine 1*
MMP - Mátrix metalloproteináz (MMP-2, MMP-7, MMP-9)
MRI - Mágneses rezonancia képalkotás (*Magnetic Resonance Imaging*)
MTT - *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*
n - Mintaszám
NAD(P) - Nikotinamid-adenin-dinukleotid (P: foszforilált változat)
NAMPT (i, e) - Nikotinamid foszforiboziltranszferáz (iNAMPT: intracelluláris; eNAMPT: extracelluláris)
NFDM - Zsírintes száraz tej (*Non-fat dried milk*)
OAT - *Ornithine aminotransferase*
p - Szignifikancia p-érték

PARP - *Poly (ADP-ribose) polymerase*
PBS - Foszfát puffer (*Phosphate-buffered saline*)
PC - Prosztatarák (*prostate cancer*)
PCA3 - *Prostate cancer antigen 3*
(q)PCR - (kvantitatív) Polimeráz lánreakció
PDIA3 - *Protein disulfide isomerase family A member 3*
PI - Propidium-jodid
PI3K - Foszfatidilinozitol-3-kináz
PI-RADS - *Prostate Imaging-Reporting and Data System*
Prg - progresszió
PSA (fPSA, tPSA) - prosztata specifikus antigén (szabad PSA, teljes PSA)
PYGB - *Glycogen Phosphorylase B*
PYGL - *Glycogen Phosphorylase L*
RAD - Irradiáció, sugárterápia
RANK - *Receptor activator of nuclear factor kappa-B*
RASSF3 - *Ras Association Domain Family Member 3*
RDV - Rektális digitális vizsgálat
RECIST - *Response Evaluation Criteria in Solid Tumours*
RIPA - *Radioimmunoprecipitation assay*
RNS - Ribonukleinsav
RPE - Radikális prosztatektómia (*radical prostatectomy*)
SDC1 - Syndecan-1
siRNS - kis interferáló ribonukleinsav (*small interfering ribonucleic acid*)
SND1 - *Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1*
STAT - *Signal transducer and activator of transcription*
SYPL1 - *Synaptophysin-like protein 1*
TBST - *Tris-buffered saline + Tween 20*
TFA - Trifluorecetsav
TMPRSS2-ERG - *Transmembrane serine protease 2 - ETS transcription factor ERG*
génfúzió
TNM - Tumor Nyirokcsomó Metasztázis (*Tumor Node Metastasis*)

1. Bevezetés

1.1. A prosztata anatómiája, hisztológiája, szerepe

A prosztata a férfiak belső nemi szervei közé tartozó páratlan szerv, amely alakjában és méretében gesztenyéhez hasonlítható. A szerv a húgyhólyag alatt helyezkedik el, ahol a prosztata alapja (*basis prostatae*) a hólyaggal a húgycső kilépése körüli részén csekély mértékben összenőtt, míg hátsó domború felszíne a végbél görbületével érintkezik. A prosztatát a húgycső aszimmetrikusan fúrja át, amelybe a herék felől érkező két ondókilövellő csatorna (*ductus ejaculatorius*) a szerv közepe táján kapcsolódik be [1].

A prosztata a férfi szaporító rendszer legnagyobb mirigye, amelynek tömör *stromája* a mirigyek mellett simaizomból és kötőszövetből épül fel. A szervben belül 20-50 különböző méretű *tubuloalveolaris* mirigy található, amelyek a húgycsőbe nyílnak. A szerv szerepe a prosztatanedv termelése és tárolása, amely *ejaculatio* esetén a spermát hígítja, a hímivarsejtek mozgását serkenti, valamint lúgos kémhatásával azok életképességét növeli. Emellett az *ejaculatio* során a prosztata simaizomzata részt vesz az ondó kilövellésében is [1, 2].

A szerv szekréciós aktivitását, szövetének szerkezetét nagyban befolyásolják androgén hormonhatások. A tesztoszteron hormon biológiailag aktívabb 5 α -dihidrotesztoszteronná (DHT) való átalakítására több egyéb szerv mellett a prosztata *stromalis* és *basalis* sejtjei is képesek [1, 2].

1.2. A prosztatarák etiológiája, epidemiológiája, prevenciója

2018-as adatok alapján a világon évente hozzávetőlegesen 1,3 millió új prosztatarákos (PC) megbetegedést diagnosztizálnak, valamint 360.000 PC-vel összefüggő halálozást regisztrálnak [3]. Hazánkban a PC éves incidenciája 4500 körüli, míg 1300 haláleset írható a betegség számlájára [4, 5]. A férfiak körében a világon a PC a második leggyakrabban diagnosztizált *malignus* elváltozás, valamint a daganatos megbetegedések okozta halálokok rangsorában az ötödik helyet foglalja el [3].

A PC incidenciája a világ különböző tájait összehasonlítva nagy eltéréseket mutat. A fejlett országokban, így Ausztráliában, Észak- és Nyugat-Európában, valamint Észak-Amerikában a leggyakoribb a betegség előfordulása és jellemzően Dél- és Kelet-

Ázsiában, illetve Afrika északi és keleti részén találkozunk a legalacsonyabb incidencia adatokkal [3].

A PC rizikótényezőit illetően kevés információ áll rendelkezésünkre, mindazonáltal multifaktoriális betegségként tekintünk rá, amely azt jelenti, hogy az öröklött elváltozásokon felül a környezeti tényezők együttesen alakítják ki a szerv *malignus* elfajulását. A daganat incidenciája és mortalitása a magasabb életkorral függ össze, így ezek a mutatók az idősebb (65 év feletti) férfiak vonatkozásában a legmagasabbak [6]. Ha a különböző etnikai csoportokat hasonlítjuk össze, kirajzolódik, hogy az afroamerikaiak körében találkozunk a legagresszívabb fenotípusú PC-vel, valamint a legmagasabb előfordulási aránnyal is, amely összefüggés a betegség genetikai eredetére utal, de nem elhanyagolható az életmód, valamint a környezeti faktorok szerepe sem [3, 5, 6].

Jelenlegi tudásunk szerint a PC-vel diagnosztizált betegek közel egyötödének családi anamnézisében előfordult már a betegség, amelyben a genetikai alapok mellett a hasonló környezeti karcinogéneknek való kitettség és életmód is közrejátszik [6, 7]. A PC örökletes formájáért főként DNS-hibajavításban részt vevő gének felelősek, melyek közül a *BRCA2* és *BRCA1*, az *ATM* és *CHEK2* csírvonali mutációi emelendők ki [8]. A genetikai háttérrel kapcsolatos kutatások rávilágítottak, hogy mivel az agresszívebb, metasztatikus esetek közel 10%-ában találni csírvonalbeli mutációt a szervre lokalizált daganatok esetén tapasztalt 5%-hoz képest, így az agresszív PC-k körében az örökletes háttér gyakoribb [8, 9]. A további rizikógének felderítését célzó kutatások alapján a *HOXB13*, *CDKN1B*, *RASSF3* és *ESR2* gének polimorfizmusairól bizonyosodott be, hogy genetikai eltérései hajlamosító tényezőt jelentenek a betegség kialakulásának szempontjából [9, 10].

A táplálkozásnak fontos szerepe lehet a PC megelőzésében. A túlzott hús, kiváltképp a vörös húsok, a magas telített zsírsav tartalmú ételek fogyasztása növelheti a PC kialakulásának kockázatát. Ezzel szemben a keresztesvirágú zöldségek (pl. karfiol, brokkoli, kelbimbó, káposzta) fogyasztása csökkentheti a megbetegedés rizikóját [6, 11, 12]. Bár egymásnak ellentmondó eredmények jelentek meg a témában, a paradicsom fogyasztás, annak likopintartalma miatt protektív hatású lehet, különösen E-vitaminnal és szelénnel kiegészítve [6, 13]. A túlzásba vitt alkohol fogyasztással kapcsolatban több tanulmány is megjelent, miszerint az növelheti a PC miatti halálozást [14]. A dohányzás

több módon is segítheti a daganatok megjelenését, így a PC-vel kapcsolatban is felmerült, mint kockáztnövelő életmódbeli faktor. Egyrésről a dohányfüstben lévő karcinogén anyagok génmutációkhoz vezethetnek, valamint a férfi dohányosok vérében a nemi hormonok szintje megnövekszik, amelyek hozzájárulhatnak a PC kialakulásához és progressziójához [6, 15, 16]. Az egyik legeggyértelműbb kockázati tényező a metabolikus szindróma nyomán kialakuló elhízás és magas vérnyomás [5, 6, 17]. Jelenlegi tudomásunk szerint a PC előfordulásának kockázata helyes életmóddal csökkenthető. A normál testsúly megtartása fontos szempont, amelyhez a mindennapos aktivitás és rendszeres testmozgás hozzásegít, de kiemelt szerep hárul az egészséges táplálkozásra is. Zöldségekben, gyümölcsökben és antioxidánsokban gazdag, míg telített zsírokat tartalmazó ételekben, húsokban mérsékelt étrend célravezető lehet [5, 6].

1.3. A prosztaták tünettana, szűrése, diagnosztikája

A PC korai stádiumban jellemzően tünetmentes, amely a korai felismerés fontosságára hívja fel a figyelmet. Mikor a daganat előrehaladottabb stádiumúvá fejlődik, úgy vizeletürítési gondokat okozhat. A PC első tünetei között szerepelhet az akadozó vagy nehézvizelés, a vizeletelakadás, a gyakori vizelési inger és a gyenge vizeletsugár. Lokálisan előrehaladott esetekben előfordulhat veseüregrendszeri pangás, vérszegénység, véres vizelet vagy akár alsó végtagi vizenyő is. Ritka tünet lehet a *hematospermia* megjelenése. A PC leggyakrabban a csontokba metasztatizál, így a daganat jelenlétére gyakran a csontfájdalom, ritkábban patológiás csonttörés nyomán derül fény [5, 18].

A PC-re különösen igaz, hogy az elváltozás mielőbbi észlelése kritikusan fontos a betegek gyógyulása szempontjából. Az ehhez szükséges szűrővizsgálaton az 50 év feletti férfiaknak évente ajánlott megjelenni. Azon férfiak esetében, akiknek családi kórtörténetében szerepelt PC eset vagy igazoltan patogén *BRCA2* génmutációt hordoznak, már 40-45 éves koruktól kezdve érdemes a szűrővizsgálatokon részt venni [5, 19].

Az alap szűrési protokoll szérum PSA-szint (prostatata specifikus antigén) meghatározásból és rektális digitális vizsgálatból (RDV) áll. PC gyanúja esetén (emelkedett vagy emelkedő tendenciát mutató szérum PSA-szint, vagy gyanús tapintási lelet) a diagnózist szövettani vizsgálattal is szükséges megerősíteni [5, 19, 20].

A PSA egy glikoprotein, amelyet a prosztata *epithelialis* sejtjei termelnek, és feladata az ondóváladék elfolyósítása a hímivarsejtek mozgásának elősegítése érdekében. A PSA egy fontos biomarker a PC felfedezésében, ezen felül a kezelések hatékonyságának, valamint a tumor progressziójának meghatározásában, azonban alkalmazásának korlátjai vannak. A PSA prosztata specifikus, de nem PC-specifikus marker, ami azt jelenti, hogy szérumszintjének emelkedése ugyanúgy jelezhet prosztata gyulladást, jóindulatú megnagyobbodást, mint ahogyan daganatos elváltozást is [5, 19, 20]. Az 1980-as évek közepétől kezdve a PC-vel diagnosztizált betegek száma jelentősen megnőtt, amelynek egyik oka a PSA-szűrés bevezetése volt. Ma már látjuk, hogy tünetmentes férfiak PSA meghatározása gyakran vezethetett látens, klinikailag indolens PC diagnosztizálásához, amely sok esetben a beteg túlkezelését eredményezte, éppen ezért a PSA-szűrés finomhangolására volt szükség [6, 19, 21].

A PSA véráramba jutva jellemzően fehérjékhez kötve (kötött PSA) jelenik meg, azonban egy kisebb hányaduk szabadon (szabad PSA vagy fPSA) kering a vérben. A PSA két formája együttesen adja a teljes PSA értéket (*total-PSA* vagy tPSA). A tumor kockázatának becslésére szolgál a fPSA/tPSA hányados meghatározása, amely minél nagyobb értéket vesz fel, annál valószínűbb, hogy nem *malignus* folyamat okozza a PSA-szint emelkedést a vérben. További fontos szempont, hogy a szérum PSA-szint (ng/ml) mérése mellett figyelembe vegyük a prosztata térfogatát is. Így határozható meg a PSA-denzitás, amely a szérum PSA-szint és a prosztata térfogatának hányadosaként számolandó érték. Ezen kívül a PSA-sebesség is egy olyan mérőszám, amely segíthet a tumor specificitást javítani, hiszen ezen érték az egy év alatt bekövetkezett PSA-szint emelkedést határozza meg (ng/ml/év). A PSA duplázódási idő azt az időt adja meg, amely alatt a PSA érték a kétszeresére nő. Fontos azonban megemlíteni, hogy léteznek PSA-t nem termelő (PSA-negatív) PC esetek (pl. tisztán neuroendokrin PC-k) is, így önmagában a szérum PSA-szint meghatározás nem elégséges diagnosztikus eszköz. Habár a klinikai gyakorlatban még nem elterjedt módszer, de ma már vizeletből kimutatható biomarkerek is segíthetik a PC diagnózisának felállítását. Prostatamasszázst követő vizeletvétele után a PCA3 (*prostate cancer antigen 3*), valamint a *TMPRSS2-ERG* génfüzió kimutatása, illetve azok kombinálása segíthet a daganat jelenlétét igazolni [5, 19, 20, 22].

A PC klinikai stádiumbesorolása ma már nem képzelhető el képalkotó eljárások igénybevétele nélkül. A prosztata ultrahangos vizsgálatával megállapítható a szerv

szerkezete és mérete, viszont a *benignus* és *malignus* daganatok nem különböztethetők meg általa. A *computer tomographiás* (CT) eljárás megfelelő képalkotó módszer a PC szervi áttéteinek észlelésére, azonban a mágneses rezonancia (MRI) vizsgálat által nyújtott PI-RADS (*Prostate Imaging-Reporting and Data System*) besorolás szolgáltatja a leginformatívabb képet a prosztatát érintő *benignus* vagy *malignus* elváltozásokról. Az MRI vizsgálat segítségével pontosan meghatározható a tumoros terület a szerv állományán belül, ezáltal a biopsziás mintavétel optimális helye is behatárolható, továbbá pontosabb információt ad a prosztatarák lokális kiterjedtségéről. A csontmetasztázisok kimutatására szolgáló csontszcintigráfias vizsgálat szintén elengedhetetlen a prosztatarák klinikai stádiumbesorolásához, mely izotópdiagnosztikai módszerrel történik [5, 19, 20].

A prosztatata tübiopsziás mintavételét a magas vagy emelkedő tendenciát mutató szérums PSA-szint, valamint a kóros RDV lelet indokolhatja. A lokális analgészia mellett a végbélen vagy a gáti szakaszon át történő ultrahang vezérelt biopsziás mintavételt úgy kell kivitelezni, hogy a prosztatata mindkét lebenyéből, a szerv teljes állományát a lehető legjobban lefedő 6-6 szövetminta vételezése történjen meg. A szövetmintát ezt követően patológus szakorvos elemzi, valamint állapítja meg a tumor jelenlétét, amely a PC diagnózisának alapját képezi [5, 19, 20].

1.4. A prosztatarák patológiája, prognosztikája

A PC-k hozzávetőlegesen 95%-a szövettanilag *acinaris* („klasszikus”) *adenocarcinoma*, míg kb. 5%-a *ductalis* eredetű *adenocarcinoma*. A PC 70-80%-ban a szerv perifériás zónájából indul ki [5, 23]. Az *adenocarcinomák* képesek neuroendokrin differenciáció útján elindulni, azonban tisztán neuroendokrin PC-k csak ritka esetekben alakulnak ki és igen rossz prognózissal jellemezhetőek [5, 23, 24].

A biopsziás mintavétel célja, hogy a patológus szakorvos megállapítsa a tumor differenciáltságának mértékét, amely a prognózis megállapításának szempontjából kiemelt fontosságú lépés, valamint a későbbi terápiás döntést is nagyban befolyásolja. A tumor differenciáltságának leírására a *Gleason-grade* értékek használatosak, amely két, egyenként 1 és 5 közötti értékből áll. Az első számot a tumormintán látható kiterjedését tekintve domináns, a második értéket a legkevésbé differenciált daganatos mirigyek *grade* értékével adják meg (pl. 3+4). Az értékek összeadásával határozható meg a daganat Gleason-pontszáma (*Gleason-score*), és ennek alapján az *ISUP-grade* (*International*

Society of Urological Pathology) (1-5) besorolás (1. táblázat). Az *ISUP-grade* rendszer bevezetése lehetővé tette, hogy a PC grádusa összevethető lehessen más tumorok grádusával [5, 19, 23, 25, 26].

1. táblázat – A PC szövettani kiértékelésére létrehozott Gleason pontszámok és *ISUP-grade* rendszer, valamint azok klinikai jellemzői [5, 19].

ISUP grade	Gleason-pontszám	A tumoros mirigyek szerkezete	Klinikai jellemzők
1	2-6	Kizárólag különálló, jól formált mirigyek	- legkevésbé agresszív - nagyon lassú növekedésű - alacsony kockázatú
2	7 (3+4)	Túlnyomórészt jól formált mirigyek, de kis területen rosszul formált / fúzionált / cribriform mirigyek	- kevésbé agresszív - lassú növekedésű - alacsony / közepes kockázatú
3	7 (4+3)	Túlnyomórészt rosszul formált / fúzionált / cribriform mirigyek, de kis területen jól formált mirigyek	- mérsékelten agresszív - gyors növekedésű - közepes / magas kockázatú
4	8	- Kizárólag rosszul formált / fúzionált / cribriform mirigyek, vagy - Túlnyomórészt jól formált mirigyek és kis területen mirigyképző tendencia hiánya, vagy - Túlnyomórészt mirigyképző tendencia hiánya és kis területen jól formált mirigyek	- agresszív - gyors növekedésű - magas kockázatú
5	9-10	Mirigyképzés hiánya. Mirigynekrozis, rosszul formált / fúzionált / cribriform mirigyekkel vagy anélkül.	- nagyon agresszív - gyors növekedésű - magas kockázatú

A daganatok kiterjedésük alapján is fontos osztályoznunk, erre szolgál a TNM-klasszifikáció. A 'T' a primer tumor, az 'N' az esetleges nyirokcsomó érintettség, míg az 'M' a távoli metasztázisok jellemzésére szolgál (2. táblázat).

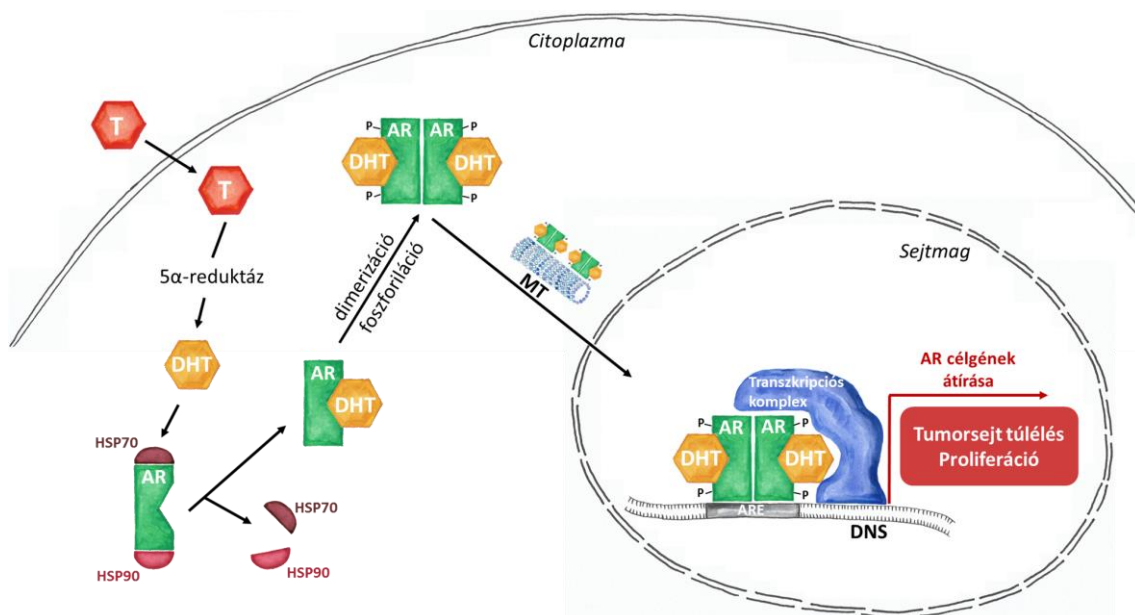
2. táblázat – A PC Tumor Node Metastasis (TNM) klasszifikációja [5, 19].

Osztályozás	Definíció
T - Primer tumor	
Tx	A primer tumor nem kiértékelhető
T1	Klinikailag nem észlelhető tumor, amely nem tapintható
T1a	Incidentálisan felfedezett tumor a reszekált minta ≤ 5%-ában
T1b	Incidentálisan felfedezett tumor a reszekált minta > 5%-ában
T1c	Tumor igazolása az emelkedett PSA-érték miatt végzett tűbiopsziás szövetmintában
T2	A prosztata korlátozódó, tapintható tumor
T2a	A tumor az egyik lebeny ≤ 50%-át érinti
T2b	A tumor az egyik lebeny > 50%-át érinti
T2c	A tumor mindkét lebenyt érinti
T3	Prosztata tokján túl terjedő tumor
T3a	Prosztata tokján túlterjedő (extrakapszuláris) tumor
T3b	A tumor infiltrálja a <i>vesicula seminalis</i> t
T4	A tumor ráterjed a szomszédos szervekre: külső <i>sphincter</i> , végbél, <i>levator</i> izomzat és/vagy medencefal
N - Regionális (medencei) áttét	
Nx	Regionális nyirokcsomók nem kiértékelhetők
N0	Nincs regionális nyirokcsomóáttét
N1	Regionális nyirokcsomóáttét van
M - Távoli áttét	
M0	Nincs távoli áttét
M1	Távoli áttét
M1a	Nem regionális nyirokcsomóáttét
M1b	Csontáttét
M1c	Egyéb távoli áttét

1.5. Androgének szerepe a prosztatatarakban

Az endogén androgénszintézis, melynek terméke a szteroid szerkezetű tesztoszteron, valamint az abból keletkező DHT főként a here Leydig-sejtjeiben, kisebb mértékben a mellékvesében történik, ahonnan szekrécióval kerül a véráramba. A DHT a hormon biológiailag leghatékonyabb formája, melynek képződése főként az androgénérzékeny célszövetekben történik meg. Az androgének szükségesek a férfi nemi jellegek kialakításában, ahogy a prosztata fejlődése is függ ezen hormonok szintjétől. Az androgének hatásai a célsejtek androgén receptorain (AR) keresztül valósulnak meg. A ligand-függő AR aktivált állapotában transzkripciós faktorként funkcionál. Mivel a DHT nagyobb affinitással kötődik az AR-hoz, így ennek klinikai jelentősége is nagyobb. Fiziológias körülmények között a normál módon működő prosztata sejtek androgén függők, azaz érési, differenciálódási folyamataikat, növekedésüket és életben maradásukat az androgénszint szabályozza. A folyamat a következőképpen zajlik: az androgén érzékeny prosztata sejtek által a tesztoszteron felvételre kerül a véráramból,

melyet 5α -reduktáz enzimük segítségével DHT-ná, az AR ligandjává alakítanak át. A ligand-receptor kapcsolat létrejötte képes aktiválni az AR-t, amely foszforilálódik és dimerizálódik, majd a mikrotubulusok mentén a sejtmagba transzlokálódik. Itt a DNS ún. androgén-reszponzív elemeihez (ARE – *androgen responsive element*) kötődik, amellyel elindulhat androgén célgének átírása. A génaktiváció hatására a prosztatasejtek túlélése, proliferációja beindul, valamint PSA termelésük is megnövekszik (1. ábra) [5, 27, 28]. Ezen molekuláris folyamat ismerete szükséges az androgén deprivációs terápia (ADT) lényegének megértéséhez.



1. ábra – Az androgén hormon (DHT) androgén receptoron keresztül kifejtett hatásai. A tesztoszteron hormon a véráramból a prosztatasejtekbe bejutva 5α -dihidrotesztoszteronná alakul a sejt 5α -reduktáz enzim segítségével, amely az androgén receptor biológiailag aktívabb ligandja. A ligand ezt követően a citoplazmában lévő androgén receptorhoz kötődik, amelynek hatására a HSP70 és HSP90 fehérjék leválnak a receptorról, majd a receptor-ligand komplexek dimerizálódnak és kinázok által foszforilálódnak. A dimerek ezt követően a mikrotubulusok mentén szállítódnak a sejtmagba, ahol a DNS ARE régiójához kötődve transzkripció faktoroként az AR-célgének átírásában vesznek részt. Ennek hatására a tumorsejtek túlélnek és proliferálnak. T – tesztoszteron; DHT - 5α -dihidrotesztoszteron; AR – androgén receptor; ARE – androgén reszponzív elem; MT - mikrotubulus.

1.6. A prosztatatarák kezelési lehetőségei

1.6.1. Szervre lokalizált, illetve lokálisan előrehaladott prosztatatarák kezelése

Azokban az esetekben, amikor a PC diagnózisa szerint a tumor a szervre lokalizált vagy lokálisan előrehaladott, olyan elsődleges kezelési lehetőségek jönnek szóba, mint a beteg aktív követése, a radikális prosztatatektómia (RPE), a sugárkezelés, valamint a megfigyelés. Az ilyen stádiumú esetek terápiájának kiválasztásánál fontos a daganat rizikócsoportha sorolása, valamint a beteg tájékoztatása. A PC diagnózis felállítását követően a megfelelő ellátás megválasztásához *onkoteamnek* kell a kezelési stratégiát kialakítania, melynek figyelembe kell vennie a tumor sajátosságait, a beteg várható élettartamát és biológiai korát, valamint igényeit is [5, 19]. A nem előrehaladott prosztatatumorok egyes rizikócsoportha sorolásának szempontjai táblázatos formában kerültek összefoglalásra (3. táblázat).

3. táblázat – A nem előrehaladott PC rizikóbesorolásának szempontjai, valamint a radikális prosztatatektómia (RPE) indikációi [19].

	Alacsony kockázatú	Közepes kockázatú	Magas kockázatú	
	Szervre lokalizált tumor			Helyileg előrehaladott tumor
PSA	PSA < 10ng/ml	PSA 10-20 ng/ml	PSA > 20 ng/ml	bármilyen PSA-szint
Patológiai mutatók	és ISUP grade 1 és cT1-2a	vagy ISUP grade 2-3 vagy cT2b	vagy ISUP grade 4-5 vagy cT2c	bármilyen ISUP grade cT3-4 vagy cN+
RPE indikáció	Nem egyértelműen indikált	Indikált	Leginkább indikált	Indikált

Az aktív követés célja az alacsony rizikójú PC esetek túlkezelésének elkerülése. Ez a stratégia abban az esetben preferálandó, amikor a daganat alacsony rizikójú, valamint a beteg együttműködést mutat a rendszeres PSA-szűrésre és RDV-ra, valamint szükség esetén a biopsziás mintavételre. Az így követett tumor kezelését abban az esetben kezdik meg, ha a progresszió jelei tapasztalhatók [5, 19].

Az RPE, azaz a prosztatának és tokjának, valamint a regionális (kismedencei) nyirokcsomóknak és ondómirigyeknek műtéti eltávolítása jelenti az egyik kuratív jellegű kezelési formát, amelyet azon nem áttétes PC betegeknek ajánlanak, akiknek várható élettartama legalább 10 év és nem szenvednek egyéb súlyos betegségben [5, 29-31]. A sebészeti eljárás célja a prosztatatumor maradéktalan eltávolítása a szervezetből, továbbá lehetőség szerint a páciens kontinenciájának és merevedési képességének megőrzése. A kezelés a beteg teljes gyógyulásához vezethet, túlélését nagymértékben növelheti. Az

RPE elvégezhető laparoszkópiával vagy nyílt műtéttel [5, 19, 30, 32]. A műtétieltávolított tumorszövet patológus által történő vizsgálata fontos mozzanat a beteg további kezelése szempontjából. A pozitív reszekciós szél, illetve a tumor prosztata tokján való áttörése, valamint a környező szöveteket érintő beszűrődése indikálja a sugárterápia alkalmazását [5]. Ezen felül ahogyan a PC bármely kezelését követően, úgy az RPE után is a PSA-szint monitorozásnak nagy jelentősége van, hiszen ez alapján a műtét után esetlegesen visszamaradó tumorsejtek kimutathatók, valamint a későbbiekben a tumor recidíva igazolható, ezáltal a további terápiás lépések megalapozhatók [5, 19, 33].

A sugárterápia gyógyító dózisban ugyancsak végezhető a szervre lokalizált PC esetében. A sugárterápiás orvos a PC kockázati besorolásától függően kezeli a prosztátát vagy azon felül az ondóhólyagot, valamint a magas kockázat esetén a kismedencei nyirokrégiót is. A kezelés megoldható külső sugárzás útján, illetve szövetközi besugárzással (brachiterápia), valamint ezek kombinációjával [5, 19].

A megfigyelés olyan PC betegek esetén kerül szóba, akiknek rövid a várható élettartamuk, valamint nem alkalmasak kuratív jellegű kezelésre. Esetükben palliatív ellátásra van lehetőség, amellyel a tünetek csökkentése, illetve a kezelés okozta toxicitás mérséklése a cél [5, 19, 34].

1.6.2. Előrehaladott prosztatarák kezelése

1.6.2.1. Hormon-érzékeny prosztatarák kezelése

Ugyan a PC progressziójának okait még nem ismerjük teljes egészében, azonban ismert, hogy a PC kezdetben hormonfüggő (*hormone sensitive prostate cancer* – HSPC) betegség, így az androgén szintézis gátlásával a betegek túlnyomó többsége jellemzően évekig eredményesen kezelhető [35]. ADT abban az esetben indítható, ha a kuratív célú sebészi vagy sugárterápiás kezeléseket a beteg állapota nem engedi, vagy ha a daganat előrehaladott stádiuma miatt már nem alkalmazhatók. Az ADT célja az androgének termelődésének blokkolásán alapul, amelyre több megoldás is létezik. A sebészi kasztráció ma már háttérbe szorult, mivel a kasztráció ma már gyógyszeres úton is megvalósítható. A vér tesztoszteron szintjének csökkentését LHRH (luteinizáló hormont felszabadító hormon) agonistákkal és antagonistákkal egyaránt elérhetjük [36]. LHRH agonistákkal a szérum tesztoszteron szint 4 héten belül, míg LHRH antagonistákkal már

1 hét múlva a kívánt kasztrációs szint (<50 ng/dl vagy 1,7 nmol/l) alá szorítható [19]. A PC hormonérzékenysége azonban múlandó állapot, ugyanis jellemzően 2-3 éves ADT kezelés után a daganatok belépnek az ún. hormonrefrakter (más néven kasztráció-rezisztens) stádiumba. A kasztráció-rezisztens állapotról akkor beszélünk, ha a vérben lévő kasztrációs tesztoszteron szint ellenére biokémiai vagy radiológia progresszió tapasztalható [35]. A biokémia progressziót a PSA szérumszintjének tendenciózus emelkedése jelenti, amelynek legalább 50%-kal kell meghaladnia a nadír értéket, azaz a kezelés során mért legalacsonyabb PSA koncentrációt. A radiológiai progresszió akkor állapítható meg, ha legalább két új csonttét megjelenése igazolható, vagy ha a lágyszöveti metasztázis a RECIST kritériumoknak megfelelő progressziót produkál [19].

Napjainkban az ADT terápia mellett az eredetileg kasztráció-rezisztens prosztatarák (CRPC) ellen alkalmazott docetaxel (DOC) kemoterápia, valamint az abirateron (ABI) is alkalmazható metasztatikus hormonérzékeny (mHSPC) betegek esetén [37, 38]. A DOC és az ABI elsőként kasztráció-rezisztens stádiumú prosztatarákban került törzskönyvezésre, így részletesebben a következő alfejezetben kerülnek bemutatásra.

1.6.2.2. Kasztráció-rezisztens prosztatarák kezelése

A PC tehát időlegesen kontroll alatt tartható gyógyszeres vagy sebészi kasztráció útján, azonban a daganat idővel óhatatlanul hormon-független módon is képes lesz növekedni, így kialakul a CRPC, amely stádiumban lévő betegeknél jellemzően távoli áttétek is detektálhatók (mCRPC – metasztatikus kasztráció-rezisztens prosztatarák) [35].

A kasztráció-rezisztens tumorok kezelésére ma már számos gyógyszer áll rendelkezésre, azonban az elsővonalbeli kezelés, valamint az egyes gyógyszerek szekvenciájának optimális megválasztására jelenleg nincsenek megfelelő biomarkereink. A klinikai döntéshozatal így leginkább a beteg állapotát, kórtörténetét, kísérő betegségeit, illetve a gyógyszerek elérhetőségét, mellékhatásait veszi figyelembe. Az mCRPC betegek elsővonalbeli kezelésére rendelkezésre álló hatóanyagok; a DOC kemoterápia, valamint az AR támadáspontú enzalutamid (ENZA) és ABI, valamint a csonttétet célzó radium-223 izotóp kezelés. Másod- vagy többedik vonalban a fenti három szertől kívül adható a cabazitaxel (CABA), valamint a BRCA1-mutáns páciensek esetében különböző PARP inhibitor kezelések (Olaparib, Rucaparib), illetve a mikroszatellita instabilitást

hordozó betegeknek elérhető az immunellenőrzőpont-gátló (Pembrolizumab) kezelés [39].

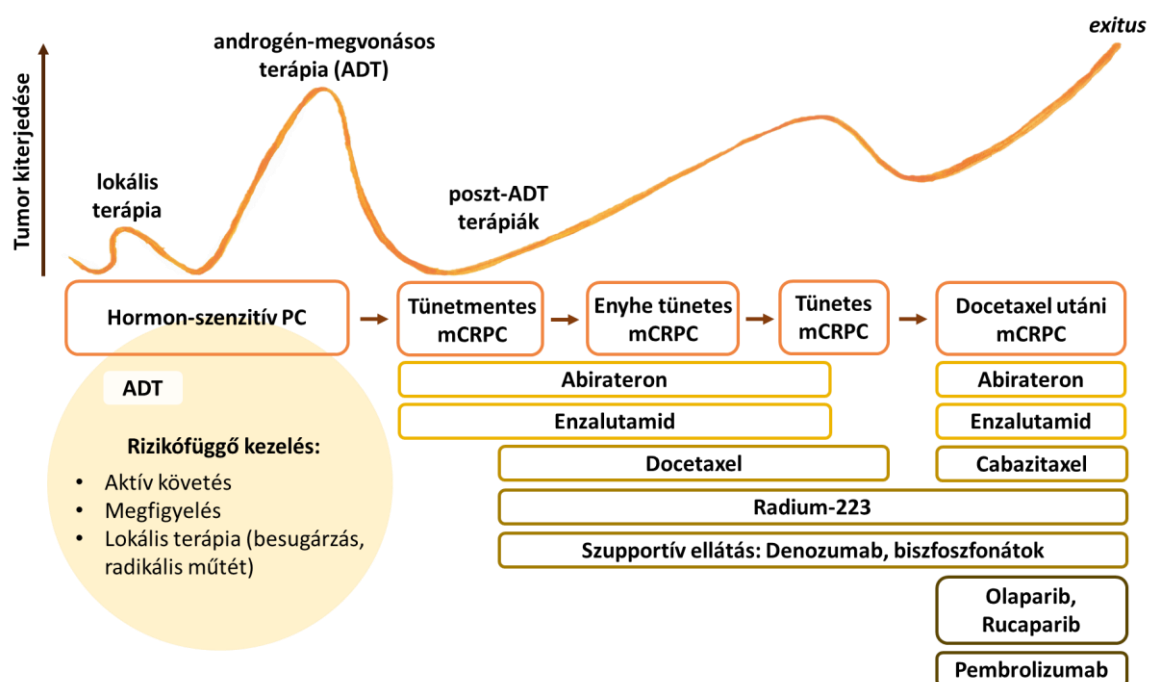
A fent említett kezelések közül elsőként, 2004-ben a DOC kemoterápiát engedélyezték az mCRPC daganatokkal szembeni kezelésre, amely máig is az egyik legjelentősebb elsővonalbeli kezelésnek számít [33, 40]. A citotoxikus taxánok hatásmechanizmusukat tekintve az intracelluláris mikrotubulusok β -tubulin alegységeihez kötődnek, így azok nem képesek a rájuk jellemző dinamikus instabilitást fenntartani, ezáltal a sejtek „megbénulnak”. A stabilizált mikrotubulus rendszer apoptózisra kényszeríti az osztódó sejteket, ugyanis a mitotikus húzófonalak gátlása révén a sejtek nem képesek a sejtciklus G2/M ellenőrzőpontján túljutni [41]. A kezelés további következménye, hogy a mikrotubulusok mentén, a sejtmagba történő AR transzport is leáll, így a kemoterápiás kezelés az androgén jelútra is hatást gyakorol [42].

A TAX327 és a SWOG 99-16 fázis 3 klinikai vizsgálatok mutatták ki az mCRPC betegek jobb túlélését DOC-kezelés hatására az addig korábban alkalmazott mitoxantron kemoterápiával összevetve [40, 43]. A CABA azon betegek számára lett kifejlesztve, akiknél tumorprogresszió volt tapasztalható a DOC-kezelés alatt. A CABA a klinikai vizsgálatokban a DOC-hoz hasonló hatékonyságot mutatott a DOC-érzékeny daganatokkal szemben, azonban a taxán-rezisztenciát mutató tumorokkal szemben hatásosabbnak bizonyult a DOC-nál [44-46]. A DOC-rezisztencia kialakulásakor másodvonalban opció lehet a CABA kezelés, ám napjainkban gyakrabban alkalmazzák az ABI vagy az ENZA kezeléseket [5, 39].

A 2010-ben engedélyezett ABI egy Cyp17 inhibitor, mely a sejtek androgénszintézisét képes gátolni, ezáltal csökkenti a véráramba jutó tesztoszteron mennyiségét [47]. A két évvel később törzskönyvezett ENZA ugyancsak anti-androgén támadáspontú hatóanyag, azonban nem az androgén bioszintézist gátolja, hanem az AR-t. Az ENZA tehát az AR kompetitív antagonistájaként megakadályozza az AR-ligand (DHT) kötődést, ezáltal nem képes a receptor a sejtmagba bejutva transzkripciós faktorként célgénjeit átírni [48]. Jelenleg hazánkban mindkét utóbb említett gyógyszer alkalmazható olyan betegek esetén, akiknél tumorprogresszió állapítható meg a DOC-kezelés folyamán vagy azt követően, azonban pre-kemoterápiás indikációjuk is létezik [38].

Az előrehaladott PC esetekben gyakran a beteg szervezetében csontmetasztázisok jelenléte is igazolható. A csontokat érintő események elkerülésére használhatók a biszfoszfonátok (Zoledronsav), valamint a RANK ligand gátló készítmények (Denosumab) [5, 33]. Ugyancsak a csontmetasztázisok kezelésére alkalmas a radium-223, amely α -sugárzó izotóp a betegek életminőségének javításán túl képes a túlélésüket is növelni. A radium-223 képes szelektíven támadni a csontáttéteket, ahol sugárzó hatása révén DNS károsodást okoz és megállítja a sejtosztódást, valamint fájdalomcsillapító hatást is kifejt [49].

A napjainkban rendelkezésre álló hatóanyagok alkalmazásának sorrendje nehezen optimalizálható. A terápiás szekvencia megválasztása egy sok szempontos, összetett feladat, amelynek célja a beteg túlélésének maximalizálása az életminőség figyelembe tartása mellett. A PC különböző stádiumaiban rendelkezésre álló kezelési lehetőségeket a 2. ábra foglalja össze.



2. ábra – A PC egyes stádiumaiban alkalmazható kezelési, terápiás lehetőségek összefoglaló ábrája [5].

Fontos kiemelni a terápia-rezisztencia jelenségét, amelyről abban az esetben beszélünk, amikor a daganat bizonyos sejten belüli vagy mikrokörnyezetével kapcsolatos változásának köszönhetően képes ellenállni egy adott kezelés hatásának. Alapvonalis rezisztenciáról beszélünk, ha a tumor fenotípusának köszönhetően kezdetben is ellenáll a

kezelésnek, míg szerzett rezisztencia esetén annak folyamán alakítja ezen tulajdonságát. Jelen értekezés a taxán kezelések közé tartozó DOC kemoterápia rezisztenciájának vizsgálatára összpontosít, így az ezzel kapcsolatos szakirodalmi eredmények kerülnek részletes bemutatásra.

1.7. Ismert kemoterápia-rezisztencia mechanizmusok, lehetséges biomarkerek és célzott kezelések

Mivel a DOC kemoterápia a mikrotubulusokat felépítő β -tubulin alegységekhez való kötődéssel fejt ki citotoxikus hatását, így a tumorsejtek számára kézenfekvő stratégia a hatás elkerülése érdekében ezen molekuláinak megváltoztatása. Több tudományos közlemény szerint is DOC-rezisztenciához vezethetnek az α - és β -tubulin génekben bekövetkező mutációk, amelyek következtében a DOC kisebb affinitással képes kötődni a mikrotubulusokhoz. A sejtvízban bekövetkező változások között továbbá megfigyelték, hogy a DOC-rezisztens sejtekben a β III-tubulin izoforma kifejeződése megnövekedett mértékű. A β III-tubulin magasabb expressziójának emellett klinikai szempontból is van jelentősége, hiszen összefüggést találtak a PC agresszívabb fenotípusával és a kasztráció-rezisztens állapot progressziójával. Az eredmények fényében a tubulint érintő változások vizsgálata felmerült, mint lehetséges biomarker a taxán rezisztencia előrejelzésére, de a klinikai gyakorlatba való bevezetésig még további kutatómunka szükséges [45, 50, 51].

Az *epithelialis-mesenchymalis* tranzíció (EMT) jól ismert jelenség a daganatokat illetően. A *mesenchymalis* fenotípusúvá alakuló tumorok agresszívabbak, motilitásuk magasabb fokú, melynek következtében fokozott áttétképző képességgel és így rosszabb prognózissal bírnak. Két független kutatócsoport hasonló *in vitro* vizsgálatai egyaránt kimutatták, hogy a kezdetben DOC-érzékeny PC sejtek a kezelés hatására EMT-n mennek keresztül. Sikerült bebizonyítaniuk, hogy a jelenség hozzájárul a hatóanyaggal szembeni rezisztenciájukhoz [45, 52, 53].

Az ABC-transzporterek (*ATP-binding cassette*, vagy más néven *multidrug resistance* – MDR gének) szerepét a PC, valamint egyéb tumorfélések terápia rezisztenciájával kapcsolatban is felfedték. Ennek molekuláris szintű magyarázata, hogy az MDR génekről átíródó ABC transzmembrán fehérjék efflux pumpa aktivitásuk által képesek a sejtek intracelluláris hatóanyag koncentrációját jelentős mértékben csökkenteni [54]. Bahngai és munkacsoportja 2000-ben publikált közleményében bemutatta, hogy az *MDR1* gén

által kódolt ABCB1 fehérje megnövekedett expressziója a vizsgált tumorszövet mintákban összefüggést mutatott a magasabb PSA-szinttel, malignitással és stádiummal. További sejtkultúrák kísérletek az ABCB1, ABCB4 és ABCB5 fehérjékről bizonyították be, hogy szerepet játszanak a DOC-rezisztencia kialakításában [55-57], azonban fontos megemlíteni azt az észrevételt is, miszerint a CABA kezelés a DOC-nál hatékonyabbnak bizonyul MDR fenotípusú tumorokkal szemben [58]. Hour munkacsoportjának sikerült kimutatnia, hogy a DOC-rezisztens PC sejtekben tapasztalt jelentős mértékben megnövekedett ABCB1 expresszió mögött az EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) szignálút fokozott aktivitása áll. A különböző stádiumú tumorszövet minták immunhisztokémiai analiziséből továbbá megállapították, hogy míg hormonérzékeny szakaszban az EGFR expresszió alig kimutatható, addig kasztráció-rezisztens stádiumban már megnövekedett mértékű, azonban leginkább DOC-rezisztens állapotban regulálódik felül [59]. Kato és munkacsoportja arra a fontos eredményre jutott, hogy nem csupán az *in vitro* kondíciók között vizsgált DOC-rezisztens PC sejtek felülúszóiból, hanem a DOC-terápiára nem reagáló betegek szérummintáiból izolált exoszómákban is megnövekedett az ABCB1 fehérjeszintje. Mivel hasonló összefüggést nem sikerült kimutatniuk a CABA kezeléssel kapcsolatosan, így arra a következtetésre jutottak, hogy a vérből vagy vizeletből izolált exoszómák ABCB1 tartalma segíthet a megfelelő taxán kezelés megválasztásában [60]. Az ígéretes eredmények ellenére az *MDR* gének biomarkerként vagy gyógyszer-célpontként való alkalmazása máig nem került be a klinikai gyakorlatba.

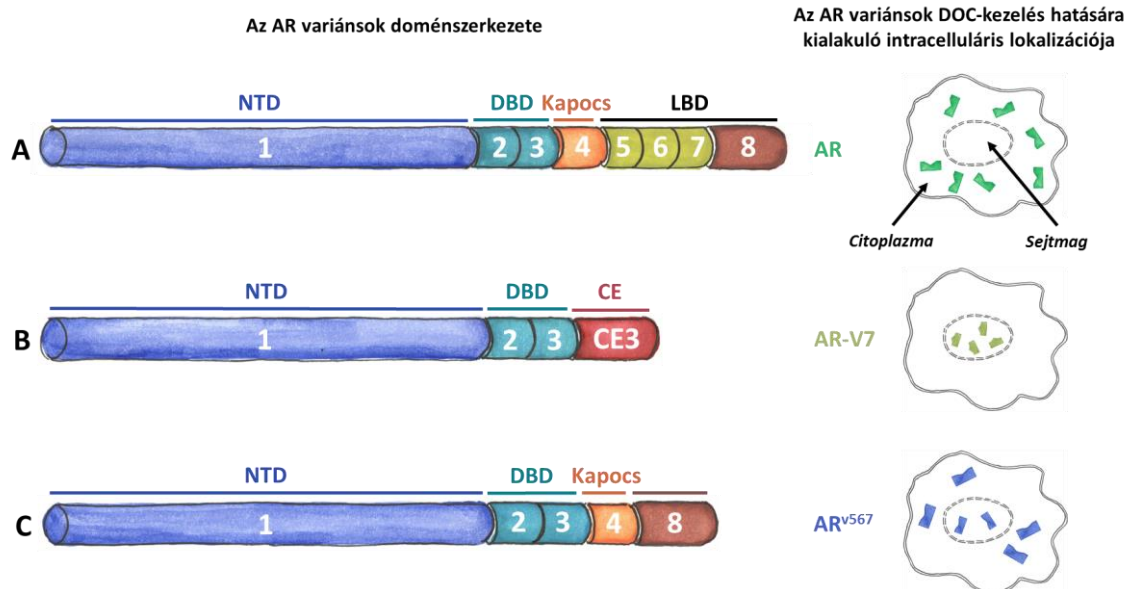
Az ERG egy transzkripciós regulátorként funkcionáló onkogén fehérje, amelynek fokozott termelődése a PC-k közel 50%-ában kimutatható. Megnövekedett expressziójáért az esetek döntő többségében a *TMPRSS2-ERG* fúziós gén létrejötte tehető felelőssé [61]. A *TMPRSS2* gén expressziója androgén szabályozás alatt áll, így a fúzió kialakulásával az ERG fehérje is androgén befolyásoltság alá kerül. Galetti és kutatócsoportja *in vitro* és *in vivo* módszerekkel kimutatták, hogy az ERG termelődés fokozódása DOC-rezisztenciához vezet. Megfigyeléseiket mCRPC betegek szövetszövetmintáin is megerősítették, melynek során kimutatták, hogy az ERG-pozitív (ERG+) betegek kétszer nagyobb eséllyel válnak rezisztenssé DOC-ra, mint ERG-negatív (ERG-) tumorral diagnosztizált páciensek [62]. Reig és munkatársai az előzőekkel összhangban azt találták, hogy *TMPRSS2-ERG+* mCRPC betegek a DOC-terápiára alacsonyabb PSA válasszal reagáltak, valamint rövidebb PSA-progresszió-mentes

túlélést mutattak, mint az ezen génfüziót nem hordozó betegek [63]. Azonban érdekes módon két független munkacsoport hormonérzékeny metasztatikus prosztatarák (mHSPC) klinikai mintákon tett vizsgálataik alapján, az előzőekben leírtakkal ellentétes megállapításra jutott. Küronya és munkacsoportja 55, míg Rajpar és munkatársai 334 mHSPC páciens szövetmintáinak immunhisztokémiai vizsgálata alapján egyöntetűen arra a következtetésre jutottak, hogy a pozitív ERG festődés a DOC-kezelés alatti jobb relapszus-mentes túléléssel van összefüggésben [64, 65]. Mindezen eredmények fényében elmondható, hogy a DOC-rezisztenciát illetően az ERG expresszió biomarkerként való alkalmazásához további vizsgálatokra van szükség.

A DOC által okozott mikrotubulus gátlás nem csupán a mitózis folyamatát blokkolja, hanem ezen felül további fontos sejten belüli folyamatra is hatással van. Ismert, hogy a ligandkötődés által aktivált AR a mikrotubulusok mentén haladó dynein motorfehérje segítségével jut be a sejtmagba. Darshan és munkatársai képesek voltak kimutatni, hogy a DOC sejtvezet megbenítő hatása nyomán az AR a sejtplazmában felhalmozódik, amelynek következtében az AR célgénjei nem kerülnek átírásra, így a tumor progressziója lassulhat. Ezen összefüggés feltárása nyitotta meg az utat a munkacsoport előtt ahhoz, hogy DOC-kezelt PC betegek mintáiban az AR sejten belüli lokalizációját vizsgálják. Vizsgálataik rávilágítottak, hogy azon DOC-kezelt betegekben, akik a terápia ellenére növekedő PSA szintet mutattak, magasabb szinten volt jelen a sejtmagban az AR, mint a DOC-ra reagáló betegek esetében. Ezáltal kimutatták, hogy az AR citoplazmatikus szekvesztrációja és a DOC-terápiára adott válasz között korreláció mutatkozik [45, 66]. Thadani-Mulero és munkatársai kutatásukkal tovább árnyalták a képet, amely az AR-státusz és a DOC-rezisztencia között kirajzolódott. Munkájukkal meghatároztak két klinikailag releváns AR *splice* variánst, az AR^{v567}-et és az AR-V7-et, amelyekről kimutatták, hogy különböző mértékben kötődnek a mikrotubulusokhoz és függenek a dynein motorfehérjétől. *In vitro* és *in vivo* kísérleteik tükrében azt a következtetést vonták le, hogy ez az affinitásbeli különbség megjelenik a taxánokkal szembeni szenzitivitásban. A kutatócsoport az AR^{v567}, illetve AR-V7 variánst expresszáló PC sejtek és egy egér xenograft modell segítségével megállapította, hogy a AR^{v567} variánst expresszáló egerek esetében a DOC-terápia hatékony volt, míg az AR-V7+ egerek DOC-rezisztensnek bizonyultak. Ennek háttérében az áll, hogy az AR-V7 *splice* variáns egyrészt nem tartalmazza a ligandkötő domént, így annak bekötődése nélkül is

aktív, másrészt a fehérjének azon része is csonkolt, amely a mikrotubulusok és a dynein molekula megkötéséért lenne felelős, így a molekula képes ezen fehérjéktől független módon is bejutni a sejtmagba, majd ott transzkripciós aktivitását kifejteni [43]. Antonarakis és kutatócsoportja hasonló kérdéskörben végzett kísérleteket, klinikai minták bevonásával. A vizsgálatukba bevont 37 taxán-kezelt (30 DOC, 7 CABA) mCRPC beteg vérében lévő keringő tumorsejtek (CTC) AR-V7 mRNS expresszióját mérték meg, melyet összevetettek a betegek terápiára adott válaszával. Eredményeik szerint a AR-V7+ betegek szignifikánsan rosszabb PSA-válással reagáltak a DOC-kezelésre, valamint progresszió-mentes túlélésük is rövidebb volt, mint az AR-V7-pácienseké [67]. A TAXYNERGY fázis II klinikai vizsgálat célja volt az mCRPC betegek taxánkezelésének optimalizálásához keringő tumorsejtekből kimutatható biomarkerek kutatása, amelynek keretében a CTC-k által expresszált AR *splice* variánsokat határozták meg. A vizsgálat szerint a legjobb taxán hatékonyság és leghosszabb progresszió-mentes túlélést a dupla negatív (AR-V7-, AR^{V567}-) betegek mutatták. Emellett szignifikánsan jobb prognózisúnak bizonyultak az AR-V7- tumorok az AR-V7+ daganatokhoz képest [68].

A fent említett AR variánsokat felépítő fehérjedoménokat és a jellemző sejten belüli lokalizációjukat a 3. ábra szemlélteti.



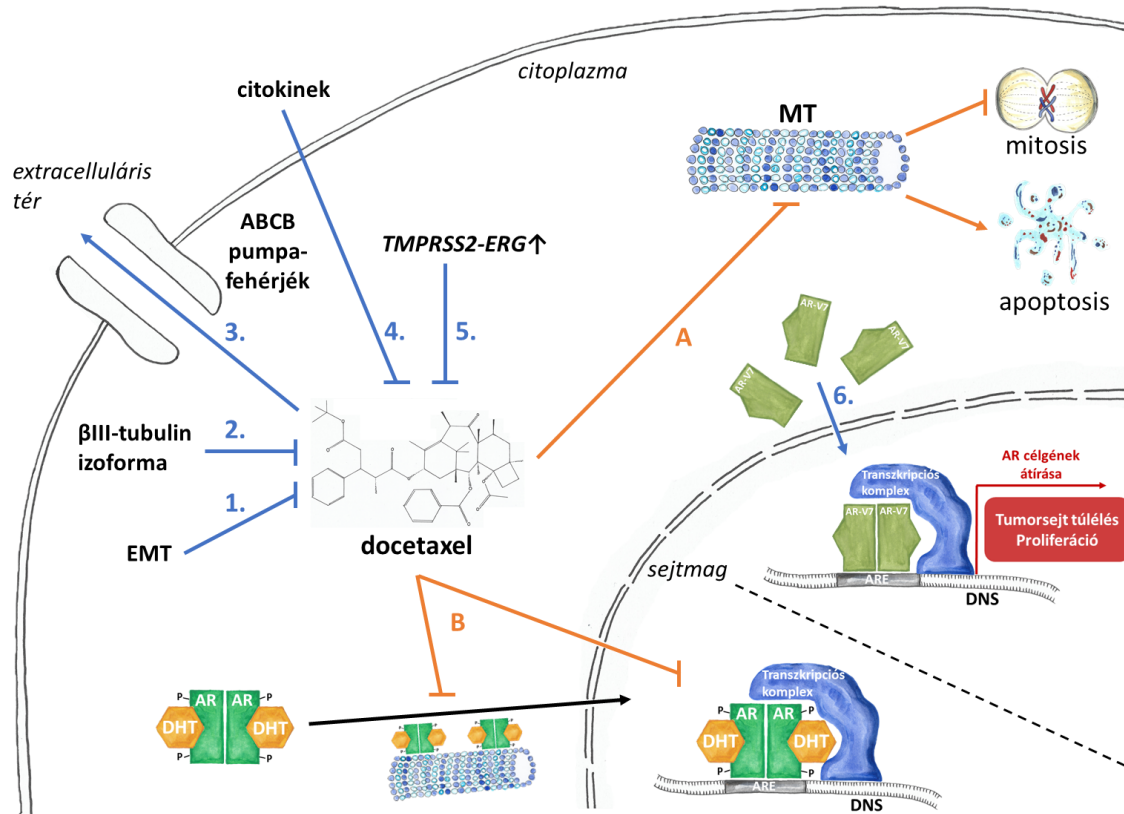
3. ábra - Az androgén receptor különböző variánsainak doménszerkezete, az exonok jelölésével (számok), valamint DOC-kezelés következtében kialakuló szubcelluláris lokalizációjuk [68]. **A:** normál (teljes hosszúságú) AR. A teljes hosszúságú AR a kapocs

régiója révén képes a mikrotubulusokhoz kötődni, amely a sejtmagba való transzlokáció során szükséges. A DOC kezelés hatására a megbénuló mikrotubulus rendszer következtében az AR a citoplazmában felhalmozódik, ahol inaktív módon van jelen. **B:** AR-V7 variáns. A kapocs doménnel nem rendelkező AR-V7 a DOC kezeléstől függetlenül is képes a sejtmagba bejutni, így az AR-célgének átírását elvégezni. **C:** AR^{v567} variáns. Az AR^{v567} mikrotubulusokhoz való kötődése, így a sejtmagba való bejutása is tökéletlen. Ennek oka, hogy az AR teljes C-terminális doménjének (2-8 exonok) megléte szükséges a maximális mikrotubulus kötődéshez (teljes hosszúságú AR), míg a kapocs domén a minimális asszociációt teszi lehetővé, ezáltal ezen variáns mind a citoplazmában, mind a sejtmagban megtalálható. NTD – N-terminális domén; DBD – DNS-kötő domén; LBD – ligand-kötő domén; CE – rejtett (*cryptic*) exon.

A PC kialakulása jellemzően gyulladáshoz vezető folyamatok kíséretében történik, amelyek a daganat minden stádiumában megfigyelhetők [69]. A tumorsejtek citokineken keresztül képesek a környező myeloid sejtekkel kölcsönhatva terápia-rezisztenciát kialakítani [70, 71]. Korábban az interleukin-6 (IL-6) citokin DOC-kezelés előtti szérumszintjének meghatározása vetődött fel a kezelés hatékonyságának előrejelzésére, miután Domingo-Domenech és munkatársai az emelkedett IL-6 szérumszint és az elégtelen terápiás válasz közötti összefüggést feltárta [72]. Mahon és kutatócsoportja több tucat citokin szintjét vizsgálta meg 55 CRPC beteg DOC-kezelés előtti és alatti vérmintáin, majd méréseiket összevetették a kezelésre adott PSA-válasszal. Eredményeik alapján az IL-4, IL-6 és MIC-1 biomarker szerepét tartották megalapozottnak [71]. További említést érdemel az YKL-40 gyulladáshoz vezető mediátor fehérje, amelynek emelkedett DOC-kezelés előtti szérumszintjei a kedvezőtlenebb túléléssel mutattak összefüggést mCRPC betegekben [73].

A szakirodalmi áttekintésből kiderült, hogy a PC kemoterápia rezisztenciáját illetően számos fontos kutatási eredmény született. Így a DOC-rezisztencia hátterében meghúzódó folyamatok is egyre világosabbá válnak, számos potenciális biomarker és gyógyszercélpont is felmerült a témában. Azonban máig a DOC-rezisztencia ellen, a klinikumba átültetett biomarkerekkel vagy új terápiás célpontokkal átütő sikert nem sikerült elérni. A PhD képzésem keretében elvégzett kutatómunka azt a célt szolgálta, hogy a DOC-rezisztenciáról rendelkezésre álló információkat és az azt okozó molekuláris mechanizmusok ismeretét bővítse. Kutatási tervünket úgy építettük fel, hogy az mCRPC betegek kezelésének megtervezéséhez hasznos terápia prediktív biomarkereket legyünk képesek azonosítani, valamint új gyógyszercélpontokra hívjuk fel a figyelmet,

amelyekkel reményeink szerint a DOC-rezisztencia elkerülhetővé, leküzdhetővé válhat. A DOC kemoterápia hatásmechanizmusa, valamint az azzal szembeni rezisztenciához vezető, ismert molekuláris mechanizmusok a 4. ábrán kerültek összefoglalásra.



4. ábra – A DOC gátló hatásai (narancssárga betűkkel jelölve), valamint a DOC elleni rezisztencia mechanizmusai (kék számokkal jelölve) [45]. A DOC hatóanyag citotoxikus hatását a MT-okra jellemző dinamikus instabilitásának gátlása révén fejtí ki (A). Az így megbénult sejt nem képes a sejtosztóási programját végrehajtani, ezért apoptotizál. A MT-gátlás következménye továbbá, hogy az AR nem képes azok mentén a sejtmagba bejutni, így az AR célgének átírása nem történik meg (B). A PC sejtek képesek különböző molekuláris változások nyomán a DOC kemoterápiával szemben rezisztenciát kialakítani (1-6.). A sejtek *epithelialis-mesenchymalis* átalakulása (1.), a MT-ok felépítésében a β III-tubulin izoforma kifejeződése (2.) már ismert mechanizmusok a DOC-rezisztenciában. Hasonlóképpen ismert jelenség miszerint a sejtek ABCB efflux pumpa fehérjét expresszálnak a DOC-kezelés hatására, amelyek képesek a hatóanyagot a sejtől kipumpálni, így csökkentve annak hatékonyságát (3.). Továbbá, egyes citokinekről (4.), valamint a TMPRSS2-ERG génfüzióról (5.) is kiderült, hogy hozzájárulhatnak a PC kemorezisztenciájához. Mivel az AR-V7 *splice* variáns a MT-októl függetlenül is képes a sejtmagba bejutni és az AR-célgéneket átírni, így a DOC-kezelés az AR-V7+ esetekben kevésbé hatékony kezelési forma (6.). AR – androgén

receptor; ARE – androgén reszponzív elem; EMT – *epithelialis-mesenchymalis* tranzíció;
DHT - 5 α -dihidrotesztoszteron; MT – mikrotubulus.

2. Célkitűzések

A jelen dolgozatban bemutatott kutatómunka célja a PC DOC elleni rezisztencia kialakulásának alaposabb megértése volt, melyhez az alábbi célokat tűztük ki:

- 1) A DOC rezisztenciában szerepet játszó, eddig ismertté vált rezisztencia mechanizmusok irodalmi feldolgozása.
- 2) DOC-érzékeny (DU145, PC3) és -rezisztens (DU145-DR, PC3-DR) prosztatarák sejtvonalpárok tömegspektrometriai módszerrel történő komparatív proteomikai vizsgálata.
- 3) A proteomikai analízis eredményeinek bioinformatikai módszerekkel történő kiértékelése, különös tekintettel a szekretálódó és így a vérben nagyobb valószínűséggel kimutatható fehérjék azonosítására.
- 4) A MedSol betegdokumentációs rendszerben fellelhető adatok alapján egy részletes, klinikopatológiai és túlélési adatbázis létrehozása, azon DOC-kezelésnek alávetett páciensek adataiból, akik vérmintái a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikán kutatási célra gyűjtésre kerültek.
- 5) A kiválasztott fehérjék DOC-kezelésnek alávetett betegek szérum mintáiban történő kimutatása és az eredmények összevetése a kezelés hatékonyságával, melyet a biokémiai és radiológiai válasszal, valamint a betegek túlélésével határoztunk meg.
- 6) A legígéretesebb fehérjék *in vitro* vizsgálata az adott fehérje rezisztenciában betöltött esetleges funkcionális szerepének tisztázására. Az *in vitro* kísérletek keretében célunk volt a vizsgált fehérjék expressziójának csendesítése és ezzel párhuzamosan a sejtek életképességét és apoptózisát érintő változásának meghatározása.

3. Módszerek

3.1. Docetaxel-érzékeny és -rezisztens prosztaták sejtvonalpárok tenyésztése

Kutatásunk során DOC-érzékeny (PC3, DU145 – ATCC, Rockville) és DOC-rezisztens (PC3-DR, DU145-DR) PC sejtvonalpárokkal dolgoztunk, amelyeket az Innsbrucki Egyetem Urológiai Klinikájának Kutatólaboratóriumából Dr. Martin Pühr bocsájtott rendelkezésünkre [53]. Terápia-rezisztens sejtvonalak létrehozása hosszas, jellemzően 12-18 hónapos sejtkultúrás tenyésztéssel érhető el. Ezen sejtvonalpárok esetében az innsbrucki kollaborációs munkacsoport a parentális sejteket lépésről-lépésre, növekvő dózisu DOC (Sigma-Aldrich; katalógusszám: 01885) kezelésnek vetette alá, mely folyamat során minden passzáláskor az életképes sejtek továbbnövesztése, majd magasabb dózisu DOC koncentrációval történő kezelése történt. A szelektációs folyamat befejeztével a DOC-rezisztens sejtek életképeseknek bizonyultak 12,5 nM DOC koncentráció (fenntartó DOC dózis) mellett is, míg a parentális sejtvonalpárjuk már 1 - 1,5 nM DOC jelenlétében elpusztult (Eredmények fejezet, 15. ábra).

A sejtvonalakat L-glutamint tartalmazó RPMI 1640 médiumban (Gibco; 21875034) tenyésztettük, mely 10% FBS-t (fötális borjú savó, Biowest; S181B) és 1% penicillin-streptomycin antibiotikumot (Lonza, 17-602E) tartalmazott. A DOC-rezisztens sejtek médiumához továbbá a fenntartó dózisnak megfelelő koncentrációjú DOC lett hozzáadva. A sejteken 48-72 óra időközönként történt tápfolyadékcseré, míg jellemzően 70-90%-os konfluencia elérésekor kerültek passzálásra. A sejtenyésztő inkubátorban magas páratartalom (~90%), 37°C-os hőmérséklet és 5%-os CO₂ koncentráció mellett tartottuk fenn a sejteket.

3.1.1. Sejtvonalpárok komparatív proteomikai összehasonlítása tömegspektrometriai módszerrel

A DOC-érzékeny (PC3, DU145) és rezisztens (PC3-DR, DU145-DR) sejtvonalpárokat összehasonlító proteomikai analízisnek vetettük alá, melyhez folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriai módszert (LC-MS/MS) alkalmaztunk. Az ilyen módszerrel elvégzett elemzés kiváló módszer többek között különböző sejtpopulációkban kifejeződő fehérjék minőségi és mennyiségi összehasonlítására. Így a vizsgálatunk célja szerint sikerült beazonosítanunk a

sejtvonalpárok között (PC3 vs. PC3-DR; DU145 vs. DU145-DR) eltérő expressziót mutató fehérjéket.

A folyadékkromatográfia során a mérendő komponensek elválasztása történik meg, amely berendezés a minta tömegspektrométerbe történő beadagolását is végzi. Az ezt követő tömegspektrometriai mérés a rendszerbe juttatott fragmentumokat (jelen esetben a fehérjék peptidjeit) egy ionforrás által ionizálja, hogy azokat a tömeganalizátor által a tömeg/töltés (m/z) paraméterük alapján vákuumban szétválassza, majd a tömegdetektor segítségével detektálja. Az elemzés során generált tömegspektrumon az ionok intenzitása utal a mennyiségre, míg a tömeg az adott peptidre jellemző egyedi tulajdonság.

3.1.2. LC-MS/MS analízis részletei

A komparatív proteomikai elemzéshez alkalmazott LC-MS/MS vizsgálatot kollaboráció keretében valósítottuk meg. A kísérletet a bochumi Ruhr Egyetem Orvosi Proteomikai Központjában (Ruhr-Universität Bochum, Medizinisches Proteom Center, Bochum, Németország) végezték el az alább részletezett protokollnak megfelelően.

A sejtek ~70%-os konfluencia elérésekor kerültek preparálásra (~2 millió sejt/minta) a következő lépések szerint. A sejteket a médium leszívása után PBS (foszfát puffer) pufferrel mostuk, majd sejtkaparó pálcával felkapartuk őket és centrifugacsőbe pipettáztuk. A mintákat 100 g fordulatszám 5 percig centrifugáltuk, majd a keletkezett felülúszó leszívását követően a pelletált mintákat -80°C -on tároltuk és szárazjégen küldtük el Bochumba.

A mérést megelőzően a pelletek 30 μl 50 mM-os ammónium bikarbonát és 0,1%-os *RapiGestSF surfactant* reagensben lettek felvéve a sejtlízishez. A minták fehérjekoncentrációja Bradford-módszerrel lett meghatározva. A mintaelőkészítés további lépéseiben 4 μg fehérjéhez 5 nM ditiotretiol (DTT) került hozzáadásra (30 perc, 60°C), valamint fényvédett körülmények között 15 nM jódacetamidós (IAA) alkilálás következett (30 perc, szobahőmérsékleten). Ezt követően a lizált fehérjemintákat tripszines emésztésnek vetették alá (37°C , éjszakán át). A savasítási (0,5% trifluorecetsav) lépést centrifugálás (10 perc, 16,000 g) követte, majd a minták vákuumcentrifugában kerültek kiszáritásra, végül 0,1%-os TFA-ban (trifluorecetsav) kerültek feloldásra.

Méréseként 300 ng minta LC-MS/MS analízise történt meg *LTQ Orbitrap Elite* (Thermo Fisher Scientific, Bréma, Németország) berendezéshez kapcsolt *Ultimate 3000 RSLCnano* folyadékkromatográfiás rendszer (Dionex, Idstein, Németország) segítségével. Sejtvonalként 6 párhuzamos tenyésztésből történtek mérések, ami a 2 sejtvonalpár esetében 24 mérést jelentett.

A fehérje identifikáció (Thermo Fisher Scientific) szoftver segítségével történt. A detektált tömegspektrum a UniProtKB/Swiss-Prot adatbázissal került összevetésre a Mascot 2.5 szoftver (Matrix Science, London, Egyesült Királyság) segítségével. Az elemzések statisztikai paraméterei az ún. „*target-decoy*” módszerrel kerültek meghatározásra (FDR-küszöb $< 0,1$; FDR – hamis felfedezési arány, *false discovery rate*).

3.2. A tömegspektrometria alapú proteomikai vizsgálat adatfeldolgozása

A tömegspektrometriai elemzés által detektált, nagy terjedelmű proteomikai adatsort az alább részletezett szűrési módszereinkkel szűkítettük le. Célunk az volt, hogy a találati listából laboratóriumi körülmények között is vizsgálható számú fehérjét válasszunk ki további vizsgálatokra.

3.2.1. Előzetes szűrési kritériumok alkalmazása

Az előzetes szűrési kritériumrendszerünk által a nyers proteomikai adatsorból azokat a fehérjéket választottuk ki, amelyek legalább 2 egyedi peptid (*unique peptide*) alapján voltak beazonosíthatók, továbbá statisztikailag szignifikáns eltérést mutattak (FDR-korrigált p-érték $\leq 0,05$). Ezen kritériumoknak megfelelően jelentős mértékben sikerült szűkítenünk a proteomikai elemzés által nyújtott fehérjelistát, amelyben a továbbiakban három módszerrel igyekeztünk kiválasztani a biomarkerként, illetve gyógyszercélpontként potenciálisan alkalmazható fehérjéket.

3.2.2. Kandidáns fehérjék kiválasztásának bioinformatikai módszerei

A potenciálisan biomarkerként, valamint terápiás célpontként felhasználható kandidáns fehérjék kiválasztására fontosnak tartottuk, hogy hipotézismentes módszereket használjunk. A fő szűrési módszerünk alapján a proteomikai adathalmazból a szekretált (vérben jelen lévő) fehérjéket azonosítottuk. Ezen kívül további két metódust

alkalmaztuk, amelyek által 1-1 kandidáns fehérjét választottunk ki laboratóriumi vizsgálatokra.

3.2.2.1. Szekretálódó fehérjék predikciója

Az első szűrési metódusként a proteomikai analízis nyújtotta eredményeinek szűrésére a Debreceni Egyetem Humángenetikai Tanszékének kutatócsoportjával (laborvezető: Prof. Takács László) kollaborációban a potenciálisan szekretálódó fehérjéket választottuk ki. A kifejlesztett bioinformatikai módszer integratív módon használt prediktív programokat (SignalP 4.1, SecretomeP 2.0, TargetP 1.1, TMHMM 2.0), valamint nyílt hozzáférésű adatbázisokat (Uniprot, Human Protein Atlas, NCBI, ExoCarta) a fehérjék lokalizációjának előrejelzésére. A módszer 200 ismert szekretálódó és ugyanennyi nem szekretálódó fehérje tesztelésével került kidolgozásra, valamint a maximális szenzitivitáshoz és specificitáshoz a megfelelő küszöbértékek (*cut-off* értékek) is beállítására kerültek. Az ilyen módon azonosított fehérjékről feltételeztük, hogy szekréción keresztül a véráramba bejuthatnak, így betegek szérummintáiban detektálhatók, vizsgálhatók lehetnek. Ezen szűrési módszerbe azon fehérjéket vontuk be, amelyek az előzetes szűrési kritériumoknak (3.2.1. alfejezet) való megfelelésén túl legalább kétszeres expressziós változást mutattak a DOC-rezisztens sejtekben.

3.2.2.2. Összehasonlító elemzés

Egy másik megközelítést alkalmazva a tömegspektrometriai méréseink nyújtotta adathalmazt összevetettük más kutatócsoportok által publikált hasonló vizsgálatok eredményeivel. Összehasonlító analízisünk során további három olyan tanulmányt dolgoztunk fel, amelyekben a kutatócsoportok DOC-szenzitív és -rezisztens PC sejtvonalpárok komparatív elemzését végezték el. O'Connell [74], valamint Zhao és munkatársai [75] ugyancsak tömegspektrometriai módszert, míg Marín-Aguilera és munkacsoportja [76] RNS-szintű génchip analízist alkalmaztak. Azon fehérjékre összpontosítottunk, amelyek több vizsgálat szerint is konzisztens felülregulációt mutattak a DOC-rezisztens sejtekben.

3.2.2.3. Összetett szűrési módszer

Harmadik szűrési módszerünk során egy általunk kidolgozott, összetett szempontrendszer szerint rangsoroltuk a fehérjéket. Egyidejűleg figyelembe vettük a fehérjék proteomikai elemzésünk szerinti expressziós változásának mértékét (*fold change*), valamint a STRING adatbázis segítségével megvizsgáltuk a fehérjék interakciós hálózatban betöltött helyét és más fehérjékkel való kapcsolatainak számát. A proteomikai vizsgálat nyújtotta adatsort a STRING adatbázisban vizsgálva tehát megállapíthattuk, hogy az egyes DOC-rezisztens sejtekben felülregulálódó fehérjék mely másikkal, a listában jelen lévő fehérjékkel alakítanak ki interakciót. Ennek során hálózati biológiai elvek mentén feltételeztük, hogy a gazdagabb kapcsolatokkal (magasabb élszámmal) rendelkező fehérjék nagyobb eséllyel és hangsúlyosabb szerepet játszanak a DOC-rezisztencia kialakításában és szabályozásában. Ezen kívül figyelmet szenteltünk a fehérjék szakirodalmának, melynek során utánajártunk, hogy PC-vel vagy DOC-rezisztenciával kapcsolatosan történtek-e már velük vizsgálatok, illetve felmerült-e daganatos betegségekben prognosztikus és prediktív értékük. Mindezek mellett szem előtt tartottuk, hogy a fehérjék kísérletes környezetben megfelelően vizsgálhatók-e, azaz a szérumbizsgálatokhoz szükséges ELISA kiték, valamint a funkcionális tesztekhez szükséges gátlószerek elérhetők-e a kereskedelmi forgalomban.

Ezen szűrési módszert azon 5-5 fehérjén végeztük el, amelyek a legnagyobb expressziós változást mutatták a két DOC-rezisztens sejtvonalban (Eredmények fejezet, 7. táblázat), valamint bevontuk az elemzésbe a mindkét DR sejtvonalban konzisztens felülregulációt mutató fehérjéket is (Eredmények fejezet, 8. táblázat).

A fent említett 3 bioinformatikai módszerrel összesen 7 fehérjét választottunk ki szérumbizsgálatokra (Eredmények fejezet, 9. táblázat).

3.3. Fehérjék szérumkoncentrációinak meghatározása

3.3.1. Szérum minták

A Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáján 2014 óta folyik prosztatadaganatos megbetegedéssel kezelt páciensek vérmintáinak gyűjtése kutatási célokra a betegek beleegyezése mellett, amelyet a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága hagyott jóvá

(etikai engedély száma: TUKEB 55/2014). A DOC kemoterápiával kapcsolatos klinikai mintagyűjtés során az első kezelést megelőző (alapvonal) minták mellett, minden terápiás ciklus első napján is gyűjtünk (kezelés alatti / követéses minták) vérmintákat.

A mintagyűjtés során a szérumszeparátor csövekbe történő vérvételt követően 30-60 perccel a vérmintákat lecentrifugáljuk (1500 g, 10 perc), majd a felülúszó szérumot, plazmát anonimizált módon feliratozott tárolócsövekbe alikvótoljuk és felhasználásig -80°C -on tároljuk.

A betegek klinikopatológiai adatait a klinikánkon használt MedSol dokumentációs rendszerből gyűjtöttük össze, a túlélési adataikat a megfelelő engedélyek birtokában a Belügyminisztérium Személyi Nyilvántartási Hivatalától kérdeztük le. A betegek anonimizált adatait statisztikai kiértékelésre alkalmas programokban (Microsoft Excel, IBM SPSS) tároljuk. Az összeállított adatbázis a következő paramétereket tartalmazza: a beteg életkora; PC diagnózis dátuma; Gleason-score; túlélés; ECOG státusz (*Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*); primer terápia típusa; radikális prosztataektómiás ideje; sugárkezelés ideje; hormonterápia időszaka; lágyszövet-, csont- és nyirokcsomóáttét jelenléte a kemoterápia előtt, illetve közben vagy után; első és utolsó DOC-kezelés dátuma; kezelést megelőzően, közben és végén mért PSA szérumszintek; PSA és radiológiai progresszióra vonatkozó adatok; DOC-kezelés leállításának oka; elhalálozás ideje.

3.3.2. Betegcsoportok

ELISA vizsgálatainkat a 3.2.2. alfejezetben részletezett módszerek alapján kiválasztott fehérjéken összesen két független, DOC-kezelésnek alávetett mCRPC betegcsoport szérumszintjeit végeztük el. A betegek kezelés előtti mintái közvetlenül a DOC-terápiájuk megkezdését megelőzően kerültek levételre, míg a további mintákat minden esetben a DOC ciklusok első napján gyűjtöttük.

Az első betegcsoportba tartozó szérumszintek a Bécsi Orvostudományi Egyetem Urológiai Klinikáján (laborvezető: Prof. Gero Kramer) kerültek gyűjtésre (etikai engedély száma: ECS 1986/2017). A mintákat és a hozzájuk tartozó klinikopatológiai és túlélési adatokat kollaboráció keretében bocsátották rendelkezésünkre. Ezen betegcsoport 99 beteg kezelés előtti mintáit, illetve közülük 25 beteg további, kezelés alatt gyűjtött mintáit foglalta magába. A kiválasztott fehérjék közül csak a NAMPT

szérumkoncentrációit határoztuk meg ezen betegkohorton a minták korlátozott mennyiségéből kifolyólag.

A második betegcsoport mintáin a további 6 kandidáns fehérjénk (GAP43, MET, CD44, GSN, LNPEP, IL13RA2) szérumszintjeit mértük meg. Ezen minták a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikájának szérumszűzteményéből származtak, majd a kutatócsoportunk által létrehozott betegadatokat tartalmazó adatbázissal összevetve végeztük el a statisztikai kiértékelést. A fenti 6 fehérje esetén az ELISA kitek eltérő kapacitása okán különböző számú betegmintát tudunk megvizsgálni. Így a GAP43 esetén 100 beteg kezelés előtti mintáját, és további 44 kezelés alatt gyűjtött mintát mértünk meg. A CD44 és MET fehérjék esetében 69 kezelés előtti mintát és további 149 kezelés során vett minta szérumkoncentrációit határoztuk meg. Az IL13RA2 fehérje esetében az előbbi 69 kezelés előtti minta mellett további 10 követéses minta mérését tudtuk elvégezni. Az LNPEP és GSN ELISA vizsgálatok esetén 56 beteg kezelés előtti mintáját, valamint 16 DOC-kezelés alatt vett szérumminta fehérjeszintjeit mértük meg.

3.3.3. Szérum ELISA vizsgálatok

A CD44, MET és IL13RA2 fehérjék szérumkoncentrációinak meghatározása DuoSet ELISA Kit-ek segítségével történt (R&D Systems; DY7045-05, DY358, DY614) a gyártó előírásait követve. A NAMPT, LNPEP, GSN és GAP43 szérumszintjeinek méréséhez szendvics ELISA kiteket (Adipogen, AG-45A-0006YEK-KI01; BioSite, EKH 3040; LSBio, LS-F22526; Elabscience, E-EL-H1922) használtunk. Az ELISA méréseket és kiértékelésüket a gyártó által javasolt protokoll szerint végeztük el.

A fent említett fehérjék szérumkoncentrációjának meghatározását követően ezen értékeket statisztikai módszerekkel összevetettük a betegek klinikopatológiai és túlélési adataival.

3.4. Sejtkultúras vizsgálatok

Az ELISA vizsgálat által a betegek túlélésével összefüggést mutató NAMPT és CD44 fehérjék funkcionális vizsgálatait az alább részletezett sejtkultúras technikák segítségével valósítottuk meg mindkét sejtvonalpáron. A kísérleteket továbbá a PC3-DR sejtvonalon a GAP43 fehérjét célozva is elvégeztük annak okán, hogy ezen fehérje a

tömegspektrometriai proteomikai analízis szerint kiugróan magas expressziós változást mutatott a PC3-DR sejtekben.

A funkcionális vizsgálatok keretében a géncsendesítés DOC-rezisztenciára gyakorolt hatásait vizsgáltuk. Az siRNS-transzfeccióval (siRNS – kis interferáló RNS) egyidejűleg különböző koncentrációjú DOC-kezelésnek alávetett sejtek DOC-rezisztenciájának változásait állapítottuk meg a kontroll sejtekhez képest. Ez utóbbit a sejtek életképességének (viabilitásának) mérésével tudtuk kivitelezni MTT-módszer segítségével, valamint elvégeztük a sejtek apoptózis analízisét is áramlási citometriás módszer alkalmazásával. Kísérleteinktől azt vártuk, hogy a rezisztens sejtek DOC-érzékenysége növekszik a célfehérjék expressziójának gátlása nyomán.

3.4.1. Gén- és fehérjeexpresszió validációja

A funkcionális vizsgálatokat megelőzően, az ezeknek alávetett fehérjék (NAMPT, CD44, GAP43) tömegspektrometriai elemzés által nyújtott expressziós változásának mértékét és irányát validáltuk a saját módszereinkkel, amelyet RNS és fehérje szinten valósítottunk meg.

3.4.1.1. RNS izolálás, reverz transzkripció

Az RNS izolálást *RNeasy Plus Kit* (Qiagen; 74134) segítségével végeztük el a gyártó előírását követve. Az izolátum tisztaságáról *NanoDrop* készülék által bizonyosodtunk meg, míg az RNS koncentrációját *Qubit RNA BR Assay Kit* (Invitrogen, Q10210) és *Qubit 4 Fluorometer* (Invitrogen; Q33238) segítségével határoztuk meg. Az RNS mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk.

A génextpresszió méréséhez ezután elvégeztük az mRNS cDNS-re történő átírását. Ennek során 1000 ng RNS-ből indultunk ki és a *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitet* (ThermoFisher Scientific; 4368814) használtuk követve annak ajánlásait. A cDNS mintákat -20°C-on tároltuk felhasználásig.

3.4.1.2. Fehérje izolálás

A sejtek teljes fehérjeállományát a sejtlizálási technikával izoláltuk. A procedúra során a sejtekről eltávolítottuk a médiumot, majd kétszer hideg (4°C) PBS-sel mostuk meg. Ezt követően sejtlízishez szükséges elegyet adtunk a sejtekhez, amely RIPA

pufferből és 1:100 hígításban hozzáadott proteáz, valamint foszfatáz inhibitorokból (*Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail*, ThermoFisher Scientific; 78440) állt. A sejteket 10 percig inkubáltuk az eleggyel jégen, majd sejtkaparóval kapartuk fel őket a flaskák aljáról. A centrifuga csövekbe átpipettázott oldatot alaposan szuszpendáltuk és vortexeltük, majd 15 percig jégen tartottuk. Ezt követően a csöveget 15 percen át, 15.000g fordulatszám, 4°C-os hőmérsékleten lecentrifugáltuk, majd a keletkezett felülúszót, mint sejtlizátumot egy új csöbe pipettáztuk át és felhasználásig -80°C-on tároltuk. A minták fehérjekoncentrációját BCA módszerrel határoztuk meg (*Pierce BCA Protein Assay Kit*; Thermo Scientific; 23227).

3.4.1.3. Valós idejű kvantitatív PCR vizsgálat

A sejtek géneexpresszióját valós idejű kvantitatív (*real-time quantitative*) PCR (qPCR) technika segítségével mértük meg, amelyhez *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems; 4376600) berendezést használtunk. A 96-lyukű (*96-well*) *MicroAmp Fast Optical Reaction Plate* (Applied Biosystems; 4366932) (lemez) egyes reakciócsövei 10 µl *TaqMan Universal Master Mix II-t* (Applied Biosystems; 4440044), 1 µl *TaqMan Gene Expression Assay-t* (primer) (Applied Biosystems; 4331182), 3 µl 100 ng/µl koncentrációjú cDNS mintát és 6 µl PCR tisztaságú vizet tartalmaztak. Minden minta géneexpresszióját 3 biológiai és 3 technikai párhuzamos alkalmazásával határoztuk meg. Belső kontrollként a HPRT1 háztartási gént alkalmaztuk, valamint pozitív és negatív kontroll mintát is vizsgálatunk. A felhasznált, géntermék (RNS/cDNS) specifikus *TaqMan Gene Expression Assay-k* pontos beazonosítására a 4. táblázat szolgál.

4. táblázat – A qPCR analíziseink során TaqMan assay-k azonosítószámai.

Gén	Assay ID	Jelölő festék
NAMPT	Hs00237184_m1	FAM-MGB
CD44	Hs01075864_m1	
GAP43	Hs00967138_m1	
HPRT1	Hs02800695_m1	

A PCR reakciók az 5. táblázatban feltüntetett hőprofil és ciklusszám szerint zajlottak le.

5. táblázat – A qPCR génextpressziós méréseink hőprofilja.

	UNG inkubáció	Polimeráz aktiváció	PCR (40 ciklus)	
			Denaturálás	Anneálás / extenzió
Hőmérséklet	50°C	95°C	95°C	60°C
Idő	2 perc	10 perc	15 mp	1 perc

3.4.1.4. Western blot analízis

A fehérjeexpresszió méréséhez és annak változásainak detektálásához Western blot módszert használtunk. A gyártó előírásai alapján előkészített 20 µg fehérjetartalmú mintákat *Bolt 4-12% Bis-Tris Plus Gel* (Invitrogen; NW04120BOX) segítségével választottunk szét az elektroforézis során *Mini Gel Tankban* (Invitrogen; A25977), melyet *PowerEase* (Invitrogen; PS0091) áramforráshoz kötöttünk. Az elektroforézis 200V feszültség mellett 22 percig tartott, 1x *Bolt MES SDS* elektroforézis puffer (Invitrogen; B0002) alkalmazásával. Ezt követően a mintákat az *iBlot 2 Transfer Stackben* (Invitrogen; IB23001) található nitrocellulóz membránra blottoltuk *iBlot 2 Gel Transfer Device* (Invitrogen; IB21001) száraz blottoló berendezés használatával. A fehérjék molekulaszúlyát, illetve a gyártó ajánlásait figyelembe véve a következő feszültségeken végeztük el a blottolási lépést: 20V - 1 percig, 23V – 4 percig, 25V – 2 percig.

Következő lépésben a membránt az antitest specifikációjától függően 5% NFDM/TBST (NFDM – zsírintes száraz tej) vagy BSA/TBST (BSA - borjú szérum albumin) pufferben blokkoltuk 1 órán át, szobahőmérsékleten. A továbbiakban az elsődleges antitesttel való inkubálást éjszakán át 4°C-on végeztük, majd a membrán alapos mosását követően a másodlagos antitestekkel egy órán át, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A felhasznált antitestek beazonosítására szolgáló adatait és alkalmazási kondícióit a 6. táblázat tartalmazza. Belső kontrollként anti-GAPDH (háztartási gén) antitestet alkalmaztunk. A fehérje expresszió méréseket minden esetben háromszor végeztük el. Emellett minden géncsendesítéssel járó (sejtviabilitás mérés, apoptózis analízis) kísérlet esetén Western blot technikával győződünk meg a transzfekció hatékonyságáról.

6. táblázat – Western blot fehérjeexpressziós kísérleteink során használt antitestek listája.

Primer antitest	Gyártó	Katalógusszám	Klonalitás	Antitest koncentráció	Puffer	Molekulásúly
anti-NAMPT	Invitrogen	PA1-1045	(nyúl) poliklonális	1:800	5% NFDm/TBST	52 kDa
anti-CD44	Abcam	ab157107	(nyúl) poliklonális	1:3500	5% BSA/TBST	81 kDa
anti-GAP43	Abcam	ab75810	(nyúl) monoklonális	1:8000	5% NFDm/TBST	48 kDa
anti-GAPDH	Abcam	ab8245	(egér) monoklonális	1:6000	5% NFDm/TBST vagy 5% NFDm/TBST	36 - 40 kDa
Szekunder antitest	Gyártó	Katalógusszám	Klonalitás	Antitest koncentráció		
anti-nyúl	Abcam	ab6721	(kecske) poliklonális	1:7500		
anti-egér	Abcam	ab6789	(kecske) poliklonális	1:7500		

Az elsődleges antitestekkel való inkubálás, majd alapos mosást követően az előhíváshoz *SuperSignal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate*-tal (Thermo Scientific; 34577) inkubáltuk a membránt 3-5 percig, majd *iBright Imaging System* (Invitrogen; A32748) segítségével készítettünk róla digitális felvételt.

3.4.2. Sejtkultúras funkcionális vizsgálatok

3.4.2.1. Géncsendesítés (siRNS transzfekció)

A *NAMPT*, *CD44* és *GAP43* gének expresszióját a rájuk specifikus siRNS molekula transzfektálásával csendesítettük le a sejtkultúrában.

A 6-osztatú sejtenyésző lemezek egyes pozícióiba 75.000-150.000 sejtet ültettünk antibiotikum-mentes médium felhasználásával. 60-80%-os konfluencia elérésekor transzfektáltuk a sejteket a következőkben részletezett módon. A liofilizált formában érkezett célzó (*SMARTpool on-target plus*) siRNS-eket (Dharmacon; NAMPT: L-004581-00-0005, CD44: L-009999-00-0005, GAP43: L-011663-00-0005) 1x-es siRNS pufferben (Dharmacon, Cat. No: B-002000UB100) oldottuk fel. Negatív kontroll kísérletként nem-célzó (*non-targeting control pool on-target plus*) siRNS-rel (Dharmacon; D-0018101005) transzfektáltuk a sejteket.

A transzfekciós elegy reakciónként 40 pmol siRNS-t, 7 µl *Lipofectamine RNAiMAX* transzfekciós reagenst (Invitrogen; 13778150) és 250 µl Opti-MEM médiumot (Gibco; 319850070) tartalmazott. A reagensek alapos elegyítését 5 perces inkubáció követte (szobahőmérsékleten) az siRNS-lipid komplexek megfelelő kialakulásához. A 1750 µl friss (antibiotikummentes) tenyésztőmédiumot tartalmazó lyukakhoz ezt követően adtunk hozzá 250-250 µl transzfekciós elegyet.

A sejteket 8-24 órán át inkubáltuk a transzfekciós eleggyel, majd tápfolyadékot cseréltünk rajtuk. A géncsendesítés monitorozása érdekében a sejtek lizálását 48-72 órán belül végeztük el, majd annak hatékonyságáról Western blot módszerrel győződünk meg.

A transzfektált sejtekkel a továbbiakban sejtvitalitás vizsgálatokat, valamint apoptózis analízist végeztünk.

3.4.2.2. Sejt életképességi vizsgálatok (MTT-teszt)

A sejtvitalitási vizsgálataink arra szolgáltak, hogy meghatározzuk az siRNS-sel transzfektált, géncsendesítésnek alávetett DOC-rezisztens sejtek terápia rezisztenciájának változásait a kontroll (nem-célzó siRNS-sel transzfektált) sejtekkel való összehasonlítás alapján.

Ehhez előzetes vizsgálatként meg kellett határoznunk a két sejtvonalpár különböző DOC koncentrációk mellett mutatott relatív életképességét (DOC dózis-hatás görbe), ezáltal pedig a DOC hatóanyaggal szemben mutatott IC50 értéküket. Az IC50 érték alatt azt a hatóanyag koncentrációt értjük, amely hatására a kezelt sejtpopuláció 50%-a elpusztul.

A DOC dózis hatás görbéjének meghatározásához szükséges sejtvitalitás kísérletek során 96-lyukú sejtenyésztő lemezeket dolgoztunk úgy, hogy minden vizsgált kondíciót 4 párhuzamos lyukban mértünk meg (technikai párhuzamosok). Lyukanként 2500-3500 sejtet ültettünk ki, melyeket 100 µl, a citotoxikus ágens (DOC) is tartalmazó médiumban tenyésztettük. A negatív kontroll kondíció mellett tenyésztett sejtek nem részesültek kezelésben, míg az oldószer kontroll esetén 0,1% DMSO (dimetil-szulfoxid) mellett vizsgáltuk a sejtek életképességét. A lemez azon lyukaihoz, amelyekbe nem ültettünk ki sejteket, 100-100 µl PBS-t adtunk, a médium evaporációjának csökkentése érdekében. A kezelést követően 24, 48 és 72 órával végeztük el a sejtleletképességi méréseket. A megfelelő inkubációs idő elteltével a lyukakhoz 10-10 µl MTT-reagenst (*Thiazol blue tetrazolum bromide*; Sigma-Aldrich; M2128) adtunk, amit 1 órás inkubációs idő követett. A formazán kristályok megfelelő mértékű képződése után a lemez tartalmát kiürítettük, majd 50-50 µl DMSO-t pipettáztunk a lyukakban a képződött formazán kristályok feloldása céljából. A háttér (vak) mérését olyan lyukakkal valósítottuk meg, amelyek sejteket nem, csupán médiumot és MTT-reagenst tartalmaztak. Az egyes lyukak optikai denzitását 570 és 690 nm hullámhosszon mértük le spektrofotométer segítségével.

A géncsendesítésnek alávetett sejteket a transzfekeciót követően 24 órával ültettük át 96-lyukú lemezre, majd további 24 óra elteltével kezeltük docetaxellel. A sejtek hatóanyaggal való kezelése és a sejtviabilitás mérés kivitelezése a fent ismertetett módon történt. A vizsgált fehérjék DOC-rezisztenciában betöltött funkcionális szerepéről az alapján vontunk le következtetéseket, hogy összevetettük a célgénre specifikus siRNS-sel transzfekektált és a kontroll sejtek viabilitás görbéit, kiemelt figyelmet fordítva az ezekről leolvasható IC50 értékeiknek. Kísérleteinket legalább háromszor ismételtük meg (biológiai párhuzamosok).

3.4.2.3. Apoptózis analízis áramlási citometriával

Az áramlási citometriával végzett apoptózis vizsgálatra szánt sejteket a transzfekeciót követően 48 órával kezeltük docetaxellel, majd a hatóanyag hozzáadását követően 72 órával készítettük elő a mintákat a mérésre az alábbi protokoll szerint. Az apoptózis analízisek során az egyes kondíciókat két technikai párhuzamossal vizsgáltuk, majd a kísérleteket három biológiai párhuzamos méréssel ismételtük meg.

Az apoptózis analízishez *APC Annexin V Apoptosis Detection Kit*-et (BioLegend; 640932), valamint *Cell Staining Buffer*t (BioLegend; 420201) használtunk. A vizsgált sejtpopulációt Annexin V és propidium-jodid (PI) kettős festésnek vetettük alá, amely lehetővé tette az élő, a korai vagy késői apoptózisban lévő és a nekrotizáló sejtek megkülönböztetését.

A 72 órás DOC-kezelés lejártakor a letapadó sejteket tripszinnel felvettük és a felülúszó médiumukkal együttesen centrifugáltuk le (1000 rpm, 10 perc). A sejtperletről a felülúszót leöntöttük, ezt követően hideg (4°C-os) *Cell Staining Buffer*rel mostuk meg a sejteket, majd újabb centrifugálással ülepitettük őket. Ez utóbbi mosási lépést megismételtük, majd alaposan leszívtuk a felülúszó folyadékot a sejtperletről. Ezt követően minden mintát felfuszpendáltunk 100µl *Annexin V Binding Buffer*t, 5µl PI-t, és 2,5µl APC-Annexin V festéket tartalmazó elegyben, amelyet 15 perces, sötétben és szobahőmérsékleten történő inkubálás követett. A mérést megelőzően további 200µl *Annexin V Binding Buffer*t adtunk a mintákhoz és rövid vortexeléssel homogenizáltuk azokat. Végül az áramlási citométer (Beckman Coulter, *CytoFLEX Flow Cytometer*) és annak szoftvere (Beckman Coulter, CytExpert 2.3) segítségével állítottuk be a mérési paramétereket, valamint rögzítettük azokat.

A kiértékelés során figyelembe vettük, hogy az APC-vel (fluorokróm) konjugált Annexin V festéssel a korai apoptotikus fázisban lévő sejtek válnak detektálhatóvá, míg a fluoreszcens propidium-joddal is megfestődött sejtek késői apoptózisú, illetve nekrotikus fázisban vannak.

3.5. Statisztikai módszerek

Az átmentes értékkel bíró paraméterek összehasonlítása során a Mann-Whitney tesztet alkalmaztuk. A túlélési analízis Kaplan-Meier görbe, log-rank teszt és Cox-univariancia teszt segítségével történt. A multivariancia elemzés során Cox-regressziós modellt alkalmaztunk, amelyben az univariancia analízis által a túléléssel szignifikáns ($p \leq 0,05$) összefüggést mutató változókat vizsgáltuk tovább. Az ELISA mérések statisztikai kiértékelését SPSS 23.0 program segítségével végeztük el.

A qPCR méréseink kiértékelése során a célgének relatív expresszióját $\Delta\Delta C_t$ számítási módszerrel határoztuk meg, Microsoft Excel szoftver segítségével. A NAMPT, CD44 és GAP43 célgének expresszióját normalizáltuk a HPRT1 belső kontroll gén expressziójához.

A Western blot vizsgálataink kiértékelését denzitometriával végeztük el a fehérjeexpresszió kvantifikálása céljából, melyhez az ImageJ szoftvert használtuk. A vizsgált fehérjék expresszióját a GAPDH háztartási gén kifejeződéséhez normalizáltuk.

Az MTT életképességi tesztek kiértékelése során a spektrofotométer által leolvasott nyers abszorbancia értékekből első lépésben levontuk a háttér (vak) értékeit, majd a hullámhossz korrekció érdekében az 570 nm hullámhosszúságon mért értékekből levontuk a 690 nm-en mérteteket. Ezt követően meghatároztuk a kondíciónkénti 4 technikai párhuzamos értékének átlagát és szórását, majd a relatív életképesség meghatározásához a kezeletlen sejtek átlagos abszorbancia értékéhez viszonyítottunk.

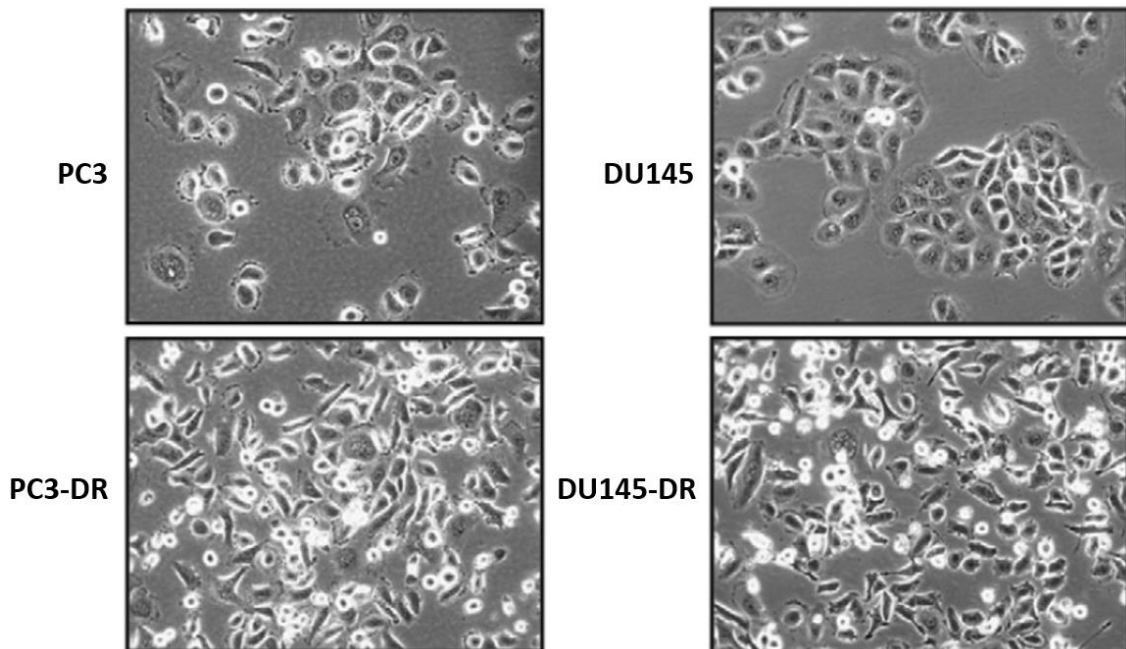
Áramlási citometriás méréseink statisztikai kiértékeléseit, ábrázolását GraphPad Prism 7 szoftver segítségével végeztük el. A kezelt vs. kontroll sejtek apoptózis értékeit t-teszttel vetettük össze az eltérésük statisztikai szignifikanciájának ($p \leq 0,05$) meghatározásához.

4. Eredmények

4.1. Komparatív proteomikai analízis kiértékelése

A DOC-érzékeny (PC3, DU145) és DOC-rezisztens (PC3-DR, DU145-DR) sejtvonalpárok teljes fehérjekészletét LC-MS/MS analízissel hasonlítottuk össze. A kollaborációs partnerünk a tömegspektrometriai vizsgálat eredményeit felhasználóbarát formába szerkesztett táblázatban bocsátotta rendelkezésünkre. A táblázatban többek között szerepelt, hogy az egyes fehérjék hány egyedi peptid alapján kerültek azonosításra, valamint feltüntetésre kerültek a hozzájuk tartozó, tömegspektrométer által detektált abszolút abundancia értékek és az ezek alapján számolt expressziós változás mértéke, valamint információt kaptunk a mérések statisztikai szignifikanciájáról is, az azt jelző FDR-korrigált p-érték által. A kiértékelő táblázatban szerepelt továbbá a fehérjék UniProt azonosítója és a gén neve is.

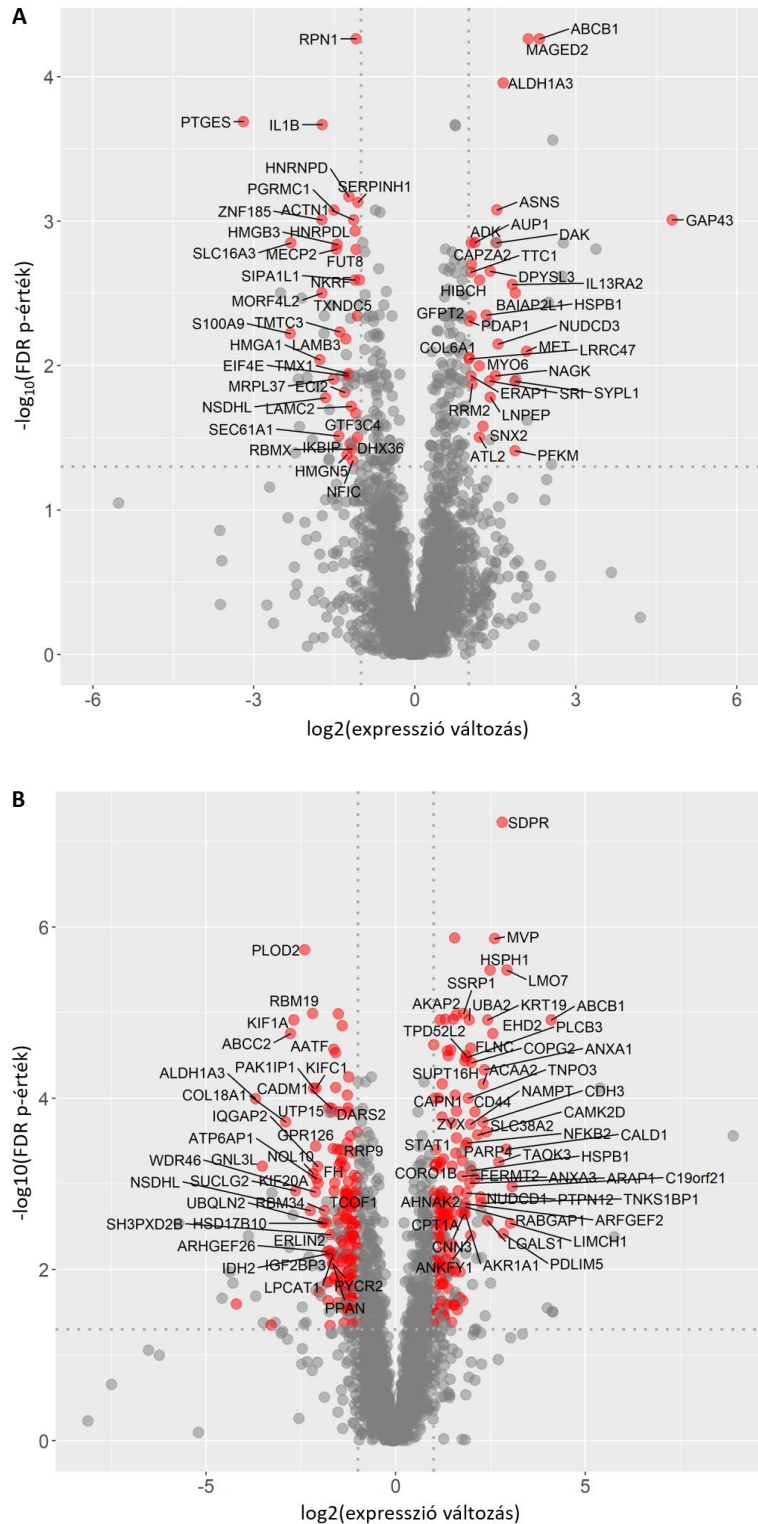
A PC3 és PC3-DR, valamint a DU145 és DU145-DR sejtvonalakról készült mikroszkópos felvételek a 5. ábrán láthatók.



5. ábra – A kutatásunk során használt sejtvonalakról készített mikroszkópos felvételek 100x-os nagyítás mellett [53].

A PC3 vs. PC3-DR összevetésben az analízis 2710 fehérjének tudta meghatározni az expressziós változásának mértékét, valamint a szignifikanciáját, míg a DU145 vs.

DU145-DR analízis esetében 2489 találatot kaptunk. Ezt követően a 3.2.1. alfejezetben leírt előzetes szűrési beállítások szerint szűkítettük a listát. Ezek alkalmazásával a PC3 sejtvonalpár DOC-érzékeny és -rezisztens variánsa között 248, míg a DU145 sejtvonalpár esetén 685 azonosított fehérjére módosult a lista, amely így a technikai szempontból is elfogadható, megbízható találatokat tartalmazta. A proteomikai vizsgálatok eredményeit az alábbi *volcano plot*ok segítségével ábrázoltuk (6. ábra).



6. ábra - A PC3 vs. PC3-DR (A) és a DU145 vs. DU145-DR (B) sejtvonalak LC-MS/MS által elvégzett proteomikai összehasonlításának volcano plot ábrázolása. A detektált fehérjék pontonként jelennek meg az ábrán. A szignifikáns változást (FDR-korrigált p-érték $\leq 0,05$) mutató fehérjék a vízszintes szaggatott vonal felett helyezkednek el, míg a függőleges vonalak a legalább kétszeres expressziós változást jelzik (balra a rezisztensben csökkent, míg jobbra a rezisztensben emelkedett expressziót mutató

fehérjék található). Így az ábrák jobb felső részében piros pontonként jelölt fehérjék a DOC-rezisztens sejtekben felülregulálódott találatokat jelenítik meg.

4.1.1. Kandidáns fehérjék kiválasztása további vizsgálatokra

A tömegspektrometria alapú összehasonlító proteomikai elemzések nyújtotta nagy terjedelmű fehérjelistát a korábban részletezett előzetes szűrési kritériumok beállításával sikerült jelentősen lecsökkentenünk. Ezek alkalmazásával is azonban több száz fehérjéből álló adathalmaz állt rendelkezésünkre, így a potenciálisan biomarkerként, gyógyszer-célpontként alkalmazható, a későbbiekben kísérletes vizsgálatoknak alávetett fehérjék kiválasztásához további bioinformatikai megközelítésű szűrési módszereket dolgoztunk ki, melyek a 3.2.2. alfejezetben kerültek ismertetésre.

4.1.1.1. Szekretált fehérjék kiválasztása

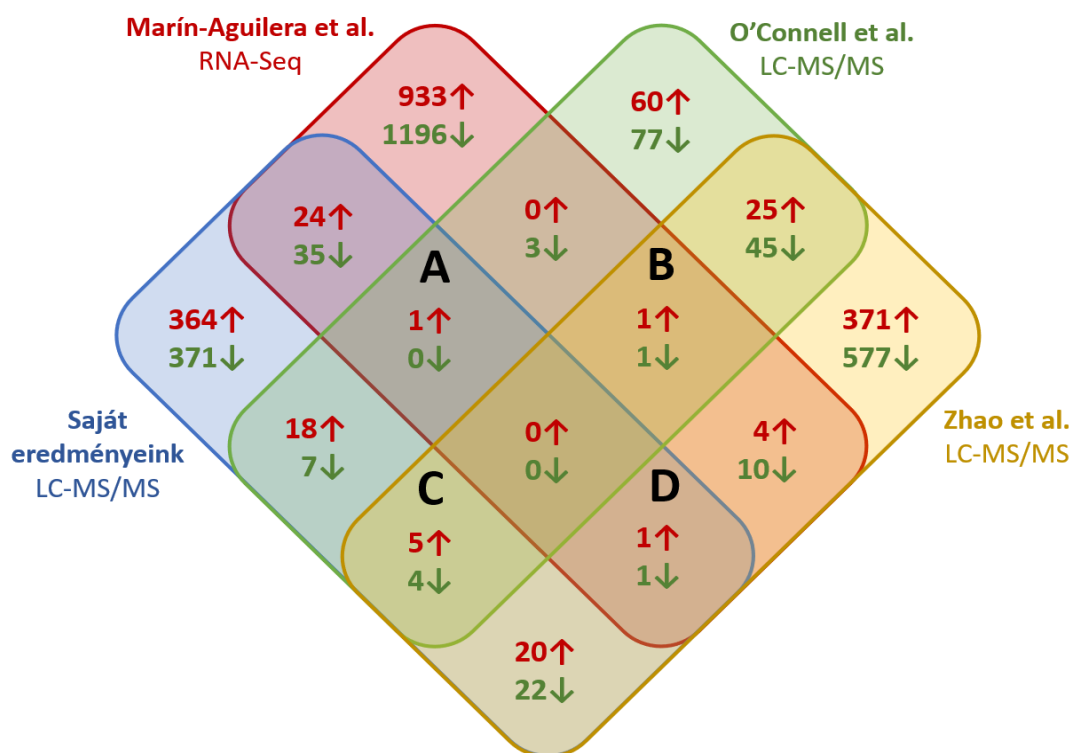
Első kiválasztási módszerünk segítségével a szekretált és ezért a szérumban nagyobb valószínűséggel kimutatható fehérjéket választottuk ki (3.2.2.1. alfejezet) a DOC-rezisztens sejtekben legalább kétszeres felülregulációt mutató fehérjék közül, melyet a Debreceni Egyetem Humángenetikai Tanszékével kooperációban valósítottunk meg. A debreceni kutatócsoport által kidolgozott és validált predikciós algoritmus a következő 11 potenciálisan szekretálódó fehérjét azonosította a rezisztens sejtekben legalább kétszeres emelkedést mutató fehérjék közül: IL13RA2, COL6A1, MET, AUP1, ERAP1, LNPEP, CD44, GSN, CALU, COASY, HBS1L. A felsoroltakból a CD44, az IL13RA2, a MET, az LNPEP és a GSN szérumfehérjék kvantitatív szérum vizsgálatát végeztünk el ELISA módszerrel, melyhez DOC kezelésnek alávetett mCRPC betegektől gyűjtött mintákat használtunk. Választásunk azért esett ezen célpontokra, mert esetükben állt rendelkezésre megbízható forgalmazótól származó ELISA kit.

4.1.1.2. Összehasonlító elemzés által kiválasztott fehérjék

Második szelekciós módszerünkkel (3.2.2.2. alfejezet) a saját proteomikai méréseink eredményeit vetettük össze három másik kutatócsoport által publikált hasonló vizsgálat eredményeivel. Mindhárom további vizsgálatban DOC-érzékeny és rezisztens PC sejtek kerültek összehasonlításra. Közülük Zhao, valamint O'Connell és munkatársai a mi

vizsgálatainkhoz hasonlóan proteomikai szintű elemzést alkalmaztak e célra, míg Marín-Aguilera munkacsoportja transzkriptom (*RNA-Seq*) analízist végzett a sejtmintákon.

Ahogy azt a 7. ábrán szereplő Venn-diagram mutatja, a találatok száma magasabb volt a tömegspektrometria alapú módszerekkel elvégzett kísérletek metszeteiben. A diagram C betűvel jelzett metszetében lévő öt megnövekedett expressziót mutató fehérje esetében a három független proteomikai vizsgálat egybehangozóan felülregulációt állapított meg a DOC-rezisztens sejtekben (NAMPT, ANXA3, SND1, FLNC, ACTN1), így a kiválasztás során ezen találatokra összpontosítottunk. Végül szérumbizsgálatainkba a NAMPT fehérjét vontuk be, mivel szakirodalmának áttanulmányozása alapján bebizonyosodott, hogy szérumban is kimutatható, valamint vizsgálatához megbízható gyártó által gyártott ELISA kit is elérhető.

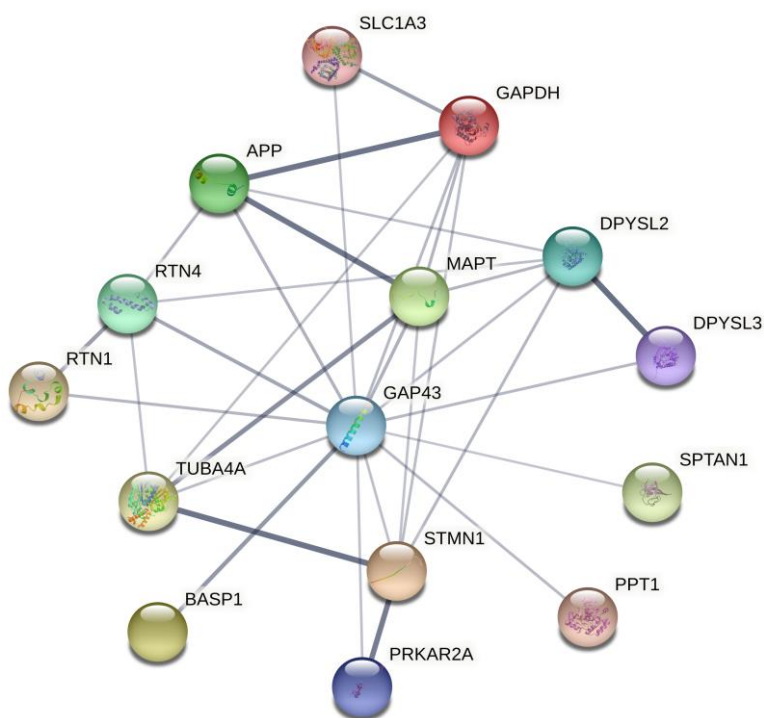


7. ábra - Venn diagram. LC-MS/MS alapú proteomikai vizsgálatunk eredményeinek összevetése független kutatócsoportok által publikált hasonló vizsgálatok eredményeivel. A piros számok a DOC-rezisztens prosztatarák sejtvonalakban detektált megnövekedett expressziójú fehérjék számát, míg a zöld számok az alulregulálódó fehérjék számát jelzik. A betűvel jelölt metszetekbe azon fehérjék tartoznak, amelyek legalább három független vizsgálat szerint is szignifikáns eltérést mutatnak.

A - Felülreguláció: ANXA6; **B** - Felülreguláció: PYGL; Alulreguláció: EFHD2;
C - Felülreguláció: NAMPT, ANXA3, SND1, FLNC, ACTN1; Alulreguláció: PDIA3, OAT, LDHA, FLNB; **D** - Felülreguláció: PYGB; Alulreguláció: CKAP4

4.1.1.3. Összetett szűrési módszer által kiválasztott fehérjék

A harmadik szűrési módszerünkkel (3.2.2.3. alfejezet) összetett szempontrendszer szerint vizsgáltuk azt az 5-5 fehérjét, amelyek a DR sejtekben a legmagasabb expressziót mutatták a parentális sejtvonalpárjukhoz képest (7. táblázat), valamint azt a további 3 fehérjét, amelyek mindkét rezisztens sejtvonalonban következetesen felülregulálódtak (8. táblázat). A szűrési módszer keretein belül egyrészt feldolgoztuk a fehérjék szakirodalmát, amelynek többek között célja volt, hogy olyan fehérjéket válasszunk ki, amelyek a PC kemorezisztenciáját illetően még nem kerültek feltérképezésre, azonban más tumorentitásokban prognosztikus vagy prediktív markerként, illetve hatóanyag rezisztenciában szerepet betöltő molekulaként, esetleg gyógyszer-célpontként már azonosították őket. A GAP43 STRING adatbázis szerinti fehérje-fehérje interakcióit a 8. ábra mutatja, amely a fehérje magas élszámát (14) is szemlélteti. A szakirodalmi áttekintés alapján a GAP43 és a Hsp27 fehérje rajzolódott ki számunkra, mint a további vizsgálatok számára legígéretesebb célfehérjék. A doktori képzésem folyamán elvégzett kutatómunkába ezek közül a GAP43 fehérjét vontuk be, amely lényegesen szegényebb PC-vel kapcsolatos szakirodalommal bír.



8. ábra – A GAP43 fehérje STRING adatbázis szerinti fehérje interakciói a PC3-DR sejtekben, a DOC-rezisztencia hatására felülregulálódó fehérjékkel kapcsolatosan

(GAP43 éleinek száma = 14). Permanens link: <https://version-11-0b.string-db.org/cgi/network?networkId=bmcJtR0l8Jol>

7. táblázat – A DU145-DR (A) és PC3-DR (B) sejtvonalakban az öt-öt legnagyobb expressziós emelkedést mutató fehérje listája. A szignifikáns értékek (FDR-korrigált p-érték $\leq 0,05$) félkövér betűtípussal jelölve.

A

Gén név	UniProt azonosító	Fehérje név	Expressziós változás (fold change)	Szignifikancia (FDR-korrigált p-érték)
ABCB1	P08183	Multidrug resistance protein 1	17,23	0,000012
C19orf21	Q8IVT2	Uncharacterized protein C19orf21	8,44	0,001075
LIMCH1	Q9UPQ0	LIM and calponin homology domains-containing protein 1	8,16	0,002889
LMO7	Q8WW11	LIM domain only protein 7	7,68	0,000003
CALD1	Q05682	Caldesmon	7,60	0,000392

B

Gén név	UniProt azonosító	Fehérje név	Expressziós változás (fold change)	Szignifikancia (FDR-korrigált p-érték)
GAP43	P17677	Neuromodulin	27,77	0,000979
ABCB1	P08183	Multidrug resistance protein 1	5,01	0,000055
MAGED2	Q9UNF1	Melanoma-associated antigen D	4,34	0,000055
MET	P08581	Hepatocyte growth factor receptor	4,24	0,007954
BAIAP2L1	Q9UHR4	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1	3,67	0,003145

8. táblázat – A komparatív proteomikai analízis által, mindkét vizsgált DOC-rezisztens sejtvonalon felülregulációt mutató fehérjék listája. A szignifikáns értékek (FDR-korrigált p-érték $\leq 0,05$) félkövér betűtípussal jelölve.

Gén név	UniProt azonosító	Fehérje név	DU145-DR vs. DU145		PC3-DR vs. PC3	
			Expressziós változás (fold change)	Szignifikancia (FDR-korrigált p-érték)	Expressziós változás (fold change)	Szignifikancia (FDR-korrigált p-érték)
ABCB1	P08183	Multidrug resistance protein 1	17,23	0,000012	12,70	0,000055
SYPL1	Q16563	Synaptophysin-like protein 1	2,18	0,002853	3,66	0,012825
HSPB1	P04792	Heat shock protein beta-1	3,40	0,000697	2,52	0,004463

Az előzetes szűrési kritériumok alkalmazásával, majd a bioinformatikai szűrési módszerek által végül 7 fehérjét (9. táblázat) választottunk ki szérumbizsgálatokra.

9. táblázat – A szűrési módszerek révén a szérumbizsgálatokra kiválasztott hét fehérje tömegspektrometriai elemzés szerinti expressziós változásai a DOC-rezisztens sejtekben a terápia érzékeny sejtvonalládjukhoz viszonyítva. A szignifikáns értékek (FDR-korrigált p-érték $\leq 0,05$) félkövér betűtípussal jelölve.

Gén név	Uniprot azonosító	PC3-DR		DU145-DR	
		Expressziós változás	FDR p-érték	Expressziós változás	FDR p-érték
NAMPT	P43490	1,41	0,01825	3,92	0,00020
CD44	P16070	1,15	0,45315	4,28	0,00014
GAP43	P17677	27,77	0,00098	<i>nem detektált</i>	
MET	P08581	4,24	0,00795	<i>nem detektált</i>	
LNPEP	Q9UIQ6	2,65	0,01658	-1,20	0,26205
IL13RA2	Q14627	3,52	0,00275	<i>nem detektált</i>	
GSN	P06396	1,67	0,21940	3,25	0,02128

4.2. Szérumbizsgálatok eredményei

4.2.1. A szérumbizsgálatba bevont betegek adatai

Szérumbizsgálatainkat két betegcsoporton végeztük el. Az egyes betegkohortok főbb adatai a 10. táblázatban olvashatók.

A NAMPT fehérje koncentrációit a Bécsi Orvostudományi Egyetem Urológiai Klinikáján 2003.03. – 2011.11. között gyűjtött szérumbizsgálatokban határoztuk meg. A mintákat, valamint a betegek anonimizált klinikopatológiai adatait együttműködés keretében bocsátották rendelkezésünkre. A betegkohort 99 beteg mintáját tartalmazta, közülük 82-en elsővonalban, 17-en másodvonalban kapták a DOC-kezelést. A páciensek medián életkora 69 év volt (terjedeleme: 47-86). Hetvenhat betegnél volt kimutatható csontáttét, 9 betegnél lágyszövet metasztázis, valamint 19-nél nyirokcsomó érintettség. A 99 beteg közül 7 élt az utolsó utánkövetés időpontjában. A medián követési idő 10 hónap volt. A szérumbizsgálatba 99 beteg kezelés előtti, közülük 7 beteg progresszió előtti és progressziókori, valamint 18 beteg utolsó kezelés alatti mintáját vontuk be. A kiértékelés főbb végpontjai a betegek teljes, illetve betegségfüggő túlélése volt. A betegek klinikai adatait a 10. táblázat tartalmazza.

A második betegcsoportot a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáján 2014/01 – 2018/03 között DOC-kezelésnek alávetett mCRPC betegek alkották. Ezen betegkohort szérumbizsgálatában határoztuk meg a GAP43, CD44, MET, IL13RA2, LNPEP és GSN fehérjék szérumbizsgálati koncentrációit. Az ELISA kiték eltérő kapacitása okán az egyes fehérjék esetén eltérő számú beteg mintáit tudtuk megvizsgálni. Így a GAP43 esetén 100, a CD44,

MET és IL13RA2 fehérjék esetén 66, valamint az LNPEP és GSN ELISA tesztek során 53 beteg mintáit mértük meg. Ezen betegcsoport mintáin végzett tesztek kiértékelésének fő végpontja a teljes túlélés volt, de figyelembe vettük a kezelésre adott PSA választ is.

10. táblázat – A kandidáns fehérjék szérumbizsgálataira létrehozott két betegcsoport leíró adatai.

Betegkohort Vizsgált fehérje	1. kohort	2. kohort		
	NAMPT	GAP43	CD44, MET, IL13RA2	LNPEP, GSN
Teljes betegszám	99	100	66	53
Kezelés előtti medián életkor (terjedelem)	69 (47-86)	70 (44 - 86)	71 (44 - 86)	71 (44 - 86)
Betegfelvételi ECOG PS				
0	61	63	38	30
1	29	27	22	19
2	9	9	5	3
ismeretlen	0	1	1	1
Csontmetasztázis	76	95	64	51
Nyirokcsomó érintettség (> 2cm)	19	38	29	21
Lágyrész metasztázis (tüdő/máj)	9	15	14	10
Korábbi RPE	51	17	12	10
Korábbi RAD	n.a.	12	7	5
Kezelés előtti PSA (ng/ml)	73,0 (2,0-1212,0)	84,1 (1,5- 6115,4)	87,8 (2,6 - 7312,0)	88,9 (7,9 - 7312,0)
PSA csökkenés (igen/nem/n.a.)	94 / 1 / 4	69 / 15 / 16	46 / 11 / 9	36 / 10 / 7
30%-os PSA csökkenés	78	52	36	27
50%-os PSA csökkenés	54	43	31	23
90%-os PSA csökkenés	14	25	16	10
PSA prg. DOC-kezelés alatt (igen/nem)	1 / 94	22 / 47	15 / 31	14 / 22
Radiológiai prg. DOC-kezelés alatt (igen/nem/n.a.)	n.a.	36 / 31 / 33	24 / 18 / 24	22 / 15 / 16
Docetaxel kezelés				
Elsővonalban	82	97	65	52
Másodvonalban	17	3	1	1
Medián DOC szériák száma (terjedelem)	1 (1-5)	n.a.	n.a.	n.a.
Medián DOC ciklusok száma (terjedelem)	8 (2-28)	6 (1-25)	8 (1-25)	10 (1-25)
Egy széria DOC	52	n.a.	n.a.	n.a.
≥ 2 széria DOC	47	n.a.	n.a.	n.a.
Elhunyt / élő betegek száma	92 / 7	68 / 32	42 / 24	38 / 15
Medián követési idő hónapokban (terjedelem)	10 (0,7 - 39,6)	17 (0,4-56,4)	19 (0,4-59,5)	19 (0,4-59,5)

4.2.2. ELISA vizsgálatok eredményei

4.2.2.1. A szérumban NAMPT koncentrációk összefüggései a betegek klinikopatológiai paramétereivel és túlélésével

A deskriptív statisztikai elemzés során a kezelés előtti NAMPT szérumszintek nem mutattak összefüggést a betegek klinikai adataival (életkor, korábban elvégzett prosztataektómiával, ECOG státusz, áttét lokalizációja) (11. táblázat).

11. táblázat – A kezelés előtti NAMPT szérumszintek deskriptív statisztikai összevetése a betegek klinikai adataival. EMP – Empirin.

	n	Kezelés előtti NAMPT szérumszint (ng/ml)	p
Kor (évek)			
≤ 69	49	1,07 (0,27-13,67)	0,629
> 69	50	1,04 (0,11-12,10)	
Korábbi RPE			
nem	48	1,06 (0,11-12,10)	0,919
igen	51	1,08 (0,22-13,67)	
Docetaxel kezelés			
Elsővonalban	82	1,13 (0,13-13,67)	0,084
Másodvonalban	17	0,71 (0,11-8,78)	
Docetaxel kezelés			
Csak DOC	72	1,07 (0,11-11,13)	0,832
EMP/DOC	27	0,90 (0,11-13,67)	
DOC széria száma			
Egy széria	52	1,06 (0,11-11,13)	0,692
≥ 2 széria	47	1,07 (0,27-13,67)	
ECOG PS			
0	61	1,18 (0,11-13,67)	0,231
1-2	38	0,79 (0,11-12,10)	
Metasztázisok jelenléte			
nem	15	1,07 (0,13-13,67)	0,846
igen	84	1,06 (0,11-11,13)	
Nyirokcsomó státusz			
N -	81	1,08 (0,11-13,67)	0,723
N +	19	0,92 (0,22-6,03)	
Csontmetasztázis			
nem	23	1,07 (0,13-13,67)	0,132
igen	76	1,06 (0,11-8,78)	
Lágyrész metasztázis			
nem	43	1,07 (0,13-13,67)	0,856
igen	56	1,06 (0,11-8,78)	

Az univariancia analízis keretében a betegadatokat és a medián PSA és NAMPT szérumszinteket vetettük össze a teljes, valamint a betegségfüggő túléléssel (12. táblázat). A metasztázisok jelenléte, a magasabb kezelés előtti PSA (medián érték) és NAMPT (felső tercilis érték) szintek mutattak szignifikáns összefüggést a betegek rövidebb teljes és betegségfüggő túlélésével.

12. táblázat – A klinikai paraméterek és a kezelés előtti szérumszintek NAMPT koncentrációk összevetése a betegek teljes, illetve betegségfüggő túlélésével univariancia analízis segítségével.

Változók		Teljes túlélés			Betegségfüggő túlélés		
		HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Kor (évek)	≤ 69	ref.			ref.		
	> 69	0,983	0,650 - 1,486	0,935	1,105	0,718 - 1,699	0,650
Korábbi RPE	nem	ref.			ref.		
	igen	0,528	0,339 - 0,822	0,005	0,553	0,350 - 0,875	0,011
Docetaxel kezelés	elsővonalban	ref.			ref.		
	másodvonalban	1,523	0,896 - 2,591	0,120	1,558	0,900 - 2,988	0,113
Docetaxel kezelés	EMP/DOC	ref.			ref.		
	csak DOC	0,669	0,561 - 1,449	0,902	0,868	0,533 - 1,413	0,569
ECOG PS	0	ref.			ref.		
	1-2	1,492	0,964 - 2,309	0,072	1,457	0,925 - 2,295	0,104
Metasztázisok jelenléte	nem	ref.			ref.		
	igen	2,499	1,369 - 4,561	0,003	2,775	1,449 - 5,315	0,002
PSA szérumszint cc. (medián)	≤ 73 ng/ml	ref.			ref.		
	> 73 ng/ml	2,172	1,420 - 3,323	<0,001	2,453	1,570 - 3,883	<0,001
NAMPT szérumszint cc. (felső tercilis)	≤ 1.60 ng/ml	ref.			ref.		
	> 1.60 ng/ml	1,750	1,126 - 2,719	0,013	1,784	1,130 - 2,817	0,013

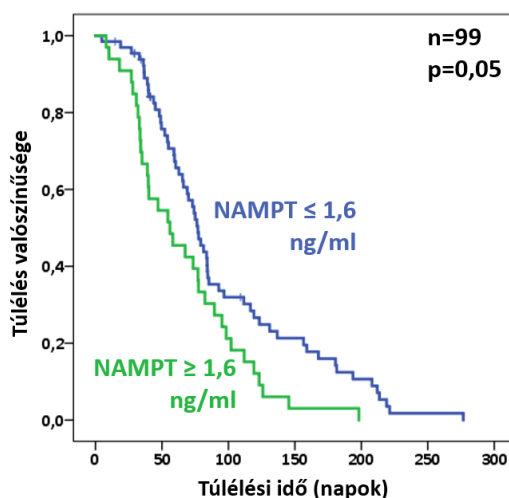
A multivariancia modellben (13. táblázat) azon változókat vizsgáltuk tovább, amelyek az univariancia elemzés során szignifikáns összefüggést mutattak a betegek túlélésével. Az analízis rávilágított, hogy a metastázisok jelenléte, a magas PSA és NAMPT szérumszintek a rövidebb túlélés független prognosztikus markerei, míg a korábbi radikális műtéti beavatkozás a kedvezőbb túléléssel mutatott szignifikáns összefüggést.

13. táblázat – Multivariancia analízis. A DOC-kezelés előtti magasabb szérumszintek NAMPT koncentrációk a túlélés független rizikófaktorának bizonyultak. A szignifikáns értékek ($p \leq 0,05$) félkövér betűtípussal vannak jelölve.

Változók		Teljes túlélés			Betegségfüggő túlélés		
		HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Korábbi RPE	nem	ref.			ref.		
	igen	0,561	0,359 - 0,877	0,011	0,591	0,371 - 0,941	0,027
Metasztázisok jelenléte	nem	ref.			ref.		
	igen	2,336	1,238 - 4,407	0,009	2,514	1,265 - 4,994	0,009
PSA szérumszint cc. (medián)	≤ 73 ng/ml	ref.			ref.		
	> 73 ng/ml	1,579	1,008 - 2,457	0,046	1,758	1,098 - 2,815	0,019
NAMPT szérumszint cc. (felső tercilis)	≤ 1.6 ng/ml	ref.			ref.		
	> 1.6 ng/ml	1,718	1,082 - 2,728	0,022	1,741	1,077 - 2,813	0,024

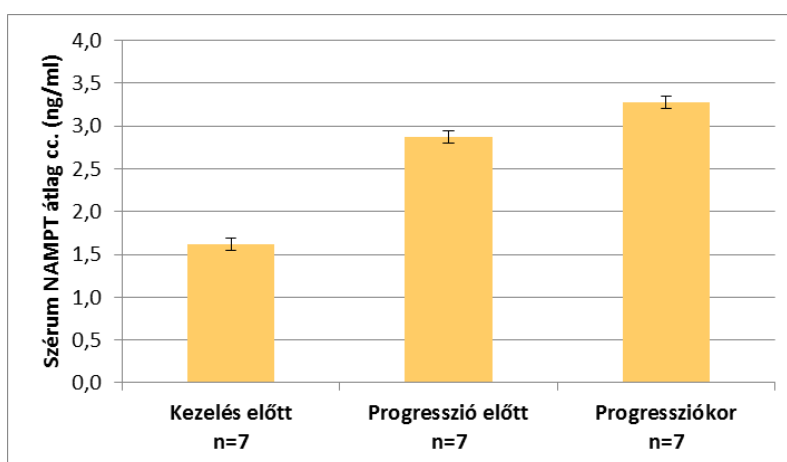
Az alapvonalú NAMPT szérumszintek túléléssel történő összevetését Kaplan-Meier görbékkel szemléltettük. A Kaplan-Meier túlélési görbe (9. ábra) szemlélteti, hogy a kezelés előtti emelkedett (felső tercilis feletti) NAMPT fehérje szérumszintje a

DOC-kezelésnek alávetett mCRPC betegek szignifikánsan ($p \leq 0,05$) rövidebb túlélésével mutat összefüggést.



9. ábra – A NAMPT ELISA túlélés analízisnek eredménye Kaplan-Meier túlélési görbén szemlélítve. Vizsgálatunk szerint a DOC-kezelés előtti magasabb NAMPT szérumszintje ($\geq 1,6$ ng/ml) az mCRPC betegek rövidebb túlélését jelezte előre.

A DOC-kezelés alatt, a betegség progresszióját megelőzően, valamint a progressziókor gyűjtött minták kiértékelésével rávilágítottunk, hogy a NAMPT szérumszintje már a progresszió felfedezését megelőzően jelentős emelkedést mutat, majd ez a tendencia a tumor progressziójával tovább folytatódott (10. ábra).



10. ábra – A DOC-kezelt mCRPC betegek NAMPT fehérje szérumszintjének alakulása a DOC-kezelés előtt, a progresszió felfedezését megelőzően, valamint a progresszió felfedezésekor.

4.2.2.2. A szérumban GAP43, CD44, MET, IL13RA2, LNPEP és GSN koncentrációk ELISA vizsgálata

A második (Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáján gyűjtött) betegcsoport mintáin a GAP43, CD44, MET, LNPEP, IL13RA2 és GSN fehérjék szérumban koncentrációit határoztuk meg. Az ELISA kiték eltérő kapacitása okán eltérő mennyiségű klinikai mintát tudtunk bevinni az egyes fehérjékkel végzett kísérletek során. A GAP43 esetén 100 beteg 144 mintáját, a CD44 és MET fehérjék esetében 66 beteg 218 mintáját, az IL13RA2 esetén ugyanezen 66 beteg 78 szérumban mintáját, valamint az LNPEP és GSN proteinek esetén 56 beteg 72 mintáját mértük meg. A DOC-kezelés előtt vett mintákon túl a betegek egy részénél elérhetőek voltak a kezelés során gyűjtött szérumban minták is, melyeken szintén méréseket végeztünk.

4.2.2.3. A GAP43 kezelés előtti szérumban koncentrációinak összefüggései a betegek klinikai adataival és túlélésével

A klinikai adatok és a DOC-kezelés előtti GAP43, illetve PSA szérumban koncentrációk közötti összefüggéseket a 14. táblázatban összesítettük. Az alapvonalon GAP43 szintek nem mutattak összefüggést a vizsgált klinikai adatokkal. Ezzel szemben a kezelés előtti PSA koncentrációk szignifikáns összefüggést mutattak a következő betegadatokkal: korábbi kezelés megléte, korábbi radikális prosztatektómia, ECOG státusz.

14. táblázat - A kezelés előtti GAP43 szérumszintek deszkriptív statisztikai összevetése a betegek klinikai adataival. A szignifikáns értékek ($p \leq 0,05$) félkövér betűtípussal jelölve. RAD – irradiáció.

	n	Kezelés előtti GAP43 szérumszint cc. (ng/ml)	P	Kezelés előtti PSA szérumszint cc. (ng/ml)	P
		medián (terjedelem)		medián (terjedelem)	
Kor (évek)					
< 72	54	3,024 (0,380 - 6,500)	0,942	55,300 (1,520 - 4886,000)	0,304
≥ 72	46	3,467 (0,250 - 6,280)		96,015 (2,800 - 6115,410)	
Korábbi kezelés					
nem	71	2,982 (0,250 - 6,500)	0,704	150,000 (1,520 - 6115,410)	0,005
igen	29	3,275 (0,790 - 5,980)		56,000 (3,200 - 4886,000)	
Korábbi RPE					
nem	83	3,009 (0,250 - 6,500)	0,563	116,600 (1,520 - 6115,410)	0,015
igen	17	3,812 (1,090 - 5,980)		56,000 (3,200 - 109,920)	
Korábbi RAD					
nem	88	3,309 (0,250 - 6,500)	0,231	96,015 (1,520 - 6115,410)	0,284
igen	12	3,107 (0,790 - 4,810)		59,690 (4,640 - 4886,000)	
ECOG PS					
0-1	63	3,066 (0,250 - 6,280)	0,703	54,600 (1,520 - 2110,000)	0,001
2	36	3,211 (0,380 - 5,980)		220,355 (7,850 - 6115,410)	
ismeretlen	1				
Nyirokcsomó érintettség					
nem	62	3,173 (0,250 - 6,280)	0,363	88,700 (1,520 - 2349,610)	0,837
igen	38	3,191 (1,090 - 6,500)		67,300 (2,800 - 6115,410)	
Lágyrész metasztázis					
nem	85	3,199 (0,250 - 6,500)	0,699	73,690 (1,520 - 6115,410)	0,121
igen	15	3,009 (1,500 - 5,980)		171,000 (4,64 - 4886,000)	
Csontmetasztázis					
nem	5	1,715 (1,320 - 4,440)	0,323	181,760 (15,900 - 379,360)	0,837
igen	95	3,199 (0,250 - 6,500)		80,000 (1,520 - 6115,410)	
PSA csökkenés					
nem	15	3,815 (0,790 - 5,980)	0,930	79,600 (4,640 - 329,200)	0,307
igen	69	3,590 (0,250 - 6,500)		89,300 (1,520 - 6115,410)	
ismeretlen	16				
30%-os PSA csökkenés					
nem	34	3,467 (0,250 - 6,280)	0,747	84,050 (1,520 - 6115,410)	0,416
igen	52	3,525 (0,940 - 6,500)		83,200 (2,800 - 4886,000)	
ismeretlen	14				
50%-os PSA csökkenés					
nem	43	3,812 (0,250 - 6,280)	0,329	88,100 (1,520 - 6115,410)	0,395
igen	43	3,066 (0,940 - 6,500)		80,000 (2,800 - 4886,000)	
ismeretlen	14				
90%-os PSA csökkenés					
nem	62	3,606 (0,250 - 6,500)	0,161	69,150 (1,520 - 6115,410)	0,530
igen	25	2,949 (0,940 - 5,250)		216,460 (3,200 - 4886,000)	
ismeretlen	13				
Radiológiai prg. DOC kezelés alatt					
nem	31	3,199 (0,250 - 6,280)	0,878	65,300 (2,800 - 6115,410)	0,791
igen	37	3,460 (0,790 - 6,500)		61,000 (4,640 - 2110,000)	
ismeretlen	32				

A klinikai adatokat, valamint az alapvonali GAP43 szinteket univariancia analízissel vetettük össze a betegek teljes túlélésével (15. táblázat). Szignifikáns változást az ECOG státusszal, valamint a kezelésre adott primer PSA válaszokkal tudtunk kimutatni, azonban a kezelés előtti GAP43 szintekkel kapcsolatosan nem találtunk szignifikáns összefüggést.

15. táblázat – A klinikai paraméterek és a GAP43 szérumszintek koncentrációk összehasonlítása a betegek túlélésével univariancia analízis segítségével. A szignifikáns értékek ($p \leq 0,05$) félkövér betűtípussal jelölve. RAD – irradiáció.

Változók		Teljes túlélés		
		HR	95% CI	p
Kor (évek)	< 72	ref.		
	≥ 72	1,596	0,975 - 2,612	0,063
Korábbi RPE	nem	ref.		
	igen	1,193	0,659 - 2,162	0,560
Korábbi RAD	nem	ref.		
	igen	1,691	0,830 - 3,445	0,148
ECOG PS	0-1	ref.		
	2	1,972	1,216 - 3,196	0,006
Nyirokcsomó érintettség	nem	ref.		
	igen	0,961	0,583 - 1,585	0,877
Lágyrész metasztázis	nem	ref.		
	igen	1,332	0,710 - 2,497	0,372
Csontmetasztázis	nem	ref.		
	igen	0,861	0,269 - 2,754	0,801
PSA szérumszint cc. (medián)	≤ 89 ng/ml	ref.		
	> 89 ng/ml	1,118	0,688 - 1,815	0,653
PSA válasz	nem	ref.		
	igen	0,290	0,153 - 0,549	<0,001
PSA válasz	< 30%	ref.		
	> 30%	0,548	0,319 - 0,940	0,029
PSA válasz	< 50%	ref.		
	> 50%	0,491	0,285 - 0,847	0,011
PSA válasz	< 90%	ref.		
	> 90%	0,558	0,286 - 1,086	0,089
GAP43 szérumszint cc. (medián)	≤ 3,17 ng/ml	ref.		
	> 3,17 ng/ml	0,706	0,435 - 1,146	0,159
GAP43 szérumszint cc. (felső tercilis)	≤ 3,83 ng/ml	ref.		
	> 3,83 ng/ml	1	0,598 - 1,080	0,147
GAP43 szérumszint cc. (felső kvartilis)	≤ 4,17 ng/ml	ref.		
	> 4,17 ng/ml	0,825	0,663 - 1,027	0,085
GAP43 szérumszint cc. (felső 20%)	≤ 4,55 ng/ml	ref.		
	> 4,55 ng/ml	0,867	0,728 - 1,032	0,108

4.2.2.4. A kezelés előtti CD44, MET, LNPEP ELISA szérumszintjeinek összefüggései a betegek klinikai adataival és túlélésével

Az LNPEP fehérjével végzett vizsgálatba bevont 66 alapvonalis mintából mindössze 15 esetben találtunk detektálható jelet, így az eredményeket dichotomizáltuk LNPEP-pozitív és negatív csoportokba.

A kiértékelés első lépésében a vizsgált fehérjék, valamint a PSA kezelés előtti szérumszintjeit vetettük össze a főbb betegadatokkal (16. táblázat).

16. táblázat - A kezelés előtti CD44, MET és LNPEP szérumszintjeinek deskriptív statisztikai összevetése a betegek klinikai adataival.

	n	Kezelés előtti CD44	p	Kezelés előtti MET	p	Összes beteg		LNPEP negatív		LNPEP pozitív		p	Kezelés előtti PSA	p
		szérumszintje (ng/ml)		szérumszintje (ng/ml)		n	%	n	%	n	%		szérumszintje (ng/ml)	
		medián (terjedelem)		medián (terjedelem)									medián (terjedelem)	
Kor (évek)														
< 71	33	851,80 (78,00-5000,00)	0,964	341,50 (194,90-725,60)	0,273	26	19	73,1	7	26,9	0,827	70,10 (2,55-1638,25)	0,611	
≥ 71	33	922,30 (78,00-5000,00)		354,80 (149,70-1058,80)		27	19	70,4	8	29,6		88,79 (4,20-731,20)		
Primer terápia														
nem	47	922,30 (78,00-3910,00)	0,350	341,50 (175,40-1058,80)	0,944	38	26	68,4	12	31,6	0,399	108,68 (4,20-731,20)	0,125	
igen	19	714,70 (78,00-5000,00)		354,80 (149,70-552,00)		15	12	80	3	20		74,31 (2,55-347,38)		
Korábbi RPE														
nem	54	897,95 (78,00-5000,00)	0,454	345,90 (149,70-1058,80)	0,861	43	30	69,8	13	30,2	0,518	88,22 (4,20-731,20)	0,267	
igen	12	748,75 (78,00-5000,00)		353,35 (219,80-552,00)		10	8	80	2	20		66,68 (2,55-347,38)		
Korábbi RAD														
nem	59	917,80 (78,00-5000,00)	0,662	341,50 (175,40-1058,80)	0,747	48	34	70,8	14	29,2	0,665	88,79 (2,55-731,20)	0,396	
igen	7	714,70 (180,10-5000,00)		354,80 (149,70-507,60)		5	4	80	1	20		74,31 (5,09-273,29)		
ECOG PS														
0	60	897,95 (78,00-5000,00)	0,221	333,85 (149,70-839,60)	0,719	49	34	69,4	15	30,6	0,256	87,32 (2,55-731,20)	0,481	
1-2	5	839,3 (78,00-2383,00)		363,90 (175,40-1058,80)		3	3	100	0	0		209,64 (7,89-1037,48)		
ismeretlen	1					1								
Nyirokcsomó státusz														
N -	37	938,4 (78,00-5000,00)	0,256	321,60 (149,70-1058,80)	0,458	32	24	75	8	25	0,51	120,32 (5,09-731,20)	0,080	
N +	29	786,60 (180,00-5000,00)		369,40 (188,50-764,80)		21	14	66,7	7	33,3		51,59 (2,55-939,14)		
ismeretlen	0													
Lágyrész metasztázis														
nem	52	938,4 (78,00-5000,00)	0,117	321,60 (149,70-1058,80)	0,442	43	30	69,8	13	30,2	0,518	82,745 (2,55-731,20)	0,919	
igen	14	786,6 (180,10-5000,00)		369,40 (188,50-764,80)		10	8	80	2	20		92,58 (5,09-625,71)		
unknown	0													
Csontmetasztázis														
nem	2	1472,40 (917,80-2027,00)	0,373	247,60 (232,40-262,80)	0,103	2	1	50	1	50	0,487	57,79 (26,23-89,35)	0,496	
igen	64	859,55 (78,00-5000,00)		352,55 (149,70-1058,80)		51	37	72,6	14	27,4		87,81 (2,55-731,20)		
unknown	0													
PSA válasz														
igen	46	806,80 (78,00-5000,00)	0,664	366,65 (175,40-1058,80)	0,374	36	25	65,8	11	29	0,512	87,32 (2,55-4224,24)	0,957	
nem	11	917,80 (78,00-3910,00)		296,60 (219,80-552,00)		10	8	80	2	20		87,81 (5,09-1638,25)		
ismeretlen	9					7								
PSA válasz														
> 30%	36	819,20 (78,00-5000,00)	0,904	366,65 (175,40-1058,80)	0,785	27	17	63	10	37	0,095	82,75 (2,55-1037,48)	0,538	
< 30%	22	853,30 (78,00-3910,00)		324,30 (194,90-839,60)		20	17	85	3	15		116,53 (5,09-4224,24)		
ismeretlen	8					6								
PSA válasz														
> 50%	31	709,50 (78,00-5000,00)	0,236	369,40 (175,40-1058,80)	0,668	23	15	65,2	8	34,8	0,285	70,10 (2,55-1037,48)	0,225	
< 50%	27	917,80 (78,00-3910,00)		321,60 (194,90-839,60)		24	19	79,2	5	20,8		102,94 (5,09-4224,24)		
ismeretlen	8					6								
PSA válasz														
> 90%	16	660,55 (180,10-5000,00)	0,230	350,60 (252,00-725,60)	0,903	37	27	73	10	27	0,852	68,16 (2,55-399,63)	0,417	
< 90%	42	897,95 (78-3910)		340,90 (175,40-1058,80)		10	7	70	3	30		88,22 (4,20-4224,24)		
ismeretlen	8					6								
Radiológiai progresszió														
nem	18	622,65 (180,10-3993,00)	0,162	342,75 (188,50-839,60)	0,790	15	10	66,7	5	33,3	0,692	78,17 (4,20-837,05)	0,538	
igen	24	872,70 (78,00-5000,00)		340,90 (175,40-750,00)		22	16	72,7	6	27,3		88,22 (5,09-1638,25)		
ismeretlen	24					16								
Teljes kohort	66	872,70 (78,00-5000,00)		345,90 (149,70-1058,80)		53	38	71,7	15	28,3		87,81 (2,55-731,20)		

Az univariancia elemzésünkkel kimutattuk, hogy a kezelés előtti emelkedett CD44 szérumszint, az ECOG *performance status* (>0) és a terápiára adott PSA válasz szignifikáns összefüggést mutatnak a betegek teljes túlélésével (17. táblázat).

17. táblázat - A kezelés előtti szérumszint CD44, MET és LNPEP koncentrációk összevetése a betegek túlélésével univariancia analízis segítségével. A szignifikáns értékek ($p \leq 0,05$) félkövér betűtípussal jelölve. RAD - irradiáció.

Változók		Teljes túlélés		
		HR	95% CI	p
Kor (évek)	< 71	ref.		
	≥ 71	1,456	0,851 - 2,490	0,170
Korábbi RPE	nem	ref.		
	igen	1,181	0,606 - 2,301	0,624
Korábbi RAD	nem	ref.		
	igen	1,331	0,566 - 3,132	0,512
ECOG PS	0	ref.		
	1-2	1,774	1,029 - 3,059	0,039
Nyirokcsomó státusz	nem	ref.		
	igen	1,024	0,596 - 1,759	0,933
Lágyrész metasztázis	nem	ref.		
	igen	1,351	0,720 - 2,537	0,349
Csontmetasztázis	nem	ref.		
	igen	0,678	0,164 - 2,804	0,592
PSA szérumszint (medián)	< 88 ng/ml	ref.		
	> 88 ng/ml	1,506	0,866 - 2,619	0,146
PSA válasz	nem	ref.		
	igen	0,291	0,141 - 0,602	0,001
PSA válasz	< 30%	ref.		
	> 30%	0,455	0,250 - 0,828	0,001
PSA válasz	< 50%	ref.		
	> 50%	0,450	0,249 - 0,814	0,008
PSA válasz	< 90%	ref.		
	> 90%	0,634	0,327 - 1,227	0,176
CD44 (medián)	< 872.7 pg/ml	ref.		
	> 872.7 pg/ml	1,976	1,150 - 3,395	0,014
CD44 (felső 25%)	< 1237 pg/ml	ref.		
	> 1237 pg/ml	1	1,069 - 1,612	0,009
MET (medián)	< 345.9 ng/ml	ref.		
	> 345.9 ng/ml	1,119	0,655 - 1,913	0,680
LNPEP	negatív	ref.		
	pozitív	0,837	0,429 - 1,634	0,602

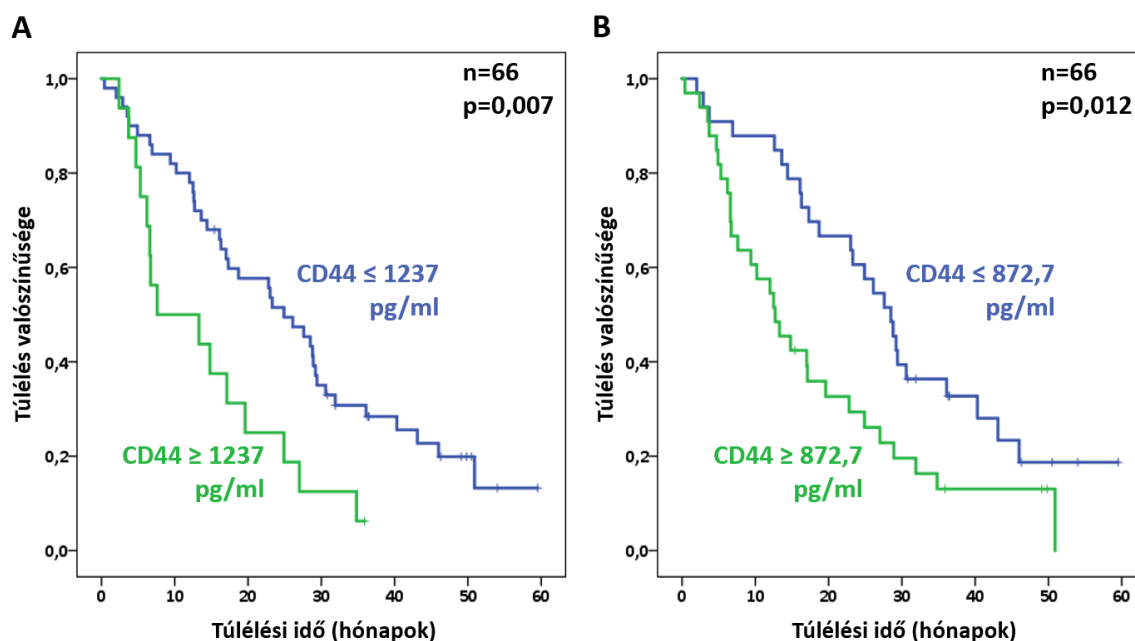
A további kiértékelés során két multivariancia modellt használva vizsgáltuk tovább az univariancia vizsgálat szerinti szignifikáns változókat. A „kezelés előtti” modellben a DOC-terápia megkezdését megelőzően elérhető változókat vizsgáltunk. Ez alapján a magas (felső tercilis érték feletti) CD44 szérumszint a teljes túlélés független rizikófaktorának bizonyult ($p=0,016$). A „kezelés alatti” modellbe olyan faktorokat vontunk be, amelyek olyan paramétereket is tartalmaztak (primer PSA válasz), melyek

csak a DOC kemoterápia megkezdése után elérhető. A „kezelés előtti” modellben csak a magasabb szérumban CD44 szint ($p=0,016$), míg a „kezelés alatti” modellben a magasabb CD44 szint ($p=0,001$) mellett a kezelésre adott PSA válasz ($p<0,001$) bizonyult független prognosztikus faktornak a DOC-kezelt mCRPC betegek túlélésének tekintetében (18. táblázat).

18. táblázat – A CD44 fehérje multivariancia analízisének eredményei. A szignifikáns értékek ($p\leq 0,05$) félkövér betűtípussal jelölve.

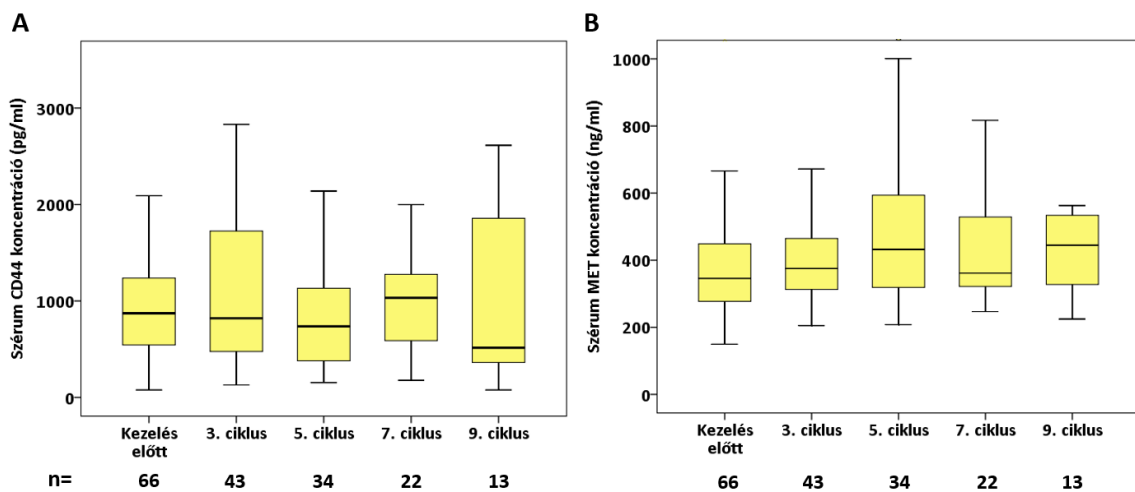
	Teljes túlélés		
	HR	95% CI	p
Kezelés előtti modell			
ECOG PS (0 vs. 1- 2)	2,107	0,977 - 4,545	0,057
Kezelés előtti PSA (medián) > 88 ng/ml	1,000	0,464 - 2,155	0,999
CD44 (>1237 pg/ml)	1,304	1,051 - 1,618	0,016
Kezelés alatti modell			
ECOG PS (0 vs. 1- 2)	1,519	0,817 - 2,825	0,187
PSA válasz (igen)	0,227	0,103 - 0,502	<0,001
CD44 (>1237 pg/ml)	1,531	1,193 - 1,964	0,001

A túlélés elemzés során a CD44 fehérje kezelés előtti emelkedett koncentrációja szignifikáns korrelációt mutatott a betegek rövidebb túlélésével (11. ábra).



11. ábra – A CD44 ELISA túlélés analízise Kaplan-Meier görbékben megjelenítve. A kemoterápiás kezelés megkezdése előtt mért magasabb CD44 értékek (A: felső tercilis érték ≥ 1237 pg/ml, B: medián érték $\geq 872,7$ pg/ml) az mCRPC páciensek kedvezőtlenebb túlélésével függttek össze.

A CD44 és MET ELISA kitek DuoSet formátuma lehetővé tette nagyszámú DOC-kezelés alatt gyűjtött minta meghatározását is. A kiértékelés során így képesek voltunk meghatározni a vizsgált fehérjék szérumszintjének DOC-terápia során bekövetkező esetleges változásait. Vizsgáltuk továbbá ezen koncentrációváltozások hatását a betegek túlélésére. A kezelés során fellépő szignifikáns koncentrációváltozásokat egyik fehérje esetében sem voltunk képesek kimutatni (12. ábra), illetve ezen fehérjék szérumszintjei a teljes túléléssel sem mutattak összefüggést.



12. ábra - A CD44 (A) és a MET (B) szérumszintjeinek változásai a DOC-kezelés különböző ciklusaiban.

A GSN és IL13RA2 ELISA mérések nem eredményeztek a mérési tartományban detektálható szignált.

Összefoglalva, szérumszintjeink alapján a NAMPT és a CD44 fehérjék kezelés előtti emelkedett szérumszintjei mutattak szignifikáns és független összefüggést a DOC-kezelte mCRPC betegek túlélésével. A NAMPT esetében továbbá kimutattuk, hogy a fehérje koncentrációja már a betegség progresszióját megelőzően jelentős mértékben megemelkedik.

4.3. Sejtkultúrák vizsgálatok eredményei

Funkcionális kísérleteinket a szérumszintvizsgálatok során elért eredmények tükrében a NAMPT és CD44 fehérjék célzva végeztük el mindkét sejtvonalpáron. Emellett a PC3-DR sejtvonalban kimagasló felülregulációt mutató GAP43 fehérjét is bevitük sejtkultúrák vizsgálatainkba.

A kísérleteket megelőzően RNS és fehérje szinten saját laboratóriumi módszereinkkel (qPCR, Western blot) validálni tudtuk a célfehérjék proteomikai vizsgálat által meghatározott expressziós különbségét a DOC-rezisztens és érzékeny sejtvonalpárok között (4.3.1. alfejezet). Ezt követően MTT-teszttel kivitelezett sejtvitalitási méréseinkkel az egyes sejtvonalak különböző DOC koncentrációk mellett mutatott életképességének mérésével (DOC dózis-hatás görbe) meghatároztuk azok IC50 értékét 24, 48 és 72 órás inkubációk mellett (4.3.2. alfejezet). A továbbiakban a célfehérjék kifejeződését siRNS transzfekció segítségével csendesítettük, amelynek sikerességéről Western blot módszerrel győződünk meg (4.3.1.1. alfejezet). A géncsökkentett sejtek életképességét MTT-teszttel (4.3.3. alfejezet) és apoptózisát áramlási citometria vizsgálatokkal (4.3.4. alfejezet) határoztuk meg, majd összevetettük azokat a kontroll sejtek esetén mért értékekkel.

4.3.1. A CD44, NAMPT és GAP43 gén- és fehérjeexpressziója a használt PC sejtvonalakban

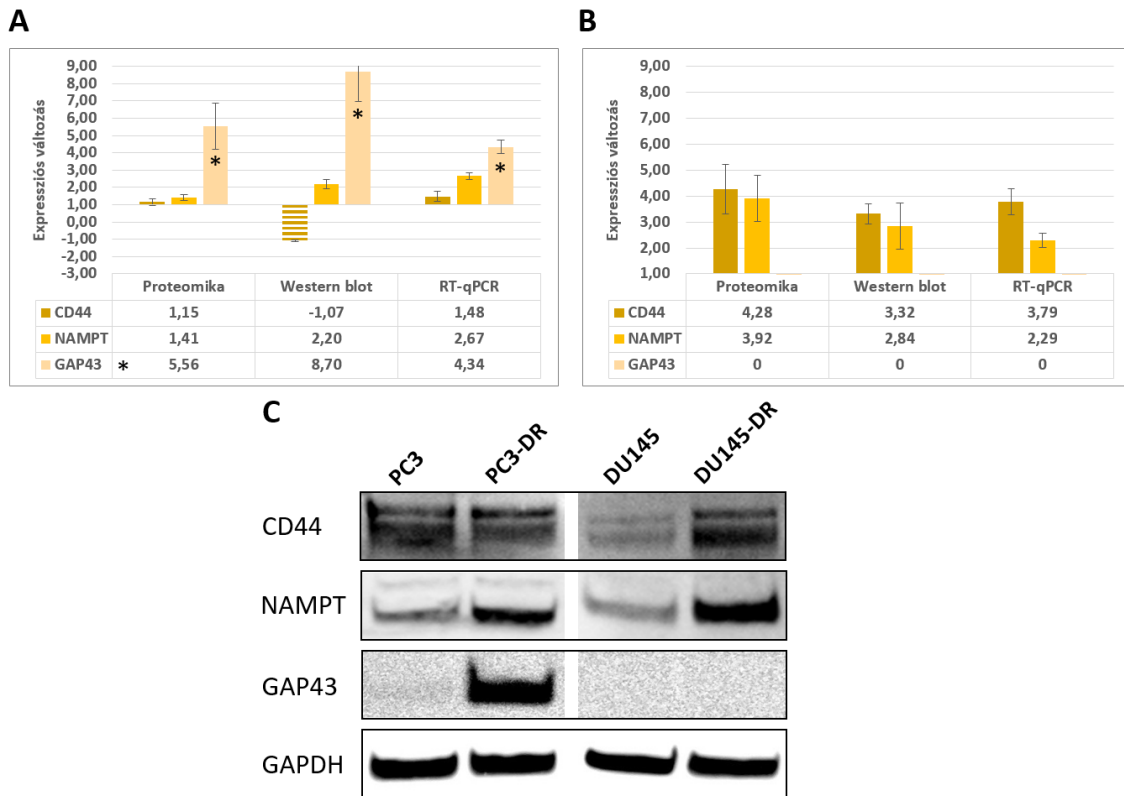
A két DOC-érzékeny és rezisztens sejtvonalpáron a CD44, NAMPT és GAP43 fehérjék gén- és fehérjeexpressziós méréseit qPCR és Western blot technikák segítségével végeztük el. A vizsgálat célja a tömegspektrometriai mérések által mutatott expressziós különbségek megerősítése volt fehérje és RNS szinten, ami egyben egy módszertani előkészületet is jelentett a későbbi géncsökkentések monitorozására.

A CD44 fehérje expressziója a DU145 sejtvonalpárok között mindhárom módszer szerint erőteljesebb volt, mint a PC3 sejtvonalak esetén. A DU145-DR sejtekben a CD44 fehérje szintje 3,3 – 4,3-szorosa volt a parentális sejtvonalpárban (DU145) mért értékeknek, míg a PC3-DR sejtvonalak között nem találtunk hasonló eltérést (-1,07 - +1,48-szoros változás) (13. ábra).

A NAMPT fehérje a két DOC-rezisztens sejtvonalban (DU145-DR, PC3-DR) hasonló mértékben mutatott magasabb fehérje expressziót, amely változást mindhárom módszer kimutatta. A DU145-DR sejtekben a fehérje 2,29 – 3,92-szeres mennyiségben, a PC3-DR sejtvonalban 1,41 – 2,67-szeres mennyiségben volt jelen a DOC-érzékeny sejtvonalpárjaikhoz képest (13. ábra).

A GAP43 fehérje kifejeződését kizárólag a PC3/PC3-DR sejtvonalpárban sikerült kimutatnunk. A proteomikai vizsgálat szerint 27,8-szorosára, a qPCR alapján 21,7-

szeresére, míg az ELISA analízis szerint 43,5-szörösére nőtt a fehérje expressziója a DOC-rezisztens sejtekben. Ennek megfelelően a GAP43 csendesítéssel párhuzamosan a PC3-DR sejtek életképességének és apoptózisának mérését is elvégeztük (13. ábra).



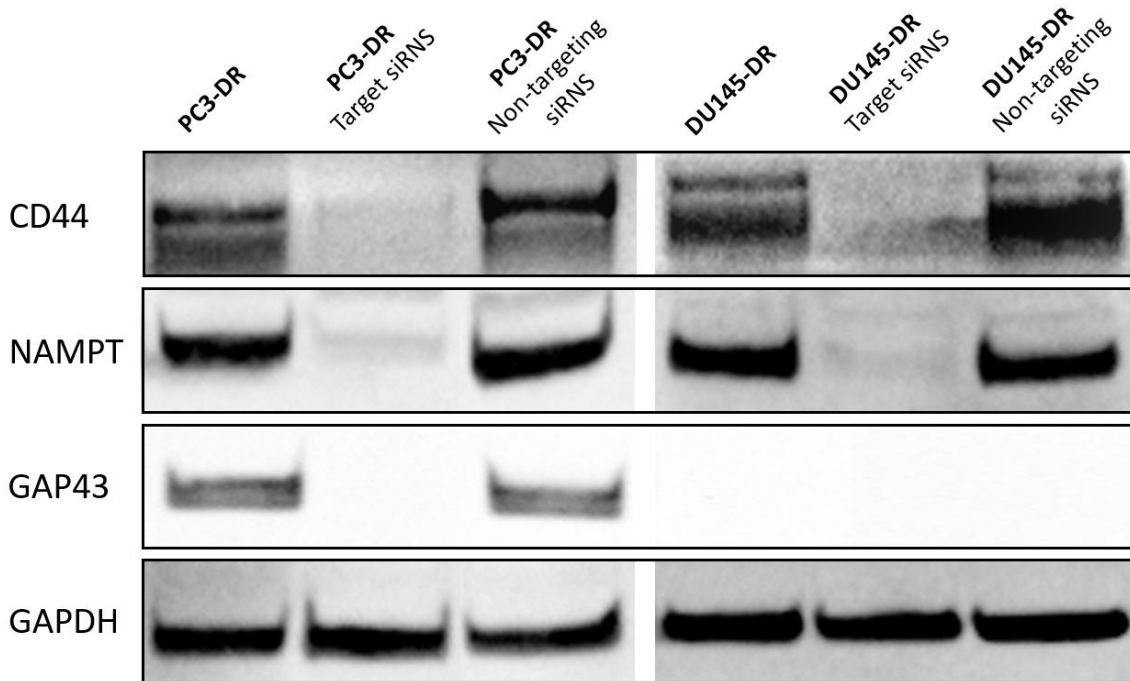
13. ábra – A CD44, NAMPT és GAP43 gén- és fehérjeexpressziójának validációs vizsgálatai a PC3-DR vs. PC3 (A), valamint DU145-DR vs. DU145 (B) sejtvonalpáron. *A GAP43 expressziós változásának értékeit 5-tel osztottuk a jobb ábrázolhatóság érdekében. A célfehérjék sejtvonalpárok közötti expressziós különbségeit továbbá a Western blot membránokról készült képek is szemléltetik (C).

Kísérleteinkkel sikerült a tömegspektrometriai proteomikai elemzés által mutatott értékekhez hasonló értékeket kapnunk RNS- és fehérjeszinten egyaránt. A későbbi, géncsendesítéssel járó kísérleteinket a továbbiakban Western blot módszerrel monitoroztuk.

4.3.1.1. Géncsendesítés monitorozása

Az siRNS-sel történő transzfekció géncsendesítő hatásának ellenőrzését minden kísérlet esetén elvégeztük Western blot módszerrel. A vizsgálatok rámutattak, hogy a géncsendesítés megfelelő módon működött minden fehérje célpont esetében, hiszen azok

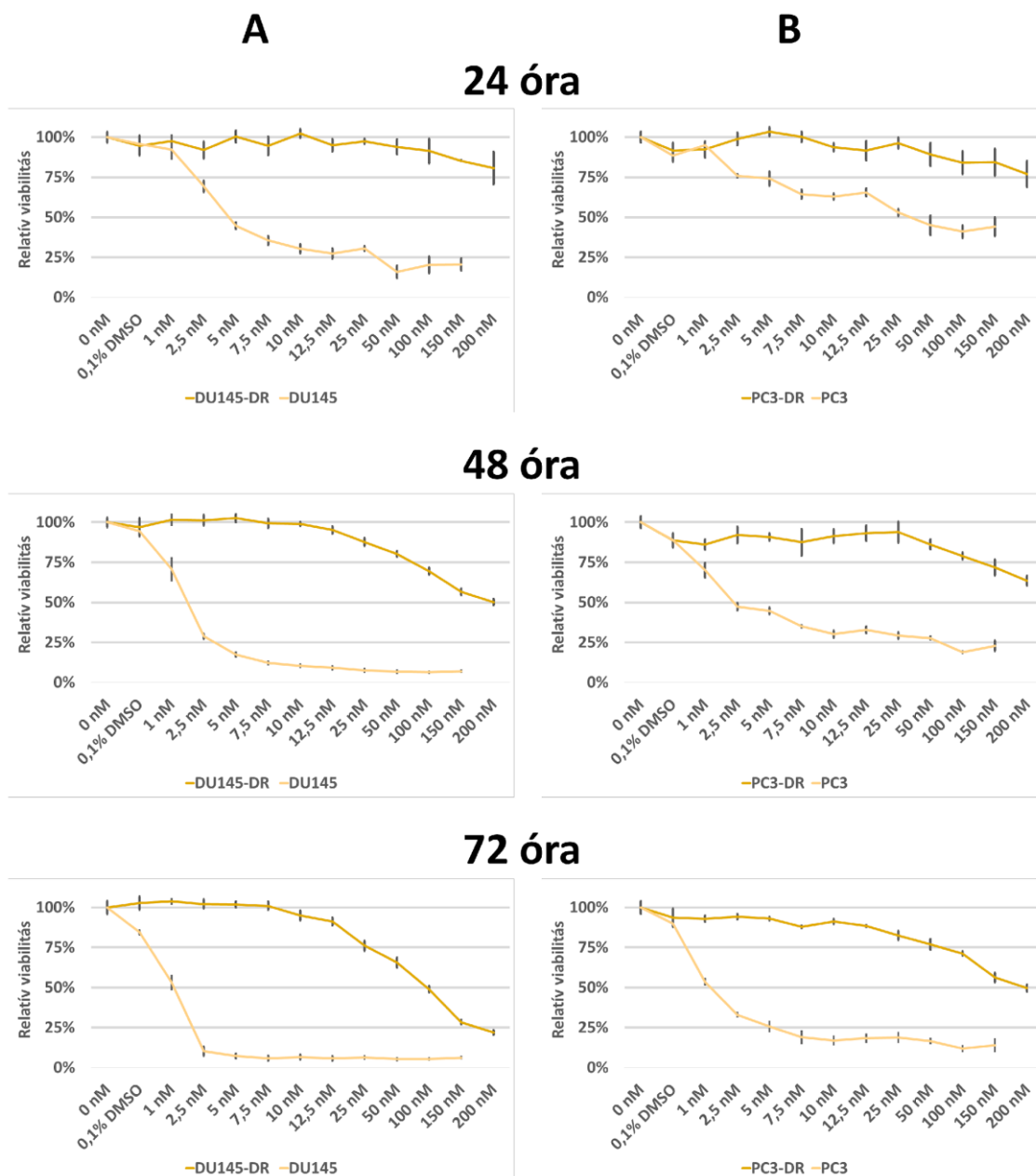
expresszióját jelentős mértékben letörte, miközben a nem-célzó (negatív kontroll) siRNS-sel való transzfektálás nem befolyásolta a célgének kifejeződését (14. ábra).



14. ábra - Az siRNS transzfekció CD44, NAMPT és GAP43 géncsökkentő hatékonyságának ellenőrzése Western blot technikával a PC3-DR és DU145-DR sejtekben.

4.3.2. Docetaxel dózis-hatás görbe

Az egyes sejtvonalak 24, 48 és 72 órás DOC dózis-hatás görbéjének meghatározásával kimutattuk a DOC-érzékeny és rezisztens sejtvonalpárok életképessége közötti szignifikáns különbséget, valamint meghatároztuk a három időpontban az egyes sejtvonalak DOC-ra vonatkoztatott IC50 értékét (15. ábra).



15. ábra – 24, 48 és 72 órás DOC-kezelés melletti dózis-hatás görbék meghatározása MTT-teszttel. A – DU145 és DU145-DR sejtvonalak, B – PC3 és PC3-DR sejtvonalak.

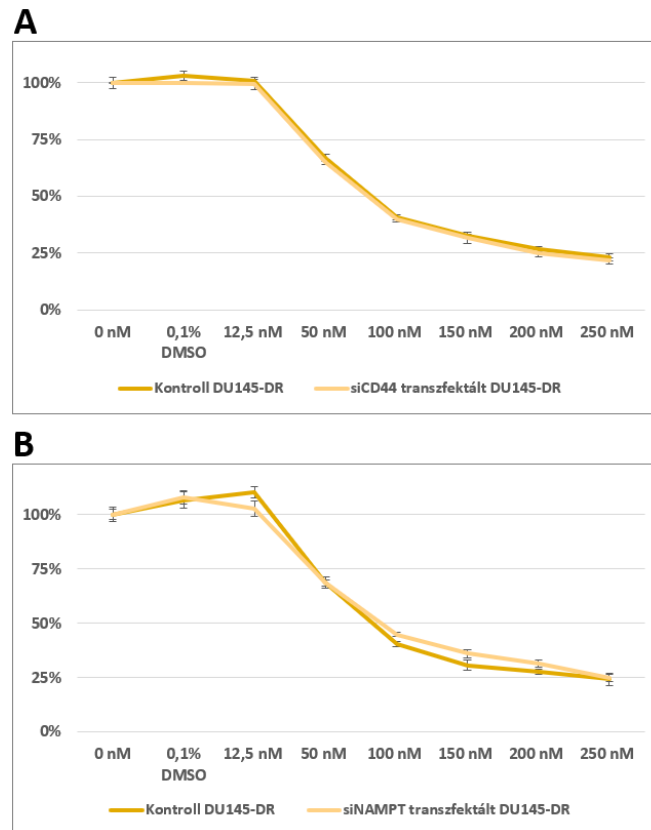
A sejt életképességi méréseink alapján elmondható, hogy a parentális PC3 és DU145 sejtvonal DOC-érzékenysége jelentősen nagyobb, mint a DOC-rezisztens párjuké. Továbbá, a görbék meredekségéből az is kiolvasható, hogy a legnagyobb életképesség különbséget a DOC-érzékeny és rezisztens sejtek között 72 órás DOC-kezelésnél érhetjük el. Így a további kísérleteinkben, mikor a géncsendesítésnek alávetett DR sejtek viabilitás és apoptózis változásait mértük, 72 órás DOC-kezelésnek vetettük alá őket.

A 72 órás DOC-kezelés mellett mért IC50 értékek következők voltak: PC3: 1,5nM, PC3-DR: 200nM; DU145: 1nM, DU145-DR: 100nM.

4.3.3. Sejtviabilitás-változás mérése géncsendesítés hatására

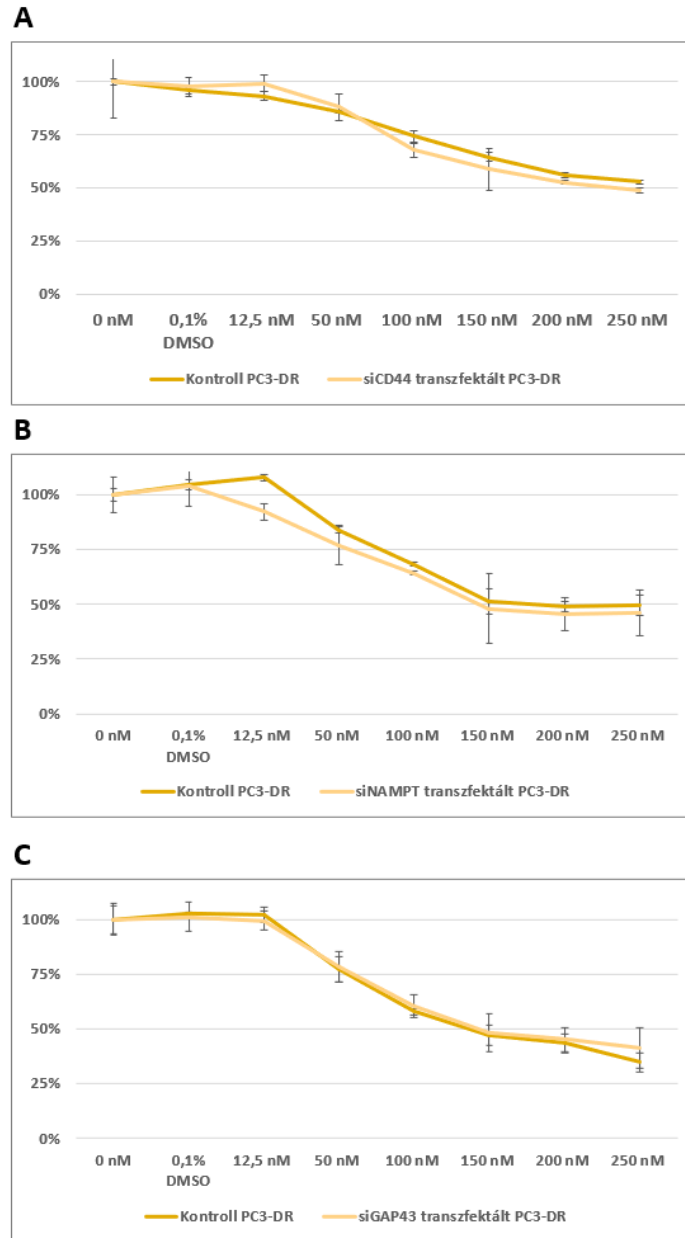
Funkcionális kísérleteink keretében megvizsgáltuk a DOC-rezisztens sejtek CD44, NAMPT és GAP43 fehérjék csendesítése mellett mutatott életképesség változásait. A kísérletek során ugyanazon DOC dózissal kezeltük 72 órán át a géncsendesítésnek alávetett DR sejteket, valamint a nem-célzó siRNS-sel transzfektált kontroll sejtpopulációt. A kiértékelés során összevetettük a sejtek életképességi görbéinek lefutását, valamint az azok által meghatározható IC50 értékek változását.

A DU145-DR sejtekben a CD44 és a NAMPT fehérjéket csendesítettük. A vizsgálatokat kiértékelve nem tapasztaltunk szignifikáns sejtviabilitás-változást a géncsendesített sejtekben a kontroll sejtekhez képest. A 16. ábrán látható, hogy a kezelt és kontroll sejtek DOC dózis hatás görbéi közel azonos értékeket vesznek fel, így megállapítottuk, hogy a két sejtpopuláció DOC-ra vonatkozó IC50 értéke nem változott a CD44 és NAMPT fehérjeexpresszójának gátlásával.



16. ábra – Sejtviabilitás mérés eredményei a CD44 (A), illetve NAMPT (B) csendesítésnek alávetett DU145-DR sejtekben 72 órás DOC-kezelést követően. Az célgénnek expressziójának letörése nem változtatta meg a sejtek DOC-rezisztenciáját.

A PC3-DR sejtekben a CD44, a NAMPT és a GAP43 fehérjék kifejeződését gátoltuk. Kísérleteink nem mutattak szignifikáns eltérést a géncsendesítésnek alávetett sejtek életképességében a kontroll sejtekhez képest, azaz az összehasonlított sejtek IC50 értékei nem tértek el szignifikánsan egymástól (17. ábra).



17. ábra – MTT-teszt által meghatározott sejtvitalitás mérés eredményei a CD44 (A), NAMPT (B), valamint GAP43 (C) csendesítésnek alávetett PC3-DR sejtekben, 72 óras DOC-kezelést követően. A sejtek DOC dózis-hatás görbéi nem váltak el egymástól, azok IC50 értéke nem változott szignifikánsan a géncsendesítés hatására.

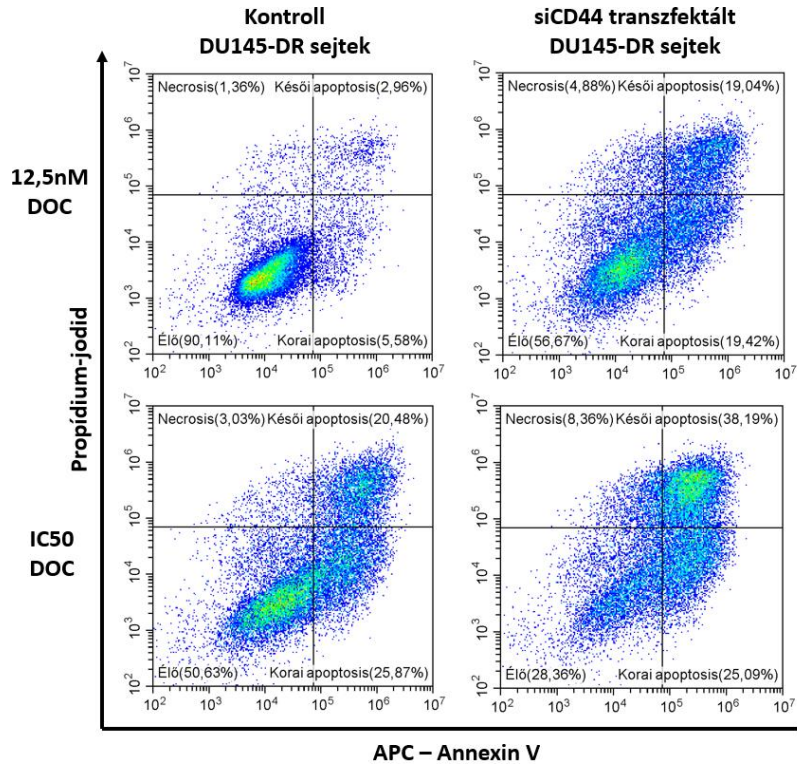
4.3.4. Apoptózis vizsgálat

Az áramlási citometriás méréseink során összevetettük a géncsendesített DR sejtek apoptózisának mértékét a nem-célzó negatív kontroll siRNS-sel transzfektált sejtekével 72 órás fenntartó (12,5nM) és IC50 dózisu DOC-kezelés mellett.

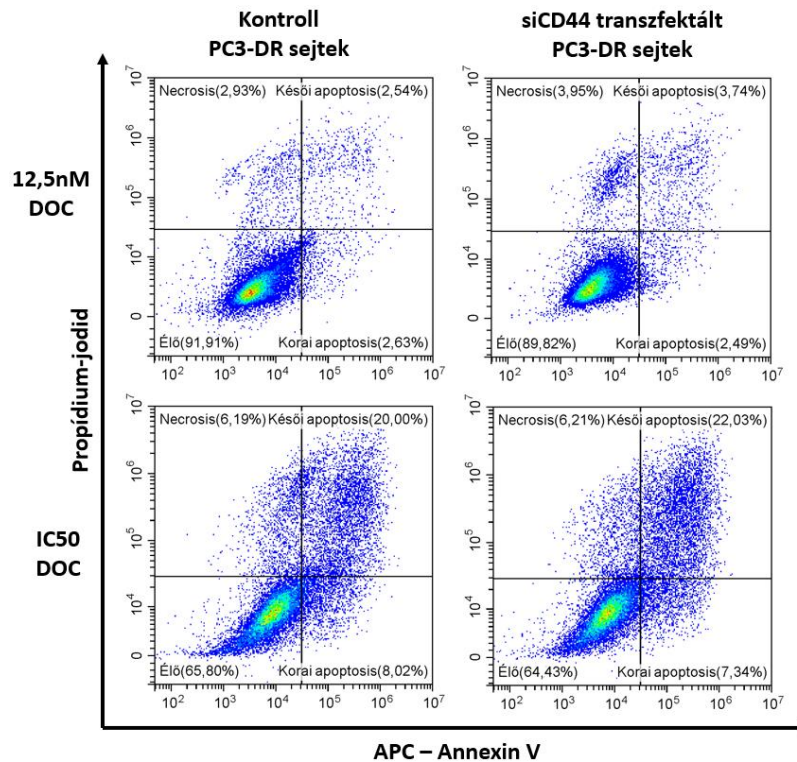
Azt tapasztaltuk, hogy fenntartó dózisu DOC-kezelés mellett a CD44 és NAMPT csendesített DU145-DR sejtekben az apoptotikus sejtek aránya szignifikáns mértékben megnőtt ($p < 0,001$) a kontroll sejtekhez képest. A sejteket 100nM (IC50) docetaxellel kezelve a CD44 expressziót nem mutató sejtekben az apoptotikus sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt a kontroll sejtekhez képest (18 és 20. ábra). A mérés továbbá megállapította, hogy a NAMPT expresszió gátlás az IC50 DOC dózis mellett nem növelte a sejtek apoptózisát (20. ábra).

A PC3-DR sejtvonalon elvégzett kísérleteink a NAMPT csendesítéssel kapcsolatban adtak hasonló eredményt, mint a DU145-DR sejtvonalnál, míg a CD44 kiütött PC3-DR sejtek apoptózisának mértéke változatlan maradt. A fenntartó DOC dózissal kezelt PC3-DR sejtpopulációban szignifikánsan ($p < 0,01$) megnőtt az apoptotizáló sejtek aránya a kontroll sejtekhez képest (19. és 20. ábra).

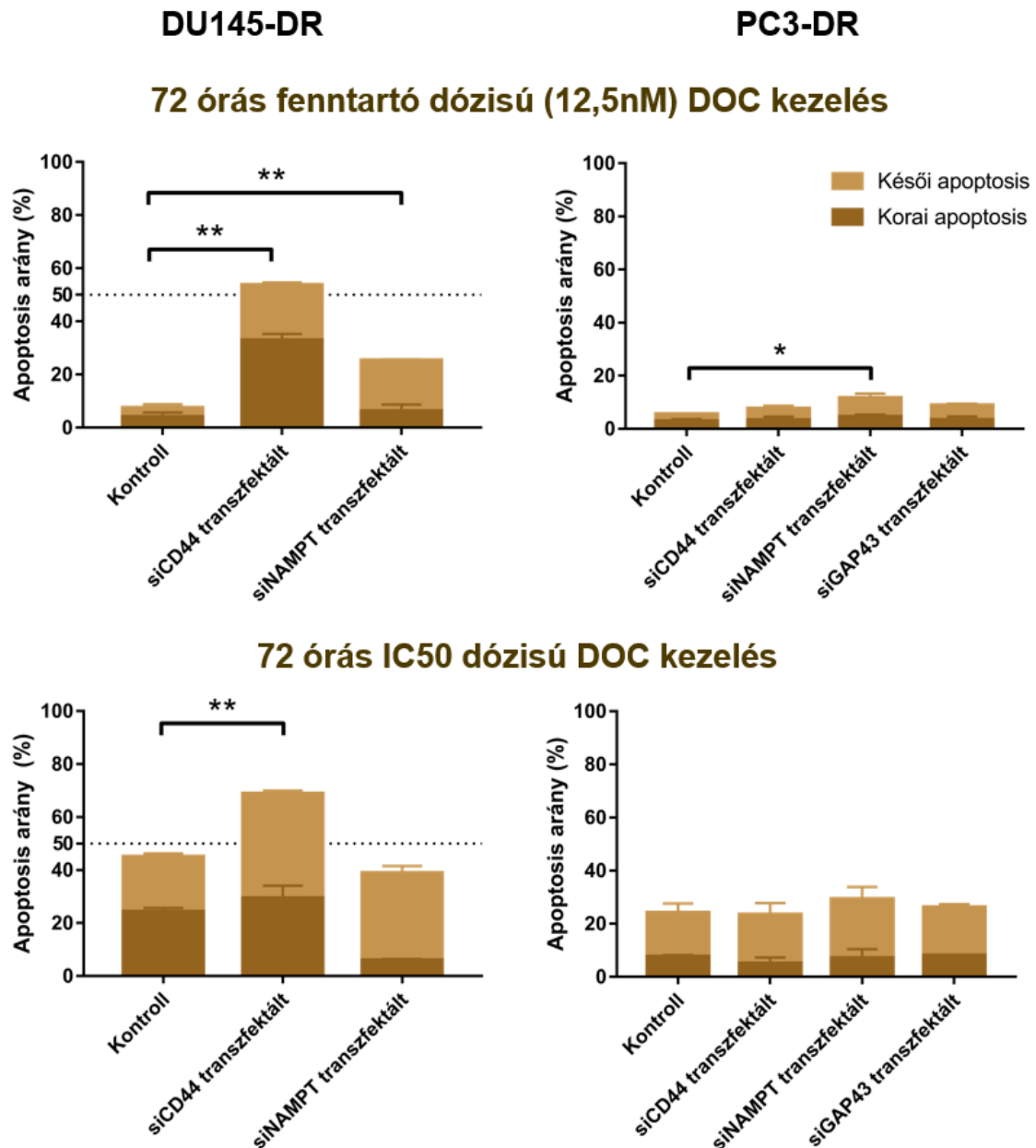
Az apoptózis vizsgálatunk szerint a GAP43 fehérje expressziójának letörése a PC3-DR sejtek DOC-érzékenységére nem volt hatással (20. ábra).



18. ábra – A DU145-DR sejtek apoptózis analízisének áramlási citometriás diagramjai.

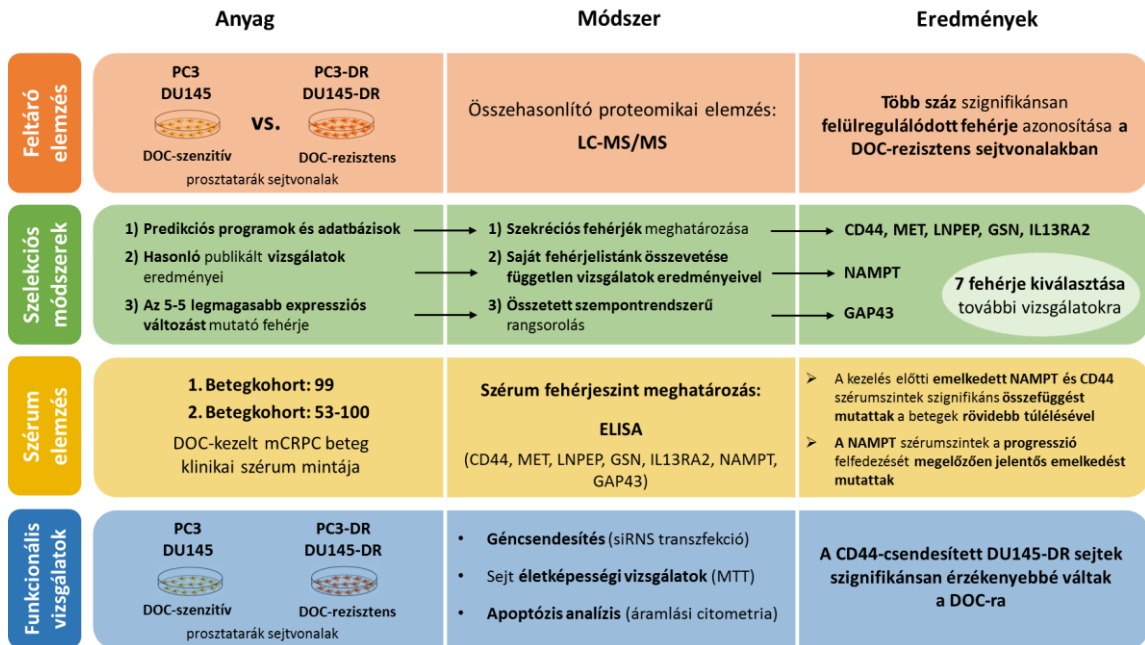


19. ábra – A PC3-DR sejtek apoptózis analízisének áramlási citometriás diagramjai.



20. ábra - Az áramlási citometriás méréssel kivitelezett apoptózis vizsgálat eredményei. A DU145-DR sejteken a CD44 géncsökkentés hatására a 72 órás fenntartó (12,5 nM), valamint IC50 dózisú DOC-kezelés hatására jelentősen megnövekedett apoptózist tapasztaltunk a kontroll sejtek által mutatott értékekhez képest. A NAMPT fehérje kifejeződésének gátlása a DU145-DR és PC3-DR sejtekben is szignifikánsan növelte a sejthalálózást, azonban csak a fenntartó dózisú DOC-kezelés mellett.

A PhD képzésem keretei között megvalósított kutatási projektünk felépítésének, annak során használt anyagok és alkalmazott módszerek, valamint elért eredményeink összefoglalása a 21. ábrán került megjelenítésre.



21. ábra – „Grafikus absztrakt”. Kutatómunkánk összefoglaló ábrája.

5. Megbeszélés

Jelen értekezés keretében bemutatott kutatómunkánk célja a prosztaták DOC kemoterápiával szembeni rezisztenciájában részt vevő fehérjék azonosítása volt annak érdekében, hogy e folyamat molekuláris és funkcionális hátterét jobban megismerjük, valamint prediktív szérumbiomarkereket, lehetséges új terápiás célpontokat azonosítsunk. Ennek érdekében DOC-érzékeny és -rezisztens PC sejtvonalpárok teljes fehérjékészletét hasonlítottuk össze tömegspektrometriai módszerrel. A vizsgálat által azonosított, több száz DOC-rezisztenciával összefüggő fehérje közül hipotézismentes bioinformatikai módszerekkel választottunk ki hetet (NAMPT, CD44, GAP43, MET, LNPEP, GSN, IL13RA2) szérumbizsgálatokra. Az ELISA alapú méréseinkkel ezen fehérjék koncentrációit határoztuk meg DOC-kezelt mCRPC betegek szérummintáiban, majd az eredményeket összevetettük a betegek klinikai és túlélési adataival. A klinikai mintákon végzett mérések alapján az emelkedett DOC-kezelés előtti NAMPT és CD44 szérumszintek szignifikáns és független összefüggést mutattak a betegek rövidebb túlélésével. A NAMPT és a CD44 továbbá a GAP43 fehérje DOC-rezisztenciában betöltött szerepének mélyebb megismerése céljából ezt a három fehérjét további *in vitro* funkcionális kísérleteknek vetettük alá. Az áramlási citometriával végzett apoptózis vizsgálattal kimutattuk, hogy a CD44 expresszió letörése re-szenzitizálta a DU145-DR sejteket a DOC-kezeléssel szemben, míg a sejtviabilitás vizsgálatok nem mutattak különbséget [77, 78].

A dolgozatban bemutatott vizsgálataink elvégzését megelőzően a DOC-rezisztencia mélyebb megismerése érdekében alapos szakirodalmi áttekintést végeztem. Ennek során összefoglaltam azokat az eddig ismertté vált mechanizmusokat, amelyek feltehetően részt vesznek a DOC-rezisztencia kialakulásában [79]. Ennek ellenére mindmáig nincsenek a klinikai gyakorlatba bevezetett prognosztikus és prediktív biomarkerek, amelyekre támaszkodva egy adott beteg számára az optimális terápiás szekvencia megalkotható lenne.

Az egyik alaposan kutatott DOC-rezisztencia mechanizmusért az ABCB1 fehérje tehető felelőssé. A széles szubsztrát specifitású transzmembrán fehérjéről több tumorféleséggel kapcsolatban is bebizonyosodott, hogy képes a tumorelles hatóanyagot kipumpálni a sejtől, ezáltal csökkenti annak intracelluláris koncentrációját, amely terápia rezisztenciához vezet. Zhu és munkatársai PC sejteken végzett vizsgálatai

kimutatták, hogy az ABCB1 gátlásával a korábban megszerzett DOC-rezisztencia jelentősen csökkenthető [57]. Egy később publikált tanulmányukban bemutatták, hogy a PC kezelésében használt másik két gyógyszer az ENZA és bicalutamid képesek a fehérje pumpa aktivitását gátolni. Megfigyelték, hogy a bicalutamid kezelés hatékonysága docetaxellel kombinálva jelentősen javítható. Ezek alapján vonták le azt a következtetést, hogy a bicalutamid hatóanyag képes lehet re-szenzitizálni a DOC-rezisztens PC sejteket [80]. Ezzel összhangban proteomikai vizsgálatunk azon kevés fehérje között azonosította az ABCB1-et, amelynek expressziója mindkét DOC-rezisztens sejtvonalban szignifikánsan emelkedett. Mivel az ABCB1 a PC DOC-rezisztenciájára vonatkozóan gazdag szakirodalommal bír, így nem végeztünk további vizsgálatokat ezzel a fehérjével kapcsolatban. A mindkét DOC rezisztens sejtvonalban talált jelentős ABCB1 fehérje expresszió igazolta ezen mechanizmus jelenlétét sejtjeinkben és ezzel megerősítette *in vitro* modellünk hitelességét is.

Az ABCB1 fehérjén túl a Hsp27 és SYPL1 voltak azok a fehérjék, melyek expressziós szintje mindkét rezisztens PC sejtvonalban szignifikánsan és legalább kétszeresen megemelkedett a tömegspektrometriai vizsgálatunk szerint. A *HSPB1* egy intracelluláris chaperon fehérjét (Hsp27) kódoló gén, amely többek között a sejt stresszre adott válaszában játszik kiemelt szerepet. Számos HSP családhoz tartozó fehérjével kapcsolatban bebizonyosodott, hogy felülregulációjuk nyomán képesek különböző tumortípusokban az apoptózis elkerüléséhez hozzájárulni. Tumorszöveten elvégzett immunhisztokémiai vizsgálatok alapján elmondható, hogy a Hsp27 expressziója a PC kasztráció-rezisztens stádiumában a legmagasabb, amely a fehérjének a daganat hormon független állapotának kialakításában betöltött szerepére utal [81]. Ennek oka, hogy a Hsp27 az androgén receptorral komplexet alkotva képes az AR célgénnek átírásának szabályozására. Foster és munkatársai kimutatták, hogy a PC diagnózisának idejében emelkedett Hsp27 képes előrejelezni a daganat kedvezőtlen prognózisát [82]. Habár a HSP fehérjéről, mint terápiás célpontról több ígéretes kutatási eredmény született, ez idáig HSP-gátlószert nem törzskönyveztek prosztatákban [83]. A SYPL1 fehérje daganatokkal kapcsolatos szerepe lényegesen kevésbé kutatott terület. Chen és munkatársainak közleménye szerint a fehérje megnövekedett expressziója összefügghet a hepatocelluláris *carcinoma* (HCC) *epithelialis-mesenchymalis* átalakulásával. A tumorszöveteken végzett további kísérleteik rávilágítottak arra, hogy a SYPL1 fehérje

emelkedett szintje a HCC betegek kedvezőtlenebb túlélésének független rizikófaktora [84]. Liu és munkatársai egészséges alanyok, adenomás, valamint colorectalis *carcinomában* szenvedő betegek szérummintáin végezték el a SYPL1 fehérje vizsgálatát. Eredményeik szerint a fehérje emelkedett szérumszintje összefüggésben állt a betegek nyirokcsomó érintettségével [85]. Mivel a kandidáns fehérjék kiválasztására alkalmazott szelektív módszereink nem azonosították sem a Hsp27, sem pedig a SYPL1 fehérjét, így ezeket jelen tanulmányunkba nem vontuk be, azonban későbbi vizsgálatukat indokoltnak tartjuk.

A PC3-DR sejtekben a DOC-érzékeny sejtekhez képest 4,2-szeres emelkedést mutatott a MET (más néven HGFR) szintje, amely szekréciós fehérjét szintén megvizsgáltunk kísérletes keretek között. A MET egy alaposan kutatott proto-onkogén, amely sejtfelszíni receptorként képes számos, tumorképződéssel kapcsolatos jelátviteli utat (pl. STAT, PI3K, RAS) aktiválni. Számos tumortípusban terápiás célpontként használják, valamint kísérletek mutattak rá a fehérje gyógyszer rezisztenciában betöltött szerepére is [86]. ELISA kísérleteink alapján a MET fehérje szérumszintje nem mutatott korrelációt a DOC-kezelt mCRPC betegek klinikai adataival, ahogy a túlélésükre vonatkozóan sem találtunk összefüggést.

Proteomikai vizsgálatainkban a legkiugróbb, 27,8-szoros emelkedést a GAP43 fehérje mutatta, melyet a PC3-DR sejtekben tapasztaltunk, amely kandidáns fehérjét a 3.2.2.3. alfejezetben leírtak alapján választottunk ki további vizsgálatokra. A GAP43 (*neuromodulin*) egy, az idegsejtek növekedésében fontos szerepet betöltő fehérje. Agydaganat sejtvonalakban megfigyelték fokozott expresszióját, ahogy glioblasztomákkal kapcsolatosan is leírták a tumorképzéssel összefüggő szerepét [87]. Zhang és munkatársai arra a megállapításra jutottak, hogy GAP43 biomarkerként alkalmazható lehet a nem kissejtes tüdődaganatok agyi áttétképzésének előrejelzésében [88]. PC-vel kapcsolatos szerepére vonatkozóan nem állnak rendelkezésre adatok. Ezen fehérjét szérumvizsgálataink, valamint *in vitro* funkcionális kísérleteink során is megvizsgáltuk, azonban eredményeink nem erősítették meg a fehérje DOC-rezisztenciában betöltött szerepét.

A szakirodalmi áttekintés keretében olyan közleményeket is feldolgoztunk, amelyek az általunk elvégzettekhez hasonló felépítésű kutatást mutat be a PC kemoterápia-rezisztenciájának témájában, amely összehasonlító elemzés segítségünkre volt a

kísérletekre való kiválasztásban is (3.2.2.2. alfejezet). Három cikket találtunk, amelyek ugyancsak DOC-érzékeny és rezisztens PC sejtvonalpárok omikai összehasonlítását mutatja be.

Az első cikkben O'Connell és munkatársai kvantitatív tömegspektrometriai technikával határozták meg a megváltozott expressziójú fehérjéket három DOC-érzékeny és rezisztens PC sejtvonalpárban (PC3, DU145, 22RV1). Vizsgálataik alapján 29 olyan fehérjét azonosítottak, amelyek legalább két DOC-rezisztens sejtvonalban regulálódtak felül. A továbbiakban ezen fehérjéket *in silico* jelátviteli elemzésnek vetették alá. Főbb eredményeik szerint több hősokk fehérjét (Hsp70, Hsp90A), valamint EMT-vel kapcsolatos proteint azonosítottak több rezisztens sejtvonalban is. Értelmezésük szerint a hősokk fehérjék nagyban hozzájárulnak a sejtek többek között kemoterápiás kezelés által is kiváltott stresszválaszához. Az EMT jelensége gyakran figyelhető meg a tumorsejtek progressziója során, hozzájárul azok áttétképző képességéhez, emellett számos kemoterápiás szer elleni rezisztencia hátterében is azonosították jelentőségét. A munkacsoport által vizsgált PC3 D12 sejtek rezisztencia hatására bekövetkező morfológiai változásai is alátámasztják eredményeiket [74]. Továbbá, az általunk vizsgált PC3-DR és DU145-DR sejtek DOC-rezisztenciájával kapcsolatban Pühr és munkatársai ugyancsak rámutattak az EMT jelenlétére és jelentőségére [53].

A második cikkben Zhao és munkacsoportja PC3 és annak DOC-rezisztens sejtpárjának (PC3-Rx) fehérjekészletét hasonlította össze tömegspektrometria alapú vizsgálattal. Elemzésük 50 felülregulálódó és 35 alulregulációt mutató fehérjét azonosított, amelyek közül a legnagyobb változást mutató fehérjéket vizsgálták alaposabban. ELISA szérumbizsgálataik, valamint sejtkultúrák kísérleteik által az AGR2 és a MIC-1 fehérjéket azonosították, mint lehetséges biomarkereket és gyógyszercélpontokat a PC DOC-rezisztenciájában [75].

A harmadik cikkben Marín-Aguilera és munkatársai ugyancsak DOC-érzékeny és rezisztens PC3 és DU145 sejtvonalpárokat hasonlítottak össze, azonban az előző két vizsgálattól eltérően transzkriptomikai (mRNS) szinten. Az RNS-szintű vizsgálat jelentősen több (243) génnel kapcsolatban mutatta ki mindkét rezisztens sejtvonalban a megnövekedett expressziós szintet. Ezen géneket egy átfogó *in silico* analízisnek (*ingenuity pathway analysis*) vetették alá, hogy kiderítsék, a rezisztencia kialakulása mely főbb jelátviteli utak és egyéb szabályozási mechanizmusok változásaival mutatott

összefüggést. Az így kiválasztott 18 gén expresszióját 8 DOC-érzékeny és ugyanennyi DOC-rezisztens mCRPC beteg tumorszövet mintáján határozták meg qPCR módszerrel. Kísérleteik nyomán több gén (pl. *AREG*, *EPCAM*, *CDHI*, *DLC1*) csökkent expresszióját is képesek voltak kimutatni a DOC-rezisztens mintákban [76].

Kutatásunk során az alaposabb vizsgálatnak alávetett fehérjék kiválasztásának egyik szempontjaként a saját proteomikai adatsorunkat hasonlítottuk össze a fent részletezett három vizsgálat eredményével. A DOC-érzékeny és -rezisztens PC3 sejtvonalpárok között mind a saját mérésünk, mind a független vizsgálatok által kevesebb megváltozott expressziójú fehérje került azonosításra, mint a DU145 vs. DU145-DR összehasonlításból eredően. Az összevetésből kiderült továbbá, hogy a hasonló, tömegspektrometria alapú mérések között nagyobb számban találtunk közös találatokat, mint a proteomikai és a transzkriptomikai adatok között. A szűrési módszerrel 5, illetve 4 olyan fehérjét találtunk, amelyeknek mindhárom, független proteomikai analízis szerint is megnőtt, illetve csökkent az expressziója DOC-rezisztencia hatására. Az ilyen módon azonosított, konzisztens felülregulációt mutató találatok közül a NAMPT fehérjével végeztünk további kísérleteket.

A proteomikai elemzésünk nyújtotta fehérjelistából a potenciálisan biomarkerként alkalmazható célpontok kiválasztásához egy további módszert is alkalmaztunk. Ennek során a bioinformatikai analízissel a potenciálisan szekretálódó és ezért a vérben nagyobb valószínűséggel kimutatható fehérjék azonosítását végeztük el (3.2.2.1. alfejezet). Ezen módszer találatai közül a következő fehérjéket választottuk ki: CD44, MET, LNPEP, GSN, IL13RA2. Az előzőleg részletezett GAP43 és NAMPT mellett tehát ennek a további öt fehérjének határoztuk meg ELISA technikával a szérumkoncentrációit DOC-kezelt mCRPC betegek mintáiban, majd statisztikai összefüggéseket kerestünk a szérumkoncentrációk és a betegadatok között.

A klinikai mintákon végzett retrospektív vizsgálatok kiértékelése során a NAMPT és a CD44 fehérjékről bizonyosodott be, hogy a DOC-kezelést megelőzően megemelkedett szérumszintjük a kedvezőtlenebb túléléssel mutat szignifikáns összefüggést. Ezen korrelációk a multivariancia analízis során is szignifikánsak maradtak, amely azt jelzi, hogy az alapvonalis NAMPT és CD44 szérumszint a többi túléléssel összefüggést mutató változótól függetlenül is képesek előrejelezni a DOC-kezelt mCRPC betegek rövidebb túlélését [77, 78]. A NAMPT fehérje esetében továbbá megállapítottuk, hogy annak

szérumkoncentrációja már a tumor progressziójának kimutatását megelőzően, majd a progresszió során további jelentős emelkedést mutatott [78].

Az ELISA vizsgálatok alapján ígéretes eredményeket adó NAMPT és CD44 fehérjéket további, *in vitro* funkcionális kísérleteknek vetettük alá annak érdekében, hogy a DOC-rezisztenciában betöltött szerepükről részletesebb képet kapjunk. Sejtkultúrák kísérleteink során az azonosított fehérjék funkcionális vizsgálatával visszatértünk azon két DOC-érzékeny és -rezisztens sejtvonalpárhoz, amelyek proteomikai összehasonlítása alapozta meg kutatásunkat. Ezekben a DOC-rezisztens sejtvonalakban a NAMPT és CD44 fehérjék kifejeződését siRNS transzfekció útján csendesítettük, majd ezzel egyidőben figyeltük a sejtek életképességének, valamint apoptózisának változásait a negatív kontroll siRNS-sel transzfektált sejtekhez képest. Az MTT-teszttel kivitelezett méréseink nem mutattak változást a géncsökkentett sejtek DOC-ra vonatkozó IC50 értékei között. A továbbiakban így egy érzékenyebb módszerrel, áramlási citometriával, igyekeztünk a célfehérjék expressziós gátlásának apoptózisra gyakorolt hatását tetten érni. Méréseinket a minták APC-Annexin V-tel és propidium-jodiddal való kettős festésével készítettük elő, így képesek voltunk elkülöníteni a sejtpopuláció élő, korai, illetve késői apoptózisban lévő, valamint nekrozist elszenvedett tagjait. Az apoptózis analízis által képesek voltunk a géncsökkentés hatására jelentős változásokat detektálni, a sejtleletképességi vizsgálatok eredményeivel ellentmondó módon. A NAMPT fehérje szintjének letörésének hatására mindkét DOC-rezisztens sejtvonalban szignifikánsan megnőtt az apoptotizáló sejtek aránya a fenntartó dózisú DOC-kezelés mellett. Érdekes módon az IC50 DOC-dózissal kezelt, NAMPT csendesített rezisztens sejtek sejthalálzásában azonban szignifikáns változást nem tapasztaltunk. A CD44 géncsökkentés a DU145-DR sejtek apoptózisában okozott jelentős változást. Mind a 12,5 nM (fenntartó), mind az IC50 DOC dózisban kezelt sejtek szignifikánsan nagyobb mértékben apoptotizáltak, a kontroll sejtvonalhoz viszonyítva. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a CD44 és NAMPT fehérjék hozzájárulnak a PC DOC-rezisztenciájának kialakulásához [77, 78].

A NAMPT (nikotinamid-foszforiboziltranszferáz, más néven *visfatin* vagy PBEF) fehérje képes enzimként, növekedési faktorként, valamint adipocitokinként is viselkedni. Lokalizációját tekintve intracelluláris (iNAMPT), valamint extracelluláris, keringő (eNAMPT) formája is ismeretes [89-92]. Az iNAMPT a nikotinamid-adenin-dinukleotid

(NAD) bioszintézis fontos enzime, amely a mentő útvonalon (*salvage pathway*) keresztül valósítja meg a bioenergetikai szempontból fontos NAD előállítását. A NAD, valamint annak foszforilált formája (NADP) a sejten belüli energetikai folyamatok nélkülözhetetlen elektronszállító koenzimje [89, 93, 94]. Az eNAMPT extracelluláris térben történő NAD bioszintézisben való enzimatis aktivitása még nem bizonyított, azonban citokinszerű aktivitása, valamint növekedési faktorként való viselkedése ismert. A fehérje extracelluláris változatával kapcsolatban kimutatták annak sejtproliferációs és anti-apoptotikus tulajdonságait és összefüggést találtak az eNAMPT felülregulációja és egyes daganatok jelenléte között [89, 95, 96]. A NAMPT-ről lokalizációjától függetlenül számos daganattípust érintően - számos elhízással kapcsolatos tumort beleértve - bebizonyosodott, hogy a tumor progressziójára hatással van, így a fehérje rosszindulatú megbetegedésekkel kapcsolatos szakirodalma gazdag [89, 95, 97]. Az intracelluláris NAMPT által ellátott sejten belüli feladatok kiemelt jelentőségűek az olyan NAD-fogyasztó enzimek számára, mint a BRCA1 vagy a PARP DNS-javító fehérjék, így a NAD bioszintézis révén a NAMPT hozzásegíti a daganatsejteket a megfelelő genomi integritás fenntartásához [98, 99]. További kutatások leírták, hogy az eNAMPT képes pro-inflammatórikus jelpályákat aktiválni, többek között az NF- κ B fehérjén keresztül, amely transzkripciós faktor felülregulációja jól ismert mechanizmus számos tumortípusban [89, 100, 101]. Több, krónikus gyulladással járó kórképpel, így az elhízással kapcsolatban is megfigyelték az eNAMPT szérumszintjének növekedését [102]. Kísérleti eredmények alapján képes az IL-6 termelődést serkenteni, amely molekula az elhízással kapcsolatos inzulin rezisztencia egyik fontos résztvevője [101]. Patel és kutatócsoportja PC sejtvonalak és klinikai szövetminták iNAMPT expresszióját vizsgálta. Kísérleteik szerint a NAMPT növelte a sejtek proliferációját a MAPK aktiválás nyomán, valamint a fehérje hozzájárult a MMP-2 és 9 fehérjék aktivitásának növeléséhez, amely a tumor áttétképző hajlamának növekedését eredményezte [103]. Wang és munkacsoportja az iNAMPT fontos szerepét bizonyította be a PC oxidatív stressz elleni rezisztenciájában [104]. Gooma és munkatársai több lényeges összefüggésre is rámutattak az eNAMPT és a PC evolúciója között. Egyrészt kimutatták, hogy a PC betegek szérum NAMPT-szintje szignifikánsan magasabb az egészséges kontroll, valamint a BPH (jóindulatú prosztata megnagyobbodás) betegeké, másrészt az emelkedett NAMPT koncentrációk a magasabb Gleason-pontszámmal, így a

kedvezőtlenebb prognózissal is összefüggést mutattak [89, 105]. A NAMPT fehérje általunk elsőként feltárt terápia prediktív értéke, valamint a DOC-rezisztenciában való lehetséges szerepe az eddigi kutatási eredményekkel összhangban van, illetve azokat kiegészíti [78].

A CD44 egy multifunkcionális transzmembrán glikoprotein, amely képes számos sejt-sejt, valamint sejt-mátrix kapcsolat létrehozására. Fiziológias körülmények között rengeteg folyamatban részt vesz, hiszen képes növekedési faktorok és citokinek által hordozott jeleket a sejt felé közvetíteni, ezáltal a sejt osztódását, differenciációját, túlélését, valamint a környező mátrix struktúrákkal való kapcsolódását befolyásolni [106, 107]. Azonban a fehérje különböző, alternatív *splicing* útján létrejövő izoformáinak megjelenése, illetve megváltozott expressziója is több daganattípussal kapcsolatosan összefüggésbe került [108-111]. Ma már a CD44-et mint tumor őssejt markert tartjuk számon [112, 113]. Mivel a tumor őssejtek jellemzően kvieszcens, azaz nem osztódó állapotban vannak, így a kemoterápiákkal szemben is nagyobb ellenállást mutatnak. Az ilyen állapotú sejteknek sejtciklusuk átmeneti leállításához fontos a mikrokörnyezetükkel való kommunikáció, amelyben a CD44 fehérje lényeges szerepet játszik azáltal, hogy az őssejtszerű tulajdonságok kialakításában részt vesz. A tumor őssejtekre jellemző a nagyfokú rugalmasság, amely ezen kontextusban azt jelenti, hogy képesek a környezeti behatások kedvezőbbre fordulásával gyors osztódásnak indulni, így felelősek lehetnek a tumor lokális progressziójáért, illetve az áttétképződéséért is [112-114]. A CD44 biomarkerként vagy terápiás célpontként való alkalmazása számos tudományos közlemény eredménye alapján megalapozottnak tűnik [111]. Lai és munkatársai azt megállapították, hogy a DOC-rezisztens sejtpopulációkban lényegesen nagyobb a CD44 tumor őssejt markert kifejező sejtek aránya. A fehérje gátlása nyomán továbbá azt tapasztalták, hogy a rezisztens sejtek migrációs és invazív tulajdonságai mérséklődtek, amely a CD44 ezen folyamatokban betöltött szerepére utal [115]. Roy és munkacsoportja a CD44 kemoterápia-rezisztenciában betöltött funkciójára hívta fel a figyelmet. Ciszplatin-rezisztens fej-nyaki daganat sejtvonalon vizsgálódva megállapították, hogy a CD44-gátlással a sejtek ciszplatinnal szembeni re-szenzitizációja figyelhető meg [116]. Cao és munkatársai nagyszámú betegmintán végzett vizsgálatainak köszönhetően bebizonyosodott, hogy a CD44-pozitív gyomorrákos betegek túlélése szignifikánsan rövidebb, mint a CD44-negatív csoportba tartozó pácienseké [117]. Egy további, több

ezer beteg klinikopatológiai adatait összesítő közlemény hasonló eredményekre jutott. A szerzőknek szignifikáns összefüggést sikerült kimutatniuk a gyomor daganatok magasabb CD44 expressziója és a TNM-szerinti előrehaladottabb stádiuma között, ahogy a betegek kedvezőtlenebb teljes túlélésével is [118]. A CD44 különböző *splice* variánsai közül többel kapcsolatban is bebizonyosodott, hogy prognosztikus értékkel bír különböző tumortípusokban. Példaként említhető a CD44v6 izoforma, amely a PC-n túl többek között kissejtes tüdőrákban és hasnyálmirigyrákban is összefüggést mutatott a kedvezőtlenebb prognózissal [110, 111, 119, 120]. A tény, miszerint a CD44 hozzájárul a tumorok őssejt fenotípusának kialakításához, valamint számos daganattípussal összefüggésben azonosított szerepe miatt a fehérjére potenciális gyógyszer-célpontként tekinthetünk. Ezen megállapítást saját eredményeink is megerősítik, amellyel a fehérje a PC DOC-terápiával kapcsolatos prediktív értékét, valamint a DOC-rezisztenciában betöltött valószínűsíthető funkcionális szerepét állapítottuk meg [77].

Kutatócsoportunk eltérő kutatási tervvel, de a jelen dolgozathoz kapcsolódó hasonló célú projektjei keretében további potenciális szérumbiomarkerrel kapcsolatban mutatott ki összefüggést a DOC-ra adott csökkent terápiás válasszal és a rövidebb túléléssel mCRPC betegek esetében. A mátrix metalloproteináz-7 (MMP-7) fehérjével kapcsolatban kimutattuk, hogy annak DOC-kezelés megkezdése előtt emelkedett szérumszintje szignifikáns összefüggést mutat a DOC-rezisztenciával, valamint a rövidebb betegségfüggő túléléssel [121]. Az MMP-7 fehérje részt vesz többek között a SDC1 (*syndecan-1*) transzmembrán proteoglikán sejtfelszínről való lehasításában, ezáltal annak szérumszintje megnőhet. Sikerült összefüggést találnunk a magas alapvonalis SDC1 szérumszint és a betegségfüggő túlélés között, amelyen túl kimutattuk a fehérje jelentős szérumszintbeli emelkedését a tumor progressziójával összefüggésben [122]. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy az mCRPC betegek kezelésének megkezdését megelőzően az említett fehérjék szérumkoncentrációinak meghatározása segíthet a megfelelő terápiás szer kiválasztásában.

A doktori képzésem során elért kutatási eredmények megerősítik azt az elképzelést, miszerint a daganatok terápia-rezisztenciája egy összetett, számos sejtszintű folyamat eredőjeként létrejövő jelenség. A szakirodalmi áttekintésből kiderült, hogy ugyan napjainkban már több molekuláris folyamat ismert, amely a PC kemoterápia rezisztenciáját okozhatja, azonban ez idáig áttörést nem sikerült elérni annak elkerülése

érdekében. Ahogy az egyes PC betegek között, úgy egy daganaton, vagy akár egyetlen tumorsejten belül is több fajta rezisztencia mechanizmus is megjelenhet, amelyek egymástól függetlenül, esetleg szinergisztikus módon képesek a daganat túlélését szolgálni. A kutatásunkat megalapozó proteomikai vizsgálat célja szerint további rezisztencia géneket igyekeztünk azonosítani, amelyek a PC terápia predikcióját megkönnyíthetik, illetve új gyógyszercélpontként támadhatók. A rezisztencia mechanizmusok sokrétűségét támasztja alá azon eredményünk is, miszerint mindkét vizsgált DOC-rezisztens sejtvonalban mindössze három közösen felülregulálódott fehérjét azonosítottunk, amely mellett több száz csupán az egyikükben mutatott expressziós változást a rezisztencia kialakulása során. Ez a jelenség egyben megmagyarázza azt is, hogy a funkcionális kísérleteink során a CD44 géncsökkentés miként okozhatott jelentős apoptotikus hatást a DU145-DR sejtekben, míg a PC3-DR sejtvonal DOC-inszenzivitását nem befolyásolta. Ugyan további vizsgálatok szükségeltetnek a NAMPT és CD44 molekulák terápia prediktív értékének, valamint rezisztenciát befolyásoló funkcionális szerepének pontosabb megértéséhez, azonban az eredményeink alapján ígéretes biomarkerként, illetve gyógyszercélpontként tekinthetünk rájuk a PC DOC-rezisztenciájában [77, 78, 121, 122].

6. Következtetések

A két DOC-érzékeny és -rezisztens prosztatarák sejtvonalpáron elvégzett tömegspektrometria alapú proteomikai vizsgálattal több száz olyan fehérjét sikerült azonosítanunk, amelyek potenciálisan részt vesznek a DOC-rezisztencia kialakításában. A hipotézismentes, objektív megközelítésű bioinformatikai módszereinkkel 7 fehérjét (NAMPT, CD44, GAP43, MET, LNPEP, IL13RA2, GSN) választottunk ki a proteomikai vizsgálat nyújtotta fehérje adatsorból szérumban vizsgálatokra. A kutatásunk megalapozásában nagy szerepe volt több kollaborációs együttműködésünknek is, melyekben hozzájárultak munkánk színvonalának emeléséhez.

Az ELISA technikával végzett vizsgálatainkkal 5 fehérjét voltunk képesek kimutatni a DOC-kezelésnek alávetett PC betegek szérumban, amelyek közül 2 fehérje (NAMPT, CD44) kezelés előtti szérumszintjei mutattak szignifikáns összefüggést a betegek rövidebb túlélésével. Továbbá a kezelés alatt gyűjtött minták NAMPT koncentrációjának meghatározásával kimutattuk, hogy e fehérje szérumszintje már a progresszió felfedezését megelőzően is emelkedést mutatott és tovább emelkedett a progresszió felfedezésének idejében.

Eredményeink szerint a NAMPT és CD44 fehérjék kezelése előtt mért szérumszintjének meghatározása hozzásegíthet a DOC-rezisztens betegek azonosításához, ezáltal segítheti a terápiás döntéshozatalt. Továbbá a NAMPT fehérje vizsgálatainak eredményei alapján elmondható, hogy szérumban szintjének monitorozása DOC-kezelés során segíthet a kezelés alatti progresszió korai előrejelzésében.

In vitro sejtkultúrás funkcionális kísérleteinket ezen két fehérjével, illetve a PC3-DR DOC-rezisztens sejtvonalban kimagaslóan magas expressziós változást mutató GAP43 fehérjével végeztük el. Ennek során a DOC-rezisztens sejtekben ezen fehérjék kifejeződését csendesítettük siRNS transzfekció útján, majd figyeltük a különböző DOC dózisok mellett tapasztalható, a kezeletlen kontroll sejtekhez képest mutatott viabilitás és apoptózis változásait. A megvizsgált célpontok közül a CD44 fehérje csendesítése mellett tapasztaltunk szignifikáns apoptózis növekedést a DU145-DR sejtekben. Az áramlási citometriával elvégzett apoptózis analízis szerint ezen sejtek CD44 fehérje hiányában érzékenyebbek váltak a DOC-kezelésre. Ezen kísérletek a CD44 DOC-rezisztenciában betöltött lehetséges szerepére utalnak.

Eredményeink fényében elmondható, hogy terápia-érzékeny és rezisztens sejtvonalpárok proteomikai összehasonlítása, illetve annak objektív módon való feldolgoása, szűrése új biomarkerek, valamint gyógyszer-célpontok azonosítására alkalmas módszernek tekinthető. Jelen dolgozatban bemutatott eredményeink reményeink szerint hozzájárulnak a jövőben a PC kemoterápia-rezisztenciájának leküzdéséhez. A CD44 és NAMPT, valamint az MMP-7 és SDC1 fehérjéket célzó szérumbizsgálataink független betegcsoporton való prospektív validációja szükséges azok terápia prediktív biomarkerként való alkalmazásához. A NAMPT és CD44 molekulák sejtkultúras funkcionális kísérleteinkkel, valamint azok szakirodalmában fellelhető eredményeivel összhangban a fehérjék DOC-rezisztenciában betöltött lehetséges funkcionális szerepére utalnak. Ezen mechanizmus még pontosabb megismeréséhez további kísérletek elvégzése szükséges.

7. Összefoglalás

A docetaxel (DOC) kemoterápiával szembeni rezisztencia a metasztatikus kasztráció-rezisztens prosztatarákos (mCRPC) betegek számára jelentős kockázatot jelent. Jelenleg számos olyan hatóanyag áll rendelkezésre, amelyek a betegek ugyanazon csoportja számára potenciálisan hatékony alternatívát jelentenek a DOC-rezisztens prosztatarák esetén. Így célunk olyan terápia prediktív biomarkerek azonosítása volt, amelyekre támaszkodva kiszűrhetők a DOC-kezelésre nem reagáló betegek.

Kutatásunk DOC-érzékeny és rezisztens prosztatarák sejtvonalpárok tömegspektrometriai módszerrel kivitelezett proteomikai összehasonlításán alapult. A vizsgálat által nyújtott fehérje adatsorban hipotézismentes bioinformatikai szűrési módszerekkel választottunk ki 7 kandidáns fehérjét szérumból. A fehérjék koncentrációit ELISA módszerrel határoztuk meg DOC-kezelt mCRPC betegek szérumból, majd ezen értékeket összehasonlítottuk a páciensek klinikopatológiai és túlélési adataival.

Szérumból alapján a betegek kedvezőtlenebb túlélésével összefüggést mutató NAMPT és CD44 fehérjéket, valamint a DOC-rezisztens PC3-DR sejtvonalban legnagyobb expressziós változást mutató GAP43 fehérjét további sejtkultúrák funkcionális teszteknek vetettük alá, amelyek során a fehérjék kifejeződését siRNA-transzfekcióval gátoltuk és figyeltük a sejtek életképességének, valamint apoptózisának változásait. A CD44 gécscsendesítés hatására a DU145-DR sejtvonal esetében az apoptotizáló sejtek arányának szignifikáns megnövekedését tapasztaltuk.

Az eredményeinkből következőleg a terápia megkezdését megelőzően a CD44 és NAMPT fehérjék szérumból történő kimutatása segíthet a DOC-rezisztens betegek kiválasztásában, így optimalizálhatja a klinikai döntéshozatalt. Továbbá, a NAMPT fehérje szérumszintjének meghatározása alkalmazható lehet a megkezdett DOC-terápia hatékonyságának monitorozásában is. A letört CD44 expressziójú sejtek esetén kimutatható megnövekedett DOC-érzékenység valószínűleg ezen fehérje DOC-rezisztenciában betöltött funkcionális szerepére utal. Az elvégzett kutatásunk alapján elmondható, hogy a terápia érzékeny és rezisztens sejtvonalak komparatív analízise megfelelő bioinformatikai megközelítéssel kiegészítve egy hatékony módja új biomarkerek azonosításának, az így kiválasztott fehérjék funkcionális vizsgálata pedig elvezethet új potenciális gyógyszercélpontok azonosításához.

8. Summary

Baseline as well as acquired resistance to docetaxel (DOC) chemotherapy represents a significant risk for metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) patients. On the other hand, in the last years additional therapy regimens became available providing reasonable alternatives for DOC-resistant patients. In this study, we aimed to identify predictive biomarkers able to select patients who will not benefit from DOC-treatment. In addition, functional analyses have been performed in order to assess the functional involvement of identified proteins in the DOC-resistance of prostate cancer cells.

We first performed a comparative proteome analysis of DOC-sensitive and resistant prostate cancer cell lines using LC-MS/MS mass spectrometry. By using various hypothesis-free filtering methods we selected 7 proteins from the generated dataset for quantitative (ELISA) analysis of serum samples of DOC-treated patients. Protein serum concentrations were correlated with clinicopathological and survival data.

Two of the seven assessed proteins, NAMPT and CD44, proved to be associated with poor survival, therefore these proteins and GAP43 – which showed the highest fold change in DOC-resistant PC3-DR cell line according to our proteome analysis – were assessed in further *in vitro* functional experiments by siRNA silencing in parallel with assessing cell viability and apoptosis. Due to CD44 silencing the rate of apoptotic DU145-DR cells were significantly increased compared to the control cells.

In conclusion, the determination of pre-treatment serum CD44 and NAMPT levels may help to identify patients who are resistant to DOC and therefore may help to optimize clinical decision making. Furthermore, the determination of on-treatment serum NAMPT levels may support monitoring of the efficacy of DOC therapy as well. The observed re-sensitization to DOC in CD44 silenced cells implies the possible functional involvement of CD44 in DOC-resistance. Based on our findings, using comparative proteome analysis on therapy sensitive and resistant cell lines in combination with respective bioinformatic approaches provide an effective method for discovering novel biomarkers or therapeutic targets.

9. Irodalomjegyzék

1. Szentágothai J. Funkcionális anatómia II. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2006: 1209 - 1211.
2. Röhlich P. Szövettan. Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió Kft., Budapest, 2006: 375 - 376.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68: 394-424.
4. Kasler M, Otto S, Kenessey I. (2017) [The current situation of cancer morbidity and mortality in the light of the National Cancer Registry]. *Orv Hetil*, 158: 84-89.
5. Nyirády P. Urológia – Orvostanhallgatók, szakorvosjelöltek és szakorvosok számára. Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió Kft., Budapest, 2019: 273 - 295.
6. Rawla P. (2019) Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*, 10: 63-89.
7. Gallagher RP, Fleshner N. (1998) Prostate cancer: 3. Individual risk factors. *CMAJ*, 159: 807-813.
8. Cheng H, Powers J, Schaffer K, Sartor O. (2018) Practical Methods for Integrating Genetic Testing Into Clinical Practice for Advanced Prostate Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 38: 372-381.
9. Timar J. (2019) [Molecular pathology of prostate cancer]. *Magy Onkol*, 63: 5-9.
10. Benafif S, Kote-Jarai Z, Eeles RA, Consortium P. (2018) A Review of Prostate Cancer Genome-Wide Association Studies (GWAS). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 27: 845-857.
11. Aronson WJ, Barnard RJ, Freedland SJ, Henning S, Elashoff D, Jardack PM, Cohen P, Heber D, Kobayashi N. (2010) Growth inhibitory effect of low fat diet on prostate cancer cells: results of a prospective, randomized dietary intervention trial in men with prostate cancer. *J Urol*, 183: 345-50.
12. Joseph MA, Moysich KB, Freudenheim JL, Shields PG, Bowman ED, Zhang Y, Marshall JR, Ambrosone CB. (2004) Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione S-transferases M1 and T1, and prostate cancer risk. *Nutr Cancer*, 50: 206-213.

13. Venkateswaran V, Klotz LH, Ramani M, Sugar LM, Jacob LE, Nam RK, Fleshner NE. (2009) A combination of micronutrients is beneficial in reducing the incidence of prostate cancer and increasing survival in the LNCaP transgenic model. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2: 473-483.
14. Rizos C, Papassava M, Golias C, Charalabopoulos K. (2010) Alcohol consumption and prostate cancer: a mini review. *Exp Oncol*, 32: 66-70.
15. Huncharek M, Haddock KS, Reid R, Kupelnick B. (2010) Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *Am J Public Health*, 100: 693-701.
16. International Agency for Research on Cancer. (2004) Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 83: 1-1438.
17. Bhindi B, Locke J, Alibhai SMH, Kulkarni GS, Margel DS, Hamilton RJ, Finelli A, Trachtenberg J, Zlotta AR, Toi A, Hersey KM, Evans A, van der Kwast TH, Fleshner NE. (2015) Dissecting the association between metabolic syndrome and prostate cancer risk: analysis of a large clinical cohort. *Eur Urol*, 67: 64-70.
18. Merriell SWD, Funston G, Hamilton W. (2018) Prostate Cancer in Primary Care. *Adv Ther*, 35: 1285-1294.
19. Mottet N, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, Fanti S, Fossati N, Gandaglia G, Gillessen S, Grivas N, Grummet J, Henry AM, van der Kwast TH, Lam TB, Lardas M, Liew M, Mason MD, Moris L, Oprea-Lager DE, van der Poel HG, Rouviere O, Schoots IG, Tilki D, Wiegel T, Willemsse PM, Cornford P. (2021) EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol*, 79: 243-262.
20. Lomas DJ, Ahmed HU. (2020) All change in the prostate cancer diagnostic pathway. *Nat Rev Clin Oncol*, 17: 372-381.
21. Draisma G, Etzioni R, Tsodikov A, Mariotto A, Wever E, Gulati R, Feuer E, de Koning H. (2009) Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *J Natl Cancer Inst*, 101: 374-383.
22. Nagy B, Bhattoa Harjit P, Kappelmayer J. (2019) [Routine laboratory diagnostics of prostate cancer: Past, present and the future]. *Magy Onkol*, 63: 16-25.

23. Humphrey PA. (2017) *Histopathology of Prostate Cancer*. Cold Spring Harb Perspect Med, 7: 1-21.
24. Conteduca V, Oromendia C, Eng KW, Bareja R, Sigouros M, Molina A, Faltas BM, Sboner A, Mosquera JM, Elemento O, Nanus DM, Tagawa ST, Ballman KV, Beltran H. (2019) Clinical features of neuroendocrine prostate cancer. *Eur J Cancer*, 121: 7-18.
25. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, Grading C. (2016) The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*, 40: 244-252.
26. Toth E, Salamon F. (2019) [Prostate cancer reporting: needle biopsy and radical prostatectomy specimen]. *Magy Onkol*, 63: 10-15.
27. Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. (2015) Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*, 36: 3-23.
28. Dehm SM, Tindall DJ. (2006) Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *J Cell Biochem*, 99: 333-344.
29. Bill-Axelson A, Holmberg L, Garmo H, Rider JR, Taari K, Busch C, Nordling S, Haggman M, Andersson SO, Spangberg A, Andren O, Palmgren J, Steineck G, Adami HO, Johansson JE. (2014) Radical prostatectomy or watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med*, 370: 932-942.
30. Nyirady P. (2019) [Surgical treatment of prostate cancer]. *Magy Onkol*, 63: 26-31.
31. Sebesta EM, Anderson CB. (2017) The Surgical Management of Prostate Cancer. *Semin Oncol*, 44: 347-357.
32. Ramsay C, Pickard R, Robertson C, Close A, Vale L, Armstrong N, Barocas DA, Eden CG, Fraser C, Gurung T, Jenkinson D, Jia X, Lam TB, Mowatt G, Neal DE, Robinson MC, Royle J, Rushton SP, Sharma P, Shirley MD, Soomro N. (2012) Systematic review and economic modelling of the relative clinical benefit and cost-effectiveness of laparoscopic surgery and robotic surgery for removal of the prostate in men with localised prostate cancer. *Health Technol Assess*, 16: 1-313.

33. Cornford P, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, Fanti S, Fossati N, Gandaglia G, Gillessen S, Grivas N, Grummet J, Henry AM, der Kwast THV, Lam TB, Lardas M, Liew M, Mason MD, Moris L, Oprea-Lager DE, der Poel HGV, Rouviere O, Schoots IG, Tilki D, Wiegel T, Willemsse PM, Mottet N. (2021) EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II-2020 Update: Treatment of Relapsing and Metastatic Prostate Cancer. *Eur Urol*, 79: 263-282.
34. Bill-Axelsson A, Holmberg L, Garmo H, Taari K, Busch C, Nordling S, Haggman M, Andersson SO, Andren O, Steineck G, Adami HO, Johansson JE. (2018) Radical Prostatectomy or Watchful Waiting in Prostate Cancer - 29-Year Follow-up. *N Engl J Med*, 379: 2319-2329.
35. Feldman BJ, Feldman D. (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*, 1: 34-45.
36. Seidenfeld J, Samson DJ, Hasselblad V, Aronson N, Albertsen PC, Bennett CL, Wilt TJ. (2000) Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*, 132: 566-577.
37. Kinsey EN, Zhang T, Armstrong AJ. (2020) Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer: A Review of the Current Treatment Landscape. *Cancer J*, 26: 64-75.
38. Maraz A, Geczi L, Kuronya Z. (2019) [New therapeutic options for hormone sensitive prostate cancers]. *Magy Onkol*, 63: 33-39.
39. Kuronya Z, Biro K, Geczi L, Maraz A. (2018) [Modern treatment of metastatic hormone-sensitive prostate cancer]. *Orv Hetil*, 159: 1664-1671.
40. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN, Jr., Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, Crawford ED. (2004) Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med*, 351: 1513-1520.
41. Bissery MC. (1995) Preclinical pharmacology of docetaxel. *Eur J Cancer*, 31A Suppl 4: S1-6.

42. Jordan MA, Wilson L. (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, 4: 253-265.
43. Thadani-Mulero M, Portella L, Sun S, Sung M, Matov A, Vessella RL, Corey E, Nanus DM, Plymate SR, Giannakakou P. (2014) Androgen receptor splice variants determine taxane sensitivity in prostate cancer. *Cancer Res*, 74: 2270-2282.
44. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, Gravis G, Bodrogi I, Mackenzie MJ, Shen L, Roessner M, Gupta S, Sartor AO, Investigators T. (2010) Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet*, 376: 1147-1154.
45. Galletti G, Leach BI, Lam L, Tagawa ST. (2017) Mechanisms of resistance to systemic therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Treat Rev*, 57: 16-27.
46. Vrignaud P, Semiond D, Benning V, Beys E, Bouchard H, Gupta S. (2014) Preclinical profile of cabazitaxel. *Drug Des Devel Ther*, 8: 1851-1867.
47. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, Chi KN, Jones RJ, Goodman OB, Jr., Saad F, Staffurth JN, Mainwaring P, Harland S, Flaig TW, Hutson TE, Cheng T, Patterson H, Hainsworth JD, Ryan CJ, Sternberg CN, Ellard SL, Flechon A, Saleh M, Scholz M, Efstathiou E, Zivi A, Bianchini D, Loriot Y, Chieffo N, Kheoh T, Haqq CM, Scher HI, Investigators C-A-. (2011) Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*, 364: 1995-2005.
48. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, de Wit R, Mulders P, Chi KN, Shore ND, Armstrong AJ, Flaig TW, Flechon A, Mainwaring P, Fleming M, Hainsworth JD, Hirmand M, Selby B, Seely L, de Bono JS, Investigators A. (2012) Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med*, 367: 1187-1197.
49. Parker C, Nilsson S, Heinrich D, Helle SI, O'Sullivan JM, Fossa SD, Chodacki A, Wiechno P, Logue J, Seke M, Widmark A, Johannessen DC, Hoskin P, Bottomley D, James ND, Solberg A, Syndikus I, Kliment J, Wedel S, Boehmer S, Dall'Oglio M, Franzen L, Coleman R, Vogelzang NJ, O'Bryan-Tear CG, Staudacher K,

- Garcia-Vargas J, Shan M, Bruland OS, Sartor O, Investigators A. (2013) Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*, 369: 213-223.
50. Ploussard G, Terry S, Maille P, Allory Y, Sirab N, Kheuang L, Soyeux P, Nicolaiew N, Coppolani E, Paule B, Salomon L, Culine S, Buttyan R, Vacherot F, de la Taille A. (2010) Class III beta-tubulin expression predicts prostate tumor aggressiveness and patient response to docetaxel-based chemotherapy. *Cancer Res*, 70: 9253-9264.
 51. Terry S, Ploussard G, Allory Y, Nicolaiew N, Boissiere-Michot F, Maille P, Kheuang L, Coppolani E, Ali A, Bibeau F, Culine S, Buttyan R, de la Taille A, Vacherot F. (2009) Increased expression of class III beta-tubulin in castration-resistant human prostate cancer. *Br J Cancer*, 101: 951-956.
 52. Marin-Aguilera M, Codony-Servat J, Reig O, Lozano JJ, Fernandez PL, Pereira MV, Jimenez N, Donovan M, Puig P, Mengual L, Bermudo R, Font A, Gallardo E, Ribal MJ, Alcaraz A, Gascon P, Mellado B. (2014) Epithelial-to-mesenchymal transition mediates docetaxel resistance and high risk of relapse in prostate cancer. *Mol Cancer Ther*, 13: 1270-1284.
 53. Puhr M, Hoefler J, Schafer G, Erb HH, Oh SJ, Klocker H, Heidegger I, Neuwirt H, Culig Z. (2012) Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205. *Am J Pathol*, 181: 2188-2201.
 54. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5: 219-234.
 55. Kawanobe T, Kogure S, Nakamura S, Sato M, Katayama K, Mitsushashi J, Noguchi K, Sugimoto Y. (2012) Expression of human ABCB5 confers resistance to taxanes and anthracyclines. *Biochem Biophys Res Commun*, 418: 736-741.
 56. Oprea-Lager DE, Bijnsdorp IV, RJ VANM, AJ VDE, Hoekstra OS, Geldof AA. (2013) ABCC4 Decreases docetaxel and not cabazitaxel efficacy in prostate cancer cells in vitro. *Anticancer Res*, 33: 387-391.
 57. Zhu Y, Liu C, Nadiminty N, Lou W, Tummala R, Evans CP, Gao AC. (2013) Inhibition of ABCB1 expression overcomes acquired docetaxel resistance in prostate cancer. *Mol Cancer Ther*, 12: 1829-1236.

58. Duran GE, Wang YC, Francisco EB, Rose JC, Martinez FJ, Collier J, Brassard D, Vrignaud P, Sikic BI. (2015) Mechanisms of resistance to cabazitaxel. *Mol Cancer Ther*, 14: 193-201.
59. Hour TC, Chung SD, Kang WY, Lin YC, Chuang SJ, Huang AM, Wu WJ, Huang SP, Huang CY, Pu YS. (2015) EGFR mediates docetaxel resistance in human castration-resistant prostate cancer through the Akt-dependent expression of ABCB1 (MDR1). *Arch Toxicol*, 89: 591-605.
60. Kato T, Mizutani K, Kameyama K, Kawakami K, Fujita Y, Nakane K, Kanimoto Y, Ehara H, Ito H, Seishima M, Deguchi T, Ito M. (2015) Serum exosomal P-glycoprotein is a potential marker to diagnose docetaxel resistance and select a taxoid for patients with prostate cancer. *Urol Oncol*, 33: 385 e15-20.
61. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. (2005) Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, 310: 644-648.
62. Galletti G, Matov A, Beltran H, Fontugne J, Miguel Mosquera J, Cheung C, MacDonald TY, Sung M, O'Toole S, Kench JG, Suk Chae S, Kimovski D, Tagawa ST, Nanus DM, Rubin MA, Horvath LG, Giannakakou P, Rickman DS. (2014) ERG induces taxane resistance in castration-resistant prostate cancer. *Nat Commun*, 5: 5548-5559.
63. Reig O, Marin-Aguilera M, Carrera G, Jimenez N, Pare L, Garcia-Recio S, Gaba L, Pereira MV, Fernandez P, Prat A, Mellado B. (2016) TMPRSS2-ERG in Blood and Docetaxel Resistance in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*, 70: 709-713.
64. Kuronya Z, Sukosd F, Varga L, Biro K, Gyergyay F, Geczi L, Nagyivanyi K, Jorgo K, Szarvas T, Kovacs A, Laczo I, Varga Z, Posfai B, Pepo J, Maraz A. (2019) ERG expression can predict the outcome of docetaxel combined with androgen deprivation therapy in metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *Urol Oncol*, 37: 289 e1-289 e9.
65. Rajpar S, Merabet Z, Vielh P, Foulon S, Lesaunier F, Delva R, Rolland F, Priou F, Ferrero JM, Houede N, Mourey L, Theodore C, Krakowski I, Faivre L, Habibian M, Culine S, Chauchereau A, Gravis G, Fizazi K. (2017) The benefit

- of combining docetaxel to androgen deprivation therapy in localized and metastatic castration-sensitive prostate cancer as predicted by ERG status: An analysis of two GETUG phase III trials. ASCO Annual Meeting. 2017. *J Clin Oncol* 35: 5012.
66. Darshan MS, Loftus MS, Thadani-Mulero M, Levy BP, Escuin D, Zhou XK, Gjyrezi A, Chanel-Vos C, Shen R, Tagawa ST, Bander NH, Nanus DM, Giannakakou P. (2011) Taxane-induced blockade to nuclear accumulation of the androgen receptor predicts clinical responses in metastatic prostate cancer. *Cancer Res*, 71: 6019-6029.
 67. Antonarakis ES, Lu C, Luber B, Wang H, Chen Y, Nakazawa M, Nadal R, Paller CJ, Denmeade SR, Carducci MA, Eisenberger MA, Luo J. (2015) Androgen Receptor Splice Variant 7 and Efficacy of Taxane Chemotherapy in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol*, 1: 582-591.
 68. Tagawa ST, Antonarakis ES, Gjyrezi A, Galletti G, Kim S, Worroll D, Stewart J, Zaher A, Szatrowski TP, Ballman KV, Kita K, Tasaki S, Bai Y, Portella L, Kirby BJ, Saad F, Eisenberger MA, Nanus DM, Giannakakou P. (2019) Expression of AR-V7 and ARv(567es) in Circulating Tumor Cells Correlates with Outcomes to Taxane Therapy in Men with Metastatic Prostate Cancer Treated in TAXYNERGY. *Clin Cancer Res*, 25: 1880-1888.
 69. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. (2007) Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 7: 256-269.
 70. Balkwill F. (2004) Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*, 4: 540-550.
 71. Mahon KL, Lin HM, Castillo L, Lee BY, Lee-Ng M, Chatfield MD, Chiam K, Breit SN, Brown DA, Molloy MP, Marx GM, Pavlakis N, Boyer MJ, Stockler MR, Daly RJ, Henshall SM, Horvath LG. (2015) Cytokine profiling of docetaxel-resistant castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer*, 112: 1340-1348.
 72. Domingo-Domènech JM, Codony J, Tapia M, Filella X, Alcover J, Rovira A, Gascón P, Albanell J, Mellado B. (2004) High serum interleukin-6 levels predicts resistance to chemotherapy in hormone-independent prostate cancer. *Cancer Research*, 64: 1031-1031.

73. Darr C, Krafft U, Hadaschik B, Tschirdewahn S, Sevcenco S, Csizmarik A, Nyirady P, Kuronya Z, Reis H, Maj-Hes A, Shariat SF, Kramer G, Szarvas T. (2018) The Role of YKL-40 in Predicting Resistance to Docetaxel Chemotherapy in Prostate Cancer. *Urol Int*, 101: 65-73.
74. O'Connell K, Prencipe M, O'Neill A, Corcoran C, Rani S, Henry M, Dowling P, Meleady P, O'Driscoll L, Watson W, O'Connor R. (2012) The use of LC-MS to identify differentially expressed proteins in docetaxel-resistant prostate cancer cell lines. *Proteomics*, 12: 2115-2126.
75. Zhao L, Lee BY, Brown DA, Molloy MP, Marx GM, Pavlakis N, Boyer MJ, Stockler MR, Kaplan W, Breit SN, Sutherland RL, Henshall SM, Horvath LG. (2009) Identification of candidate biomarkers of therapeutic response to docetaxel by proteomic profiling. *Cancer Res*, 69: 7696-7703.
76. Marin-Aguilera M, Codony-Servat J, Kalko SG, Fernandez PL, Bermudo R, Buxo E, Ribal MJ, Gascon P, Mellado B. (2012) Identification of docetaxel resistance genes in castration-resistant prostate cancer. *Mol Cancer Ther*, 11: 329-339.
77. Keresztes D, Csizmarik A, Nagy N, Modos O, Fazekas T, Bracht T, Sitek B, Witzke K, Puhr M, Sevcenco S, Kramer G, Shariat S, Kuronya Z, Takacs L, Tornyi I, Lazar J, Hadaschik B, Laszik A, Szucs M, Nyirady P, Szarvas T. (2022) Comparative proteome analysis identified CD44 as a possible serum marker for docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer. *J Cell Mol Med*, 26: 1332-1337.
78. Keresztes D, Módos O, Szűcs M, Hüttl A, Csizmarik A, Nagy N, Kretz V, Bracht T, Sitek B, Witzke K, Puhr M, Sevcenco S, Kramer G, Shariat S, Nyirády P, Szarvas T. (2019) Comparative proteome analysis identified NAMPT as a potential serum marker for the prediction of docetaxel-resistance in prostate cancer. *European Urology Supplements*, 18: e482.
79. Szarvas T, Csizmarik A, Nagy N, Keresztes D, Varadi M, Kuronya Z, Riesz P, Nyirady P. (2020) Molecular underpinnings of systemic treatment resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Orv Hetil*, 161: 813-820.
80. Zhu Y, Liu C, Armstrong C, Lou W, Sandher A, Gao AC. (2015) Antiandrogens Inhibit ABCB1 Efflux and ATPase Activity and Reverse Docetaxel Resistance in Advanced Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*, 21: 4133-4142.

81. Rocchi P, So A, Kojima S, Signaevsky M, Beraldi E, Fazli L, Hurtado-Coll A, Yamanaka K, Gleave M. (2004) Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*, 64: 6595-6602.
82. Foster CS, Dodson AR, Ambrosine L, Fisher G, Moller H, Clark J, Attard G, DeBono J, Scardino P, Reuter VE, Cooper CS, Berney DM, Cuzick J. (2009) Hsp-27 expression at diagnosis predicts poor clinical outcome in prostate cancer independent of ETS-gene rearrangement. *Br J Cancer*, 101: 1137-1144.
83. Albany C, Hahn NM. (2014) Heat shock and other apoptosis-related proteins as therapeutic targets in prostate cancer. *Asian J Androl*, 16: 359-363.
84. Chen DH, Wu QW, Li XD, Wang SJ, Zhang ZM. (2017) SYPL1 overexpression predicts poor prognosis of hepatocellular carcinoma and associates with epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Rep*, 38: 1533-1542.
85. Liu L, He Q, Li Y, Zhang B, Sun X, Shan J, Pan B, Zhang T, Zhao Z, Song X, Guo Y. (2020) Serum SYPL1 is a promising diagnostic biomarker for colorectal cancer. *Clin Chim Acta*, 509: 36-42.
86. Zhang Y, Xia M, Jin K, Wang S, Wei H, Fan C, Wu Y, Li X, Li X, Li G, Zeng Z, Xiong W. (2018) Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. *Mol Cancer*, 17: 45-58.
87. Hartl M, Schneider R. (2019) A Unique Family of Neuronal Signaling Proteins Implicated in Oncogenesis and Tumor Suppression. *Front Oncol*, 9: 289-301.
88. Zhang F, Ying L, Jin J, Feng J, Chen K, Huang M, Wu Y, Yu H, Su D. (2018) GAP43, a novel metastasis promoter in non-small cell lung cancer. *J Transl Med*, 16: 310-321.
89. Dalamaga M, Christodoulatos GS, Mantzoros CS. (2018) The role of extracellular and intracellular Nicotinamide phosphoribosyl-transferase in cancer: Diagnostic and therapeutic perspectives and challenges. *Metabolism*, 82: 72-87.
90. Rongvaux A, Shea RJ, Mulks MH, Gigot D, Urbain J, Leo O, Andris F. (2002) Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur J Immunol*, 32: 3225-3234.

91. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. (1994) Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol*, 14: 1431-1437.
92. Kitani T, Okuno S, Fujisawa H. (2003) Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of pre-B-cell colony-enhancing factor. *FEBS Lett*, 544: 74-78.
93. Chiarugi A, Dolle C, Felici R, Ziegler M. (2012) The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology. *Nat Rev Cancer*, 12: 741-752.
94. Houtkooper RH, Canto C, Wanders RJ, Auwerx J. (2010) The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev*, 31: 194-223.
95. Bi TQ, Che XM. (2010) Nampt/PBEF/visfatin and cancer. *Cancer Biol Ther*, 10: 119-125.
96. Olszanecka-Glinianowicz M, Owczarek A, Bozentowicz-Wikarek M, Brzozowska A, Mossakowska M, Zdrojewski T, Grodzicki T, Wiecek A, Chudek J. (2014) Relationship between circulating visfatin/NAMPT, nutritional status and insulin resistance in an elderly population - results from the PolSenior substudy. *Metabolism*, 63: 1409-1418.
97. Shackelford RE, Mayhall K, Maxwell NM, Kandil E, Coppola D. (2013) Nicotinamide phosphoribosyltransferase in malignancy: a review. *Genes Cancer*, 4: 447-456.
98. Li D, Chen NN, Cao JM, Sun WP, Zhou YM, Li CY, Wang XX. (2014) BRCA1 as a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-dependent metabolic switch in ovarian cancer. *Cell Cycle*, 13: 2564-2571.
99. Bajrami I, Kigozi A, Van Weverwijk A, Brough R, Frankum J, Lord CJ, Ashworth A. (2012) Synthetic lethality of PARP and NAMPT inhibition in triple-negative breast cancer cells. *EMBO Mol Med*, 4: 1087-1096.
100. Kim SR, Bae YH, Bae SK, Choi KS, Yoon KH, Koo TH, Jang HO, Yun I, Kim KW, Kwon YG, Yoo MA, Bae MK. (2008) Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1783: 886-895.

101. Li Y, Zhang Y, Dorweiler B, Cui D, Wang T, Woo CW, Brunkan CS, Wolberger C, Imai S, Tabas I. (2008) Extracellular Nampt promotes macrophage survival via a nonenzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *J Biol Chem*, 283: 34833-34843.
102. Moschen AR, Gerner RR, Tilg H. (2010) Pre-B cell colony enhancing factor/NAMPT/visfatin in inflammation and obesity-related disorders. *Curr Pharm Des*, 16: 1913-1920.
103. Patel ST, Mistry T, Brown JE, Digby JE, Adya R, Desai KM, Randeve HS. (2010) A novel role for the adipokine visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor 1 in prostate carcinogenesis. *Peptides*, 31: 51-57.
104. Wang B, Hasan MK, Alvarado E, Yuan H, Wu H, Chen WY. (2011) NAMPT overexpression in prostate cancer and its contribution to tumor cell survival and stress response. *Oncogene*, 30: 907-921.
105. Gomaa S, Abou Youssif T, Elmissery M, Elgandy S. (2015) Clinical significance of serum adipokine visfatin/eNampt in relation to prostate cancer detection and aggressiveness. *Egyptian Journal of Obesity, Diabetes and Endocrinology*, 1: 36-42.
106. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. (2002) CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 39: 527-579.
107. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. (2003) CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 33-45.
108. Ko YH, Won HS, Jeon EK, Hong SH, Roh SY, Hong YS, Byun JH, Jung CK, Kang JH. (2011) Prognostic significance of CD44s expression in resected non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 11: 340-348.
109. Lim SD, Young AN, Paner GP, Amin MB. (2008) Prognostic role of CD44 cell adhesion molecule expression in primary and metastatic renal cell carcinoma: a clinicopathologic study of 125 cases. *Virchows Arch*, 452: 49-55.
110. Tei H, Miyake H, Harada K, Fujisawa M. (2014) Expression profile of CD44s, CD44v6, and CD44v10 in localized prostate cancer: effect on prognostic outcomes following radical prostatectomy. *Urol Oncol*, 32: 694-700.

111. Yan Y, Zuo X, Wei D. (2015) Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl Med*, 4: 1033-1043.
112. Morath I, Hartmann TN, Orian-Rousseau V. (2016) CD44: More than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol*, 81: 166-173.
113. Wang L, Zuo X, Xie K, Wei D. (2018) The Role of CD44 and Cancer Stem Cells. *Methods Mol Biol*, 1692: 31-42.
114. Ayob AZ, Ramasamy TS. (2018) Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci*, 25: 20-38.
115. Lai CJ, Lin CY, Liao WY, Hour TC, Wang HD, Chuu CP. (2019) CD44 Promotes Migration and Invasion of Docetaxel-Resistant Prostate Cancer Cells Likely via Induction of Hippo-Yap Signaling. *Cells*, 8: 295-307.
116. Roy S, Kar M, Roy S, Padhi S, Kumar A, Thakur S, Akhter Y, Gatto G, Banerjee B. (2020) Inhibition of CD44 sensitizes cisplatin-resistance and affects Wnt/beta-catenin signaling in HNSCC cells. *Int J Biol Macromol*, 149: 501-512.
117. Cao X, Cao D, Jin M, Jia Z, Kong F, Ma H, Wang Y, Jiang J. (2014) CD44 but not CD24 expression is related to poor prognosis in non-cardia adenocarcinoma of the stomach. *BMC Gastroenterol*, 14: 157-163.
118. Chen Y, Fu Z, Xu S, Xu Y, Xu P. (2014) The prognostic value of CD44 expression in gastric cancer: a meta-analysis. *Biomed Pharmacother*, 68: 693-697.
119. Situ D, Long H, Lin P, Zhu Z, Wang J, Zhang X, Xie Z, Rong T. (2010) Expression and prognostic relevance of CD44v6 in stage I non-small cell lung carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 136: 1213-1219.
120. Zhou G, Chiu D, Qin D, Niu L, Cai J, He L, Tan D, Xu K. (2013) Expression of CD44v6 and integrin-beta1 for the prognosis evaluation of pancreatic cancer patients after cryosurgery. *Diagn Pathol*, 8: 146-155.
121. Szarvas T, Sevcenco S, Modos O, Keresztes D, Nyirady P, Csizmarik A, Ristl R, Puhr M, Hoffmann MJ, Niedworok C, Hadaschik B, Maj-Hes A, Shariat SF, Kramer G. (2018) Matrix metalloproteinase 7, soluble Fas and Fas ligand serum levels for predicting docetaxel resistance and survival in castration-resistant prostate cancer. *BJU Int*, 122: 695-704.

122. Szarvas T, Sevcenco S, Modos O, Keresztes D, Nyirady P, Kubik A, Romics M, Kovalszky I, Reis H, Hadaschik B, Shariat SF, Kramer G. (2018) Circulating syndecan-1 is associated with chemotherapy-resistance in castration-resistant prostate cancer. *Urol Oncol*, 36: 312 e9-312 e15.

10. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:

- **Keresztes D**, Csizmarik A, Nagy N, Modos O, Fazekas T, Bracht T, Sitek B, Witzke K, Puhr M, Sevcenco S, Kramer G, Shariat S, Kuronya Z, Takacs L, Tornyi I, Lazar J, Hadaschik B, Laszik A, Szucs M, Nyirady P, Szarvas T. (2022) Comparative proteome analysis identified CD44 as a possible serum marker for docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer. *J Cell Mol Med*, 26: 1332-1337.

IF: 5,310
- Szarvas T, Csizmarik A, Nagy N, **Keresztes D**, Varadi M, Kuronya Z, Riesz P, Nyirady P. (2020) Az áttétes kasztrációrezisztens prosztatarák gyógyszerrezisztenciájának molekuláris vonatkozásai [Molecular underpinnings of systemic treatment resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer]. *Orv Hetil*, 161: 813-820.

IF: 0,540
- **Keresztes D**, Módos O, Szűcs M, Hüttl A, Csizmarik A, Nagy N, Kretz V, Bracht T, Sitek B, Witzke K, Puhr M, Sevcenco S, Kramer G, Shariat S, Nyirady P, Szarvas T. (2019) Comparative proteome analysis identified NAMPT as a potential serum marker for the prediction of docetaxel-resistance in prostate cancer. *European Urology Supplements*, 18: e482.
- Szarvas T, Sevcenco S, Modos O, **Keresztes D**, Nyirady P, Csizmarik A, Ristl R, Puhr M, Hoffmann MJ, Niedworok C, Hadaschik B, Maj-Hes A, Shariat SF, Kramer G. (2018) Matrix metalloproteinase 7, soluble Fas and Fas ligand serum levels for predicting docetaxel resistance and survival in castration-resistant prostate cancer. *BJU Int*, 122: 695-704.

IF: 4,524
- Szarvas T, Sevcenco S, Modos O, **Keresztes D**, Nyirady P, Kubik A, Romics M, Kovalszky I, Reis H, Hadaschik B, Shariat SF, Kramer G. (2018) Circulating

syndecan-1 is associated with chemotherapy-resistance in castration-resistant prostate cancer. *Urol Oncol*, 36: 312 e9-312 e15.

IF: 2,863

A disszertációtól független saját közlemények:

- Nagy N, Reis H, Hadaschik B, Niedworok C, Modos O, Szendroi A, Biro K, Hager T, Herold T, Ablat J, Black PC, Okon K, Tolkach Y, Csizmarik A, Olah C, **Keresztes D**, Bremmer F, Gaisa NT, Kriegsmann J, Kovalszky I, Kiss A, Timar J, Szasz MA, Rink M, Fisch M, Nyirady P, Szarvas T. (2020) Prevalence of APC and PTEN Alterations in Urachal Cancer. *Pathol Oncol Res*, 26: 2773-2781.

IF: 3,201

- Reis H, van der Vos KE, Niedworok C, Herold T, Modos O, Szendroi A, Hager T, Ingenwerth M, Vis DJ, Behrendt MA, de Jong J, van der Heijden MS, Peyronnet B, Mathieu R, Wiesweg M, Ablat J, Okon K, Tolkach Y, **Keresztes D**, Nagy N, Bremmer F, Gaisa NT, Chlosta P, Kriegsmann J, Kovalszky I, Timar J, Kristiansen G, Radzun HJ, Knuchel R, Schuler M, Black PC, Rubben H, Hadaschik BA, Schmid KW, van Rhijn BWG, Nyirady P, Szarvas T. (2018) Pathogenic and targetable genetic alterations in 70 urachal adenocarcinomas. *Int J Cancer*, 143: 1764-1773.

IF: 4,982

- Kubik A, Szarvas T, Módos O, **Keresztes D**, Horváth A, Nyirady P. (2017) A felső húgyúti urothel sejtes tumorok kezelése - hasonlóságok és különbségek a húgyhólyag urotheliális tumoraival. *Magy Urol*, 29: 52-56.

11. Köszönetnyilvánítás

Elsőként a Semmelweis Egyetem Urológia Klinika igazgatójának, programvezetőmnek, Prof. Nyirády Péternek szeretnék hálás köszönetet mondani, akinek segítségével az Urológiai Klinika Kutatólaboratóriuma megújulhatott, így korszerű, nyugodt feltételek mellett dolgozhattam doktori képzésem folyamán. Továbbá meg kell köszönjem Professzor úrnak, hogy nem fogadott el tőlem nemleges választ a Klinika Futócsapatába való invitálásakor, így az Ultrabalaton futóversenyen nem csak nagyszerű élményekkel gazdagodtam, hanem a hosszútáv futást is megszerettem, amit azóta is rendszeresen űzök.

Kiemelten köszönetemet fejezem ki, Prof. Szarvas Tibornak, aki a kutatói pályám elejétől kezdve lelkiismeretesen támogatott és akitől nagyon sokat tanulhattam az elmúlt években. Köszönöm neki, hogy doktori képzésemet megelőzően segített Németországban szakmai gyakorlati helyen elhelyezkednem, valamint számos hazai és nemzetközi konferencián való felkészülésben támaszkodhattam rá. Témavezetőmnek köszönhetem továbbá, hogy megtanulhattam, hogyan kell színvonalas tudományos cikket írni, melyet szakértelme, hasznos tanácsai, valamint az irányomba tanúsított türelme nyomán érhettem el.

Köszönöm Professzor uraknak, hogy kitüntettek bizalmukkal és helyet biztosítottak számomra az általuk vezetett színvonalas képzési programban.

Köszönöm a mindennapos támogató segítséget az Urológiai Klinika Uroonkológiai Kutatólaboratóriuma Ph.D. hallgatóinak, Pásztor-Csizmarik Anitának, Habina-Nagy Nikolettnek és Hermann-Váradai Melindának. Általuk a doktori képzési programom 4 éve színesebben, derűsebb légkörben telt, amellet, hogy sok segítséget nyújtottak számomra.

Köszönettel tartozom az Urológiai Klinika további munkatársainak is. Külön köszönetet szeretnék mondani a Klinikán működő Uroonkológiai Centrum vezetőjének, Dr. Szűcs Miklós főorvos úrnak, valamint Fazekas Tünde ápolónak, akik áldozatos munkája nélkül nem lettem volna képes ilyen nagy betegcsoport szérummintáit bevonni kísérleteimbe, ezáltal nagymértékben hozzájárultak az elért eredményeinkhez. Dr. Módos Orsolyának köszönöm, hogy már TDK kutatásom alatt megtanított számomra számos molekuláris szintű vizsgálatot, azok tervezési, kivitelezési és kiértékelési lépéseit, valamint azt, hogy hozzá bármikor bizalommal fordulhattam urológiai témájú kérdéseimmel, amelyek mellett emberileg is támogatást nyújtott. Köszönöm Dr. Hüttl

Andrásnak és Dr. Fazekas Tamásnak a sok segítséget, amelyet a vizsgálataimba bevont betegek klinikopatológiai adatainak kigyűjtésében nyújtottak.

A Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézete több kutatócsoportjának is köszönettel tartozom. Köszönöm Prof. Kovalszky Ilonának, hogy TDK és Ph.D. képzésem alatt is lehetőséget biztosított számomra, hogy az általa vezetett Molekuláris Patológia Laboratóriumban számos kísérletemet elvégezhessem. A Laboratórium további munkatársainak, Dr. Karászi Katalinnak, Dr. Reszegi Andreának, Egedi Krisztinának és Császár Krisztinának is hálás köszönettel tartozom, amiért bármikor fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel, amelyeket segítőkészen és nagy szakértelemmel válaszoltak meg.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Sebestyén Annának és Ph.D. hallgatójának Dankó Titanillának, akik megteremtették a lehetőségét, hogy sejtkultúrák kísérleteimet az általuk vezetett Szövettenyésztő Laboratóriumban elvégezhessem. Köszönöm a támogató tanácsaikat, áldozatos és önzetlen munkájukat, amelyet a Laboratórium mindennapos, magas színvonalú fenntartása érdekében tettek.

Köszönettel tartozom Prof. Krenács Tibornak és az általa vezetett Molekuláris Patomorfológia Munkacsoportnak, így Dr. Forika Gertrúdnak és Kiss Évának. Ők nem csupán rendelkezésemre bocsátották az áramlási citométer berendezést, hanem türelmesen, alaposan elmagyarázták annak használatát, a minta előkészítéstől, a mérésen át, annak kiértékeléséig.

Hálásan köszönöm a düsseldorfi Heinrich Heine Egyetem Urológiai Kutatólaboratórium munkatársainak, hogy a Ph.D. képzésemet megelőzően, Erasmus+ szakmai gyakorlatomat náluk tölthettem. Köszönöm Prof. Wolfgang Schulzknak, hogy az általa irányított kutatócsoportban helyet biztosított számomra. Köszönettel tartozom Dr. Michéle Hoffmann-nak, aki a szakmai gyakorlatom során témavezetőm volt és akitől rengeteget tanulhattam a hét hónapos program során. Nagyon sok segítséget és támogatást kaptam továbbá Dr. Nicholas Wagnertől, Dr. Alessandro Ninitől, Dr. Margaretha Skowrontól, Dr. Ananda Ayyappan Jaguva Vasudevántól, Dr. Patchawaralai Whongsiritől, Dr. Johanna Drooptól és Christiane Hadertől. Az általuk teremtett munkakörnyezetben öröm volt dolgozni, amely mellett nagyon sok hasznos tapasztalatra

tettem szert. Köszönöm, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel, melyeket türelemmel és odafigyeléssel fogadtak és nagy szakértelemmel válaszoltak meg.

Köszönetemet szeretném kifejezni a doktori értekezésem létrejöttéhez nagyban hozzájáruló kollaborációs partnereinknek is. Köszönöm Dr. Martin Puhrnak (Innsbrucki Orvosi Egyetem, Urológiai Klinika), hogy rendelkezésemre bocsátotta az általuk tenyésztett kemoterápia-érzékeny és -rezisztens prosztaták sejtvonalpárokat. Köszönöm Prof. Barbara Siteknek, Dr. Kathrin Witzkenek és Dr. Thilo Brachtnak (Bochumi Ruhr Egyetem, Orvosi Proteomikai Központ) a sejtvonalak komparatív proteomikai elemzését és annak kiértékelésében nyújtott segítségüket. Köszönet illeti Prof. Gero Kramert és Dr. Sabina Sevcencot, akik nagyon értékes, kemoterápiás kezeléssel átesett mCRPC betegek szérummintáiból és klinikopatológiai adataiból álló betegcsoportot bocsátott rendelkezésünkre. Köszönöm Prof. Takács Lászlónak, Dr. Lázár Józsefnek és Tornyai Ilonának (Debreceni Egyetem, Humán-genetikai Tanszék) az együttműködést, amelynek során bioinformatikai módszereikkel képesek voltunk a proteomikai adatsorból a szekretált fehérjéket további vizsgálatainkhoz kiválasztani.

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Csermely Péternek és az általa vezetett LINK-Group munkacsoportnak (Semmelweis Egyetem, Molekuláris Biológiai Tanszék). Köszönöm Professzor úrnak, hogy a Ph.D. képzésem alatt megismertette velem a hálózatbiológia tudományterületét, és támogatta, hogy kutatócsoportjával együttműködjünk. Köszönöm Ph.D. hallgatójának, Dr. Kovács Borbálának az izgalmas közös szakmai munkát és az értékes, baráti beszélgetéseket is.

Köszönöm szépen gimnáziumi biológia tanáromnak, Dr. Mészáros Lukácsnak a nagyszerű és lenyűgöző tanóráit, amelyek nem csupán felkeltették az érdeklődésemet a természettudományok iránt, hanem azok hatására és Tanár úr biztatására el is köteleződtem a tudományos pályaválasztás mellett. Továbbá hálás vagyok korábbi mentoraimnak, Dr. Minkó Krisztinának, Dr. Bódi Ildikónak és Dr. Dávid Csabának, akik az egyetemi alapképzésem során biztosítottak helyet számomra TDK hallgatóként a kutatócsoportjukban (Semmelweis Egyetem, Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet), amely kutatási projekt keretében tapasztalhattam meg közelebbről a kutatói hivatás szépségét és izgalmas kihívásait.

Végezetül hálámat szeretném kifejezni azoknak, akiknek a legtöbbet köszönhetek, a Családomnak és Barátaimnak. Hálásan köszönöm Édesanyámnak, hogy szeretetben nevelt fel és bármikor számíthatok rá, valamint olyan háttérrel biztosított számomra, amivel a tanulmányaimra koncentrálni tudtam. Köszönöm Nővéremnek és Öcsémnek, hogy mindig mellettem állnak, a nehéz időszakaimon átsegítenek, támogatnak és mindig képesek felvidítani. Külön köszönöm Nővéremnek, hogy sok egyéb teendője mellett is segítette a doktori értekezésem színvonalát növelni az általa készített ábráknak köszönhetően. Köszönöm Nagymamám őszinte és értékes tanácsait, Nagynénémnek és Nagybátyámnak az önzetlen támogatását. Köszönöm a Barátaimnak, Ginának, Dávidnak, Bálintnak, Tominak, Daninak és Bencének, hogy mindenkor számíthatok rájuk. Jólelkőségük és az általuk megteremtett harmonikus, vidám és felhőtlen környezet is nagyban hozzásegített, hogy doktori képzésemet elvégezhessem.