

**NEM KISSEJTÉS TUDÓDAGANAT MOLEKULÁRIS HÁTTERÉNEK
VIZSGÁLATA CISZPLATIN ÉS ERLOTINIB KEZELÉS HATÁSÁRA**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS



FÜLÖPNÉ KISS EDIT

**Pécsi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerészi Biotechnológia Intézet**

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Szekeres Júlia, egyetemi tanár

Programvezető: Prof. Dr. Berki Tímea, egyetemi tanár

Témavezető: Prof. Dr. Pongrácz Judit Erzsébet, egyetemi tanár

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar**

Pécs

2021.

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke	4
2	Bevezetés	7
2.1	A tüdődaganatok kialakulása	7
2.2	A tüdődaganatok stádiumai	7
2.3	A tüdődaganatok mutációs háttere	9
2.3.1	KRAS mutáció	9
2.3.2	EGFR mutáció	10
2.3.3	ALK génátrendeződés	11
2.3.4	B-Raf mutáció	11
2.4	A tüdődaganatok terápiás lehetőségei	12
2.4.1	Adenokarcinóma kezelése	14
2.4.1.1	KRAS mutáció kezelése	14
2.4.1.2	EGFR mutáció kezelése	15
2.4.1.3	ALK mutáció kezelése	16
2.4.1.4	BRAF mutáció kezelése	16
2.4.2	Laphámsejtes tüdőkarcinóma kezelése	17
2.4.3	Nagysejtes tüdőkarcinóma kezelése	17
2.4.4	Immunterápia	18
3	A mikrokörnyezet szerepe a tüdődaganatok kialakulásában és progressziójában	19
3.1	A Wnt jelátvitel	19
3.2	Gyulladásos citokinek	21
3.3	ABC transzporter fehérjék	22
4	Célkitűzések	25
5	Anyagok és módszerek	26
5.1	Betegminták	26
5.2	Primer tüdő tumorsejtek izolálása szövetmintából	27
5.3	Primer tüdő tumorsejtek izolálása pleurális folyadékból	27
5.4	Sejttenyésztés	27
5.5	Transzgenikus sejtvonalak	28
5.6	In vitro háromdimenziós (3D) tüdő modell (122) (Szabadalom: P0900819)	28
5.7	Rekombináns fehérjék és hatóanyagok	28

5.8	Sejt életképességi vizsgálat	29
5.9	RNS izolálás	29
5.10	cDNS szintézis.....	29
5.11	Valós idejű kvantitatív PCR (qPCR).....	30
5.12	Citokin mérés.....	31
5.13	Drogtranszporter fehérjék aktivitásának mérése	31
5.14	Karcolási sejt vándorlás vizsgálata.....	32
5.15	Sejtek migrációs kapacitásának vizsgálata	32
5.16	Matrigel inváziós kísérlet	32
5.17	Hematoxylin-eozin festés.....	33
5.18	Statisztikai kiértékelés	33
6	Eredmények	34
6.1	Erlotinib és ciszplatin kezelés hatása primer tüdő adenokarcinóma betegmintákon.	34
6.2	Erlotinib kezelés hatása tüdő adenokarcinóma sejtvonalakon	35
6.3	IL-6 és IL-8 expresszió primer humán tüdődagangokban	36
6.4	Ciszplatin és erlotinib kezelés hatása az IL-6 és az IL-8 expressziójára.....	37
6.5	Az IL-6 szerepe a tumorsejtek túlélésében.....	38
6.6	Az IL-6 szerepe a multidrogezisztenciában	39
6.7	A ciszplatin és az erlotinib kezelés hatása a sejt migrációra	41
6.8	Gyulladásos citokinek szerepe a sejt migrációban	42
6.9	Wnt jelátviteli molekulák szerepe a nem kissejtes tüdőrákban	44
7	Összefoglalás	47
8	Új eredmények, Következtetések.....	50
9	Irodalomjegyzék	53
10	Közlemények.....	63
10.1	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	63
10.2	Egyéb közlemények.....	63
10.3	Kongresszusi előadások jegyzéke	64
11	Köszönetnyilvánítás	65
12	Mellékletek.....	66

1 Rövidítések jegyzéke

2D: kétdimenziós

3D: háromdimenziós

7-AAD: 7-aminoactinomycin D

ABCA1: ATP binding cassette subfamily A member 1

ABCB1: ATP binding cassette subfamily B member 1

ABCC1: ATP binding cassette subfamily C member 1

ABCG2: ATP binding cassette subfamily G member 2

AC: adenocarcinoma (adenokarcinóma)

ALK: anaplastic lymphoma kinase (anaplasztikus limfóma kináz)

ATP7A: ATPase 7A

APC: adenomatous polyposis coli

BRAF: rapidly accelerated fibrosarcoma kinase member B

CBA: cytometric bead array (citometriás gyöngy esszé)

cDNS: complementary deoxyribonucleic acid (komplementer dezoxiribonukleinsav)

CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (citotoxikus T-limfocita antigén 4)

CTR1: copper transporter1 (réz transzporter 1)

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DMSO: dimethyl sulfoxide (dimetil-szulfoxid)

EGFR: epidermal growth factor receptor (epidermális növekedési faktor receptor)

EGFR TKI: Epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor (epidermális növekedési faktor receptor tirozin kináz gátló)

EML-4: echinoderm microtubule-associated protein-like 4

EMT: epithelial-mesenchymal transition (epitheliális-mesenchymális tranzíció)

FACS: fluorescence-activated cell sorting (fluoreszcencia aktivált sejtválogatás)

FBS: fetal bovine serum (borjú szérum)

FDA: Food and Drug Administration (Élelmiszer- és Gyógyszerellenőrző Hatóság)

FGM-2: fibroblast growth medium-2 (fibroblaszt növekedési médium 2)

FZD: frizzled

GFP: green fluorescent protein (zöld fluoreszcens fehérje)

GSK-3 β : glycogen synthase kinase 3 beta (glikogén szintetáz kináz 3 béta)

GTP: guanosine triphosphate (guanozin-trifoszfát)

HER/ErbB: human epidermal growth factor receptor (humán epidermiális növekedési faktor receptor)

IARC: International Agency for Research on Cancer

IL-6: interleukin-6

IL-8: interleukin-8

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LC: lung cancer (tüdőrák)

LCC: large cell carcinoma (nagysejtes karcinóma)

LRP5/6: low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6

MAF: multidrug resistance activity factor (multidrog rezisztencia aktivitás faktor)

MDR: multidrug resistance (multidrog rezisztencia)

MFI: mean fluorescence intensity (átlagos fluoreszcencia intenzitás)

MAPK: mitogen-activated protein kinase (mitogén aktivált protein kináz)

NF κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (nukleáris faktor kappa B)

NHLF: normal human lung fibroblasts (normál humán tüdő fibroblaszt)

NSCLC: non-small cell lung cancer (nem kissejtes tüdőrák)

OCT2: organic cationic transporter 2 (organikus kation szállító 2)

PBS: phosphate buffered saline (foszfát puffer)

PCP: planar cell polarity (poláris sejt polaritás)

PD-1: programmed cell death-protein 1 (programozott sejthalál fehérje 1)

PD-L1: programmed cell death-ligand 1 (programozott sejthalál fehérje ligand 1)

PE: phycoerythrin (fikoeritrin)

PFS: progression-free survival (progressziómentes túlélés)

PKC: protein kinase C (protein kináz C)

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma (peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma)

qPCR: quantitative polymerase chain reaction (kvantitatív polimeráz láncreakció)

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute 1640 médium)

S100A: S100 calcium binding protein A (S100 kalcium-kötő fehérje A)

SAEC: small airway epithelial cells (kislégúti epithél sejtek)

SAGM: small airway epithelial cell growth medium (kislégúti epithél sejt növekedési médium)

SCC: squamous cell carcinoma (laphámkarcinóma)

SCLC: small cell lung cancer (kissejtes tüdőrák)

TGF- β : tumor growth factor β (tumor növekedési faktor béta)

TNF- α : tumour necrosis factor alpha (tumor nekrozis faktor alfa)

VEGF-A: vascular endothelial growth factor A (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A)

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor A (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor)

WHO: World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

2 Bevezetés

2.1 A tüdődaganatok kialakulása

A tüdődaganatok a légző felület epithéliális sejtrétegéből kialakuló rosszindulatú megbetegedések (1). A primer tüdődaganatok leggyakrabban a főhörgőket (centrális tumor), valamint a hörgőcskéket, illetve a tüdőhólyagocskákat borító hámrétegből indulnak ki (perifériális tumor) (2). Hisztológiai osztályozás alapján két fő csoportot különböztetünk meg, a nem kissejtes (NSCLC) és kissejtes (SCLC) daganatok csoportját. Az SCLC a tüdődaganatos esetek 10-15%-át képezi, amely rendkívül agresszív sejtípusú daganat és szinte kizárólag csak dohányzók körében fordul elő (3). Az esetek döntő többségét (80-85%) azonban az NSCLC csoportjába tartozó daganatok teszik ki (4).

Az NSCLC-nek további három altípusa van, az adenokarcinóma (AC), a squamózus- (SCC) és a nagysejtes tüdőkarcinóma (LCC).

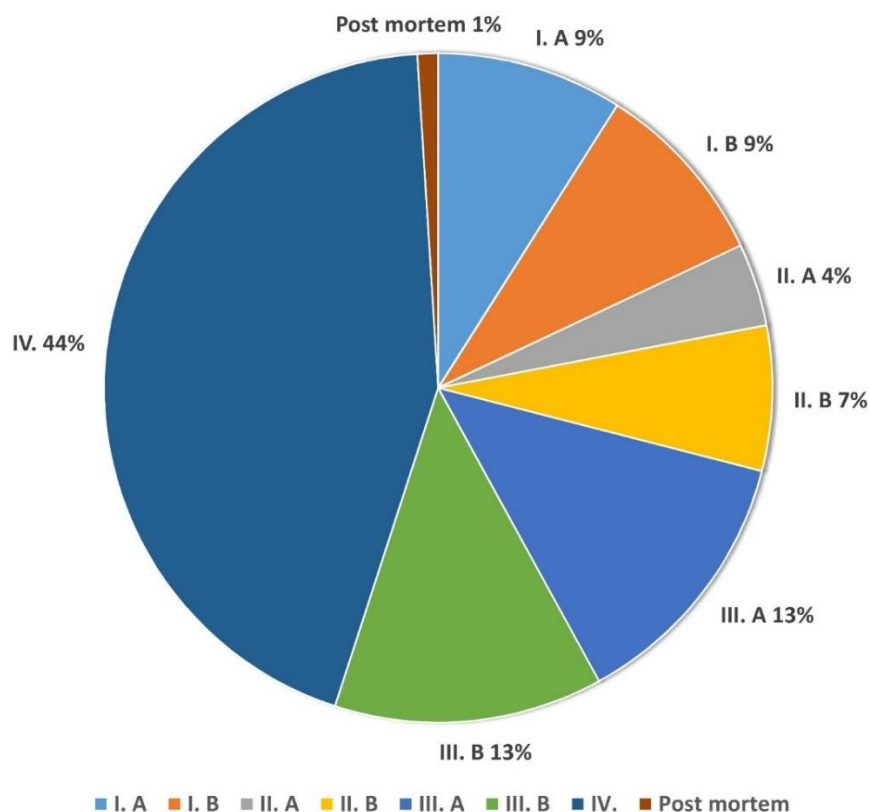
Az NSCLC túlnyomó többségét az adenokarcinóma (AC) szövettani altípus teszi ki. Az AC gyakorisága folyamatosan növekedett az elmúlt években, és jelenleg ez a leggyakrabban előforduló NSCLC, különösen nők és nem dohányzók esetében. Heterogén megjelenésű, számos szövettani altípusa ismert, mint pl.: acinarius, papillaris, mucint termelő szolid forma. Többségében perifériális elhelyezkedésű és korán képez áttétet. A squamózus sejtes karcinóma (SCC) avagy laphámkarcinóma kialakulása szorosan összefügg a dohányzással és többségében centrális elhelyezkedést mutat. Az NSCLC harmadik és egyben legritkább előfordulású altípusa a nagysejtes tüdőrák (LCC), amely jellemzően alacsony differenciáltságú sejtekből álló gyors növekedésű, agresszív daganat (5). A tüdőkarcinómák jellemzően a csontban, az agyban, a májban és a mellékvesékben képeznek áttétet. Az elmúlt években az agyi metasztázisok egyre gyakrabban fordulnak elő EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) vagy ALK (anaplasztikus limfóma kináz) mutációval rendelkező adenokarcinómás betegek körében, míg a laphámkarcinóma számos esetében lokális kiterjedtség figyelhető meg (6).

2.2 A tüdődaganatok stádiumai

Az IARC (International Agency for Research on Cancer) Globocan statisztikai rendszer 2012. évi adatai alapján a világ vezető megbetegedési és halálozási arányszámát a daganatos megbetegedések okozzák, ebből is kiemelkedően a tüdődaganatok. Sajnálatos tény, hogy hazánk első helyen áll úgy a tüdődaganat előfordulása, mint a halálozás tekintetében mindkét nemre összesítve (7). A hazai tüdőrák adatokból jól látszik, hogy a tüdőrákos megbetegedések aránya folyamatos növekedést mutat a nőknél, valamint egyre gyakoribb a fiatal nők esetében.

A felfedezett tüdődaganatokat négy súlyossági stádium alapján osztályozzák: I. stádium esetén a daganat csak a tüdő állományát érinti, tüdőszövet vagy pleura határolja, nyirokcsomóra nincs áttérés. II. stádium: a daganat beszűrődik a pleurába, ráterjed a főhörgőre és a közeli nyirokcsomókra. III. stádium: a daganat lokalizációja kiterjed a nyirokcsomókra, a mellkasfalra, a rekeszizomra és a szívburokra. A nyirokcsomók érintettsége alapján megkülönböztetünk IIIa és IIIb stádiumokat. IIIa stádiumnál a daganat kialakulási helyéhez közeli nyirokcsomók érintettek, míg a IIIb stádiumnál az attól távolabbiak. A legdrasztikusabb kimenetelű IV. stádium esetén a daganat már mindkét tüdőfelet érinti és áttétet képez a távolabbi szervekre is (8).

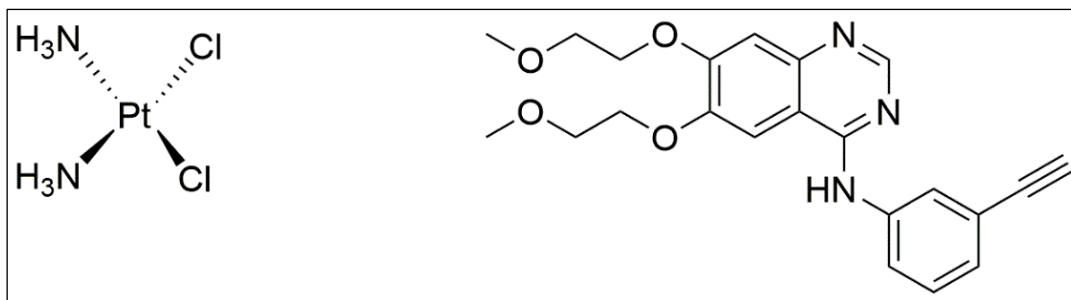
A magas halálozási ráta egyik fő oka az, hogy az újonnan felfedezett tüdőrákos esetek közel 50%-át már végstádiumban (IV. stádium) diagnosztizálják (9) (**1. ábra**). A késői felismerés következtében a tüdőrákos betegek 5 éves túlélése csak 10-15%-ra tehető (10).



1. ábra: A tüdőrák stádiumai a betegség felfedezésekor (a Korányi Bulletin, 2019 adatai alapján).

2.3 A tüdődaganatok mutációs háttere

Az elmúlt évtizedekben a molekuláris diagnosztikai módszerek fejlődésének köszönhetően az NSCLC alcsoportjai molekuláris szinten is tovább osztályozhatóak az aktiváló („driver”) mutációk azonosítása révén. Az eddigi hisztológiai besorolás mellett teret hódító új, molekuláris klasszifikáció a terápiaválasztás tekintetében is változást hozott (11). A hagyományos kezelési eljárások mellett új lehetőséget biztosít a molekuláris célzott terápiák alkalmazása a tüdőrák kezelésében (**2. ábra**). A tumorsejtekre jellemző korlátlan osztódási képesség folyamatosan stimulált proliferációs és túlélést támogató jelátviteli mechanizmusok révén valósul meg, amelyet a sejtfelszíni receptorokhoz kötődő növekedési faktorok, valamint a jelátvitelért felelős intracelluláris tirozin-kináz doménekben fellépő aktiváló mutációk idéznek elő (12).



2. ábra: A ciszplatin és az erlotinib kémiai szerkezete.

2.3.1 KRAS mutáció

A KRAS (kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) a RAS proto-onkogén családba tartozik, amely egy kisméretű GTPáz (guanozin-trifoszfátáz) fehérjét kódol (13). Számos guanin-kötő fehérjéhez hasonlóan GDP-kötő (guanozin-difoszfát) inaktív és GTP-kötő aktív alakban léteznek (14). A Ras-fehérjék aktivációját a növekedési faktorok receptoraikhoz való kötődése idézi elő. A RAS-GTP komplex számos downstream jelátviteli útvonalat aktivál, mint például a Raf-MEK-Erk, PI3K-Akt-mTOR, RalGDS-RalA/B és a TIAM1-RAC1 útvonalakat (15). KRAS onkogén mutáció leggyakrabban a tüdő adenokarcinómára jellemző (30%), a planocelluláris szövettani alcsoportban ritkább előfordulást mutat (5%). Kaukázusi betegpopulációban és dohányosok körében elterjedtebb (16). A KRAS gén mutációja esetén nem alkalmazható az EGFR-ellenes terápia, mivel ezen mutációk az EGFR downstream

útvonalainak folyamatos aktiváláshoz vezetnek, így a KRAS onkogén mutáció az EGFR TKI terápiára negatív prediktív értékkel bír (17). NSCLC-ben a legtöbb KRAS génmutáció egyetlen aminosavcserével jár a 12-es kodonban (80%), kisebb mértékben a 13-as és 61-es kodonokban (18).

2.3.2 EGFR mutáció

A tüdőrák kezelésében a citotoxikus terápia mellett ígéretes célponttá vált az EGFR mediálta jelátviteli útvonala, amely a tüdőkarcinogenezis folyamatában is szerepet játszik. Az EGFR a HER/ErbB sejtfelszíni receptor tirozin-kinázok családjába tartozik (19), amely egy extracelluláris ligand-kötő helyből, egy transzmembrán régióból és egy intracelluláris komponensből áll, amely a tirozin-kináz domént tartalmazza (20). A ligand kapcsolódása a receptor homo-, vagy heterodimerizációjához vezet, amelynek következményében az intracelluláris tirozin-kináz domén autofoszforylálódik. Ez a folyamat számos jelátviteli útvonaltal aktivál, többek között a PI3K/AKT/mTOR, a RAS/RAF/MAPK és a JAK/STAT útvonaltalakat, amelyek sejtosztódást, áttétképződést, és sejttúlélést indukálnak. Az EGFR aktiváló mutációja a tirozin-kináz domén folyamatos aktiválását eredményezi, amely serkenti a tumorsejtek kontrollálatlan osztódását és a tumor progresszióját. Az EGFR gátlására kis molekulájú tirozin-kináz gátlók (erlotinib, gefitinib), valamint a receptor extracelluláris doménjét gátló monoklonális antitestek (cetuximab) állnak rendelkezésre (21). Az epitheliális eredetű daganatok közül a nem kissejtes tüdődaganatokban az epidermiális növekedési faktor receptor overexpresszió gyakorisága 40-80% (22). A szövettani altípusok közül az EGFR mutációja leggyakrabban a tüdő adenokarcinóma altípusra jellemző, valamint nőknél, nemdohányzó egyedekben és az ázsiai populációban (23). NSCLC-ben az EGFR mutációk a tirozin-kináz domén első négy exonján (exon 18-21) fordulnak elő, leggyakrabban a 19-es exon deléciója (~45%) és a 21-es exon pontmutációja az exon 858-as pozícióján (L858R) (~40%). Ritkább előfordulást mutatnak a 20. exonon bekövetkező frame duplikációk és inszerciók (5-10%). A másodlagos mutáció kialakulásáért két gyakori mutáció felelős: a 20-as exon T790M mutációja és a MET amplifikáció, előbbi az EGFR TKI kezelésre adott rezisztenciával hozható összefüggésbe (24).

2.3.3 ALK génátrendeződés

2007-ben új fúziós onkogén azonosítása került napvilágra nem kissejtes tüdőkarcinómás betegek esetében (25). Az érintettek 2-7 %-ban a 2-es kromoszóma rövid karján történő inverzió az ALK génnek az EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) génnel való fúzióját eredményezte. Az EML4-ALK fúziós gén az ALK transzmembrán fehérje tirozin-kináz doménjét tartalmazza, amelyhez a fúziós partner kapcsolódása ligand-független dimerizációhoz vezet. Ennek eredményeképpen az ALK tirozin-kináz domén aktívvá válik, így az onkogén fehérje olyan jelátviteli útvonalak aktiválásához vezet (PI3K-AKT, MAPK-ERK), amelyek a tüdőkarcinogenezis folyamatában is részt vesznek. Az NSCLC-n belül is az adenokarcinóma szövettani formájában fordul elő leggyakrabban, nem dohányzó vagy könnyű dohányos fiatal betegekben. Az ALK átrendeződés, az EGFR és a KRAS mutációk ritkán mutathatók ki együttesen, általában kölcsönösen kizárják egymást (26).

2.3.4 B-Raf mutáció

Noha a KRAS mutációk évtizedek óta ismeretesek voltak a humán daganatok kapcsán, a BRAF (rapidly accelerated fibrosarcoma kinase member B) onkogén mutációját csak 2002-ben fedezték fel. A BRAF gén egy olyan szerin-treonin kinázt kódol, amely a RAS fehérjén keresztül a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli útvonal aktivációját váltja ki (27). A BRAF mutációk többsége a 15. exonon található, amelyek a 600-as kodonnál (V600E) a glutamin valinra történő cseréjét eredményezik. A BRAF génjében bekövetkező mutáció ligand-kötés hiányában is a MAPK jelátviteli útvonal folyamatos aktivitását eredményezi, amely a tumorsejtek megnövekedett túléléséhez és fokozott osztódásához vezet (28). Klinikai vizsgálatok eredményei arra engednek következtetni, hogy az EGFR, KRAS és BRAF onkogének szomatikus mutációi kölcsönösen kizárják egymást (29), (30). Melanómában leggyakoribb az előfordulása (50-70%) (31), míg a tüdődaganatok 1-3%-ban van jelen (32), tüdő adenokarcinómában 2-4%-ban fordul elő, ahol az esetek közel felében a gén V600E mutációja áll fenn (33).

2.4 A tüdődaganatok terápiás lehetőségei

A tüdődaganatok kezelési lehetőségei napjainkra igen kiszélesedtek, ennek ellenére a gyógyulási és az életben maradási esélyek nagyon csekélyek. A terápiás eljárások függenek a betegség stádiumától, a hisztológiai altípusától, valamint a beteg fizikai állapotától.

Kezdeti stádiumú (I-II) és lokálisan előrehaladott (IIIA) nem kissejtes tüdődaganatok esetében a sebészi eltávolítás szolgál elsődleges kezelésként, amelynek eredményeit javítja a kiegészítő kezelésként alkalmazott adjuváns és neoadjuváns terápia. Habár a sebészi beavatkozás a korai stádiummal diagnosztizált betegeknek jó esélyt nyújt a gyógyulásra, sok esetben azonban mégsem alkalmazható. Az előrehaladott életkor, a rossz általános állapot vagy súlyos kísérőbetegségek esetén csak önálló sugárkezelés javasolható, viszont csekélyebb túlélési esélyt eredményez a sebészi eljárásokhoz képest. A végstádiumú (IV) betegek kezelési lehetőségére a kemoterápia az egyetlen mód (34).

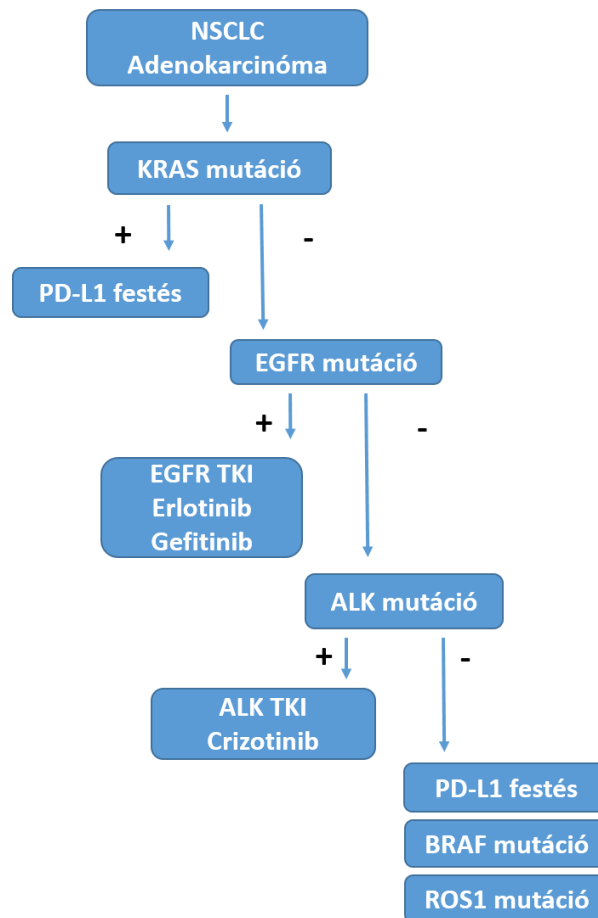
Az NSCLC első vonalbeli kemoterápiás kezelési standardját jelenleg is a platina alapú kombinált citotoxikus terápia nyújtja (35). A platina származékok közül a ciszplatin (cisz-diammin-dikloro-platina (II)) és a karboplatin terápiás alkalmazása a legelterjedtebb. A ciszplatin citotoxikus hatását elsődlegesen a DNS molekulához kötődve fejti ki. A purin bázisok N7 helyeihez történő kötődés a DNS-láncok közötti és belüli keresztkötések kialakulását idézi elő, amely gátolja a DNS replikációt és transzkripciót. Ez a térszerkezetváltozás végül a sejtosztódás gátlásához és apoptózishoz vezet (36). A ciszplatin felfedezése Michele Peyrone nevéhez fűződik, aki 1844-ben elsőként szintetizálta a vegyületet, biológiai hatását később Barnett Rosenberg fedezte fel *Escherichia coli*-n végzett kísérletein 1965-ben (37). Sejtosztódást gátló és tumor ellenes aktivitása hamar megbizonyosodott (38), így az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerellenőrző Hatóság (U.S. Food and Drug Administration, FDA) már 1978-ban engedélyezte rákellenes szerként történő használatát elsősorban here-, petefészek-, és tüdőrákok esetén (39). A Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group által kiadott tanulmány volt az első, amelyben először írták le, hogy a ciszplatin alapú kemoterápia előrehaladott stádiumban lévő NSCLC betegeknél a halálozási kockázatot 27%-kal csökkenti, és szignifikáns javulást mutat az egyéves túlélés, valamint a medián túlélés viszonylatában a támogató ellátásban részesülő betegekhez képest (40).

A LACE (Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation) metaanalízis szerint a II-es és III-as onkológiai stádiumban megoperált NSCLC betegeknél a műtétet követő ciszplatin alapú adjuváns terápia 5,3%-kal növelte az ötéves túlélést a kontroll csoporthoz képest (41).

Terápiás alkalmazását azonban nagymértékben csökkentik citotoxikus mellékhatásai, mint például az oto-, neuro-, és nefrotoxicitás (42). A ciszplatin sejtekbe történő bejutása részben passzív diffúzióval valósul meg, de az elmúlt évek kutatásai arra következtetnek, hogy ez a folyamat aktív transzport révén is megvalósulhat. Számos membránfehérje köthető a ciszplatin plazmamembránon, valamint a sejtbe való transzportjához, mint például a CTR1 (copper transporter 1), a CTR2 (copper transporter 2), az OCT2 és OCT6 (organic cation transporter 2/6) transzporterek (43). A hatóanyag felvételét azonban ellenirányú membránfehérjék akadályozhatják, amelyek elsődleges célja a citotoxikus szer kipumpálása és visszajuttatása az extracelluláris térbe. A ciszplatin efflux folyamatában ismert membránfehérjék közé sorolhatóak bizonyos ABC (ATP-binding cassette) típusú fehérjék, az ABCG2 (ATP-binding cassette sub-family G member 2), az ABCC2 és ABCC6, emellett az ATP7A és ATP7B transzporterek (P-type copper-transporting ATPases) (44), (45). Ezen multidrog fehérjék plazmamebránban zajló, aktív, energiát igénylő működése a leggyakrabban előforduló sejtes rezisztencia mechanizmus, amely védelmet nyújt a tumorsejtek károsodása ellen.

2.4.1 Adenokarcinóma kezelése

A számos szövettani megjelenési formán túlmenően ez az alsóport genetikailag is igen sokszínű. A génhibák és a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli útvonalak ismeretében az adenokarcinóma altípus molekuláris szinten is továbbosztályozható. A mutáció analízis a génhibák gyakoriságának sorrendjében: KRAS, EGFR, ALK, BRAF történik (**3. ábra**), azonosításuk a célzott biológiai terápia alkalmazásának alapjául szolgál.



3. ábra: Az adenokarcinóma szövettani altípus mutáció analízisének sorrendje.

2.4.1.1 KRAS mutáció kezelése

Annak ellenére, hogy a KRAS gén aktiváló mutációját már 35 évvel ezelőtt leírták (46) és a gén mutációja az NSCLC esetek 25-30%-ban előfordul, a KRAS mutációra jelenleg még nincs célzott terápiás kezelés (47). Éppen ezért számos vizsgálat irányul a KRAS mutáció kezelési lehetőségeinek felderítésére. Az egyik lehetséges célpontnak a farneziltranszferáz gátlását tekintették, mivel a KRAS gén farnezilációja szükséges a sejtmembránhoz való

transzlokációjához és aktívvá válásához. Míg az egérmodellben végzett kísérletek eredményei hatékonyságot mutattak (48), addig a humán klinikai vizsgálatok során ez a hatás nem volt megfigyelhető (49). A jelátviteli útvonal KRAS alatti tagjainak, így a BRAF, MEK-ERK, PI3K-AKT gátlására irányuló BATTLE-2 vizsgálat eredményei szintén alulmaradtak az elvárttól (50). A KRAS fehérje direkt gátlását sokáig nem tartották lehetségesnek, amelyet a direkt módon támadható kötőhelyek hiányának tulajdonítottak (51), de az elmúlt évek során felfedezésre került egy olyan alloszterikus kötőhely, amely egy alloszterikus cisztein 12 (G12C) mutációspecifikus gátlószert kifejlesztését és ezáltal a KRAS inaktív formában történő stabilizációját tette lehetővé (52), (53). Ezen vegyületek továbbfejlesztése megteremtheti a lehetőséget egy olyan hatóanyag előállításának, amely a KRAS mutációban szenvedő betegek kezelésére szolgálhat.

2.4.1.2 EGFR mutáció kezelése

Az EGFR mutációval bíró betegek elsővonalbeli kezelésére az erlotinib szolgál a hazai gyakorlatban. Az erlotinib egy szájon át adható anilinokinazolinszármazék, amely a tirozin-kináz kompetitív gátlása révén a sejtproliferáció gátlásához és apoptózishoz vezet (54), (55). Az erlotinib kezelés hatékonyságának vizsgálatát korábbi sikertelen kemoterápiás kezelés után a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group BR.21 jelű nemzetközi, randomizált, fázis III vizsgálata igazolta, amely IIIB és IV. stádiumú betegek részvételével történt. Az erlotinibbel kezelt betegcsoport összesített válaszaránya szignifikánsan nagyobb volt a placebo kapó betegcsoportéhoz képest, növelve a túlélési lehetőséget kezdeti terápiás sikertelenség esetén (56). Az erlotinib kezelés hatékonyságának vizsgálatára platina alapú kemoterápiás kezeléssel összevetve az OPTIMAL randomizált, fázis III, nyílt vizsgálatban került sor, amelyben ázsiai, EGFR aktiváló mutációt hordozó, IIIB és IV. stádiumú NSCLC-ben szenvedő betegeket figyeltek meg, akik nem részesültek korábbi kezelésben. A progressziómentes túlélés (PFS) tekintetében az erlotinib szignifikánsan jobbnak bizonyult a platina alapú kemoterápiás kezeléssel szemben (57). Hasonló vizsgálat európai etnikumban az EURTAC nemzetközi, prospektív, multicentrikus, randomizált, fázis III vizsgálat, amelyben az erlotinib szignifikánsan hosszabb PFS-t és szignifikánsan alacsonyabb progressziót eredményezett a platina alapú kettős kemoterápiával szemben elsővonalbeli kezelésben (58). Az erlotinib hatásosságát elsővonalbeli kemoterápiát követő fenntartó kezelésként nem kissejtes tüdőrákban a randomizált, kettős-vak, placebo SATURN vizsgálatban

értékelték. Bár az erlotinib az EGFR mutációval rendelkező betegcsoportban mutatott rendkívüli hatékonyságot a PFS tekintetében, az EGFR-mutáció negatív csoportban is hatékonynak bizonyult (59).

2.4.1.3 ALK mutáció kezelése

Az ALK-pozitív betegcsoport számára mára már számos ALK-TKI alkalmazása elérhető a klinikai gyakorlatban. A crizotinib volt az első molekuláris célzott terápia, amelyet az FDA 2011-ben törzskönyvezett kemoterápia-rezisztens ALK-pozitív NSCLC-ben szenvedő betegek esetében (60). A crizotinib egy több támadáspontú tirozin-kináz inhibitor, amely az ALK gátlása mellett a MET és ROS1 tirozin-kinázok gátlására is képes. Klinikai fázis vizsgálatok eredményei 7-12 hónap közötti progresszió-mentes túlélést mutattak lokálisan előrehaladott NSCLC-s betegcsoportban, de a tartós terápiás választ követően idővel gyógyszerrezisztencia volt megfigyelhető (61). Ennek hátterében elsősorban az ALK tirozin-kináz régiójának másodlagos mutációja és a gén amplifikációja áll, de más, az ALK-tól független rezisztencia mechanizmusokat is leírtak, amely alternatív jelátviteli útvonalak (EGFR, KIT) aktiválódásához vezet (62). E rezisztencia mechanizmusok kivédésére szelektivebb és hatásosabb ALK-TKI gátlókat fejlesztettek ki. A második generációs ALK inhibitorok (ceritinib, alectinib, brigatinib) törzskönyvezésével sikereket értek el a kezdeti crizotinib kezelés ellenére progrediáló, valamint a kezelésre nem reagáló betegcsoportoknál, míg a harmadik generációs lorlatinib az eddigi ALK inhibitorokkal szemben fellépő, rezisztenciát okozó mutációk ellenére is hatásosnak bizonyult (63).

2.4.1.4 BRAF mutáció kezelése

A BRAF onkogén mutációjának azonosítása számos kis molekulású inhibitor fejlesztését vonta maga után. A vemurafenib volt az első olyan BRAF gátlószer, amelyet törzskönyveztek áttétes BRAF V600E mutációt mutató melanóma esetén. Ezt követően 2013-ban egy újabb BRAF gátlószer, a dabrafenibet, valamint a MEK gátlására szolgáló trametinib használatát törzskönyvezték a BRAF V600E mutációt hordozó melanóma kezelésére. A melanóma kezelésében elért sikerek reménykeltőek voltak a BRAF mutációt hordozó NSCLC esetén is. Előrehaladott BRAF V600E mutációra pozitív metasztatikus NSCLC kezelésére a dabrafenib trametinibbel való kombinációja bizonyult a leghatékonyabbnak (64).

2.4.2 Laphámsejtes tüdőkarcinóma kezelése

Az adenokarcinóma mellett a laphámsejtes karcinóma a leggyakoribb az NSCLC-ben, az esetek 30%-át teszi ki (65). Az NSCLC kezelésében a célzott terápiás szerek bevezetése drasztikus változásokat eredményezett a tüdő adenokarcinómában szenvedő, specifikus mutációs háttérrel rendelkező betegek esetében. E célzott szerek alkalmazása több esetben kiváló hatékonyságot mutatott a kemoterápiával szemben. A laphámsejtes karcinómák nem mutatnak átfedést az adenokarcinómában tapasztalt mutációkkal (66), a genetikai eltérések egyik csoportját jellemzően a membrán receptorokat érintő elváltozások alkotják: FGFR1 amplifikáció (22%), DDR2 mutáció (4%), MET amplifikáció (5%), MET mutáció (1%). A második csoport a jelátviteli útvonalakban történő változásokat öleli fel: PIK3CA amplifikáció (33 %), PTEN mutáció (10%), LKB1 mutáció (5%), AKT1 mutáció (1%). Végül a harmadik csoportot a transzkripciós faktorokban megfigyelt eltérések alkotják: TP53 (51 %), SOX2 (23%) (65). A hagyományos citotoxikus terápián túlmenően számos vizsgálat igazolja az immunterápia egyre növekvő szerepét az SCC kezelésben. A PD-1 gátló nivolumab hatékonyságát igazoló klinikai vizsgálatok révén gyorsított eljárásban törzskönyvezték a szert előrehaladott SCC betegek esetében, akik a korábbi platina alapú kezelést követően progresszív állapotot mutattak. A betegség kezelésére egy másik lehetőséget biztosít az angiogenezis gátlására szolgáló szerek alkalmazása. Habár a VEGF-gátló bevacizumab használata semmiképpen nem javasolható a betegség kezelésére, mivel az SCC-ban szenvedő betegeket veszélyeztetheti a kezelés során fellépő súlyos, egyes esetekben akár fatális kimenetelű tüdővérzés (haemoptysis) (67), (68), a VEGFR2 gátlását célzó ramucirumab azonban reménykeltő lehet. A jövőbeli célpontok táborát az FGFR, IGF és PI3K-AKT jelátviteli útvonalak gátlását szolgáló szerek képezik (69).

2.4.3 Nagysejtes tüdőkarcinóma kezelése

Az NSCLC esetek kisebb részét a nagysejtes tüdődaganatok alcsoportjába tartozó, rossz differenciáltságú tüdőkarcinómák alkotják. Diagnózisa rendszerint kizáráson alapul, mivel nem mutatja sem a laphámrák, sem az adenokarcinóma, sem pedig a kissejtes tüdőrák jellegzetességeit (70). Rendszerint gyors ütemű növekedést mutat, így a betegek gyógyulási kilátásai sajnos csekélyek (71). A WHO (World Health Organization) szövettani osztályozása szerint öt külön változata létezik, amelyek közül a legfőbb altípusok a nagysejtes neuroendokrin karcinóma és a basalooid karcinóma (72). Noha a molekulárisan eltérő tulajdonságok

megkülönböztetik az LCC variánsait az egyéb tüdőrák altípusoktól, kezelése az NSCLC kezelési irányelve alá tartozik (73).

2.4.4 Immunterápia

A tüdőrák kezelésében jelentős sikert mutat számos, negatív immunellenőrzőpont ellen irányuló antitest terápia, amelyek közül a legígéretesebbnek az anti-PD-1, anti-PD-L1 és anti-CTLA-4 antitest terápia bizonyul. A PD-1 útvonal működését két speciális fehérje képezi: az immunsejt felszínén kifejeződő, a programozott sejthalálban szerepet játszó PD-1 (programme cell death receptor-1) receptor és a tumorsejt felszínén kifejeződő PD-L1 (programme cell death-ligand 1) ligand. A tumorsejt felszínén található PD-L1 ligandnak a T-sejt PD-1 receptorához való kötődése gátolja a T-sejtek aktivitását, ezáltal csökkent T-sejt válaszhoz és a daganat további progressziójához vezet (74). A receptor-ligand kapcsolódását gátló specifikus ellenanyagok (nivolumab, pembrolizumab, BMS-936559) révén viszont a T-sejt hatékony tumorelles immunválasza megmarad. Hasonlóképpen, a T-sejt felszínén kifejeződő CTLA-4 gátlására szolgáló monoklonális antitest (ipilimumab) elősegíti a T-sejtek aktivációját, proliferációját és a tumorba történő infiltrációját (75). Míg a célzott, EGFR tirozin-kináz inhibitorok terápiás hatékonysága elsősorban nem dohányos, adenocarcinomás betegek kezelésében mutatott jelentős sikereket, addig az immunterápia dohányos, laphámrákkal diagnosztizált betegek körében nyújt kedvező terápiás választ (76).

3 A mikrokörnyezet szerepe a tüdődaganatok kialakulásában és progressziójában

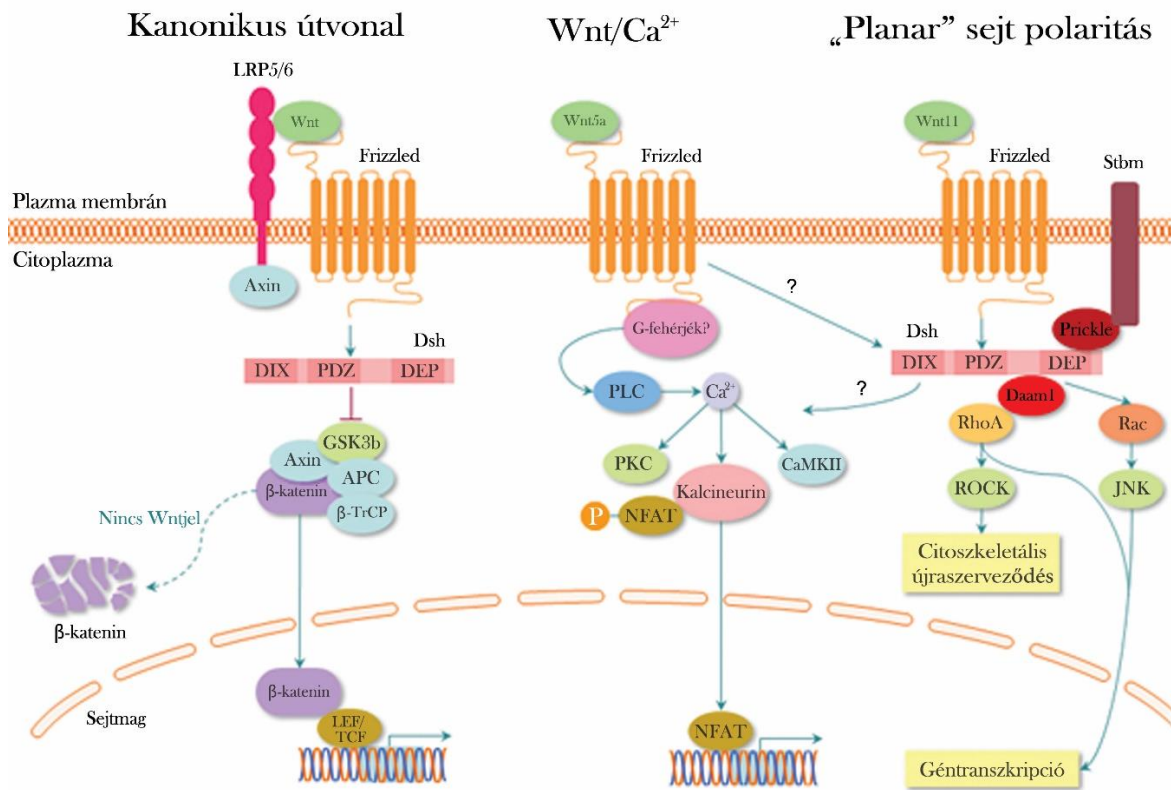
3.1 A Wnt jelátvitel

A Wnt fehérjecsalád tagjai ciszteinben gazdag, szekretált gliko-lipoproteinek (77). A Wnt fehérjék a Frizzled (Fzd) receptorokhoz és számos ko-receptorhoz, mint például lipoprotein receptor-related protein (LRP)-5/6, Ryk, vagy Ror2 való kötődés révén indítják el az intracelluláris jelátviteli folyamatokat. Emberben 19 Wnt fehérje és 10 Frizzled receptor ismeretes (78). A ligand-receptor kötődés révén két fő jeltovábbítási rendszer aktiválása szabályozza a génátíródást (79) (**4. ábra**). Az egyik az ún. kanonikus jelátviteli útvonal, amely β -katenin függő. A kanonikus Wnt-ok hiányában a glikogén szintáz kináz -3β (GSK-3 β) aktív marad és a β -katenin az Axin-APC-GSK-3 β fehérje komplex révén szerin és treonin aminosavakon foszforilálódik majd proteoszómális degradáció eredményeképpen lebomlik. A Wnt-ok jelenlétében azonban a Wnt-Fzd-LRP receptor komplex aktiválja az ún. Dishevelled (Dvl) citoplazmatikus jelátviteli fehérjét, amely a GSK-3 β gátlásához vezet. A GSK-3 β gátlása a β -katenin stabilizációjához és citoplazmatikus szintjének emelkedéséhez vezet. Ennek következtében a szabad, citoszólikus β -katenin a sejtmagba transzlokálódik és aktív transzkripciós komplexet képez a TCF/LEF transzkripciós faktor családjával (80). A másik, az ún. nem-kanonikus útvonal a β -katenintől függetlenül működik és további két jelátviteli útra ágazik. Attól függően, hogy milyen intracelluláris mediátorok vesznek részt a jeltovábbításban megkülönböztetünk a kalmodulin kináz II és protein kináz C-n keresztül aktiválódó Wnt/Ca²⁺ útvonalat, valamint a Jun N-terminális kináz (JNK) által aktivált PCP (polar cell polarity) útvonalakat (81). A jelátviteli útvonalak aktiválása alapján a Wnt molekulákat csoportosíthatjuk kanonikus (Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10b, Wnt16) és nem-kanonikus (Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt11) Wnt-okra (82).

A Wnt jelátviteli útvonalaknak alapvető szerepe van a sejtek proliferációjában, polaritásában és a sejtsors determinációjában az embrionális fejlődés és a szövetek homeosztázisa során, de számos irodalom bizonyítja, hogy fontos szerepe van a daganatképződés folyamataiban is (83). Nem kissejtes tüdőcarcinómák vizsgálata során fény derült arra, hogy kialakulása szorosan összefügg valamely Wnt molekula megnövekedett mennyiségével, vagy a jelátviteli útvonal valamely inhibitorának lecsökkenésével. Kazutsugu és munkatársai a Dvl-3 jelátviteli molekula túltermeléséről számoltak be az NSCLC-k 75%-ában, amely a Wnt útvonal pozitív regulátoraként kulcsfontosságú szereppel bír a jelátvitel aktiválásában (84). További vizsgálatok a Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt5a, Wnt11, β -katenin és

a Frizzled-8 túlzott kifejeződését erősítették meg NSCLC esetén (80). A Wnt5a szélesebb feladatkörének bizonyítékaként az EMT és ezáltal a metasztázisképződés indukálásában betöltött szerepét is leírták a β -katenin-függő kanonikus útvonal aktiválódása révén (85).

Az említett Wnt család tagjainak overexpressziójával ellentétben a tüdőcarcinóma negatív regulátoraként számon tartott Wnt-7a kifejeződése a legtöbb tüdőrák sejtvonalban és daganatban alulszabályozott (86). A Wnt jelátviteli útvonal antagonisták, mint például a DKK-3, a WIF és az sFRP csökkent mennyiségéről szintén beszámoltak a különböző tüdődaganat altípusok esetén (87).



4. ábra: A Wnt útvonalak jelátviteli folyamatainak összefoglalása.

3.2 Gyulladásos citokinek

A citokinek olyan szekretált kemotaktikus fehérjék, amelyeknek a sejt-sejt közötti kommunikációban és elsősorban az immunválasz szabályozásában van alapvető szerepük (88). A citokinek családjába tartozó interleukin-6 (IL-6) egy kis molekulású glikoprotein (89). Elsősorban makrofágokban, T-sejtekben, B-sejtekben, fibroblasztokban, valamint számos tumorsejtben termelődik. Szintézisét a prosztaglandin E2 (PGE2), a transzformáló növekedési faktor béta (TGF- β), az IL-1 β és lipopoliszacharidok stimulálják. Sokrétű biológiai szerepet öltő, ún. pleiotróp hatása révén elsősorban immunológiai, hematopoetikus, gyulladásos és onkogenetikus folyamatokban vesz részt. Szerepe van az effektor T-sejtek fejlődésében, az aktivált B-sejteknek antitesttermelő plazmasejteké váló átalakulásában, a CD8⁺ T-sejtek citotoxikus T-sejteké váló differenciálódásában, a csontvelőbe érve a megakariociták érését és a vérlemezkék kialakulását indukálja (90).

Az IL-6 citokin családba tartozó molekulák közös jelátvivő elemként a glikoprotein 130 (gp130) transzmembrán fehérjét használják és a májban akut fázis fehérjék termelését indukálják. Az IL-6 receptor elsősorban T-sejteken, aktivált B-sejteken, monocitákon és hepatocitákon expresszálódik (91). Az IL-6 a sejtfelszínén található IL-6 receptorhoz (IL-6R) kötődik, amely egy ligandkötő α -alegységből (IL-R α) és egy jelátvivő receptor alegységből (gp130) áll. A ligand kötődése a gp130 jelátvivő lánc homodimerizációját indukálja, így az aktivált, jelátviteli folyamat megindítására alkalmas receptorkomplexet két gp130, két α -lánc és két citokin molekula hexamer egysége alkotja (90). A gp130 aktiválódása további downstream jelátviteli útvonalak, így például a Janus kináz (JAK) és a JAK-SHP-2-mitogén-MAPK útvonalak aktiválódásához vezet.

A gyulladásos folyamatok és az immunválasz szabályozásán kívül az IL-6 fontos szerepet játszik a daganatok kialakulásában is. Számos esetben a tumor mikro környezetében magas IL-6 szint figyelhető meg, ahol a karcinogenezis folyamatát szabályozza, elősegítve a tumorsejtek túlélését, proliferációját, migrációját, valamint az angiogenezis és a metasztázis folyamatát (92). Chin Hao Chang és munkatársai leírták, hogy előrehaladott NSCLC-ben szenvedő betegek vérplazmájában a megemelkedett IL-6 szint prognosztikus markerként szolgál a túlélést illetően, valamint hogy a magas IL-6 szint csökkent kemoterápiás válasszal párosul (93). Az IL-6 emeli a tüdő tumorsejteknek a kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztenciáját, valamint fokozza ABCG2 multidrog rezisztencia fehérje és a Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xl antiapoptotikus fehérjék expressziós szintjét az ATM/NF- κ B útvonal aktiválása révén (94). Kunioku és munkatársai leírták, hogy patkány tumorsejtekben az IL-6 csökkenti a sejtek szenzitivitását

kemoterápiás szerekre, mint például paclitaxelre és ciszplatinra a PI3K/AKT és STAT3 útvonalak aktiválása révén (95).

A kemoterápiás kezelés a tumorsejtek elpusztításán túl indukálhat olyan jelátviteli útvonalakat, amelyek kedveznek a gyulladási folyamatok beindításának és így hozzájárulnak a daganat továbbterjedéséhez. A ciszplatin a gyulladási folyamatokat az NF- κ B útvonalon keresztül aktiválja. Az NF- κ B szabályozza a gyulladási folyamatokban szerepet játszó gének, mint például az IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α átírását, amelyek a karcinogenezis számos folyamatával összefüggésbe hozhatóak. Míg az IL-1, IL-6 és a TNF- α elsősorban a tumorsejtek proliferációjában és inváziójában játszanak szerepet, addig az IL-8 elsősorban az angiogenezis folyamatát segíti elő (96).

3.3 ABC transzporter fehérjék

A daganatellenes szerekkel szembeni rezisztencia gyakori oka a kezelés sikertelenségének. A legtöbb esetben a gyógyszer rezisztencia a kezelés folyamata során alakul ki („szerzett” rezisztencia), de előfordulhat a daganatsejtek már eleve meglévő („intrinsic”) rezisztenciája is (97). A kezelésnek ellenálló daganatsejtek túlélése számos mechanizmus révén valósulhat meg: egyik oka a gyógyszer által kiváltott anyagcsere változások, amelyek a gyógyszermolekula inaktiválódását eredményezhetik. Fokozódhat a gyógyszer okozta DNS károsodások javítása, valamint gátlódhatnak az apoptotikus jelátviteli útvonalak. Ide sorolható a gyógyszer támadáspontjának mennyiségi és minőségi megváltozása, valamint a csökkenő celluláris gyógyszerfelvétel és egyúttal a gyógyszer aktív kipumpálása a sejtből, amelyet széles, számos esetben átfedő szubsztrátspektrummal rendelkező, energiafüggő drogranzsporterek fokozott kifejeződése segít elő (98). Ez utóbbi sejtes rezisztencia legfőbb okozója az ABC transzporterek családjába tartozó fehérjék, amelyek mind a prokarióta, mind az eukarióta sejtekben megtalálhatóak. Funkciójukat tekintve lehetnek importerek, valamint exporterek. Míg a prokarióták esetében importerként és exporterként is működhetnek, eukariótákban kizárólag exporter funkciót látnak el (99). A funkcióképes ABC fehérjék közös szerkezeti vonása, hogy két, a szubsztrátok megkötéséért felelős transzmembrán domént (Transmembrane Domain = TMD) és két, az ATP megkötéséért és hidrolíziséért felelős nukleotid-kötő domént (Nucleotide Binding Domain = NBD) tartalmaznak (100). Aminosav szekvencia vizsgálatok révén felismerték, hogy ezen transzporterek ATP-kötő doménjeinek elsődleges szerkezete erősen konzervált szekvencia motívumokból felépülő ATP-kötő kazettákból (ABC-binding

cassette = ABC) áll (101). Az ABC transzporterek működésének szerkezeti alapjául az α -hélixekből álló transzmembrán domének szolgálnak. Feltételezhetően az ezen doménekben bekövetkező konformációs változások felelősek a transzporterek nyitott, illetve zárt állapotáért. Aktív, irányított transzport funkciójukhoz az ATP hidrolíziséből nyerik az energiát. Az ATP a citoplazmában elhelyezkedő nukleotid-kötő doménhez kapcsolódik, ahol az ATP hidrolíziséből energia szabadul fel. Ez az energia közvetlenül az NBD-hez kapcsolódó transzmembrán domén konformációváltozására és ezáltal a szubsztrát transzportjára fordítódik (102). Az ABC transzporterek sejten belüli elhelyezkedése változatos lehet, de általánosságban elmondható, hogy a sejtek plazmamembránjában található, ugyanakkor az endoplazmatikus retikulumban (103), a Golgi-készülékben (104), a lizoszómában (105), a peroxiszómában (106) és a mitokondriumban is előfordulhatnak (107). Számos ABC fehérje fejeződik ki az egyes tüdősejt típusokon is. Az ABCB1 (MDR1/P-gp) a bronchiális hámsejtek, a tüdőendothélium, valamint az I. típusú alveoláris sejtek apikális membránjában fejeződik ki, ezzel szemben az ABCC1 (MRP1) a bronchiális hámsejtek bazolaterális oldalán helyezkedik el. A II. típusú alveoláris hámsejtekre az ABC fehérjék „A” alcsaládjába tartozó ABCA1 és ABCA3 kifejeződése jellemző. Bazolaterális expresszió figyelhető meg az ABCG2 (BCRP) esetén is (108). Emberben 49 ABC fehérjét kódoló gént azonosítottak, amelyek mutációi számos örökklődő betegség hátterében állnak. Ezek közé tartozik a Tangier-betegség, amely az ABCA1 gén mutációjára vezethető vissza. A II. típusú alveoláris sejtek által termelt surfactant súlyos hiányát az ABCA3 funkciócsökkenése okozza. Az ABCC2 mutációjának következtében az ún. Dubin-Johnson szindróma alakul ki, míg a cisztás fibrózis az ABCC7 és CFTR mutációjának eredményeképpen lép fel (109), (110). A különféle ABC transzporterek a tüdő normál működésében fontos szerepet játszanak a koleszterin és a foszfolipidek szállításának szabályozásában, a surfactant termelésének regulációjában, valamint a toxikus intracelluláris anyagok eltávolításában (108), (111). A malignus tumorok gyógyszeres kezelése során az alkalmazott terápia eredménytelenségének egyik fő oka a tumorsejtek ABC fehérjeinek fokozott kifejeződése és működése, amelyek képesek a daganatellenes szereket kipumpálni a sejtéből, ezáltal kialakítani a kezeléssel szembeni ún. multidrog rezisztencia jelenségét. Eddigi ismereteink szerint az ABCB1, az ABCC1 és az ABCG2 transzport fehérjéről bizonyították, hogy különösen fontos szerepük van a klinikumban megjelenő multidrog rezisztencia kapcsán (112). A ciszplatinnal szemben kialakuló rezisztencia egyik lehetséges mechanizmusa a platinaszármazék megnövekedett efflux transzportja, amelyet számos ABC transzport fehérje túlzott működése idéz elő. Tüdőkarcinóma sejtvonalon végzett vizsgálatok kimutatták, hogy az ABCC1 mRNS szintjének fokozott jelenléte összefüggésben áll a ciszplatinnal szembeni

rezisztenciával. További tanulmányok az ABCC2 szerepét igazolják a ciszplatin efflux transzportjában (113). Az ABCC5 expresszió növekedése humán embrionális vesesejtvonalban okozott rezisztenciát ciszplatinnal szemben (114). Előrehaladott NSCLC esetében azt is megfigyelték, hogy az ABCG2 prediktív faktorként szolgál standard platina alapú kemoterápiában (115). A fent említett, ABC fehérjékhez köthető multidrog rezisztencia azonban hatékonyan gátolható tirozin-kináz inhibitorokkal. A célzott terápiás szerek közé tartozó erlotinib ABCB1, valamint ABCG2 transzporterekkel való interakcióját, szubsztrát tulajdonságát számos tanulmányban leírták (116), (117). Megfigyelték, hogy az erlotinib képes az ABCB1 és az ABCG2 (118), illetve az ABCC10 (119) transzport fehérjék működését gátolni, amely ezen drogztranszporterek hatóanyag szubsztrátjainak sejten belüli akkumulációját és ezáltal az MDR fenotípus visszafordítását eredményezi (120).

4 Célkitűzések

Doktori kutatómunkám a tüdődaganatok, azon belül is a nem kissejtes tüdődaganatok molekuláris hátterének vizsgálatára irányul gyógyszeres kezelés hatására, külön tekintettel a ciszplatin és az erlotinib hatásának vizsgálatára az adenocarcinoma szövettani altípus kezelésében. Vizsgálataim a hatóanyagoknak a tumorsejtek osztódására, migrációjára, valamint a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek és a drogranzporter fehérjék kifejeződésére gyakorolt hatásának alaposabb megismerésére terjedtek ki.

Kutatómunkám során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- 1. Szolgálhat-e a betegekből nyert tüdődaganatos szövetminta laboratóriumi feldolgozásával történő in vitro 3D tumormodell felállítása az egyes tüdődaganat típusok reprezentálására és alkalmas-e a klinikai terápia során alkalmazott hatóanyagok vizsgálatára?*
- 2. Befolyásolja-e a kezelés sorrendje a tumorsejtek kezelésre adott válaszát és a gyulladási citokinek expresszióját?*
- 3. Megváltoztatja-e az IL-6 jelenléte a tumorsejtek kezelésre adott válaszát?*
- 4. Ezen belül vizsgáltuk annak a kérdését, hogy van-e összefüggés a tumorsejtek életképessége és a drogranzporter fehérjék szintje között?*
- 5. Szerepet játszik-e az IL-6, valamint az IL-8 a tumorsejtek migrációjának szabályozásában és ezáltal a metasztázisképzésben?*

5 Anyagok és módszerek

5.1 Betegminták

A humán tüdőcarcinóma minták a Pécsi Tudományegyetem (PTE) Sebészeti Klinikájáról érkeztek és az egyetemi Etikai Bizottság jóváhagyásával kerültek kutatócsoportunkhoz (etikai engedély száma: 2014-RIKEB-5329-EKK). Minden beteg beleegyező nyilatkozattal adta írásba, hogy mintáikat és klinikai adataikat kizárólag kutatási célokra használhatjuk fel. Mutáció analízis alapján összesen 21 mintát választottunk ki vizsgálatainkra, amelyek mindegyike adenokarcióma szövettani típusú volt, amely diagnózist patológus állított fel (PTE-ÁOK, Pathológiai Intézet). A betegminták adatait az **1. táblázatban** foglaltuk össze.

EGFR/KRAS vad (n=7)	Mintaszám	Mintatípus	Nem	Életkor	T	N	M
	1	szolid tumor	nő	73	T2	N1	Mx
2	pleurális folyadék	férfi	60	T2	N2	M1	
3	szolid tumor	férfi	65	T1	N1	Mx	
4	pleurális folyadék	nő	65	T4	N2	M1	
5	pleurális folyadék	férfi	58	T2	N3	M1	
6	pleurális folyadék	nő	82	T4	N2	M1	
7	szolid tumor	nő	46	T2	N0	M1	

KRAS mutáns (n=8)	Mintaszám	Mintatípus	Nem	Életkor	T	N	M
	8	szolid tumor	nő	93	T2	N1	Mx
9	szolid tumor	nő	46	T2	N0	Mx	
10	szolid tumor	férfi	65	T2b	N2	M0	
11	szolid tumor	nő	62	T3	N2	Mx	
12	szolid tumor	nő	51	T2	N0	Mx	
13	szolid tumor	nő	57	T1	N2	Mx	
14	szolid tumor	férfi	72	T2	N2	Mx	
15	szolid tumor	férfi	62	T1	N1b	Mx	

EGFR mutáns (n=6)	Mintaszám	Mintatípus	Nem	Életkor	T	N	M
	16	szolid tumor	férfi	68	T2b	N1	Mx
17	pleurális folyadék	férfi	59	T3	Nx	M1	
18	szolid tumor	férfi	69	T1	N1	Mx	
19	pleurális folyadék	nő	53	T2	N3	M1	
20	pleurális folyadék	férfi	81	T4	N2	M1	
21	szolid tumor	nő	53	pT2a	pN2	Mx	

1. táblázat: A kísérletekben felhasznált betegmintákhoz tartozó adatok.

5.2 Primer tüdő tumorsejtek izolálása szövetmintából

A szolid tumor szövetekből egy-sejt szuszpenziót Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) és GentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) felhasználásával készítettünk. A klinikai műtét során kimetszett tumorszövetet egy speciális szövettároló folyadékba (MACS® Tissue Storage Solution (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)) helyeztük, majd ezt követően szikével kisebb részekre daraboltuk. A gyártó által előírt enzim-mixbe helyeztük a szövetdarabokat és egy óra időtartamra a disszociátorba helyeztük. Ezt követően 70 µm-os szűrőn 20 ml RPMI médiummal mostuk a sejteket és 300 g-n 7 percig centrifugáltuk. Szükség esetén a mintában maradt vörösvértesteket 500-1000 µl Red Blood Cell Lysis Solution felhasználásával távolítottuk el, majd 20 ml RPMI médiummal 300 g-n 7 percig centrifugáltuk. A sejteket DMEM tápfolyadékban felszuszpendáltuk, Cryo-SFM sejtfagyasztó médiumban lefagyasztottuk (PromoCell, Heidelberg, Germany) és -80°C-on tároltuk.

5.3 Primer tüdő tumorsejtek izolálása pleurális folyadékból

A mellhártya rétegei között felhalmozódó daganatos eredetű folyadékgyülem (pleurális folyadék) leszívását követően a folyadékot 250 ml kúpos végű centrifuga csőbe helyeztük és 1500 rpm-en 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót leöntve a sejt pelletet 70 µm-os szűrőn átszűrtük, majd Ficoll grádiens fölé rétegeztük és 2000 rpm-en 20 percig centrifugáltuk. Az interfázisban kapott sejteket összegyűjtöttük és 1000 rpm-en 5 perc centrifugálással kétszer mostuk át streil PBS-ben.

5.4 Sejttenyésztés

A 2D és 3D sejttenyészetekhez KRAS mutáns humán tüdő adenokarcinóma sejt vonalat (A549; American Type Cell Culture Collection, Rockville, USA), epridermális növekedési faktor receptor (EGFR) mutáns humán tüdő adenokarcinóma sejt vonalat (PC-9; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) és primer normál humán tüdő fibroblaszt (NHLF; Lonza, Basel, Switzerland) sejteket használtunk. Az A549-es sejt vonalat komplett DMEM médiumban tenyésztettük (10% borjú szérum, 1% L-glutamin, 2% penicillin/sztreptomycin, 1% HEPES, 1% nem-esszenciális aminosavak, 1% PBS/β-mercaptoethanol). Az EGFR mutáns PC-9 sejt vonal tenyésztése RPMI 1640 médiumban történt (10% borjú szérum, 1% L-glutamin és 2% penicillin/sztreptomycin). A primer normál humán tüdő fibroblaszt tenyésztési körülményei a gyártó által előírt protokoll alapján történtek (Lonza, Basel, Switzerland). A sejteket párás környezetben, 37°C-on 5% CO₂-

tartalmú inkubátorban tenyésztettük. Az élő sejtek mennyiségének meghatározását tripánkék festéssel vizsgáltuk Bürker-kamrában.

5.5 **Transzgenikus sejtvonalak**

A Wnt11-overexpresszáló A549 transzgenikus sejtvonala előállítását lentivirális transzgenézissel történt laboratóriumunkban. A lentivirális vektor készítése az alábbi publikációban leírtak szerint történt (121). Röviden, második generációs HIV-1 alapú lentivirális vektort állítottunk elő kódolva a Wnt-11 transzgént. A transzfektálás a virális felülészóval, a stabil transzfektánsok detektálása áramlási citometrián alapuló sejtszortolással történt.

5.6 ***In vitro* háromdimenziós (3D) tüdő modell (122) (Szabadalom: P0900819)**

A 3D ko-kultúrákhoz humán adenokarcinóma sejtvonalaikat, a betegmintákból származó primer tüdő tumorsejteket, valamint primer humán tüdő fibroblasztokat használtunk. A tumorsejt/sejtvonalaik és a primer humán tüdő fibroblasztok 1:1 arányú sejtszuszpenziós keverékét nem kitapadó sejtekre szolgáló, U-aljú 96-lyukú lemezre (Corning, New York, USA) mértük, ezt követően 10 percig centrifugáltuk 600 *rcf* sebességgel. Az aggregátumokat RPMI:FGM, valamint DMEM:FGM tenyésztő médiumok 1:1 arányú keverékében tenyésztettük. 24 órás inkubálást (37°C, 5% CO₂) követően az összeállt aggregátumokat további kísérleteinkre használtuk fel.

5.7 **Rekombináns fehérjék és hatóanyagok**

A sejtenyészetek kezeléséhez szükséges hatóanyag hígításokat 1 mg/ml koncentrációjú ciszplatin (Accord Healthcare, Ahmedabad, India), valamint 5 mM koncentrációjú erlotinib (Selleckchem, Houston, USA) törzsoldatokból kiindulva végeztük el. A tisztított, rekombináns IL-6 és IL-8 fehérjéket (R&D Systems, Minneapolis, USA) 1% BSA PBS-ben oldottuk be, 100 µg/ml-es törzskoncentrációját 100 ng/ml-es végkoncentrációban alkalmaztuk. A Wnt11 gén mRNS és fehérje szinten történő kifejeződésének gátlására siRNS indukált géncsendesítést alkalmaztunk. A 100 nmol kontroll siRNS, valamint a 100 nmol Cy3-mal jelölt Wnt11 specifikus siRNS oligonukleotid szekvenciák transzfektálásához Lipofectamine 2000 reagenst alkalmaztunk (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA).

5.8 Sejt életképességi vizsgálat

A sejtek hatóanyag kezelés utáni életképességének meghatározására CellTiter-Glo® lumineszcens viabilitási esszé (Promega, Madison, USA) alkalmaztunk. A módszer egy luciferáz alapú ATP esszé, amely a sejtek lizálása során felszabaduló ATP mennyiséget méri, amely egyenesen arányos a metabolikusan aktív, élő sejtek számával. A luciferáz reakció során az ATP katalizálja a luciferin oxiluciferinné történő átalakulását, amely a reakció eredményeként a lumineszcens jelet adja.

Vizsgálataink során A549 és PC-9 tüdő adenokarcinóma sejtvonalakat tenyésztettünk monokultúrában 96-lyukú lemezen 8×10^3 sejtdenzitással, komplett tápközegben. A 3D kokultúrákhoz a primer tumorsejtek/sejtvonalak és a primer humán tüdő fibroblasztok 1:1 arányban összeállított aggregátumait használtuk. 24 órás inkubálást követően a médiumot leszívtuk a szteroidokról, majd 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M és 10 μ M koncentrációjú erlotinib tartalmú médiummal kezeltük meg 48 órás időintervallumban. A kezelés végén 100 μ l médiumot a mintákon hagyva 100 μ l frissen feloldott CellTiter-Glo® reagenst pipettáztunk a lyukakba. A lemezeket 2-5 percig rázattuk, majd 10-25 perc szobahőmérsékleten történő inkubálást követően mértük a minták lumineszcenciáját fehér, 96-lyukú lemezen. A méréseket EnSpire® Multimode plate-olvasón végeztük (PerkinElmer, Waltham, USA).

5.9 RNS izolálás

A mintákat 350 μ l RA1 lízis pufferben homogenizáltuk, majd a nukleinsav izoláláshoz NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) izolációs kit-et használtunk a gyártó leírása szerint. A genomiális DNS szennyeződés eltávolítása oszlopon, RNáz-mentes DNázal való emésztési lépésben történt. A tisztított minták totál RNS koncentrációját és minőségét Nanodrop UV-VIS spektrofotométer segítségével határoztuk meg (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA).

5.10 cDNS szintézis

A cDNS szintézist High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) segítségével végeztük el, reakciónként 1 μ g RNS mintát, valamint a kit random hexamer primerjeit felhasználva a gyártó által előírt protokoll szerint.

5.11 Valós idejű kvantitatív PCR (qPCR)

A cDNS szintézist követően génextpressziós vizsgálatokat végeztünk kvantitatív, valós-idejű polimeráz lánreakció segítségével. A reakcióhoz HighROX SensiFast SYBR Green Master Mix-et (BioLine, London, UK) és génspecifikus primereket (**2. táblázat**) használtunk. Az amplifikációt StepOne Plus Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) készüléken végeztük, ahol a PCR reakció körülményei a következők voltak: 95°C 2 perc, 40 cikluson keresztül 95°C 5 másodperc és 60°C 30 másodperc. A mérési adatokat StepOne szoftverrel analizáltuk, háztartási génként humán β -aktint használtunk. Az eredményeket a 2^{-ddCt} módszerrel állapítottuk meg az alábbi képlet alapján: $dCt = Ct(\text{célgén}) - Ct(\text{háztartási gén})$. A génextpresszió relatív kvantifikációját pedig a következő formula alapján számítottuk ki: $RQ = 2^{-ddCT}$, ahol a ddCT számítása a következő képlet alapján történt: $dCt(\text{kezelt minta}) - dCt(\text{kontroll minta})$.

Célgén	Forward primer	Reverz primer
β -aktin	5'-GCGCGGCTACAGCTTCA-3'	5'-CTTAATGTCACGCACGATTTC-3'
ABCC1	5'-GCTGGAGTGTGTGGGCAACT-3'	5'-CTGAGGCTGTGCCTGGAGAT-3'
ABCC5	5'-GGAAGCACCTGCCAGAATTAAG-3'	5'-GTACCTCATCTCTGCGTTCTCAAA-3'
ABCG2	5'-AACCTGGTCTCAACGCCATC-3'	5'-GTCGCGGTGCTCCATTTATC-3'
IL-6	5'-AGGGCTCTTCGGCAAATGTA-3'	5'-GAAGGAATGCCCATTAACAACAA-3'
IL-8	5'-CAGTTTTGCCAAGGAGTGCTA-3'	5'-AACTTCTCCACAACCCTCTGC-3'
E-kadherin	5'-GACCGGTGCAATCTTCAAA-3'	5'-TTGACGCCGAGAGCTACAC-3'
N-kadherin	5'-AGCTTCTCACGGCATAACC-3'	5'-GTGCATGAAGGACAGCCTCT-3'
S100A4	5'-TGGAGAAGGCCCTG-3'	5'-CCCTCTTTGCCCGAGTACTG-3'
Wnt5a	5'-TGGCTTTGGCCATATTTTC-3'	5'-CCGATGTACTGCATGTGGTC-3'
Wnt11	5'-CGTTGGATGTCTTGTGTCAC-3'	5'-TGACCTCAAGACCCGATACC-3'

2. táblázat: A génspecifikus primerpárok szekvencia adatai.

5.12 Citokin mérés

A hatóanyag kezelés hatására felszabaduló citokinek mennyiségi vizsgálatát áramlási citometriás gyöngy array (Cytometric Bead Array (CBA), Human IL-6/ IL-8 Flex Set Assays, BD Biosciences, San Jose, USA) segítségével végeztük. A vizsgálatokat a betegminták laboratóriumi feldolgozásából származó daganatsejtek, valamint PC-9 tüdő adenokarcinóma sejtvonalak felhasználásával készített 3D szövettenyészeteken végeztük el a gyári protokoll előírásait követve (BD). Röviden összefoglalva a következő eljárást alkalmaztuk: 50 µl hígított felülúszót 50 µl befogó antitest-gyöngy keverékhez adtunk, majd szobahőmérsékleten, sötétben 1 órán keresztül inkubáltuk. 50 µl phycoerythrinrel (PE) jelölt detektáló antitest hozzáadása után szobahőmérsékleten, sötétben további 2 órán keresztül inkubáltuk. Ezután a mintákat 1 ml mosó pufferrel mostuk 5 perc 2000 g-n történő centrifugálással, végül 300 µl mosó pufferben reszuszpendáltuk. A minták citokin koncentrációjának mérése BD FACS DIVA V6 szoftverrel ellátott BD FACSCanto II típusú áramlási citométerrel (BD Immunocytometry Systems, Erembodegen, Belgium) történt és az adatokat FCS Express V3 szoftverrel értékeltük ki.

5.13 Drogranzporter fehérjék aktivitásának mérése

A multidrog rezisztencia fehérjék funkcionális aktivitásának mérését eFluXX-ID® Green multidrug resistance assay kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) felhasználásával végeztük el a gyártói előírást követve. Az esszéhez PC-9 tüdő adenokarcinóma sejtvonalak felhasználásával készített 3D szövettenyészeteket steril 1x PBS-ben átmostuk, majd 1ml Accumax™ oldattal (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) kezeltük. Az egysejt-szuszpenzió elérése után a sejteket a hígított drogranzporter inhibitorokkal 37°C-on 5 percig inkubáltuk. Azután a mintákhoz hígított eFluXX-ID® Green festéket adtunk és 37°C-on 30 percig inkubáltuk. A sejtvitalitás monitorozásához propidium-jodid festést alkalmaztunk. A méréseket BD FACSCanto II típusú áramlási citométerrel (BD Immunocytometry Systems, Erembodegen, Belgium) végeztük, mérésenként 1×10^4 eseményt regisztrálva. A multidrog rezisztencia aktivitási faktort (MAF) a következő képlet alapján számoltuk: $100 * (MFI_{inh} - MFI_0) / MFI_{inh}$, ahol MFI_{inh} és MFI_0 az inhibitor jelenlétében és hiányában mért átlag fluoreszcens intenzitás. A sejtek fluoreszcencia intenzitása a funkcionáló multidrog rezisztencia fehérjék aktivitásával fordítottan aránylik.

5.14 Karcolási sejt vándorlás vizsgálat

Az A549 és PC-9 sejteket 3×10^4 sűrűségben 24-lyukú sejttenyésztő edénybe tettünk ki (Corning, New York, USA). Egy éjszaka inkubációt követően a letapadt, konfluens sejttenyészeteket 200 μ l-es steril hegygel karcoltuk meg („scratch assay”), szabad felszínre teremtve a sejtek vándorlásához. A sejtekhez friss, 10% FBS-t és a hatóanyagokat - ciszplatint (30 nM), erlotinib (100 nM), IL-6 (100 ng/ml), IL-8 (100 ng/ml) - tartalmazó médiumot tettünk. Azonnal a kezelést követően, valamint 12 órás inkubációs idő után EVOS fénymikroszkóp (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) segítségével fényképeket készítettünk. A képeket Image J szoftver (National Institutes of Health, Bethesda, USA) segítségével elemeztük.

5.15 Sejtek migrációs kapacitásának vizsgálata

A sejtek migrációs kapacitását sebgyógyulási („wound healing”) teszttel is vizsgáltuk (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). Az EGFR mutáns PC-9 és a KRAS mutáns A549 tüdő adenokarcinóma sejteket 25 cm^3 -es sejttenyésztő flaskában tenyésztettük 80% konfluens réteg kialakulásáig. Ezt követően 200 μ l nanorészecskéket (NanoShuttle-PL) tartalmazó oldatot tettünk a sejttenyészethez, amelyek a sejtmembránhoz kötődve elektrosztatikus úton magnetizálták a sejteket. Egy éjszakán át tartó inkubáció elteltével a sejttenyészetekből egysejt-szuspenziót készítettünk és $1,2 \times 10^6$ sejtsűrűségben 6-lyukú sejttaszító felülettel rendelkező sejttenyésztő lemezre mértük. A lemez tetejére a sejtek lebegését, valamint a sejt közötti állomány (extracelluláris mátrix) kialakulását szolgáló mágneset helyeztünk. 5 órás inkubációt követően a sejteket összegyűjtöttük és 2×10^5 sejtsűrűségben 24-lyukú sejttaszító felülettel rendelkező sejttenyésztő lemezre mértük. A sejtek gyűrű formában történő aggregációját a lemez aljára elhelyezett mágnes segítségével 15 percet követően értük el. Végül a sejtek 30 nM ciszplatinnal és 100 nM erlotinibbel történő kezeléséről és a migrációra gyakorolt hatásának monitorozásáról a következő időpontokban fényképeket készítettünk EVOS FL Imaging System segítségével: 0 h, 6 h, 12 h és 24 h.

5.16 Matrigel inváziós kísérlet

A tüdő tumorsejtek invazív képességének összehasonlító vizsgálatát az NSCLC két leggyakoribb szövettani altípusával (A549 adenokarcinóma és H157 laphámsejtes karcinóma sejtvonalak) 8 μ m pórusátmerőjű sejttenyésztő betéttel ellátott Matrigel inváziós kamrán végeztük el (BD Biosciences, San Jose, USA). A kamrák rehidratálását követően a betéteket 750 μ l 10% FCS-sel kiegészített sejttenyésztő médiumba helyeztük. A sejteket 5×10^4

sejtsűrűségben a betét belső felén tenyésztettük FCS-mentes médiumban. 24 óra elteltével a függesztett betétekre kitett tumorsejtek invázióját hematoxylin-eozin festéssel tettük láthatóvá. Az invazív sejtek számának meghatározásához minden esetben öt különálló mikroszkópikus mezőt számoltunk.

5.17 Hematoxylin eozin festés

A Matrigel inváziós esszé függesztett sejttenyésztő betétjeit Mayer's hematoxylin oldatban (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) festettük 10 percig. A mintákat ezt követően folyó vízben 10 percig mostuk, majd 0,25%-os ecetsavval differenciáltattuk 1 percig. Ezután desztillált vízzel mostuk, majd 2 percig eozin oldattal festettük. A mosást követően Vectashield fedőoldattal (Vector Laboratories, Burlingame, USA) fedtük és Nikon Eclipse Ti-U inverz mikroszkóppal fotóztuk.

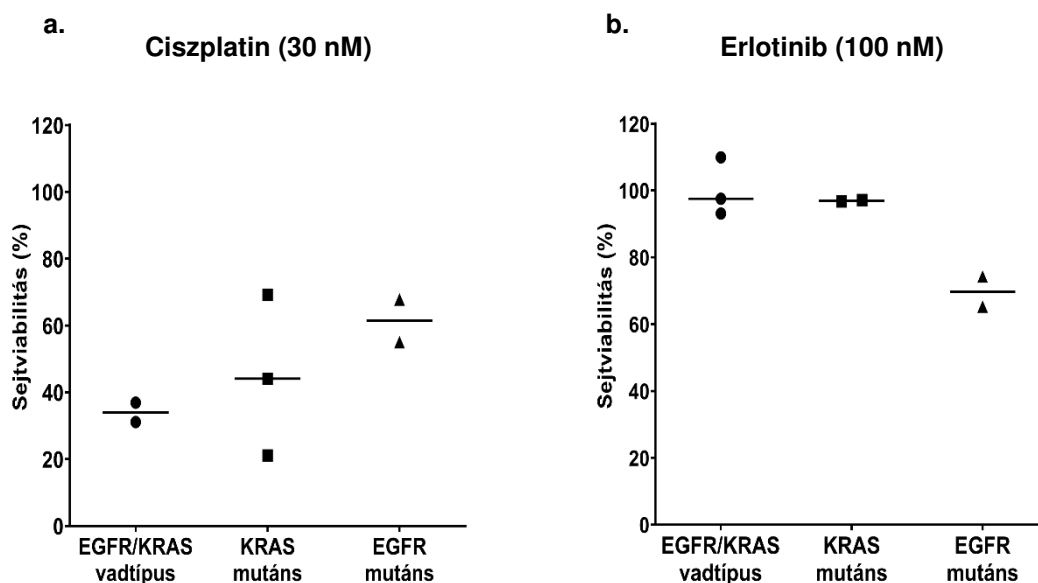
5.18 Statisztikai kiértékelés

Munkánk során a diagramokon az adatok átlagát és az átlagok standard hibáját ábrázoltuk (\pm SEM). A statisztikai elemzés SPSS 20 (IBM) szoftverrel történt, Student-féle t-próba és egyutas ANOVA (Bonferroni post hoc) tesztek segítségével. Szignifikáns eredménynek minden esetben a $p < 0.05$ értékeket fogadtuk el.

6 Eredmények

6.1 Erlotinib és ciszplatin kezelés hatása primer tüdő adenokarcinóma betegmintákon

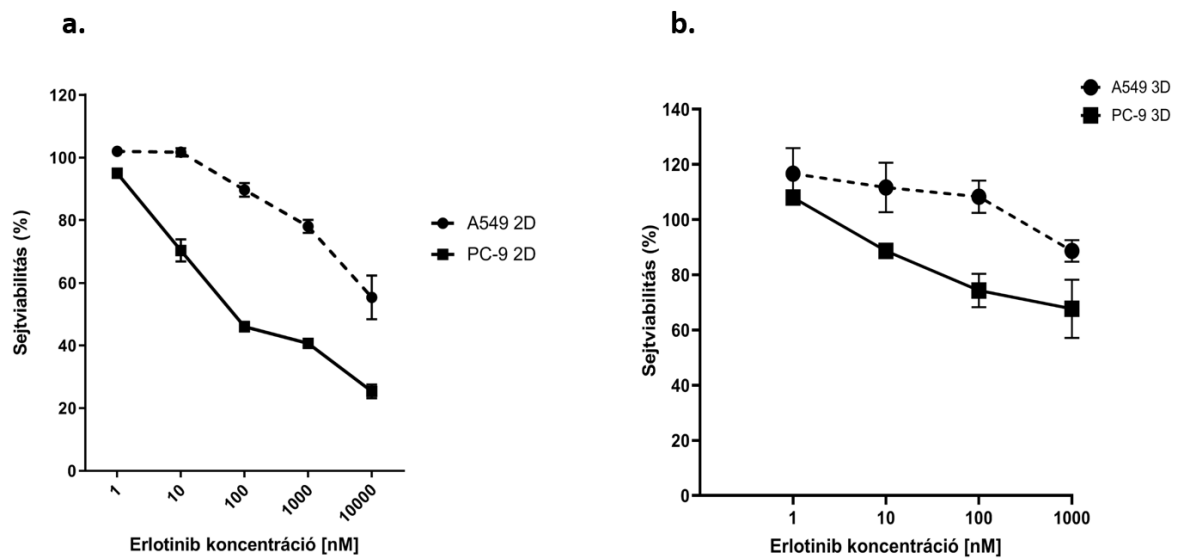
Vizsgálataink elején kíváncsiak voltunk arra, hogy az *in vitro* gyógyszer érzékenységi vizsgálatok eredményei összhangban vannak-e a klinikai gyakorlatban tapasztalt terápiás válasszal. Ennek érdekében a betegekből nyert daganatos szövetminta laboratóriumi feldolgozásával történő 3D tumormodellt hoztunk létre és vetettük alá erlotinib, valamint ciszplatin kezelésnek. A várakozásainknak megfelelően azt tapasztaltuk, hogy az EGFR mutációval rendelkező betegekből származó minták érzékenyebbek az erlotinib kezelésre, míg a vad típusú és KRAS mutációval rendelkező minták esetén az erlotinib hatástalannak bizonyult (5. a. ábra). Ezzel ellentétben a ciszplatinnal történő kezelés a vad típusú és a KRAS mutáns minták esetében volt hatásos, drasztikusan csökkentve a sejtek életképességét (5. b. ábra). A két leggyakoribb mutációs státuszt összehasonlítva igazoltuk, hogy az *in vitro* 3D szövetkultúrában végzett kezeléseink eredményei korrelálnak a klinikumban tapasztalt gyógyszerhatékonysággal és hogy a betegmintákból felállított 3D tüdőmodellünk alkalmas a klinikai terápia során alkalmazott hatóanyagok vizsgálatára.



5. ábra: 48 órás ciszplatin (30 nM) (a.) és erlotinib (100 nM) (b.) kezelés hatása a sejtek életképességének alakulására vad típusú, KRAS mutáns és EGFR mutáns betegmintákból felállított *in vitro* 3D tüdőszöveti modellben. A sejtek életképessége a DMSO kontrollhoz viszonyítva látható.

6.2 Erlotinib kezelés hatása tüdő adenokarcinóma sejtvonalakon

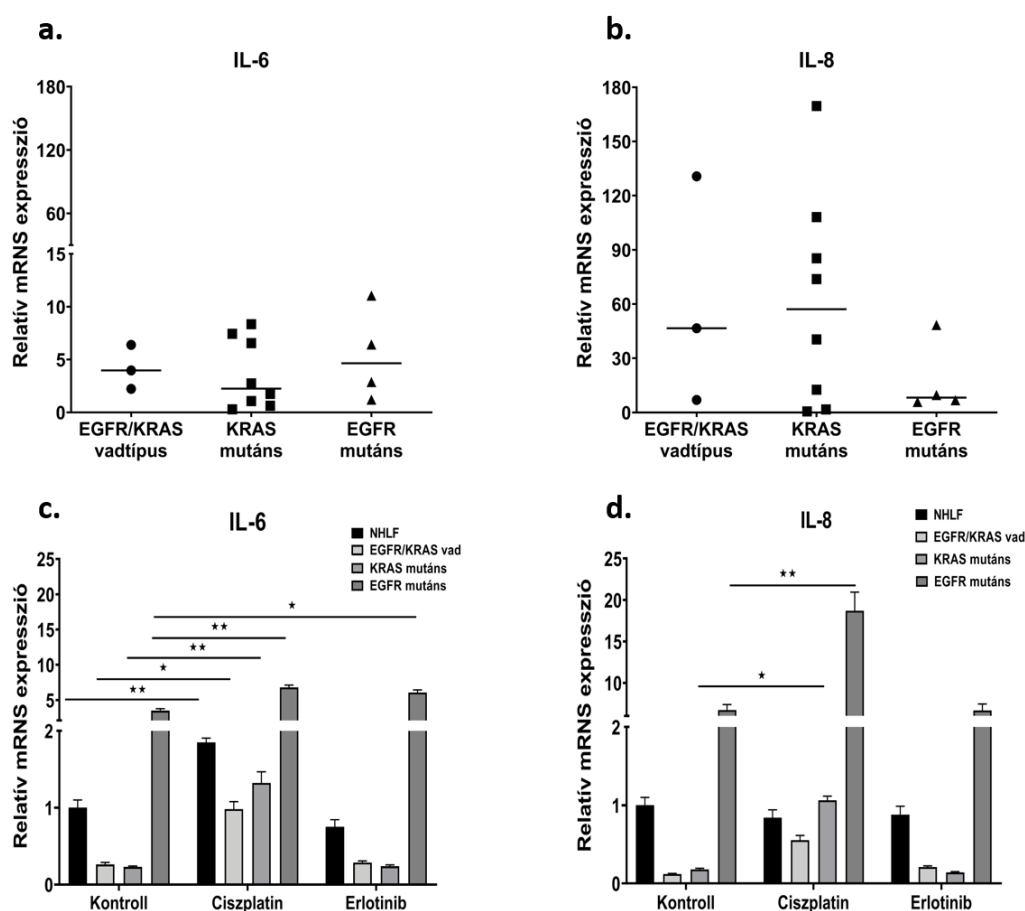
Az erlotinib kezelés hatását 2D sejttenyészetben és egy általunk készített 3D *in vitro* disztális tüdőmodellben vizsgáltuk, normál tüdőfibroblaszt, EGFR mutáns tüdő adenokarcinóma sejtek (PC-9), valamint KRAS mutáns tüdő adenokarcinóma sejtek (A549) felhasználásával. A klinikai betegmintákból végzett kísérletek eredményeivel összhangban elmondható, hogy az erlotinib 100 nM koncentrációban drasztikusan csökkentette az EGFR mutáns sejtek életképességét. A KRAS mutáns A549 sejtek életképességére azonban nem volt szignifikáns hatása (6. a.-b. ábrák).



6. ábra: 48 órás erlotinib (100 nM) kezelés hatása KRAS mutáns A549 és EGFR mutáns PC-9 sejtek életképességének alakulására *in vitro* 2D (a.) és 3D (b.) sejttenyészetekben ($n=3$). A sejtek életképessége a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva láthatóak. Az adatokat azok átlaga \pm SEM ábrázoltuk.

6.3 IL-6 és IL-8 expresszió primer humán tüdődaganatokban

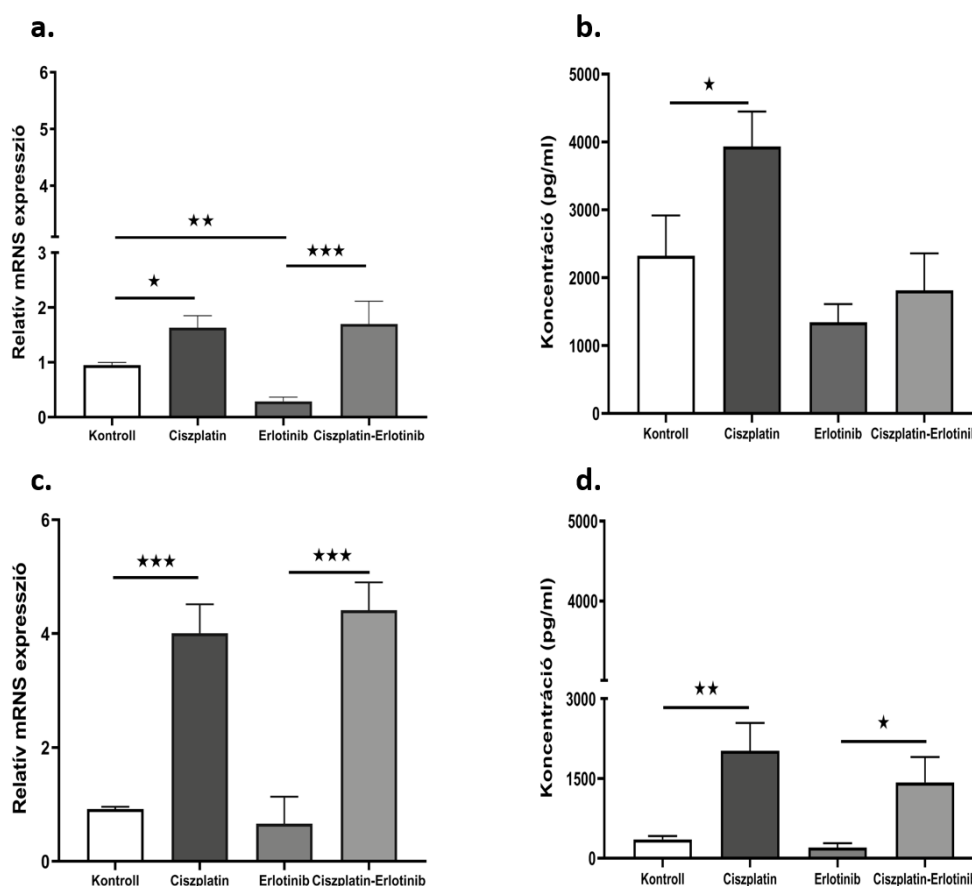
Primer humán adenokarcinóma mintákon, azon belül KRAS mutáns, EGFR mutáns és vad típusú mintákon qPCR segítségével vizsgáltuk a pro-inflammatórikus citokinek mRNS szinten történő kifejeződését. Az analízis során az IL-6 molekula génexpressziós szintje az EGFR mutáns betegcsoportban, míg az IL-8 mRNS szintje a KRAS mutáns betegcsoportban volt magasabb (7. a.-b. ábrák). Ezt követően megvizsgáltuk, hogy vajon az erlotinib és a ciszplatin kezelés milyen hatással van a gyulladási citokinek kifejeződésére. A ciszplatin minden minta esetében emelte az IL-6 és IL-8 expressziós szinteket, különösképpen az EGFR mutációval rendelkező minták tekintetében, míg az erlotinib esetében az IL-6 és IL-8 szintek változatlanok maradtak a kezeletlen kontrollhoz képest (7. c.-d. ábrák).



7. ábra: IL-6 és IL-8 pro-inflammatórikus citokinek relatív mRNS expressziójának változása kezeletlen (a.-b.) és 48 órás ciszplatin (30 nM) és erlotinib (100 nM) kezelt (c.-d.) vad típusú, KRAS mutáns és EGFR mutáns betegmintákból felállított in vitro 3D tüdőszöveti modellben (n=3). A génexpressziós változások β -aktin belső kontrollhoz viszonyítva láthatóak. Az adatokat azok átlaga \pm SEM ábrázoltuk és szignifikánsnak tekintettük, ha az ANOVA teszt alapján $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.

6.4 Ciszplatin és erlotinib kezelés hatása az IL-6 és az IL-8 expressziójára

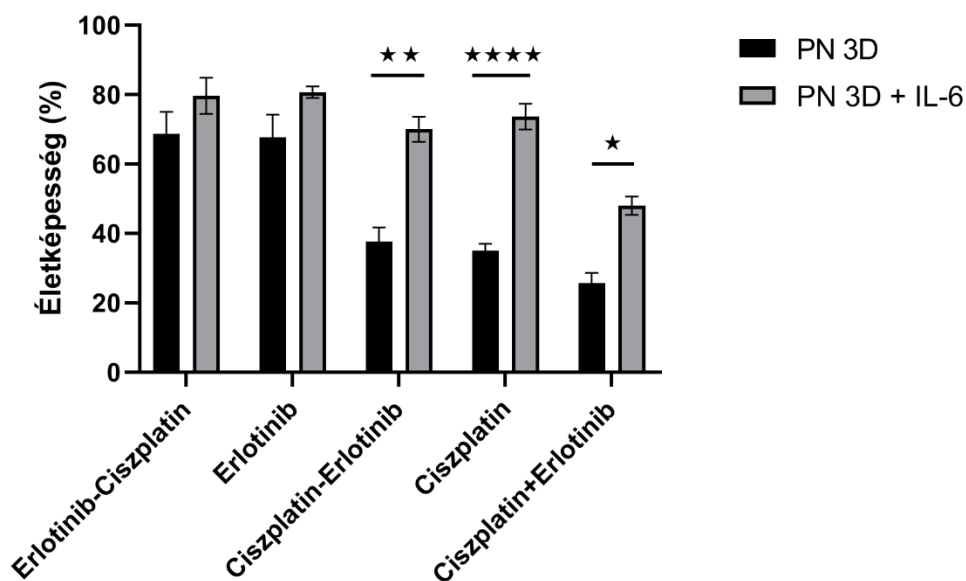
A vizsgálatainkat tovább folytattuk abba az irányba, hogy a ciszplatin és az erlotinib mono-, és kombinációs kezelésben alkalmazva milyen hatással van az IL-6 és az IL-8 molekulák mRNS és fehérje szinten történő kifejeződésére. Ehhez a nem kissejtes tüdőrák EGFR mutációval rendelkező adenokarcinóma altípusát reprezentáló *in vitro* 3D tüdőmodell (PC-9-NHLF) készítettünk és vetettük alá hatóanyag kezelésnek. Megvizsgálva az IL-6 és IL-8 molekulák termelődését azt tapasztaltuk, hogy a ciszplatin csak önmagában, valamint előkezelésként történő használatakor szignifikánsan emelte mindkét vizsgált molekula termelését (8 a.-c. ábrák). Ezzel szemben az erlotinib kizárólagos használata csökkentette ezen interleukinok mRNS és fehérje szintjét. A ciszplatin követő erlotinib kezelés során azt tapasztaltuk, hogy az erlotinib képes volt a ciszplatin-indukálta IL-6 és IL-8 fehérjeszekréción gátolni (8 b.-d. ábrák).



8. ábra: IL-6 és IL-8 pro-inflammatorikus citokinek relatív mRNS expressziójának (a.-c.) és fehérjemennyiségének (b.-d.) változása 48 órás ciszplatin (30 nM), erlotinib (100 nM) és ciszplatin követő erlotinib kezelés hatására *in vitro* 3D tüdőszöveti modellben (PC-9-NHLF, n=3). A génexpressziós változások β -aktin belső kontrollhoz viszonyítva láthatóak. Az adatokat azok átlaga \pm SEM ábráztuk és szignifikánsnak tekintettük, ha az ANOVA teszt alapján $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

6.5 Az IL-6 szerepe a tumorsejtek túlélésében

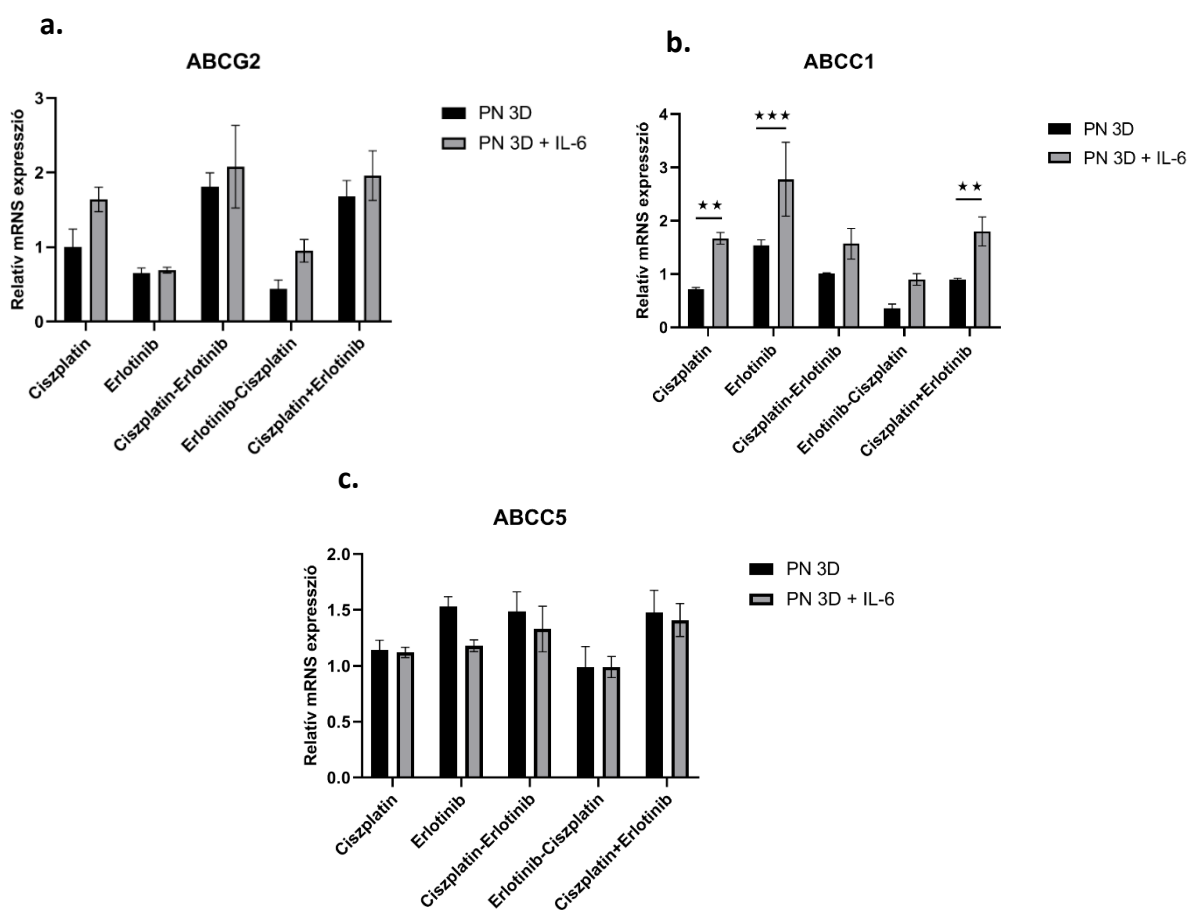
Mivel az IL-6 molekula az EGFR mutáns mintákban magasabb szintet mutatott, így a vizsgálatainkat az IL-6 irányába folytattuk tovább. A tumorsejtek túlélésében betöltött szerepének vizsgálatára az EGFR mutációt hordozó *in vitro* 3D tüdőmodelleket (PC-9-NHLF) humán rekombináns IL-6 előkezelésnek vetettük alá a hatóanyag kezelések előtt. Exogén IL-6 előkezelés hatására szignifikánsan emelkedett a sejtek életben maradási képessége ciszplatin monoterápia, ciszplatin követő erlotinib, valamint ciszplatin és erlotinib együttes alkalmazása után (9. ábra).



9. ábra: 48 órás ciszplatin (30 nM) és erlotinib (100 nM) önálló és kombinált kezeléseinek hatása EGFR mutáns PC-9 sejtek életképességének alakulására *in vitro* 3D sejtenyészeten 48 órás humán rekombináns IL-6 előkezelést követően (PC-9-NHLF, n=3). A sejtek életképessége a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva láthatóak. Az adatokat azok átlaga \pm SEM ábrázoltuk és szignifikánsnak tekintettük, ha az ANOVA teszt alapján $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

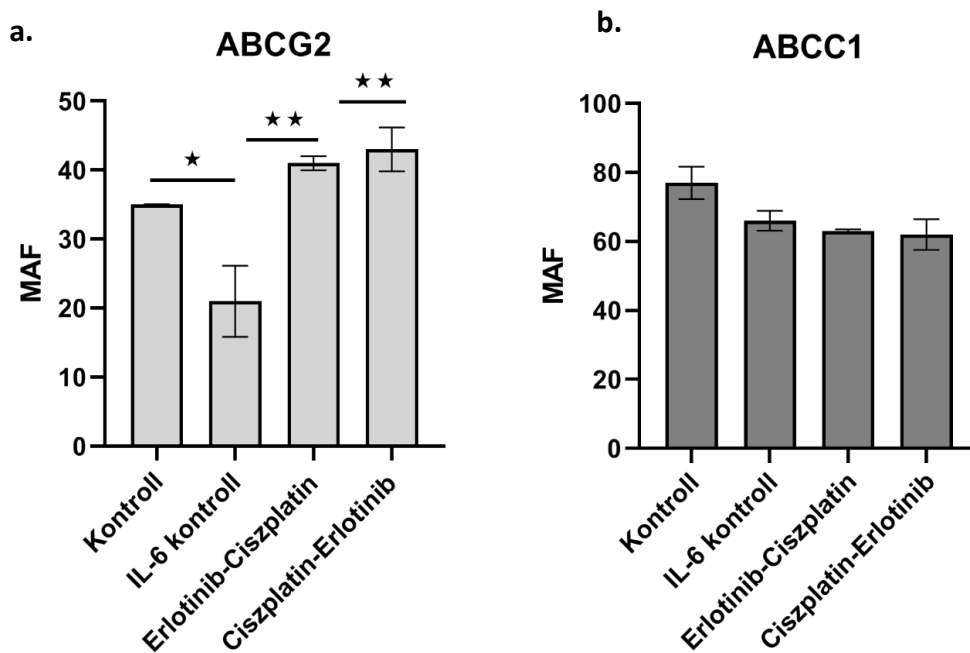
6.6 Az IL-6 szerepe a multidrog rezisztenciában

A multidrogtranszporter fehérjék tumorsejteken való kifejeződése hozzájárul a multidrog rezisztencia jelenségéhez, amely csökkenti a daganatok kemoterápiás kezelésének hatékonyságát. Következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk tovább, hogy van-e valamilyen hatása az exogén IL-6 kezelésnek a multidrog rezisztencia fehérjék kifejeződésére, így az EGFR mutációval rendelkező 3D tüdőmodelleket (PC-9-NHLF) rekombináns IL-6 kezelésnek vetettük alá és az ABCG2, ABCC1, valamint ABCC5 mRNS szinten történő kifejeződését qPCR módszerrel vizsgáltuk. Az emelkedett IL-6-ot tartalmazó környezetben az ABCG2 és az ABCC1 szintjében minden kezelési kondíció esetén emelkedést tapasztaltunk (10. a.-b. ábrák), míg az ABCC5 csökkenő tendenciát mutatott (10. c. ábra).



10. ábra: ABCG2 (a.), ABCC1 (b.) és ABCC5 (c.) relatív mRNS expressziójának változása 48 órás humán rekombináns IL-6 előkezelést követő hatóanyag kezelések során *in vitro* 3D sejtenyészeten (PC-9-NHLF, n=3). A génexpressziós változások β -aktin belső kontrollhoz viszonyítva láthatóak. Az adatokat azok átlaga \pm SEM ábrázoltuk és szignifikánsnak tekintettük, ha az ANOVA teszt alapján $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

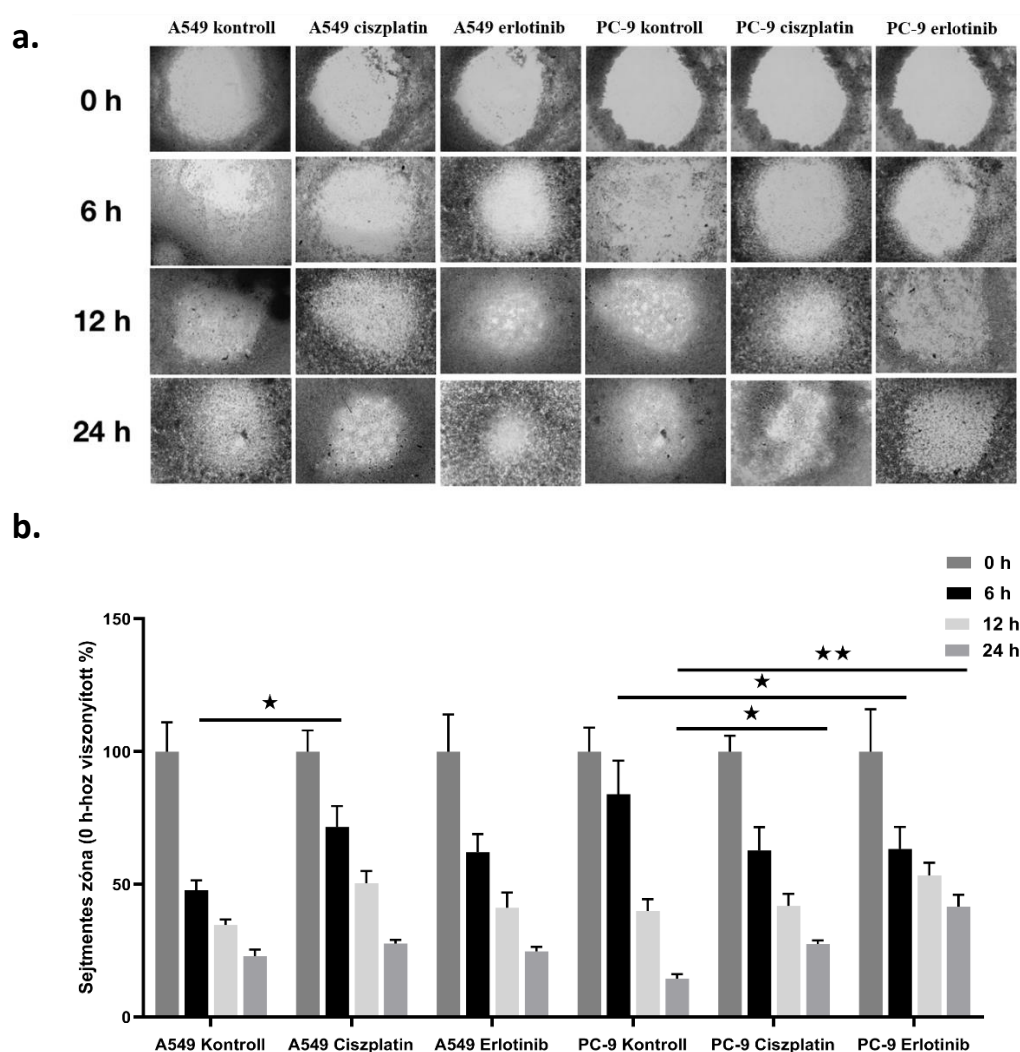
Az ABCG2 és ABCC1 pumpa-aktivitásának kvantitatív meghatározásához funkcionális vizsgálatot is végeztünk. A rekombináns IL-6 molekula kizárólagos használata ugyan csökkentette az ABCG2 aktivitását, az IL-6 előkezeléssel történő erlotinib-ciszplatin, valamint ciszplatin-erlotinib szekvenciális kezelések az ABCG2 fokozott aktivitását mutatták (**11. a. ábra**). Ezzel szemben az ABCC1 aktivitása kismértékben csökkent a kezeletlen kontrollhoz képest (**11. b. ábra**).



11. ábra: ABCG2 (a.) és ABCC1 (b.) drogtranszporter fehérjék aktivitásának változása 48 órás humán rekombináns IL-6 kezelést követő hatóanyag kezelés során *in vitro* 3D sejtenyészetben ($n=3$). Az adatokat azok átlaga \pm SEM ábrázoltuk és szignifikánsnak tekintettük, ha az ANOVA teszt alapján $*p<0.05$, $**p<0.01$.

6.7 A ciszplatin és az erlotinib kezelés hatása a sejtmigrációra

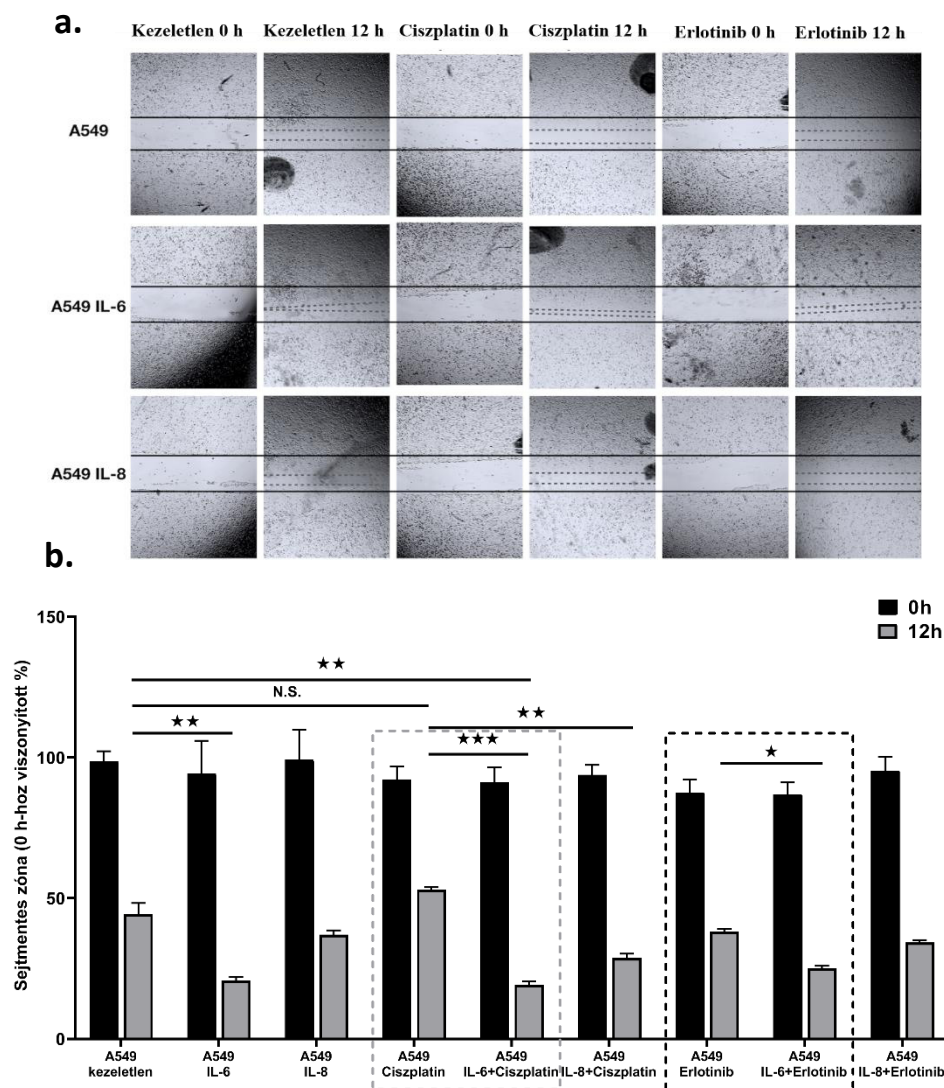
Annak érdekében, hogy a tumorsejtek migrációját befolyásolja-e az erlotinib és a ciszplatin alkalmazása, mágneses migrációs gyöngy esszét végeztünk. Az A549 sejtvonal esetében a kontroll kezeletlen sejtpopulációhoz képest a ciszplatinnal történő kezelés átmenetileg késleltette a rés összezáródást, de 24 h elteltével a sejtek migrációja azonos volt a kontroll sejtekével. Az erlotinib kezelés nem volt hatással az A549 sejtek migrációjára, nem szorította vissza a sejtvándorlást. Ezzel ellentétben a PC-9 sejtvonal jól reagált az erlotinibbel történő kezelésre és 12 h, valamint 24 h elteltével kisebb résösszezáródás volt megfigyelhető a kezeletlen kontrollhoz és a ciszplatin kezelt sejtpopulációhoz képest (**12. a.-b. ábrák**).



12. ábra: Ciszplatin (30 nM) (a.) és erlotinib (100 nM) (b.) kezelés hatásának vizsgálata KRAS mutáns A549 és EGFR mutáns PC-9 sejtek migrációjára mágneses gyöngy esszé segítségével mérve ($n=3$). Az adatokat azok átlaga \pm SEM ábrázoltuk és szignifikánsnak tekintettük, ha az ANOVA teszt alapján $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.

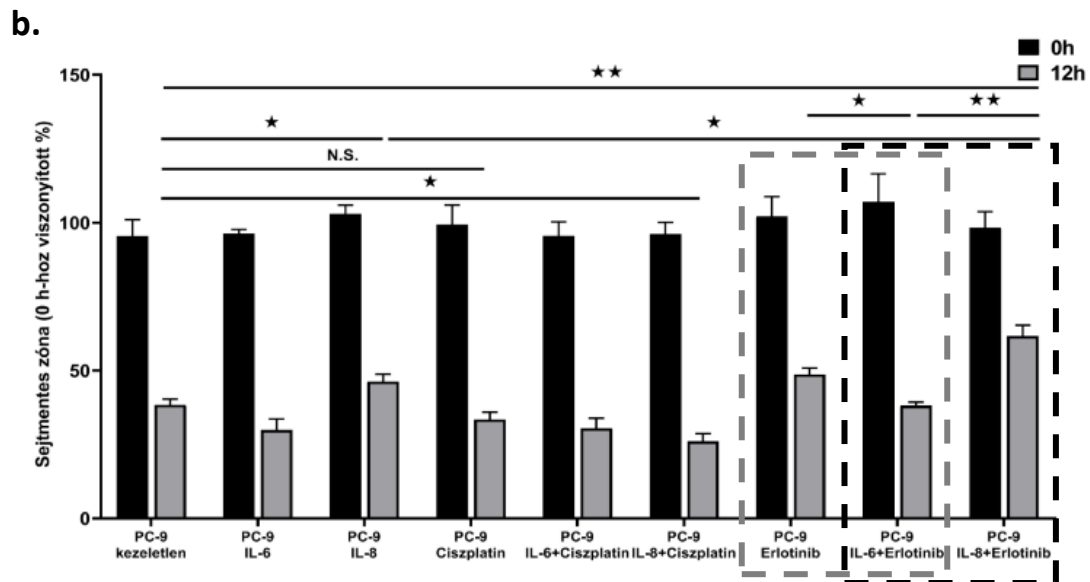
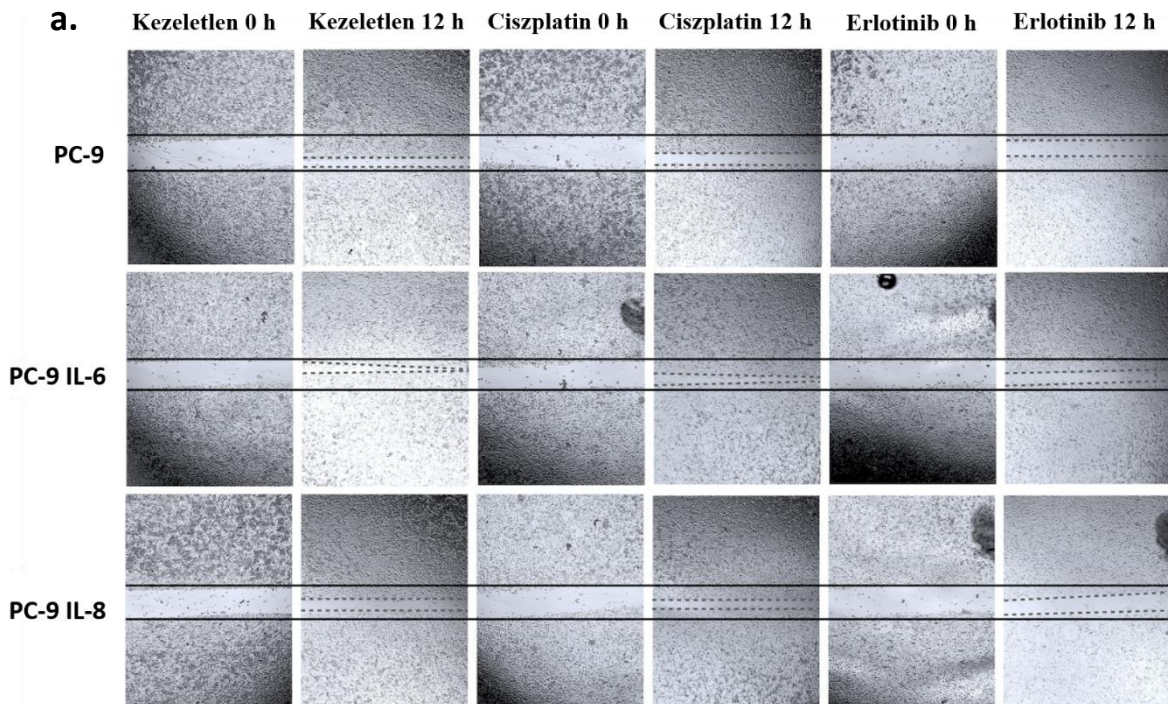
6.8 Gyulladásos citokinek szerepe a sejt migrációban

Vizsgálatainkat tovább folytattuk abba az irányba, hogy a citokinek jelenléte befolyásolja-e a tumorsejtek migrációját a kezelésekkel együtt, valamint önállóan alkalmazva. Az A549-es sejtvonal esetében az IL-6 szignifikánsan növelte a sejtek migrációját. Ugyanez a hatás figyelhető meg, ha az IL-6-ot ciszplatinnal vagy erlotinibbel együtt alkalmaztuk. Az IL-8 irányába végzett kísérleteink során hasonló migrációs mintázatot tapasztaltunk, mint az IL-6 esetében. Az IL-8 ciszplatinnal együtt történő alkalmazása szignifikánsan növelte a tumorsejtek migrációját (13. a.-b. ábrák). A tumoros eredetű tüdőepithél sejtek migrációja azonban rekombináns IL-6 kezelés hatására nagyobb mértékben nőtt az IL-8 kezeléshez képest.



13. ábra: Ciszplatin (30 nM), erlotinib (100 nM), IL-6 (ng/ml) és IL-8 (100 ng/ml) kizárólagos és együttes alkalmazásának hatása a KRAS mutáns A549 sejtek migrációjára (n=3). Az adatokat azok átlaga ± SEM ábrázoltuk és szignifikánsnak tekintettük, ha az ANOVA teszt alapján * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. 10x-es nagyítás.

A PC-9-es sejtek esetében az IL-6 nem volt szignifikáns hatással a sejtmigrációra, csak abban az esetben, amikor erlotinibbel együtt alkalmaztuk. Érdekes módon azonban az IL-8 gátolta a résösszezáródást, különösképpen az erlotinibbel együtt. A ciszplatin nem volt képes lelassítani a résösszezáródást, de IL-6 és IL-8 jelenlétében nagyobb migrációt eredményezett (14. a.-b. ábrák).

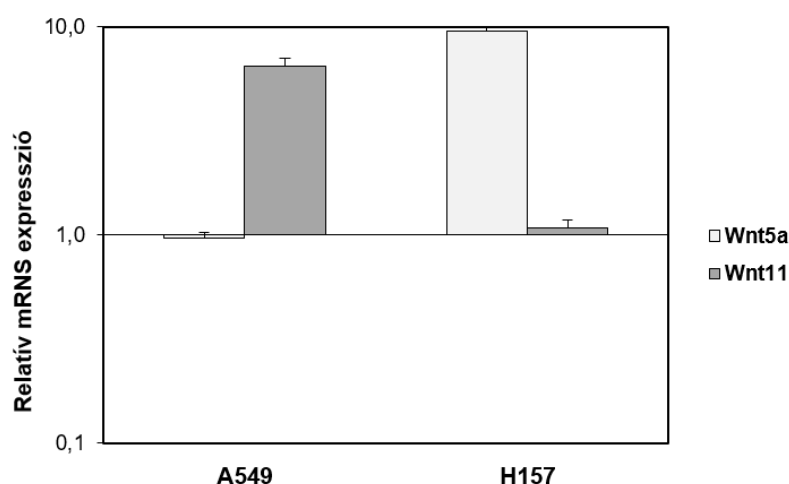


14. ábra: Ciszplatin (30 nM), erlotinib (100 nM), IL-6 (ng/ml) és IL-8 (100 ng/ml) kizárólagos és együttes alkalmazásának hatása az EGFR mutáns PC-9 sejtek migrációjára (n=3). Az adatokat azok átlaga ± SEM ábrázoltuk és szignifikánsnak tekintettük, ha az ANOVA teszt alapján * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. 10x-es nagyítás.

6.9 Wnt jelátviteli molekulák szerepe a nem kissejtes tüdőkarinómában

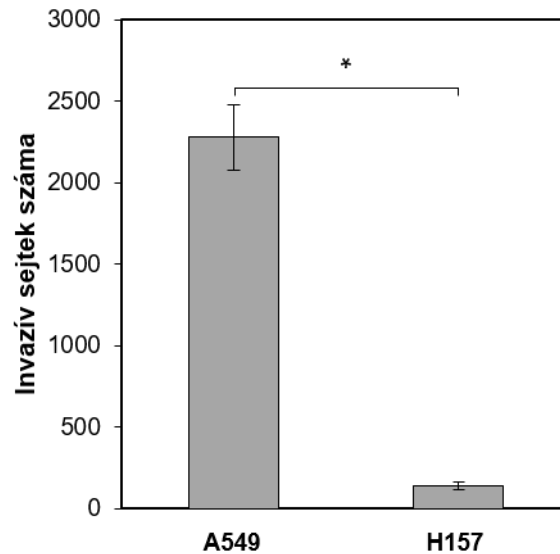
Az epitheliális-mesenchymális tranzíció (EMT) folyamata során az epitheliális eredetű sejtek elveszítik eredeti fenotípus jellemzőiket és mesenchymális karaktert vesznek fel. A sejtek orsó alakot öltenek, a sejtadhéziós kapcsolatok felbomlanak, a sejtek elveszítik polaritásukat és az epitheliális sejtekre jellemző markerek (pl.: E-kadherin, cytokeratin) drasztikus csökkenése figyelhető meg. Ezzel egyidejűleg a mesenchymális sejtekre jellemző tulajdonságok jelennek meg, mint például vimentin, fibronectin, N-kadherin, α -simaizom aktin expressziója, valamint mátrix metalloproteinázok termelése. Végeredményképpen a transzformálódott sejtek nagyfokú mozgékonyt és inváziós képességet szereznek, amely a daganatos betegségek progressziójában és metasztázisképzésében nyilvánulhat meg. Számos, daganat kialakulásához köthető jelátviteli útvonal és fehérje vesz részt az EMT kialakulásában. Legfőbb szabályozója a transzformáló növekedési faktor- β , de az eddig megismert szabályozó rendszerek közé sorolhatóak a Hedgehog, Notch és a Wnt jelátviteli útvonalak is (123).

A Wnt jelátvitelnek az őssejt biológiájában és a daganatképződésben, így a tüdő karcinogenezisében is meghatározó szerepe van. Így kezdtük el vizsgálni a nem-kanonikus Wnt molekulák kifejeződését AC és SCC sejt vonalakon. Az analízis során kimutattuk, hogy a nem kissejtes tüdőkarinóma két altípusában a Wnt5a és Wnt11 molekulák kifejeződése ellentétes mintázatot mutat. Magasabb Wnt11 ugyanis alacsonyabb Wnt5a szinttel párosult az AC altípusban, míg magasabb Wnt5a szint alacsonyabb Wnt11 jelenlétét eredményezte az SCC altípusban (15. ábra).



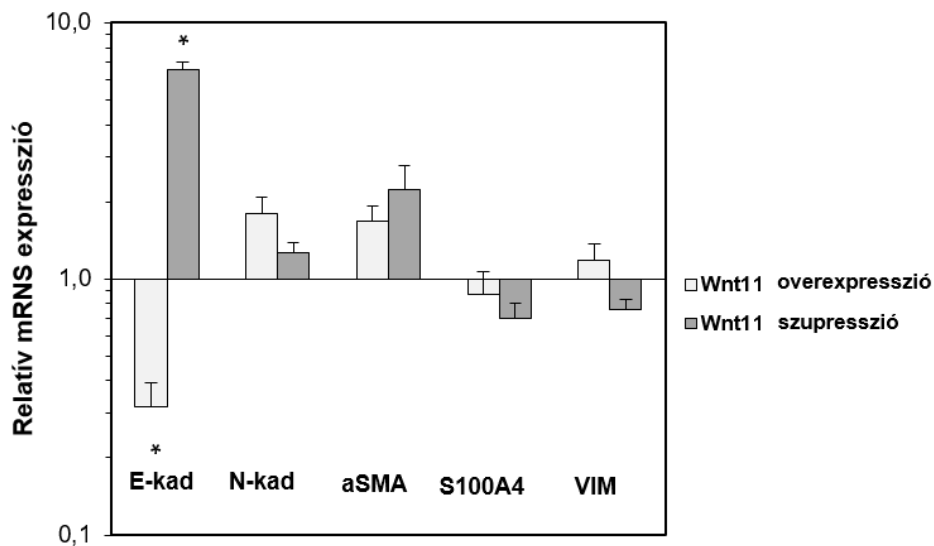
15. ábra: *Wnt5a és Wnt11 génexpressziós szintje A549 (AC) és H157 (SCC) sejt kultúrákban. A génexpressziós változások β -aktin belső kontrollhoz, valamint primer, normál tüdőepithél sejt kultúrához (SAEC) viszonyítva láthatóak. Az adatokat azok átlaga \pm SEM ábrázoltuk.*

Ezt követően arra kerestük a választ, hogy az AC altípusban túlsúlyban lévő Wnt11 molekula milyen szerepet tölthet be a tüdő karcinogenezisének folyamatában. A sejtek invazív képességére irányuló kísérleteinkben a függesztett sejtenyésztő betétbe kitett A549 sejtek szignifikánsan gyorsabban vándoroltak, mint az SCC altípusú H157 sejtek, amelyeknél alacsonyabb Wnt11 szint volt látható (**16. ábra**).



16. ábra: A549 (AC) és H157 (SCC) sejt kultúrák inváziós képességének vizsgálata. Az adatokat azok átlaga \pm SEM ábrázoltuk és szignifikánsnak tekintettük, ha a Student-féle t-próba alapján $*p < 0.05$.

A megváltozott Wnt 11 expresszió a sejtek motilitásában is változásokat okozhat, így kezdtük el vizsgálni a Wnt11 szerepét az EMT folyamatához köthető epitheliális és mesenchymális markerek expressziójában. Eredményeink azt mutatják, hogy a Wnt11 overexpressziója elősegítette az EMT folyamatát, amely az epitheliális kadherin (E-kadherin) szintjének csökkenését és egyúttal a mesenchymális markerek, így az N-kadherin, α -simaizom aktin és vimentin fokozott kifejeződését vonta magával (**17. ábra**).



17. ábra: *Wnt11* overexpresszió és szupresszió hatása az epitheliális-mesenchymális tranzíció folyamatához köthető markerek expressziójára A549 sejt kultúrában. A génexpressziós változások β -aktin belső kontrollhoz viszonyítva láthatóak. Az adatokat azok átlaga \pm SEM ábrázoltuk és szignifikánsnak tekintettük, ha a Student-féle *t*-próba alapján $*p < 0.05$.

7 Összefoglalás

A tüdődaganat miatti halálozás évtizedek óta vezeti a statisztikákat a világ minden táján (124). A tüdődaganatok kialakulásának növekvő tendenciája úgy klinikai, mint molekuláris vizsgálatok szükségességét vetette fel jobb kezelési stratégiák kidolgozása érdekében. A platina alapú kettős kombinált bázisterápián túl a molekuláris célzott terápia megjelenésével új fejezet nyílt az NSCLC, azon belül is az adenokarcinóma szövettani altípus kezelésében. Ezzel szemben a laphámsejtes karcinóma esetében jelenleg még nem rendelkezünk célzott biológiai terápia lehetőségével. Az újfajta megközelítést képviselő immunterápia alkalmazása azonban reménykeltő lehet a laphámsejtes betegcsoport számára. E dohányzással összefüggő, erősen immunogén szövettani altípusban a PD-L1 és CTLA-4 fehérjék kifejeződése szignifikánsan magasabbnak mutatkozik, mint az adenokarcinómák esetében, amely különösen fontossá válhat az immunellenőrzőpont-gátló szerek alkalmazásának tükrében (125), (126).

A kemoterápiás kezelés hatására a szöveti mikro környezetben bekövetkező változások és a progresszió kialakulásának megnövekedett kockázata összefüggésben állnak egymással. Az elsődleges célként számoltartott tumorsejtpusztítás mellett a kemoterápia káros következményeként gyulladáscitokinek, kemokinek és pro-angiogenikus faktorok szekréciója indulhat meg, amely kedvez a túlélő sejtpopuláció további életben maradásához és ezáltal a progresszióra és metasztázisra hajlamosító környezet megteremtéséhez (127). Eredményeink szerint a ciszplatin kezelés szignifikánsan megemeli az IL-6 és IL-8 gyulladáscitokinek termelődését, különösen az NSCLC EGFR mutációjának esetén. Ezek az eredmények összefüggésbe hozhatóak korábbi tanulmányokkal, amelyekben leírták, hogy a molekuláris mechanizmus hátterében feltétlenül a platinakomplex DNS károsító hatására indukálódó NF- κ B-útvonalnak van szerepe, amely az IL-6 termelődését fokozza (128), (96). Az NF- κ B-útvonal aktiválódása által kiváltott IL-6 termelés szerepének vizsgálatában arra is fény derült, hogy az IL-6 a tüdőben található monociták tumortámogató hatással rendelkező, M2 fenotípusú makrofágokká történő differenciálódását idézi elő, amely szerepet játszik a kemorezisztencia kialakulásában.

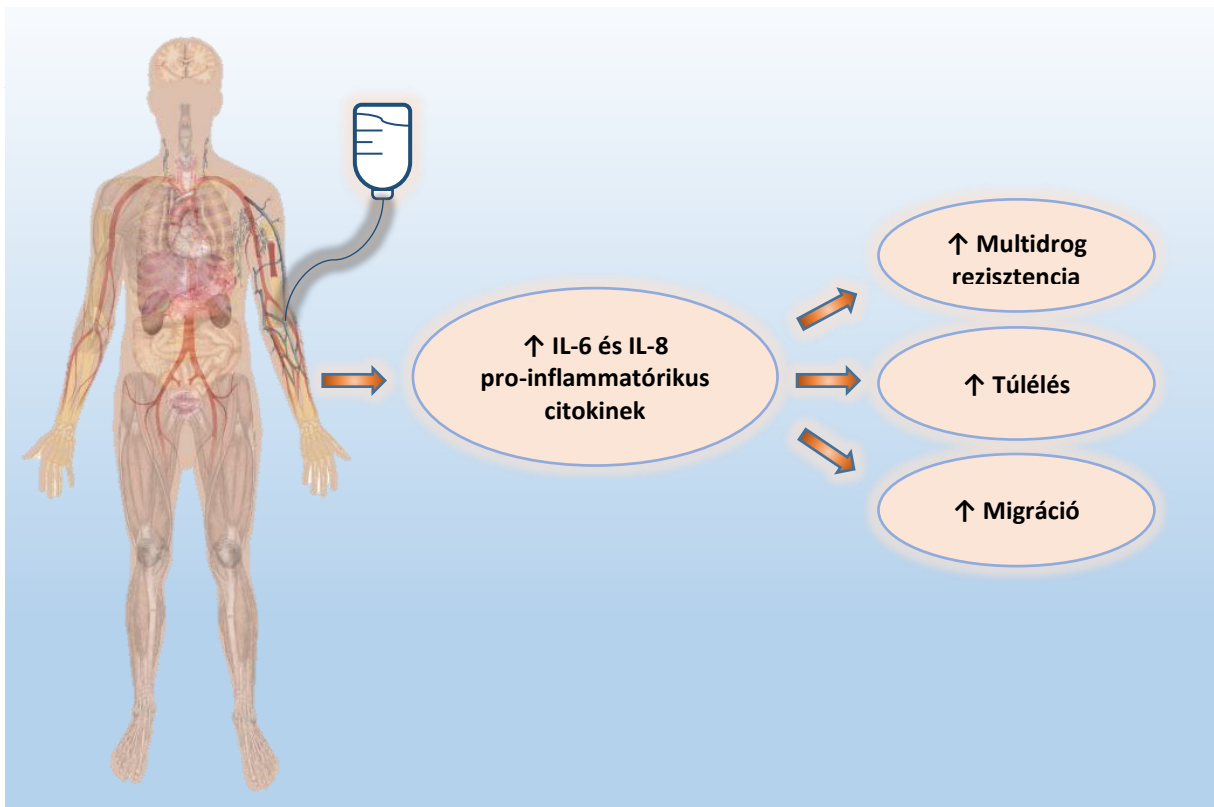
További kísérleteink rávilágítottak a terápia sikerét befolyásoló egyéb tényezőkre is. Eredményeink azt mutatják, hogy a megnövelt IL-6 szint a multidrog rezisztencia kialakulásában fontos szerepet játszó ABCG2 és ABCC1 transzporter fehérjék szintjének emelkedéséhez vezet. Az előrehaladott nem kissejtes tüdőrákban szenvedő betegek vérplazmájában gyakran emelkedett IL-6 szint detektálható (93). Felmerülhet a kérdés, hogy a kemoterápiás kezelés vajon fokozza-e az IL-6 szekrécióját és a fent említett, immunsejtekre

ható szerepe mellett milyen molekuláris változásokat idéz még elő. Korábbi tanulmány is alátámasztja, hogy a ciszplatin kezelés az ATM/NF- κ B-útvonál aktiválódása révén fokozza az IL-6 szekréciót, amely egyúttal az MDR-asszociált fehérjék, így az ABCG2 megemelkedett expressziójához vezet (94). Az általunk vizsgált ABCG2 és ABCC1 transzporter fehérjék emelkedett expressziója értelmezhető egyfajta molekuláris védelmi mechanizmusként is, amely az IL-6 dús tumor mikrokörnyezet révén védelmet nyújt a daganatellenes szerekkel szemben.

További kísérleteink a tumorsejtek migrációs képességének vizsgálatával bizonyítják, hogy az IL-6 és IL-8 citokinek sejt-, és mutációsspecifikus módon képesek a kezelés alatt álló tumorsejtek migrációját befolyásolni. Az adenokarcinóma altípus EGFR mutációja számos esetben az IL-6, míg a KRAS mutációja az IL-8 megnövekedett szintjével párosul (129), (130). Eredményeink alapján feltételezzük, hogy EGFR mutáció esetén a ciszplatinnal történő kezelés az IL-6-szint további emelkedését vonhatja maga után, amely a vér-agy gát integritásának megbontásával megnövekedett permeabilitáshoz vezet (131). Az vér-agy gátra gyakorolt negatív hatás révén az IL-6 emelkedett szintje szükséges lehet az EGFR mutációra gyakran jellemző agyi metasztázis elősegítéséhez.

A fentiekben tárgyalt IL-6 és IL-8 citokinek mellett a gyulladás és a migráció folyamataiban más gének is szerepet játszanak. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a nem-kanonikus Wnt5a a pro-inflammatórikus folyamatok aktiválódásán és egyúttal az anti-inflammatórikus PPAR- γ gátlásán keresztül szabályozza a tüdőben lejátszódó gyulladásos folyamatokat (132). Humán melanómában a Wnt5a közvetlenül szerepet játszik a tumorsejtek motilitásában, amely a PKC útvonál aktiválódása révén sejtadhéziós változásokhoz és az aktin átrendeződéséhez vezet (133), míg egy másik, szintén nem-kanonikus Wnt ligand, a Wnt11 az EMT folyamatán keresztül szabályozza a sejtek vándorlását (134). Eredményeink alapján a Wnt11 aktivációját az NSCLC-n belül az adenokarcinóma altípusban figyeltük meg, amely a tumorsejtek fokozott inváziós képességével párosult. Kísérleteink szerint a Wnt11 által közvetített hatás jeletősen függ a szöveti mikrokörnyezetben jelenlévő Wnt molekulák szintjétől. A módosult Wnt mikrokörnyezetben a Wnt11 fokozott kifejeződése elősegíti az EMT folyamatát, elsősorban a sejtek integritásért felelős kadherin molekulák szintjének eltolódása révén. Eredményeink alapján elmondható, hogy a Wnt11 közvetlenül felelős a kadherin szint szabályozásáért. A „kadherin váltás” révén az E-kadherin szintjét csökkenti, míg az N-kadherin mRNS szintjét növeli, amely szükséges lépés a metasztatikus tumor progresszió felé.

A fenti eredmények tükrében arra következtethetünk, hogy a nem kissejtes tüdődaganatok kezelése során alkalmazott hatóanyagok és azok sorrendje a tumor sejtek gátlásán túlmenően megemelkedett IL-6 expresszióhoz vezethetnek. Az IL-6 által közvetített hatás a szöveti mikro környezetben a tumor progressziójának kedvez a túlélés, a migrációs képesség és a rezisztencia fokozása révén (**18. ábra**). Ennek okán a kezelés kiváltotta molekuláris mechanizmusoknak pontosabb megismerése a tüdőkarcinóma kezelésének terápiás megoldásaiban is kulcsfontosságú lehet.



18. ábra: A kezelés hatására indukálódó pro-inflammatórikus citokinek szerepe a nem kissejtes tüdődaganat progressziójában.

8 Új eredmények, következtetések

Kutatómunkám során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. *Szolgálhat-e a betegekből nyert tüdődaganatos szövetminta laboratóriumi feldolgoásával történő in vitro 3D tumormodell felállítása az egyes tüdődaganat típusok reprezentálására és alkalmas-e a klinikai terápia során alkalmazott hatóanyagok vizsgálatára?*

Az *in vitro* vizsgálatok biológiai modelljét sokáig a 2D ún. egyrétegű („monolayer”) sejt kultúrák jelentették, azonban a sejt-, és szövettenyésztési technikák fejlődésével egyre nagyobb teret hódít az új, 3D vizsgálati rendszerek alkalmazása. Mivel szerkezetük és összetettségük közelebb áll a valós tumor-mikrokörnyezethez, így lehetővé válhat számos betegség *in vitro* szöveti modelljének előállítása és ezáltal tumorelles hatóanyagok tesztelése is.

Vizsgálatainkban az adenokarcinóma szövettani altípus *in vitro* 3D szöveti modelljében kimutattuk, hogy EGFR mutáció esetén az erlotinib, míg KRAS/EGFR vad típus, valamint KRAS mutáció esetén a ciszplatin bizonyult hatékonyabbnak. Megállapítottuk, hogy ezen eredmények korrelálnak a klinikumban tapasztalt *in vivo* gyógyszerhatékonysággal, és hogy a betegmintákból felállított 3D tüdőmodellünk alkalmas a klinikai terápia során alkalmazott hatóanyagok vizsgálatára.

2. *Befolyásolja-e a kezelés sorrendje a tumorsejtek kezelésre adott válaszát és a gyulladási citokinek expresszióját?*

A ciszplatin, valamint az erlotinib kezelés alkalmazásának sorrendje eltérő terápiás válasszal párosult a tumorsejtek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálatában. Eredményeink azt mutatják, hogy kombinált kezelésben a ciszplatin elsődleges használata drasztikusan csökkentette a tumorsejtek életképességét, ezzel szemben az erlotinib elsődleges használata kedvezőbb volt a tumorsejtek életképességének szempontjából. E megközelítésen túl kimutattuk, hogy a terápia során alkalmazott hatóanyagkezelések sorrendje kulcsfontosságú szereppel bír a gyulladási citokinek expressziójában. EGFR mutáció esetén a ciszplatin

kezelés tovább emelte a tüdőkarcinogenezis folyamatában fontos szerepet játszó, a tumorsejtek proliferációjáért és migrációjáért felelős IL-6 termelődését. Ezzel szemben az erlotinib képes volt a ciszplatin-indukálta IL-6 szekréciónak gátolni. Ez a megfigyelés a kezelési sorrend kiemelt szerepét hangsúlyozza, amely hozzájárulhat a tumorsejtek migrációjának és ezáltal a metasztázis képzés gátlásához.

3. Megváltoztatja-e az IL-6 jelenléte a tumorsejtek kezelésre adott válaszát?

A tumorsejtek túlélésében betöltött szerepének vizsgálatában kimutattuk, hogy az IL-6 minden kezelési kondíció esetén indukálja a sejtek életben maradási képességét. A progresszió megítélésének szempontjából elmondható, hogy az IL-6 a tumorsejtek túlélésének pozitív regulátora, amely az alkalmazott hatóanyagkezelés sikertelenségét okozhatja.

4. Ezen belül vizsgáltuk annak a kérdését, hogy van-e összefüggés a tumorsejtek életképessége és a drogtranszporter fehérjék szintje között?

A tumorsejtek életképességének növekedésével párhuzamosan megállapítottuk, hogy az IL-6 képes az ABCG2 és ABCC1 multidrog transzporter fehérjék mRNS szintjét megemelni. A génextpressziós változások mellett a funkcionális vizsgálatainkban az IL-6 önmagában alkalmazva ugyan csökkentette az ABCG2 aktivitását, de a ciszplatin és erlotinib szekvenciális kezelésekkkel együtt az ABCG2 megnövekedett aktivitását váltotta ki. Eredményeink igazolják azt a feltételezésünket, hogy a tumorsejtek efflux transzportereinek kifejeződését a gyulladáshoz vezető mikroöregzet az IL-6 révén képes oly módon megváltoztatni, amely a tumor progressziójához vezethet.

5. Szerepet játszik-e az IL-6, valamint az IL-8 a tumorsejtek migrációjának szabályozásában és ezáltal a metasztázis képzésben?

A tumorsejtek migrációs folyamatait vizsgáló kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy az IL-6 és IL-8 citokinek pozitív szabályozóként működnek a KRAS mutáns A549 adenokarcinóma sejtek esetében, fokozva a sejtek migrációs képességét. Az EGFR mutáns PC-9 sejtek tekintetében azonban az IL-6 és IL-8 ellentétes irányú hatását tapasztaltuk. Míg az IL-6 fokozta, az IL-8 gátolta a sejtek vándorlását. Összességében feltételezhetjük, hogy ezen

citokinek mutációfüggő módon képesek szabályozni a sejtek migrációját és ezáltal a tumor metasztázisképző hajlamát.

9 Irodalomjegyzék

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics , 2009,. CA CancerJournal Clin. 2009;59(4):225–49.
2. Wistuba I, Gazdar A. Molecular biology of preneoplastic lesions of the lung. Lung Cancer. 2008;84–98.
3. Koinis F, Kotsakis A, Georgoulis V. Small cell lung cancer (SCLC): No treatment advances in recent years. Transl Lung Cancer Res. 2016;5(1):39–50.
4. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, risk factors, treatment and survivorship. 2009;83(5):584–94.
5. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung Cancer: Diagnosis and Management. Am Fam Physician [Internet]. 2007;75(1):56–63. Available from: <http://www.aafp.org/afp/2007/0101/p56.html>
6. Popper HH. Progression and metastasis of lung cancer. Cancer Metastasis Rev. 2016;35(1):75–91.
7. Ferlay J, Soerjomataram I, Morten E, Rajesh D, Sultan E, Mathers C. GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. 2013; Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2014;
8. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. Chest [Internet]. 2009;136(1):260–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.08-0978>
9. Korányi Bulletin. 2019; Available from: <https://szakmai.koranyi.hu/wp-content/uploads/2020/02/Evkonyv2019.pdf>
10. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja A tüdő és a mellhártya elsődleges rosszindulatú megbetegedéseinek diagnosztikája és kezelése. Available from: <http://ftsz.pte.hu/docs/protokollok/TUDOHorgorak.pdf>
11. Luo SY, Lam DC. Oncogenic driver mutations in lung cancer. Transl Respir Med. 2013;1(1):2–9.
12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
13. Cooper WA, Lam DCL, O’Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. J Thorac Dis. 2013;5(SUPPL.5).
14. Vatansever S, Erman B, Gümüş ZH. Oncogenic G12D mutation alters local conformations and dynamics of K-Ras. Sci Rep. 2019;9(1):1–13.
15. Román M, Baraibar I, López I, Nadal E, Rolfo C, Vicent S, et al. KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: Clinical perspectives on the treatment of an old target. Mol Cancer. 2018;17(1):1–14.
16. Korpanty GJ, Graham DM, Vincent MD, Leighl NB. Biomarkers that currently effect

- clinical practice in lung cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1 and KRAS. *Front Oncol.* 2014;4 JUL(August):1–26.
17. Judit M, István P. EGFR-tirozinkináz-inhibitorok alkalmazása tüdőrákban : szenzitivitás és rezisztencia. *Magy Onkológia.* 2012;56:38–49.
 18. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 2012;72(10):2457–67.
 19. Gaughan EM, Costa DB. Genotype-driven therapies for non-small cell lung cancer: Focus on EGFR, KRAS and ALK gene abnormalities. *Ther Adv Med Oncol.* 2011;3(3):113–25.
 20. Lee NY, Hazlett TL, Koland JG. Structure and dynamics of the epidermal growth factor receptor C-terminal phosphorylation domain. *Protein Sci.* 2006;15(5):1142–52.
 21. Ganjoo KN, Wakelle H. Review of erlotinib in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Biol Targets Ther.* 2007;1(4):335–46.
 22. Lee JG, Wu R. Combination Erlotinib-Cisplatin and Atg3-Mediated Autophagy in Erlotinib Resistant Lung Cancer. *PLoS One.* 2012;7(10).
 23. Sequist L V., Bell DW, Lynch TJ, Haber DA. Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(5):587–95.
 24. AF Gazdar. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene.* 2009;28(Suppl 1):S24–31.
 25. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448(7153):561–6.
 26. Ryska A, Dziadziuszko R, Olszewski W, Berzinec P, Öz B, Gottfried M, et al. A tüdőrák molekuláris diagnosztikája. *Magy Onkológia.* 2015;(59):259–66.
 27. Oxnard GR, Binder A, Jänne PA. New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(8):1097–104.
 28. Szabó IL, Ócsai H, Kiss B, Kékedi K, Kósa P, Várvolgyi T, et al. BRAF-mutáció pozitív áttétes melanoma célzott gyógyszeres kezelése. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szle.* 2017;93(4):160–7.
 29. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: Analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol.* 2005;23(4):857–65.
 30. Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer.* 2006;118(2):257–62.
 31. Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J*

- Clin Oncol. 2011;29(15):2046–51.
32. Gautschi O, Milia J, Cabarro B, Bluthgen MV, Besse B, Smit EF, et al. Targeted therapy for patients with BRAF-mutant lung cancer results from the European EURAF cohort. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2015;10(10):1451–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0000000000000625>
 33. Planchard D, Min Kim T, Mazieres J, Quoix E, Riely G, Barlesi F, et al. Dabrafenib in BRAF V600E-Mutant Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: an Open-label, Single arm, Multicenter, Phase 2 Trial HHS Public Access. *Lancet Oncol* [Internet]. 2016;17(5):642–50. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5006181/pdf/nihms812215.pdf>
 34. Pallis AG. A Review of Treatment in Non-small-cell Lung Cancer. *Eur Oncol Haematology*. 2012;8(4):208–12.
 35. Fennell DA, Summers Y, Cadranel J, Benepal T, Christoph DC, Lal R, et al. Cisplatin in the modern era : The backbone of first-line chemotherapy for non-small cell lung cancer. *CANCER Treat Rev* [Internet]. 2016;44:42–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.01.003>
 36. Tanida S, Mizoshita T, Ozeki K, Tsukamoto H, Kamiya T, Kataoka H, et al. Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity : Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment. *Int J Surg Oncol*. 2012;
 37. Rosenberg B, Camp L Van, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 1965;205(4972):698–9.
 38. Rosenberg B, VanCamp L. The Successful Regression of Large Solid Sarcoma 180 Tumors by Platinum Compounds. *Cancer Res*. 1970;30(6):1799–802.
 39. Gómez-Ruiz S, Maksimović-Ivanić D, Mijatović S, Kaluderović GN. On the discovery, biological effects, and use of cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy. *Bioinorg Chem Appl*. 2012;2012:15–7.
 40. Stewart LA, Pignon JP. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: A meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. *Br Med J*. 1995;311(7010):899–909.
 41. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti G V., Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: A pooled analysis by the LACE collaborative group. *J Clin Oncol*. 2008;26(21):3552–9.
 42. Takatoshi K, Steyger PS. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. *Toxicol Lett*. 2015;237(3):219–27.
 43. Ciarimboli G. Membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects. *Anticancer Res*. 2014;34(1):547–50.
 44. Ke SZ, Ni XY, Zhang YH, Wang YN, Wu B, Gao FG. Camptothecin and cisplatin upregulate ABCG2 and MRP2 expression by activating the ATM/NF- κ B pathway in lung cancer cells. *Int J Oncol*. 2013;42(4):1289–96.

45. Kuo MT, Chen HHW, Song IS, Savaraj N, Ishikawa T. The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(1):71–83.
46. Shimizu K, Birnbaum D, Ruley MA, Fasano O, Suard Y, Edlund L, et al. Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature.* 1983;304(5926):497–500.
47. Yoda S, Dagogo-Jack I, Hata AN. Targeting oncogenic drivers in lung cancer: Recent progress, current challenges and future opportunities. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2019;193:20–30. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.08.007>
48. Gunning WT, Kramer PM, Lubet RA, Steele VE, End DW, Wouters W, et al. Chemoprevention of benzo(a)pyrene-induced lung tumors in mice by the farnesyltransferase inhibitor R115777. *Clin Cancer Res.* 2003;9(5):1927–30.
49. Riely GJ, Johnson ML, Medina C, Rizvi NA, Miller VA, Kris MG, et al. A phase II trial of salirasib in patients with lung adenocarcinomas with KRAS mutations. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2011;6(8):1435–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e318223c099>
50. Papadimitrakopoulou V, Jack Lee J, Wistuba II, Tsao AS, Fossella F V., Kalhor N, et al. The BATTLE-2 study: A biomarker-integrated targeted therapy study in previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34(30):3638–47.
51. Yang H, Liang SQ, Schmid RA, Peng RW. New horizons in KRAS-mutant lung cancer: Dawn after darkness. *Front Oncol.* 2019;9(SEP):1–13.
52. Lito P, Solomon M, Li LS, Hansen R, Rosen N. Cancer therapeutics: Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. *Science* (80-). 2016;351(6273):604–8.
53. Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, Shokat KM. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* [Internet]. 2013;503(7477):548–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12796>
54. Reguart N, Cardona AF, Rosell R. Role of erlotinib in first-line and maintenance treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag Res.* 2010;2(1):143–56.
55. Tamási L, Böcskei RM. Erlotinib a mutáns és vad epidermális növekedési faktor receptort hordozó tüdő adenocarcinoma kezelésében. *Med Thorac.* 2012;447–53.
56. Shepherd FA, Pereira JR, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in Previously Treated Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2005;352(2):123–32.
57. Chen G, Feng J, Zhou C, Wu YL, Liu XQ, Wang C, et al. Quality of life (QoL) analyses from OPTIMAL (CTONG-0802), a phase III, randomised, open-label study of first-line erlotinib versus chemotherapy in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol.* 2013;24(6):1615–22.
58. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with

- advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): A multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2012;13(3):239–46. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70393-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70393-X)
59. Osarogiagbon RU, Cappuzzo F, Ciuleanu T, Leon L, Klughammer B. Erlotinib therapy after initial platinum doublet therapy in patients with EGFR wild type non-small cell lung cancer: Results of a combined patient-level analysis of the NCIC CTG BR.21 and SATURN trials. *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(4):465–74.
 60. Kazandjian D, Blumenthal GM, Chen H, He K, Patel M, Justice R, et al. FDA Approval Summary: Crizotinib for the Treatment of Metastatic Non- Small Cell Lung Cancer With Anaplastic Lymphoma Kinase Rearrangements. *Oncologist*. 2014;19(10).
 61. Liao BC, Lin CC, Shih JY, Yang JCH. Treating patients with ALK-positive non-small cell lung cancer: Latest evidence and management strategy. *Ther Adv Med Oncol*. 2015;7(5):274–90.
 62. Shackelford RE, Vora M, Mayhall K, Cotelingam J. ALK-rearrangements and testing methods in non-small cell lung cancer: A review. *Genes and Cancer*. 2015;5(1–2):1–14.
 63. Wu J, Savooji J, Liu D. Second- and third-generation ALK inhibitors for non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2016;9(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13045-016-0251-8>
 64. Khunger A, Khunger M, Velcheti V. Dabrafenib in combination with trametinib in the treatment of patients with BRAF V600-positive advanced or metastatic nonsmall cell lung cancer: clinical evidence and experience. *Ther Adv Respir Dis*. 2018;12:1–9.
 65. Perez-Moreno P, Brambilla E, Thomas R, Soria JC. Squamous cell carcinoma of the lung: Molecular subtypes and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res*. 2012;18(9):2443–51.
 66. Liao RG, Watanabe H, Meyerson M, Hammerman PS. Targeted therapy for squamous cell lung cancer. *Lung Cancer Manag*. 2012;1(4):293–300.
 67. Socinski MA, Evans T, Gettinger S, Hensing TA, Van Dam Sequist L, Ireland B, et al. Treatment of stage IV non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* [Internet]. 2013;143(5 SUPPL):e341S-e368S. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.12-2361>
 68. Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM, et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(11):2184–91.
 69. Derman BA, Mileham KF, Bonomi PD, Batus M, Fidler MJ. Treatment of advanced squamous cell carcinoma of the lung: A review. *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(5):524–32.
 70. Rajdev K, Siddiqui AH, Ibrahim U, Patibandla P, Khan T, El-Sayegh D. An Unusually Aggressive Large Cell Carcinoma of the Lung: Undiagnosed until Autopsy. *Cureus*.

- 2018;d(2):1–7.
71. Downey RS, Sewell CW, Mansour KA. Large Cell Carcinoma of the Lung : A Highly Aggressive Tumor With Dismal Prognosis. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 1989;47(6):806–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-4975\(89\)90007-6](http://dx.doi.org/10.1016/0003-4975(89)90007-6)
 72. Ostoros G. A tüdőrák és a mellhártya elsődleges rosszindulatú megbetegedéseinek diagnosztikája és kezelése – Irányelvek 2001. 2001;1(54):1–24.
 73. Paripati A, Kingsley C, Weiss GJ. Pathway Targets to Explore in the Treatment of Small Cell and Large Cell Lung Cancers. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2009;4(11):1313–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181ba20cf>
 74. Peters S, Kerr KM, Stahel R. PD-1 blockade in advanced NSCLC : A focus on pembrolizumab. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2018;62:39–49. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.10.002>
 75. Massarelli E, Papadimitrakopoulou V, Welsh J, Tang C, Tsao AS. Immunotherapy in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2014;3(1):53–63.
 76. Moldvay J, Ostoros G. Támadás helyett önvédelem – Immunterápia tüdőrákban. *Magy Onkológia*. 2016;(60):28–33.
 77. Hime G, Abud H. Transcriptional and translational regulation of stem cell. Springer. 2013.
 78. Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. 2010;(106):1798–806.
 79. Berki T, Boldizsár F, Szabó M, Talabér G, Varcza Z. Jelátvitel (Orvosi biotechnológia) [Internet]. 2011. Available from: https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Jelatvitel_hu_book/ch03s06.html
 80. Stewart DJ. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(1):1–11.
 81. Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Jablons DM. Wnt signaling in lung cancer. 2005;222:1–10.
 82. Haseeb M, Pirzada RH, Ain QU, Choi S. Wnt signaling in the regulation of immune cell and cancer therapeutics. *Cells*. 2019;8(11):1380.
 83. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781–810.
 84. Uematsu K, He B, You L, Xu Z, McCormick F, Jablons DM. Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: Evidence of dishevelled overexpression. *Oncogene*. 2003;22(46):7218–21.
 85. Wang B, Tang Z, Gong H, Zhu L, Liu X. Wnt5a promotes epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Biosci Rep*. 2017;37(6):1–10.
 86. Winn RA, Marek L, Han SY, Rodriguez K, Rodriguez N, Haimmond M, et al. Restoration of Wnt-7a expression reverses non-small cell lung cancer cellular

- transformation through Frizzled-9-mediated growth inhibition and promotion of cell differentiation. *J Biol Chem*. 2005;280(20):19625–34.
87. Rapp J, Jaromi L, Kvell K, Miskei G, Pongracz JE. WNT signaling - lung cancer is no exception. *Respir Res*. 2017;18(1):1–16.
 88. Landskron G, De La Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*. 2014;2014.
 89. Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat Rev [Internet]*. 2012;38(7):904–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.04.007>
 90. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. 2014;6(10):1–16.
 91. Nagasaki T, Hara M, Shiga K, Takeyama H. Relationship between inflammation and cancer progression: Recent advances in interleukin-6 signaling and its blockage in cancer therapy. *Recept Clin Investig*. 2014;1–7.
 92. Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumor Biol [Internet]*. 2016;37(9):11553–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5098-7>
 93. Chang CH, Hsiao CF, Yeh YM, Chang GC, Tsai YH, Chen YM, et al. Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Int J Cancer*. 2013;132(9):1977–85.
 94. Yan HQ, Huang XB, Ke SZ, Jiang YN, Zhang YH, Wang YN, et al. Interleukin 6 augments lung cancer chemotherapeutic resistance via ataxia-telangiectasia mutated/NF-kappaB pathway activation. *Cancer Sci*. 2014;105(9):1220–7.
 95. Kunioku H, Inoue K, Tomida M. Interleukin-6 protects rat PC12 cells from serum deprivation or chemotherapeutic agents through the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT3 pathways. *Neurosci Lett*. 2001;309(1):13–6.
 96. Vyas D, Laput G, Vyas AK. Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis. *Onco Targets Ther*. 2014;7:1015–23.
 97. Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist*. 2019;
 98. Zandvliet M, Teske E. Mechanisms of drug resistance in veterinary oncology- A review with an emphasis on canine lymphoma. *Vet Sci*. 2015;2(3):150–84.
 99. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: Structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*. 2008;9(1):105–27.
 100. Deeley RG, Westlake C, Cole SPC. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev*. 2006;86(3):849–99.
 101. Wilkens S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep*.

- 2015;7(February):1–9.
102. Szakács G, Váradi A, Özvegy-Laczka C, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today*. 2008;13(9–10):379–93.
 103. Antoniou AN, Ford S, Pilley ES, Blake N, Powis SJ. Interactions formed by individually expressed TAP1 and TAP2 polypeptide subunits. *Immunology*. 2002;106(2):182–9.
 104. Tsuchida M, Emi Y, Kida Y, Sakaguchi M. Human ABC transporter isoform B6 (ABCB6) localizes primarily in the Golgi apparatus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;369(2):369–75.
 105. Bock C, Zollmann T, Lindt KA, Tampé R, Abele R. Peptide translocation by the lysosomal ABC transporter TAPL is regulated by coupling efficiency and activation energy. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–12.
 106. Morita M, Imanaka T. Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2012;1822(9):1387–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.009>
 107. Zutz A, Gompf S, Schägger H, Tampé R. Mitochondrial ABC proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2009;1787(6):681–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.02.009>
 108. Van der Deen M, De Vries EGE, Timens W, Scheper RJ, Timmer-Bosscha H, Postma DS. ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respir Res*. 2005;6:1–16.
 109. Štefková J, Poledne R, Hubáček JA. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res*. 2004;53(3):235–43.
 110. Shulenin S, Noguee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M. ABCA3 Gene Mutations in Newborns with Fatal Surfactant Deficiency. *N Engl J Med*. 2004;350(13):1296–303.
 111. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*. 2001;42(7):1007–17.
 112. Delou JMA, Lopes AG, Capella MAM. Unveiling the role of multidrug resistance proteins in hypertension. *Hypertension*. 2009;54(2):210–6.
 113. Wang Y, Zhang Y, Kathawala RJ, Chen Z. Repositioning of Tyrosine Kinase Inhibitors as Antagonists of ATP-Binding Cassette Transporters in Anticancer Drug Resistance. *Cancers (Basel)*. 2014;29(6 (4)):1925–52.
 114. Pratt S, Shepard RL, Kandasamy RA, Johnston PA, Perry W, Dantzig AH. The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(5):855–63.
 115. Yoh K, Ishii G, Yokose T, Minegishi Y, Tsuta K, Goto K, et al. Breast Cancer Resistance Protein Impacts Clinical Outcome in Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(5):1691–7.

116. Tournier N, Goutal S, Auvity S, Traxl A, Mairinger S, Wanek T, et al. Strategies to inhibit ABCB1-and ABCG2-mediated efflux transport of Erlotinib at the blood-brain barrier: A PET study on nonhuman primates. *J Nucl Med.* 2017;58(1):117–22.
117. Agarwal S, M.S. Hartz A, F. Elmquist W, Bauer B. Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein in Brain Cancer: Two Gatekeepers Team Up. *Curr Pharm Des.* 2012;17(26):2793–802.
118. Shi Z, Peng XX, Kim IW, Shukla S, Si QS, Robey RW, et al. Erlotinib (Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated drug resistance. *Cancer Res.* 2007;67(22):11012–20.
119. Kuang YH, Shen T, Chen X, Sodani K, Hopper-Borge E, Tiwari AK, et al. Lapatinib and erlotinib are potent reversal agents for MRP7 (ABCC10)-mediated multidrug resistance. *Biochem Pharmacol.* 2010;79(2):154–61.
120. Wu S, Fu L. Tyrosine kinase inhibitors enhanced the efficacy of conventional chemotherapeutic agent in multidrug resistant cancer cells. *Mol Cancer.* 2018;17(1):1–13.
121. Bovia F, Salmon P, Matthes T, Kvell K, Nguyen TH, Werner-Favre C, et al. Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Blood.* 2003;101(5):1727–33.
122. Kovacs T, Csongei V, Feller D, Ernszt D, Smuk G, Sarosi V, et al. Alteration in the Wnt microenvironment directly regulates molecular events leading to pulmonary senescence. *Aging Cell.* 2014;13(5):838–49.
123. Xiao D, He J. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *J Thorac Dis.* 2010;2(3):154–9.
124. Pinsolle J, Terzi N, Ferrer L, Giaj Levra M, Toffart AC, Moro-Sibilot D. Advances in the management of lung cancers. *Med Intensive Reanim.* 2019;28(4):290–9.
125. Leukam MJ, Villaflor VM. Advances in molecular and immunologic targeted therapies for squamous cell carcinoma of the lung. *Transl Cancer Res.* 2015;4(4):403–14.
126. Ostoros G, Szondi K. A Nem kissejtes tüdőrák komplex gyógyszeres kezelése - új kihívások, új lehetőségek. *Klin Onkológia.* 2014;1(2):95–100.
127. Gartung A, Yang J, Sukhatme VP, Bielenberg DR, Fernandes D, Chang J, et al. Suppression of chemotherapy-induced cytokine/lipid mediator surge and ovarian cancer by a dual COX-2/sEH inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(5):1698–703.
128. Dijkgraaf EM, Heusinkveld M, Tummers B, Vogelpoel LTC, Goedemans R, Jha V, et al. Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting m2 macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2013;73(8):2480–92.
129. Gao SP, Mark KG, Leslie K, Pao W, Motoi N, Gerald WL, et al. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J Clin Invest.* 2007;117(12):3846–56.

130. Sunaga N, Hisao I, Kimihiro S, Shames DS. Oncogenic KRAS- induced interleukin- 8 overexpression promotes cell growth and migration and contributes to aggressive phenotypes of non- small cell lung cancer. *Int J cancer* [Internet]. 2012;130(8):1733–44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
131. Rochfort KD, Collins LE, Murphy RP, Cummins PM. Downregulation of blood-brain barrier phenotype by proinflammatory cytokines involves NADPH oxidase-dependent ROS generation: Consequences for interendothelial adherens and tight junctions. *PLoS One*. 2014;9(7).
132. Feller D, Kun J, Ruzsics I, Rapp J, Sarosi V, Kvell K, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation becomes systemic by circulating extracellular vesicles containing Wnt5a and inflammatory cytokines. *Front Immunol*. 2018;9(JUL):1–14.
133. Belvisi MG, Hele DJ, Birrell MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as therapy for chronic airway inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2006;533(1–3):101–9.
134. He D, Lu Y, Hu H, Zhang J, Qin B, Wang Y, et al. The wnt11 signaling pathway in potential cellular EMT and osteochondral differentiation progression in nephrolithiasis formation. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):16313–29.

10 Közlemények

10.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kiss, E., Abdelwahab, E., Steib, A., Papp, E., Torok, Z., Jakab, L., Smuk, G., Sarosi, V., & Pongracz, J. E. (2020). Cisplatin treatment induced interleukin 6 and 8 production alters lung adenocarcinoma cell migration in an oncogenic mutation dependent manner. *Respiratory research*, 21(1), 120.

Impact factor: 3,924

2. Bartis, D., Csongei, V., Weich, A., Kiss, E., Barko, S., Kovacs, T., Avdicevic, M., D'Souza, V. K., Rapp, J., Kvell, K., Jakab, L., Nyitrai, M., Molnar, T. F., Thickett, D. R., Laszlo, T., & Pongracz, J. E. (2013). Down-regulation of canonical and up-regulation of non-canonical Wnt signalling in the carcinogenic process of squamous cell lung carcinoma. *PloS one*, 8(3), e57393.

Impact factor: 3,534

A dolgozatban a cikk eredményei részben kerültek felhasználásra, ennek megfelelően az impaktfaktorok megállapításánál **1,767** került beszámításra.

10.2 Egyéb közlemények

1. Rapp, J., Kiss, E., Meggyes, M., Szabo-Meleg, E., Feller, D., Smuk, G., Laszlo, T., Sarosi, V., Molnar, T. F., Kvell, K., & Pongracz, J. E. (2016). Increased Wnt5a in squamous cell lung carcinoma inhibits endothelial cell motility. *BMC cancer*, 16(1), 915.

Impact factor: 3,288

2. Vesel, M., Rapp, J., Feller, D., Kiss, E., Jaromi, L., Meggyes, M., Miskei, G., Duga, B., Smuk, G., Laszlo, T., Karner, I., & Pongracz, J. E. (2017). ABCB1 and ABCG2 drug transporters are differentially expressed in non-small cell lung cancers (NSCLC) and expression is modified by cisplatin treatment via altered Wnt signaling. *Respiratory research*, 18(1), 52.

Impact factor: 3,751

Dolgozat alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: 5,691

Összesített impakt faktor: 14,497

10.3 **Kongresszusi előadások jegyzéke**

Kiss Edit, Bartis Domonkos, Csöngői Veronika, Kovács Tamás, Avdicevic Mónika, Rapp Judit, Kvell Krisztián, Pongrácz Judit Erzsébet. A Wnt jelátviteli útvonal vizsgálata nem kissejtes tüdőrákokban. 43. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2013. május 21-24. –Előadásra kiválasztott poszter

11 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik az elmúlt évek során segítettek a munkámat.

Elsőként témavezetőmnek, Prof. Dr. Pongrácz Juditnak szeretnék köszönetet mondani, aki lehetővé tette, hogy bekapcsolódjak a kutatói munkába. Hálás vagyok mindazért a segítségért és támogatásért, amellyel egyengetett az elmúlt évek során.

Köszönettel tartozom a Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerészi Biotechnológia Intézet minden munkatársának, különösképpen Dr. Elhusseiny Mohamed Mahmoud Abdelwahabnak, hogy munkatársként és barátként segített az évek során. Rendkívül hálás vagyok Dr. Rapp Juditnak a baráti és szakmai támogatásért az intézetben töltött évek alatt. Köszönöm továbbá Steib Anitának a betegminták laboratóriumi feldolgozásában nyújtott segítségét.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Sárosi Veronikának, Dr. Jakab Lászlónak, Dr. Smuk Gábornak és Dr. Papp Emőkének, akik közreműködtek a klinikai betegminták gyűjtésében és a betegadatok feldolgozásával kapcsolatosan.

Hálával tartozom Dr. Meggyes Mátyásnak, a PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitási Intézet munkatársának az áramlási citometriás vizsgálatokban nyújtott önzetlen segítségéért.

Végül, de nem utolsó sorban hálával és köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak azért a sok szeretetért és türelemért, amellyel mindvégig mellettem álltak és támogattak. A legnagyobb szeretettel mondok köszönetet férjemnek, Zsoltnak azért az önzetlen és kitartó szeretetért, támogatásért és segítségért, amely erőt adott ezen az úton és kisfiúunknak, Zsoltinak, aki az elmúlt hónapokban a dolgozat megírására ösztönzött.

12 Melléklet


1. **Kiss, E.**, Abdelwahab, E., Steib, A., Papp, E., Torok, Z., Jakab, L., Smuk, G., Sarosi, V., & Pongracz, J. E. (2020). Cisplatin treatment induced interleukin 6 and 8 production alters lung adenocarcinoma cell migration in an oncogenic mutation dependent manner. *Respiratory research*, 21(1), 120.
2. Bartis, D., Csongei, V., Weich, A., **Kiss, E.**, Barko, S., Kovacs, T., Avdicevic, M., D'Souza, V. K., Rapp, J., Kvell, K., Jakab, L., Nyitrai, M., Molnar, T. F., Thickett, D. R., Laszlo, T., & Pongracz, J. E. (2013). Down-regulation of canonical and up-regulation of non-canonical Wnt signalling in the carcinogenic process of squamous cell lung carcinoma. *PloS one*, 8(3), e57393.

RESEARCH

Open Access



Cisplatin treatment induced interleukin 6 and 8 production alters lung adenocarcinoma cell migration in an oncogenic mutation dependent manner

Edit Kiss^{1,2,3}, El Husseiny Mohamed Mahmud Abdelwahab^{1,3}, Anita Steib², Eموke Papp⁴, Zsofia Torok⁴, Laszlo Jakab⁵, Gabor Smuk⁶, Veronika Sarosi⁴ and Judit Erzsebet Pongracz^{1,2,3*} 

Abstract

Background: The predominant metastatic site of lung cancer (LC) is the brain. Although outdated, conventional cisplatin treatment is still the main therapeutic approach for patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC), since targeted therapy that offers better tumor control is not always possible. In the present study brain metastasis associated cytokine expression was investigated in primary NSCLC adenocarcinoma (AC) tissues with known oncogenic mutations in the presence or absence of platinum based and tyrosine kinase inhibitor (TKI) drugs.

Methods: Primary lung tumor samples were isolated, DNA was sequenced and then the samples were grouped based on mutation. Experiments were also performed using KRAS mutant A549 and EGFR mutant PC-9 cells. Drug response was analyzed in three dimensional (3D) tissue cultures. We assessed drug response and IL-6 and IL-8 cytokine expression in relation to cellular invasion using ATP dependent cell viability, qRT-PCR analysis, cytokine bead array, and migration assay.

Results: In 3D co-cultures, primary NSCLC derived cells harboring EGFR mutation responded better to erlotinib treatment than KRAS mutant or KRAS/EGFR wild type (WT) cancer cells. In contrast, under the same culture conditions KRAS/EGFR WT or KRAS mutant cancer cells are more sensitive to cisplatin than EGFR mutant cells. Drug response and pro-inflammatory cytokine production varied depending on the driver mutations. Cisplatin but not erlotinib increased both IL-6 and IL-8 secretion and only IL-6 increased cellular migration and proliferation.

Conclusion: In vitro assays are available to determine the response to planned therapeutic approach of lung cancer subtypes. The sequence of administration of therapeutic drugs determines cytokine production and therefore therapeutic response.

Keywords: Non-small cell lung cancer, Adenocarcinoma, EGFR, Cisplatin, Erlotinib, IL-6, IL-8

* Correspondence: pongacz.judit@pte.hu

¹Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Pecs, 2 Rokos Str, Pecs, Hungary

²Humeltis Ltd, 20 Ifjusag Str, Pecs, Hungary

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Effective therapy of lung cancer (LC) is still one of the greatest challenges in cancer care. Despite the great promises of novel immunotherapies [1] the vast majority of newly diagnosed LC cases are treated with conventional chemotherapy as the cancer is already metastasized by the time of diagnosis [2]. In such a fast progressing disease, the slower acting immunotherapies can only offer treatment advantage in specific cases and mainly in younger patients.

The vast majority (around 80%) of LC-s belong to the non-small cell lung cancer (NSCLC) type where the largest subtype is adenocarcinoma (AC) [3, 4]. To find the best therapeutic approach, key mutations including epidermal growth factor receptor (EGFR), Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), echinoderm microtubule-associated protein-like 4–anaplastic lymphoma kinase (EML4–ALK), and recently B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase (BRAF) are routinely tested [5–7]. Although radical improvements have not been observed in survival statistics, targeted therapies can be used to slow down progression in the presence of certain mutations. In case of EGFR mutation, erlotinib, gefitinib, and the second generation afatinib are recommended [3, 4].

The predominant metastatic site of both NSCLC and SCLC is the brain, and up to 68% of patients with mediastinal lymph node metastasis eventually have brain metastasis [8]. Even in comparison with other common epithelial malignancies, the frequency of brain metastasis is the highest in LC-s [9]. Brain metastasis is significantly higher in patients with confirmed EGFR mutations compared to those with wild type EGFR [10]. EGFR mutation with exon 19 deletion induces multiple small brain metastasis with smaller peri-tumoral brain edema than occurs in those without EGFR mutations [11]. The EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKI) gefitinib and erlotinib have been tested in patients with NSCLC brain metastasis [12]. Similarly to primary tumors, the response of brain metastasis to EGFR inhibitors is better in patients with activating EGFR mutations while the activity of these drugs in individuals with wild-type EGFR metastatic disease is modest at best [12].

The response to erlotinib and gefitinib in chemotherapy-naïve, non-smoker patients with brain metastases was significantly better than smoker patients with brain metastasis, indicating that there may be additional mutations that are the result of cigarette smoking or chemotherapy that facilitate brain metastasis. Ineffectiveness of targeted therapy is more often the case in patients who received platinum based (carboplatin or cisplatin) chemotherapy prior to targeted therapy. As both carboplatin, and especially cisplatin markedly increases the mutation rate [7], added mutations could alter the response to therapy. Additionally, the molecular microenvironment changes upon therapy and can affect the therapeutic outcome; increased soluble chemokines and

cytokines including interleukin 8 (IL-8) and interleukin 6 (IL-6) have been detected in a variety of cancers and such cytokine surges can promote metastasis [1, 3].

In the current work our primary aim was to investigate whether the treatment response of EGFR mutant tumors could be mimicked in vitro and used as a in drug selection studies [13]. We also aimed to study whether IL-8 and IL-6 cytokine production is triggered upon therapy which could ultimately affect cellular proliferation and migration. This may ultimately be of use in the selection of the best available treatment for these cancers.

Materials and methods

Cell cultures

KRAS-mutant A549 (p.G12S c.34G > A) human lung adenocarcinoma cell line (American Type Cell Culture Collection, Rockville, MD, USA) was grown in DMEM (Lonza, Walkersville, MD, USA) supplemented with 10% FBS (Biowest, Nuaille, France), 1% L-glutamine (Lonza, Walkersville, MD, USA), 2% penicillin/streptomycin (Hyclone, Logan, UT, USA), 1% HEPES (Lonza, Walkersville, MD, USA), 1% non-essential amino-acids (Lonza, Walkersville, MD, USA), 1% PBS/beta-mercaptoethanol). EGFR-mutant PC-9 (exon19del E746–A750) human lung adenocarcinoma cell line (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was maintained in RPMI 1640 (Corning, NY, USA) containing 10% FBS, 1% L-glutamine and 2% penicillin/streptomycin at 37 °C in humidified atmosphere containing 5% CO₂. Primary human lung fibroblasts (NHLF) were cultured in FGM-2 according to the manufacturers' recommendations (Lonza, Walkersville, MD, USA).

Primary lung cancer tissues

Lung tissue samples were collected during tumor resections at the Department of Surgery, University of Pecs, Hungary. Pleural effusion samples were collected at the Division of Pulmonology, Department of Internal Medicine, Clinical Centre, the University of Pecs, Hungary. The project was approved by the Ethical Committee of the University of Pecs (2014-RIKEB-5329-EKK) and the Medical Research Council of Hungary (366/2015 (46945–1/2015/EKU)). Patients had given written informed consent and their samples were independently coded and treated anonymously. Sequencing of the samples was part of the routine pathology testing. Patient data is summarized in Table 1.

Primary tumor cell isolation

Solid tumor tissues were resected, and viable tumor areas were selected by a certified lung pathologist. Tissue samples were placed into sterile MACS® Tissue Storage Solution (Miltenyi Biotec, Auburn, USA), sliced then digested using a gentleMACS Dissociator (Miltenyi

Table 1 Patient list

No	Mutation	Histology	T	N	M
1	EGFR/KRAS WT	Adenocc	T2	N1	Mx
2	EGFR/KRAS WT	Adenocc	T2	N1	M1
3	EGFR/KRAS WT	Adenocc	T1	N1	Mx
4	KRAS MUTANT	Adenocc	T2	N1	Mx
5	KRAS MUTANT	Adenocc	T2	N0	Mx
6	KRAS MUTANT	Adenocc	T2b	N0	Mx
7	KRAS MUTANT	Adenocc	T3	N2	Mx
8	KRAS MUTANT	Adenocc	T2	N0	Mx
9	KRAS MUTANT	Adenocc	T1	N2	Mx
10	KRAS MUTANT	Adenocc	T2	N2	Mx
11	KRAS MUTANT	Adenocc	T1	N1b	Mx
12	EGFR MUTANT	Adenocc	T2b	N1	Mx
13	EGFR MUTANT	Adenocc	T3	Nx	M1
14	EGFR MUTANT	Adenocc	T1	N1	Mx
15	EGFR MUTANT	Adenocc	T2	N3	M1

Biotec, Auburn, USA) according to the manufacturer's recommendation (Miltenyi Biotec, Auburn, USA). Briefly, solid tumor tissues were digested (40 min, at 37 °C) in RPMI 1640 supplemented with an enzyme mix provided by the manufacturer. Cells were pelleted, resuspended in RPMI 1640, passed through a cell strainer, and then centrifuged. The pellet was resuspended in DMEM. Cells were cryo-preserved using Cryo-SFM according to the manufacturer's recommendation (PromoCell, Heidelberg, Germany) and stored at -80 °C until used.

In vitro three dimensional (3D) lung aggregates

NHLF and A549 or PC9 were mixed in 1:1 ratio and a total of 30,000 cells/well were pipetted onto a low-attachment 96-well U-bottom plate (Corning, NY, USA). Cells were sedimented (600 g for 10 min) and cultured at 37 °C and 5% CO₂ in mixed DMEM:FGM-2 or RPMI:FGM-2 media at 1:1 ratio, respectively [14].

Drugs and reagents

Cisplatin (Accord Healthcare) was purchased from the University Pharmacy, University of Pecs, Hungary). Erlotinib was purchased from Selleckem (Houston, TX, USA). Drugs were added to cells at final concentration of 30 nM cisplatin, and various concentrations (1 nM,

10 nM, 100 nM and 1 μM) of erlotinib for 48 h. The choice of erlotinib optimal concentration was determined using a cell viability assay. Recombinant human IL-6 and IL-8 was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and used at a final concentration of 100 ng/ml for 48 h.

Cell viability assay

CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA) was used to evaluate cytotoxicity after drug treatment. Co-cultures were seeded into 96-well plates, after 24 h incubation 2D or 3D cell cultures were treated with erlotinib and/or cisplatin. After incubation for 48 h at 37 °C, 100 μl of CellTiter-Glo reagent were added and luminescence measured with EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Each experiment was performed in triplicates for each concentration and repeated three times ($n = 3$).

RNA isolation, cDNA synthesis

Total RNA was extracted using NucleoSpin RNA II isolation kit according to manufacturer's protocol (Macherey-Nagel, Düren Germany). RNA concentration was measured by Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). One microgram of total RNA was used to generate cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Quantitative (q)RT-PCR

qRT-PCR-s were carried out using the SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (BioLine, London, UK). Amplifications were done on a StepOnePlus system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Gene expression was analysed with StepOne software, using the housekeeping gene β-actin as reference standard. The primer sequences are listed in Table 2. The cycling parameters were the following: one cycle 95 °C for 2 min, 40 cycles at 95 °C for 5 s and 60 °C for 30 s. The relative quantities (RQ) were calculated using the 2^{-ddCt} method.

Cytokine production

Inflammatory cytokine protein levels were quantified after cisplatin and/or erlotinib treatment using BD™ CBA Human IL-6 and IL-8 Flex Set Assays CBA (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) according to the

Table 2 PCR primer sequences

Target gene	Forward primer	Reverse primer
human β-actin	GCGCGGCTACAGCTTCA	CTTAATGTCACGCACGATTTC
human IL-6	AGGGCTCTTCGGCAAATGTA	GAAGGAATGCCCATTAACAACAA
human IL-8	CAGTTTTGCCAAGGAGTGCTA	AACTTCTCCACAACCCTCTGC

manufacturer's instructions. Cytometric Bead Arrays (CBA) were then run on BD FACSCanto II flow cytometer (BD Immunocytometry Systems, Erembodegen, Belgium) and analyzed.

3D wound healing bioassay

A549 and PC-9 cells were cultured on T-25 flasks until they reached 80% confluence, then treated with 200 μ L NanoShuttle-PL overnight at 37 °C, 5% CO₂. After 24 h incubation single cell suspensions were made and cells were seeded to the 6-well repellent plate at a density of 1.2×10^6 cells/well. A 6-well magnet was placed on the top of the plate for 5 h to levitate the cells and induce ECM formation [13, 15]. After incubation cells were collected and added to 24-well repellent plate at a concentration of 2×10^5 cells/well. A 24-well ring magnet was placed below the plate for 15 min to allow cells to aggregate into the magnet's ring shape. Then, the cells were exposed to cisplatin (30 nM) or erlotinib (100 nM). Cell growth was documented by taking pictures at every 6 h for 24 h using an EVOS® FL Imaging System.

Scratch assay

Cells were grown to 90% confluence in 24 well plates (Corning Costar, Darmstadt, Germany) and wound was created in each culture by scratching the cellular monolayers. Fresh medium supplemented with cisplatin (30 nM) or erlotinib (100 nM) in the presence or absence of 100 ng/ml IL-6 or IL-8 was added to the cell cultures,

respectively. Wound healing was monitored by the decrease of gap area taking images with EVOS light microscopy (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) at regular intervals and the gap area was quantified using ImageJ software.

Statistical analysis

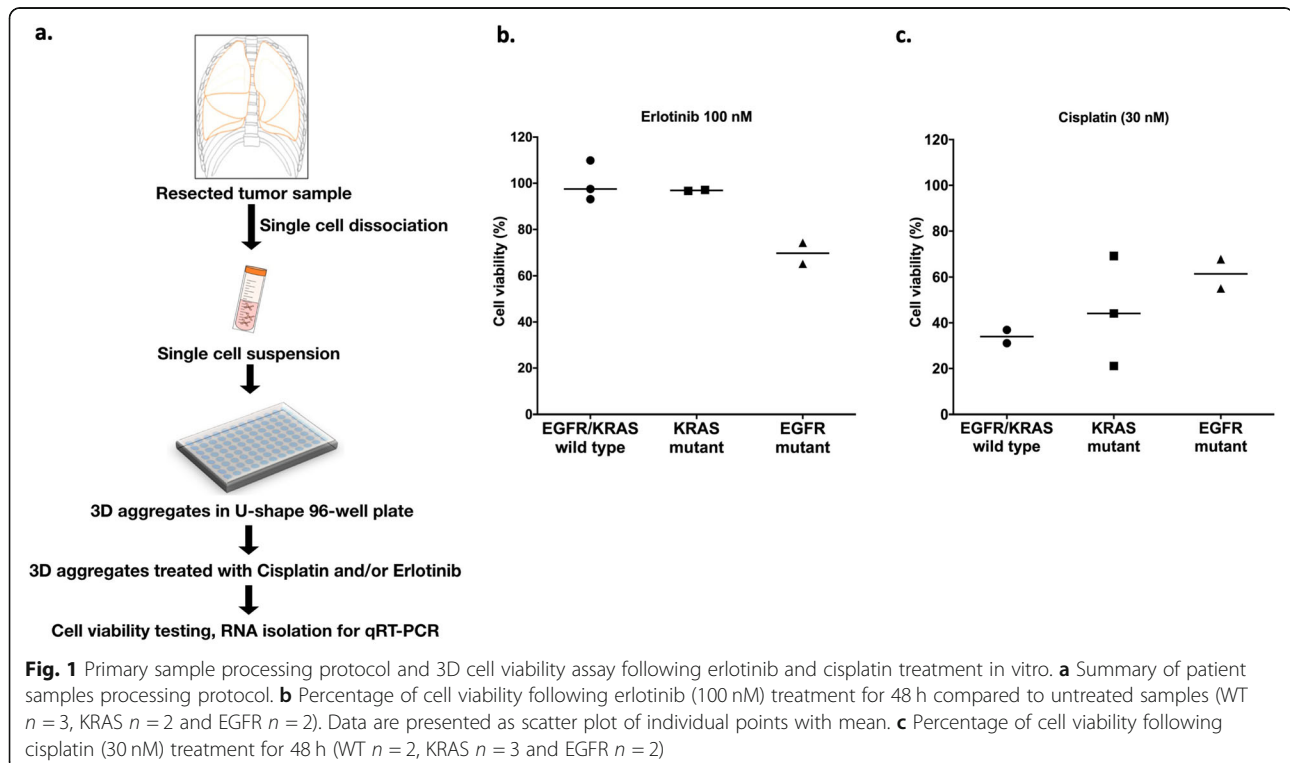
Data are presented as mean \pm standard error of mean (SEM), and statistical analysis was performed using one-way ANOVA test. $p < 0.05$ was considered as significant.

Results

Drug sensitivity of primary human lung adenocarcinomas can be predicted in in vitro tissue cultures

Fifteen patient samples were used in the study, all of whom had primary lung adenocarcinoma (AC). The samples from 8 patients had KRAS mutations, 4 had activating EGFR mutation and 3 patients had wild type (WT) EGFR and KRAS genes. Patient information is summarized in Table 1. All the samples were freshly cryopreserved as single cell suspensions after surgery, and then thawed for testing when the mutation analysis became available. The protocol is summarized in Fig. 1a. Not all of the samples provided enough material to be used in every experiment, hence there are differences in the number of freshly isolated samples in individual experimental settings.

To investigate the drug response of primary lung ACs with various mutation background in vitro, 3D aggregate



cultures were formed from primary cancer cells, after which the cultures were exposed to cisplatin (30 nM) or erlotinib (100 nM). Studies indicate that in vitro drug sensitivity assays replicate the clinically proven drug response [16–18]. Patients with exon 19 deletions or exon 21 substitution (L858R) in the EGFR gene were responsive to TKI (erlotinib), while samples with KRAS mutation or WT KRAS/EGFR genes were not sensitive to erlotinib (Fig. 1b) [19–21]. Additionally, the in vitro drug sensitivity assay confirmed that cisplatin was more cytotoxic to cells with WT KRAS/EGFR mutations than with KRAS mutations and was least effective in those with EGFR mutations (Fig. 1c) [22].

Cisplatin and erlotinib treatment alters cell viability and migration

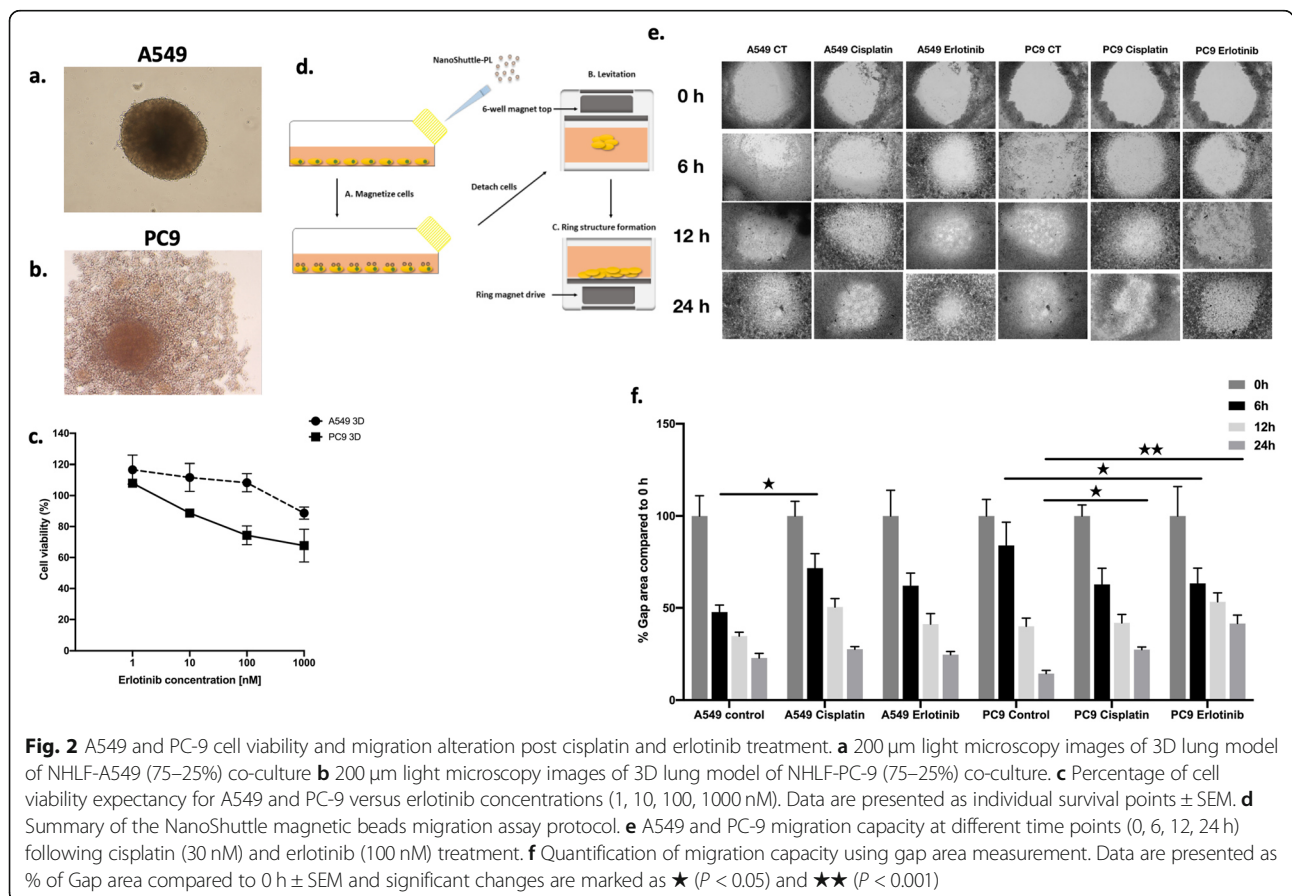
To be able to investigate the microenvironment in more detail, two human lung AC cell lines with different EGFR status were treated with erlotinib in 3D co-cultures (Fig. 2a, b and c) [23]. Similarly to primary lung AC cells, cell viability of KRAS mutant A549 aggregate co-cultures were barely affected by erlotinib at lower concentrations (1–100 nM) and some decrease in viability was only detected at 1000 nM, far above the sensitivity of the EGFR

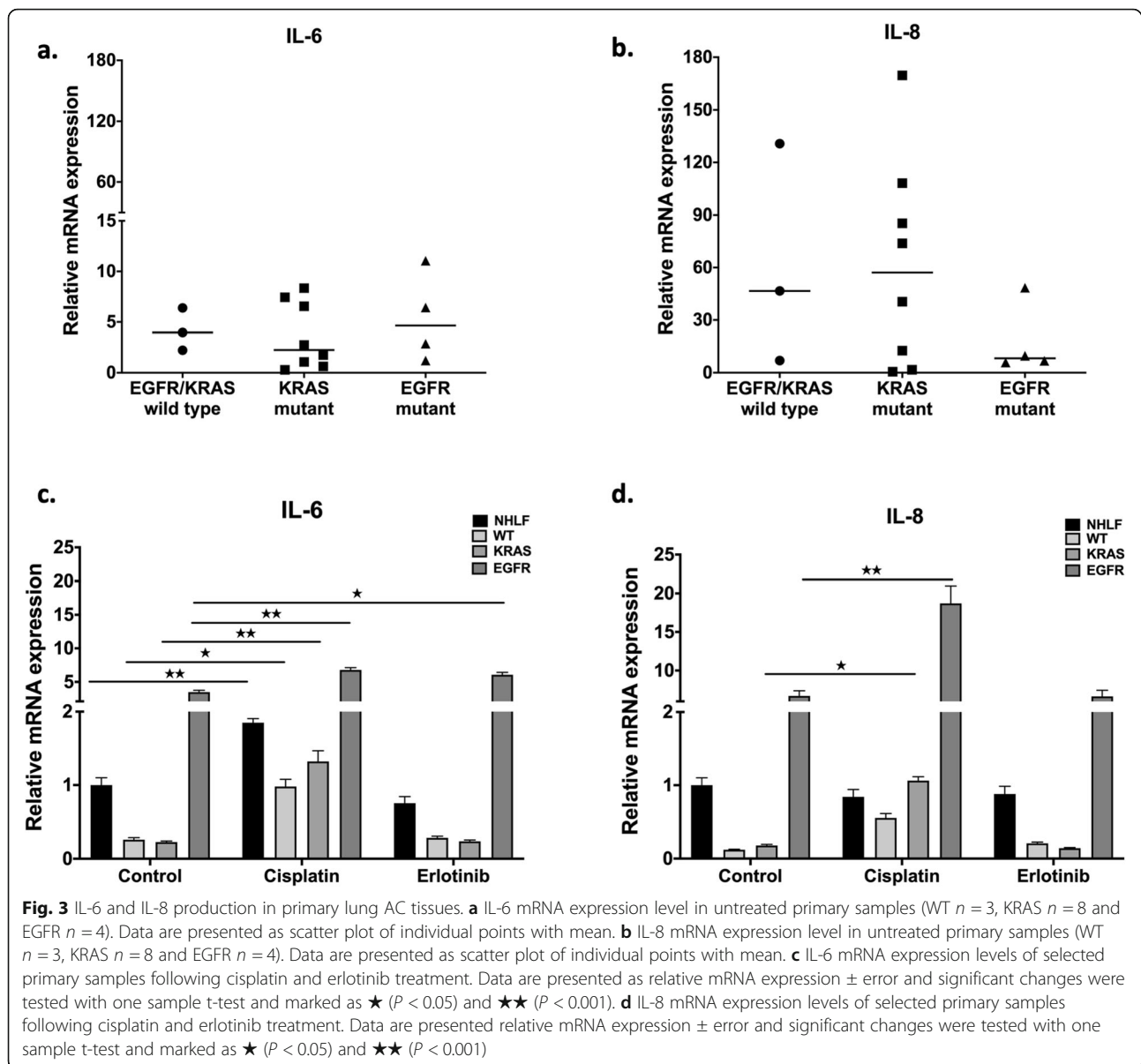
mutant (exon 19 deletion) PC-9 cell cultures that reacted to erlotinib at 10 nM (Fig. 2c).

To test whether cell proliferation and migration is affected by the two above drugs, a novel cellular migration test was performed. In the magnetic migration test the KRAS mutant A549 and the EGFR mutant PC-9 lung adenocarcinoma cell lines were used in 3D mono-cultures (Fig. 2d). 30 nM cisplatin treatment of the KRAS mutant A549 cells only transiently delayed gap-closure and by 24 h the gap was closed to the same level as in the untreated control (Fig. 2e and f). Erlotinib had no significant effect (Fig. 2e and f) in the KRAS mutant cultures. The EGFR mutant PC-9 cell line responded well to erlotinib and a significantly larger gap area was preserved even at 24 h of incubation compared to untreated and even to cisplatin treated control (Fig. 2e, f).

Cisplatin significantly increases pro-inflammatory cytokine production

To test whether primary, patient derived tumor samples express pro-inflammatory cytokines that influence cellular proliferation and migration, mRNA levels of IL-6 and IL-8 were measured. The levels of both IL-6 and IL-8 varied greatly amongst individual patient samples (Fig. 3a, b). The only notable tendency was that while in

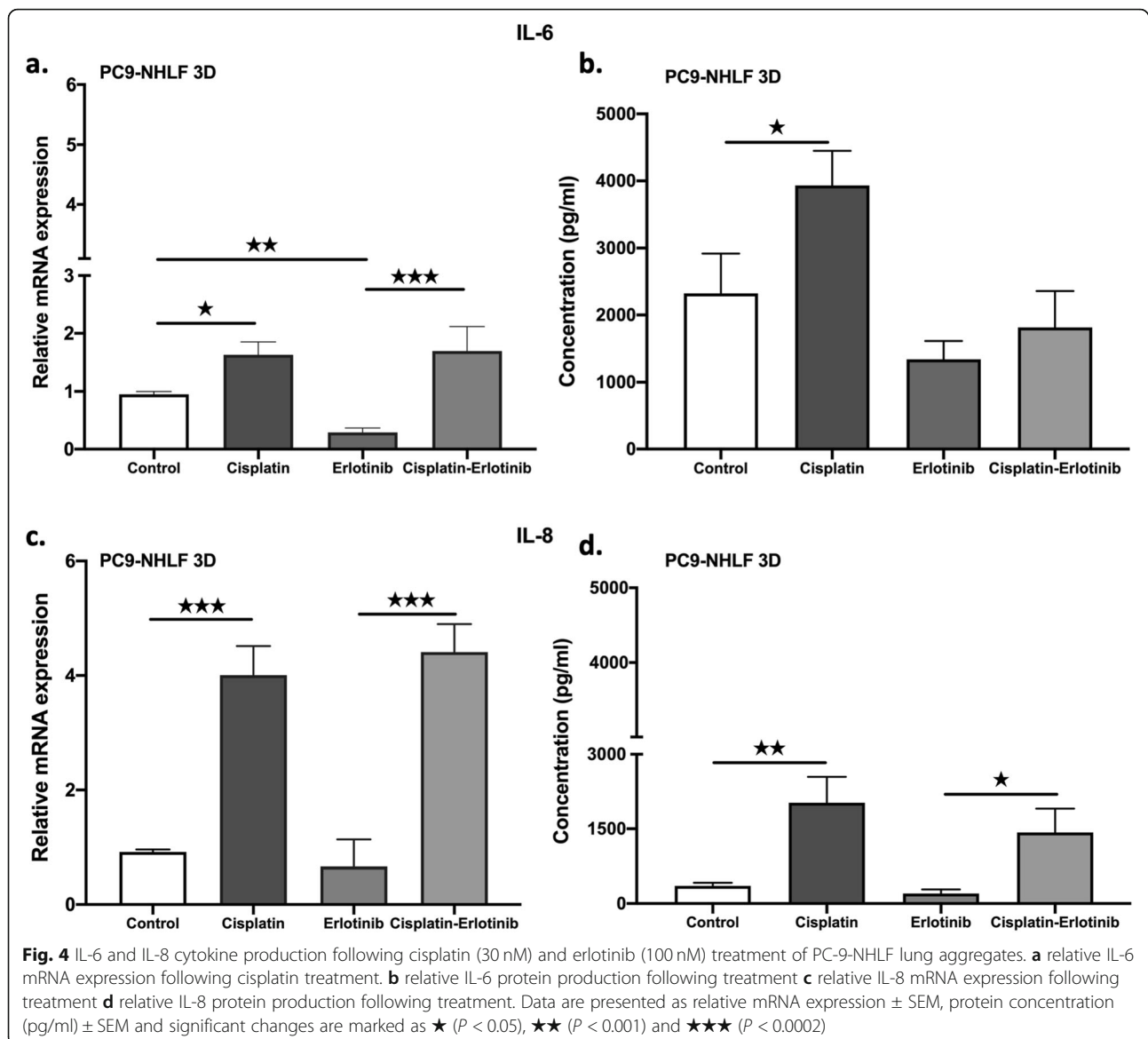




the EGFR mutant primary AC samples IL-6 levels were higher than in KRAS or WT samples, IL-8 levels were the lowest. To test whether cisplatin and erlotinib affect IL-6 and IL-8 cytokine expression, WT, KRAS and EGFR mutant tumor samples were treated with cisplatin (30 nM) or erlotinib (100 nM), and then cytokine mRNA levels were measured (Fig. 3c, d). Cisplatin treatment increased both IL-6 and IL-8 message levels in all sample types, especially in the EGFR mutant tumor samples (Fig. 3c, d). In contrast, erlotinib did not influence cytokine production in WT or KRAS mutant primary samples, but did increase IL-6 levels in samples with EGFR mutation (Fig. 3c, d).

However, there was a great deal of variation between different in primary samples, with and the greatest

differences observed between samples with of EGFR mutations. Therefore experiments were performed using the EGFR mutant AC cell line, PC-9. Pro-inflammatory IL-6 and IL-8 cytokine production in EGFR mutant PC-9 cell lines in 3D cultures were measured after cisplatin or erlotinib treatment. It was also tested whether cisplatin pre-treatment followed by erlotinib treatment affected cytokine production. Both inflammatory cytokine IL-6 and IL-8 production was significantly increased at the mRNA level after cisplatin mono-treatment or cisplatin and erlotinib combination treatment, while erlotinib alone did not increase message levels for either cytokine (Fig. 4a-d). Protein levels of both IL-6 and IL-8 were also tested, but elevated protein levels were only detected when the cell cultures were exposed to



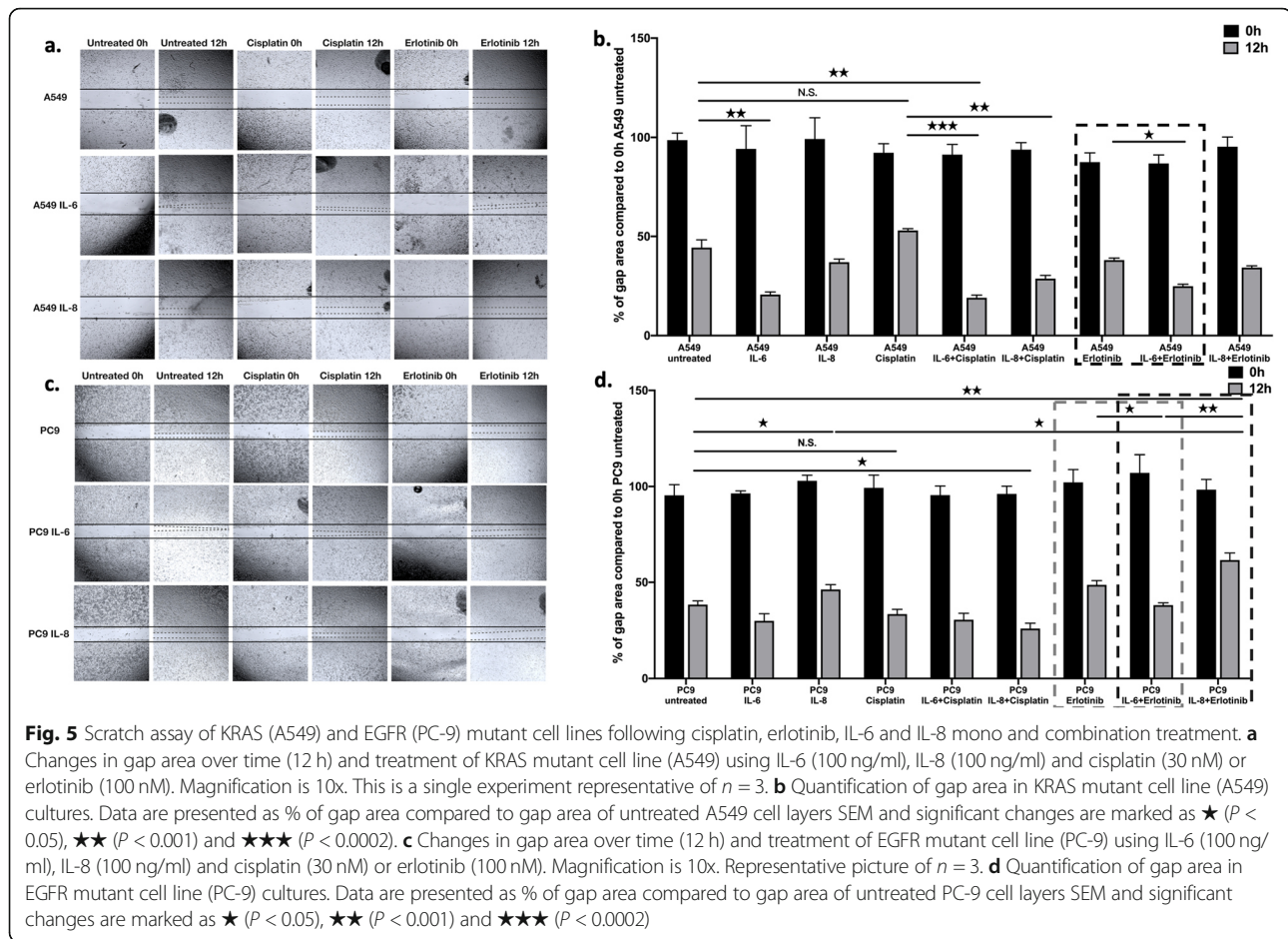
cisplatin. In fact, erlotinib reduced cisplatin induced IL-6 protein expression (Fig. 4b).

To test whether the presence of cytokines can modulate cellular migration and proliferation, scratch assays were performed in the presence or absence of the two drugs and/or cytokines. The addition of IL-6 (100 ng/ml) significantly reduced the gap area by inducing cellular proliferation and migration in the KRAS mutant A549 cultures (Fig. 5a, b). This was also the case if the cultures were treated with cisplatin or erlotinib in the presence of IL-6. IL-8 had no remarkable effect on gap closure in the KRAS mutant cell lines (Fig. 5a, b). In contrast, adding IL-6 had no significant effect on EGFR mutant PC-9 cells. PC-9 cultures responded to IL-6 during erlotinib treatment when added IL-6 promoted gap closure. More interestingly, IL-8 inhibited gap closure in the PC-9 cell

line and even more so in the presence of erlotinib (Fig. 5c, d). Cisplatin was unable to slow down gap closure in the PC-9 cell cultures (Fig. 5c, d) and in the presence of cisplatin, added IL-6 and IL-8 accelerated the process (Fig. 5c, d).

Discussion

Inflammation-associated cancer progression has become widely acknowledged in the past decades [24]. While IL-6 and IL-8 both promote angiogenesis, tumor cell survival, chemoresistance, and migration [25, 26]; it was the high IL-6 serum levels which was associated with poor survival rate in advanced NSCLC. This is due to increased drug resistance and reduced drug-induced apoptosis [27–30].



One of the widely used chemotherapeutic drugs in treatment of advanced cancers is cisplatin, which triggers inflammatory cytokine IL-6 and IL-8 production [17]. Cisplatin, apart from being strongly mutagenic [31] induces upregulation of both IL-6 and IL-8 via activation of the NF κ B signaling pathway [18]. Moreover, elevated levels of pro-inflammatory cytokines can increase chemoresistance [29]. Elevated levels of IL-6 is also associated with increased permeability of the blood brain barrier (BBB) [32].

In clinical trials, platinum-based chemotherapy combined with EGFR-TKI had no survival benefits in advanced NSCLC [33–36], although preclinical studies indicated otherwise [37]. Using our methodology, we were able to preserve primary LC tissues and generate 3D aggregate cultures for in vitro drug sensitivity testing when sequencing data became available. The methodology allowed us to demonstrate that in vivo patient data and in vitro drug sensitivity tests provide highly similar results. We have shown that primary tumors with activating EGFR mutation were the least responsive to cisplatin while tyrosine kinase inhibition was only effective in the presence of activating EGFR mutation. Additionally, the

level of IL-6 was the highest in the patient group with activating EGFR mutation. If patients were to be pre-treated with cisplatin, IL-6 levels can increase even further. As IL-6 negatively affects the BBB, increased brain metastasis can be further expected from the activating mutant EGFR AC-s if treated with cisplatin. It has also been demonstrated that erlotinib doesn't increase IL-6 but high IL-6 levels can reduce the beneficial effects of TKI. In contrast, the presence of IL-8 did not reduce the tumor cell proliferation effect of erlotinib. It was also shown that erlotinib can inhibit cisplatin induced IL-6 secretion and accelerate cellular migration.

Conclusions

Drug response can be effectively tested on primary cancer tissues in vitro [6, 13, 15, 21].

Somatic mutations of EGFR and KRAS are characteristic mutations in lung AC-s that promote accelerated tumor growth [38] and also affect drug response [39]. Preceding clinical therapy with an in vitro drug sensitivity test on a small number of tumor cells, could allow even individual cytokine responses to be detected, indicating clinical response to treatment. After further

clinical validation of the above methods using a larger sample pool, such technique could become a valuable tool assisting the prediction of treatment response.

In cancer therapy the best treatment depends on the available drug, the sequence of administration, the patients' general conditions and co-morbidities that alter the tumor microenvironments and hence their drug responses [40]. Based on our study, there is a possibility to test individual drug response using a great variety of output readings which all together provides additional information for predicting individual therapy response.

Abbreviations

LC: Lung cancer; NSCLC: Non-small cell lung cancer; AC: Adenocarcinoma; TKI: Tyrosine kinase inhibitor; 3D: Three dimensional; IL: Interleukin; EGFR: Epidermal growth factor receptor; KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; EML4-ALK: echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase; BRAF: B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase; WT: Wild type; BBB: Blood brain barrier

Acknowledgements

The authors would like to thank Professor Mary Keen, Emerita Professor, University of Birmingham and Honorary Professor, University of Pecs for language editing.

Authors' contributions

VS and JEP conceived the project. LJ, ZT, GS collected patient samples and data. EK, EMMA and AS performed the laboratory tests. EK, EMMA and JEP wrote the manuscript. ZT, GS and VS provided clinical guidance. The author(s) read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported in part by the University of Pecs KA Research Fund 2018 (to JEP), GINOP-2.3.2.-15-2016-00022, TUDFO/51757-1/2019-ITM and by Humeltis Ltd.

Availability of data and materials

All data generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

All Lung tissue samples used in this study were collected during tumor resections at the Department of Surgery, University of Pecs, Hungary and was approved by the Ethical Committee of the University of Pecs (2014-RIKEB-5329-EKK) and the Medical Research Council of Hungary (366/2015 (46945-1/2015/EKU)).

Consent for publication

Patients had given written informed consent.

Competing interests

EK, AS and JEP disclose conflict of interest.

Author details

¹Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Pecs, 2 Rokos Str, Pecs, Hungary. ²Humeltis Ltd, 20 Ifjusag Str, Pecs, Hungary. ³Szentagotai Research Centre, University of Pecs, 20 Ifjusag Str, Pecs, Hungary. ⁴Department of Internal Medicine, Medical School and Clinical Centre, University of Pecs, 13 Ifjusag Str, Pecs, Hungary. ⁵Department of Surgery, Medical School and Clinical Centre, University of Pecs, 13 Ifjusag Str, Pecs, Hungary. ⁶Department of Pathology, Medical School and Clinical Centre, University of Pecs, 13 Ifjusag Str, Pecs, Hungary.

Received: 5 November 2019 Accepted: 8 May 2020

Published online: 20 May 2020

References

- Bobbio A, Alifano M. Immune therapy of non-small cell lung cancer. The future. *Pharmacol Res.* 2015;99:217–22.
- Pallis AG. A review of treatment in non-small-cell lung Cancer. *Cit Eur Oncol Haematol.* 2012;8:208–12.
- Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008;83:584–94. <https://doi.org/10.4065/83.5.584>.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009;59:225–49.
- Schmid K, Oehl N, Wrba F, Pirker R, Pirker C, Filipits M. EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding Locoregional lymph node metastases. *Clin Cancer Res.* 2009;15:4554–60. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0089>.
- Leichsenring J, Horak P, Kreutzfeldt S, Heining C, Christopoulos P, Volckmar A, et al. Variant classification in precision oncology. *Int J Cancer.* 2019;ijc.32358. <https://doi.org/10.1002/ijc.32358>.
- Boot A, Huang MN, Ng AWT, Ho S-C, Lim JQ, Kawakami Y, et al. In-depth characterization of the cisplatin mutational signature in human cell lines and in esophageal and liver tumors. *Genome Res.* 2018;28:654–65. <https://doi.org/10.1101/gr.230219.117>.
- Wang S, Ye X, Ou W, Lin Y, Zhang B, Yang H. Risk of cerebral metastases for postoperative locally advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2009;64:238–43. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2008.08.012>.
- Schouten LJ, Rutten J, Huveneers HAM, Twijnstra A. Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma. *Cancer.* 2002;94:2698–705. <https://doi.org/10.1002/cncr.10541>.
- Jamal-Hanjani M, Spicer J. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in the treatment of epidermal growth factor receptor-mutant non-small cell lung Cancer metastatic to the brain. *Clin Cancer Res.* 2012;18:938–44. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2529>.
- Sekine A, Kato T, Hagiwara E, Shinohara T, Komagata T, Iwasawa T, et al. Metastatic brain tumors from non-small cell lung cancer with EGFR mutations: distinguishing influence of exon 19 deletion on radiographic features. *Lung Cancer.* 2012;77:64–9. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.12.017>.
- Eichler AF, Kahle KT, Wang DL, Joshi VA, Willers H, Engelman JA, et al. EGFR mutation status and survival after diagnosis of brain metastasis in nonsmall cell lung cancer. *Neuro-Oncology.* 2010;12:1193–9. <https://doi.org/10.1093/neuonc/1193>.
- Souza GR, Molina JR, Raphael RM, Ozawa MG, Stark DJ, Levin CS, et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol.* 2010;5:291–6.
- Kovacs T, Csongei V, Feller D, Ernszt D, Smuk G, Sarosi V, et al. Alteration in the Wnt microenvironment directly regulates molecular events leading to pulmonary senescence. *Aging Cell.* 2014;13:838–49. <https://doi.org/10.1111/ace1.12240>.
- Timm DM, Chen J, Sing D, Gage JA, Haisler WL, Neeley SK, et al. A high-throughput three-dimensional cell migration assay for toxicity screening with mobile device-based macroscopic image analysis. *Sci Rep.* 2013;3:3000.
- Blom K, Nygren P, Larsson R, Andersson CR. Predictive value of ex vivo Chemosensitivity assays for individualized Cancer chemotherapy: a meta-analysis. *SLAS Technol.* 2017;22:306–14.
- Deng X, Nakamura Y. Cancer precision medicine: from Cancer screening to drug selection and personalized immunotherapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38:15–24. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.013>.
- Marchetti A, Milella M, Felicioni L, Cappuzzo F, Irtelli L, Del Gramastro M, et al. Clinical implications of KRAS mutations in lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors: an important role for mutations in minor clones. *Neoplasia.* 2009;11:1084–92.
- Zhou C, Yi-Long W, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2011;12:735–42.
- Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced

- EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13:239–46.
21. Zhang X, Chang A. Molecular predictors of EGFR-TKI sensitivity in advanced non-small cell lung cancer. *Int J Med Sci.* 2008;5:209–17.
 22. Forde PM, Ettinger DS. Targeted therapy for non-small-cell lung cancer: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013;13:745. <https://doi.org/10.1586/ERA.13.47>.
 23. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2013;18:240–9.
 24. Nagasaki T, Hara M, Shiga K, Takeyama H. Relationship between inflammation and cancer progression: Recent advances in interleukin-6 signaling and its blockage in cancer therapy. *Recept Clin Investig.* 2014;1:10-14800/rci.202.
 25. Waugh DJJ, Wilson C. The Interleukin-8 pathway in. *Cancer.* 2008;8:6735–42.
 26. Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat Rev.* 2012;38:904–10.
 27. Chang CH, Hsiao CF, Yeh YM, Chang GC, Tsai YH, Chen YM, et al. Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Int J Cancer.* 2013;132:1977–85.
 28. Yan HQ, Huang XB, Ke SZ, Jiang YN, Zhang YH, Wang YN, et al. Interleukin 6 augments lung cancer chemotherapeutic resistance via ataxia-telangiectasia mutated/NF-kappaB pathway activation. *Cancer Sci.* 2014;105:1220–7.
 29. Poth KJ, Guminski AD, Thomas GP, Leo PJ, Jabbar IA, Saunders NA. Cisplatin treatment induces a transient increase in tumorigenic potential associated with high interleukin-6 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2010;9:2430–9.
 30. Cells C, Conze D, Weiss L, Regen PS, Bhushan A, Weaver D, et al. Autocrine Production of Interleukin 6 Causes Multidrug Resistance in Breast. *Cancer Res.* 2001;61:8851–8.
 31. Sanderson BJ, Ferguson LR, Denny WA. Mutagenic and carcinogenic properties of platinum-based anticancer drugs. *Mutat Res.* 1996;355:59–70. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(96\)00022-x](https://doi.org/10.1016/0027-5107(96)00022-x).
 32. Pan W, Stone KP, Hsueh H, Manda VK, Zhang Y, Kastin AJ. Cytokine signaling modulates blood-brain barrier function. *Curr Pharm Des.* 2011;17:3729–40 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21834767>. Accessed 19 Jul 2019.
 33. Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, Kaukel E, Roubec J, De Rosa F, et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva lung cancer investigation trial. *J Clin Oncol.* 2007;25:1545–52.
 34. Herbst RS, Prager D, Hermann R, Fehrenbacher L, Johnson BE, Sandler A, et al. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:5892–9.
 35. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and Cisplatin in advanced non-small-cell lung Cancer: a phase III trial—INTACT 1. *J Clin Oncol.* 2004;22:777–84.
 36. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller VA, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung Cancer: a phase III trial—INTACT 2. *J Clin Oncol.* 2004;22:785–94.
 37. Yang Z, Tam KY. Combination strategies using EGFR-TKI in NSCLC therapy: learning from the gap between pre-clinical results and clinical outcomes. *Int J Biol Sci.* 2018;14:204–16. <https://doi.org/10.7150/ijbs.22955>.
 38. Gaughan EM, Costa DB. Genotype-driven therapies for non-small cell lung cancer : focus on EGFR , KRAS and ALK gene abnormalities. *Ther Adv Med Oncol.* 2011;3:113–25.
 39. Langer CJ. Roles of EGFR and KRAS mutations in the treatment of patients with non-small-cell lung Cancer. *P T.* 2011;36:263–79.
 40. Melisi D, Troiani T, Damiano V, Tortora G, Ciardiello F. Therapeutic integration of signal transduction targeting agents and conventional anti-cancer treatments. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11:51–68.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Down-Regulation of Canonical and Up-Regulation of Non-Canonical Wnt Signalling in the Carcinogenic Process of Squamous Cell Lung Carcinoma

Domokos Bartis^{1,2,3}, Veronika Csongei^{1,6,9}, Alexander Weich¹, Edit Kiss^{1,6}, Szilvia Barko³, Tamas Kovacs^{1,6}, Monika Avdicevic¹, Vijay K. D'Souza², Judit Rapp^{1,6}, Krisztian Kvell^{1,6}, Laszlo Jakab⁴, Miklos Nyitrai^{2,6}, Tamas F. Molnar⁴, David R. Thickett², Terezia Laszlo⁵, Judit E. Pongracz^{1,6*}

1 Department of Medical Biotechnology, Institute of Immunology and Biotechnology, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary, **2** Department of Medicine, Medical School, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom, **3** Department of Biophysics, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary, **4** Department of Surgery, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary, **5** Department of Pathology, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary, **6** Szentagotai Research Center, University of Pecs, Pecs, Hungary

Abstract

The majority of lung cancers (LC) belong to the non-small cell lung carcinoma (NSCLC) type. The two main NSCLC sub-types, namely adenocarcinoma (AC) and squamous cell carcinoma (SCC), respond differently to therapy. Whereas the link between cigarette smoke and lung cancer risk is well established, the relevance of non-canonical Wnt pathway up-regulation detected in SCC remains poorly understood. The present study was undertaken to investigate further the molecular events in canonical and non-canonical Wnt signalling during SCC development. A total of 20 SCC and AC samples with matched non-cancerous controls were obtained after surgery. TaqMan array analysis confirmed up-regulation of non-canonical Wnt5a and Wnt11 and identified down-regulation of canonical Wnt signalling in SCC samples. The molecular changes were tested in primary small airway epithelial cells (SAEC) and various lung cancer cell lines (e.g. A549, H157, etc). Our studies identified Wnt11 and Wnt5a as regulators of cadherin expression and potentiated relocation of β -catenin to the nucleus as an important step in decreased cellular adhesion. The presented data identifies additional details in the regulation of SCC that can aid identification of therapeutic drug targets in the future.

Citation: Bartis D, Csongei V, Weich A, Kiss E, Barko S, et al. (2013) Down-Regulation of Canonical and Up-Regulation of Non-Canonical Wnt Signalling in the Carcinogenic Process of Squamous Cell Lung Carcinoma. PLoS ONE 8(3): e57393. doi:10.1371/journal.pone.0057393

Editor: Srikumar P. Chellappan, H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute, United States of America

Received: August 8, 2012; **Accepted:** January 23, 2013; **Published:** March 7, 2013

Copyright: © 2013 Bartis et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the TAMOP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0002; (Tarsadalmi Megújulás Operatív Program); TIOP 1.3.1-07/1-2F-2008-0002 (Tarsadalmi Infrastruktúra Operatív Program); K-OTKA_67807_A_07 -2-2012-0093328 (MAG Zrt-NKTH(NFU)-OTKA(Magyar Gazdaságfejlesztési Központ Zrt-Nemzeti Kutatástámogatási Hivatal (Nemzeti Fejlesztési Ugyonokseg)-Orszagos Tudomanyos Kutatasi Alapprogramok Iroda or Hungarian Scientific Research Fund) all to JEP and by the K-OTKA grant 34039/KA-OTKA/11-02 to DB. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: judit.e.pongracz@aok.pte.hu

9 These authors contributed equally to this work.

Introduction

Lung cancer (LC) is the leading cause of cancer death worldwide [1]. About 80% of LCs belongs to the NSCLC type which is erroneously considered as a single entity. The two main NSCLC sub-types, namely AC that arises mostly in the peripheral airways or the bronchio-alveolar region of the parenchyma, and SCC that develops mainly in the proximal airways and affects mostly cigarette smokers, differs not only in aggressiveness but responsiveness to chemotherapy, also. To make the overall picture more complicated, there are an emerging number of combined NSCLCs where malignant tumours are representing themselves as adeno-squamous or mixed type LC. Not surprisingly, the molecular background of AC and SCC development has been a focus of intense investigation. In various studies Wnt signalling has emerged as one of the potential regulators of the carcinogenic process.

Wnt Signalling

Wnt signalling regulates a variety of developmental processes including cell fate specification, proliferation, polarity and migration (reviewed in [2]). Wnt molecules trigger gene transcription via at least three signalling pathways: the canonical or β -catenin dependent, and two non-canonical pathways. When Wnts bind to their trans-membrane receptors, Frizzleds (Fzd) and co-receptors, LRP5/6, signal transduction begins on the canonical pathway. Once stabilized, non-degraded β -catenin molecules move to the nucleus where they activate TCF-LEF-dependent gene transcription. In the absence of Wnt signals, the cytoplasmic β -catenin is subjected to phosphorylation in the APC-Axin-GSK3 β -complex [2] then to subsequent proteasomal degradation. Upon non-canonical Wnt signals, the JNK/API dependent, planar cell polarity (PCP) and the PKC/CAMKII/NFAT dependent Ca²⁺ pathways are activated.

Table 1. List of gene specific primers.

Gene	Accession number	Forward primer	Reverse primer	Product
β-actin(1)	NM_001101	5'-CTGTGCTATCCCTGTACGCCTCTG-3'	5'-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTCG-3'	541 bp
β-actin(2)	NM_001101	5'-GCGCGGTACTACAGCTTCA-3'	5'-CTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	55 bp
E-cad	NM_004360	5'-GACCGGTGCAATCTTCAA-3'	5'-TTGACGCCGAGAGTACAC-3'	93 bp
N-cad	NM_002961	5'-AGCTTCTCACGGCATAACC-3'	5'-GTGCATGAAGGACAGCCTCT-3'	133 bp
S100A4	NM_002961	5'-TGGAGAAGGCCCTG-3'	5'-CCCTCTTGCCCGAGTACTTG-3'	58 bp
aSMA	NM_001613.2	5'-CCGACCGAATGCAGAAGGA-3'	5'-ACAGAGTATTTCGCTCCGAA-3'	88 bp
VIM	NM_003380	5'-ATTCCACTTTGCGTTCAAGG-3'	5'-CTTCAGAGAGGAAGCCGA-3'	97 bp
Wnt5a	NM_003392	5'-TGGCTTTGGCCATATTTTC-3'	5'-CCGATGACTGCATGTGGTC-3'	199 bp
Wnt11	NM_004626	5'-CGTTGGATGTCTTGTTCAC-3'	5'-TGACCTCAAGACCCGATACC-3'	209 bp

doi:10.1371/journal.pone.0057393.t001

Wnt Signalling in LC

Analysis of gene expression data has revealed that Wnt pathway activity can be strongly down-regulated in small cell lung cancer (SCLC) through over-expression of inhibitory genes. Proof of deregulation of specific Wnt molecules leading to oncogenic signalling has also emerged. Frequent loss of Wnt7a mRNA was demonstrated in some studies in LC cell lines and primary tumours [3], and elevated levels of Wnt1 and Wnt2 [4,5] have also been reported in NSCLC. NSCLC cells transformed with Wnt7a showed inhibition of anchorage independent growth [6] supporting the theory that decreased Wnt7a levels are part of the pathogenic profile of NSCLC. Furthermore, over-expression of dishevelled (Dvl), a signal transducer from Wnt receptors, Fzd-s, has been reported in 75% of NSCLC cases [7]. Down-regulation of Wnt pathway antagonists like Dkk3 [8], WIF [9,10] and sFRP [11] has also been described. When NSCLC is concerned, the well-known epithelial-mesenchymal transformation (EMT) is a characteristic feature [12] and is generally linked to increased β-catenin dependent signalling [13]. Although β-catenin mutations in LC-s are relatively rare [14–16], up-regulation of uncomplexed β-catenin without genetic alteration to β-catenin itself was shown in a high proportion of human NSCLC primary tumours and tumour cell lines [17]. Recently, comparative microarray and pathway analysis of both AC and SCC samples [18,19] have identified activation of the non-canonical Wnt signalling pathway as a main regulator of SCC development.

In the present study, the role of Wnt signalling was investigated further using primary tumours and non-cancerous lung tissues, human AC and SCC lung cancer cell lines as well as commercially available, non-cancerous, primary small airway epithelium (SAEC).

Materials and Methods

Ethics Statement

Lung tissue samples were collected during lung resections at the Department of Surgery, University of Pecs, Hungary. The project was approved by the Ethical Committee of the University of Pecs. Patients had given written consent to provide samples for research purposes. All collected samples were treated anonymously.

Cell Lines

Human lung cancer cell lines A549 (AC), and H157 (SCC) were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Transgenic cell line Wnt11-A549 was created in our laboratory using lentiviral transgenesis [20].

Primary Cells and Tissues

Normal small airway epithelial cells (SAEC) were commercially available (Lonza) and were isolated from lungs of multiple random donors of different sexes and ages by Lonza.

Tumour types were determined in the Department of Pathology, University of Pecs, Hungary. A total of 20 squamous and adeno lung carcinoma samples with matched normal lung samples were obtained after surgery based on the availability of frozen tissue for molecular analysis. Samples were also formalin fixed and paraffin-embedded to be sectioned at 5 μm and stained with hematoxylin and eosin (HE) for light microscopy. Following analysis, samples were grouped as SCC vs AC according to the World Health Organisation (WHO) classification [21] by a dedicated lung pathologist.

Cell Cultures

SAEC cultures were maintained at 37°C and 5% CO₂ content in a humidified atmosphere. For initial expansion primary SAEC-s were seeded onto 6-well plates (100 000 cells/well) and cultured in Small Airway Growth Medium (SAGM) (Lonza). For treatment SAEC-s were cultured in 24-well plates in SAGM. All other cell types (A549, H157, Wnt11-A549) were cultured in DMEM or RPMI supplemented with 10% FCS and were maintained at 37°C in 5% CO₂ content in a humidified atmosphere.

Recombinant Proteins, siRNA and Chemicals

Purified, recombinant Wnt11 was purchased from R&D Systems and used at two different concentrations (0.1 and 1.0 μg/ml) for treatment of cell cultures. siWnt11 and control siRNA were obtained from Invitrogen to knock down Wnt11 expression. 100 nmol negative control and Wnt11-specific Cy3 labelled siRNA oligos were transfected into target cells using Lipofectamine 2000 transfection reagent following the manufacturer's instructions (Invitrogen). Uptake of the labelled oligonucleotides was tested using fluorescence microscopy. Cells were lysed 36 hours after transfection for RNA isolation and cDNA synthesis. qRT-PCR was used to determine Wnt11 mRNA levels in transfected samples. β-catenin inhibitor IWR-1 was purchased from Sigma, dissolved in DMSO and used at the final concentration of 1.0 μg/ml.

Immunohistochemistry and Immunofluorescent Staining

Sections of primary lung tissues were permeabilized in PBS buffer containing 0.1% saponine and 5% bovine serum albumin for 30 minutes then incubated in primary anti-Wnt11 (AbCam),

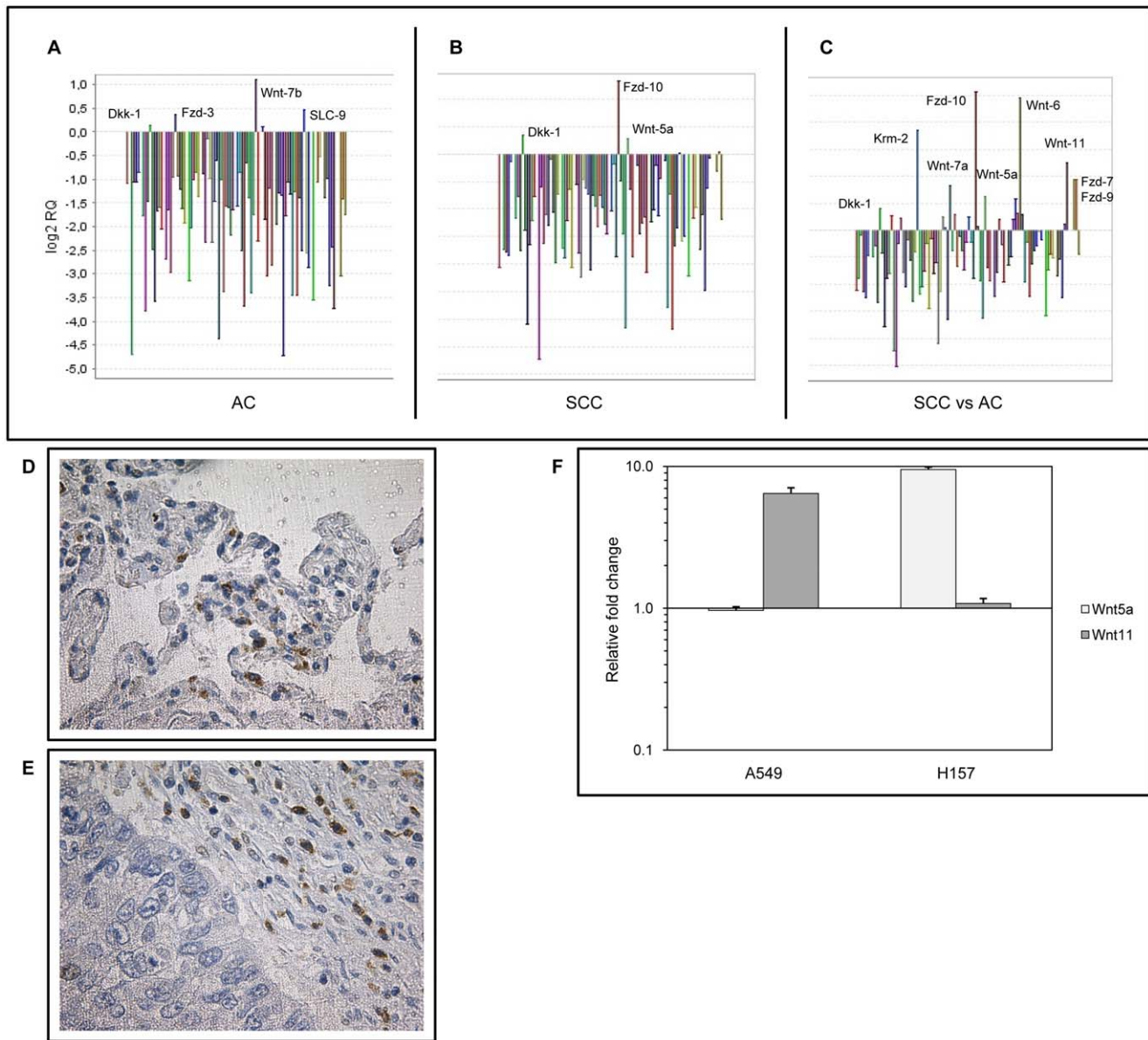


Figure 1. Level of Wnt signalling molecules in AC and SCC. Pooled cDNA of 12 AC, 8 SCC samples were targeted to gene expression analysis using a commercially available Taqman array. Four housekeeping genes were used (18S, GAPDH, HPRT1, GUSB). **A:** Expression profile of AC. Pooled cDNA of autologous normal tissue samples of the same AC patients served as reference. Note the increased level of the canonical Wnt-7b, and the receptor Fzd-3. (For the list of all gene expression changes see Table S1). **B:** Gene expression levels of SCC. Pooled cDNA of autologous normal tissue samples of the same SCC patients served as reference. Note the upregulation of the non-canonical Wnt5a and the canonical pathway inhibitor Dkk-1, along with increased level of Fzd-10 gene expression. (For the list of all gene expression changes see Table S2). **C:** Gene expression of SCC compared to AC. Note the increased level of non-canonical Wnts (Wnt5a and Wnt11), several receptors (Fzd-7, -9, -10), a canonical pathway inhibitor (Dkk-1) and an inhibitory receptor (Krm2). (For the list of all gene expression changes see Table S3). **D and E:** Immunohistochemical staining of primary control (Panel D) and AC (Panel E) tissues for Wnt11. Note the higher Wnt11 expression in the tumours emphasizing the relative nature of the initially identified differences at mRNA level. Images shown are representatives of three independent stainings. **F:** Wnt11 gene transcription was also measured in an AC (A549) and an SCC (H157) cancer cell line. Note the higher Wnt11 levels in the observed cancer cell lines compared to the normal, non-cancerous pulmonary epithelium (SAEC). The AC cell line showed a more pronounced increase in Wnt11 expression than the SCC cell line. (The results are representative of three independent experiments where the non-cancerous control (SAEC) was derived from three individual donors of different ages).

doi:10.1371/journal.pone.0057393.g001

then in anti-rabbit-HRP secondary antibodies for 1 hour each. To ensure the comparability of expression levels, all images were captured with the same exposition settings. For β -catenin staining of SAEC, normal A549, Wnt11-A549 and H157 cells: 10000 cells/cm² were seeded and cultured for 24 h on 4-well culture slides (BD-Falcon). The monolayer cell cultures were

fixed with 4% formaldehyde and permeabilized with PBS containing 0.1% Triton-X and 5% BSA. Murine anti- β -catenin IgG₁ mAb (Santa Cruz) (1:50) and donkey anti-murine IgG secondary antibody conjugated to NorthernLight 557 (R&D Systems) (1:200) were used for immunofluorescent labelling; nuclei were counterstained with DAPI. Images were acquired

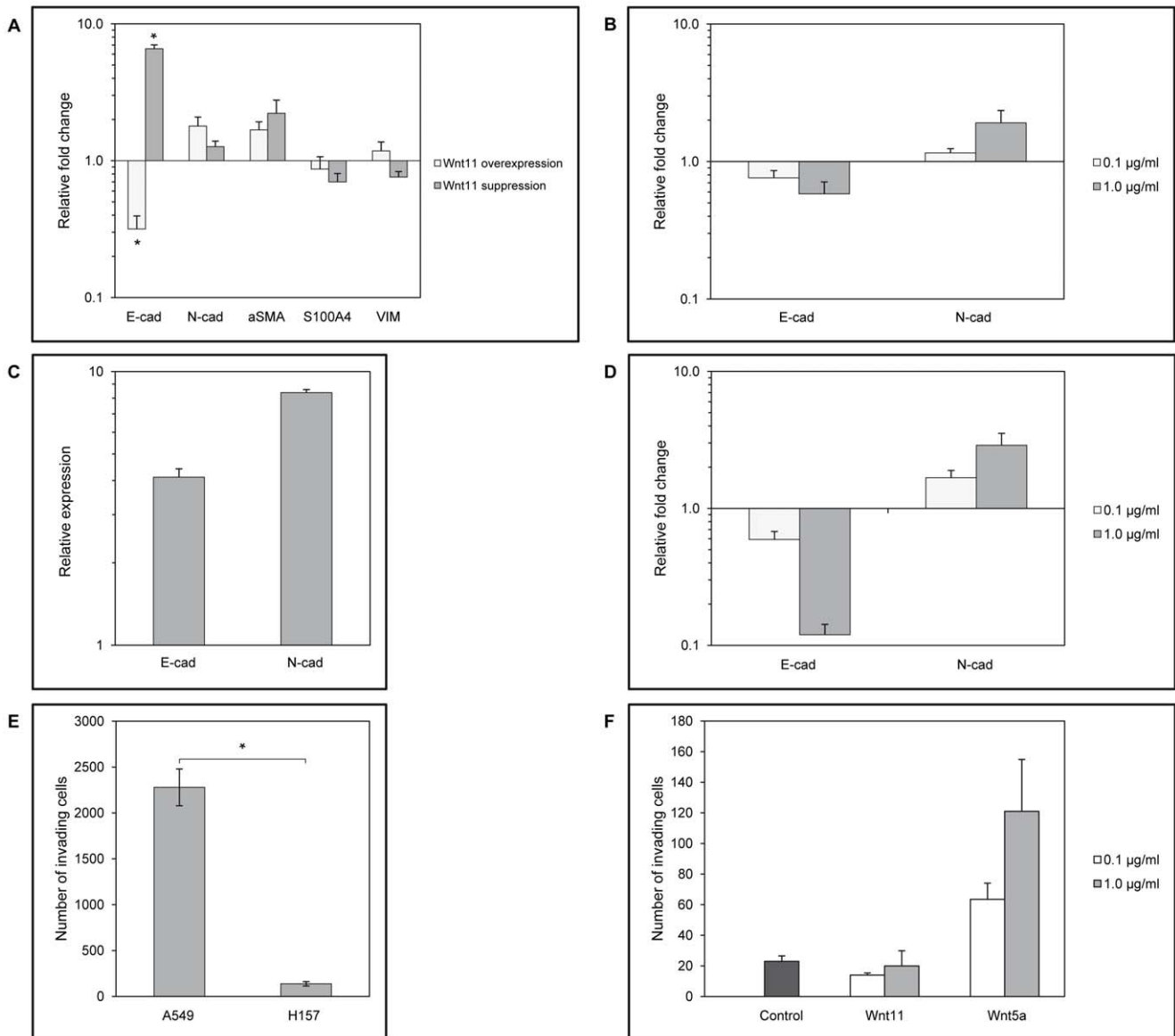


Figure 2. Effects of Wnt11 and Wnt5a in tumour development. **A:** Effects of Wnt11 overexpression and suppression in A549 AC cell line. Gene expression of A549-GFP and A549 treated with control siRNA served as reference, respectively. Note the decreased expression of E-cadherin in Wnt11-A549 ($p < 0.011$), and the increased E-cadherin level following siWnt11 treatment ($p < 0.006$). **B:** Recombinant Wnt11 treatment of SAEC cultures. Gene expression of untreated control cells was used as reference. Note the concentration dependent “cadherin switch” upon rWnt11 treatment. (Data are representative of five independent experiments where SAEC was used of five individual donors of different ages and sexes). **C:** Expression of E- and N-cadherin in primary adenocarcinoma lung tissue sample compared to its healthy autologous control pair. Data are representative of the analysis of three independent tissue pairs. **D:** Recombinant Wnt5a treatment of SAEC cultures. Gene expression of untreated control cells was used as reference. Note the concentration dependent “cadherin switch” upon rWnt5a treatment. (The presented data are representative of five independent experiments where SAEC was used as control of five individual donors of different ages and sexes). **E:** Invasion assay. The A549 AC cell line that expresses high levels of Wnt11 is more invasive than the H157 SCC cell line with lower expression of Wnt11 ($p < 0.008$). **F:** Invasion assay. Primary non-cancerous SAEC were treated with 1 µg/ml rWnt11 and rWnt5a for three days prior to the assay. Only the rWnt5a treated SAEC migrated faster than the non-treated control cells. (The results are representative of three independent experiments where SAEC was used from three individual donors of different ages).
doi:10.1371/journal.pone.0057393.g002

using an Olympus IX-81 light and fluorescent or a confocal microscope, then densitometry was performed.

RNA Isolation, Preparation of cDNA, TaqMan Array and quantitative RT-PCR

Total RNA was prepared from cell cultures and primary lung resections (SCC and AC samples and their respective non-

cancerous controls) using NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel) with on-column DNase digestion. cDNA was prepared from RNA samples with MMuLV reverse transcriptase kit (Thermo Scientific). Real-time quantitative RT-PCR examinations were carried out using Absolute QPCR SYBR Green Low ROX master mix (ABGene) and an Applied Biosystems 7500 thermal cycler system. The sequences and data of primers are listed in Table 1.

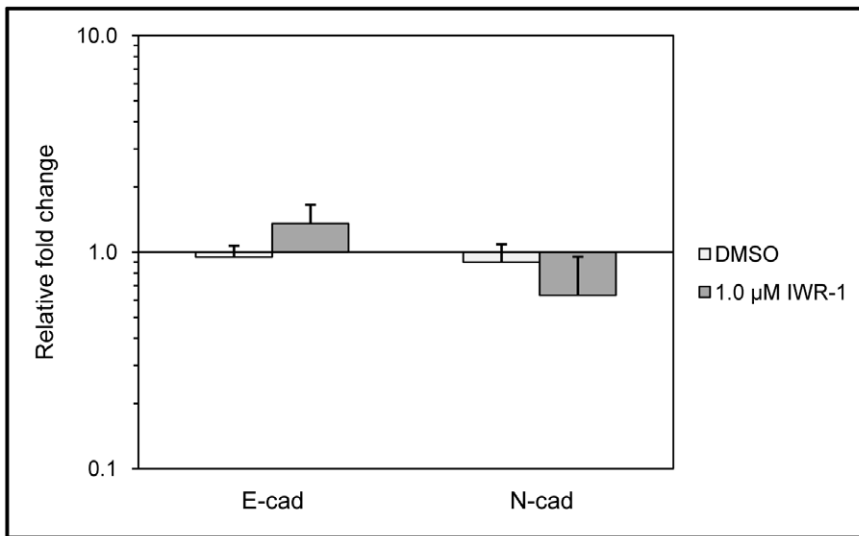


Figure 3. Effects of β -catenin inhibition on cadherin gene expression. Suppression of canonical Wnt signalling in SAEC using 1 μ g/ml IWR-1 inhibitor or DMSO as diluent control. Gene expression of non-treated SAEC was used as reference. Note the increased E-cadherin and decreased N-cadherin mRNA expressions. (The results are representative of three independent experiments where SAEC was used from three individual donors of different ages).

doi:10.1371/journal.pone.0057393.g003

Quantitative real-time RT-PCR data were analyzed by delta Ct (dCt) and Relative Quantity (RQ) methods as suggested by Applied Biosystems using the 7500 System SDS Software. Briefly, Ct values were determined for each sample using an automatic threshold level determined by the 7500 System SDS Software. Delta Ct (dCt) values were determined according to the following formula: $dCt(\text{target gene}) = Ct(\text{target gene}) - Ct(\text{housekeeping gene})$. Changes in gene expression are shown as RQ values calculated using the formula below: $RQ = 2^{-ddCt}$, where ddCt values were calculated as $ddCt = dCt(\text{sample}) - dCt(\text{reference sample})$.

TaqMan[®] Array Human WNT Pathway 96-well Plate (4414100)—the gold standard of specificity and sensitivity in real-time PCR was purchased from Applied Biosystems. The array also contained 4 housekeeping genes including 18S, β -actin (ACTB), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT).

Matrigel Invasion Assay

A549, H157, SAEC, rWnt5a (0.1 and 1.0 μ g/ml) and rWnt11 (0.1 and 1.0 μ g/ml)-treated SAEC were used in the invasion assays. SAEC were pre-treated with rWnt5a and rWnt11 for 72 hours before tested in the invasion assay. Cells were cultured in DMEM/RPMI/SAGM, respectively supplemented with 10% FCS and were maintained at 37°C in 5% CO₂ content in a humidified atmosphere. Invasion assays were carried out in 24-well Matrigel invasion chambers (BD BioCoat Matrigel) with 8.0- μ m filter membranes. After rehydration of the chambers, membranes were transferred to the wells containing 750 μ l of DMEM/RPMI/SAGM supplemented with 10% FCS as a chemoattractant. Cells (5×10^4) in 500 μ l of FCS- or growth-factor-free DMEM/RPMI/SAGM were added into each of the chambers. After 24 hours incubation the non-invading cells on the upper side of the chamber membranes were removed. The invading cells to the opposite side of the chamber membranes were fixed in 4% paraformaldehyde and were stained using hematoxylin-eosin. The total number of invading cells was determined by counting the number of cells that migrated to the lower surface of

the filters. Five separate microscopic fields were counted on each membrane.

Statistical Analysis

Where it is applicable, data are presented as mean \pm standard deviation (SD), and the effects between various experimental groups were compared with the Student t-test. $p < 0.05$ was considered as significant.

Results

Wnt Signalling Molecules are Differentially Expressed in AC and SCC

Using a commercially available Wnt Taqman array system, differences between canonical and non-canonical Wnt pathway activities were studied in AC and SCC samples, respectively. Sample pairs included pooled cDNA of primary AC (12) or SCC (8) samples and their respective tissue autologous, non-cancerous controls. The read-outs were matched to all four housekeeping genes of the array to focus on the largest of differences in gene expression.

Increased transcription of the canonical Wnt-7b ligand and a Wnt receptor Fzd-3 was detected in pulmonary AC-s along with drastic down-regulation of canonical pathway inhibitors (Figure 1A). In contrast, activation of the non-canonical Wnt5a and canonical pathway inhibitor Dkk-1 along with up-regulation of Fzd-10 gene transcripts were measured in SCC samples (Figure 1B).

When gene expression profiles of non-cancerous control tissues of the two different tumour types were compared, no characteristic genes or molecular patterns were identified as potential initiators of AC or SCC development (data not shown).

However, comparative analysis of AC and SCC tumour samples emphasized additional differences between the two NSCLC subtypes. Much higher levels of an additional non-canonical Wnt, Wnt11, several receptors (Fzd-7, -9, Fzd-10) as well as increased levels of canonical pathway inhibitor Dkk-1 and

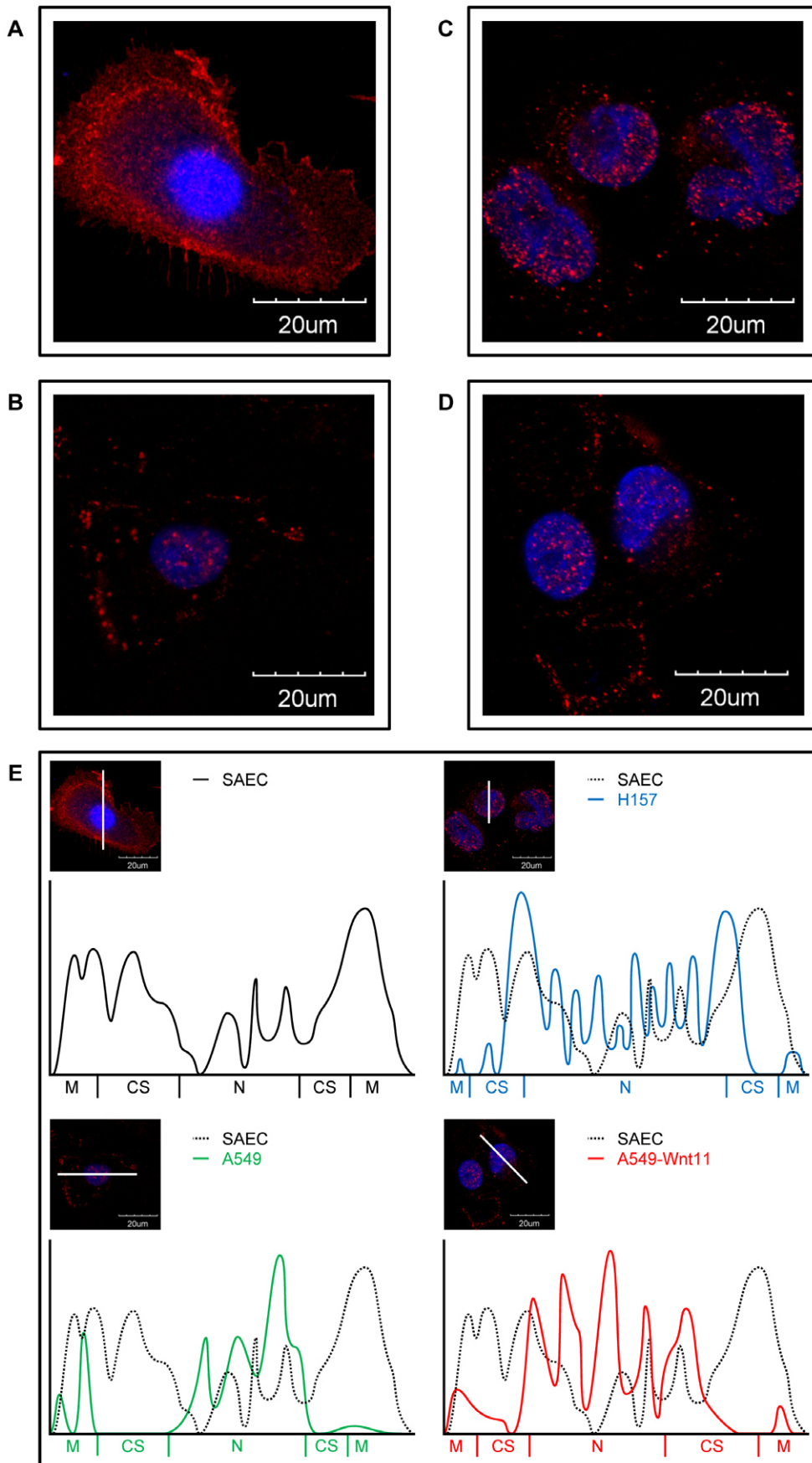


Figure 4. Localization of β -catenin. **A:** Immunofluorescent staining of SAEC. **B:** Immunofluorescent staining of normal A549. **C:** Immunofluorescent staining of Wnt11 overexpressing A549. **D:** Immunofluorescent staining of H157 monolayer cell cultures. (60x image, red: β -catenin, blue: DAPI). Note the dramatic increase in nuclear localization and the decrease in cellular membrane localization of A549 AC, Wnt11-A549 and H157 SCC cell lines compared to the normal pulmonary epithelium (SAEC). Data presented are representative of three independent experiments. **E:** Densitometry of immunofluorescent images of SAEC, A549, Wnt-11-A549 and H157 cells. Note the increased nuclear localization of β -catenin particularly in the Wnt11-A549 cell line. (M: cellular membrane, CS: cytosol, N: nucleus). doi:10.1371/journal.pone.0057393.g004

inhibitory receptor Kremen (Krm2) were detected (Figure 1C) in SCC.

Although up-regulation of the non-canonical Wnt pathway has been identified in previous studies as a general trend in gene expression alterations during SCC development, the precise role for specific molecules in the carcinogenic process has rarely been defined. One of the enigmatic molecules in the carcinogenic process of SCC is Wnt11. As Wnt11 up-regulation in SCC was detected only as relative to AC, we theorized that Wnt11 might have some general role in tumorigenesis. To investigate whether Wnt11 protein is present in ACs, AC samples were tested for Wnt11 protein expression. Primary non-cancerous control (Figure 1D) and AC (Figure 1E) tissues were stained for Wnt11 using immunohistochemistry. Wnt11 was detected in both normal and cancerous samples, although at higher levels in the tumours. The results emphasized that Wnt11 is necessary for the normal homeostasis of the tissue and its increased expression in the tumour correlates with the carcinogenic process. The relative nature of Wnt11 expression was further confirmed, when Wnt11 gene transcription was measured in an AC (A549) and an SCC (H157) cancer cell line. While Wnt11 levels were higher in both A549 and H157 than in normal, non-cancerous SAEC, several fold increase was detectable in Wnt11 mRNA expression in the AC (Figure 1F) than in the SCC cell line.

To find out more about the role of Wnt11 and potentially Wnt5a in the carcinogenic process, further studies were performed.

Wnt11 and Wnt5a in NSCLC

To examine the role of non-canonical Wnts in LC development, first Wnt11 levels were modified in the A549 cell line using lentiviral transgenesis for overexpression and commercially available siWnt11 for transient suppression of Wnt11 (Figure S1).

As in a limited number of previous studies Wnt11 has been implicated as a regulator of EMT (Zhang, JBC, 2012), several EMT molecular markers including S100, α SMA, and VIM were measured. Only E- and N-cadherin mRNA levels changed significantly in Wnt11 overexpressing-A549 cells (Figure 2A), drastically decreasing E- and increasing N-cadherin expression. In contrast, transient inhibition of Wnt11 translation using siWnt11 could only increase E-cadherin mRNA transcription while N-cadherin levels remained unchanged implicating E-cadherin as a Wnt11 target (Figure 2A). To test whether Wnt11 has a similar effect in primary pulmonary epithelium, SAEC-s presenting mixed epithelial phenotypes (Figure S2) were treated with different concentrations (0.1 and 1.0 μ g/ml) of purified recombinant Wnt11. The experiments provided further evidence that Wnt11 regulates cadherin levels (Figure 2B) as E-cadherin expression decreased, while N-cadherin mRNA levels increased in Wnt11 treated SAEC-s in a concentration dependent manner. To investigate E- and N-cadherin expression in AC-s where Wnt11 protein levels are higher than in their non-cancerous autologous controls (Figure 1D and E), qRT-PCR analysis was performed. In the Wnt11 enriched environment of AC-s, both E- and N-cadherin levels were higher than in the non-cancerous control tissues (Figure 2C) indicating Wnt11 as a regulator of cadherin

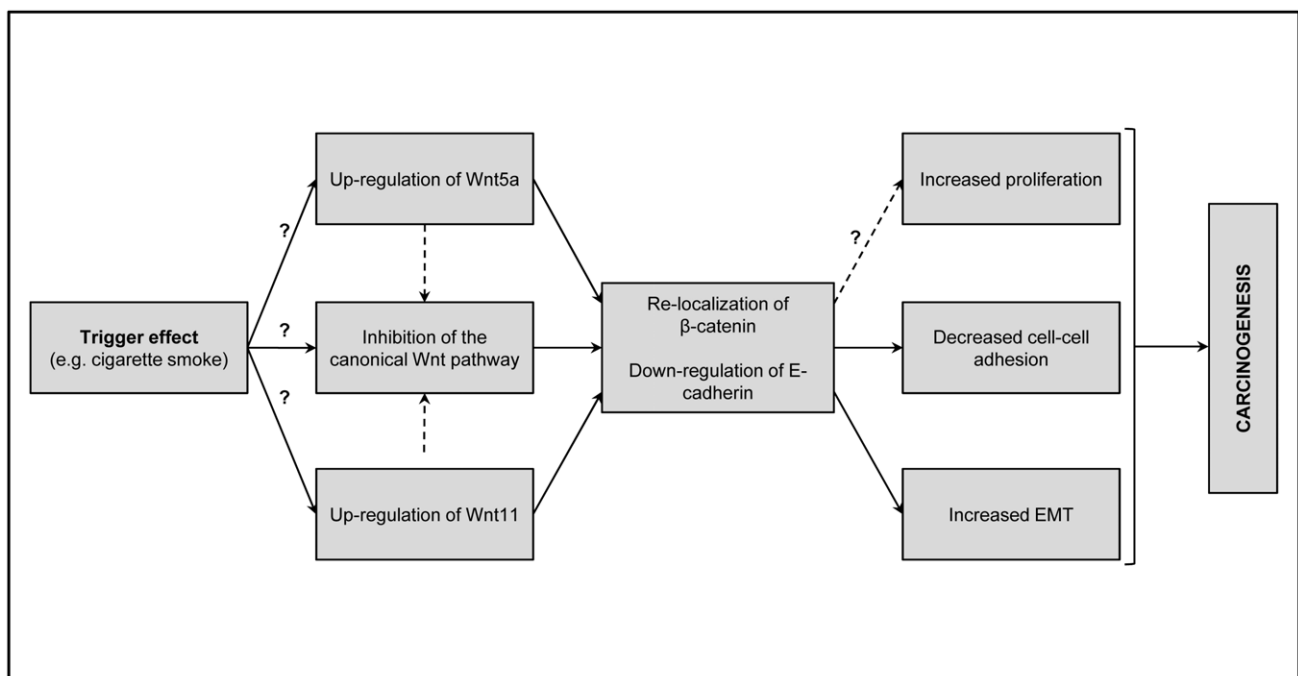


Figure 5. Predicted molecular pathway interactions during SCC development.

doi:10.1371/journal.pone.0057393.g005

expression and emphasizing the regulatory role of additional factors present in the molecular microenvironment of the tissue. Based on the literature [22] Wnt5a and Wnt11 can support or even replace one another *in vivo* while controlling tissue development and functions, therefore the effect of Wnt5a was also tested on E- and N-cadherin expression. Similarly to rWnt11, rWnt5a (0.1 and 1.0 $\mu\text{g/ml}$) was able to down-regulate E- and up-regulate N-cadherin expression in primary SAEC (Figure 2D).

To investigate whether added Wnt11 or Wnt5a can modulate E- and N-cadherin expression in LC cell lines, both A549 and H157 cell lines were exposed to rWnt5a and Wnt11 at the concentration of 0.1 and 1.0 $\mu\text{g/ml}$. Added rWnt5a to AC cell line was able to further decrease E-cadherin, and had no significant effect on N-cadherin, while rWnt5a had no significant effect on either genes in the H157 cell line. Added rWnt11 in the H157 SCC cell line increased N-cadherin expression and had no effect on the already non-detectable E-cadherin levels (Figure S3).

As current literature concerning the role of Wnt5a and Wnt11 in cadherin regulation [23,24] and therefore in cellular motility is contradicting, an invasion assay was performed, where non-treated primary SAEC, rWnt5a and rWnt11 treated SAEC as well as A549 AC and H157 SCC cells were tested (Figure 2E, 2F). In the invasion assay the A549 cell line that expresses Wnt11 at high levels moved much faster than the H157 cell line that highly expresses Wnt5a (Figure 2E). In contrast, rWnt5a treated non-cancerous SAEC were more invasive than the rWnt11 treated SAEC which were not moving faster than the controls (Figure 2F), indicating that primary, non-cancerous cells might require additional signals or longer exposure to Wnt11 to achieve increased motility.

Inhibition of Canonical Wnt Signalling and β -catenin Localization

In the TaqMan array of SCC samples, apart from up-regulation of non-canonical Wnt-s, suppression of canonical Wnt signalling was also detected that might have an important role in modulating the tissue's microenvironment.

As the Wnt11 promoter contains two conserved Tcf/LEF binding sites and two conserved GATA sites, canonical Wnt signals and GATA family members can regulate Wnt11 transcription directly. In contrast, the Wnt5a promoter region harbours numerous *cis*-acting elements including several GC boxes and Sp1, AP1, and AP2 binding motifs [25]. To test how β -catenin activity affects Wnt11 and Wnt5a expression as well as cadherin mRNA levels, cells were treated with a β -catenin inhibitor, IWR-1 (1.0 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours. Inhibition of β -catenin function resulted in increased expression of E- and reduced N-cadherin expression (Figure 3), while both Wnt11 and Wnt5a transcription was slightly reduced (data not shown).

Additionally, β -catenin is not only important in the regulation of gene transcription but also in cellular adhesion. β -catenin associates with the cytoplasmic domain of cadherin and directly links to the actin cytoskeleton through α -catenin in a dynamic cadherin adhesion complex. Localization of β -catenin protein therefore was investigated in primary, non-cancerous SAEC (Figure 4A), A549 AC cell line (Figure 4B), Wnt11-A549 (Figure 4C) and an SCC cell line, H157 (Figure 4D). Cells were stained for β -catenin using protein specific antibody and the nucleus with DAPI, then staining intensity was scanned in a cross-section of the cells (Figure 4E). In the normal pulmonary epithelium, SAEC, β -catenin staining was strong in the cellular membrane and not in the nucleus indicating that β -catenin acts primarily in cellular adhesion and much less of the protein is involved in forming a transcription complex. In contrast, dramatic

increase was detected in nuclear localization of β -catenin in Wnt11-A549 AC and in the H157 SCC cell lines while no significant amount of β -catenin was detected in their cellular membranes indicating severely weakened cellular adhesion.

Discussion

Malfunction of genes and pathways controlling developmental processes have long been studied in association with cancers. Malfunction of Wnt related events have frequently been singled out as one of the causes of carcinogenesis. While Wnts seem to be important in the carcinogenic process of LC-s also, the complex molecular background of mixed LC types has been notoriously difficult to decipher.

Recent studies, including our TaqMan analysis, confirmed a differential molecular background to NSCLC sub-types AC-s and SCC-s involving up-regulation of canonical signalling in AC-s [26] and increased non-canonical Wnt signalling in SCC-s. While these results should be sufficient enough to identify additional therapeutic targets that could aid development of effective therapies, the underlying molecular complexity of AC and SCC works against this goal. In the present study we aimed to provide further details to the molecular background of pulmonary carcinogenesis and to connect individually observed molecular alterations during the process.

Similarly to previous studies, our experiments detected a marked increase in Wnt5a levels in SCC. As Wnt5a is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis [27] increased tissue mass of tumours with high Wnt5a levels is understandable. Interestingly, the role of Wnt5a in carcinogenesis is still ambiguous, as it can exhibit tumour suppressor activities in some cancers, like thyroid, brain, breast and colorectal, but is aberrantly up-regulated and associated with tumour progression in cancers of the lung, stomach and prostate. Increased Wnt5a levels in SCC samples might also be significant as an inducer of LC, as cigarette smoke extracts [28] trigger Wnt5a expression in various types of exposed tissues including macrophages and cells of epithelial origin. Comparative analysis of gene expression in AC and SCC tumour tissues has additionally identified Wnt11 and its receptor Fzd-7 [29] as potential regulators of SCC development. However, while the increase in Wnt5a levels was specific to SCC, the Wnt11 increase was only relative to AC. Similarly to SCC, AC-s had also shown up-regulated Wnt11 levels indicating a general role for Wnt11 in the carcinogenic process. Our studies using primary pulmonary epithelial tissues as well as cell lines identified Wnt5a and Wnt11 as regulators of cadherin expression, most likely the "cadherin switch" that is a characteristic marker of tumour progression. Our studies also confirmed that the effects of both Wnt5a and Wnt11 are concentration dependent and presumably modified by additional microenvironmental signals. Perhaps even a combination of Wnt5a/Wnt11 in SCC and Wnt7b/Wnt11 in AC. The additional signals could also include for example different levels of Wnt11 receptor Fzd-7 in NSCLC sub-types that was detected in the AC and SCC samples (unpublished observations), as well as activators of e.g. the SP1, AP1 or AP2 transcription factors that could modify Wnt5a transcription. As Wnt5a can also activate gene transcription via AP1, SCC tumour development might be associated with an auto-regulatory loop of Wnt5a. According to the literature, Wnt5a dependent E-cadherin down-regulation, however, is independent of the canonical Wnt pathway in melanoma type skin cancer and favours the PKC dependent up-regulation of a transcriptional repressor, Snail [30]. Addition to modification of cadherin expression, both Wnt5a and Wnt11 adjusted β -catenin localization, redirecting β -catenin from cellular

adhesion foci to the nucleus. The fact that Wnt11 can loosen cellular adhesion is not a novel concept. Previous studies have found that Wnt11 can promote ubiquitination and therefore degradation of the focal adhesion protein paxillin supporting turnover of focal adhesions which process is required for cell migration [31].

As an additional factor, a general down-regulation of canonical Wnt signalling was also detected in SCC. To investigate the potential significance of canonical Wnt pathway suppression, β -catenin was chemically inhibited in cell lines and in primary pulmonary epithelial cells, then Wnt5a and Wnt11, E- and N-cadherin expression was studied. While Wnt11 and Wnt5a levels were slightly suppressed upon β -catenin inhibition, E-cadherin was up- and N-cadherin was down-regulated. While the outcomes of the above experiments are in agreement with previous description of non-canonical Wnt signalling regulation, it doesn't provide explanation for our results of primary tissues where up-regulation of non-canonical Wnts with parallel down-regulation of the canonical Wnt pathway was detected. Although further studies are essential, our observations in primary tumours are not unique in lung SCC, as a similar molecular pattern was detected in non-melanoma type, squamous cell skin cancer [32] also.

While the main molecular trends in AC and especially in SCC development are apparent, gene expression changes that are currently unexplained might hold the key to effective therapeutic design. Unfortunately, detailed analysis of all identified molecular alterations has gone way beyond the scope of the present study one can still hypothesise about important future directions of the investigation. In contrast to SCC for example, development of AC is orchestrated by de-regulation of canonical Wnt pathway suppressors and up-regulation of Wnt7b, a lung epithelium-linked Wnt [33,34]. It has also been determined that Wnt7b promoter activity is regulated by a homeo-domain transcription factor, TTF1 (Thyroid Transcription Factor 1) [33], responsible for alveolar epithelial development, indicating that mutation or malfunction of TTF1 might be responsible for AC-type carcinogenesis. Emphasizing the complex regulation of LC development, increased mRNA expression of Fzd-3, a natural receptor for Wnt5a [35] was also detected in AC-s, rather than in SCC although the significance of this finding is unclear. Meanwhile, Fzd-10, a receptor for Wnt7a [36–38] as well as Wnt7b [38] showed an increase in SCC. Whether Fzd-10 up-regulation is a sign of compensatory attempt for inhibited canonical Wnt signalling is awaiting further experimentation. Additionally, high levels of Wnt6 were also detected in SCC samples. Based on studies in human gastric cancer (GC) cells, WNT6 was able to increase resistance to apoptotic cell death induced by chemotherapeutic agents and enhance resistance of GC cells to anthracycline drugs [39]. Whether Wnt6 is involved in regulation of drug resistance in LC remains to be seen. Based on the summary of present findings one potential target in lung SCC therapy could involve AP1 induced gene transcription using the dominant negative c-jun as transcriptional repressor as in the transgenic TAM67 (dominant-negative c-Jun) mouse model both skin [40] and lung cancer tumour progression was successfully inhibited as a result of interference with Wnt5a signalling [41].

In summary (Figure 5) we theorize that cigarette smoke triggers up-regulation of Wnt5a that initiates proliferation and aids suppression of canonical Wnt signalling that leads to decreased participation of β -catenin in cellular adhesion. Increased Wnt11 ratio decreases cellular adhesion even further by suppressing E-cadherin expression, by reducing β -catenin molecules in anchorage function and by inducing degradation of the focal adhesion protein paxillin.

Although further studies are clearly required, by highlighting the overlapping function of molecular pathways of LC-s, our work has provided additional facts to aid better understanding of the molecular background of NSCLC sub-types which might help development of curative therapies in the future.

Supporting Information

Figure S1 Wnt11 overexpression and suppression in A549 cells. A549 pulmonary adenocarcinoma cells were transfected with a lentiviral bicistronic construct encoding full-length Wnt11-IRES-GFP. Control A549 cells were transfected with GFP only. **A:** Quantitative RT-PCR measurement of Wnt11 mRNA levels in A549 and Wnt11-A549 cells. **B:** Detection of Wnt11 protein by Western blotting. A549 cells were lysed in SDS sample buffer containing 10% 2-ME and heated for 5 minutes at 95C. Then SDS-PAGE was performed and proteins were blotted onto nitrocellulose membrane. Membrane was blocked in TBS containing 2% BSA and 0.1% Tween 20. Rabbit anti-Wnt11 pAb (Abcam) and mouse anti- β -actin mAb (Sigma) primary antibodies were used. HRP labelled antibodies specific for rabbit and mouse IgG, respectively, were used as secondary reagents. Blots were visualized using the chemiluminescent Supersignal Kit (Pierce). **C:** transfection efficiency of cy3 labelled siRNA-s was monitored using fluorescence microscopy. **D:** Quantitative RT-PCR measurement of Wnt11 mRNA levels in control and siWnt11-A549 cells. (TIF)

Figure S2 Expression profile of various epithelial markers in SAECs. mRNA levels of SAEC were measured with qRT-PCR for the following types of epithelial markers of commercially obtained SAEC: AQP3: Aquaporin 3 (NM_004925, AGCCCCTTCAGGATTTCCA-GACC-CAAATTCGGTTCCA, 86 bp); AQP4: Aquaporin 4 (NM_004028, GCGAGGACAGCTCCTATGAT-ACTGGTGCCAGCATGAATC, 110 bp); AQP5: Aquaporin 5 (NM_001651.2, CCCTGCGGTGGTCATGA-ATGGGCCCTACCCAGAAAAC, 60 bp); MUC-1: Mucin 1, cell surface associated (NM_001204286.1, CTCATTGCCTTGCTGTCTGT-GATGTC-CAGCTGCCCGTAGT, 57 bp); FOXJ1: Forkhead box protein J1 (NM_001454, CGAGGCACTTTGATGAAGC-CAACTTCTGCTACTTCCGCC, 110 bp); CC10: Clara cell 10 (NM_003357.4, CGAGGCACTTTGATGAAGC-CAACTTCTGCTACTTCCGCC, 135 bp). Relative β -actin was used as the normalizer gene (SD from duplicate readings). The results indicated a mixed phenotype of SAECs. The present figure is a representative of three separate tests. (TIF)

Figure S3 rWnt treatment of A549 and H157 cell lines. **A:** rWnt5a treatment of the A549 AC cell line. Note the decreased expression of E-cadherin and the slight increase in N-cadherin expression. **B:** rWnt11 treatment of the H157 SCC cell line. Note the lack of E-cadherin and increased N-cadherin expression. **C:** rWnt5a treatment of the H157 SCC cell line. Note the lack of E-cadherin and increased N-cadherin expression. (TIF)

Table S1 Comparative analysis of primary lung adenocarcinoma (AC) samples to their tissue autologous controls. (DOCX)

Table S2 Comparative analysis of primary lung squamous cell carcinoma (SCC) samples to their tissue autologous controls. (DOCX)

Table S3 Comparative analysis of primary lung squamous cell carcinoma to adenocarcinoma samples. (DOCX)

References

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *Cancer J Clin* 55: 74–108.
- Pongracz JE, Stockley RA (2006) Wnt signaling in lung development and diseases. *Respiratory Res* 7: 15.
- Calvo R, West J, Franklin W, Erickson P, Bemis L, et al. (2000) Altered HOX and WNT7A expression in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12776–12781.
- He B, You L, Uematsu K, Xu Z, Lee AY, et al. (2004) A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells. *Neoplasia* 6: 7–14.
- You L, He B, Xu Z, Uematsu K, Mazieres J, et al. (2004) Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cell. *Oncogene* 23: 6170–6174.
- Winn RA, Marek L, Han SY, Rodriguez K, Rodriguez N, et al. (2005) Restoration of Wnt-7a expression reverses non-small cell lung cancer cellular transformation through frizzled-9-mediated growth inhibition and promotion of cell differentiation. *J Biol Chem* 280: 19625–19634.
- Uematsu K, He B, You L, Xu Z, McCormick F, et al. (2003) Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression. *Oncogene* 22: 7218–7221.
- Nozaki I, Tsuji T, Iijima O, Ohmura Y, Andou A, et al. (2001) Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 19: 117–121.
- Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stochr R, et al. (2003) WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol* 201: 204–212.
- Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Lee AY, et al. (2004) Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res* 64: 4717–4720.
- Lee AY, He B, You L, Dadfarmay S, Xu Z, et al. (2004) Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene* 23: 6672–6676.
- Taki M, Kamata N, Yokoyama K, Fujimoto R, Tsutsumi S, et al. (2003) Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Cancer Sci* 94: 593–597.
- Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, et al. (2005) Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* 179: 56–65.
- Sunaga N, Kohno T, Kolligs FT, Fearon ER, Saito R, et al. (2001) Constitutive activation of the Wnt signaling pathway by CTNNB1 (beta-catenin) mutations in a subset of human lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 316–321.
- Ueda M, Gemmill RM, West J, Winn R, Sugita M, et al. (2001) Mutations of the beta- and gamma-catenin genes are uncommon in human lung, breast, kidney, cervical and ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 85: 64–68.
- Blanco D, Vicent S, Elizegi E, Pino I, Fraga MF, et al. (2004) Altered expression of adhesion molecules and epithelial-mesenchymal transition in silica-induced rat lung carcinogenesis. *Lab Invest* 84: 999–1012.
- Akiri G, Cherian MM, Vijayakumar S, Liu G, Bafico A, et al. (2009) Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma. *Oncogene* 28: 2163–2172.
- Hu Y, Galkin AV, Wu C, Reddy V, Su AI (2011) CAFET algorithm reveals Wnt/PCP signature in lung squamous cell carcinoma. *PLoS One* 6: e25807.
- Lockwood WW, Chari R, Coe BP, Thu KL, Garnis C, et al. (2010) Integrative genomic analyses identify BRF2 as a novel lineage-specific oncogene in lung squamous cell carcinoma. *PLoS Med* 7: e1000315.
- Bovia F, Salmon P, Matthes T, Kvell K, Nguyen TH, et al. (2003) Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Blood* 101: 1727–1733.
- Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y (2001) The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 18: 1059–1068.
- Brandon C, Eisenberg LM, Eisenberg CA (2000) WNT signaling modulates the diversification of hematopoietic cells. *Blood* 96: 4132–4141.
- Medrek C, Landberg G, Andersson T, Leandersson K (2009) Wnt-5a-CKI{alpha} signaling promotes {beta}-catenin/E-cadherin complex formation and intercellular adhesion in human breast epithelial cells. *J Biol Chem* 284: 10968–10979.
- Arnsdorf EJ, Tummala P, Jacobs CR (2009) Non-canonical Wnt signaling and N-cadherin related beta-catenin signaling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate. *PLoS One* 4: e5388.
- Danielson KG, Cohen IR, Huebner K, Nicholls JM, Iozzo RV (1995) Characterization of the complete genomic structure of the human WNT-5A gene, functional analysis of its promoter, chromosomal mapping, and expression in early human embryogenesis. *J Biol Chem* 270: 31225–31234.
- Nguyen DX, Chiang AC, Zhang XH-F, Kim JY, Kris MG, et al. (2009) WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis. *Cell* 138: 1–12.
- Vuga LJ, Ben-Yehudah A, Kovkarova-Naumovski E, Oriss T, Gibson KF, et al. (2009) WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 583–589.
- Hussain M, Rao M, Humphries AE, Hong JA, Liu F, et al. (2009) Tobacco Smoke Induces Polycomb-Mediated Repression of Dickkopf-1 in Lung Cancer Cells. *Cancer Res* 69: 3570.
- Kim GH, Her JH, Han JK (2008) Ryk cooperates with Frizzled 7 to promote Wnt11-mediated endocytosis and is essential for *Xenopus laevis* convergent extension movements. *J Cell Biol* 182: 1073–1082.
- Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, O'Connell MP, Leotlela PD, et al. (2007) The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282: 17259–17271.
- Iioka H, Imemura S, Natsume T, Kinoshita N (2007) Wnt signalling regulates paxillin ubiquitination essential for mesodermal cell motility. *Nat Cell Biol* 9: 813–821.
- Pourreyyon C, Reilly L, Proby C, Panteleyev A, Fleming C, et al. (2012) Wnt5a is strongly expressed at the leading edge in non-melanoma skin cancer, forming active gradients, while canonical Wnt signalling is repressed. *PLoS One* 7: e31827.
- Weidenfeld J, Shu W, Zhang I, Millar SE, Morrissey EE (2002) The Wnt7b promoter is regulated by TTF-1, GATA6, and Foxa2 in lung epithelium. *J Biol Chem* 277: 21061–21070.
- Shu W, Jiang YQ, Lu MM, Morrissey EE (2002) Wnt7b regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung. *Development* 129: 4831–4842.
- Kawasaki A, Torii K, Yamashita Y, Nishizawa K, Kanekura K, et al. (2007) Wnt5a promotes adhesion of human dermal fibroblasts by triggering a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signal. *Cell Signal* 19: 2498–2506.
- Carmon KS, Loose DS (2008) Secreted frizzled-related protein 4 regulates two Wnt7a signaling pathways and inhibits proliferation in endometrial cancer cells. *Mol Cancer Res* 6: 1017–1028.
- Kawakami Y, Wada N, Nishimatsu S, Nohno T (2000) Involvement of frizzled-10 in Wnt-7a signaling during chick limb development. *Dev Growth Differ* 42: 561–569.
- Wang Z, Shu W, Lu MM, Morrissey EE (2005) Wnt7b activates canonical signaling in epithelial and vascular smooth muscle cells through interactions with Fzd1, Fzd10, and LRP5. *Mol Cell Biol* 25: 5022–5030.
- Yuan G, Regel I, Lian F, Friedrich T, Hitkova I, et al. (2013) WNT6 is a novel target gene of caveolin-1 promoting chemoresistance to epirubicin in human gastric cancer cells. *Oncogene* 32: 375–387.
- Kang MI, Baker AR, Dextras CR, Cabarcas SM, Young MR, et al. (2012) Targeting of Noncanonical Wnt5a Signaling by AP-1 Blocker Dominant-Negative Jun When It Inhibits Skin Carcinogenesis. *Genes Cancer* 3: 37–50.
- Tichelaar JW, Yan Y, Tan Q, Wang Y, Estensen RD, et al. (2010) A dominant-negative c-jun mutant inhibits lung carcinogenesis in mice. *Cancer Prev Res* 3: 1148–1156.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JEP DB DRT. Performed the experiments: DB VC AW EK SB TK MA VKS JR KK LJ MN TFM TL. Analyzed the data: DB VC TL TFM MN DRT JEP. Contributed reagents/materials/analysis tools: JEP DRT TFM MN. Wrote the paper: DB VC JEP.