

NEM KISSEJTÉS TÜDŐDAGANAT MOLEKULÁRIS HÁTTÉRÉNEK VIZSGÁLATA CISZPLATIN ÉS ERLOTINIB KEZELÉS HATÁSÁRA

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei



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.**

BEVEZETÉS

Nem kissejtes tüdőkarcinóma

A daganatos kórfolyamatok morbiditási és mortalitási adatait szemlélve, elmondható, hogy a tüdő rosszindulatú megbetegedései fordulnak elő a leggyakrabban. Sajnálatos tény, hogy hazánk első helyen áll úgy a tüődaganat előfordulásának, mint a halálzásának tekintetében, mindkét nemre összesítve. A tüődaganatok a légző felület epithéliális sejtrétegéből kialakuló rosszindulatú megbetegedések. Hisztológiai osztályozás alapján két fő csoportot különböztetünk meg, a nem kissejtes (NSCLC) és kissejtes (SCLC) daganatok csoportját. Az SCLC a tüődaganatos esetek 10-15%-át képezi, amely rendkívül agresszív sejtípusú daganat és szinte kizárólag csak dohányzók körében fordul elő. Az esetek döntő többségét (80-85%) azonban az NSCLC csoportjába tartozó daganatok teszik ki. 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.: acinaris, papillaris, mucint termelő szolid forma. Többségében perifériális elhelyezkedésű és korán képez áttétet. A squamózus sejtjes 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. A tüdőkarcinóma kialakulásának kezdeti szakaszában a beteg tünetmentes, a diagnózis felállításakor azonban már legtöbbször előrehaladott, nem operálható állapotú tumor azonosítható. A 2019. évi magyarországi betegadatok alapján az újonnan nyilvántartásba vett betegek 44%-át a legsúlyosabb IV. stádiumban diagnosztizálták.

A tüődaganatok terápiás lehetőségei

A tüődaganatok kezelési lehetőségei napjainkra igen kiszélesedtek, ennek ellenére a gyógyulási és az életben maradási esélyek nagyon csekélyek. A kezdeti stádiumú (I-II) és lokálisan előrehaladott (IIIA) nem kis-sejtes tüődaganatok 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. Az NSCLC első vonalbeli kemoterápiás kezelési standardját jelenleg is a platina alapú kombinált citotoxikus terápia nyújtja. 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 sejtsztódás gátlásához és apoptózishoz vezet. Az elmúlt évtizedekben a molekuláris diagnosztikai módszerek fejlődésének köszönhetően azonban 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. A hagyományos kezelési eljárások mellett új lehetőséget biztosít a molekuláris célzott terápiák alkalmazása a tüdőrák kezelésében. Az adenokarcinómával diagnosztizált betegek esetén a leggyakrabban a KRAS és EGFR mutációi fordulnak elő. Az EGFR mutációval bíró betegek elsővonalbeli kezelésére az erlotinib szolgál a hazai gyakorlatban, amely a tirozin-kináz kompetitív gátlása révén a sejtproliferáció gátlásához és apoptózishoz vezet. Ezzel szemben KRAS mutációra jelenleg még nem rendelkezünk célzott biológiai terápia lehetőségével.

Gyulladásos citokinek szerepe a tumorok kialakulásában

A citokinek olyan szekretált kemotaktikus fehérjék, amelyeknek a sejt-sejt közötti kommunikációban és elsősorban az immunválasz szabályozásában van alapvető szerepük. A citokinek családjába tartozó interleukin-6 (IL-6) egy kis molekulásúlyú glikoprotein. Sokrétű biológiai szerepet öltő, ún. pleiotróp hatása révén elsősorban immunológiai, hematopoetikus, gyulladásos és onkogenetikusan folyamatokban vesz részt. Szerepe van az effektor T-sejtek fejlődésében, az aktivált B-sejteknek antitesttermelő plazmasejtekké való átalakulásában, a CD8⁺ T-sejtek citotoxikus T-sejtekké való differenciálódásában, a csontvelőbe érve a megakariociták érését és a vérlemezkék kialakulását indukálja. 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 metasztatizálás folyamatát. 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. Az IL-6 emeli a tüdő tumorsejteknek a kemoterápiás szerekekkel 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. 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.

ABC transzport 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. A kezelésnek ellenálló daganatsejtek túlélésének egyik oka a csökkenő celluláris gyógyszerfelvétel és egyúttal a gyógyszer aktív kipumpálása a sejtből, amelyet széles, számos esetben átfedő szubsztrátspektrummal rendelkező, energiafüggő drogtranszporterek fokozott kifejeződése segít elő. Ez utóbbi sejtes rezisztencia legfőbb okozója az ABC transzporterek családjába tartozó fehérjék. Eddigi ismereteink szerint az ABCB1, az ABCC1 és az ABCG2 transzport fehérjékről bizonyították, hogy különösen fontos szerepük van a klinikumban megjelenő multidrog rezisztencia kapcsán. 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. Az ABCC5 expresszió növekedése humán embrionális vesesejtvonalban okozott rezisztenciát ciszplatinnal szemben. Előrehaladott NSCLC esetében azt is megfigyelték, hogy az ABCG2 prediktív faktorként szolgál standard platina alapú kemoterápiában. 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. Megfigyelték, hogy az erlotinib képes az ABCB1 és az ABCG2, illetve az ABCC10 transzport fehérjék működését gátolni, amely ezen drogtranszporterek hatóanyag szubsztrátjainak sejten belüli akkumulációját és ezáltal az MDR fenotípus visszafordítását eredményezi.

A fent említett folyamatok további vizsgálata jelentős szerepet tölthet be a kezelés kiváltotta molekuláris mechanizmusok pontosabb megismerésében és a tüdőkarcinóma kezelésének terápiás megoldásaiban.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatómunkám során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- 1. Szolgálhat-e a betegekből nyert tüdődagyanatos szövetminta laboratóriumi feldolgozásával történő in vitro 3D tumormodell felállítására az egyes tüdődagyanat típusok reprezentálására és alkalmas-e a klinikai terápia során alkalmazott hatóanyagok vizsgálatára?*
- 2. Befolyásolja-e a kezelés sorrendje a tumorsejtek kezelésre adott választát és a gyulladási citokinek expresszióját?*
- 3. Megváltoztatja-e az IL-6 jelenléte a tumorsejtek kezelésre adott választát?*
- 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?*

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Betegminták

A humán tüdőkarcinóma minták a Pécsi Tudományegyetem (PTE) Sebészeti Klinikájáról érkeztek és az egyetemi Etikai Bizottság jóváhagyásával kerültek kutatócsoportunkhoz. 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, Pathologiai Intézet).

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-mixben felvettük 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.

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.

Sejtenyésztés

A két- és háromdimenziós sejtenyészetekhez 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 (NHFL; 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 tripánkek festéssel vizsgáltuk Bürker-kamrában.

***In vitro* háromdimenziós (3D) tüdő modell**

A 3D ko-kultúrákhoz humán adenokarcinóma sejt vonalakat, a betegmintákból származó primer tüdő tumorsejteket, valamint primer humán tüdő fibroblasztokat használtunk. A tumorsejtek/sejt vonalak és a primer humán tüdő fibroblasztok 1:1 arányú sejtszuspenziós 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.

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.

Sejt életképességi vizsgálat

A két-, és háromdimenziós ko-kultúrákhoz a primer humán tüdő fibroblasztok tüdőadenokarcinóma sejtvonalakkal, valamint a betegminták feldolgozásából nyert tüdőadenokarcinóma sejtekkel 1:1 arányban összeállított sejtuszpenzióit használtuk. 24 órás inkubálást követően a médiumot leszívtuk a szferoidokról, majd hatóanyag tartalmú médiummal kezeltük meg 48 órás időintervallumban az alábbi hatóanyag koncentrációk alkalmazásával: 100 nM erlotinib, 30 nM ciszplatin, 100 ng/ml IL-6. A kezelés végén 100 µl médiumot a mintákon hagyva 100 µl frissen feloldott CellTiter-Glo® reagenst (Promega, Madison, USA) 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).

RNS izolálás

A mintákat 350 µl 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 DNÁzzal való emésztési lépésben történt. A tisztított minták totál RNS koncentrációját és minőségét Nanodrop UV-VIS spektrofotométer segítségével határoztuk meg (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA).

cDNS szintézis

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

Valós idejű kvantitatív PCR (qPCR)

A cDNS szintézist követően génexpressziós vizsgálatokat végeztünk kvantitatív, valós-idejű polimeráz láncreakció segítségével. A reakcióhoz HighROX

SensiFast SYBR Green Master Mixet (BioLine, London, UK) és génspecifikus primereket használtunk. Az amplifikációt StepOne Plus Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) készüléken végeztük. A mérési adatokat StepOne szoftverrel analizáltuk, háztartási génként humán β -aktint használtunk.

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 tüdőadenokarcinóma sejtvonalak felhasználásával készített háromdimenziós szövettenyészeteken végeztük el a gyári protokoll előírásait követve. Röviden összefoglalva a következő protokollt alkalmaztuk: 50 μ l hígított felülúszót 50 μ l befogó antitest-gyöngy keverékhez adtunk, majd szobahőmérsékleten, sötétben 1 órán keresztül inkubáltuk. 50 μ l 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 μ l 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.

Drogtranszporter 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 tüdőadenokarcinóma sejtvonalak felhasználásával készített háromdimenziós szövettenyészeteket steril 1x PBS-ben átmostuk, majd 1 ml Accumax™ oldattal (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) kezeltük. Az egysejt-szuszpenzió elérése után a sejteket a hígított drogtranszporter inhibitorokkal 37°C-on 5 percig inkubáltuk. Azután a mintákhoz hígított eFluxx-ID® Green festéket adtunk és 37°C-on 30 percig inkubáltuk. A sejtviabilitás 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.

Karcolási sejtvándorlás vizsgálat

Az A549 és PC-9 sejteket 3×10^4 sűrűségben 24-lyukú sejtenyésző edénybe tettünk ki (Corning, New York, USA). Egy éjszaka inkubációt követően a letapadt, konfluens sejtenyészőket 200 μ l-es steril hegygel karcoltuk meg („scratch assay”), szabad felszínt teremtve a sejtek vándorlásához. A sejtekhez friss, 10% FBS-t és a hatóanyagokat - ciszplatin (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.

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 tüdőadenokarcinóma sejteket 25 cm^3 -es sejtenyésző flakóban tenyésztettük 80% konfluens réteg kialakulásáig. Ezt követően 200 μ l nanorészecskéket (NanoShuttle-PL) tartalmazó oldatot tettünk a sejtenyészőhöz, amelyek a sejtmembránhoz kötődve elektrosztatikus úton magnetizálták a sejteket. Egy éjszakán át tartó inkubáció elteltével a sejtenyészőkből egysejt-szuszpenziót készítettünk és $1,2 \times 10^6$ sejtsűrűségben 6-lyukú sejttaszító felülettel rendelkező sejtenyésző lemezre mértük. A lemez tetejére a sejtek lebegését, valamint a sejt közötti állomány (extracelluláris mátrix) kialakulását szolgáló mágnes helyeztünk. 5 órás inkubációt követően a sejteket összegyűjtöttük és 2×10^5 sejtsűrűségben 24-lyukú sejttaszító felülettel rendelkező sejtenyésző 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.

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 egy-utas ANOVA (Bonferroni post hoc) tesztek segítségével. Szignifikáns eredménynek minden esetben a $p < 0.05$ értékeket fogadtuk el.

EREDMÉNYEK

Erlotinib és ciszplatin kezelés hatása primer tüdőadenokarcinóma betegmintákon

A Pécsi Tudományegyetem (PTE) Sebészeti Klinikájáról érkező humán tüdő adenokarcinóma minták laboratóriumi feldolgozásával előállított 3D tumormodellben vizsgáltuk a ciszplatin és az erlotinib kezelés hatását a sejtek életképességére. Kísérleteink során a ciszplatin és az erlotinib kezelés hatására eltérő érzékenység mutatkozott az EGFR és a KRAS mutációval rendelkező betegek tekintetében. A várakozásainknak megfelelően azt tapasztaltuk, hogy az EGFR mutációval rendelkező betegek *in vitro* 3D szöveti modelljében a tumor sejtek nagyfokú érzékenységét mutattak az erlotinibbel történő kezelés hatására. Ezzel ellentétben a ciszplatinnal történő kezelés a vad típusú és a KRAS mutáns minták esetében volt hatásos, drasztikusan csökkentve a sejtek életképességét. A két leggyakoribb mutációs státuszt összehasonlítva eredményeink azt mutatták, hogy az *in vitro* 3D szövetkultúrában végzett kezeléseink eredményei jól korrelálnak a klinikumban tapasztalt gyógyszerhatékonysággal és hogy a betegmintákból felállított 3D tüdőmodellünk alkalmas a klinikai terápia során alkalmazott hatóanyagok vizsgálatára.

IL-6 és IL-8 expresszió primer humán tüdőadenokarcinómában

Primer humán adenokarcinóma mintákon, azon belül KRAS mutáns, EGFR mutáns és vad típusú mintákon valós idejű kvantitatív PCR segítségével vizsgáltuk a pro-inflammatorikus 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.

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

Ezt követően megvizsgáltuk, 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 48 órás 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. 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 fehérjeszekréciót gátolni.

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 irányában 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 kezelésekk előtt. Az IL-6 előkezelés hatására minden kezelési kondíció esetében emelkedett a sejtek életben maradási képessége, szignifikánsan magasabb értékeket ciszplatin monoterápia, ciszplatin követő erlotinib, valamint ciszplatin és erlotinib együttes alkalmazása után tapasztaltunk.

Az IL-6 szerepe a multidrog rezisztenciában

A fent leírt kísérleteink szerint az IL-6 minden kezelési kondíció esetén indukálja a sejtek életben maradási képességét, így a tumorsejtek túlélésének pozitív regulátora. Ezen belül vizsgáltuk annak a kérdését, hogy a tumorsejtek életképessége összefüggésbe hozható-e a drogranzporter fehérjék megemelkedett szintjével és aktivitásával. Irodalmi adatok egyértelműen összekapcsolják, hogy a multidrogtranszporter fehérjék tumorsejteken való kifejeződése hozzájárul a multidrog rezisztencia jelenségéhez, amely csökkenti a daganatok kemoterápiás kezelésének hatékonyságát. Az EGFR mutáns *in vitro* 3D tüdőmodelleket (PC-9-NHLF) humán rekombináns IL-6 előkezelésnek vetettük alá a hatóanyag kezelésekk előtt és három, a hatóanyagok efflux folyamatában szerepet játszó molekula, az ABCG2, az ABCC1 és az ABCC5 mRNS szinten történő kifejeződését vizsgáltuk. IL-6 előkezelés hatására az ABCG2 és az ABCC1 szintjében minden kezelési kondíció esetén emelkedést tapasztaltunk, míg az ABCC5 csökkenő tendenciát mutatott. 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 kezelésekk azonban az ABCG2 fokozott aktivitását mutatták. Ezzel szemben az ABCC1 aktivitása kismértékben csökkent a kezeletlen kontrollhoz képest.

Gyulladásos citokinek szerepe a sejt migrációban

A gyulladásos citokinek jelenléte fontos szerepet tölt be a progresszióra és metasztázisra hajlamosító környezet megteremtésében. Így vizsgálatainkat tovább folytattuk abban az irányban, hogy a citokinek jelenléte befolyásolja-e a tumorsejtek migrációját a kezelésekk együtt, valamint önállóan alkalmazva. A KRAS mutációval rendelkező A549-es sejt vonal 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 irányában végzett kísérleteink során hasonló migrációs mintázatot tapasztaltunk, mint az IL-6

esetében. Az IL-8 ciszplatinnal együtt történő alkalmazása szignifikánsan növelte a tumorsejtek migrációját. A tumoros eredetű tüdőepithél sejtek migrációja azonban rekombináns IL-6 kezelés hatására nagyobb mértékben nőtt összehasonlítva az IL-8 kezeléssel. Az EGFR mutációt mutató 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 a lelassítani a résösszezáródást, de IL-6 és IL-8 jelenlétében nagyobb migrációt eredményezett.

TÉZISEK

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

Az *in vitro* vizsgálatok biológiai modelljét sokáig a kétdimenziós ún. egyrétegű („monolayer”) sejt kultúrák jelentették, azonban a sejt-, és szövettenyésztési technikák fejlődésével egyre nagyobb teret hódít az új, háromdimenziós 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 tumorelleses 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 szekréciót gátolni. Ez a megfigyelés a kezelési sorrend kiemelt szerepét hangsúlyozza, amely hozzájárulhat a tumorsejtek migrációjának és ezáltal a metasztázisképzés gátlásához.

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

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 drogranzporter 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 génexpressziós változások mellett a funkcionális vizsgálatainkban az IL-6 önmagában alkalmazva ugyan csökkentette az AGCG2 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 közeli mikroöregényezet 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 metasztázisképzésben?

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.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

Összesített impakt faktor: 14,497

Dolgozat alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: 5,691

A dolgozat 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.

IF: 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.

IF: 3,534

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

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.

IF: 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.

IF: 3,751

Egyetemi jegyzet

1. György Z Miskei, Judit Rapp, **Edit Kiss**, Tamás Kovács, Judit E Pongrácz: Basic and Complex Cell and Tissue Culture Techniques for Biotechnology Students University of Pecs, www.medbiotech.com; 2014 PTE

A dolgozat alapjául szolgáló konferencia poszterek

1. **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.
2. **Edit Kiss**, Domokos Bartis, Veronika Csongei, Tamas Kovacs, Monika Avdicevic, Judit Rapp, Krisztian Kvell, Judit E. Pongracz: Wnt signalling in non-small cell lung cancer. 2nd International Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, 2013. szeptember 11-12.
3. **Edit Kiss**, Veronika Csongei, Monika Avdicevic, Krisztian Kvell, Judit E. Pongracz: The effect of cisplatin treatment on the Wnt microenvironment of the human lung. BIT's 2nd Lung Cancer Summit, Róma, 2013. december 4-5.
4. **Fülöpné Kiss Edit**, Csöngői Veronika, Avdicevic Mónika, Kvell Krisztián, Pongrácz Judit Erzsébet: Cisplatin kezelés hatásának vizsgálata humán tüdőszöveti mikrokörnyezetben. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV. Kongresszusa, Budapest, 2014. április 10-12.
5. **Edit Kiss**, Monika Avdicevic, David Ernszt, Judit Rapp, Judit E. Pongracz: Comparative analysis of cisplatin treatment in *in vitro* 3D lung microtissue and monolayer cell cultures. ERS International Congress, Amsterdam 2015. szeptember 26-30.
6. **Kiss Edit**, Mohamed Mahmoud Abdelwahab Elhousseiny, Perjési Pál, Pongrácz Judit Erzsébet: Cisplatin, erlotinib és az (E)-2-(4-metoxibenzilidén)-1-benzoszuberon hatásának vizsgálata humán tüdő adenokarcinómában. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, XVI. Kongresszusa, Debrecen, 2020. szeptember 10-12.

A dolgozat alapjául szolgáló kongresszusi előadások jegyzéke

1. **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

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 volt és jelenlegi 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 kisfiúmnak, Zsoltinak, aki az elmúlt hónapokban a dolgozat megírására ösztönzött.