Prediktív és prognosztikus molekuláris markerek szolid daganatokban

Doktori tézisek

Dr. Brauswetter Diána

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Peták István, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Törőcsik Beáta, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Tátrai Péter, Ph.D., szenior kutató

Szigorlati bizottság
elnöke: Dr. Tretter László, D.Sc., egyetemi tanár
tagjai: Dr. Csermely Péter, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Reményi Attila, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2017

1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben szemléletváltás következett be a daganatterápiában. A Human Genom Projekt betekintést engedett az emberi örökítőanyagba és egyre több betegség, többek között a rosszindulatú daganatok esetében is megkezdődött a genetikai háttér felderítése. Ez a folyamat lehetővé tette, hogy daganat alcsoportokban specifikus célpontokat definiálhassunk, és azokat gátolva érhessünk el nagyobb hatékonyságot a daganatkezelésben. Ezeket az egy vagy néhány fehérjét nagy specificitással gátló kezelőszereket nevezzük célzott terápiás ágenseknek. A daganat alcsoportok azonban ritkán követik az anatómiát, hisztológiát, inkább egyéb biomarkereken (mutáció, expresszió, génkópiaszám változás), tehát a daganat molekuláris hátterén alapulnak. Az utóbbi években a klinikai vizsgálatok tervezésében is hasonló eltolódást figyelhetünk meg. A szövettani diagnózison, elhelyezkedésen alapuló vizsgálatok mellett lassan teret hódítanak a molekuláris biomarker alapú, úgynevezett genotípushoz illesztett („genotype matched”) klinikai vizsgálatok, amelyben a beválasztott betegek túlélése szignifikánsan jobbnak bizonyult, mint a hagyományos anatómiai/hisztológiai alapon besorolt társaiké. Emellett megjelentek a retrospektív mellett prospektív, biomarker analizáló kutatások is, ahol a betegség kimenetele mellett a daganatok minél részletesebb analízise is célja a klinikai vizsgálatnak.

Kutatásaink során a magyar rákstatisztikában megfigyelt gyakoriságuk, illetve hazánkban kiemelkedően rossz incidencia és mortalitás adataik alapján fej-nyaki és hasnyálmirigy daganatokat vizsgáltunk.

Mindkét vizsgált daganattípus esetén elenyésző az engedélyezett, klinikai használatban lévő tirozin-kináz gátlószerek száma. A hasnyálmirigy adenokarcinómák kezelésére engedélyezett erlotinib EGFR-gátlószer nem hozott áttörést a terápiában, melyben szerepe lehet az ezekben a daganatokban rendkívül gyakran (70-90%-ban) jelen lévő és rezisztenciát okozó KRAS mutációnak. A KRAS ideális célpont lehetne, de gátlása jelenleg csupán indirekt módon lehetséges, például MEK-inhibítorokkal. Ezek a kezelőszerek azonban szintén nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket, csak a betegek kis hányadában okoztak remissziót illetve ezek betegek kiválasztására sem rendelkezünk megfelelő molekuláris markerekkel. A MEK-inhibítorok hatástalansága egy feedback mechanizmussal magyarázható, mely az EGFR/PI3K/Akt útvonal irányába tereli a jelátvitelt. Fej-nyaki daganatok esetében az egyetlen klinikai használatban lévő kinázellenes kezelőszer a cetuximab EGFR-ellenes monoklonális antitest. Hatásának előrejelzésére jelenleg nem rendelkezünk megfelelő prediktív

biomarkerrel. Emellett lokalizáció specifikus, és az ebben a tumortípusban gyakori HPV-pozitivitással összefüggő molekuláris markerek egyaránt hozzájárulnának ahhoz, hogy molekuláris alcsoportokat elkülönítve hatásosabb, kisebb toxicitással járó terápiás hatóanyagokat alkalmazhassunk. Célpontként szóba jöhet az EGFR mellett a PIK3CA, MET, Src fehérje is, melyek mutációja illetve túltermelődése gyakran megfigyelhető ezekben a daganatokban.

A beteget és a daganatot minél jobban megismerve, genetikai hátterüket minél alaposabban tisztázva lehetővé válik a legmegfelelőbb, személyre szabott daganatellenes kezelés kiválasztása.

2. Célkitűzések

Kutatásunk során archivált (formalin-fixált, paraffinba ágyazott, FFPE) daganatos szövetmintákat vizsgáltunk, mely lehetőséget nyújtott a daganatokban előforduló DNS/mRNS/fehérje szintű elváltozások pontosabb megismerésére. Segítségükkel meghatározhattuk a különböző lokalizációjú daganatok genetikai hátterét, feltárhattuk a lehetséges célpontokat, amik akár egy fej-nyaki vagy hasnyálmirigy tumorban - tehát lokalizációtól függetlenül is- azonosak lehetnek. A daganatos sejtvonalakon végzett in vitro kísérletek segítségével pedig vizsgálhattuk a talált célpontok gátlásának terápiás hatását.

Célkitűzéseink a következők voltak:

1. **Archivált FFPE szövetminták vizsgálata** DNS/fehérje szinten a lehetséges molekuláris markerek irányába, melyek potenciális célpontok vagy prognosztikus illetve prediktív markerek lehetnek a daganatterápia során. **Fluoreszcens in situ hibridizációs módszert alkalmazva kívántuk vizsgálni a *PIK3CA* és *MET* gének kópiaszám változását. Emellett célul tűztük ki a p16^{INK4}-immunhisztokémia és a HPV DNS-alapú detektálásának összehasonlítását, prognosztikus értékének vizsgálatát.**

2. **Sejtvonalak tanulmányozása**, genetikai hátterük pontos elemzése és használata a lehetséges tirozin-kináz gátlószeres kezelések hatásának modellezésére. **Célul tűztük ki a használt sejtvonalakban előforduló mutációk meghatározását új-generációs szekvenálással. Vizsgálni kívántuk a fehérjeexpressziót és a jelátviteli útvonalak aktivitását.**

3. **Molekuláris biomarkereken alapuló alcsoportok meghatározása**, amelyben egy-egy kezelőszer vagy kezelőszer kombináció kiemelkedően jó hatásprofillal rendelkezik illetve a hatás- illetve rezisztencia mechanizmusok feltárása. **Életképesség vizsgálatokkal kívántuk meghatározni a sejtvonalak kezelőszer-érzékenységét. Rezisztencia esetén a mechanizmus feltárását, kombinációs kezelések kidolgozását tűztük ki célul.**

3. Módszerek

Szövettani mintákon alkalmazott módszerek

Adatgyűjtés, betegek

Kutatásunk során két fej-nyaki daganatos kohrsz állt rendelkezésünkre. Az első kohorsz betegeit a Jahn Ferenc Dél-pesti kórház fül-orr-gégészeti osztályán 2000 és 2008 között fej-nyaki laphámrák miatt kezelték, számuk 152 fő volt. A második kohorsz fej-nyaki daganatos esetei a Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikájáról származtak és 124 beteg szövettani mintái kerültek feldolgozásra.

A hasnyálmirigy daganatos betegek új-generációs és Sanger szekvenálási adatai az Oncompass Medicine Kft. adatbázisából származtak. 2012 és 2016 között 138 hasnyálmirigy daganatos szövetminta vizsgálata történt meg.

Szövettani vizsgálatok

Mindkét fej-nyaki daganatos kohorsz szövetmintáiból 7-7 darab úgynevezett TMA-blokkot készítettünk. Az ezekből készített metszeteken immunhisztokémiai (IHC) festéseket (p53, $p16^{INK4}$, EGFR, Ki-67, connexin 43) és fluoreszcens in situ hibridizációs vizsgálatot (*PIK3CA* + 3-as centromer és *MET* + 7-es centromer kettős festés) végeztünk.

A metszeteket a festéseket követően digitalizáltuk és a szövettani kiértékelést számítógéppel, Panorami Viewer programmal (3DHISTECH) végeztük. A Ki-67, p53 és connexin 43 IHC esetében a festődő sejtek aránya alapján négy kategóriát különítettünk el: I: <5 %, II: 6-20%, III: 21-60%, IV: >61%. A $p16^{INK4}$ festés esetében 75% feletti homogén sejtmag illetve citoplazma festődés esetén minősítettük pozitívnak a szövetmintát. Az EGFR IHC kiértékelése során a festődő sejtek aránya mellett annak intenzitását is figyelembe vettük (négyfokú skálán) és a két tényező szorzata alapján három kategóriát különböztettünk meg: I: 0-200, II: 201-300, III: 301-400. A fluoreszcens in situ hibridizációs vizsgálat során a kategóriák kialakítása a Cappuzzo-féle kritériumrendszert alapul véve történt. Ez a besorolási módszer a gén és krómoszóma specifikus jelek alapján normál génállományú, triszómiás, poliszómiás és amplifikált kategóriákat különít el.

HPV (humán papillomavírus)-genotipizálás

A 2. kohorsz esetében HPV genotipizálást is végeztünk. Ehhez az előzetes vizsgálatunk során $p16^{INK4}$-pozitívnak bizonyult FFPE mintákból DNS-t izoláltunk.

A magas-kockázatú HPV DNS kimutatását CONFIDENCE™ HPV teszt felhasználásával és HPV16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 genotipizálással a NEUMANN Diagnostics cég végezte el.

Statisztika

A statisztikai analízis IBM SPSS Statistics szoftverrel történt. A túlélés vizsgálatára Kaplan-Meier analízist használtunk log-rank teszttel és Cox-regresszió analízist. Az összefüggések vizsgálatára χ^2-probát, Fisher-féle egzakt tesztet használtunk Monte Carlo szimulációval. Az összefüggéseket szignifikánsnak tekintettünk, amennyiben a p-érték 0,05 alattinak bizonyult.

In vitro módszerek

Sejttenyésztés

Három hasnyálmirigy daganatos sejtvonalat (MiaPaCa2, BxPC3 és Panc) és két fej-nyaki daganatos sejtvonalat (FaDu és Detroit 562) használtunk in vitro kísérleteinkhez. A sejtvonalak az ATCC sejtbankjából származtak és az általuk megszabott médiumban és körülmények között tenyésztettük őket.

DNS izolálása sejtvonalakból és új-generációs szekvenálás

A daganatos sejtvonalakból történő DNS kinyerésére azonos módszert alkalmaztunk, mint ahogy tumoros szövetminták esetén szokásos. A sejtekből DNS-t izoláltunk, majd Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 felhasználásával DNS-könyvtárat készítettük. Ez a multiplex PCR alapú célpont dúsítás („target enrichment”) 50 gén 207 génfragmentumának vizsgálatát teszi lehetővé. Az így kapott szekvenciákra úgynevezett „vonalkód” szekvenciákat ligáltunk, mely lehetővé teszi a különböző mintákból származó könyvtárak egyszerre történő szekvenálását. A könyvtárak tisztítást követően a Ion 318 Chipen Ion PGM készülékkel kerültek szekvenálásra Sequomics Kft. laboratóriumában. Az átlagos mintánkénti leolvasások száma 200.000 vagy afeletti volt. Végül előforduló génvariánsok listázásra kerültek.

Tirozin-kináz inhibítorok

Munkánk során főként az FDA által már engedélyezett, klinikai használatban lévő szereket, esetleg fázis III klinikai vizsgálatban lévő tirozin-kináz gátlószereket használtunk. Az alkalmazott kezelőszerek az EGFR (HER-receptorcsalád) gátlószerei: afatinib, erlotinib, MEK-inhibítorok: trametinib, refametinib, PD0325901, selumetinib, Akt-gátlószer: triciribine, Src- inhibítor: dasatinib voltak.

Életképesség mérések

A mérés 96 lyukú steril sejttenyésztő lemezen történt. A sejteket 24 órán át hagytuk letapadni, majd monoterápia esetén 5 µM-os vagy kombinációs terápia esetén 5+5 µM-os maximális koncentrációról indítva csökkenő koncentrációjú kináz-inhibítorral illetve inhibítorokkal kezeltük meg. 72 óra inkubáció elteltével a sejtek életképességét CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay segítségével állapítottuk meg. A görbék illesztése GraphPad Prism version 7.00 for Mac szoftverrel történt.

Gyógyszer-szinergizmusok vizsgálata (Compusyn)

A lehetséges gyógyszer szinergizmusokat és az 50%-os effektív dózisnál (ED) definiált kombinációs indexeket (CI) Compusyn programmal állapítottuk meg. A program által generált kombinációs indexek 1-es érték alatt gyógyszer szinergizmust jelölnek. Leginkább additív hatást jelent a 0,75 és 1 közötti CI érték, míg efelett antagonizmusról beszélünk. Kutatásunk során állandó (1:1) arányban alkalmazott hatóanyag kombinációkat használtunk.

Western blot vizsgálat

A fehérjeexpresszió és foszforiláció vizsgálata során a sejteket letapadást (24 óra) követően, inhibítoros kezelés esetén 4/6 órás inkubációs idő után lízis pufferbe kapartuk fel. A fehérjekoncentrációt Bradford módszerrel határoztuk meg.A lizátumokat 13000 *g*-n, 4°C-on 15 percig centrifugáltuk. Az SDS-PAGE-re 5-30 µg fehérjét vittünk fel és PVDF membránra juttattuk át elektrotranszfer módszerrel.A vizsgált fehérjék a következők voltak: EGFR, pTyr1068EGFR, MET, pTyr1234/1235 MET, HER2, pTyr1221/1222HER2, HER3, pTyr1289HER3, Akt, pSer473Akt, ERK ½, pThr202/Tyr204 ERK ½, Src, pTyr416Src, connexin 43, α-tubulin. Az eredményt Enhanced Chemiluminescence (ECL) módszerrel dekektáltuk és ImageJ v1.48 szoftverrel kvantifikáltuk.

Fluoreszcens immuncitokémia

A sejteket fedőlemezekre növesztettük és 4%-os pufferelt formalin oldattal fixáltuk. Ezt követően 0,1%-os Triton-X oldattal 10 percig permeabilizáltuk őket. Connexin 43, α-tubulin elsődleges és Alexa-Fluor 488, Alexa-Fluor 546 fluoreszcens másodlagos kettős festést végeztünk, végül a sejtmagokat DAPI alkalmazásával tettük láthatóvá. Fluoreszcens mikroszkóppal reprezentatív felvételeket készítettünk.

4. Eredmények

Prediktív és prognosztikus biomarkerek vizsgálata fej-nyaki daganatokban

A PIK3CA és MET CNG prognosztikai szerepe

A Cappuzzo-féle kritériumrendszert alapul véve a gén- és centromerspecifikus jelek alapján 6 kategóriát különítettünk el és Kaplan-Meier analízissel összehasonlítottuk a csoportok prognózisát. A grafikonon a többitől szignifikánsan elkülönülve futott a *PIK3CA* amplifikációval és magas poliszómiával rendelkező esetek túlélési görbéje, mely betegcsoportok szignifikánsan rosszabb prognózissal rendelkeztek, mint a többi csoport betegei. A *MET* gén esetében kutatásunk során nem találtunk valódi génamplifikációt, de a magas poliszómiás kategóriába sorolt betegek mellett az alacsony poliszómiával rendelkezők esetében is szignifikánsan kedvezőtlenebb prognózist igazoltunk a többi csoporthoz képest.

Megfigyeléseinket alapul véve a génstátusz prognosztikai szerepe alapján két csoportot különítettünk el. A *PIK3CA* gén esetében a magas poliszómiával és az amplifikációval rendelkező eseteket neveztük magas kópiaszámúaknak (copy number gain, CNG), míg a *MET* gén esetében a magas poliszómiával rendelkező esetek mellett az alacsony poliszómiával rendelkezőket is ebbe a kategóriába soroltuk.

Szignifikáns összefüggést találtunk a *MET* és *PIK3CA* génstátusz és a betegségspecifikus túlélés között. A normál génstátusszal rendelkező (CNG nélküli) betegek esetében szignifikánsan hosszabb túlélést, kedvezőbb prognózist állapítottunk meg. (MET: 31 vs.. 19 hónap; p=0,013 és PIK3CA: 23 vs.. 16 hónap; p=0,037)

PIK3CA CNG összefüggése a p16^{INK4}-státusszal

Szignifikáns összefüggést találtunk az alacsony p16^{INK4} –expresszió és a *PIK3CA* CNG között (p=0,036), míg a *MET* gén esetében ugyanez az összefüggés nem adódott szignifikánsnak. Ez a megfigyelés utalhat arra, hogy a HPV-negatív daganatok a *PIK3CA* gént gyakrabban sokszorosítják fel, mint a HPV infekcióval rendelkezők.

A PIK3CA és MET CNG összefüggése a betegek klinikopatológiai paramétereivel

χ^2próba és Fisher-egzakt teszt használatával elemeztük az összefüggést a klinikopatológiai paraméterek (tumor stádium, grade, lokalizáció, TNM) és a vizsgált gének kópiaszám változása között.

Nem találtunk szignifikáns összefüggést a négy major lokalizáció és a vizsgált genetikai elváltozások között, habár az algarat esetében tendencia mutatkozott (p=0,09), gyakoribb volt a kópiaszám emelkedéssel rendelkező betegek száma a többi lokalizációhoz képest. A gége régió daganatai közül a glottikus daganatok esetében szignifikánsan kevesebb *PIK3CA* és *MET* CNG-s esetet találtunk, mint a supraglottikus daganatok esetében (Fisher-féle egzakt teszttel vizsgálva PIK3CA p=0,036; for MET p=0,033)

$p16^{INK4}$-státusz lokalizációbeli különbségei és prognosztikai jelentősége

Az 1. kohorsz betegeit is tartalmazó, de annál nagyobb esetszámú, korábbi kutatásunk során szignifikáns összefüggést találtunk a betegek túlélése és a $p16^{INK4}$-státuszuk között. A $p16^{INK4}$-pozitív betegek szignifikánsan jobb medián túléléssel rendelkeztek, mint a $p16^{INK4}$-specifikus immunreakcióval nem festődő tumorral rendelkezők (55 vs. 20 hónap, p=0,0049).

A 2. kohorszban a betegek 17,3%-a bizonyult $p16^{INK4}$-pozitívnak. A legmagasabb arányú pozitivitást a szájgarat tumorai között tapasztaltuk, míg a többi régió daganatai alacsonyabb arányban (gége: 4,8%, algarat: 4,2%) vagy egyáltalán nem (szájüreg: 0%) tartalmaztak $p16^{INK4}$-pozitív daganatmintát. A lokalizációbeli eltérések szignifikánsnak bizonyultak (p<0,001). Amikor a prognosztikai analízis során az összes elhelyezkedést vizsgáltuk, az első publikációnk eredményeivel ellentétben nem találtunk szignifikáns eltérést a $p16^{INK4}$-festett és $p16^{INK4}$-negatív daganattal rendelkező személyek betegségspecifikus túlélésében (17,5 vs.. 30,3 hónap, p=0,107). A szájgarat daganatait vizsgálva ugyanakkor szignifikáns különbséget állapítottunk meg. A $p16^{INK4}$-pozitív szájgarati daganatok esetén szignifikánsan jobb prognózist találtunk a $p16^{INK4}$-negatív esetekhez képest (30,3 vs. 8,8 hónap, p<0,001). Nem találtunk összefüggést a daganatok $p16^{INK4}$-kifejeződése és a T, N és M státusz, stádium, hisztológiai differenciáltsági fok és a beteg kora között.

A HPV-sátutsz prognosztikai szerepe és a $p16^{INK4}$-festés specificitása ennek előrejelzésére

A 19 $p16^{INK4}$-pozitív esetből 9 beteg daganatmintájában tudtuk kimutatni a kórokozót (HPV-pozitív esetek), melyből 8 esetben a leggyakoribb HPV 16-os, egy esetben a 33-as altípusa volt jelen. Minden HPV-pozitív minta a szájgarati régióból származott. Ez 21,4%-os HPV-pozitivitási arányt jelent ebben a régióban. A $p16^{INK4}$-festés HPV-pozitivitást prediktáló specificitása a szájüregi régióban is csupán 56,3%-nak adódott, ami a szakirodalmi adatoknál alacsonyabb.

A HPV-pozitív szájgarati tumorral rendelkező betegek betegségspecifikus túlélése szignifikánsan jobb volt, mint a HPV-negatív esetekben (25,9 vs. 9,5 hónap, p=0,024).

A dohányzás etiológiai szerepe a p16^{INK4}-pozitív páciensek körében

Mivel igen nagy arányban figyeltünk meg HPV-negatív eseteket a p16^{INK4}-immunhisztokémiával pozitivitást mutató minták között, megvizsgáltuk a dohányzási szokásokat a p16^{INK4}-pozitív betegek esetében HPV-pozitív és HPV-negatív alcsoportokra bontva őket. Érdekes módon a HPV-pozitív betegek körében nem találtunk a felmérés pillanatában is dohányzó egyént és 55,4%-uk betegtörténetében nem is fordult elő ez a tényező. Máshonnan megközelítve a HPV-negatív betegek 67,7%-a a vallotta magát a kérdőív kitöltésekor is dohányzónak, míg mindössze 7% volt, aki sosem dohányzott. A csoportok között tapasztalt különbség szignifikáns volt a dohányzás tekintetében (Fisher-féle egzakt teszt: p=0.002).

Emellett érdekes módon nem találtunk szignifikáns estérést a p16^{INK4}-pozitív daganattal rendelkező betegeket vizsgálva a HPV-asszociált és HPV-negatív esetek túlélésében. Ez szintén utalhat arra, hogy a kiváltó tényezőtől, mechanizmustól függetlenül (hogy az HPV-fertőzés vagy egyéb mutációk, epigenetikai tényezők hatására történik) a p16^{INK4} –expressziója a prognózist meghatározó tényező.

Fej-nyaki daganatos sejtvonalak molekuláris háttere és tirozin-kináz inhibítor érzékenységük közötti összefüggés

Western blot analízissel elvégeztük a FaDu és Detroit 562 sejtvonalak fehérjeexpressziós és foszforilációs vizsgálatát. A legjelentősebb különbség a MET-expresszióban és még inkább a MET-aktivitásában adódott, ami a Detroit 562 esetében volt jelentősebb.

A kis molekulasúlyú, tirozin-kináz inhibítoros kezelés során a dasatinib kezelés tekintetében a Detroit562 sejtvonalon majdnem egy nagyságrenddel kisebb IC_{50}-koncentrációt mértünk, míg az afatinib kezelés során csupán kisebb szenzitivitásbeli különbséget tapasztaltunk. A két kezelőszer kombinációja mindkét esetben szinergista hatást ért el, azonban ez a Detroit 562 esetében nem jelentett jelentős dózisredukciót a dasatinib monoterápiához képest. Amikor megvizsgáltuk az EGFR fehérje foszforilációjának változását dasatinib kezelés hatására a FaDu sejtvonalon, azt figyeltük meg, hogy a relatív EGFR-foszforiláció átlagosan közel duplájára nőtt, míg a Detroit 562 esetében ez a változás nem volt jelentős. Azt feltételezzük, hogy a HER-család minden tagját jelentős mértékben expresszáló

FaDu esetében emiatt a visszacsatolás miatt tapasztalunk szinergista hatást a két kezelőszer között kombinációban alkalmazva. A dominánsan MET-függő Detroit 562 esetén a visszacsatolásnak nincs mérvadó szerepe, a dasatinib monoterápia önmagában célravezető lehet. A monoterápia sikere az Src fehérje MET aktiváló képességében keresendő, míg a FaDu esetében a MET-receptor blokádja a jelátviteli utak átrendeződésén keresztül az EGFR-irányába tereli az aktivitást.

A connexin 43 foszforilációja és membrán lokalizációja kezelőszerek hatására

Megvizsgáltuk a korábbi munkánk során prognosztikus értékűnek ítélt connexin 43 fehérje expresszióbeli és foszforilációs változását a FaDu fej-nyaki daganatos sejtvonalon dasatinib és afatinib kezelőszerek esetében. Ennek során azt találtuk, hogy a kontroll és a dasatinibbel kezelt sejtek esetében a totál-connexin 43 fehérjérespecifikus jel felett két másik is jelen van (P1 és P2), míg az afatinib esetében ezek a jelek eltűnnek és csupán a foszforilálatlan fehérje van jelen a mintában. A vizsgált foszforilációs helyek többek között az Akt-fehérje célpontjai. Western-blot analízisünk során azt találtuk, hogy az afatinib teljesen legátolja az Akt fehérjét, míg a dasatinib kezelést követően az Akt továbbra is számottevő aktivitást mutat. A tapasztalt foszforilációs változás tehát az afatinib kezelőszer Akt-gátló hatásának tudható be.

Korábbi publikációk igazolták, hogy a connexin 43 csökkent foszforilációja esetén kevesebb fehérje helyeződik ki és stabilizálódik a membránban. Fluoreszcens immuncitokémiát végeztünk a connexin 43 fehérje membránba helyeződésének vizsgálatára afatinib és dasatinib kezelés alkalmazásakor. Azt tapasztaltuk, hogy a fluoreszcens mikroszkópos felvételeken a kontroll és dasatinibbel kezelt sejtminták esetében több connexin 43 plakk látható, mint az afatinibbel kezelt sejtek esetében.

Prediktív biomarkerek vizsgálata hasnyálmirigy daganatokban

Hasnyálmirigy daganatos páciensek és sejtvonalak NGS eredményének vizsgálata

A 138 vizsgált DNS-szekvenálási reakció mindegyikében megtörtént a KRAS onkogén leggyakrabban előforduló (hotspot) mutációinak vizsgálata. A vizsgált esetek háromnegyedében igazolódott a mintában KRAS mutáció jelenléte. A leggyakoribb elváltozás a 2-es exon 12-es kodonjának glycin/aszparaginsav cseréje volt (G12D, 43/138), ezt követi a valin (G12V) és az arginin (G12R) míg 2/138 daganat glycin/cisztein (G12C) aminosavcserét hordozott.

A három vizsgált sejtvonalon elvégzett új-generációs szekvenálási reakció eredményeként a következő mutációk igazolódtak: MiaPaCa2 (homozigóta

mutáció KRAS G12C, TP53 R248W, NOTCH1 L2457V), Panc1 (homozigóta mutáció a TP53 R273H és heterozigóta mutáció KRAS G12D), BxPC3 (homozigóta mutáció TP53 Y220C és KDR Q472H). A főbb drivereket érintő mutációs mintázat alapján a használt sejtvonalak a vizsgált betegek 44,4%-át reprezentálják.

A sejtvonalak KRAS mutációja és MEK-inhibítor érzékenysége közötti összefüggés

In vitro modellünkben a MiaPaCa2 sejtvonal kiemelkedően nagy érzékenységet mutatott a MEK-gátlószerekkel szemben, míg a Panc1 sejtvonal esetében az általunk használt MEK-inhibítorok hatástalannak bizonyultak. A BxPC3 sejtvonalon a kezelőszereknek a MiaPaCa2 sejtvonalnál tapasztaltnál valamivel gyengébb hatása volt. A legalacsonyabb IC_{50} koncentrációt akkor tapasztaltuk, mikor a sejteket trametinib kezelőszerrel inkubáltuk. A MiaPaCa2 sejtvonalon tehát a trametinib már monoterápiában is erősen daganatellenes, akár klinikumban alkalmazható hatást produkál.

A jobb hatás elérése és a toxicitás esetleges csökkentése érdekében a legjobb hatásfokú trametinibet a BxPC3 és Panc1 sejtvonalakon EGFR-inhibítorral (afatinib) kombináltuk. A dózisredukció mellett szinergista hatást értünk el a KRAS vad típusú BxPC3 sejtvonalon, míg a Panc1 esetében csupán additív volt a két kezelőszer együttes hatása. Emellett megvizsgáltuk a trametinib hatását triciribine Akt-inhibítorral kombinálva is. A két kezelőszer együttes alkalmazása mind a BxPC3, mind a Panc1 sejtvonalon szinergista hatást ért el. Azonban a szinergista hatás ellenére sem sikerült a Panc1 sejtvonal esetében in vivo tolerálható kezelőszer koncentrációt elérni.

A hasnyálmirigy daganatos sejtvonalak tirozin-kináz inhibítor érzékenysége molekuláris altípus függő

Western blot analízissel megvizsgáltuk a sejtvonalak fehérjeexpresszióját és aktivitását. A BxPC3 esetében jelentős EGFR expressziót és aktivitást tapasztaltunk, az ERK aktivitása a MiaPaCa2 esetében volt legszembetűnőbb, míg a Panc1 esetében kiemelkedően aktív Akt jelpálya igazolódott.

A MiaPaCa2 sejtvonal genetikai háttere szerencsés mutációs és expressziós együttest hordoz. A KRAS G12C mutáció főként a MEK/ERK jelpályát aktiválja és az extrém alacsony EGFR expresszió/aktiváció elhanyagolható visszacsatolásos Akt aktiváláshoz vezet a trametinib kezelést követően. Így esetében a trametinib monoterápia elegendő.

A Panc1 sejtvonal esetében a PI3K/Akt jelpálya jelentős aktivitásával érthetővé válik, hogy ebben az esetben a trametinib egyedül a triciribine Akt-inhibítorral együttesen alkalmazva ér el szinergista hatást.

A BxPC3 sejtvonal nem hordoz KRAS mutációt. Esetében a MEK/ERK és PI3K/Akt jelpálya hasonlóan fontos, de kiemelkedő EGFR aktivitása miatt a MEK-ERK-EGFR negatív visszacsatolási kör fontos szerephez jut. Így a MEK-gátló trametinib alkalmazásakor az EGFR foszforilációja megnő, átterelve a jelátviteli folyamatot a EGFR-PI3K-Akt jelpályára. Ebben az esetben tehát mindkét kombinációval dózisredukció érhető el.

Ezt követően Western blot analízissel megvizsgáltuk a trametinib kezelőszer EGFR-Akt útvonalra gyakorolt hatását a feltételezett visszacsatolási mechanizmuson keresztül. Hipotézisünkkel egybecsengő módon a MiaPaCa2 és Panc1 sejtvonalak esetében nem találtunk változást az Akt fehérje aktivitásában a kontroll mintához képest. Ezzel szemben az aktív EGFR fehérjét túltermelő BxPC3 sejtvonal kiemelkedően magas Akt aktiválódással reagált ugyanezen kezelésre.

5. Következtetések

1. A *PIK3CA* és *MET* génkópiaszám emelkedés (CNG) jelenléte lehetséges célpontként szolgál tirozin-kináz gátlószeres kezelésre. Szerepe van emellett a daganatok primer és szekunder inhibítorral szembeni rezisztenciájának megjelenésében is. Eredményeink alapján a két vizsgált gén kópiaszám emelkedése gyakori fej-nyaki daganatokban, így használatuk biomarkerként vagy célpontként a terápiában megfontolandó.
2. A *PIK3CA* és *MET* kópiaszám emelkedés prognosztikus jelentőséggel bír fej-nyaki daganatokban. Mind a *PIK3CA,* mind a *MET* CNG jelenléte szignifikánsan kedvezőtlenebb betegségspecifikus túléléssel társul ezen daganattípus esetében.
3. A *PIK3CA* CNG és a $p16^{INK4}$-expresszió között szignifikáns összefüggés áll fenn. Az alacsony $p16^{INK4}$-expresszióval rendelkező daganatok esetében gyakoribb volt a PIK3CA génkópiaszám emelkedése. A $p16^{INK4}$-expressziót indirekt a HPV-markerként alkalmazva ez az eredmény azt jelentheti, hogy a *PIK3CA* CNG HVP-negatív tumorokban nagyobb jelentőséggel bír. Mivel több azirányú törekvés is van a klinikumban és a kutatásban, hogy a HPV-státusszal összefüggő molekuláris markereket keressünk és ennek megfelelően molekuláris altípusokat határozzunk meg, eredményünk hozzájárulhat az alcsoportok pontosabb karakterizálásához.
4. A daganat *MET* kópiaszáma és EGFR-expressziója között fordított összefüggés áll fenn. Ez az eredményünk utalhat a daganatok meghatározott jelátviteli útvonal dominanciájára, növekedési faktor függésére.
5. A *MET* és *PIK3CA* gének kópiaszám emelkedése eltér a gége régió alcsoportjaiban. A glottikus daganatok esetében ritkább volt ezen gének felsokszorozódása, mint a szupraglottikus régióban. Többek között ezzel is magyarázható a glottikus daganatok jobb túlélése.
6. A $p16^{INK4-}$expresszió HPV pozitivitástól függetlenül önálló prognosztikus marker szájgarati daganatokban.
7. A magyarországi fej-nyaki daganatos betegeket vizsgálva a $p16^{INK4}$-immunpozitivitás HPV-pozitivitást prediktáló specificitása 56%-os a szájgarati régióban. A $p16^{INK4}$-immunpozitív betegek között azon esetekben, ahol HPV-fertőzés nem igazolható, a dohányzás etiológiai szerepe szignifikáns.
8. A fej-nyaki daganatok in vitro modelljében mutációik és fehérje expressziójuk ismeretében a dasatinib és afatinib érzékenység prediktálható, kombinációjuk pedig szinergista hatással bír.

9. A connexin 43 fehérje expressziójáról munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy prognosztikus jelentősége van fej-nyaki daganatokban. A connexin 43 expresszió csökkenése kedvezőtlenebb kimenetelű betegséggel társult. Munkánk során kimutattuk, hogy a fehérje foszforilációjában tirozin-kináz inhibítorok hatására bekövetkező változás befolyásolhatja a connexin 43 fehérje membránba helyeződését. Ezt az eredmény fontos lehet a connexin 43 szabályozása szempontjából.

10. A hasnyálmirigy daganatok in vitro modelljében a KRAS mutációs altípusok és a daganat fehérje expressziója meghatározza a RAS/Raf/MEK/ERK és PI3K/Akt jelpályák aktivitását és így befolyásolja a MEK-gátló kezeléssel szembeni érzékenységüket.

11. A hasnyálmirigy daganatok in vitro modelljében molekuláris és expressziós mintázata alapján altípus-specifikusan megtervezhető a leghatásosabb, szinergista gyógyszerkombináció.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Brauswetter D**, Birtalan E, Danos K, Kocsis A, Krenacs T, Timar J, Mihalyi R, Horcsik D, Polony G, Tamas L, Petak I. (2017) p16INK4 expression is of prognostic and predictive value in oropharyngeal cancers independent of human papillomavirus status: a Hungarian study. Eur Arch Otorhinolaryngol, 274: 1959-1965. **(IF: 1,660)**
2. **Brauswetter D**, Danos K, Gurbi B, Felegyhazi EF, Birtalan E, Meggyeshazi N, Krenacs T, Tamas L, Petak I. (2016) Copy number gain of PIK3CA and MET is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. Virchows Arch, 468: 579-587. **(IF: 2,848)**
3. Danos K, **Brauswetter D**, Birtalan E, Pato A, Bencsik G, Krenacs T, Petak I, Tamas L. (2016) The Potential Prognostic Value of Connexin 43 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 24: 476-481. **(IF: 1,634)**
4. Szentkuti G, Danos K, **Brauswetter D**, Kiszner G, Krenacs T, Csako L, Repassy G, Tamas L. (2015) Correlations Between Prognosis and Regional Biomarker Profiles in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. Pathol Oncol Res, 3: 643-650. **(IF: 1,94)**

A disszertációtól független közlemények

1. Varga A, Gyulavari P, Greff Z, Futosi K, Nemeth T, Simon-Szabo L, Kerekes K, Szantai-Kis C, **Brauswetter D**, Kokas M, Borbely G, Erdei A, Mocsai A, Keri G, Vantus T. (2015) Targeting vascular endothelial growth factor receptor 2 and protein kinase D1 related pathways by a multiple kinase inhibitor in angiogenesis and inflammation related processes in vitro. PLoS One, 10: e0124234. **(IF: 3,057)**
2. Dános K, Birtalan E, **Brauswetter D**, Tamás L. (2015) A humán (emberi) papillomavírus (HPV) szerepe a szájgarat daganatainak kialakulásában, kórismézében és kezelésében – áttekintő közlemény. Nőgyógyászati Onkológia, 20: 8-11. **(IF: 0)**
3. Szentkúti G, **Brauswetter D**, Dános K, Birtalan E, Tamás L. (2014) A fej-nyaki daganatok magas incidenciájának és mortalitásának okai hazánkban. OTORHINOLARYNGOLOGIA HUNGARICA, 60: 77-80. **(IF: 0)**

4. Schwab R, Petak I, Kollar M, Pinter F, Varkondi E, Kohanka A, Barti-Juhasz H, Schonleber J, **Brauswetter D**, Kopper L, Urban L. (2014) Major partial response to crizotinib, a dual MET/ALK inhibitor, in a squamous cell lung (SCC) carcinoma patient with de novo c-MET amplification in the absence of ALK rearrangement. Lung Cancer, 83: 109-111. **(IF: 3,958)**
5. Tamas L, Szentkuti G, Eros M, Danos K, **Brauswetter D**, Szende B, Zsakovics I, Krenacs T. (2011) Differential biomarker expression in head and neck cancer correlates with anatomical localization. Pathol Oncol Res, 17: 721-727. **(IF: 1,366)**