Génexpresszió alapú prediktív biomarkerek a szolid tumorok szisztémás terápiájában

Doktori értekezés

Pénzváltó Zsófia

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Győrffy Balázs, PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Lukáts Ákos, PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Szüts Dávid, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sótonyi Péter, DSc, professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Patócs Attila, PhD, tudományos főmunkatárs
Dr. Fedorcsák Imre, PhD, főorvos

Budapest
2014

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék ... 2

2. Rövidítések jegyzéke ... 5

3. Bevezetés ... 9

3.1. Kemoterápia - célzott terápia ... 9
3.2. Biomarkerek ... 11
3.2.1. Monogénes és multigénes markerek ... 13
3.3. Microarray ... 14
3.4. Kemoterápia rezisztencia ... 15
3.5. Carboplatin rezisztencia petefészekrákokban ... 17
3.5.1. A petefészekrák, molekuláris szubtípusok ... 17
3.5.2. A epiteliális petefészekrák gyógyszeres terápiája ... 18
3.5.3. A platina rezisztencia ... 21
3.5.3.1. A carboplatin hatásmechanizmusa ... 21
3.5.3.2. Pre-target rezisztencia, aktív carboplatin koncentráció csökkentése ... 23
3.5.3.3. On-target rezisztencia, a carboplatin-DNS adduktumok eltávolítása ... 24
3.5.3.4. Post-target rezisztencia ... 26
3.5.3.5. Off-target rezisztencia ... 26
3.6. Tirozin-kináz inhibitorok és a velük szembeni rezisztencia ... 27
3.6.1. Tirozin-kinázok, RAS jelátvitel ... 27
3.6.2. Tirozin-kináz inhibitorok ... 29
3.6.3. Tirozin-kináz inhibitorokkal szembeni rezisztencia ... 30

4. Célkitűzések ... 32

5. Módszerek ... 34

5.1. A carboplatin rezisztencia vizsgálata során használt módszerek (5. ábra) ... 34
5.1.1. Adatbázis építés ... 35
5.1.2. Bioinformatikai feldolgozás ... 35
5.1.2.1. Normalizálás ... 35
5.1.2.2. JetSet szűrés ... 36
5.1.2.3. ROC analízis ... 36

5.1.3. Sejtkultúra 38
5.1.4. Mikoplazma: 38
5.1.5. Sejtvonal eredet igazolás 38
5.1.6. Gyógyszerek 39
5.1.7. Gyógyszer-érzékenységi teszt 39
5.1.8. Géncsendesítés 40
5.1.9. Géncsendesítéssel kombinált gyógyszer-érzékenységi teszt 40
5.1.10. Apoptózis vizsgálat 41
5.1.11. A MEK1 gyógyszeres gátlása 42
5.1.12. Klinikai mintagyűjtés 42
5.1.13. qRT-PCR 43
5.1.13.1. RNS izolálás 43
5.1.13.1.1 RNS izolálás sejtkultúrából 43
5.1.13.1.2 RNS izolálás szövetmintából 43
5.1.13.2. Reverz transzkirpció 43
5.1.13.3. qRT-PCR 43
5.1.14. Immunhisztokémia 44
5.2. A célzott terápiás szerekkel szembeni rezisztencia vizsgálata során alkalmazott módszerek 45
5.2.1. Sejtkultúra 45
5.2.2. Gyógyszerek 47
5.2.3. Gyógyszer-érzékenységi teszt 47
5.2.4. Szignifikáns különbségek a génexpresszióban 48
5.2.4.1. Microarray – caArray adatbázis 48
5.2.4.2. Rezisztens és szenzitív sejtvonalak elkülönítése 49
5.2.4.3. Microarray feldolgozás, bioinformatika 49
5.2.4.3.1 SAM – Significance Analysis of Microarrays 49
5.2.4.3.2 Rank products 50
5.2.4.3.3 Leave-one-out keresztvalidáció 50
5.2.5.q RT-PCR 50
5.2.5.1.RNS izolálás 50
5.2.5.2. TaqMan PCR 50
5.2.6. Vesesejtes karcinóma mintagyűjtés 51
5.2.7. Immunhisztokémia 51

6. Eredmények 53

6.1. A carboplatin rezisztencia vizsgálata során elért eredmények 53
6.1.1.Adatbázis építés 53
6.1.2.Bioinformatikai feldolgozás 53
6.1.3. A gyógyszerérzékenység tesztelése 54
6.1.4. Gyógyszerkezelés és a géncsendesítés kombinációja 55

6.1.5. Apoptózis vizsgálat 56
6.1.6. MEK1 gyógyszeres gátlása 58
6.1.7. Kiválasztott gének validációja független klinikai mintákon, qRT-PCR-el 59
6.1.8. Immunhisztokémia 60
6.2. A célzott tirozin-kináz inhibitorokkal szembeni rezisztencia vizsgálata során elért eredményeink 62
6.2.1.45 sejtvonal rezisztencia profilja az öt tirozin-kináz inhibitorral szemben 62
6.2.2. A szenzitív és rezisztens sejtvonalak elkülönítésére alkalmas gének azonosítása 64
6.2.3. Microarray adatok alapján talált gének validálása TaqMan qRT-PCR-el 64
6.2.4. A sunitinib rezisztenica gének immunhisztokémiai validációja független betegmintákon 67

7. Megbeszélés 71

8. Következtetések 77

9. Összefoglalás 78

10. Summary 80

11. Irodalomjegyzék 82

12. Saját publikációk jegyzéke 106

12.1. Disszertációhoz kapcsolódó publikációk: 106
12.2. Disszertációtól független publikációk: ..... Hiba! A könyvjelző nem létezik.

13. Köszönetnyilvánítás 107

14. Függelékek 108

14.1. Függelék 1 108
14.2. Függelék 2 110
14.3. Függelék 3 112
14.4. Függelék 4 113

2. Rövidítések jegyzéke

A rövidítések és a dolgozatban előforduló gének nevei (a rövidítéseket az első előfordulás helyén a dolgozatban is definiálom):

rövidítés	angol kifejezés	magyar kifejezés
5-FU	5-fluorouracil	5-fluorouracil
AKT	rac-alpha serine/treonine-protein kinase	rac-alfa szerin6/treonin protein kináz
ANXA3	annexin a3	annexin a3
ATCC	american type culture collection	amerikai sejtbank
ATM	ataxia telangiectasia mutated	ataxia telangiectasia mutált
ATP7A	ATPase, copper transporting, alpha polypeptide	ATPáz, réz transzporter, alfa polipeptid
ATP7B	ATPase, copper transporting, beta polypeptide	ATPáz, réz transzporter, béta polipeptid
ATR	ataxia telangiectasia and rad3 related	ataxia telangiectasia és rad3 kapcsolt
AUC	area under the curve	görbe alatti terület
BAK1	bcl2-antagonist/killer 1	bcl2-antagonista 1
BAX	bcl-2-associated x protein	bcl-2-associált x fehérje
BCL2	b-cell lymphoma 2	b-sejtes limfóma 2
Bcr-Abl	breakpoint cluster region - abl proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	töréspont régió-abl proto-onkogén 1, nem-receptor tirozin-kináz
B-RAF	murine sarcoma viral oncogene homolog b	egér szarkóma vírus onkogén homológ b
BRCA1	breast cancer 1, early onset	emlőrák 1, korai
BRCA2	breast cancer 2, early onset	emlőrák 2, korai
C1	concentration 1	koncentráció 1
C2	concentration 2	koncentráció 2
C3	concentration 3	koncentráció 3
CA-125	cancer antigen 125	rák antigén 125
CCLE	cancer cell line encyclopedia	rákos sejtvonal enciklopédia
CCT3	chaperonin containing tcp1, subunit 3	tcp1 tartalmazó saperonin, négyes alegység
CD9	cd9 molecule	cd9 molekula
cDNS	complementer DNA	komplementer DNS
CHEK1	checkpoint kinase 1	ellenörzőpont kináz 1
CHEK2	checkpoint kinase 2	ellenörzőpont kináz 2
CML	chronic myeloid leukemia	krónikus mieloid leukémia
CMS	centers for medicare and medicaid services	egészségügyi szolgáltatási központ
CNOT8	CCR4-NOT transcription complex, subunit 8	CCR4-NOT transzkripciós komplex, 8-as alegység
CO_2	carbon-dioxide	szén-dioxid
CSDE1	cold shock domain containing e1	hideg sokk domént tartalmazó e1

CSF-1R	colony stimulating factor 1 receptor	kolónia stimuláló faktor 1 receptor
CTR1	copper transporter 1	réz transzporter 1
DAB	diaminobenzidin	diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium	Dulbecco módosított Eagle tápoldat
DMSO	dimetil-sulfoxid	dimetil-szulfoxid
DNáz	deoxyribonuclease	dezoxiriobunkleáz
DNS	deoxyribonucleic acid	dezoxiribonukleinsav
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	etilén-diamin-tetraecetsav
EGFR	epidermal growth factor receptor	epidermális növekedési faktor receptor
EOC	epithelian ovarian cancer	epiteliális petefészek karcinóma
EPCAM	epithelial cell adhesion molecule	epiteliális sejtadhéziós molekula
ERCC1	excision repair cross-complementation group 1	kivágó javítás kereszt-komplementációs csoport 1
ERCC4	excision repair cross-complementation group 4	kivágó javítás kereszt-komplementációs csoport 4
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinases	extracelluláris jel regulált kináz
FAT4	cadherin family member 14	kadherin család, 14-es tag
FDA	USA Food and Drug Administration	amerikai élelmiszer és gyógyszer ügynökség
FISH	fluorescent in situ hibridisation	fluoreszcens in situ hibridizáció
FDR	false discovery rate	fals találati arány
FLT3	fms-related tyrosine kinase 3	fms-kapcsolt tirozin kináz 4
FN	fals negative	fals negatív
FP	fals positive	fals pozitív
FUBP1	far upstream element (fuse) binding protein 1	fuse kötő fehérje 2
FURIN	paired basic amino acid cleaving enzyme	páros aminosav hasító enzim
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GEO	gene expression omnibus	gén expressziós omnibusz
GFR	growth factor receptor	növekedési faktor receptor
GITC	guanidinium thiocyanate	guanidinium thiocianát
GOG	gynecologic oncology group	nőgyógyászati onkológiai csoport
GSE	gene expression omnibus (geo) series	gene expression omnibus (geo) sorozat
GSH	gluthatione	glutatuion
HCl	hydrogen chlorid	hidrogén-klorid
HER2	human epidermal growth factor receptor 2	humán epiteliális növekedési faktor receptor 2
HMG	high mobility group	magas mobilitású csoport
HR	hazard ratio	kockázati arány
ADA	adenosine deaminase	adenozin deamináz
IAP	inhibitor of apoptosis	apoptózis inhibitor
IC50	half maximal inhibitory concentration	fél teljes inhibitoros koncentráció
IHC	immunohistochemistry	immunhisztokémia
ITGB4	integrin, beta 4	integrin, béta 5
JNK1/2/3	c-jun n-terminal kinase	c-jun n-terminális kináz

JRK	jerky homolog	jerky homológ
KIT	mast/stem cell growth factor receptor	őssejt növekedési faktor receptor
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Kirsten patkány szarkóma vírus onkogén homológ
KRT18	keratin 18	keratin 19
L-15	Leibowitz 15 media	Leibowitz 15 tápoldat
LGALS8	galectin 8	galektin 8
MAD2	mitotic arrest deficient-2	mitotikus késés deficiens 2
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogén-aktivált fehérje kináz
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	mitogén-aktivált fehérje kináz 14
MAPKK	mitogen-activated protein kinase kinase	mitogén-aktivált fehérje kináz kináz
MAPKKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase	mitogén-aktivált fehérje kináz kináz kináz
MAS5	microarray suite 5.0	microarray csomag 5.1
ME1	malic enzyme 1, nadp(+)-dependent, cytosolic	malic enzim 1, nadp(+)-függő, citoszoláris
MEK1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	mitogén-aktivált fehérje kináz kináz
MGED	microarray gene expression data	microarray gén expressziós adatok
MLH1	mutl homolog 1	mutl homológ 1
MM	mismatch	nem illeszkedő
MMR	mismatch repair	nem illő párok javítása
mRNS	messenger RNA	hírvivő RNS
MSH2	muts homolog 2	muts homológ 2
MSH3	muts homolog 3	muts homológ 3
MSH6	muts homolog 6	muts homológ 6
MTT	dimethylthiazol-diphenyl-tetrazolium-bromide	dimetiltilthiazol-difenik-tetrazólium-bromid
NCCN	national comprehensive cancer network	nemzeti rák hálózat
NER	nucleotide excision repair	nukleotid kivágó javítás
NFAT2CIP	nuclear factor of activated t-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 interacting protein	aktivált t-sejt nukleáris factor, citoplazmai, kalcineurin függő 2 kölcsönható fehérje
PAM	prediction analysis of microarrays	microarray predikciós elemzés
PBS	phosphate buffered saline	foszfát puffer oldat
PCR	polimerase chain reaction	polimeráz láncreakció
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor	vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor
PFP	portion of false positives	hibásan pozitívak aránya
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase	foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát 3-kináz
PM	perfect match	tökéletes illeszkedés
PMS1	postmeiotic segregation increased 1	posztmeiotikus szegregációban megemelkedő 1
PMS2	postmeiotic segregation increased 2	posztmeiotikus szegregációban megemelkedő 2
PMT	PFS: progression-free survival	progresszió mentes túlélés
PPL	periplakin	periplakin

PSA	prostate-specific antigen	prosztataspecifikus antigén
qRT-PCR	qualitative real-time PCR	kvalitatív valós idejű PCR
RAB17	RAB17, member RAS oncogene family	RAB17, a RAS onkogén család tagja
RAB25	RAB25, member RAS oncogene family	RAB25, a RAS onkogén család tagja
RAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog	v-raf egér szarkóma vírus onkogén homológ
RAS	rat sarcoma viral oncogene homolog	patkány szarkóma vírus onkogén homológ
RET	ret proto-oncogene	ret proto-onkogén
RI	resistance index	rezisztencia index
RNS	ribonucleic acid	ribonukleinsav
ROC	receiver operating characteristics	receiver operating characteristics
RP	Rank Products	Rank Products
RTF1	paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (s. cerevisiae)	paf1/RNS polimeráz II complex komponens homológ (s.cerevisiae)
SAM	significance analysis of microarray	microarray szignifikancia elemzés
SH2	src homology 2	src homolóhia 2
siRNS	small interfering RNA	kis interferáló RNS
SRT	short tandem repeat	rövid tandem ismétlődés
TCGA	the cancer genome atlas	a rák genom atlasz
TMA	tissue microarray	szöveti microarray
TN	true negative	valós negatív
TNM	tumor, nodes, metastasis	tumor, nyirokcsomó, áttét
TP	true positive	valódi pozitív
TP53	tumor protein 53	tumor fehérje 54
TT	OS: overall survival	teljes túlélés
UPR	unfolded protein response	feltekeretlen fehérje válasz
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
WT1	wilms tumor 1	wilms tumor 2

3. Bevezetés

Disszertációmban a szolid tumorok szisztémás terápiára adott rezisztenciájával és annak előrejelzésére alkalmas biomarkerek fejlesztésével foglalkozom. A gyógyszeres kezeléssel szembeni rezisztencia megjelenése gyakori jelenség minden tumor típusnál, és a sikeres szisztémás terápia elsődleges akadálya. A beteg adott terápiára való fogékonyságának előrejelzésével a terápia hatékonysága, költséghatékonysága maximalizálható és a beteget érő gyógyszerterhelés minimalizálható. A rezisztenciamechanizmusok megismerése pedig újabb lehetséges gyógyszercélpontokat jelöl ki. A prediktív és prognosztikus biomarkerek a jelenlegi terápiás lehetőségek kontextusában a racionális terápiatervezés fontos elemei és elterjedésük várhatóan sokat finomít a jelenlegi kezelési protokollokon.

Dolgozatomban kettő vizsgálat eredményeit szeretném részletesen feldolgozni: elsőként az ovárium karcinómák platina rezisztenciájával kapcsolatos kutatásaink eredményeit [1], majd a tirozin-kináz inhibitorok prediktív biomarkereit kutató vizsgálatainkat [2]. A két téma módszereit és eredményeit külön-külön mutatom be a könnyebb követhetőség kedvéért. További három publikációnkból [3-5] pedig a bevezető részben és a megbeszélésben emelek ki részeket. Ezek a munkák is szervesen kapcsolódnak a szisztémás daganatterápiával szembeni rezisztencia és biomarker kutatásokhoz, de a terjedelmi keretekből adódóan nem tárgyalom őket részleteiben.

3.1. Kemoterápia - célzott terápia

A modern kemoterápia története az első világháború idejére nyúlik vissza. A mustárgáz antitumorális hatását figyelték meg, és lefutottak az első modern értelemben vett klinikai kísérletek is. 1931-ben tizenkét páciensen alkalmazták a vegyület oldatát intratumorális injekcióban és minden esetben leírták a tumor regresszióját az egy hónapos megfigyelési idő alatt [6]. A klasszikus kemoterápiás ágensek mára hihetetlen diverzifikációt értek el, főbb csoportjaik az anti-metabolitok (pl.: 5-FU, methotrexat, merkaptopurin), alkiláló ágensek (cyclophospamid, melphalan, carmustin), mikrotubulus gátlók (taxánok és vincristinek), topoizomeráz inhibitorok (doxorubicin,

daunorubicin, irinotecan) és a citotoxikus antibiotikumok (doxorubicin, mitomicin). A klasszikus kemoterápia alapelve azon a felismerésen nyugszik, hogy a tumorsejtek korlátlanul és gyorsan osztódnak, a szervezet más sejtjeihez képest. A klasszikus kemoterapikumok a szervezet osztódó sejtjeire hatnak, azokat pusztítják el. Ez a megközelítés tehát nagyon kevéssé szelektív, számos mellékhatással jár, és nem számol a daganat nyugvó (nem, vagy csak ritkán osztódó) sejtjeivel.

A molekuláris biológia fejlődése, a rák természetének jobb megismerése paradigmaváltást sürgetett. Felfedezték a tumorszupresszor géneket [7], a tumorokban aktivált foszforilációs jelátviteli útvonalakt [8], a virális onkogének mellett leírták az első humán onkogéneket [9], felfedezték az angiogenezis, mikrokörnyezet, onkogén addikció fogalmait. A daganat jellemzői a növekedési faktorokkal való megfelelő ellátottság, növekedést gátló faktorok iránti csökkent érzékenység, az apoptózis elkerülése, korlátlan osztódási képesség, érképző képesség, genom instabilitás, invázió, és metasztázis képzés, az immunválasz elkerülése, a tumort segítő gyulladásos reakció, és a daganatsejt anyagcseréjének átalakulása [10]. A rák definíciója tehát tovább finomodott a „korlátlanul osztódó sejthalmaz” felől. 1996-ra datálható egy jelentős fordulat a rosszindulatú daganatok kezelésében, az első célzott terápiás szer, az imatinib bevezetése, amely a krónikus mieloid leukémiára jellemző Bcr-Abl (breakpoint cluster region - abl proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase) aberráns kinázt célozza meg [11]. Ez a kináz egy kromoszóma transzlokáció (Philadelphia kromoszóma) eredményeként jön létre. A konstitutívan aktív kináz olyan sejtciklus stimuláló jeleket küld, amelyek a tumorsejteket folyamatos osztódásra késztetik. A Bcr-Abl a Philadelphia kromoszómával rendelkező krónikus mieloid leukémiák „driver-e”, azaz kiváltója és fenntartója a tumor kialakulásának és növekedésének. A Bcr-Abl kináz gátlásával, kikapcsolásával az aberráns kromoszómát hordozó daganatsejtek osztódása leáll. A példa alapján összefoglalhatjuk: a **célzott terápia** tehát olyan kezelés, amely a tumor progresszióját a növekedésben és progresszióban kulcsszerepet játszó specifikus molekulák gátlásán keresztül akadályozza meg.

Az imatinib alkalmazása CML-ben (krónikus mieloid leukémia) és gasztrointesztinális sztromális tumorban radikális túlélés javuláshoz vezet, de csak azokban az esetekben, ahol a beteg tumora mutatja a megfelelő driver mutációt. Az

EGFR (epidermal growth factor receptor) inhibitorok alkalmazása csupán 10%-os válaszadási rátát mutat, ha válogatatlan populációban alkalmazzák. Az EGFR mutációval rendelkező betegekben azonban rendkívüli hatékonysággal működik [12]. A két eset tanulsága, hogy a célzott tirozin-kináz inhibitorok csak azokban a betegekben hatékonyak, akiknek tumorában, a tumor kialakulásában és progressziójában vezető szerepet tölt be az adott molekula, mutáció. Azaz a célzott terápiák alkalmazásához mindenképp szükség van a betegek válogatására. Erre szolgálnak a prediktív biomarkerek, amelyek megjósolják, hogy a beteg fog-e reagálni az adott terápiára, vagy sem. Az USA Food and Drug Amdnistration-tól (FDA) származó első célzott terápiás szerekkel kapcsolatos ajánlás szerint e szerek elrendelését olyan diagnosztikus tesztnek kell megelőznie, mely bizonyítja a szer hatékonyságának kulcselemét: a célmolekula létét (túlaktivációját, stb.) és hogy adott beteg esetén mindig a leghatékonyabb célzott terápiás szer kerüljön kiválasztásra [13].

3.2. Biomarkerek

A daganatok precíz kategorizálása, a progresszió, agresszivitás előrejelzése és a terápiatervezés egyaránt használ biomarkereket. Biomarker annyit tesz, mint egy objektíven mérhető indikátora valamilyen biológiai folyamatnak vagy terápiás beavatkozásra adott válasznak [14]. A biomarkerek kategorizálása azonban nem egyértelmű.

Az anatómiai feltérképezésből álló TNM rendszer 1958 óta létezik és finomodik [15]. Párhuzamosan megjelentek a molekuláris biológiai biomarkerek is. A biomarkereknek funkció szerint három típusát különböztethetjük meg: 1. a diagnosztikus biomarkerek, 2. prognosztikus biomarkerek és a 3. prediktív biomarkerek.

A diagnosztikus biomarkerek közé sorolhatjuk a korai felismerést, szűrést célzó markereket. Az úgynevezett tumor markerek (pl.: PSA, CA-125) szintjét a vérszérumból mutatják ki. Utánkövetésre és szűrésre egyaránt alkalmasak. A diagnosztikus biomarkerek másik csoportjába azok tartoznak, amelyek a daganat pontosabb jellemzésére szolgálnak. Az eltérő molekuláris szubtípusokba való besorolás rendkívül fontos lehet a daganat viselkedésének és terápiás érzékenységének

becslésében. Kiváló példa erre a petefészek daganatoknál megfigyelhető diagnosztikus forradalom (lásd később) vagy az emlőrák alosztályok kialakítása melyet összefoglaló munkánkban tárgyalunk [4].

A prognosztikus biomarkerek a daganatprogresszióról, túlélési esélyekről nyújtanak tájékoztatást, informálhatnak a kiújulási esélyekről is. Az informatív prognosztikus biomarkereknek szerepe lehet a terápiatervezésben. Jó példa erre az emlőrákokban alkalmazható OncotypeDX tesztje melyről részletesen [4]-ben írunk. A teszt 21 gén expressziója alapján ad a betegeknek „recurrence score”-t egy nullától százig terjedő skálán. A score arányos annak valószínűségével, hogy a daganat tíz éven belül kiújul. A magas vagy alacsony rizikó ismerete segíthet a betegnek és a kezelőorvosnak eldönteni az adjuváns kemoterápia szükségességét.

A prediktív biomarkerek pedig alkalmasak arra, hogy definiáljanak egy olyan szubpopulációt a betegek közül, melyek jó eséllyel reagálnak egy adott terápiára. A hatékony prediktív biomarkerek képezhetik a személyre szabott terápia alapkövét [16]. A prediktív biomarkerek leggyakrabban gyógyszercélpontok, és az adott hatóanyag célpontjának meglétét ellenőrzik. Ugyanakkor a prediktív biomarker paletta árnyalása szükséges, hiszen a célmolekula megléte ellenére is igen gyakran találkozunk rezisztenciával. Fontos a paralel jelátviteli útvonalak feltérképezése és az innen származó biomarkerek azonosítása. Kiváló példa erre a HER2 molekula emlőrákok esetén, melynek szerepét [4]-ben szintén tárgyaljuk. A HER2 önmagában rossz prognózist indikáló prognosztikus biomarker [17, 18]. A trastuzumab, HER2 ellenes monoklonális antitest klinikai bevezetése azonban fordulópontot hozott és a HER2 pozitív betegek a hatékony terápiának köszönhetően már kezdvező prognózisú csoportba esnek, a HER2 prediktív biomarkerré vált [19]. Ennek ellenére a trastuzumabbal szembeni rezisztencia a HER2 pozitív betegek közel hetven százalékánál jelentkezik [20] és további prediktív biomarkerek leírása szükséges a terápiás hatékonyság növeléséhez.

Klinikai alkalmazás előtt a biomarkereknek ugyanolyan validálási lépéseken kell átmenniük, mint az új gyógyszereknek. Ez az amerikai rendszerben egy FDA elbírálást jelent, ami kedvező esetben megállapítja, hogy a biomarker hatékony és biztonságos, illetve egy CMS (Centers for Medicare and Medicaid Services) elbírálást, amely

megállapítja, hogy a biomarker szükséges és gazdaságos. Ezek azok a lépcsőfokok, amelyet ritkán ugrik meg egy biomarker. A biomarker kutatás kritikus pontja hogy még a legígéretesebb vizsgálatok esetén is nagyon ritkán sikerül a független validáció. A vizsgálandó klinikai végpontok, az elfogadható hatékonyság és a használandó statisztikák körül folyamatos a vita [21].

3.2.1. **Monogénes és multigénes markerek**

A daganatok mutációk halmozásán keresztül alakulnak ki, és mind az onkogén addikció, mind a rezisztencia döntően multifaktoriális jellegű. A kutatások jellemzően egy-egy gén vagy jelátviteli útvonal szerepét vizsgálják a rezisztenciában, igen fókuszáltan és a funkcionális háttér meghatározásának igényével. Egy másik megközelítésben (ezt a megközelítést képviselik a disszertációmban tárgyalt vizsgálataink is) azonban a leíró megfigyelésektől indul a biomarker kutatás: azaz, megfigyelni nagyszámú mintán, melyek azok a gének melyek eltérő expressziója, amplifikációja, mutációja együtt jár a rezisztens fenotípussal. Így sok esetben egy egyveleget, egy génlistát kapunk. Ezek természetesen funkcionális validálásra és főként klinikai validálásra szorulnak, de a multigénes tesztek prediktív vagy prognosztikus hatékonysága sokszor nagyobb az egy-egy marker vizsgálatán alapuló klasszikus patológiai módszereknél. Így lehetséges, hogy például az emlőtumorok területén a Mammaprint és az Oncotype DX multigénes tesztek igen gyorsan elfogadottá és elismertté váltak és utat nyitottak a multigénes markerek extenzív fejlesztése felé. Példaként korábbi cikkünk [4] alapján egy összefoglaló táblázatot mutatok be az emlőrákokban használt multigénes tesztekről (**1.táblázat**).

1. táblázat: Multigénes, génexpresszió alapú tesztek az emlőrák diagnosztikában. (F/F: friss fagyasztott minta, Ffp: formalin-fixált, paraffinba ágyazott minta.)

Teszt jellemzői			**Technika**			**Funkció, cél**
Név	Cég	Elérhető	Gének száma	Szövet	Technika	
MammaPrint	Agendia	EU, USA	70	F/F	Microarray	Prognózis 61 éven felül
Oncotype Dx	Genomic Health	EU, USA	21	Ffp	PCR	Prognózis, tamoxifen kezelést követő kiújulás predikció
Theros Breast Cancer Index	Biotheranostics	USA	2(5)	Ffp	PCR	PM prognózis, endokrin terápiát követő kiújulás predikció
MapQuant Dx	Ipsoggen	EU	97	F/F	Microarray	Prognózis
Breast Bioclassifier	ARUP	USA	55	Ffp	PCR	Progonózis
Celera Metastatic Score	Applera	-	14	Ffp	PCR	Prognózis, tamoxifen kezelést követő kiújulás predikció
Breast Lymph Node (BLN) Assay	GeneSearch Veridex	UK	76	F/F	Microarray	Intraoperatív metasztázis kimutatás
Invasive Gene Signature	-	-	186	F/F	Microarray	Prognózis
Wound Response Indicator	-	-	512	F/F	Microarray	Prognózis
Nouvera Biosciences	Veridex	-	30	-	-	Prognózis, tamoxifen és taxán kezelést követő kiújulás
eXagen	eXagen Diagnostics	-	3	Ffp	FISH	Prognózis
Mammostrat	Genomics	USA	5		IHC	Menopauza utáni prognózis

Ez a hihetetlenül diverz kép azonban nem jellemző minden tumor típusra. A dolgozat egyik fő tárgyát képező petefészek daganatok esetén is számtalan multigénes marker kereső vizsgálat futott az elmúlt években [22-25], ezek közül azonban egy sem került klinikai alkalmazásba (összefoglaló [3]).

3.3. Microarray

Vizsgálatainkban microarray alapú génexpressziós mérésekből indítjuk a biomarker keresést. A microarray vagy más néven gén chip technológia génexpresszió mérésére ad lehetőséget, egyidejűleg számos gén expressziója mérhető, így a multigénes mérések és az új biomarkerek keresésében jelentős eszköz.

Az Affymetrix expressziós microarray-ek esetében egy szilárd hordozóhoz (üveglapka) 25 bázisból álló oligonukleotid próbák vannak rögzítve. Ezekhez a

próbákhoz hibridizáltatják a mintából származó RNS-ről reverz transzkripcióval készült, fluoreszcensen jelölt egyszálú cDNS-t. Minden transzkriptumot 11 próbapárral fednek le, a 11 próbapár együttesét próba szetnek (probe set) nevezzük. Egy próbapár a tökéletesen kapcsolódó próbát (perfect match, PM) és a nem specifikus kötődés, és a kereszthibridizáció becslésének mérésére alkalmas partnerpróbát (mismatch, MM) tartalmaz, a PM próbához képest a 13 bázison egy nem komplementer bázist találunk [26].

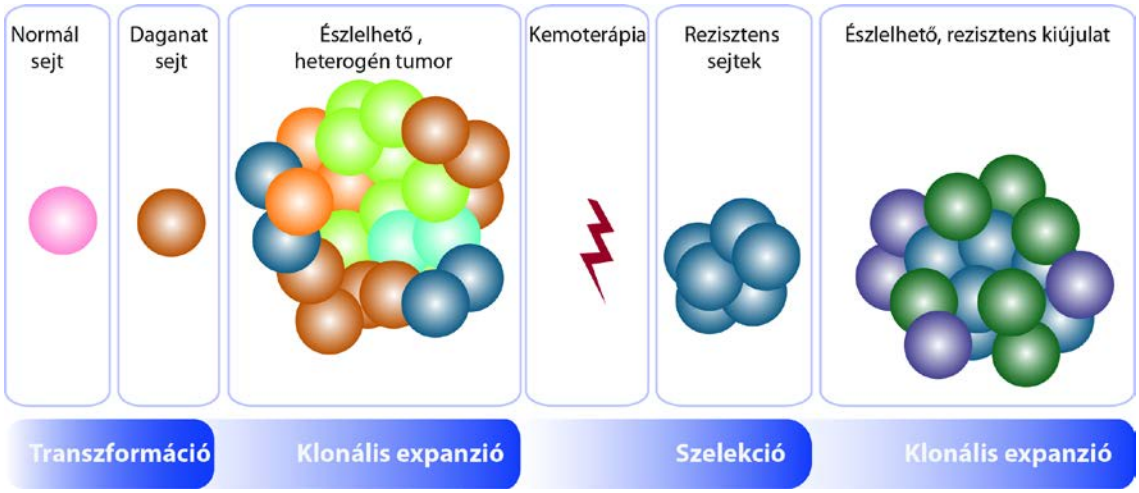
Egy Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array expressziós chip 47,400 transzkriptum expressziójának egyidejű mérésére alkalmas. A chip mérés eredménye a .DAT fájl, a részben processzált, kvantifikált próba intenzitás értékeket tartalmazó származéka a .CEL fájl. A vizsgált gének expressziós szintje a hibridizációban mért fluoreszcens intenzitásból adódik.[27]

3.4. Kemoterápia rezisztencia

A rosszindulatú daganatok kezelése napjainkban három pilléren nyugszik: sebészet, radioterápia és kemoterápia. A daganatsejtek igen gyakran jelentkező rezisztenciája a kemoterápiás kezelésekre a terápiás kudarc egyik elsődleges oka. A rezisztencia a klasszikus értelmezés szerint lehet **belső** (eleve meglévő), vagy **szerzett**. A háttérmechanizmusok gyakran azonosak, a megkülönböztetés elsősorban a terápia tervezésének szempontjából jelentős. Belső rezisztencia esetén a tumor a kemoterápiás kezelés megkezdése előtt már bír a rezisztenciához szükséges molekuláris eltérésekkel, így már az első vonalbeli terápia is hatástalan, a tumor a kezelés ellenére progrediál. Szerzett rezisztenciáról akkor beszélünk mikor a kezdetben jól reagáló tumorban alakul ki a rezisztencia. Ez létrejöhet a kezelés során jelentkező új mutációk által, vagy a genomot nem érintő adaptációs mechanizmusokkal (epigenetikai, expresszió szintű változások) [5].

Sokszor ez a megkülönböztetés azonban mesterséges: a képalkotó eljárások nem képesek egy körülbelül egymillió sejtnél kisebb góc kimutatására, így a patológiailag komplett remisszió esetén is lehet szó a szervezetben megmaradt tumorsejtekről. A tumorok mikroevolúciójával foglalkozó elméletek kiemelik a tumor heterogenitás jelentőségét: a daganat egymással versengő, heterogén sejtpopulációkból áll, a

kemoterápiás kezelés pedig szelektál a rezisztens sejtekre, a szenzitív sejtek elpusztításával versenyelőnybe hozva a rezisztens fenotípusú sejteket [28]. Ezekből gyakran még a kezdeti ígéretes klinikai kép ellenére is klonális expanzióval igen gyorsan létrejön a kiújulat, amely gyakran az eredeti tumornál jóval agresszívabb viselkedésű, rezisztens fenotípusú (**1. ábra**). Saját korábbi munkánk során hasonló következtetésekre jutottunk: a rezisztencia azonos gyógyszerterhelés mellett párhuzamosan változatos módokon kialakulhat és azonos fokú rezisztencia hátterében számos ok húzódhat meg, a mikorevolúció klonális jellegű [5].



1. ábra: A kemoterápia, mint a rezisztencia okozója: a heterogén daganatból a kemoterápia szelekciós nyomása alatt kiválogatódnak a legrátermettebb rezisztens sejtek. Ezekből alakul ki a kezelhetetlen, rezisztens kiújulat.

A rezisztencia hátterében **farmakokinetikai** és **farmakodinamikai** tényezők állhatnak. A gyógyszer tumorhoz jutását gátló tényezőket nevezzük összefoglalóan farmakokinetikai akadályoknak. Itt a gyógyszer felszívódását, eloszlását, metabolizmusát és eliminációját érintő változásokról van szó [29]. Ezeket a dolgozat további részében nem tárgyalom. A farmakodinamikai tényezők azok a sejtszintű változások, melyek kifejezetten a daganatsejtekben, esetleg a mikrokörnyezetben alakulnak ki és vezetnek a daganatsejt túléléséhez a kemoterápiás kezelés ellenére. A rezisztenciát tovább kategorizálhatjuk **pre, on**, **post és off-target** csoportokba Galluzzi és munkatársai rendszerét követve [30, 31].

Pre-target rezisztencia esetén a gyógyszer citotoxikus képessége még a célmolekulához kötés előtt lecsökken, az aktív gyógyszermennyiség csökken. Ez létrejöhet a gyógyszer csökkent felvételével, megnövekedett leadásával és celluláris metabolizmus által.

On-target rezisztenciamechanizmusok esetén maga a célmolekula alakul át úgy, hogy a gyógyszer hatástalanná válik. Célzott terápiás szerek esetén ez például lehet olyan másodlagos mutáció a célzott kinázban, aminek hatására a térszerkezet úgy változik, hogy a gyógyszermolekula képtelen lesz kötni a célmolekulát.

Post-target rezisztencia esetén a gyógyszer ugyan kifejti hatását a célmolekulán, de a hatásmechanizmus további lépéseiben olyan változások jönnek létre, hogy végső soron a sejt túlél a gyógyszer mellett. Gyakori példa erre az apoptotikus utak változásai, mikor a gyógyszer által indukált apoptózis jelátvitel elhal és a sejt tovább él.

Off target rezisztenciamechanizmusról akkor beszélünk, ha a gyógyszermolekula kifejti hatását, de ezt a hatást más mellék mechanizmusok képesek kompenzálni. Célzott terápiáknál gyakori jelenség, hogy a gyógyszer ugyan hatékonyan gátol egy molekulát, a jelátvitel mégis aktív, vagy a célmolekulától lefelé elhelyezkedő más molekulák konstitutív aktivitása által, vagy, mert a jelátviteli útvonalak redundanciája miatt aktiválódik az útvonal [32].

3.5. Carboplatin rezisztencia petefészekrákokban

3.5.1. **A petefészekrák, molekuláris szubtípusok**

A petefészek daganatok osztályozásában jelentős átalakulások történnek. Egyre hangsúlyosabbak azok a vélemények, miszerint ezeket a gyakran különböző szervi eredetű és jelentősen eltérő morfológiájú és viselkedésű tumorokat nem szabad pusztán a megjelenés területe alapján egy kategóriában kezelni [33]. Az ovárium tumorok három alaptípusa: az epitheliális daganatok (EOC) (az összes ováriumtumorok körülbelül 70%-át adják), a gonádlécek támasztósejtjeiből eredő tumorok, (10%-a az összes ováriumtumornak) és csírasejtes tumorok (20%-a az összes esetnek) [34]. Az esetszámokból adódóan legjelentősebb tehát az EOC [35], a klinikai és preklinikai

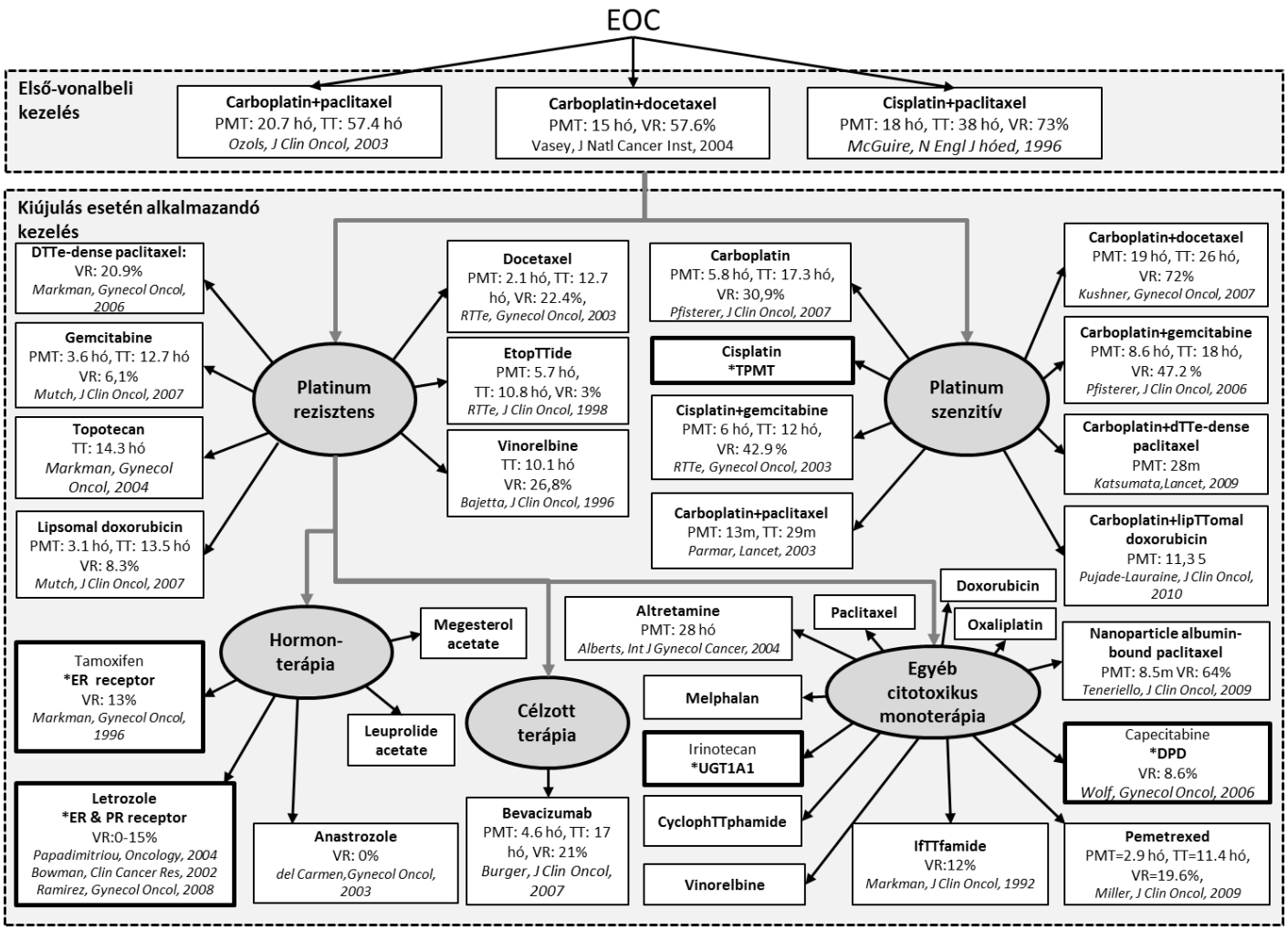
kutatások elsősorban erre a gyakori formára koncentrálnak, így ennek osztályozását nézzük meg közelebbről. A négy legjelentősebb altípusa a szerózus, a mucinózus a világos sejtes és az endometrioid tumorok. A szerózus karcinómáknak megkülönböztetjük alacsony és magas grade-ű típusait. Ezek eltérő patogenezissel rendelkeznek [36], ugyanakkor jellemző közös markerük a WT1, amely sok esetben segít elkülöníteni őket más epitheliális ovárium tumoroktól [37]. Az alacsony grade-ű tumorok kialakulásában, gyakori lépések a B-RAF [38, 39], K-RAS [40-42], HER2[43] gének mutációi, míg a magas grade-ű tumorokban ezek a mutációk igen ritkák, ugyanakkor az esetek 80%-ában TP53 (tumor protein 53) mutációval találkozunk [44]. A diagnózis jellemzően mindkét esetben magas stádiumnál történik, döntően kétoldali megbetegedéssel. Gyakoribb előfordulású a magas grade-ű tumor, az összes EOC-ok 70%-át, míg az alacsony grade-ű karcinóma az esetek kevesebb, mint 5%-át adja [45]. A mucinózus karcinóma ritka, az összes EOC-k 3%-ában találkozunk vele [45], diagnosztizáláskor jellemzően egyoldali, grade I-es [46]. A világossejtes tumorok rossz prognózissal társulnak [47], jellemzően rosszabbul reagálnak a kemoterápiára mint a szerózus karcinómák [48]. Molekuláris patológiájukról relatív keveset tudunk, az összes EOC-k 10%-át adják [45]. Az endometrioid tumorok jellemzően alacsony stádiumnál diagnosztizáltak, az összes EOC-k 10%-át adják [45].

Az epiteliális petefészek karcinóma félrevezető elnevezés, mivel ezek a tumorok gyakran nem ovárium epitél eredetűek [49]. A disztális petevezető szekretoros sejtjei gyakori kiindulásai magas grade-ű szerózus tumoroknak [50]. A mucinózus tumorok jellemzően gasztrointesztinális áttétek az ovariumban [51], kihívást jelent a ritka, primer mucinózus tumorok elkülönítése a gasztrointesztinális metasztázisoktól [52, 53]. Endometrioid, világossejtes karcinóma prekurzora az endometriózis az esetek nagy százalékában [54, 55]. Az epiteliális petefészek karcinómát tehát nem egy betegség szubtípusaiként hanem különböző hisztológiájú, szervi eredetű [56] betegségként kell felfogni [33].

3.5.2. **A epiteliális petefészekrák gyógyszeres terápiája**

A petefészekrák kezelése elsődlegesen (az aktuális NCCN (National Comprehensive Cancer Network) útmutató szerint) sebészet és azt követő platina-taxán

alapú kemoterápia [57]. Az 1996-os GOG111 (Gynecologic Oncology Group) klinikai kísérlet eredményei alapján került bevezetésre a platinum-taxán kombináció. A vizsgálatban a ciszplatin-taxán kombináció 73%-os a ciklofoszfamid-taxán kombináció 60%-os válaszadási rátát eredményezett, a progresszió mentes túlélés körülbel öt hónappal, a teljes túlélés pedig több mint egy évvel volt több a ciszplatin kombinációs csoportban [58]. A GOG158 vizsgálatban a ciszplatin cseréje a kombinációban carboplatinra enyhébb toxicitást és enyhe túlélés növekedést (PMT (progresszió mentes túlélés): 19.4 vs. 20.7 hónap, TT (teljes túlélés): 48.7 vs. 57.4 hónap) eredményezett [59]. Ez alapján a gold-standard elsővonalbeli kezelés ma a paklitaxel-carboplatin kombináció. Másodvonalban számtalan kezelési protokoll közül választhat a kezelőorvos **(2. ábra)**. A betegek zöme kedvezően reagál a platina alapú terápiára, mégis 25%-ukban hat hónapon belül kiújul a tumor [60]. A kezelés megkezdésétől számított hat hónapon belül kiújuló, vagy a kezelés ellenére progrediáló tumort definiáljuk **platina rezisztensnek** [61]. A petefészek daganatok szisztémás terápiájával szembeni rezisztencia biomarkereit a [3]-ben foglaljuk össze részletesen.



1. ábra: Az epiteliális petefészek karcinóma lehetséges szisztémás kezelésének vázlata az NCCN útmutató alapján. A csillagok az adott gyógyszer esetén már létező prediktív vagy toxicitási biomarkereket jelentik. PMT: progresszió mentes túlélés, TT: teljes túlélés, VR: válaszadási ráta.

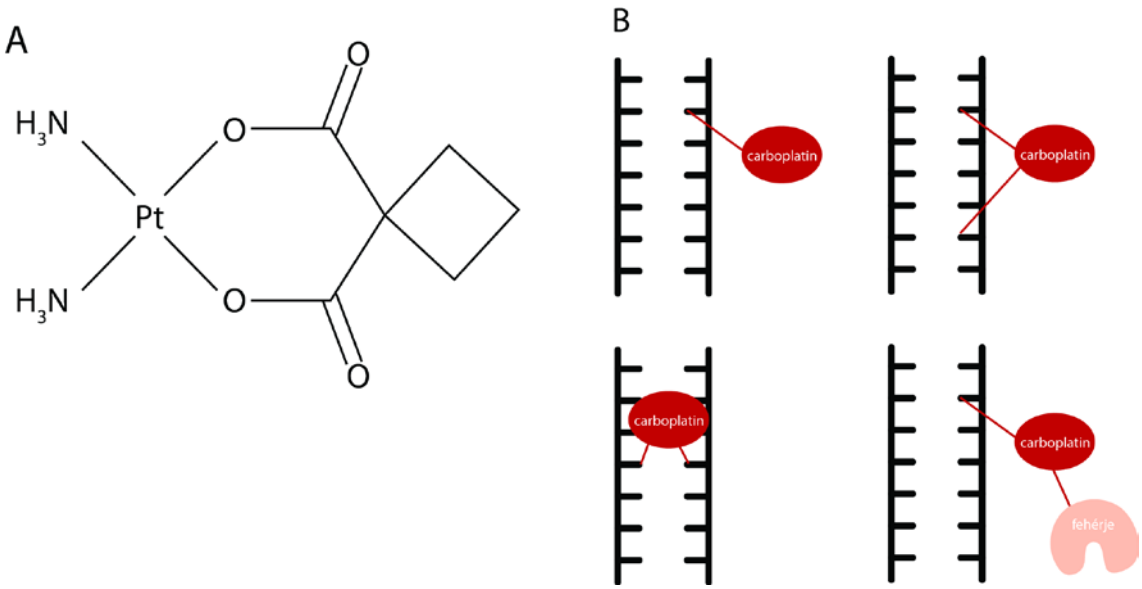
3.5.3. **A platina rezisztencia**

A ciszplatin és a carboplatin azonos hatásmechanizmussal rendelkeznek és teljes keresztrezisztenciát mutatnak, de a carboplatin alacsonyabb neuro és nefrotoxicitással bír, a carboplatin legjellemzőbb mellékhatása a mieloszupresszió [62]. Platina vegyületeket (ciszplatin, carboplatin, oxaliplatin) számos daganatos megbetegedésben alkalmaznak, eltérő hatásfokkal: míg a heredaganatokban gyakorlatilag kuratív kezelésnek számít, a petefészek daganatos betegek hetven százaléka reagál az elsővonalbeli kezelésre, de ezek huszonöt százalékában megjelenik hat hónapon belül a kiújulat, amely már platina rezisztens és az öt éves túlélés így alig huszonöt százalék [60].

Alább áttekintem a platinavegyületek ismert hatásmechanizmusait és a jelentősebb rezisztenciamechanizmusokat, koncentrálva a klinikailag is vizsgált rezisztencia markerekre.

3.5.3.1. A carboplatin hatásmechanizmusa

A carboplatin önmagában inert, aktiválódásához a sejtben spontán lezajló aktiváló reakciók szükségesek, melynek során a carboplatin molekula víz csoportokat köt. Az így kialakult pozitívan töltött molekula igen reaktívan köt minden nukleofil molekulát, DNS-t, RNS-t, fehérjéket. A citotoxikus hatásért ezek közül elsősorban a DNS kötést tartjuk felelősnek [63]. DNS kötésekor a platina ágensek jellemzően a purin bázisok imidazol gyűrűjének N7 atomjával reagálnak. Létrejöhetnek fehérje-DNS adduktumok, a DNS lézióknak pedig három típusa lehetséges: monoadduktumok (90%-ban tovább alakulnak keresztkötésekké), szálon belüli keresztkötések és szálak közötti keresztkötések (**3. ábra**). A legnagyobb arányban a szálon belüli keresztkötéseket találjuk, részben a kimagasló számuk miatt ezeket tartják a sejt számára legveszélyesebbnek [64]. A platina vegyületek bekötése a DNS szálba a DNS torzulásához vezet, a legerősebb torzulást a szálak közti keresztkötések idézik elő, a torzulás végső soron DNS töréshez vezethet.



2. ábra: A: A carboplatin molekula. B: A lehetséges platina DNS adduktumok: monoaddukt, szálon belüli keresztkötés, szálak közötti keresztkötés, DNS-fehérje keresztkötés.

A platina adduktumok felismerése a hatás következő lépése. Erre számos fehérje és DNS hibajavító molekula képes. A HMG (high mobility group) fehérjék a szálon belüli platina keresztkötéseket ismerik fel, és gátolják a transzléziós szintézist és a nukleotid kivágó javítást (NER), ezzel a platina szenzitivitást promotálva, sőt a transzkripció is blokád alá kerül [65]. A legfőbb jelátviteli út, ami a platinum okozta DNS sérülések miatti sejthalálhoz vezet az ATR (Ataxia telangiectasia and rad3 related) és CHEK1 (az ATR legfőbb szubsztrátja) molekulák aktiválódásán keresztül történik, ami végső soron a TP53 molekula foszforilációjához vezet, előidézve annak stabilizációját. Az aktivált TP53 pedig apoptózist indukál. Az ATM, egy másik fontos DNS sérülés felismerő fehérje a ciszplatin indukálta sejtciklus leállásban vesz részt, fő célpontja a CHEK2, ami letális jelet is generálhat [30].

A platina vegyületek citotoxikus hatását tehát elsősorban a DNS károsításhoz kötjük, a valóságban azonban nem elhanyagolható a citoszoláris aktivált carboplatin toxikus szerepe. Erre utal, hogy a sejten belüli ciszplatinnak csak mintegy egy százalékát találjuk magi DNS-hez kötött formában [66] és a sejtmagtól megfosztott sejteken ugyanúgy kifejti citotoxikus hatását [67-69].

Az aktivált carboplatin gyorsan köt olyan nukleofil fehérjékhez, mint a GSH, metionin, és más cisztein gazdag fehérjékhez. Mindez két következménnyel járhat, egyfelől a citoszolból kiritkulnak a reduktív ágensek, oxidatív stressz alakul ki, ami direkt citotoxicitással jár, másfelől a kémiailag aktív platina nagy részének kikötésével egy protektív hatás is létrejön, tehát a rezisztenciában is lehet szerepe [31].

Sejtmagtól megfosztott sejteken észlelték, hogy a ciszplatin kezelés az endoplazmatikus retikulum stressz útvonalat aktiválja [68, 69]. Amikor az endoplazmatikus retikulum stressz előáll, a fehérjék feltekeredése tökéletlen és az UPR (feltekeretlen fehérje válasz) aktiválódik, mely a kaszpáz 12-n keresztül apoptózishoz vezet. A carboplatin nem csak a magi, de a mitokondriális DNS-hez is köt és ezzel szintén képes apoptózist aktiválni.

Elmondhatjuk, hogy a carboplatin hatása és így a vele szemben kialakuló rezisztencia egyaránt multifaktoriális természetű, számos lépésében nem ismert.

3.5.3.2. Pre-target rezisztencia, aktív carboplatin koncentráció csökkentése

A csökkent intracelluláris koncentráció eredhet a csökkent influxból, megnövekedett effluxból, vagy ezek kombinációjából. A ciszplatinról és carboplatinról sokáig azt gondolták, hogy csak passzív diffúzióval jut át a sejtmembránon [70], ma már tudjuk, hogy jelentős hányadban réz transzporterek aktívan szállítják a membránon át. A CTR1 pumpa a ciszplatin felveteléért [71], míg az ATP7A és ATP7B az effluxért felelős [72]. Ezek expressziója a klinikumban is korrelált a túléléssel és a rezisztenciával [73] [74] [75]. A réz kelátorok, mint szenzitizáló ágensek klinikai alkalmazása is felmerült [76], habár a biológiai értelmezés ellentmondásos, hiszen a rézmolekulák ugyan versengenek a ciszplatinnal a sejtbe való felvételért, de ugyanúgy az effluxért is, tehát a ciszplatin akkumulációra a réz jelenléte két irányban hat.

Az aktivált platinavegyületek nagy affinitással kötnek a nukleofil fehérjékhez. Ez részben hozzájárulhat a citotoxikus hatásukhoz, de a rezisztencia mechanizmusa is lehet, hiszen a klasszikus célmolekulához, a magi DNS-hez kevesebb aktivált gyógyszermolekula jut el, így ezek a fehérjék egy hatáscsökkentő pufferként is felfoghatóak. A GSH (gluthation) magas szintje a klinikumban is korrelált a ciszplatin rezisztenciával [77] (habár itt is találunk vizsgálatokat, ahol nagy mintaszám mellett

sem találtak korrelációt a platinum kezelt betegek túlélése és a GSH szint között [78]). Az aktivált ciszplatin spontán kötődik a GSH-hoz, de a GSH-S-transzferáz enzim is gyorsíthatja a reakciót. Ez az enzim egy igen általános xenobiotikum detoxifikáló, sejtvédő rendszer része és így fontos rezisztencia faktor, nem csak a platina ágensek esetén. Hatását doxorubicin rezisztens sejtvonalakon nem tudtuk igazolni [5] (Klinikai vizsgálat az enzimexpresszió és a carboplatin rezisztencia kapcsolatára: [79]). Bár a GSH kötése a platinához teljesen egyértelmű oka a rezisztenciának, más lépések is lehetnek a háttérben: a megemelkedett GSH szintnek szerepe van a DNS hibajavítás aktiválásában, sőt direkt antiapoptotoikus hatása is ismert [80].

3.5.3.3. On-target rezisztencia, a carboplatin-DNS adduktumok eltávolítása

Bár egyre nagyobb hangsúlyt kap a kutatásokban a platina ágensek nem magi DNS célpontjainak vizsgálata, a megelőző irodalom a platina hatásért a DNS adduktumok kialakulását tartja elsősorban felelősnek. Nem meglepő, hogy nagy általánosságban DNS hibajavító mechanizmusok azok, amelyek a platina rezisztenciáért felelősek (hiszen ezek képesek a platina okozta DNS léziók javítására, és így a daganatsejt életben tartására). Azzal az ellentmondásos helyzettel találjuk magunkat szemben, hogy míg a megfelelő DNS hibajavítást a genom őrzőjeként tartjuk számon és a daganatok esetén mindig jobb prognózist kapcsolunk hozzá, a platina kezelés esetén az elégtelen hibajavítás az, ami kedvezőbb prediktív faktor.

Az on-target rezisztencia esetén három hatást különböztethetünk meg:

1. A hibajavítás fokozódása révén a sejt extrém mennyiségű platina adduktumot képes eltávolítani a DNS-ből.
2. A DNS léziók felismerése és így az apoptotikus jel generálása nem jön létre.
3. A sejt tolerálja a DNS léziókat és a sejtciklus tovább pörög a transzléziós szintézisnek (a DNS szintézis, replikáció megtörténik a kijavítatlan hibák jelenlétének ellenére) köszönhetően.

A platina adduktumok eltávolításáért elsősorban a NER (nukleotid excíziós javítás) a felelős. Ebben az esetben a DNS lézió mindkét oldalán vágás, majd a hibás

rész újraszintetizálása történik, a folyamat körülbelül húsz fehérje aktív részvételével zajlik. Az 5’ végen az ERCC1 és az ERCC4 heterodimerje végzi a bemetszést, az ERCC1 molekula expresszióját számos preklinikai és klinikai vizsgálat hozta párhuzamba a platina rezisztenciával [81, 82], habár egy friss tanulmány megkérdőjelezi az immunhisztokémia alapú ERCC1 aktivitásmérés lehetségességét [83]. Az expresszió mellett az ERCC1 polimorfizmusokkal is több vizsgálat foglalkozik: a 118-as kodon AAC cseréje AAT-re ugyan egyaránt aszpargint kódol, de csökkenti az mRNS stabilitását [84].

A MMR (mismatch javítás) alapvetően a hibás bázispárosodást javítja, közvetlenül a replikáció után [85], esetünkben a DNS-platina adduktumokat felismeri, ugyanakkor a javításra nem képes, és ez a képtelenség az, ami a proaptotikus utakat aktiválja. Ebből következően az MMR rendszer egyes komponensei gyakran mutáltak vagy alulexpresszáltak platina rezisztenciában. Az MMR-ben részt vevő fehérjéket az alábbi gének kódolják: MLH1, MSH2, PMS1, PMS2, MSH6, és MSH3. Ezek alulexpressziója, kiesése a ciszplatin rezisztenciában többszörösen megfigyelt jelenség [86-88].

A transzléziós szintézisről (más néven replikációs bypass) akkor beszélünk mikor a DNS szintézis, replikáció megtörténik a kijavítatlan hibák jelenlétének ellenére. Ehhez egy speciális DNS polimeráz osztályra is szükség van (polimeráz β, η, ζ, ι) a klasszikus polimerázok (α, δ, ε) nem képesek a léziók átugrására [89, 90]. Az MLH1 és MSH6 mutációk kapcsolhatóak a megnövekedett transzléziós szintézis aktivitáshoz is. A transzléziós polimerázok és az MLH1 megváltozott expressziója, mutációja szintén megfigyelhető platina rezisztenciában [91].

A platina bekötése indukálhat szálon belüli keresztkötéseket is, amelyek kettős törésekhez vezethetnek. Ezek a hibák normálisan a sejtciklus S fázisában a homológ rekombináció folyamata révén javítódnak. A homológ rekombinációs gépezet két kulcsfontosságú molekulája a BRCA1 és BRCA2 gének termékei. Ezek mutációja a familiáris emlő és petefészek daganat háttérmechanizmusa [92] (petefészek daganatokra vonatkoztatva: BRCA1 mutáció esetén az esély a petefészekrák megjelenésére 50 éves kor előtt 70%, BRCA2 mutáció esetén 20% [93]). A mutáns gént hordozó daganatokban a homológ rekombináció hibás, így a daganat érzékenyebb a platina ágensekre [94].

Ismert az a jelenség, amikor egy másodlagos mutáció helyreállítja a BRCA funkciót és a sejt így elveszíti platina érzékenységét [95].

3.5.3.4. Post-target rezisztencia

A sejtpusztulás szabályozásában számos molekula, ellenőrző és védelmi mechanizmus vesz részt, és ezek mindegyikén létrejöhet a post-target rezisztencia, az apoptotikus jelátviteli utak megváltozásától kezdve a sejtpusztulásért felelős gépezet aberrációjáig. Mivel a daganatsejtek alapvetően hajlamosak az apoptózis elkerülésére [10, 96], ezeket a mechanizmusokat ritkán tekinthetjük a platina specifikus rezisztencia részeinek, jellemzően védenek minden DNS károsító anyaggal szemben [31]. A platina ágensek citotoxikus hatásmechanizmusában a többnyire p53 függő BAX és BAK1 aktivációt követi a mitokondriális külső membrán permeabilizáció, majd ennek hatására kaszpáz függő és független úton beállhat a sejthalál. Így a post-target platina rezisztenciában fontos elem a p53 jelátvitel elégtelensége [97], a vad típusú p53-at hordozó petefészek daganatos betegek érzékenyebben reagálnak a ciszplatin terápiára [98].

3.5.3.5. Off-target rezisztencia

A daganatsejtek érzékenységét a platinával szemben limitálhatják olyan változások, amik a platina hatását kompenzáló túlélési, osztódási jeleket generálnak a sejtben. Az off target rezisztencia mechanizmusok definíciószerűen nem a platina hatására aktiválódnak, bár sokszor nem tudunk eleget a háttérmechanizmusról, ahhoz hogy ezt kijelenthessük.

Példa az off-target rezisztenciára a HER2 felülexpresszió, ami intenzív túlélési szignált közvetít a PI3K/Akt útvonalon (bár, ahogy eddig is, a nagy beteganyagon dolgozó klinikai vizsgálatok ellentmondásos eredményekre vezetnek [99] és az újabb tanulmányok nem találják meg a sejtetett korrelációt [100]). A jelátvitel alsóbb elemeit (PI3K [101], ciklin E [102]) szintén kapcsolatba hozta néhány tanulmány a platina rezisztenciával.

Emellett megfigyelhető olyan általános stressz válaszok túlműködése, mint az autofágia, hősokk reakció, amiket *in vitro* vizsgálatokban szintén kapcsolatba hoztak a platina rezisztenciával [103, 104].

Újabban kerül a figyelem középpontjába a mikrokörnyezet szerepe a rezisztenciában és egyre több tanulmány mutat rá, hogy a platina rezisztencia nem csak intracelluláris eredetű lehet. A ciszplatin más kemoterápiákhoz képest sokkal kisebb hatékonysággal indukál immunogén választ [105] és a mikrokörnyezet mezenchimális sejtjei, sztróma elemei is jelentősen befolyásolják a platina érzékenységet [106].

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a platina rezisztencia rengeteg úton létrejöhet, számos folyamat ezek közül alapvetően kapcsolható a tumor kialakulásához és a malignitáshoz, a daganatsejtek általánosan jellemző sajátossága. A platina rezisztencia jellemzően multifaktoriális jellegű, több egymástól független molekuláris változás támogatja az erősen rezisztens fenotípus kialakulását sőt, a rezisztencia akár a daganatsejten kívülről, a mikrokörnyezetből is eredhet. Ez a komplexitás, multifaktoriális jelleg megkérdőjelezi a kemoszenzitizáló ágensek fejlesztésének potenciálját.

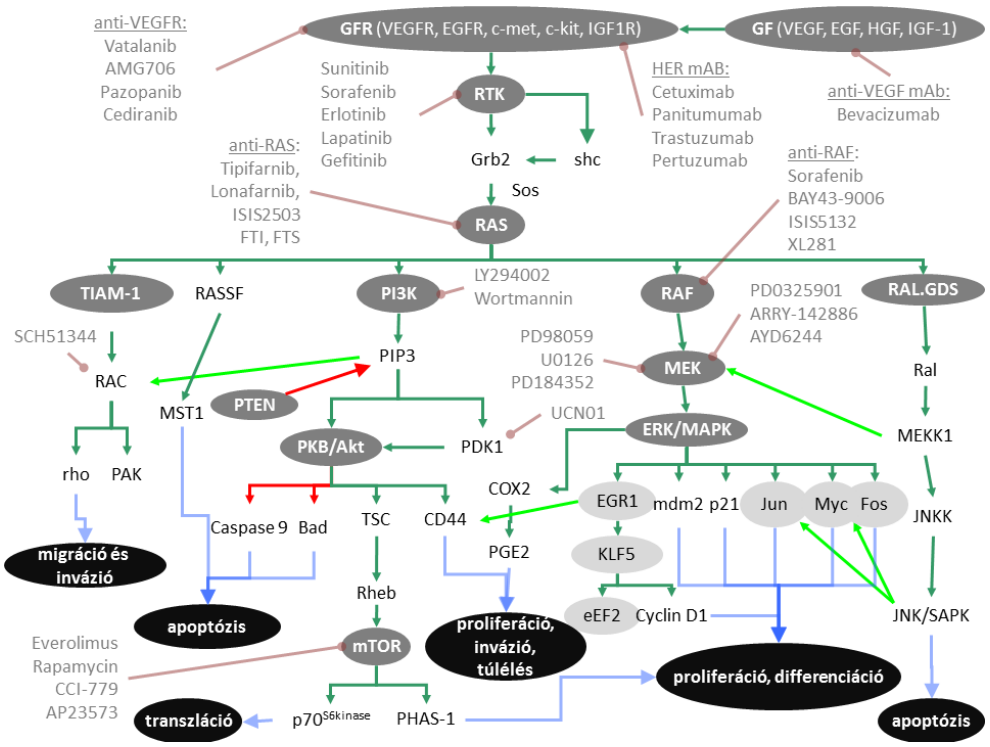
3.6. Tirozin-kináz inhibitorok és a velük szembeni rezisztencia

3.6.1. **Tirozin-kinázok, RAS jelátvitel**

A tirozin-kinázok szerepe főként jelátviteli rendszerek működtetésében van, szemben a szerin és treonin kinázokkal. A foszforilált tirozin fiziológiás pH-n hasonló stabilitású, mint a foszforilált szerin vagy treonin, azonban a foszforilált tirozint tartalmazó fehérjék féléletideje alacsony, és a tirozin-kináz molekulák erős negatív reguláció alatt állnak, így a foszforilált tirozin-kináz szubsztrátok aránya jellemzően alacsony a sejtben. Ez az alacsony koncentráció és annak szigorú szabályozása teszi lehetővé a jelátviteli szerep betöltését [107]. A jelátvitelhez nélkülözhetetlen a foszforilált tirozint nagy affinitással felismerő SH2 doménnal rendelkező jeltovábbító molekulák jelenléte [108].

A tirozin-kinázoknak két típusa a nem-receptor tirozin-kinázok (nem membránkapcsoltak, lokalizációjuk döntően citoplazmatikus, esetleg magi (pl.: c-Abl [109]) és a receptor tirozin-kinázok (ezek extracelluláris N-terminálisa ligand kötő

funkcióval bír, tartalmaznak egy transzmembrán és egy intracelluláris (kináz aktivitású) részt). A receptor tirozin-kinázok az inzulin receptoron kívül monomer formában vannak jelen a sejtmembránban. A ligandkötés indukálja dimerizációjukat és az aktiváló auto-, keresztfoszforilációt az intracelluláris doménen, ami az intracelluláris jelátvitel elindítója. Az általunk használt gyógyszerek elsődleges támadási célpontja a VEGFR, PDGFR és EGFR család tagjai. A családok tagjai igen komplex, a sejt túlélésével, proliferációjával, differenciációjával, migrációjával és vaszkularicázióval kapcsolatos szignáltranszdukciós kaszkádok élén állnak. A receptorcsaládok, illetve a jelátviteli útvonalak egyes elemeinek aberráns aktivitása, regulációs zavarai (felülexpresszió, mutáció, konstitutív aktiváció) gyakran szerepet játszanak a tumorgenezisben és a progresszióban, és számos rosszindulatú kórkép esetén rosszabb prognózissal járnak [110-115]. Az útvonalak központi eleme a RAS fehérje. A RAS jelátvitel jelentőségét jól jellemzi, hogy rengeteg daganatellenes gyógyszer és hatóanyag létezik, melyek a jelátviteli kaszkád egyes elemeit célozzák. A jelátvitel vázlatát és a gyógyszertámadási pontokat Győrffy és Schäfer összefoglaló munkája alapján [116] a **4. ábrán** mutatom be.



3. ábra: A RAS jelátvitel vázlata a különböző támadáspontú gyógyszerekkel. Módosított ábra [116] alapján.

Az EGFR család négy tagja (EGFR/ErbB1/HER1; ErbB2/Neu/HER2; ErbB3/HER3; ErbB4/HER4) egy transzmembrán egyszeres hélix régióval, egy extracelluláris ligandkötő régióval és egy intracelluláris kináz aktivitással bíró régióval rendelkezik [117]. A tagok közül a HER2 un. árva receptor, saját ligandkötő képességgel nem rendelkezik, ellenben igen aktív heterodimerizációs partner. A HER3 pedig kináz aktivitással nem rendelkezik, így ez a molekula is csak heterodimerben aktív **(2. táblázat**).A VEGFR család három fő tagja a VEGFR1, VEGFR2 és VEGFR3, ezek a VEGFA, B, C, D kötésén keresztül aktiválódnak és elsősorban angiogén jeleket közvetítenek, csakúgy, mint a PDGFR család elemei.

2. táblázat: Az EGFR család tagjainak főbb jellemzői.

	EGFR	HER2	HER3	HER4
Ligandok	EGF, AR, TGFα, BTC, HB-EGF, EPR	nem ismert	NRG1, NRG2	NRG1, NRG2, NRG3, NRG4, BTC, HB-EGF, EPR
Tirozin-kináz domén	van	van	nincs	van
Dimerizáció	ligand kötés után	folyamatosan	ligand kötés után	ligand kötés után

3.6.2. **Tirozin-kináz inhibitorok**

A tirozin-kináz inhibitorok kis molekulájú, a sejtmembránon diffúzióval átlépő hatóanyagok. Vizsgálatainkban a sunitinib, sorafenib, lapatinib, erlotinib, gefitinib hatóanyagok szerepeltek. A gefitinib és az erlotinib EGFR inhibitorok, a lapatinib célpontja az EGFR mellett a HER2, a sunitinib és a sorafenib pedig szélesebb spektrumú multikináz inhibitorok. Bár mindegyik hatóanyaghoz köthető egy daganattípus, melyben használata elterjedt, rengeteg klinikai teszt fut változatos daganattípusokban a hatékonyság felmérésére és az indikációs panel szélesedik.

- **Gefitinib:** A gefitinib az első leírt szelektív EGFR inhibitor, az EGFR ATP kötő zsebéhez köt, elsősorban EGFR funkciónyeréses mutációt, túlaktivációt hordozó daganatokban aktív [118].
- **Erlotinib:** Az erlotinib szintén EGFR inhibitor és az aktiváló mutációt hordozó tüdőrákokban alkalmazzák első sorban [119].
- **Lapatinib:** EGFR, HER2 inhibitor, HER amplifikációval, felülexpresszióval rendelkező emlődaganatok az elsődleges célcsoport, azonban a teljes válaszadási ráta még ebben a racionálisan szelektált célcsoportban is csupán 24% [120].
- **Sunitinib:** Multikináz inhibitor, célpontjai a PDGFR, VEGFR1,2,3, KIT, RET, CSF1R, gasztrointesztinális-sztromális tumorok és veserákok kezelésében használt elsősorban.
- **Sorafenib:** A sorafenib angiogén receptorokat (PDGFR-beta, VEGFR1,2,3) és a KIT, RET, RAF kinázokat gátolja [121, 122], világossejtes veserákban 10%-os válaszadási rátával [123] alkalmazzák.

3.6.3. **Tirozin-kináz inhibitorokkal szembeni rezisztencia**

Az EGFR inhibitorok közül a gefitinib az első az erlotinib a második leírt szelektív inhibitor, elsősorban EGFR funkciónyeréses mutációt, túlaktivációt hordozó daganatokban aktívak [118]. Nem kissejtes tüdőrákokban az EGFR-t érintő mutációk több mint 90%-a a 19-es vagy a 21-es exonban keletkezik. A konstitutívan aktív, megváltozott szerkezetű EGFR foszforilálja a HER3 receptort majd a PI3K/Akt útvonalon át proliferációs, túlélési szignálokat továbbít [124]. Az erlotinib és gefitinib szenzitivitás elsődleges biomarkere az EGFR mutáció megléte [125, 126]. Ugyanakkor még ezek között a kezdetben jól reagáló betegek között is igen gyorsan megjelenik a rezisztencia és az átlagos progressziómentes túlélés csupán 8-10 hónap [127, 128]. Ennek hátterében gyakran egy szekunder (T790M) aktiváló mutáció az EGFR molekulában áll [126, 129, 130]. A rezisztencia kiküszöbölésében szerepe lehet a széles spektrumú ErbB-gátló gyógyszereknek (canertinib) és a HER3 gátlóknak (MM–121).

A HER2 molekulában a lapatinib rezisztenciát és szenzitivitást előrejelző mutációkat is ismerünk [131-133]. A kompenzáló útvonalak aktivációja, például PI3K/Akt útvonal, vagy ösztrogén jelátvitel, szintén okozhatnak rezisztenciát, ahogy például az ADAM17 által mediált ERB2, ERB3 aktiválódás is [134].

A sunitinib és a sorafenib elsősorban antiangioigén terápiaként került bevezetésre, de hamar kiderült, hogy direkt daganatellenes hatásuk is van és *in vitro* is igen hatékonyak. Egy metaanalízisből (1056 eset alapján) megtudhatjuk, hogy a betegek 26%-a már első vonalban sem reagál a sorafenib és sunitinib kezelésre [135] és a kezdetben jól reagáló betegek jó része is 6-12 hónapon belül rezisztens betegséggel progrediál, a kezelés ellenére. A szerek antiangiogén hatásával szemben kialakuló rezisztencia alapvető modelljei a következőek: alternatív angiogén útvonalak aktiválódása („angiogén kapcsolás”), a tumorerek megnövekedett pericita borításán keresztüli stabilizációja, csontvelői eredetű pro-angiogén gyulladásos sejtek vonzása és aktivációja a daganatban és végül megnövekedett szöveti invazivitás, ami az angiogenezis szerepét csökkenti [136].

A tirozin-kináz inhibitorokkal szembeni rezisztenciában jellemzően nem a klasszikus rezisztenciafaktorokkal kell számolnunk. Gyakori jelenség a célmolekula változása másoldagos mutációval és a kompenzáló útvonalak aktivációja. Ugyanakkor a rezisztencia itt is multifaktoriális természetű. Az alacsony válaszadási arányok és a kezdeti válasz ellenére is igen gyorsan megjelenő rezisztencia indokolja a további rezisztencia és biomarker kutatást.

4. Célkitűzések

PhD munkám során elsősorban a szisztémás kezelésekkel szembeni rezisztencia kimutatására alkalmas biomarkerek keresésével foglalkoztam két specifikus rendszeren (öt tirozin-kináz inhibitorral szembeni rezisztencia vizsgálata teljes génexpressziós adatok alapján, illetve a platina rezisztencia biomarkerei petefészek daganatokban).

Célkitűzéseim a következőek az egyes témákkal kapcsolatban:

- A platina rezisztencia vizsgálatát célzó kísérletsorozatban a platina rezisztencia illetve a platina kezelés utáni túlélés előrejelzésére potenciálisan alkalmas biomarkerek keresése volt a cél, ehhez az alábbi részcélok elérését tűztük ki:
    - Adatbázist építettünk mely platinával kezelt orvárium karcinómás betegekből származó tumor minták microarray adatait és klinikai adatokat (kezelés, terápiás válasz, túlélés) tartalmaztak.
    - Az adatbázis alapján meghatároztuk azokat a géneket melyek magas expressziója rezisztenciával társult.
    - Az így kijelölt potenciális biomarker gének expressziójának hatását a rezisztenciára több *in vitro* rendszerben vizsgáltuk, petefészek karcinóma eredetű sejtvonalakon.
    - Az *in vitro* vizsgálatokban géncsendesítés vagy gyógyszeres gátlás által szenzitizáló hatást elérő géneket két független klinikai mintahalmazon qRT-PCR-el RNS, immunhisztokémiával pedig fehérje szinten validáltuk.
- A célzott tirozin-kináz inhibitorokkal szembeni rezisztencia biomarkereinek vizsgálata során microarray adatok és *in vitro* gyógyszer-érzékenységi vizsgálatok segítségével potenciális rezisztencia biomarkereket azonosítottunk a sunitinib, sorafenib, lapatinib, gefitinib és erlotinib gyógyszerekkel szemben, amihez a következő részcélokat tűztük ki:

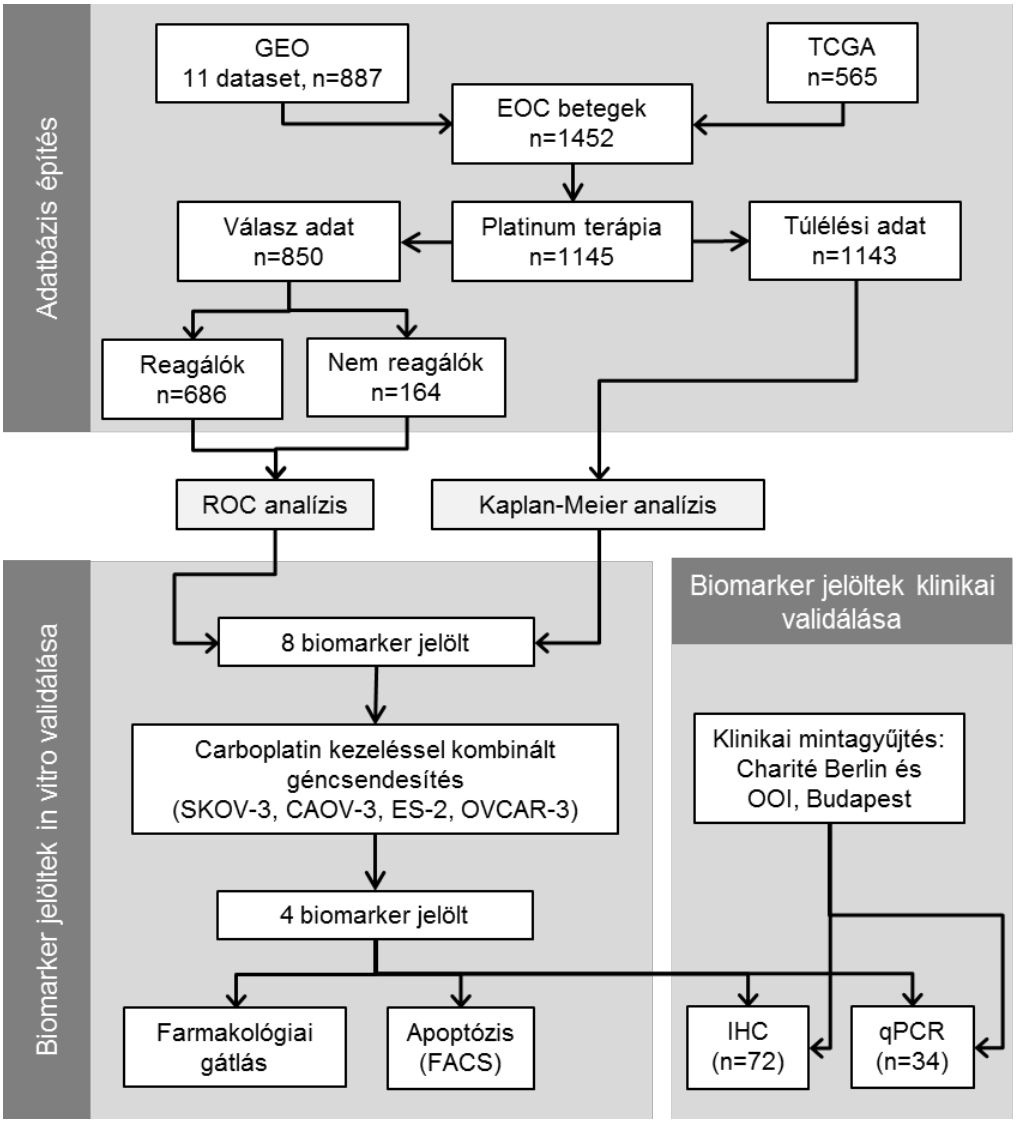
- 45 sejtvonal (15 különböző tumor típusból) *in vitro* szenzitivitásának vizsgálata az öt gyógyszerrel szemben.
- A sejtvonalak microarray adatai alapján a rezisztenciával és a szenzitivitással asszociálhatóan eltérő expressziójú gének azonosítása.
- A multirezisztencia, illetve gyógyszer specifikus rezisztencia gének azonosítása.
- A sunitinib rezisztenciával asszociált gének szerepének klinikai validálása immunhisztokémiával metasztatikus vesesejtes karcinóma mintákon.

A célunk tehát mindegyik vizsgálatban olyan potenciális biomarkerek azonosítása volt, melyek nem a megelőző irodalom alapján válogattunk, hanem nagy adathalmazok újrafeldolgozásával, a teljes génexpressziós változások elemzésével kerültek felszínre. Az így azonosított biomarkereket mindenkor igyekeztünk független klinikai mintahalmazon is validálni. Az általunk azonosított potenciális biomarkerek további klinikai és funkcionális vizsgálatok alapját képezhetik és árnyalhatják a rezisztenciáról kialakult képet.

5. Módszerek

Mindegyik vizsgálatban bioinformatikai, adatbányászati módszereket ötvöztünk *in vitro* kísérletes munkával és független klinikai mintákon történő validálással.

5.1. A carboplatin rezisztencia vizsgálata során használt módszerek (5. ábra)



5. ábra: A platina rezisztencia biomarkereinek keresését célzó vizsgálataink folyamatábrája.

5.1.1. **Adatbázis építés**

A GEO (Gene Expression Omnibus) (http://www.pubmed.com/geo) és a TCGA (The Cancer Genome Atlas) (http://cancergenome.nih.gov) adatbázisokat vizsgáltuk át megfelelő adatokat keresve. Olyan publikációkat kerestünk, ahol ovárium karcinómával kezelt betegek microarray adatait közölték. Feltétel volt, hogy legalább húsz beteg szerepeljen a vizsgálatban, legyenek elérhető kezelési és túlélési adatok és a nyers microarray adatok elérhetőek legyenek. Három microarray platformot, a GPL96 (Affymetrix HG-U133A), a GPL570 (Affymetrix HG-U133 Plus 2.0), és a GPL571/GPL3921 (Affymetrix HG-U133A 2.0) használtunk fel. A kinyert microarray és klinikai adatokból megépítettük a saját adatbázisunkat, ahol a beteg azonosítójához a génenkénti expresszió és a klinikai adatok (túlélési, klinikai válasz és kezelési adatok) csatolódtak.

5.1.2. **Bioinformatikai feldolgozás**

Az adatok értékelését R statisztikai környezetben [137] végeztük, ami egy speciálisan statisztikai számításokhoz és ábrázoláshoz tervezett programozási nyelv. A programozáshoz az interneten elérhető "csomagok" (R packages) nyújtanak segítséget, melyek a már kódolt függvényeket tartalmaznak.

5.1.2.1. Normalizálás

Az adatok összehasonlíthatóságának, és a bioinformatikai elemzés feltétele a normalizálás. A nyers microarray .CEL kiterjesztésű fájlokat normalizáltuk a MAS5 normalizálással az affy Bioconductor könyvtár segítségével [138].

A MAS 5.0 normalizációs algoritmus három fő része: a háttérzaj korrekció, a jel intenzitásának mérése és a skálázás. A háttérzaj korrekcióhoz a chipet 4x4-es régiókra osztja, majd a régió háttérzajának (minden zónában a legalacsonyabb 2% intenzitása) átlagát levonja minden egyes próba értékéből. A mismatch (MM) próba mérése különösen fontos a normalizációban, mert az egyes perfect match (PM) próbákhoz kontrollt biztosít a háttér direkt mérésével. Általánosságban a jel értéke a PM-MM érték alapján számolható ($PM > MM$ esetén). Azonban, ha $MM > PM$, az algoritmus figyelembe veszi a próba halmazban található próba párok jel erősségét: nagy jel

erősség esetén ennek egy közelítő értékével helyettesíti MM értékét, alacsony jel erősség esetén az MM-hez tartozó PM értékénél kisebb lesz. A próba halmaz értékét Tukey-féle statisztikával számolja a próba párokból. Különbségek lehetnek a chip készítésének során (pl. a hibridizációs folyamatban), melyek az átlagos intenzitás különbségét okozhatják az egyes chipekben. Ezért az algoritmus alkalmaz egy skálázást is, melynek eredménye, hogy a chipek átlagos intenzitása az előre beállított értéket adja.

5.1.2.2. JetSet szűrés

A JetSet szűrést végeztünk és minden génre csak a legjobb próba szetteken végeztük el az statisztikai analízist. Az egyes gének több próba szettel reprezentáltak a microarray-en, a JetSet segít kiválasztani azokat a próba szetteket, amely specificitásban, hasítási izoforma lefedettségben a legtökéletesebbek, és a mérés közbeni transzkriptum degradáció hatását a leghatékonyabban zárják ki [139].

5.1.2.3. ROC analízis

Ahhoz, hogy megtaláljuk a biomarker jelöltjeinek, azaz azonosítsuk azokat a géneket amelyek felülexpressziója legerőteljesebben járt együtt a kezelésre rossz választ adó (intrinsic rezisztens) betegséggel, Receiver Operatin Caracteristic elemzést végeztünk. Az ROC diagnosztikus tesztek hatékonyságát kiértékelő eljárás, illetve alkalmas arra, hogy több teszt (esetünkben több potenciális biomarker) hatékonyságát vessük össze. Egy klinikai teszt hatékonyságát klasszikusan a specificitással és a szenzitivitással jellemezzük.

$$Specificitás = TP/(TP + FN)$$

$$Szenzitivitás = TN/(TN + FP)$$

ahol:

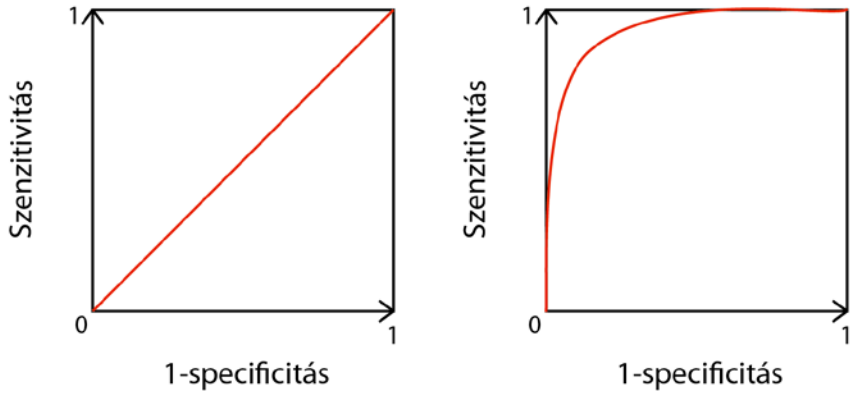
$TP = valós\ pozitív\ esetek\ száma$

$FP = fals\ pozitív\ esetek\ száma$

$TN = valós\ negatív\ esetek\ száma$

$FN = fals\ negatív\ esetek\ száma$

Az ideális teszt, biomarker esetén a szenzitivitás és a specificitás értéke egyaránt 1. A valóságban ez igen ritkán jön létre, ezzel szemben a szenzitivitás és a specificitás trade-off-ban állnak egymással és a határérték meghúzása egy optimalizációs probléma. A ROC ennek az ábrázolásában van segítségünkre. A ROC diagram x tengelyén az 1-specificitás, y tengelyén a szenzitivitás értéket láthatjuk. A teszt akkor tökéletes, ha a ROC görbe a bal felső sarokban fut, ilyenkor a jó és rossz prognózisú (progrediáló vagy gyógyuló stb.) betegeket, tumorokat jellemző értéktartomány az adott mért biomarkerre nem fedi egymást. Ha a vizsgált marker nem képes elkülöníteni a két állapotot (esetünkben a kedvező és a kedvezőtlen klinikai választ mutató betegeket), akkor a görbe az egységnégyzet átlójában fut. A ROC görbe alatti terület (AUC, Area Under the Curve) jól jellemzi az egyes biomarkerek hatékonyságát. Ha a görbe a bal felső sarkon át fut, az érték egy, a marker tökéletesen tud szelektálni jó és rossz prognózis között. Ha az érték 0,5 akkor a görbe az átlóban fut, a marker nem alkalmas a megkülönböztetésre (**6. ábra**).



6. ábra: Szeparációra nem képes (baloldal) és optimálisan szeparáló (jobb oldal) biomarker ROC görbéje.

Elemzésünk során a microarray chip-en reprezentált összes génre lefutattuk az ROC elemzést minden platinakezelésben részesült beteg esetén, keresve azokat a géneket, melyek magas expressziója a jó és rossz klinikai választ mutató betegeket el tudja különíteni. AUC érték és szignifikancia alapján válogattuk ki a diszkriminációra legalkalmasabb biomarker jelölteket.

5.1.3. **Sejtkultúra**

A sejteket 5% CO_2 tartalom mellett 37 Celsius fokon tenyésztettük termosztátban. A sejteket 10% foetalis borjú szérummal és antibiotikumokkal (penicillin-sztreptomicin, amfotericin B és tetraciklin *(Life Technologies)*) kiegészített RPMI 1640 médiumban *(PAA, Gibco)* tenyésztettük. A transzfekciós kísérletek alatt és előtt antibiotikum mentes médiumot használtunk. Négy sejtvonalat használtunk a kísérletekben, mindegyiket az ATCC-től (American Type Culture Collection) rendeltük. Ezek a CAOV-3, SKOV-3, OVCAR-3, ES-2 petefészek karcinóma eredetű vonalak.

5.1.4. **Mikoplazma:**

A mikoplazma fertőzöttség gyakori jelenség sejtkultúrás körülmények közt és a kísérleti eredményeket könnyen befolyásolhatja. A kísérletek megkezdése előtt a Mycosensor PCR Assay Kit-el *(Agilent)* ellenőriztük a sejtvonalak mikoplazma mentességét. A kitet a használati útmutatónak megfelelően alkalmaztuk. Amennyiben a fertőzés fenn állt, a BM-cyclin *(Agilent)* kétkomponensű antibiotikum reagensét vagy ciprofloxacint használtunk a fertőzés eliminálására. A ciprofloxacint 14 napig alkalmaztuk 10 µg/ml-es dózisban, majd egy hetes antibiotikum mentes tenyésztés után újra ellenőriztük a mikoplazma fertőzöttséget. A BM cyclin kétkomponensű antibiotikumot a használati útmutatónak megfelelően alkalmaztuk három hétig, majd az előzőeknek megfelelően ellenőriztük a mikoplazma mentességet.

5.1.5. **Sejtvonal eredet igazolás**

A sejtvonal eredet igazolást a humán genom 10 specifikus lókuszán végzett SRT (short tandem repeat) analízissel végeztük. A sejtvonalak genomi DNS-ét DNeasy kittel *(Qiagen)* izoláltuk a használati útmutatónak megfelelően. Az izolált DNS mennyiségét és minőségét a Nanodrop ND-1000 spektrofotométerrel ellenőriztük. A DNS koncentrációt, a fehérje koncentrációt és a minta tisztaságát mértük és a megfelelő mennyiségű és tisztaságú genomi DNS-en az SRT analízist a Johns Hopkins egyetem Fragment Analysis Facility-jének StemElite ID System-ével végeztük. A sejtvonalak SRT profilját a Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and

Cell Cultures (http://www.dsmz.de) SRT adatbázisához hasonlítottuk. Mindegyik felhasznált sejtvonal tiszta és eredeti volt.

5.1.6. **Gyógyszerek**

A gyógyszer-érzékenységi tesztekben a carboplatint vízben oldottam, a PD032591 MEK1 inhibitort *(Life Technologies)* DMSO-ban (dimetil szulfoxid, *Life Technologies)*, majd tovább oldottam médiumban, úgy hogy a kezelés során wellenként 0,5% DMSO-t kapjanak a sejtek. A felhasznált gyógyszer-koncentrációkat a **3. táblázatban** foglaltam össze.

3. táblázat: A gyógyszer-érzékenységi tesztekben használt carboplatin és MEK1 inhibitor koncentráció sorok.

Carboplatin dózisok		PD032591 dózisok	
µg/ml	µM	µg/ml	nM
1	2,7	0,05	0,1
3	8,1	0,5	1
6	16,2	4,8	10
10	26,9	12,1	25
30	80,8	24,1	50
60	161,6	48,2	100
100	269,4	96,4	200
200	538,7	192,8	400
400	1077,4	400,0	829,532

5.1.7. **Gyógyszer-érzékenységi teszt**

A gyógyszerérzékenység vizsgálatához MTT tesztet *(Roche)* [140] használtunk a korábban ismertetettnek megfelelően [5]. Első nap a sejteket steril 96 lyukú mikrotitráló lemezekbe helyeztük 10 000 sejt / 90 µl médium lyukankénti mennyiségben, hatszoros ismétlésben. A sejteket éjszakára inkubátorba helyeztük, majd a sejtek letapadását követően, második nap a sejtekhez hozzáadtuk a gyógyszereket (10 µl oldat / lyuk mennyiségben), a kontroll csak a gyógyszer oldószerét kapja. 48 órás gyógyszerkezelés után a sejteket megfestjük az MTT kit labeling reagent-el (10 µl / lyuk), négy óra inkubáció után (37 Celsius fokon) a kialakult formazánkristályokat a kit szolubizáló

reagensének hozzáadásával feloldjuk (100 µl / lyuk). A lemezeket spektrofotométerrel *(Thermo Scientifc Multiskan FC)* olvastuk le. 595 és 690 nm-es hullámhosszon mértük az abszorbanciát. Az 595 nm-en mért abszorbancia értékből kivonjuk a 690-en mért értékeket (ezzel kiszűrve a háttérzajt).

A carboplatint vizes oldatban alkalmaztuk 10 µl/lyuk mennyiségben. A DMSO-ban oldódó PD032591-t úgy alkalmaztuk, hogy a DMSO koncentráció 0,5 % / well legyen, ami még nem túlságosan toxikus a sejtek számára. A kombinációs kísérletekben a csak carboplatinnal kezelt sejtek és a kontroll sejtek is megkapták a 0,5 % / well DMSO dózist.

5.1.8. **Géncsendesítés**

A géncsendesítés hatékonyságát qPCR-el mértük. A transzfekció beállításához GAPDH pozitív kontrol siRNS-t (kis interferáló RNS) *(Silencer Select, Life Technologies)* használtunk. A HiPefect *(Qiagen)*, Lipofectamine RNAiMax *(Life Technologies)* és Oligofectamine *(Life Technologies)* transzfekciós reagenseket teszteltük, különböző siRNS koncentrációk mellett. A legnagyobb csendesítési hatékonyságot 30 nM siRNS és a Lipofectamine RNAiMax transzfekciós reagens használatával értük el. A továbbiakban ezt használtuk a csendesítésekhez. A géncsendesítést a Lipofectamine RNAiMax használati útmutatójának ajánlásai szerint végeztük. Célgénenként két siRNS-t teszteltünk. A gyógyszeres vizsgálatokban a nagyobb csendesítési hatékonyságot mutatót használtuk fel.

5.1.9. **Géncsendesítéssel kombinált gyógyszer-érzékenységi teszt**

A biomarker jelölt génjeink *in vitro* hatását a carboplatin érzékenységre úgy vizsgáltuk, hogy a gének siRNS általi csendesítésével egy időben gyógyszerkezelést alkalmaztunk. Ezután összevetettük a sejtpusztulás arányát a gyógyszerkezelés hatására a géncsendesített sejtekben a nem csendesített sejtekével. Ahol szignifikánsan növekedett a gyógyszer okozta sejtpusztulás a géncsendesítés hatására, ott tekintettük a biomarker jelöltünket az *in vitro* teszten megfeleltnek.

Első nap a sejteket steril 96 lyukú mikrotitráló lemezekben 10 000 sejt / 90 µl médium lyukankénti mennyiségben a Lipofectamine RNAiMax transzfekciós reagens használati útmutatójának és az 5.1.8-ban leírtaknak megfelelően transzfektáltuk 30 nM-os siRNS koncentrációval. Kontrollként célgénnel nem rendelkező kontrol siRNS-t és kezeletlen sejteket alkalmaztunk. Másnap a transzfekciós reagenst tartalmazó médiumot lecseréltük az adott sejtvonal számított IC50 carboplatin dózisát tartalmazó médiumra. 48 órás gyógyszerkezelés után a sejteken elvégezzük az MTT tesztet az 5.1.7 szerint. A csendesítést el nem szenvedett sejteket a normál növekedés ellenőrzésére használtuk. A statisztikát a következő csoportokon végeztük: a kontrol siRNS-el transzfektált csoportban kiszámoltuk a gyógyszer kezelt sejtek relatív viabilitását a gyógyszert nem kapott sejtekéhez képest (itt körülbelül az előző méréseknek megfelelően 50%-ot vártunk), a célgénre komplementer siRNS-el transzfektált csoportban szintén a gyógyszert nem kapott sejtek viabilitásához normalizáltuk a gyógyszert kapott sejtek viabilitását (ezzel igyekeztünk kivédeni a gén csendesítése által okozott esetleges proliferációs ütem változás torzító hatását). Végül t-teszttel vizsgáltuk a túlélésbeli különbséget a normalizált gyógyszert és célgént kódoló siRNS-t kapott csoport és normalizált gyógyszert és kontroll siRNSt kapott csoport között. A szignifikancia limitet $p < 0{,}01$-nek állítottuk be.

5.1.10. Apoptózis vizsgálat

A carboplatin által indukált sejtpusztulás nem kizárólagosan apoptózis, de a legtöbb publikáció ezt a mechanizmust hangsúlyozza. A négy gént, amelyek csendesítése szignifikáns különbséget okozott a carboplatin kezelés hatására létrejövő sejtpusztulás mértékében, a FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I *(BD Pharmingen*) apoptózis tesztben is vizsgáltuk. A gyógyszerkezeléssel kombinált géncsendesítéseket, melyekben a hatást MTT teszttel mértük mind a négy sejtvonalon elvégeztük, ezt a tesztet csak a CAOV-3 sejtvonalon végeztük el, háromszoros ismétlésben. 300 000 transzfektált CAOV-3 sejtet kezeltünk az IC50 carboplatin dózissal 48 órán át, majd a kit használati útmutatójának megfelelően mértük az apoptótikus sejtek arányát FACSAria I *(BD Pharmingen*) készüléken. A negatív kontroll siRNS-el transzfektált sejtek apoptótikus arányát hasonlítottuk az egyes

célgénekkel csendesített sejtekéhez, t-tesztet végeztünk a szignifikancia ellenőrzésére. A szignifikancia limitet $p < 0{,}05$-nek állítottuk be.

5.1.11. A MEK1 gyógyszeres gátlása

Egy szelektív MEK1 inhibitor a PD0325901 esetleges szenzitizáló hatását is vizsgáltuk. Két sejtvonal (SKOV-3 és CAOV-3) esetén vettük fel a dózis-hatás görbéket a 5.1.7- ben tárgyaltaknak megfelelően. Ezután egy kombinációs kísérletet végeztünk, melyben a carboplatin körülbelüli IC50 dózisát és egy citotoxikus hatással nem bíró dózist alkalmaztunk önmagában, vagy a PD0325901 körülbelüli IC50 dózisával kombinációban. A pontos kezelési koncentrációk a következők voltak: SKOV-3 sejtvonal: carboplatin nagy koncentráció: 212 µM, carboplatin kis koncentráció: 141 µM, PD0325901 koncentráció: 554 nM. CAOV-3 sejtvonal: carboplatin nagy koncentráció: 111 µM, carboplatin kis koncentráció: 74 µM, PD0325901 koncentráció: 277 nM. 48 órás gyógyszerkezelés után az eddig tárgyaltakhoz hasonlóan MTT tesztel vizsgáltuk a sejtpusztulás mértékét. Az életképességet a kontroll oldattal kezelt sejtekhez normalizáltuk, t-tesztet végeztünk a szignifikancia ellenőrzésére. A szignifikancia limitet $p < 0{,}05$-nek állítottuk be.

5.1.12. Klinikai mintagyűjtés

A friss-fagyasztott mintákat az Országos Onkológiai Intézetben, a paraffinba ágyazott mintákat pedig a Charité Universitatmedizin-ben gyűjtöttük 2005 és 2010 között. A TMA-kat a Charité Universitatmedizin patológiáján készültek, a friss fagyasztott mintákat felhasználásig -80 Celsius fokon tároltuk.

A független mintákon végzett immunhisztokémiai és qRT-PCR mérések eredményeit felhasználva Cox-regressziót alkalmaztunk a biomarker jelöltek teljesítményének vizsgálatára. Kaplan-Meier túlélési görbéket illesztettünk. A túlélési görbe a túlélési valószínűségeket a túlélési idő függvényében ábrázolja. A függvény függőleges szakaszaiban bekövetkezett a betegséghez kapcsolható halálozás. Ha a beteg elhagyja a vizsgálatot, a betegségétől függetlenül elhalálozik, vagy a követése véget ér,

az adat cenzorált lesz. A Kaplan-Meier túlélési görbéket a WinSTAT 2013 szoftverrel generáltuk. A szignifikancia limitet $p < 0{,}05$-nek állítottuk be.

5.1.13. qRT-PCR

5.1.13.1. RNS izolálás

5.1.13.1.1 RNS izolálás sejtkultúrából

A sejttenyészetet enyhe tripszinizálás után lecentrifugáltuk és RNS-t izoláltunk RNeasy Kit-el *(Qiagen)* a használati útmutató szerint. Az izolált RNS mennyiségét és minőségét a Nanodrop ND-1000 spektrofotométerrel ellenőriztük. Az RNS koncentrációt, a fehérje koncentrációt és a minta tisztaságát mértük és a megfelelő mennyiségű és tisztaságú RNS-t használtuk a PCR-ek során.

5.1.13.1.2 RNS izolálás szövetmintából

A friss-fagyasztott mintákat 300 µl GITC (guanidinium thiocyanate) tartalmú lízis puffer-ben 3 µl b-mercaptoethanol-al Polytron homogenizátorban 30–40 sec-ig homogenizáltuk. 10 percig inkubáltuk 55 Celsius fokon Proteinase K *(Life Technologies)* oldatban. Az RNS-t RNeasy Kit-el *(Qiagen)* izoláltuk a használati útmutató szerint. DNáz I *(Life Technologies)* kezelés után az izolált RNS mennyiségét és minőségét a Nanodrop ND-1000 spektrofotométerrel és Bionalayzer-el *(Agilent)* ellenőriztük. Csak a megfelelő mennyiségű és tisztaságú RNS-t, amely szabályos 18S és 28S mintázatott mutatott, használtuk a PCR-ek során.

5.1.13.2. Reverz transzkirpció

Superscript II Reverse Transcriptase-t *(Life Technologies)* használtunk a reverz transzkripcióhoz, a használati útmutatónak megfelelően.

5.1.13.3. qRT-PCR

A primer tervezését a Primer3 szoftver segítségével végeztük. Génenként több primer párt teszteltünk. A PCR-eket 20 µl térfogatban, LightCycler 480 SYBR Green I Mastermixet *(Roche)* használva 50-100 ng kiindulási cDNS-ből, 0,5 µM-os primer koncentráció mellett végeztük. A méréseket Lightcycler 480-as *(Roche)* készüléken

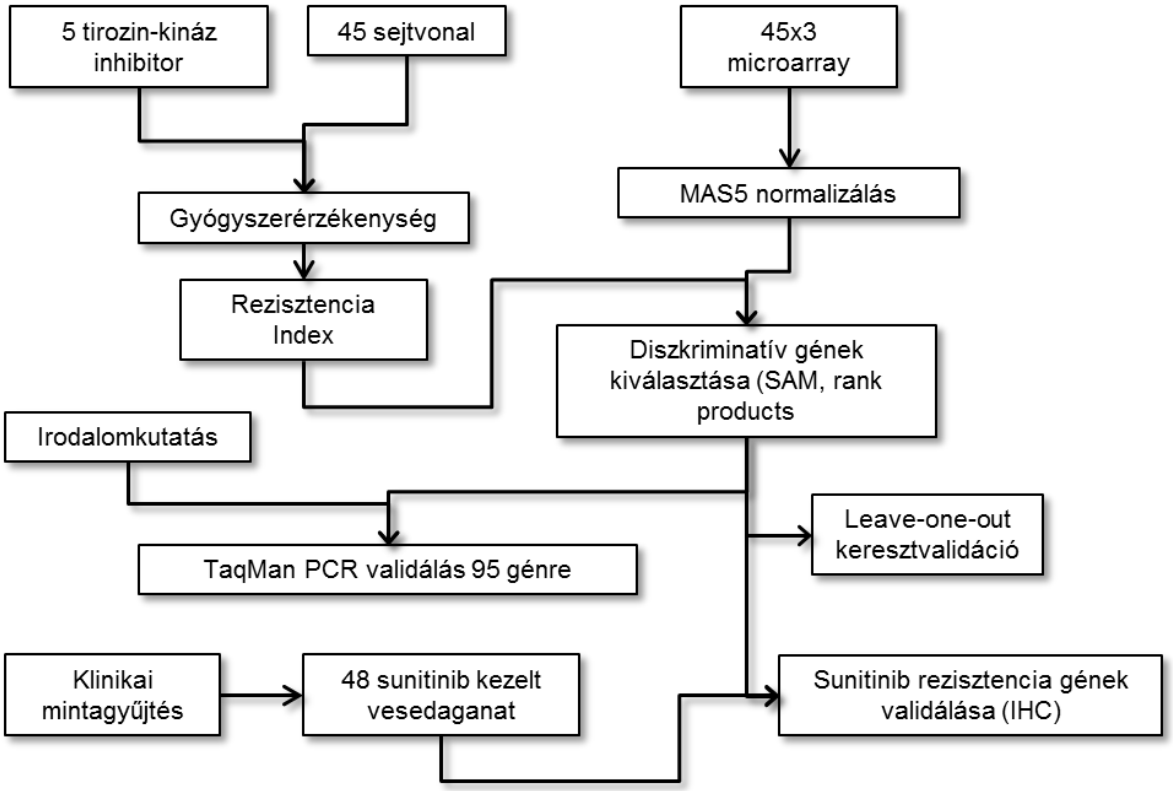
végeztük. Minden mintát minden génre háromszoros ismétlésben mértünk. GAPDH háztartási gént használtunk és a relatív expressziót a delta CT módszerrel számítottuk.

5.1.14. **Immunhisztokémia**

A TMA (szöveti microarray) blokkokból 4 µm vastagságú metszeteket készítettünk SuperFrost Ultra Plus *(Menzel)* üveg lemezekre. A deparaffinálást xilollal *(Reanal)* és felszálló alkoholsorral végeztük *(Reanal).* Metanolban *(Reanal)* oldott 1%-os hidrogén peroxid oldatot alkalmaztunk 30 percig az endogén peroxidáz blokkolására. A feltáráshoz a mintákat 500 ml 0,01 M töménységű nátrium-citrát citromsav (pH 6) oldatban főztük 40 percig, mikrohullámú sütőben. Lehülés után 1%-os marha szérum albumin *(Life Technologies)* oldatban voltak a metszetek 20 percig. Egy éjszakán át inkubáltuk a mintákat anti-MEK1 (1:50 hígítás; HPA026430 katalógusszámú antitest, *Sigma Aldrich* gyártótól) antitesttel, majd a NovoLink detektáló kitet *(Leica-NovoCastra)* és húsz percig peroxidáz detektáló reagenst használtunk. A peroxidáz aktivitást a DAB (diaminobenzidin) hidrogén peroxid kromogén-szubsztrát hozzáadásával, mikroszkópos kontroll mellett vizsgáltuk. Végső lépésben hematoxylin festést végeztünk. Az egyes lépések között 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) TBS mosást alkalmaztunk. A lemezeket Pannoramic Scan 150 *(3DHISTECH)* segítségével digitalizáltuk x20/NA0.8 *Zeiss* Plan Apochromat objektívvel és HV-F22 3-chip CCD SXGA kamerával *(Hitachi),* majd a Pannoramic Viewer 1.52.2 szoftver segítségével elemeztük egy 24” Benq LED monitoron. Betegenként négy minta festődésének átlagát vettük figyelembe a statisztikai kiértékelés során.

5.2. A célzott terápiás szerekkel szembeni rezisztencia vizsgálata során alkalmazott módszerek

A kísérletek felépítését és a használt módszereket a **7. ábrán** foglalom össze.



7. ábra: A tirozin-kináz inhibitorokkal szembeni rezisztencia vizsgálatának felépítése.

5.2.1. **Sejtkultúra**

A 45 ATCC sejtvonalat 5% CO_2 tartalom mellett 37 Celsius fokon tenyésztettük termosztátban. A sejteket 10% foetalis borjú szérummal és antibiotikumokkal (penicillin-streptomycin, amphotericin B és tetracycline) kiegészített RPMI 1640, McCoy, DMEM vagy Leibowitz-15 *(PAA, GIBCO)* médiumban tenyésztettük, az ATCC előírásainak megfelelően. A sejtvonalak eredetiségét 5.1.5 fejezetben tárgyaltak szerint vizsgáltuk. A sejtvonalakat a **4. táblázatban** jellemzem.

4. táblázat A tirozin-kináz inhibitorok biomarkereinek vizsgálatában felhasznált sejtvonalak jellemzői.

Sejtvonal	Szerv	Forrás	Katalógusszám	Médium	Letapadó/úszó
A-375	Bőr	ATCC	CRL-1619	DMEM	Letapadó
A-427	Tüdő	ATCC	HTB-53	DMEM	Letapadó
A-498	Vese	ATCC	HTB-44	DMEM	Letapadó
AN3-CA	Méh	ATCC	HTB-111	DMEM	Letapadó
BT-20	Emlő	ATCC	HTB-19	RPMI 1640	Letapadó
C-33A	Méhnyak	ATCC	HTB-31	DMEM	Letapadó
C-4 I	Méhnyak	ATCC	CRL-1594	RPMI 1640	Letapadó
C-4 II	Méhnyak	ATCC	CRL-1595	RPMI 1640	Letapadó
CAOV3	Petefészek	ATCC	HTB-75	DMEM	Letapadó
CCRF-CEM	Vér	ATCC	CCL-119	RPMI 1640	Úszó
ChaGo-K-1	Tüdő	ATCC	HTB-168	RPMI 1640	Letapadó
COLO-668	Tüdő	ECACC	87061209	RPMI 1640	Letapadó
DMS-114	Tüdő	ATCC	CRL-2066	Waymouth	Letapadó
DMS-79	Tüdő	ATCC	CRL-2049	Waymouth	Úszó
ES-2	Petefészek	ATCC	CRL-1978	RPMI 1640	Letapadó
HCT-15	Vastagbél	ATCC	CCL-225	RPMI 1640	Letapadó
HCT-8	Vastagbél	ATCC	CCL-244	RPMI 1640	Letapadó
HEC-1-B	Méh	ATCC	HTB-113	DMEM	Letapadó
Hep-3B	Máj	ATCC	HB-8064	RPMI 1640	Letapadó
HOS	Kötőszövet	ATCC	CRL-1543	RPMI 1640	Letapadó
HT-1080	Kötőszövet	ATCC	CCL-121	DMEM	Letapadó
K-562	Csontvelő	ATCC	CCL-243	RPMI 1640	Úszó
MCF-7	Emlő	ATCC	HTB-22	Leibovitz's L- 15	Letapadó
MOLT-4	Vér	ATCC	CRL-1582	RPMI 1640	Úszó
NCI-H1650	Tüdő	ATCC	CRL-5883	RPMI 1640	Letapadó
NCI-H1975	Tüdő	ATCC	CRL-5908	RPMI 1640	Letapadó
NCI-H1993	Tüdő	ATCC	CRL-5909	RPMI 1640	Letapadó
NCI-H358	Tüdő	ATCC	CRL-5807	RPMI 1640	Letapadó
NCI-H441	Tüdő	ATCC	HTB-174	RPMI 1640	Letapadó
NCI-H661	Tüdő	ATCC	HTB-183	RPMI 1640	Letapadó
NCI-H69	Tüdő	ATCC	HTB-119	RPMI 1640	Úszó
NCI-H82	Tüdő	ATCC	HTB-175	RPMI 1640	Úszó
RAJI	Vér	ATCC	CCL-86	RPMI 1640	Úszó
RD	Izom	ATCC	CCL-136	DMEM	Letapadó
SHP-77	Tüdő	ATCC	CRL-2195	RPMI 1640	Letapadó
SK-N-AS	Agy	ATCC	CRL-2137	DMEM	Letapadó
SNU-182	Máj	ATCC	CRL-2235	RPMI 1640	Letapadó
SNU-423	Máj	ATCC	CRL-2238	RPMI 1640	Letapadó
SNU-449	Máj	ATCC	CRL-2234	RPMI 1640	Letapadó

SNU-475	Máj	ATCC	CRL-2236	RPMI 1640	Letapadó
SW-403	Vastagbél	ATCC	CCL-230	Leibovitz's L-15	Letapadó
SW-480	Vastagbél	ATCC	CCL-228	Leibovitz's L-15	Letapadó
SW-620	Vastagbél	ATCC	CCL-227	Leibovitz's L-15	Letapadó
SW-948	Vastagbél	ATCC	CCL-237	Leibovitz's L-15	Letapadó
WIDR	Vastagbél	ATCC	CCL-218	RPMI 1640	Letapadó

5.2.2. **Gyógyszerek**

Az MTT teszthez 3 gyógyszer-koncentrációt használtunk, minden gyógyszer (lapatinib, erlotinib, sunitinib, sorafenib, gefitinib) esetén: a klinikailag javallott dózis alapján számított C2 koncentrációt, annak 0,1-szeresét (C1), illetve 10-szeresét (C3) **(5. táblázat)**. A gyógyszereket az LC Laboratories-től rendeltük. A gyógyszereket DMSO-ban *(Life Technologies)* oldottuk.

5. táblázat: A gyógyszer-érzékenységi tesztekben használt tirozin-kináz inhibitor koncentrációk.

gyógyszer	koncentráció (mM)		
	C1	C2	C3
lapatinib	2,867	28,67	286,7
sunitinib	0,124	1,24	12,4
sorafenib	1,147	11,47	114,7
erlotinib	0,508	5,08	50,8
gefitinib	0,745	7,45	74,5

5.2.3. **Gyógyszer-érzékenységi teszt**

Az előzőekben ismertetett módszerhez képest itt némiképp módosított MTT *(Roche)* protokollt használtunk, hosszabb gyógyszer expozícióval és egy perkontroll mérés beiktatásával, a módszert korábbi munkánk során alakítottuk ki [5].

Első nap a sejteket steril 96 lyukú mikrotitráló lemezekbe helyeztük 2 000 sejt / 100 µl médium lyukankénti mennyiségben, gyógyszer-koncentrációnként háromszoros ismétlésben. A kezelt lemezzel párhuzamosan prekontrollt is készítünk, külön lemezen (szintén háromszoros ismétléssel). Második nap a prekontroll lemezt az 5.1.7 fejezetben leírtaknak megfelelően festjük. Ezzel párhuzamosan a kezelésre szánt lemezekhez

hozzáadjuk a gyógyszereket (0,5 µl / lyuk mennyiségben), a kontroll csak a gyógyszer oldószerét kapja (0,5 µl DMSO). 5 napos növekedési idő után a kezelt lemezeket is festjük a prekontrollnál ismertetett módon. A lemezeket egy éjszakás oldódási idő után az előzőekben ismertetett módon spektrofotométerrel mérjük. Az alábbiak alapján számoltunk rezisztencia indexet minden sejtvonalra minden gyógyszerrel szemben:

$$RIi = \frac{(N_i - N_{pre})}{(N_{post} - N_{pre})}$$

Ahol: RIi: Rezisztencia Index az i-edik koncentráción, ahol i lehet a 0,1-szeres, 1-szeres, 10 szeres klinikai dózis.

Npre: átlag abszorbancia érték a prekontrollnál (háttér korrigált).

Npost: átlag abszorbancia érték a postkontrollnál (kontroll) (háttér korrigált).

N_i: átlag abszorbancia érték az i-edik koncentrációnál (háttérzaj korrigált).

A C1 és C2 koncentrációk belső kontrollként szolgáltak, hogy ellenőrizzük, a gyógyszer hatótartományán belül választottunk-e kezelési koncentrációt. A végső rezisztencia besoroláshoz csak a C2 koncentrációnál mért és számított rezisztencia indexet vettük figyelembe.

5.2.4. **Szignifikáns különbségek a génexpresszióban**

5.2.4.1. Microarray – caArray adatbázis

A caArray egy weben keresztül elérhető microarray adatkezelő [141], mely tartalmazza 319 sejtvonal microarray adatait, háromszor ismételt mérésben, melyet Affymetrix platformon, Human Genome U133 Plus 2.0 Array –on (HG-U133_Plus_2) mértek. A használt sejtvonalak génexpressziós adatai innen származnak. A caArray a caBIG kompatibilitási iránymutatásait és a Microarray Gene Expression Data (MGED) társaság sztenderdjeit figyelembe véve készült. A vizsgált sejtvonalak microarray adatait ebből az adatbázisból származtattuk.

5.2.4.2. Rezisztens és szenzitív sejtvonalak elkülönítése

A sejtvonalakat gyógyszerenként sorba rendeztük az adott gyógyszer C2 koncentrációjánál mért rezisztencia index alapján. Az adott gyógyszernél mért rezisztencia indexek mediánját számítottuk, majd ettől az értéktől való eltérés függvényében meghatároztuk a szenzitív és a rezisztens csoportok küszöbértékeit. A medián értékhez hozzárendeltük az adott gyógyszernél mért értékek teljes skálájának 10 százalékát mindkét irányban (medián+10% illetve medián−10%) ezzel kijelöltük a folytonos RI skála középső sávját, ezt a közbülső csoportot az elemzésből kihagytuk. A medián+10% fölötti RI értékkel rendelkező sejtvonalak a rezisztens, a medián−10% alatti RI értékkel rendelkező sejtvonalak a szenzitív csoportba kerültek.

5.2.4.3. Microarray feldolgozás, bioinformatika

A microarray adatokon (.CEL fájlok) MAS5 normalizálást hajtottunk végre az R statisztikai környezetben a Bioconductor könyvtár segítségével (lásd 5.1.2.1). A rezisztens és a szenzitív csoportot egymástól legjobban megkülönböztető, legjobban leíró tulajdonságok keresésére (feature selection) két algoritmust is használtunk, mivel az irodalmi adatok nem voltak egyértelműek abban a tekintetben, hogy melyik módszer használata a leghatékonyabb [142]. A validációs kohortban azokat a géneket vettük figyelembe amelyek mindkét elemzésben magas szignifikanciával jelentkeztek.

5.2.4.3.1 SAM – Significance Analysis of Microarrays

A „Significance Analysis of Microarrays” R csomag módszere módosított t–teszten alapú nemparaméteres eljárás [143]. A SAM analízis génenként d–értéket határoz meg. Ez az adott gén expressziójában mért relatív különbség a szenzitív és a rezisztens csoport között. Ezt követően az adatok eloszlását becsli: a minták p számú (esetünkben 1000) permutációjára megállapítja minden gén d–értékeit. Adott gén d–értékeinek az átlaga a várható relatív különbség. Azokat a génekeket tekinti a szenzitív és rezisztens csoportok közt eltérően expresszálódónak, melyekre teljesül, hogy a valós d–érték és a várható d–érték különbsége nagyobb egy megválasztott küszöbértéknél (estünkben 0,2). A d–érték alapján választhatjuk ki az elkülönítésben legjobban teljesítő géneket. A szignifikancia szint kifejezésére a fals találati arányt (false discrovery rate, FDR) kapjuk.

5.2.4.3.2 Rank products

A rank products szintén több mérés közt eltérően expresszálódó gének azonosítására szolgál. A géneket mérésenként az expresszió mértéke szerint sorba rendezi, és a sorban elfoglalt helye szerint rangot oszt minden egyes génnek [144]. Egy gén rank products értéke (RP) a gén mérések közötti rangjainak a mértani átlaga. A szignifikancia szint meghatározására a SAM–hez hasonlóan permutáció–alapú becslést alkalmaz. A hibás pozitívak aránya (proportion of false positives: pfp) az adott gén véletlen körülmények között várható RP értékének, és a RP értékek alapján növekvő sorban elfoglalt helyének a hányadosa.

5.2.4.3.3 Leave-one-out keresztvalidáció

A szenzitív és rezisztens csoportokra kijelölt biomarkerek hatékonyságát a szenzitív és rezisztens vonalakra leave–one–out keresztvalidációval is vizsgáltuk. Ebben az osztályozó algoritmus (esetünkben PAM –Prediction Analysis of Microarrays [145]) tanítását egy kivételével az összes sejtvonal biomarkerexpressziós mintázata alapján elvégezzük, majd ez alapján besoroljuk a kihagyott mintát a rezisztens vagy szenzitív csoportba. Ezzel az algoritmussal az összes mintát osztályozzuk és megvizsgáljuk, mennyire volt hatékony a biomarker szettünk, azaz valóban a kísérletesen mért szenzitivitási profilt kaptuk-e meg.

5.2.5. **q RT-PCR**

5.2.5.1. RNS izolálás

A sejttenyészetet enyhe tripszinizálás után lecentrifugáltuk és RNS-t izoláltunk RNeasy Kit-el *(Qiagen)* a használati útmutató szerint. DNáz I *(Life Technologies)* kezelés után az izolált RNS mennyiségét és minőségét a Nanodrop ND-1000 spektrofotométerrel és Agilent Bionalayzer-el ellenőriztük. Csak a megfelelő mennyiségű és tisztaságú RNS-t, amely szabályos 18S és 28S mintázatott mutatott, használtuk a PCR-ek során.

5.2.5.2. TaqMan PCR

TaqMan valós idejű PCR-el mértük 95 kiválasztott gén expresszióját a Micro Fluidic Card System *(Applied Biosystems)* segítségével, negyven sejtvonalban. A

méréseket PRISM® 7900HT Sequence Detection System *(Applied Biosystems)* készüléken végeztük. A géneket úgy választottuk ki, hogy a rezisztenciával korreláló legszignifikánsabb gének jelen legyenek, ez 63 biomarker jelölt. Emellett beemeltünk géneket ($n = 32$) a korábbi irodalom alapján is: olyanokat melyek expresszióváltozása rezisztenciával asszociált, illetve a RAS útvonal egyes elemeit. Az eredményeket az SDS 2.2 szoftverrel elemeztük. A delta Ct értékek (a riboszómális 18S expresszióhoz normalizálva) a rezisztencia profil alapján csoportosítottuk.

5.2.6. **Vesesejtes karcinóma mintagyűjtés**

Világos sejtes veserákos betegek körében végzett fázis hármas vizsgálatokban a sunitinib interferon alfával szemben a PMT szignifikáns növekedését tette lehetővé (11 hónap szemben 5 hónappal), sőt a teljes túlélés (26.4 hónap szemben 21.8 hónappal) és a teljes válaszadási ráta (47% szemben 12%-al) is kedvezőbb volt a sunitinibbel kezelt csoportban [146, 147]. A sunitinib az áttétes vesedaganatok elsővonalbeli kezelésének része. A Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikán 2005 és 2010 között kezelt vesesejtes karcinómában szenvedő betegekből gyűjtöttünk mintát a vonatkozó patológiai előírásoknak megfelelően. A tanulmányban csak azok a betegek szerepelnek, akik később metasztatikus betegségben szenvedtek és így sunitinib kezelésben részesültek. A formalin-fixált, paraffinba ágyazott mintákból készült TMA-kon minden beteg kétszer 2mm széles mintával szerepelt.

5.2.7. **Immunhisztokémia**

4 µm-es TMA szeleteken végeztük az immunhisztokémiai festést. Deparaffinálás után mikróban tártuk fel a sejteket a Target Retrieval Solution *(DAKO)*-val 30 percig. Ventana Benchmark automatizált festést használtunk a gyártó által nyújtott ’880’ és ’870’ (LGALS8 esetén) protokollok alapján. RAB17 (higítás: 1:200), LGALS8 (1:50), EPCAM (1:100) és CD9 (1:300) antitesteket *(Sigma Aldrich)* használtunk. CD9, LGALS8, RAB17 esetén a citoplazmai, EPCAM esetén a membránfestődést fogadtuk el megfelelő reakciónak. A lemezeket szkenneltük (Mirax MIDI Scan, *3DHistech)*, majd a festődési intenzitást (0: negatív reakció, +1: gyenge pozitivitás, +2: közepes pozitivitás, +3: erős reakció) illetve a pozitívan festődő sejtek

frekvenciáját (0:0–1%, 1:1–5%, 2:5–10%, 3:10–20%, 4:20–33%, 5:33–50%, 6:50–66%, 7:66–80%, 8:80–100%) elemeztük. Kaplan-Meier túlélési görbéket illesztettünk a medián érték mentén kialakított csoportokra WinStat-al.

6. Eredmények

6.1. A carboplatin rezisztencia vizsgálata során elért eredmények

6.1.1. Adatbázis építés

Összesen 1452 olyan beteget gyűjtöttünk össze, amelyek megfeleltek a kritériumainknak (elérhető terápiás válasz és túlélés jellemzés, a tumor mintából származó teljes microarray génexpressziós adattal). Az adatokat a TCGA-ból [25] és hét GEO dataset-ből származtatjuk, ezek: GSE3149 [148], GSE14764 [24], GSE9891 [149], GSE15622 [150], GSE19829 [151], GSE26712 [152] és GSE18520 [153]. A betegeinkben az átlagos progressziómentes túlélés 24,8 hónap volt (ami némileg több mint a platina-taxán alapú klinikai vizsgálatokban elért progressziómentes túlélés [154]), 731 progresszióval. A betegek közül 1145 beteg kapott platina alapú terápiát (614 esetben taxán kombinációban).

6.1.2. Bioinformatikai feldolgozás

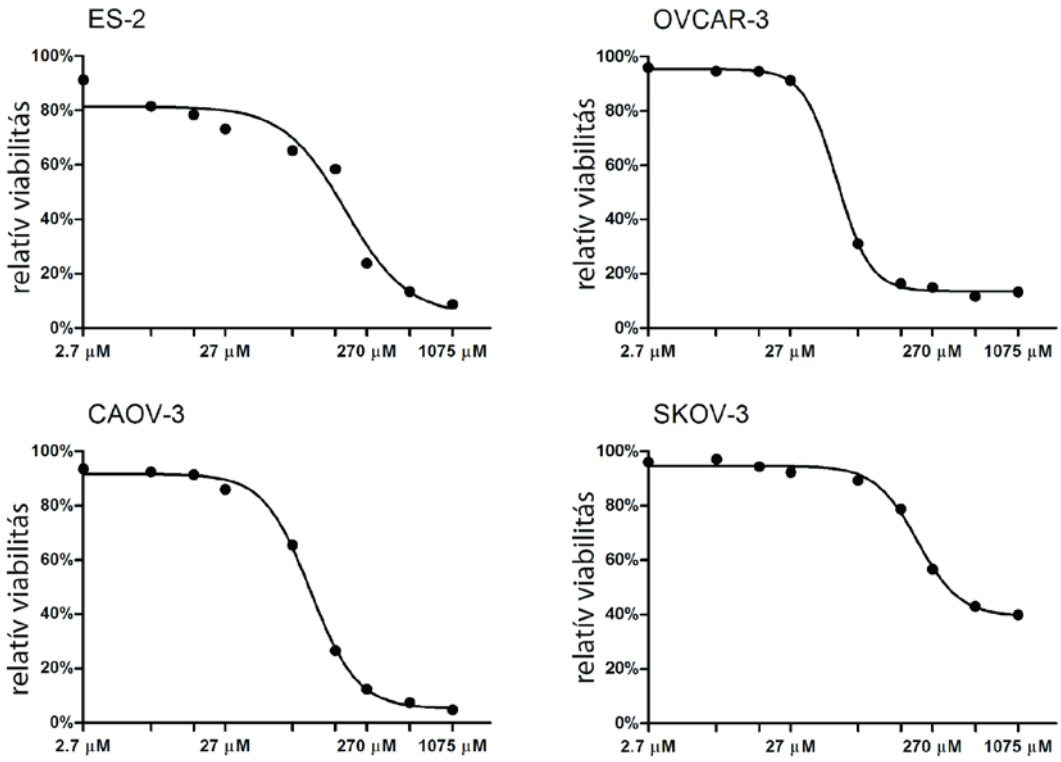
Az AUC elemzés eredményeként a diszkriminatív géneket szignifikancia (p érték) szerint sorba rendeztük. Nyolc gént választottunk ki, melyek kimagasló AUC értékkel és szignifikanciával rendelkeztek. Ezeket a top géneket használtuk a további *in vitro* vizsgálatokban. A bioinformatikai elemzésben kiválasztott géneket és a hozzájuk tartozó statisztikai jellemzőket a **6. táblázatban** mutatom be. A rossz terápiás válasz elkülönítésében mutatott magas AUC érték (prediktív potenciál) mellett a JRK ($p = 3{,}2E - 05$), CNOT8 ($p = 2{,}2E - 04$), FUBP1 ($p = 0{,}014$) és MEK1 ($p = 0{,}0078$) gének magas expressziója a rosszabb túléléssel is korrelált, azaz prognosztikai értékkel is bírt az 1152 betegből álló adatbázisban.

6. táblázat: Az ROC tesztben legjobban teljesítő prediktív gének, melyek magas expressziója a rossz platina terápiás válasszal függött össze.

Gén		Platina kezelt betegek (n=1145)	
Affy ID	**Szimbólum**	**ROC (AUC)**	**ROC (p érték)**
214692_s_at	**JRK**	0,62	1,34E-07
200910_at	**CCT3**	0,62	3,50E-07
212301_at	**RTF1**	0,62	5,87E-07
202670_at	**MEK1**	0,61	1,75E-06
214094_at	**FUBP1**	0,61	2,25E-06
202162_s_at	**CNOT8**	0,61	3,07E-06
217527_s_at	**NFATC2IP**	0,61	3,69E-06
202646_s_at	**CSDE1**	0,60	4,18E-06
214093_s_at	**FUBP1**	0,61	5,34E-06

6.1.3. **A gyógyszerérzékenység tesztelése**

A sejtvonalak mérésenként hatszoros ismétlésben és sejtvonalaként két független mérésben mért gyógyszerérzékenysége megfelelt az irodalmi adatoknak, amennyiben a SKOV-3 bizonyult a legrezisztensebb sejtvonalnak, a teljes sejtpusztulást még a legnagyobb kezelési dózis hatására (körülbelül a klinikai dózis negyvenszerese) sem érte el [155]. A négy sejtvonal dózis-hatás görbéjét a **8. ábrán** mutatom be. A görbéket GraphPad Prism szoftverrel illesztettem és az IC50 értékeket is a szoftver segítségével becsültem, ezek: CAOV-3: 108,3 µM, ES-2: 191,4 µM, SKOV-3: 211,1 µM, OVCAR-3: 57,3 µM.

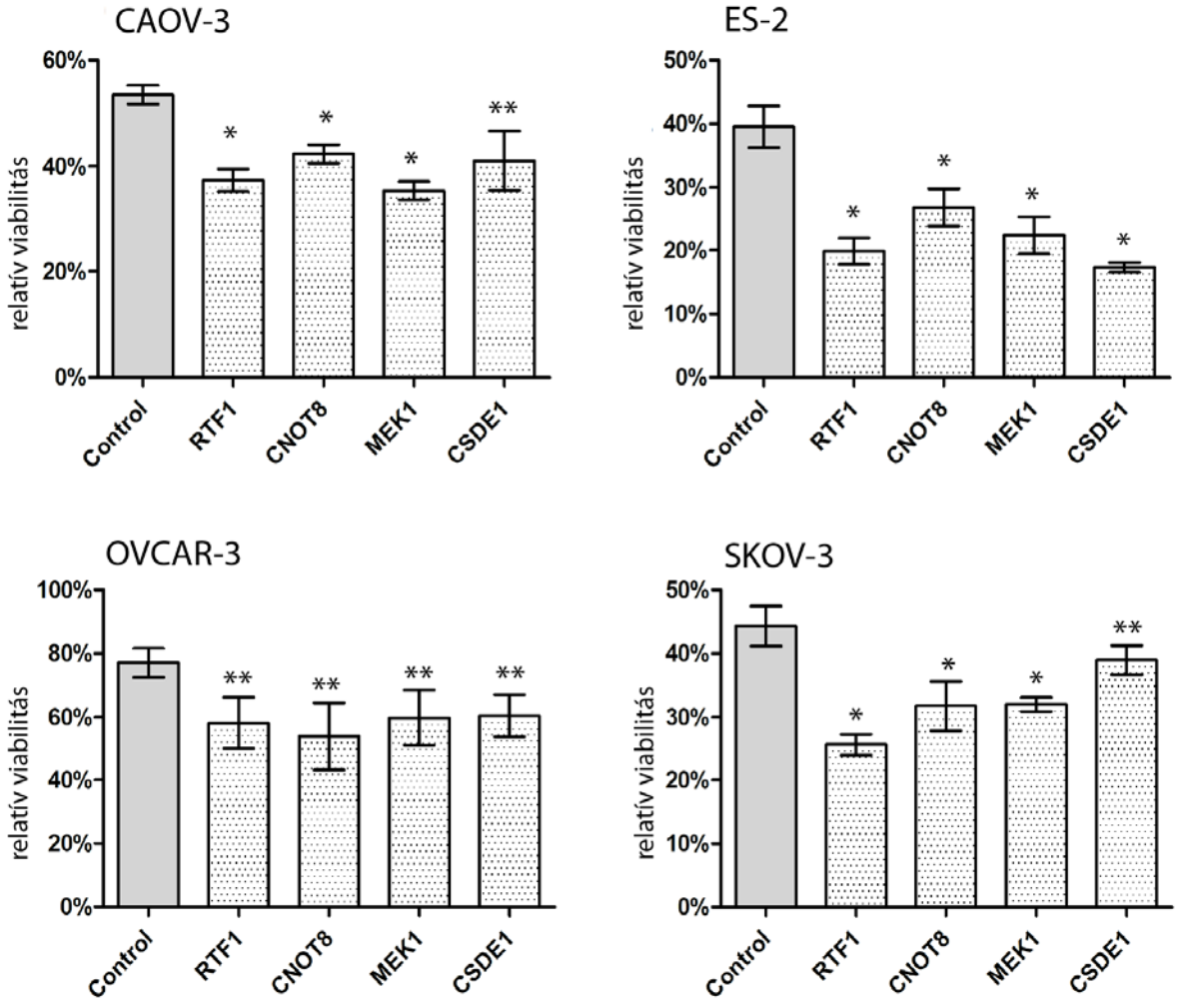


8. ábra: Az egyes sejtvonalak carboplatinnal szembeni dózis-hatás görbéje. Kontrollhoz viszonyított relatív viabilitás 48 órás carboplatin kezelés után.

6.1.4. **Gyógyszerkezelés és a géncsendesítés kombinációja**

A kiválasztott siRNS-ek csendesítési hatékonysága (qPCR-el mért relatív expresszió a kontroll siRNS-el transzfektált csoportban mért expresszióhoz képest): 97,7% (CCT3), 98,6% (RTF1), 65% (NFATC2IP), 98,01% (MEK1), 93,6% (CSDE1), 46,6% (FUBP1), és 99,6% (CNOT8) volt. Hogy vizsgáljuk a gének hatását a sejtek carboplatin érzékenységére, a gének csendesítését kombináltuk gyógyszeres kezeléssel. A méréseket hatszoros ismétlésben végeztük a módszerekben leírtaknak megfelelően. A gyógyszerrel kezelt, célgén csendesített csoportok viabilitását (optikai denzitás értéket az MTT festés után) minden esetben normalizáltuk a gyógyszert nem kapott, de a célgén csendesítést elszenvedett csoportok viabilitásához. Ezzel igyekeztünk elkerülni, hogy ha a célgén csendesítése a normális proliferációt is befolyásolja, azt ne a szenzitivitás növekedésének számlájára írjuk, tévesen. A vizsgált nyolc génből négynél találtunk a célgénnel csendesített, carboplatin kezelt csoportban

szignifikánsan nagyobb mértékű sejtpusztulást (szignifikancia limit $p < 0{,}01$), mint a kontroll siRNS-el transzfektált, carboplatin kezelt csoportban, ezek az RTF1, CNOT8, MEK1, CSDE1. A viabilitás változás grafikonjait a **9. ábrán** mutatom be.

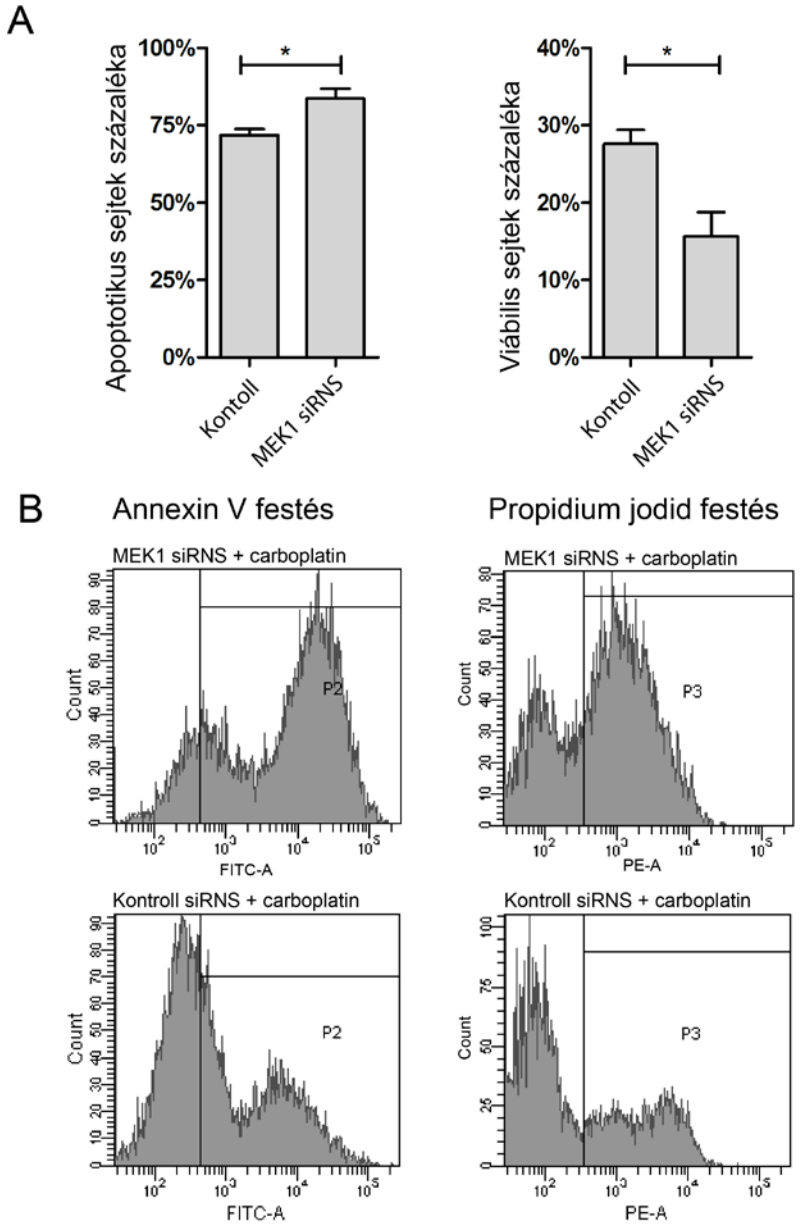


9. ábra: A carboplatin érzékenység változása az egyes sejtvonalakban a kiválasztott gének elcsendesítésének hatására (átlag a standard deviációval, csak a szignifikáns érzékenyítést eredményező gének). * $p < 0{,}001$, ** $p < 0{,}01$

6.1.5. **Apoptózis vizsgálat**

300 000 CAOV-3 sejten végeztük el a gyógyszerkezeléssel kombinált géncsendesítést 5.1.9 – ben tárgyaltaknak megfelelően, háromszoros ismétlésben. A 48 órás gyógyszerkezelés a MEK1 csendesített sejtekben szignifikánsan megnövelte a

kontroll siRNS-t kapott sejtekhez képest az apoptotikus sejtek arányát ($p = 0{,}0365$) (Annexin V pozitív sejtek) és lecsökkentette a viábilis sejtek arányát ($p = 0{,}0341$) (Annexin V és propidium jodid negatív sejtek). A többi gén csendesítése esetén szignifikáns különbséget nem kaptunk. A MEK1 csendesítéssel kapcsolatos áramlási citrometriás mérések eredményeit a **10. ábrán** mutatom be.

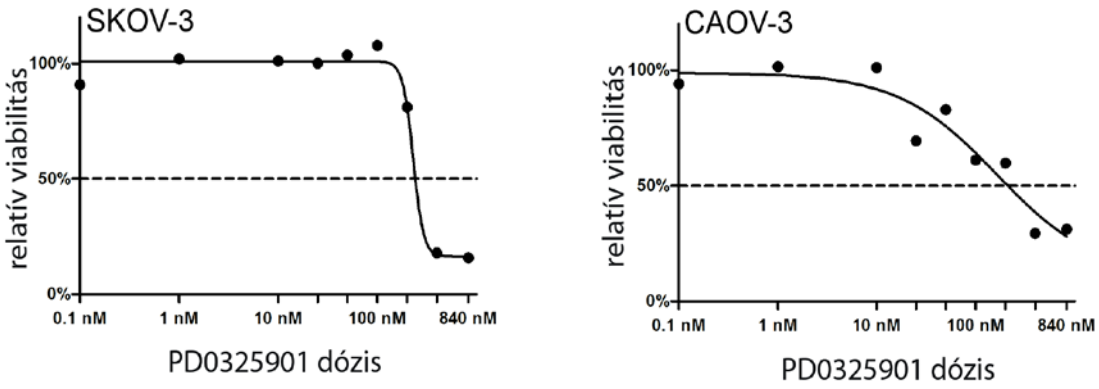


10. ábra: Apoptózis teszt, CAOV-3 sejtek viabilitásának változása carboplatin kezeléssel kombinált MEK1 csendestés hatására. A: Carboplatin kezelés hatására az apoptotikus sejtek aránya nőtt, a viábilis sejtek aránya csökkent szignifikáns

mértékben a MEK1 siRNS-t kapott sejtekben, a kontroll siRNS-el kezelt sejtekhez képest (átlag a standard deviációval). * $p < 0,05$ B: Reprezentatív példa az áramlási citometriás plotokra.

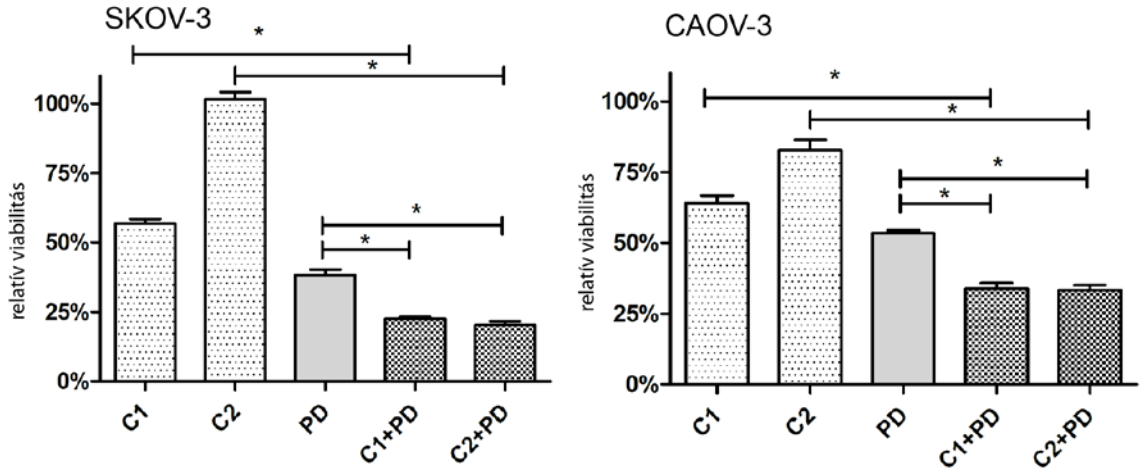
6.1.6. **MEK1 gyógyszeres gátlása**

A PD0325901 MEK1 inhibitor önmagában is hatékonynak bizonyult mindkét vizsgált sejtvonalon. Ahogyan a carboplatinnal szemben is, a SKOV3 a MEK1 inhibitorral szemben is jóval rezisztensebb volt, mint a CAOV3 sejtvonal. A dózis-hatás görbéket a **11. ábrán** mutatom be.



11. ábra: Két sejtvonal dózis hatás görbéje 48 órás MEK1 inhibitor kezelés hatására.

Kombinált (carboplatin és PD0325901) kezelést végeztünk az esetleges szinergista hatás felderítésére. A kombinációs kezelés erősebb citotoxikus hatással bírt, mint a monoterápiák ($p < 0,0001$). A carboplatin szuboptimális, csak enyhe citotoxikus hatással bíró dózisát kombinálva PD0325901-el, rendkívül erős sejtpusztulást figyelhettünk meg ($p < 0,0001$) (**12. ábra**).



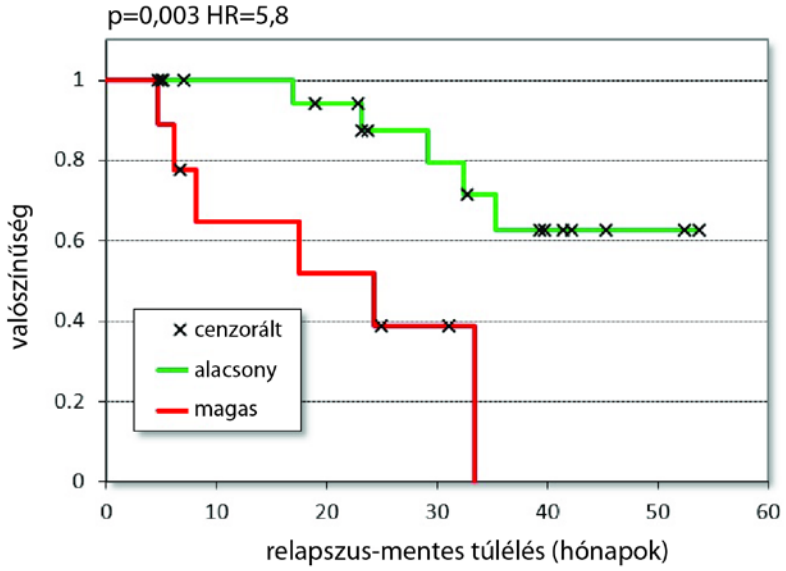
12. ábra: Carboplatin és MEK1 inhibitor kombinációjának hatása az életképességre. 48 órás kezelés a következő dózisokkal: SKOV-3 sejtvonal: C1: 212 µM carboplatin, C2: 141 µM carboplatin, PD: 554 nM PD0325901. CAOV-3 sejtvonal: C1: 111 µM carboplatin, C2: 74 µM carboplatin, PD: 277 nM PD0325901 (átlag a standard deviációval). * $p < 0,0001$

6.1.7. Kiválasztott gének validációja független klinikai mintákon, qRT-PCR-el

44 petefészek daganatos betegből gyűjtöttünk friss-fagyasztott mintát az Országos Onkológiai Intézet nőgyógyászati osztályának közreműködésével. Tíz beteg nem részesült platina alapú kemoterápiában, őket az elemzésből kizártuk. A betegeket azonosítóval láttuk el az anonimitás megőrzése érdekében. A betegek korát, a műtéti sikeresség jellemzését, a hisztológiai besorolást a daganat grade és stage diagnosztikáját, a kemoterápia típusát és a kapott ciklusok számát gyűjtöttük össze alapvető klinikai jellemzőkként. A legfontosabb információ a relapszus-mentes túlélés (átlagos relapszus-mentes túlélés: 25 hónap) és a vizsgált gének expressziója. Ezeket a **3. függelékben** mutatom be.

A Kaplan-Meier elemzésben (**13. ábra**) azt találtuk, hogy az alacsony MEK1 expresszió (felső kvartilis *versus* további minták) szignifikánsan korrelált a hosszabb relapszus-mentes túléléssel ($HR = 5,8$ $p = 0,003$). A többi, *in vitro* csendesítésben

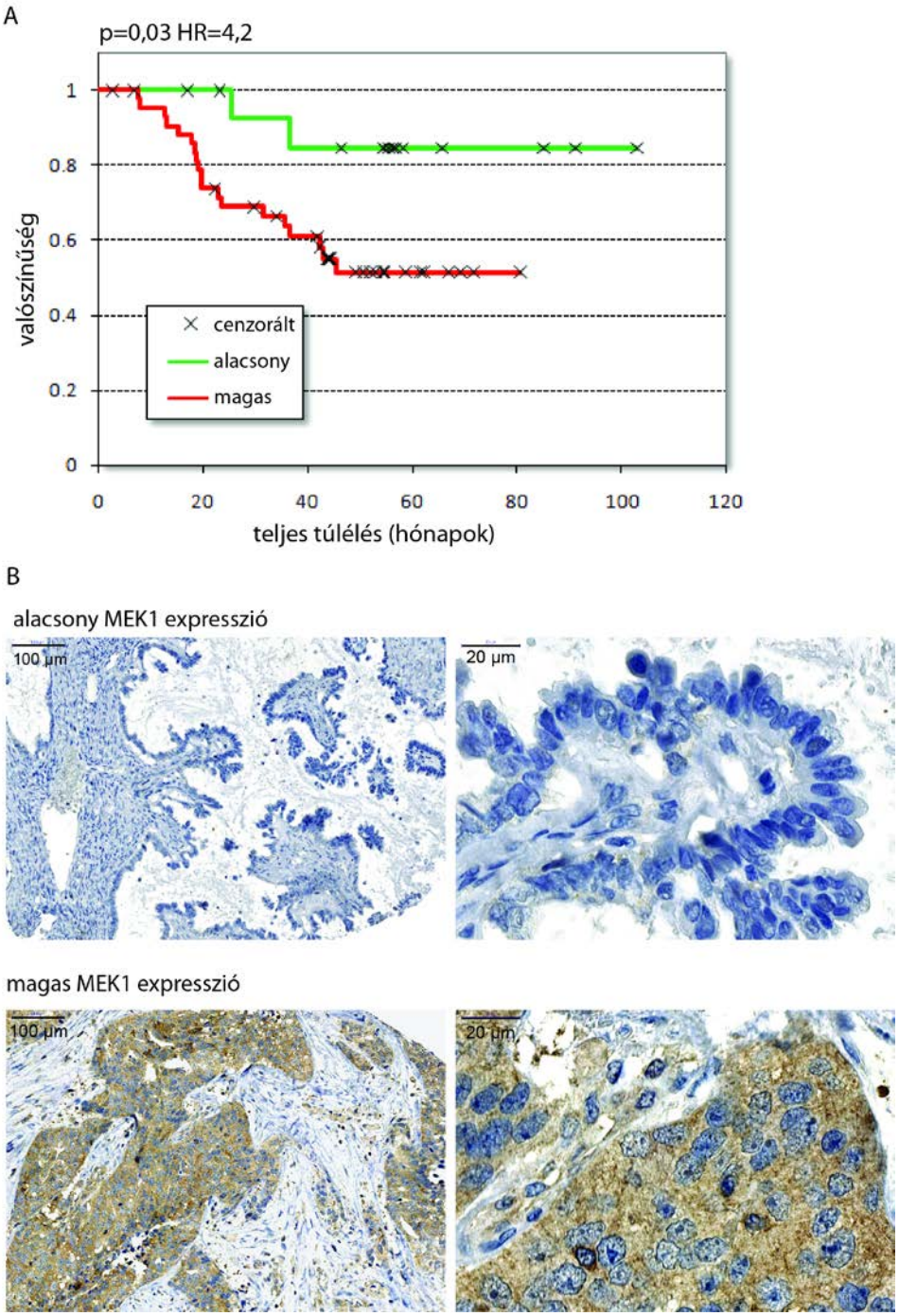
szenzitizáló hatást mutató gén esetén szignifikáns összefüggést a túlélési adatok és a gének mRNS szintű expressziója között nem találtunk.



13. ábra: Kaplan-Meier túlélési görbe az RT-PCR-el mért MEK1 expresszió alapján, 34 beteg mintáinak felhasználásával. Zöld: alacsony MEK1 expresszió, piros: magas MEK1 expresszió.

6.1.8. **Immunhisztokémia**

Összesen 72 betegből gyűjtöttünk mintát a berlini Charité Universitatmedizin közreműködésével. A betegek közül 59 kapott platinakezelést, ezeken a mintákon végeztük el az immunhisztokémiai kiértékelést. Az átlagos teljes túlélés a betegek közt 44,6 hónap volt. A magas festődési intenzitás (a felső kvartilis hasonlítva a maradékhoz) szignifikánsan korrelált a rosszabb teljes túléléssel a platinakezelés után ($HR = 4{,}2$ $p = 0{,}03$). A Kaplan-Meier görbét és reprezentatív immunhisztokémiai képeket a **14. ábrán** mutatom be. Az egyes minták festődési adatai a **4. függelékben** tekinthetőek meg.



14. ábra: A, Kaplan-Meier túlélési görbe: a teljes túlélés valószínűsége a MEK1 festődés alapján. Zöld: alacsony MEK1 festődés, piros: magas MEK1 festődés. B, példa a MEK1 immunhisztokémiára: gyengén és erősen festődő minták.

6.2. A célzott tirozin-kináz inhibitorokkal szembeni rezisztencia vizsgálata során elért eredményeink

6.2.1. 45 sejtvonal rezisztencia profilja az öt tirozin-kináz inhibitorral szemben

A rezisztencia tesztet háromszoros ismétlésben végeztük el minden sejtvonalon mind az öt gyógyszerrel, gyógyszerenként három koncentrációt tesztelve. A sejtproliferációs tesztet megismételtük, ha az eredmények nem feleltek meg a következő kritériumoknak:

1. $Npost > Npre$ (Azaz a sejtvonal egészséges, alapállapotban sejtkultúrás körülmények között növekszik.)

2. Csak azok a mérési eredmények szerepeltek az értékelésben, ahol az ismételt mérések között a viabilitási eltérés nem volt nagyobb húsz százaléknál.

3. Megismételtük a tesztet azokban az esetekben ahol azt találtuk, hogy $RI_3 < RI_1$ és RI_1, RI_2, RI_3 értékek szórása nagyobb, mint 0,25.

A továbbiakban csak az RI_2 értékekkel számoltunk. Gyógyszerenként sorba állítottuk a sejtvonalakat rezisztencia index szerint és kijelöltük a rezisztens, szenzitív és köztes rezisztenciát mutató sejtvonalakat a módszereknél tárgyaltaknak megfelelően. Az egyes sejtvonalak rezisztencia profilját gyógyszerenként a **7. táblázatban** mutatom be.

7. táblázat: A vizsgált sejtvonalak rezisztencia indexe (RI): Gyógyszerenként a sejtvonalakat sorba rendeztük RI érték alapján és kijelöltük a szenzitív (világosszürke), rezisztens (sötétszürke) és közbülső (középszürke) sejtvonalakat.

lapatinib		erlotinib		sorafenib		sunitinib		gefitinib	
sejtvonal	RI	sejtvonal	RI	sejtvonal	RI	sejtvonal	RI	sejtvonal	RI
SW-948	0,26	NCI-H441	-0,11	NCI-H69	-1,53	A-375	-0,15	Hep-3B	-0,09
K-562	0,43	HCT-15	-0,08	NCI-H441	-1,25	CAOV3	0,07	HCT-15	0,06
NCI-H358	0,48	CAOV3	-0,02	A-375	-1,04	HCT-15	0,08	SW-403	0,11
HCT-8	0,48	SW-948	0,09	CAOV3	-0,99	SW-948	0,21	C-4II	0,18

HCT-15	0,49	A-375	0,22	Hep-3B	-0,91	NCI-H441	0,31	NCI-H358	0,22
HT-1080	0,54	NCI-H1993	0,24	C-4I	-0,68	NCI-H358	0,33	NCI-H69	0,23
NCI-H441	0,56	NCI-H1650	0,28	SW-620	-0,63	SW-620	0,35	WIDR	0,28
MCF-7	0,62	NCI-H358	0,30	HT-1080	-0,58	SW-480	0,38	CAOV3	0,29
CAOV3	0,65	C-4II	0,31	HCT-15	-0,57	MCF-7	0,39	SNU-449	0,29
SNU-475	0,65	SW-480	0,39	DMS-79	-0,53	HCT-8	0,41	HT-1080	0,29
Hep-3B	0,66	NCI-H661	0,42	C-4II	-0,50	A-427	0,41	A-375	0,30
NCI-H1650	0,71	SNU-449	0,43	NCI-H1993	-0,45	Hep-3B	0,43	K-562	0,31
A-375	0,73	C-4I	0,47	SW-480	-0,41	C-4II	0,43	HCT-8	0,34
HOS	0,73	K-562	0,48	SHP-77	-0,36	NCI-H1650	0,44	NCI-H661	0,36
BT-20	0,74	SNU-475	0,50	K-562	-0,34	HT-1080	0,51	MCF-7	0,41
SHP-77	0,77	MCF-7	0,51	A-427	-0,33	NCI-H82	0,51	C-4I	0,41
CCRF-CEM	0,78	Hep-3B	0,51	HCT-8	-0,31	ES-2	0,51	CCRF-CEM	0,43
SNU-449	0,78	CCRF-CEM	0,55	NCI-H358	-0,30	CCRF-CEM	0,51	SNU-475	0,47
C-4II	0,78	NCI-H69	0,55	SW-403	-0,28	SNU-475	0,51	SW-620	0,47
NCI-H1993	0,82	SW-403	0,55	SNU-475	-0,28	WIDR	0,53	NCI-H82	0,47
SW-480	0,82	HOS	0,58	COLO-668	-0,25	NCI-H1993	0,54	SW-480	0,48
C-33A	0,87	HT-1080	0,58	CCRF-CEM	-0,19	NCI-H69	0,56	ES-2	0,51
WIDR	0,88	C-33A	0,59	MOLT-4	-0,18	HOS	0,59	NCI-H1993	0,51
AN3-CA	0,89	AN3-CA	0,60	MCF-7	-0,16	SNU-449	0,60	NCI-H441	0,51
SNU-423	0,90	ES-2	0,61	NCI-H1975	-0,14	C-4I	0,61	C-33A	0,53
A-498	0,91	SW-620	0,61	SW-948	-0,12	MOLT-4	0,61	DMS-79	0,54
NCI-H661	0,95	BT-20	0,67	SNU-423	-0,12	K-562	0,63	SNU-182	0,57
SW-403	0,96	NCI-H82	0,68	SNU-449	-0,11	AN3-CA	0,63	SHP-77	0,64
C-4I	0,98	WIDR	0,70	C-33A	-0,11	SNU-182	0,66	MOLT-4	0,65
DMS-114	0,98	MOLT-4	0,73	WIDR	-0,11	BT-20	0,66	RAJI	0,65
RAJI	0,99	A-498	0,73	NCI-H82	-0,09	COLO-668	0,71	NCI-H1650	0,67
SNU-182	1,01	HEC-1-B	0,73	SNU-182	-0,08	A-498	0,72	A-427	0,69
ChaGo-K-1	1,01	SNU-423	0,81	ChaGo-K-1	-0,07	SK-N-AS	0,72	BT-20	0,69
NCI-H82	1,02	NCI-H1975	0,82	RAJI	-0,05	RAJI	0,72	AN3-CA	0,71
MOLT-4	1,03	DMS-79	0,82	BT-20	-0,01	NCI-H1975	0,73	SNU-423	0,73
NCI-H69	1,03	RAJI	0,82	DMS-114	0,00	ChaGo-K-1	0,78	NCI-H1975	0,74
ES-2	1,05	ChaGo-K-1	0,83	HOS	0,01	SNU-423	0,80	A-498	0,80
NCI-H1975	1,08	DMS-114	0,89	NCI-H1650	0,14	NCI-H661	0,88	ChaGo-K-1	0,81
SK-N-AS	1,10	SNU-182	0,90	RD	0,20	DMS-79	0,89	HOS	0,87
A-427	1,10	COLO-668	0,91	SK-N-AS	0,20	SHP-77	0,90	DMS-114	0,93
RD	1,12	HCT-8	0,95	ES-2	0,21	C-33A	0,91	SK-N-AS	1,04
COLO-668	1,13	A-427	0,98	HEC-1-B	0,31	DMS-114	0,92	HEC-1-B	1,07
DMS-79	1,20	SK-N-AS	1,00	NCI-H661	0,32	RD	0,96	RD	1,28
HEC-1-B	1,31	RD	1,01	A-498	0,49	HEC-1-B	0,98	COLO-668	1,34
SW-620	1,31	SHP-77	1,04	AN3-CA	0,61	SW-403	1,08	SW-948	1,45

6.2.2. A szenzitív és rezisztens sejtvonalak elkülönítésére alkalmas gének azonosítása

Olyan géneket kerestünk, melyek expressziójában legalább kétszeres mennyiségbeli eltérés állt fenn a szenzitív és a rezisztens sejtvonalak között. A SAM és rank products elemzések elvégzése után azokat a géneket tekintettük szignifikánsnak, ahol a hibás találati arány (FDR) 20% alatt volt. A további vizsgálatokban a SAM és a rank products szignifikáns génlistáinak átfedő génjeit vettük figyelembe.

Az osztályozó pontosságát leave-on-out keresztvalidációval ellenőriztük. A PAM algoritmus egy 14 000 próba szettet tartalmazó génlistán tanítottuk (ebben csak azok a próba szettek szerepeltek, melyek átlagos expressziója 100 fölötti, maximális expressziója 1 000 feletti értékkel bírt). Így 92,8%-os pontossággal osztályozta a sejtvonalakat rezisztens és szenzitív csoportokba **(1. függelék).** A SAM eredményeként kapott, 40 próba szettet tartalmazó génlista 78%-os, és a rank products top 100 próba szettet tartalmazó lista pedig 79%-os klasszifikációs hatékonyságot ért el.

6.2.3. Microarray adatok alapján talált gének validálása TaqMan qRT-PCR-el

A microarray elemzés eredményeként legerősebb szignifikanciát mutató 63 gén expresszióját TaqMan-on validáltuk a sejtvonalakban. Irodalomkutatás alapján 32 gént találtunk, amely vizsgálatra érdemes a vizsgált gyógyszerekkel szembeni rezisztencia kapcsán, ezeket a géneket is lemértük a 40 sejtvonalon.

A microarray elemzéssel kapott 63 biomarker jelölt közül 45 a PCR validálás során is képes volt jelezni a szenzitivitást/rezisztenciát $p < 0{,}05$ szignifikanciával, 23 gén esetén a szignifikancia 0,01 alatt maradt. A erlotinib rezisztenciával asszociált gének közül a legerősebb szignifikanciát az ITGB4 ($p = 0{,}005$) és a TFAP2C ($p = 0{,}004$), gefitinib esetén az ADA ($p = 0{,}003$), sorafenib esetén a FAT4 ($p = 0{,}011$), lapatinib esetén pedig a FURIN és az ME1 ($p = 0{,}011$) gének mutatták. Sunitinib esetén e legjelentősebb gének a KRT18 ($p = 0{,}001$), LGALS8 ($p = 0{,}019$), RAB17 ($p = 0{,}002$), CD9 ($p = 0{,}002$) és PPL ($p = 0{,}001$).

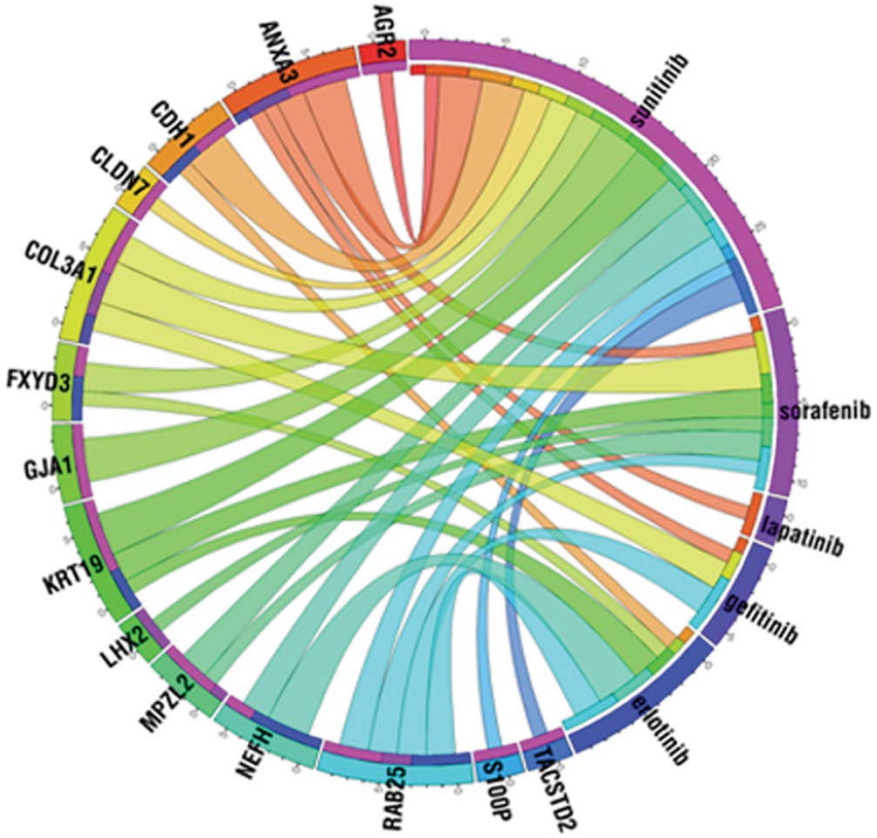
Ugyanakkor, az irodalmi adatok alapján összeállított 32 elemet tartalmazó génlistából mindössze 7 volt alkalmas arra, hogy a szenzitív és a rezisztens sejtvonalakat az expresszió alapján diszkriminálja. A TaqMan elemzésben is szignifikáns biomarker jelöltek listája a **8. táblázatban** olvasható.

8. táblázat: A TaqMan qPCR-el validált, szignifikáns tirozin-kináz inhibitor biomarkerek és irodalmi rezisztencia asszociált gének.

Gén	TaqMan ID	Affymetrix ID	Gén neve		p
Erlotinib rezisztenciával asszociált gének					
B3GNT3	Hs00429537_m1	204856_at	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-		**0,021**
CAST	Hs00156280_m1	208908_s_at	calpastatin		**0,030**
CLMN	Hs00226865_m1	221042_s_at	calmin (calponin-like, transmembrane)		**0,023**
ERBB3	Hs00176538_m1	202454_s_at	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3		**0,016**
FXYD5	Hs00204319_m1	218084_x_at	FXYD domain containing ion transport regulator 5		**0,016**
ITGB4	Hs00236216_m1	204990_s_at	integrin, beta 4		**0,005**
LGALS3	Hs00173587_m1	208949_s_at	lectin, galactoside-binding, soluble, 3		**0,016**
NEAT1	Hs01008264_s1	214657_s_at	nuclear paraspeckle assembly transcript 1		**0,019**
PRSS22	Hs00223188_m1	205847_at	protease, serine, 22		**0,023**
S100A10	Hs00741221_m1	200872_at	S100 calcium binding protein A10		**0,015**
SECTM1	Hs00171088_m1	213716_s_at	secreted and transmembrane 1		**0,026**
TFAP2C	Hs00231476_m1	205286_at	transcription factor AP-2 gamma		**0,004**
Gefitinib rezisztenciával asszociált gének					
ADA	Hs01110945_m1	216705_s_at	adenosine deaminase		**0,003**
COL5A1	Hs00609088_m1	212489_at	collagen, type V, alpha 1		**0,018**
SLC2A6	Hs01115485_m1	220091_at	solute carrier family 2, member 6		**0,027**
Sorafenib rezisztenciával asszociált gének					
FAT4	Hs01570491_m1	219427_at	FAT tumor suppressor homolog 4		**0,011**
GNG11	Hs00914578_m1	204115_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11		**0,068**
TUSC3	Hs00954406_m1	213423_x_at	tumor suppressor candidate 3		**0,021**
Sunitinib rezisztenciával asszociált gének					
CD9	Hs00233521_m1	201005_at	CD9 molecule		**0,002**
EPCAM	Hs00158980_m1	201839_s_at	epithelial cell adhesion molecule		**0,009**
KRT18	Hs01941416_g1	201596_x_at	keratin 18		**0,001**
KRT8	Hs01630795_s1	209008_x_at	keratin 8		**0,041**
LGALS8	Hs00374634_m1	208934_s_at	lectin, galactoside-binding, soluble, 8		**0,019**
LSR	Hs00210880_m1	208190_s_at	lipolysis stimulated lipoprotein receptor		**0,046**
PPL	Hs00160312_m1	203407_at	periplakin		**0,001**
RAB17	Hs00940833_m1	218931_at	RAB17, member RAS oncogene family		**0,002**
SAT1	Hs00161511_m1	203455_s_at	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1		**0,003**
SIGIRR	Hs00222347_m1	52940_at	single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor		**0,004**
Lapatinib rezisztenciával asszociált gének					
FURIN	Hs00965485_g1	201945_at	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)		**0,011**
ME1	Hs00159110_m1	204059_s_at	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic		**0,011**

TMOD3	Hs00205710_m1	220800_s_at	tropomodulin 3		**0,004**
Több gyógyszerrel szembeni rezisztenciával asszociált gének					
AGR2	Hs00180702_m1	209173_at	anterior gradient homolog 2	*sunitinib*	**0,013**
ANXA3	Hs00971411_m1	209369_at	annexin A3	*gefitinib*	**0,040**
				sorafenib	**0,032**
				sunitinib	**0,001**
				lapatinib	**0,045**
CDH1	Hs01023894_m1	201130_s_at	cadherin 1, type 1, E-cadherin	*erlotinib*	**0,050**
				sunitinib	**0,002**
CLDN7	Hs00600772_m1	202790_at	claudin 7	*sunitinib*	**0,013**
COL3A1	Hs00943809_m1	215076_s_at	collagen, type III, alpha 1	*gefitinib*	**0,005**
				sorafenib	**0,000**
				sunitinib	**0,009**
FXYD3	Hs00254211_m1	202488_s_at	FXYD domain containing ion transport regulator 3	*erlotinib*	**0,037**
				sunitinib	**0,016**
GJA1	Hs00748445_s1	201667_at	gap junction protein, alpha 1, 43kDa	*sunitinib*	**0,000**
KRT19	Hs00761767_s1	201650_at	keratin 19	*erlotinib*	**0,032**
				sorafenib	**0,029**
				sunitinib	**0,000**
LHX2	Hs00180351_m1	211219_s_at	LIM homeobox 2	*sorafenib*	**0,021**
MPZL2	Hs00170684_m1	203780_at	myelin protein zero-like 2	*sorafenib*	**0,036**
				sunitinib	**0,008**
NEFH	Hs00606024_m1	33767_at	neurofilament, heavy polypeptide	*erlotinib*	**0,001**
				sunitinib	**0,002**
RAB25	Hs00220628_m1	218186_at	RAB25, member RAS oncogene family	*erlotinib*	**0,006**
				gefitinib	**0,011**
				sorafenib	**0,015**
				sunitinib	**0,007**
S100P	Hs00195584_m1	204351_at	S100 calcium binding protein P	*sunitinib*	**0,024**
TACSTD2	Hs00242741_s1	202286_s_at	tumor-associated calcium signal transducer 2	*sunitinib*	**0,037**
Irodalomból származó gének					
HER2	Hs01001580_m1	216836_s_at	v-erb-b2 oncogene	*lapatinib*	**0,034**
TGFA	Hs00608187_m1	205016_at	transforming growth factor, alpha	*lapatinib*	**0,034**
ANGPT1	Hs00375822_m1	205608_s_at	angiopoietin 1	*sunitinib*	**0,036**
IFNG	Hs00989291_m1	210354_at	interferon, gamma	*sunitinib*	**0,024**
PDGFA	Hs00964426_m1	205463_s_at	platelet-derived growth factor alpha	*sunitinib*	**0,044**
AKT1	Hs00178289_m1	207163_s_at	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	*erlotinib*	**0,047**
				lapatinib	**0,041**
COX2	Hs00153133_m1	204748_at	cyclooxygenase	*sunitinib*	**0,034**

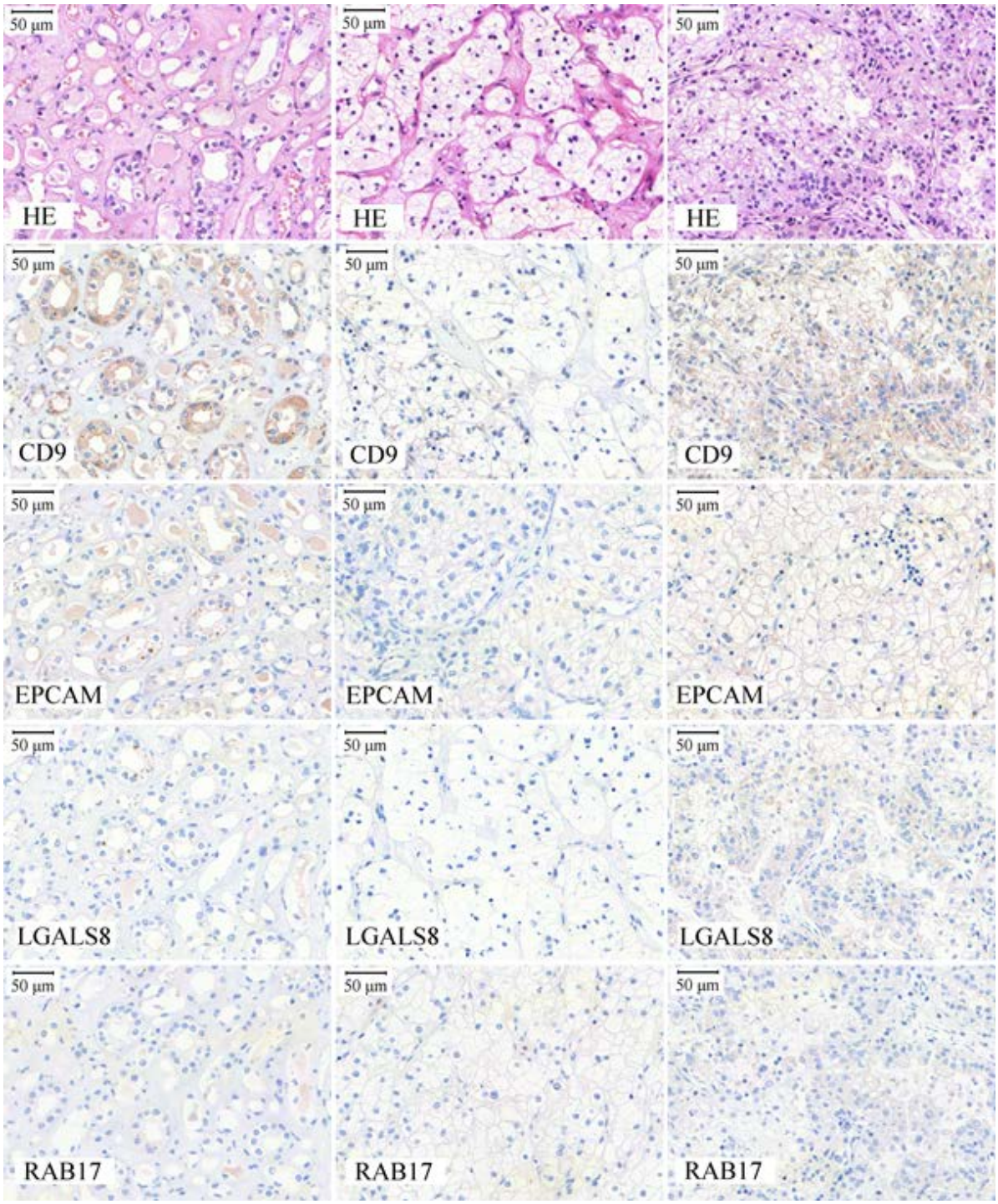
Néhány gén több gyógyszerrel szembeni rezisztenciában is megjelent, csupán két gén (ANXA3 és RAB25) asszociált mind az öt gyógyszerrel szembeni rezisztenciával. A multi-rezisztencia génekről készült egy szemléltető circosplot (**15. ábra**).



15. ábra: Circos plot ábra a génekről melyek több ágenssel szembeni rezisztenciával asszociáltak. A szalagok vastagsága az adott gén, adott gyógyszerrel szembeni rezisztenciában mutatott szignifikanciájával (logp) arányosak.

6.2.4. A sunitinib rezisztenica gének immunhisztokémiai validációja független betegmintákon

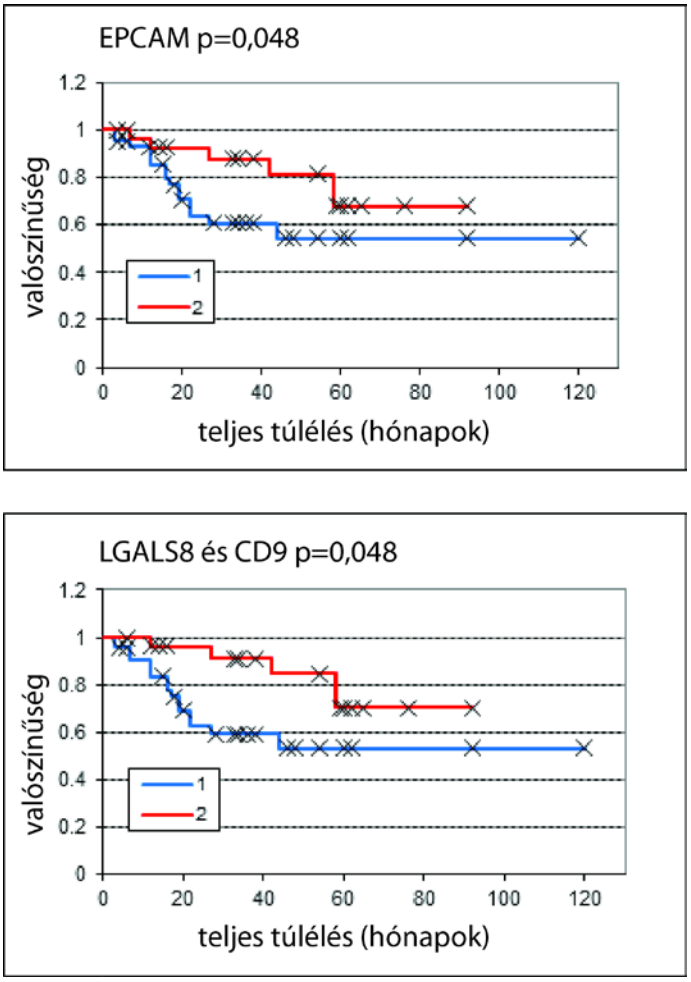
39 vesesejtes karcinómából gyűjtöttünk mintát, olyan betegektől, akik sunitinib kezelésben részesültek, az Urológiai Klinika közreműködésével. A mintákat azelőtt gyűjtöttük, mielőtt a betegek részesültek volna az első vonalbeli sunitinib kezelésben, így megfelelnek a belső rezisztencia (lásd a bevezetőben) modelljének. A betegek klinikai adataiból: az átlagos életkor 59 év volt, az átlagos teljes túlélés 14 hónap volt, a betegek 63%-a nő. Az immunhisztokémia reprezentatív példái **16. ábrán** tekinthetőek meg.



16. ábra: Reprezentatív példák az immunhisztokémiai festésről. A bal oldalon az egyes markerek festődését láthatjuk normál veseszöveten, középen tumoros szöveten gyenge festődést, a jobb oldalon pedig tumor szöveten erős festődést.

Kaplan-Meier analízist végeztünk a festődés és a túlélés kapcsolatának feltérképezésére. Az LGALS8, RAB17 és EPCAM gének egyaránt „negatív gén”-ként

jöttek ki a microarray és *in vitro* szenzitivitási adatok feldolgozása során. Ez azt jelenti, hogy rezisztens sejtekben az expressziójuk alacsonyabb volt, mint szenzitív sejtekben. Extrapolálva ezt az eredményt, azt vártuk, hogy a magas expresszió a szenzitív fenotípusnak kedvez és így jobb túléléssel társul. Várakozásainknak megfelelően azt kaptuk, hogy az LGALS8 ($p = 0{,}026$) EPCAM ($p = 0{,}01$) és RAB17 ($p = 0{,}018$) gének esetén az erősebb immunhisztokémiai festődés jobb túléléssel társult. A CD9 esetén szignifikáns korrelációt nem kaptunk. Részletesebben: a festődés intenzitását vizsgálva az alsó és felső 25 percentilisbe tartozó értékkel rendelkező betegek túlélési eredményeit összevetve a LGALS8 és RAB17 bizonyult szignifikánsnak. A a pozitív sejtek gyakoriságát (szintén az alsó és felső 25 percentilisbe tartozó minták) összevetve az EPCAM és az LGALS8 csökkent festődési frekvenciája korrelált emelkedett túlélési eredményekkel. Az LGALS8 esetén az intenzitás és a frekvencia csökkenése is szignifikánsan korrelált a túléléssel. Abban az esetben, ha a medián allati és feletti festődési intenzitás értékkel rendelkező mintákhoz tartozó eredményeket hasonlítjuk össze, az EPCAM-ot ($p = 0{,}048$), valamint az LGALS8 és CD9 összegét ($p = 0{,}031$) találtuk szignifikánsnak. A medián alapján elválasztott Kaplan-Meier görbék a **17. ábrán**, a részletes immunhisztokémiai festődési eredmények a **2. függelékben** láthatóak.



17. ábra: Az immunhisztokémiai festődés intenzitás értékeinek mediánja alapján két csoportra bontva a betegeket az EPCAM, valamint a Galektin–8 és CD9 festődés összege esetében igazoltunk összefüggést a túlélési eredményekkel. A Kaplan–Meier görbéken a medián alatti (1-es csoport, kék), és medián feletti (2-es csoport, piros) értékkel rendelkező betegek túlélési valószínűségét látjuk az idő függvényében. Az x-ek a cenzorált adatokat jelölik.

7. Megbeszélés

A szisztémás kezeléssel szembeni rezisztencia ma is a daganatterápia kudarcának elsődleges oka. Olyan biomarkerek azonosítása, amelyek a terápia megkezdése előtt képesek prediktálni, hogy adott beteg adott tumora milyen valószínűséggel reagál kedvezően az adott gyógyszerre, jelentősen növelhetik a terápia hatékonyságát. A gyógyulási, túlélési arány javulása mellett ezek a módszerek a terápia költséghatékonyságának növekedéséhez és a beteg lehető legcsekélyebb gyógyszerterheléséhez is vezetnek, így a racionális terápia tervezés fontos eszközei.

A biomarkerek használata és az újonnan megismert rezisztenciamechanizmusok szelektív célzása feltehetően nem képes megoldani a szerzett rezisztencia igen gyakran jelentkező problémáját. A rezisztencia valódi gyökereit valószínűleg a tumor heterogenitásban és az ehhez kapcsolódó szomatikus evolúcióban kell keresnünk [156]. Korábbi munkánkban magunk is bemutattuk, hogy hasonló szintű rezisztencia számtalan úton kialakulhat még azonos szelektív terhelés mellett is, *in vitro* környezetben is [5]. Ennél az *in vivo* helyzet azonban sokkal bonyolultabb, itt feltehetően a forrásokért egymással versengő daganatklónokról beszélünk, melyek közül a gyógyszeres kezeléssel éppen a rezisztens klónok túlélésére szelektálunk. Jelenleg nincs olyan terápiás eljárás, ami nem a rezisztenciára szelektál és a jelenlegi kezelési tematikában a megfelelő teljesítményt mutató prediktív biomarkerek jelentik a legjobb esélyt a beteg optimális kezelésében, a lehető legjobb túlélés elérésében.

A carboplatin rezisztenciával kapcsolatos munkáinkban egy újszerű megközelítést alkalmaztunk: a korábban megismert biomarkerek és rezisztencia faktorok vizsgálata helyett egy nagy kiterjedésű adatbányászati metodikából indultunk ki. Több mint 1 100 petefészek daganatos beteg klinikai adatait és a betegekkel párosított transzkriptomikus adathalmazt gyűjtöttük össze és építettük fel saját adatbázisunkat. Ez az 1 100 betegből álló adatbázis nagyobb, mint bármely korábban megjelent vizsgálat anyaga, így biztosítja, hogy elemzésével kellően robosztus eredményeket generáljunk. Az így talált biomarker jelölteket *in vitro* és független klinikai mintákon is vizsgáltuk. Így jutottunk el a legmarkánsabb jelölthöz, a MEK1 génhez.

A MEK1 molekula a MAPK útvonal tagja, igen fontos szerepet játszik a sejtfelszíni különböző növekedési faktor receptorokról érkező jel kapcsolásában az effektor molekulákhoz, és az útvonal több tagja fontos gyógyszertámadási célpont [157, 158]. A MAPK útvonal háromkomponensű downstream jelátvitel, alkotói a MAPK, MAPK kináz (MAPKK, MKK vagy MEK) és a MAPKK kináz vagy MEK kináz (MAPKKK or MEKK) [159]. A MEK1/2 molekulák MAP kináz-kinázok, mely az ERK1/2 MAPK molekulán keresztül fejti ki hatását. Emlősökben legalább négy, különállóan szabályozott MAPK csoport ismert (ERK1/2, JNK1/2/3, p38 alfa/béta/gamma/delta és ERK5). A MAPK-k funkciója legáltalánosabban transzkripciószabályozás az extracelluláris stimulusoknak megfelelően. Fontos szerepük lehet a proliferáció szabályozásában. Az ERK1/2 molekula serkenti a DNS szintézist és a sejtciklus progresszióját is indukálja [160, 161]. Míg az ERK aktiváció túlélési jelet szolgáltat, más MAPK-k (JNK, p38) apoptotikus utakat aktiválnak [162]. Jól látható, hogy a MEK1 aktiváció könnyedén kedvezhet a daganatos progressziónak, a korlátlan osztódás kialakulásának.

A MEK1 legfőbb aktivációs jele az EGFR felől érkezik. Az EGFR a petefészek daganatok 70%-ában felülexpresszált, felülexpressziója rossz prognózissal és kemorezisztenciával társul, ennek ellenére az EGFR inhibitorok klinikai kipróbálása csak mérsékelt eredményeket mutatott [163]. Ennek oka lehet párhuzamos jelátvitelek aktivációja és a redundáns jelátvitel [32], ami adott esetben kiküszöbölhető a jelátvitel alsóbb lépcsőinek célzásával. Eredményünket, miszerint a MEK1 prognosztikus biomarker a platina kezelésben részesült betegek körében más, klinikai környezetben végzett tanulmányok is támogatják, egyfelől a MEK1 amplifikációja társult rosszabb túléléssel [164], másfelől egy fehérje biomarker szett is a rossz prognózissal kötötte össze a MEK1 erőteljes kifejeződését [165], habár ennek ellentmondó eredményeket is közöl az irodalom, ahol szignifikáns összefüggést a MEK1 expresszió és a prognózis közt nem találtak [166].

Több MEK1 inhibitor van jelenleg is klinikai vizsgálatokban. A vizsgálatainkban használt szelektív MEK1 inhibitor, a PD0325901 melanómával és pajzsmirigy karcinómával végzett preklinikai vizsgálatban hatékonynak bizonyult [167, 168], és három klinikai vizsgálatban is kipróbálásra került. A fellépő súlyos mukoszkeletális,

okuláris és neurológiai mellékhatások miatt beszüntettek egy fázis I-es klinikai kísérletet, melyben 13 melanómával, emlőrákkal, vagy vastagbélrákkal kezelt beteg vett részt [169]. Egy fázis II-es vizsgálat nem kissejtes tüdőrákban lezárult 2007-ben, a gyógyszer hatástalansága miatt (publikálatlan adat, clinicaltrials.gov azonosító: NCT00174369). Egy további fázis I-es vizsgálat (clinicaltrials.gov azonosító: NCT01347866) pedig most toboroz betegeket PD0325901-al zajló vizsgálatba.

Arról, hogy a MEK1 milyen módon befolyásolhatja a carboplatin rezisztenciát ellentmondásos és szegényes irodalom áll rendelkezésünkre. A jelen munkánkban a hatásmechanizmus részletes feltérképezésével nem foglalkoztunk, de megemlítek néhány tanulmányt, amely ezt tűzte ki céljául. A téma ellentmondásosságát jól jellemzi, hogy egyaránt találunk vizsgálatokat, amelyekben a MEK1 aktiváció fokozódó szenzitivitást eredményez és olyanokat is, amelyekben a MEK1 aktiváció éppen ellenkezőleg, rezisztenciát indukál. Fung és mtsai munkájában csírasejtes heredaganat sejtvonalakon mutatták ki, hogy a MAD2-n keresztüli MEK1 aktiváció ciszplatin szenzitivitáshoz vezet, a MAD2 csendesítése és így a MEK1 inaktiválása pedig rezisztenssé teszi a sejteket [170]. Ugyanebben a tumor típusban egyetlen sejtvonalon végzett kísérletekkel mutatta ki egy másik csoport, hogy a ciszplatin kezelés indukálja a MEK és ERK aktivációját és ezzel együtt a kaszpáz 3 aktivációt is. MEK inhibitorokkal a kaszpáz 3 aktivációját és a ciszplatin indukálta apoptózist is sikerült mérsékelniük [171]. Méhnyakrák eredetű HeLa sejteken kimutatták, hogy a ciszplatin kezelés dózis és időfüggő ERK aktivációhoz vezetett, ami apoptózist indukált. Ugyanakkor MEK inhibitorokkal a ciszplatin indukálta apoptózis mérsékelhető volt, ERK aktiválóval történő előkezelés pedig növelte a ciszplatin szenzitivitást [172]. Hasonló eredményeket találtak egy másik, szintén méhnyakrák eredetű sejtvonalon [173].

Érdekes módon petefészek daganatos modelleken végzett vizsgálatokban ezeknek az eredményeknek a szöges ellentétét találjuk. A petefészek daganatokban kimutatott eredmények egybevágnak a mi eredményeinkkel, a MEK1 aktivációja itt rezisztenciához vezet és az útvonal gátlásával a sejtek szenzitizálhatóak a platinával szemben. Persons és munkatársai az előzőekben tárgyaltaknak megfelelően azt találták, hogy a platina kezelés a sejtekben dózisfüggő ERK aktivációjához vezet, a MEK1 gátlása azonban az apoptózist és szenzitivitást fokozza [174]. A szerzők ugyanazt az

inhibitort használták, mint az előző tanulmányokban, így az esetleges off-target hatások szerepe kizárható. A MEK-ERK aktiváció egy másik petefészek daganatos modellben ugyanezt a hatást érte el. A jelátvitel gátlásával a szenzitív és a rezisztens sejtvonalak ciszplatin érzékenységét egyaránt sikerült megnövelni [175]. Más preklinikai modellekben is találunk a hipotézisünket támogató eredményeket. Melanóma sejtvonalon a MEK aktivációjának tulajdonították az ERCC1, jól ismert platina rezisztencia gén aktivációját, és így a rezisztenciát [176].

A MEK1 szerepe a platina rezisztenciában tehát tisztázatlan. A tumor típusra specifikus tanulmányok felvetik azt a lehetőséget is, hogy esetleg egy petefészek daganatokra specifikus rezisztencia útvonallal állunk szemben. Ugyanakkor mindezek a vizsgálatok egy-két sejtvonalon végzett preklinikai elemzések. A miénkhez hasonló klinikai kohorton még senki nem vizsgálta korábban a MEK1 szerepét a rossz terápiás válasszal, primer rezisztenciával kapcsolatban.

Az alacsony grade-ű szerózus petefészek daganatok jellegzetessége a BRAF, KRAS, NRAS és HER2 mutáció, amplifikáció vagy felülexpresszió [177, 178], mindemellett ezek a daganatok jellemzően kemorezisztensek [179]. Ezek alapján az alacsony grade-ű szerózus petefészek daganatok optimális célpontjai lennének az anti-MEK1/2 terápiának, ennek ellenére egy fázis II klinikai vizsgálatban, melyet rekurrens petefészek daganatos betegekkel folytattak, a betegek csupán 15%-a reagált a selumetinib (MEK1/2 inhibitor) kezelésre [180]. Ugyanakkor a carboplatinnal való kombinációra, a MEK1 inhibitor, mint szenzitizáló ágens használatára még nem végeztek klinikai kísérletet.

A célzott terápiás tirozin-kináz inhibitorokkal kapcsolatos munkánkban az ERBB/RAS útvonalon ható gyógyszerekkel szembeni rezisztenciával foglalkoztunk. Ezek az ágensek a kétezres évek óta egyes daganattípusokban a terápiás ajánlások elsődleges szereplőivé váltak, annak ellenére, hogy klinikai vizsgálatokban a válaszadási arány tíz és negyvenhét százalék között mozog [147, 181-184]. Emellett még a kezdetben jól reagáló esetekben is igen gyakran gyorsan megjelenik a rezisztencia [127, 128]. Mindenezek alapján szükségesnek látjuk a biomarker paletta bővítését és a rezisztenciafaktorok alaposabb megismerését.

Vizsgálatunkban használtunk a korábbi irodalomban leírt biomarkereket, mégis elsősorban új rezisztenciaasszociált expresszióváltozást mutató gének azonosítása volt a célunk. Ehhez egy széles sejtvonal spektrumot (45 változatos daganattípusból származó vonal) és annak génexpressziós adatait használtuk fel. A sejtvonal-alapú rendszerek az *in vivo* humán betegség szélsőségesen leegyszerűsített modelljei. Ez egyfelől megkönnyíti a munkát, szélesíti a kísérleti technikák nyújtotta lehetőségek skáláját, másfelől azonban a pusztán sejtvonal eredetű vizsgálatokból messzire mutató klinikai következtetéseket levonni hiba lenne. A sok sejtvonal használatán alapuló rezisztencia szűrések ugyanakkor továbbra is a biomarker kutatások alapkövei akár kisebb léptékben [185, 186], akár akkora tanulmányokban, mint a CCLE, ahol közel ötszáz sejtvonal érzékenységét térképezték fel 24 hatóanyaggal szemben [187]. Hogy munkánkat némiképp klinikai kontextusba helyezzük, vizsgálatainkban az alkalmazott gyógyszer-koncentrációkat a klinikailag alkalmazott dózisok alapján terveztük. A megközelítésünk hatékonyságát jól jellemzi, hogy klinikai mintákon is sikerült igazolnunk a sunitinib rezisztencia biomarkereit, habár a használt mintaszám alacsony volt.

A sunitinib rezisztencia a másik négy tirozin-kináz inhibitorral szembeni rezisztenciához képest (vizsgálataink időpontjában) sokkal kevésbé volt jól ismert, jellemzett, így különösen érdekelt minket. Ezért választottuk a sunitinib rezisztenciát a klinikai kipróbálás alanyául. Biomarker jelöltjeink az LGALS8, EPCAM, RAB17 és CD9 gének voltak, melyek közül a CD9-et leszámítva mindegyik szignifikánsan korrelált a sunitinibkezelt vesedaganatos betegek túlélésével, a várakozásainknak megfelelő irányban. A CD9 az LGALS8-al kombinációban azonban már hatékonynak bizonyult. Ezek a biomarkerek mind „negatív markerek”, azaz alacsony szintjük asszociált a rezisztenciával, rosszabb prognózissal.

Az LGALS8 a galektin–8 fehérjét kódolja, mely fontos eleme az extracelluláris mátrixnak, a sejtadhézió modulátoraként játszik szerepet [188]. A galektinek béta galaktozidázokat kötő lektinek és különböző extracelluláris mátrix elemekkel asszociálnak, például fibronektinekkel. A galektinek szerepét a daganatos differenciáció, sejt–sejt adhézió, sejt–mátrix kölcsönhatás és apoptózis szabályozásában egyaránt leírták [189]. A galektin-8 csökkent expressziója rekurrenciával társult húgyhólyag daganatokban [190], a metasztázisok megjelenésével kapcsolatban

ellentétes szerepet tulajdonítanak neki egyes tanulmányok [191, 192]. Rezisztenciával előttünk más vizsgálatok nem hozták kapcsolatba. Méréseinkben a galektin–8 immunhisztokémiai festődésének csökkent intenzitása és frekvenciája korrelált sunitinib kezelésben részesült, áttétes veserákban szenvedő betegek jobb túlélésével.

A RAB17 esetleges szerepével a daganatokban igen keveset foglalkozik az irodalom. A Rab fehérjék GTPázok, melyek szerepe a sejt membrántranszport szabályozásában van [193]. Immunhisztokémiai vizsgálatunkban a festődés intenzitása mutatott összefüggést a túléléssel.

Az EPCAM sejtadhéziós molekula, normálisan az epitélsejtek bazolaterális felszínén expresszálódik. Daganatokban szerepe van a proliferációban a c-Myc, ciklinek aktivációján keresztül, protoonkogénként tartják számon [194]. Számos daganat erősen expresszálja, sőt már gyógyszercélpontként is használják, de a világossejtes veserákokban az expresszió kevésbé jellemző [195]. Érdekes módon eredményeinkben az alacsony expresszió társult sunitnib szenzitivitással és az immunhisztokémiai eredményekben jobb túléléssel. Ez némiképp ellentmond a korábbi irodalomnak, ahol az EPCAM expresszió a rossz prognózissal társul [196]. Kifejeződése azonban az agresszív differenciálatlan fenotípus kialakulását megakadályozza és szintjének csökkenése az epiteliális-mezenchimális átalakulást segíti elő [197]. Az epiteliális-mezenchimális átalakulás során a sejtek elvesztik polaritásukat és sejt-sejt kapcsolataikat, migráló fenotípus alakul ki, jellemzően agresszívabb betegséggel és kemorezisztenciával társul [29]. Sunitinib rezisztenciával kapcsolatba más tanulmány nem hozta.

A CD9 sejtfelszíni glikoprotein, sejtadhéziós molekula, melynek daganatok esetén metasztázisképzés szupresszor hatása van, eredményeinkkel egybehangzóan számos tanulmány kimutatta, hogy csökkent expressziója rossz prognózissal társul, több daganattípusban [198]. Kísérleteinkben a CD9 alkalmas volt a sunitinib szenzitív és rezisztens sejtvonalak elkülönítésére, azonban a vese minták esetében nem ért el szignifikáns eredményt.

8. Következtetések

Az 1970-es évek óta a petefészek daganatok kezelésében jelentős előrelépések történtek, és a teljes ötéves túlélés 25%-al növekedett [199]. Ennek ellenére a jelenlegi platina alapú kemoterápia messze nem optimális. A terápiatervezés hatékonyságának növelésére új potenciális gyógyszercélpontok felkutatására és hatékony prediktív biomarkerek bevezetésére van szükség. Munkánkban *in silico* és *in vitro* vizsgálati módszereket alkalmaztunk klinikai validálással, potenciális biomarkerek felkutatására. A MEK1 gén potenciális expresszió alapú biomarker, melynek expressziója korrelál a petefészek daganatok platina terápiára adott válaszával és a platinakezelésben részesült betegek progressziómentes túlélésével. Továbbá a MEK1 funkció kiejtésével a platina érzékenység *in vitro* fokozható. Eredményeink segíthetnek a petefészek daganatok kemoterápiájának fejlesztésében, finomításában.

A célzott tirozin-kináz inhibitorok rendkívüli gyorsasággal terjedtek el a daganatok kezelésében. Azonban hatékonyságuk csak egy szűk betegpopulációra korlátozott és a kezdetben jól reagáló betegek körében is igen gyorsan kialakul a rezisztencia. A szelektív tirozin-kináz inhibitorok esetében különösen nagy jelentőséggel bír a prediktív biomarkerek azonosítása. Széles sejtvonal panelen alkalmazott *in vitro* gyógyszer-érzékenységi tesztet kombinálva a sejtvonalak expressziós profiljának *in silico* elemzésével jutottunk a gefitinib, lapatinib, erlotinib, sunitinib és sorafenib rezisztencia biomarkereihez. A sunitinib rezisztencia markereit klinikai mintákon is vizsgáltuk. Az általunk beállított sejtvonal érzékenységi szűrés modell alkalmas rezisztenciamarkerek azonosítására. Olyan új biomarkereket azonosítottunk, melyek további funkcionális vizsgálatok alapjait képezhetik és érdemesek klinikai mintákon való tesztelésre.

9. Összefoglalás

Háttér: A szisztémás daganatterápia kudarcának elsődleges oka a rezisztencia. A célzott tirozin-kináz inhibitorok esetén a válogatatlan populációkban végzett klinikai kísérletekben a teljes válaszadási ráta $10 - 47\%$ között változik, a petefészek daganatos betegek 25%-ában pedig a platina terápiától számított hat hónapon belül kiújul a - már rezisztens - tumor. A prediktív biomarkerek fontos elemei a racionális terápiatervezésnek.

Módszerek: Vizsgálatainkban több mint ezer, platinakezelésben részesült petefészek daganatos beteg gén chip elemzését (GEO és TCGA adatok) és klinikai adatait tartalmazó adatbázist építettem, ebben Receiver Operating Characteristic (ROC) elemzéssel azonosítottunk olyan géneket, melyek emelkedett expressziója rossz terápiás válasszal társult. A legjobb előrejelző géneket 4 sejtvonalon végzett géncsendesítéssel kombinált carboplatin érzékenységi vizsgálatban vizsgáltam meg. Az *in vitro* tesztekben legjobban teljesítő MEK1 gén inhibitorával is végeztem carboplatin kombinációs kísérleteket. 93 független betegmintán immunhisztokémiával és qRT-PCR-el igazoltuk a MEK1 szerepét a carboplatin kezelés utáni túlélésben.

Összesen 45 sejtvonal gyógyszer érzékenységét vizsgáltam 5 tirozin-kináz gátlószerrel (sunitinib, sorafenib, gefitinib, lapatinib, erlotinib) szemben. A szenzitív és rezisztens sejtvonalak gén chip expressziós adatait (caArray adatok) összevetve SAM (Significance Analysis of Microarrays) és Rank Products algoritmusokkal azonosítottuk azokat a géneket melyek eltérő expressziója leghatékonyabban elválasztotta a rezisztens és érzékeny csoportokat. Az LGALS8, RAB17, CD9 és EPCAM gének expressziójának szerepét a sunitinib kezelésben részesült vesedaganatos betegek túlélésben immunhisztokémiával teszteltük.

Eredmények: 1452 petefészek daganatos betegen végzett ROC analízis alapján a nyolc potenciális biomarkert azonosítottunk: JRK, CNOT8, RTF1, CCT3, NFAT2CIP, MEK1, FUBP1 és a CSDE1 (a JRK, MEK1, FUBP1, CNOT8 expressziója nemcsak a terápiás válasszal, de a progresszió-mentes túléléssel is korrelált). A MEK1, CSDE1, CNOT8, RTF1 gének csendesítésével ($p < 0{,}01$), és a MEK1 farmakológiai gátlásával

($p < 0{,}001$) szignifikáns érzékenyítést értünk el a carboplatinnal szemben, sejtvonalakban. A MEK1 expressziója összefüggött a túléléssel platinakezelésben részesült független beteganyagon qRT-PCR-el ($n = 34$; $HR = 5{,}8$; $p = 0{,}003$) és IHC-val ($n = 59$; $HR = 4{,}3$; $p = 0{,}033$) mérve.

A bioinformatikai számítások eredményeként 63 tirozin-kináz biomarkert azonosítottunk. A sejtvonalakon végzett qRT-PCR vizsgálat 45 gén szerepét igazolta és csupán két gén (ANXA3 és RAB25) játszott szerepet több mint három inhibitorral szembeni rezisztenciában. Az immunhisztokémiai igazolás ($n = 39$) az LGALS8 ($p = 0{,}026$), EPCAM ($p = 0{,}01$) és RAB17 ($p = 0{,}018$) szerepét mutatta ki a sunitinib kezelt vesesejtes karcinómás betegek túlélésében.

Következtetések: Az általunk azonosított biomarkerek a carboplatin és a sunitinib rezisztencia vizsgálatában új lehetőséget nyújthatnak, további klinikai vizsgálatok és gyógyszerfejlesztések alapjait képezhetik.

10. Summary

Background: The primary factor behind the failure of systematic cancer treatment is chemoresistance. Clinical trials showed $10 - 46\%$ response rate for targeted tyrosine kinase inhibitor treatment, and in ovarian cancer, platinum resistant tumor recurs within six months after treatment in 25% of the patients. Therefore, biomarkers of therapy response and resistance will become important elements of rational treatment planning.

Methods: A database of ovarian cancer transcriptomic datasets including treatment and response information was set up by mining the GEO and TCGA repositories. Receiver operating characteristics (ROC) analysis was performed to identify genes whose high expression correlated with bad therapy response. The most significant biomarker candidates were *in vitro* functionally evaluated in four epithelial ovarian cancer cell lines using gene silencing and pharmacological inhibition (in case of MEK1) combined with carboplatin treatment in survival assays. The best candidate MEK1 was validated by IHC and qRT-PCR in an independent patient cohort ($n = 93$).

I investigated sensitivity against five tyrosine kinase inhibitors (sunitinib, sorafenib, gefitinib, lapatinib) in 45 cell lines. Triplicate gene expression signatures were obtained from the caArray project. Gene expression based resistance biomarkers were identified by SAM (Significance Analysis of Microarrays) and Rank Products analysis. The role of LGALS8, RAB17, CD9 and EPCAM expression were tested in sunitinib treated renal cell carcinoma patients.

Results: All together 1,452 eligible ovarian cancer patients were identified. Based on the ROC analysis, the eight most significant resistance biomarkers were JRK, CNOT8, RTF1, CCT3, NFAT2CIP, MEK1, FUBP1 and CSDE1. The expression of JRK, MEK1, FUBP1 and CNOT8 also correlated with progression free survival. Silencing of MEK1, CSDE1, CNOT8, RTF1 ($p < 0.01$) and pharmacological inhibition of MEK1 ($p < 0.001$) caused significant increase in carboplatin sensitivity in the cell lines. We found correlation between high expression of MEK1 and the survival of carboplatin treated patients using qRT-PCR ($n = 34$; $HR = 5.8$; $p = 0.003$) and IHC ($n = 59$; $HR = 4.3$; $p = 0.033$) measurements.

A list of 63 genes associated with resistance against the five tyrosine kinase inhibitors was identified. qRT-PCR measurements confirmed 45 of 63 genes identified by microarray analysis. Only two genes (ANXA3 and RAB25) had a role in resistance against four inhibitors. Validation using immunohistochemistry ($n = 39$) indicated that the expression of LGALS8 ($p = 0.026$), EPCAM ($p = 0.01$) and RAB17 ($p = 0.018$) have a role in survival of sunitinib treated renal cell carcinoma patients.

Conclusions: The identified biomarkers open new possibilities in assessing resistance to carboplatin and sunitinib, and may serve as a starting point for further clinical and preclinical investigations.

11. Irodalomjegyzék

1. Penzvalto Z, Lanczky A, Lenart J, Meggyeshazi N, Krenacs T, Szoboszlai N, Denkert C, Pete I, Gyorffy B. (2014) MEK1 is associated with carboplatin resistance and is a prognostic biomarker in epithelial ovarian cancer. BMC cancer. 14: p. 837.
2. Penzvalto Z, Tegze B, Szasz AM, Sztupinszki Z, Liko I, Szendroi A, Schafer R, Gyorffy B. (2013) Identifying resistance mechanisms against five tyrosine kinase inhibitors targeting the ERBB/RAS pathway in 45 cancer cell lines. PloS one. 8(3): p. e59503.
3. Penzvalto Z, Surowiak P, Gyorffy B. (2014) Biomarkers for systemic therapy in ovarian cancer. Current cancer drug targets. 14(3): p. 259-73.
4. Penzvalto Z, Mihaly Z, Gyorffy B. (2009) Génexpresszió mérésén alapuló multigénes prognosztikai és prediktív előrejelzés emlőtumorokban. Magyar onkologia. 53(4): p. 351-9.
5. Tegze B, Szallasi Z, Haltrich I, Penzvalto Z, Toth Z, Liko I, Gyorffy B. (2012) Parallel evolution under chemotherapy pressure in 29 breast cancer cell lines results in dissimilar mechanisms of resistance. PloS one. 7(2): p. e30804.
6. Adair FE, Bagg HJ. (1931) Experimental and Clinical Studies on the Treatment of Cancer by Dichlorethylsulphide (Mustard Gas. Annals of surgery. 93(1): p. 190-9.
7. Comings DE. (1973) A general theory of carcinogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 70(12): p. 3324-8.
8. Levinson AD, Oppermann H, Levintow L, Varmus HE, Bishop JM. (1978) Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. Cell. 15(2): p. 561-72.
9. Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA. (1982) Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. Nature. 297(5866): p. 474-8.

10. Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 144(5): p. 646-74.
11. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nature medicine. 2(5): p. 561-6.
12. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science. 304(5676): p. 1497-500.
13. Amdnistration UFaD. (2003) Annual Report to Congress Federal Food, Drug, and Cosmetic Act as Amended by the Medical Device User Fee Act of 2002.
14. Firestein GS. (2006) A biomarker by any other name. Nature clinical practice. Rheumatology. 2(12): p. 635.
15. Ludwig JA, Weinstein JN. (2005) Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. Nature reviews. Cancer. 5(11): p. 845-56.
16. Petak I, Schwab R, Orfi L, Kopper L, Keri G. (2010) Integrating molecular diagnostics into anticancer drug discovery. Nature reviews. Drug discovery. 9(7): p. 523-35.
17. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science. 244(4905): p. 707-12.
18. Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, Hung G, Robinson RA, Harris C, El-Naggar A, Slamon DJ, Phillips RN, Ross JS, Wolman SR, Flom KJ. (1997) HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 15(8): p. 2894-904.
19. Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Giordano SH. (2010) Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. Journal of clinical

oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 28(1): p. 92-8.

20. Spector NL, Blackwell KL. (2009) Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 27(34): p. 5838-47.

21. Buyse M, Sargent DJ, Grothey A, Matheson A, de Gramont A. (2010) Biomarkers and surrogate end points--the challenge of statistical validation. Nature reviews. Clinical oncology. 7(6): p. 309-17.

22. Ferriss JS, Kim Y, Duska L, Birrer M, Levine DA, Moskaluk C, Theodorescu D, Lee JK. (2012) Multi-gene expression predictors of single drug responses to adjuvant chemotherapy in ovarian carcinoma: predicting platinum resistance. PloS one. 7(2): p. e30550.

23. Liu Y, Sun Y, Broaddus R, Liu J, Sood AK, Shmulevich I, Zhang W. (2012) Integrated analysis of gene expression and tumor nuclear image profiles associated with chemotherapy response in serous ovarian carcinoma. PloS one. 7(5): p. e36383.

24. Denkert C, Budczies J, Darb-Esfahani S, Gyorffy B, Sehouli J, Konsgen D, Zeillinger R, Weichert W, Noske A, Buckendahl AC, Muller BM, Dietel M, Lage H. (2009) A prognostic gene expression index in ovarian cancer - validation across different independent data sets. The Journal of pathology. 218(2): p. 273-80.

25. (2011) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. Nature. 474(7353): p. 609-15.

26. Gyorffy A, Gyorffy B, Molnar B, Tulassay Z. (2005) [Hybridization and their application in the DNA array technology]. Orvosi hetilap. 146(27): p. 1447-52.

27. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science. 270(5235): p. 467-70.

28. Dexter DL, Leith JT. (1986) Tumor heterogeneity and drug resistance. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 4(2): p. 244-57.

29. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. (2013) Cancer drug resistance: an evolving paradigm. Nature reviews. Cancer. 13(10): p. 714-26.
30. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. (2012) Molecular mechanisms of cisplatin resistance. Oncogene. 31(15): p. 1869-83.
31. Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, Castedo M, Kroemer G. (2014) Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. Cell death & disease. 5: p. e1257.
32. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, Peng J, Lin E, Wang Y, Sosman J, Ribas A, Li J, Moffat J, Sutherlin DP, Koeppen H, Merchant M, Neve R, Settleman J. (2012) Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. Nature. 487(7408): p. 505-9.
33. Vaughan S, Coward JI, Bast RC, Jr., Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, Coukos G, Crum CC, Drapkin R, Etemadmoghadam D, Friedlander M, Gabra H, Kaye SB, Lord CJ, Lengyel E, Levine DA, McNeish IA, Menon U, Mills GB, Nephew KP, Oza AM, Sood AK, Stronach EA, Walczak H, Bowtell DD, Balkwill FR. (2011) Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. Nat Rev Cancer. 11(10): p. 719-25.
34. Scully RE. (1975) World Health Organization classification and nomenclature of ovarian cancer. Natl Cancer Inst Monogr. 42: p. 5-7.
35. Koonings PP, Campbell K, Mishell DR, Jr., Grimes DA. (1989) Relative frequency of primary ovarian neoplasms: a 10-year review. Obstet Gynecol. 74(6): p. 921-6.
36. Vang R, Shih Ie M, Kurman RJ. (2009) Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. Adv Anat Pathol. 16(5): p. 267-82.
37. Al-Hussaini M, Stockman A, Foster H, McCluggage WG. (2004) WT-1 assists in distinguishing ovarian from uterine serous carcinoma and in distinguishing between serous and endometrioid ovarian carcinoma. Histopathology. 44(2): p. 109-15.

38. Sieben NL, Macropoulos P, Roemen GM, Kolkman-Uljee SM, Jan Fleuren G, Houmadi R, Diss T, Warren B, Al Adnani M, De Goeij AP, Krausz T, Flanagan AM. (2004) In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low-grade serous tumours. J Pathol. 202(3): p. 336-40.
39. El-Osta H, Falchook G, Tsimberidou A, Hong D, Naing A, Kim K, Wen S, Janku F, Kurzrock R. (2011) BRAF mutations in advanced cancers: clinical characteristics and outcomes. PLoS One. 6(10): p. e25806.
40. Singer G, Shih Ie M, Truskinovsky A, Umudum H, Kurman RJ. (2003) Mutational analysis of K-ras segregates ovarian serous carcinomas into two types: invasive MPSC (low-grade tumor) and conventional serous carcinoma (high-grade tumor). Int J Gynecol Pathol. 22(1): p. 37-41.
41. Singer G, Kurman RJ, Chang HW, Cho SK, Shih Ie M. (2002) Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. Am J Pathol. 160(4): p. 1223-8.
42. Singer G, Oldt R, 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, Shih Ie M. (2003) Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. J Natl Cancer Inst. 95(6): p. 484-6.
43. Lassus H, Sihto H, Leminen A, Joensuu H, Isola J, Nupponen NN, Butzow R. (2006) Gene amplification, mutation, and protein expression of EGFR and mutations of ERBB2 in serous ovarian carcinoma. J Mol Med (Berl). 84(8): p. 671-81.
44. Salani R, Kurman RJ, Giuntoli R, 2nd, Gardner G, Bristow R, Wang TL, Shih IM. (2008) Assessment of TP53 mutation using purified tissue samples of ovarian serous carcinomas reveals a higher mutation rate than previously reported and does not correlate with drug resistance. Int J Gynecol Cancer. 18(3): p. 487-91.
45. Gilks CB, Prat J. (2009) Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. Hum Pathol. 40(9): p. 1213-23.
46. Seidman JD, Kurman RJ, Ronnett BM. (2003) Primary and metastatic mucinous adenocarcinomas in the ovaries: incidence in routine practice with a new approach to improve intraoperative diagnosis. Am J Surg Pathol. 27(7): p. 985-93.

47. Winter WE, 3rd, Maxwell GL, Tian C, Carlson JW, Ozols RF, Rose PG, Markman M, Armstrong DK, Muggia F, McGuire WP. (2007) Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. J Clin Oncol. 25(24): p. 3621-7.

48. Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, Terakawa N, Kikuchi Y, Kita T, Suzuki M, Sato I, Taguchi K. (2000) Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. Cancer. 88(11): p. 2584-9.

49. Lee Y, Miron A, Drapkin R, Nucci MR, Medeiros F, Saleemuddin A, Garber J, Birch C, Mou H, Gordon RW, Cramer DW, McKeon FD, Crum CP. (2007) A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. J Pathol. 211(1): p. 26-35.

50. Kobel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, Leung S, Bowen NJ, Ionescu DN, Rajput A, Prentice LM, Miller D, Santos J, Swenerton K, Gilks CB, Huntsman D. (2008) Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. PLoS Med. 5(12): p. e232.

51. Zaino RJ, Brady MF, Lele SM, Michael H, Greer B, Bookman MA. (2011) Advanced stage mucinous adenocarcinoma of the ovary is both rare and highly lethal: a Gynecologic Oncology Group study. Cancer. 117(3): p. 554-62.

52. Vang R, Gown AM, Wu LS, Barry TS, Wheeler DT, Yemelyanova A, Seidman JD, Ronnett BM. (2006) Immunohistochemical expression of CDX2 in primary ovarian mucinous tumors and metastatic mucinous carcinomas involving the ovary: comparison with CK20 and correlation with coordinate expression of CK7. Mod Pathol. 19(11): p. 1421-8.

53. Heinzelmann-Schwarz VA, Scolyer RA, Scurry JP, Smith AN, Gardiner-Garden M, Biankin AV, Baron-Hay S, Scott C, Ward RL, Fink D, Hacker NF, Sutherland RL, O'Brien PM. (2007) Low meprin alpha expression differentiates primary ovarian mucinous carcinoma from gastrointestinal cancers that commonly metastasise to the ovaries. J Clin Pathol. 60(6): p. 622-6.

54. Sainz de la Cuesta R, Eichhorn JH, Rice LW, Fuller AF, Jr., Nikrui N, Goff BA. (1996) Histologic transformation of benign endometriosis to early epithelial ovarian cancer. Gynecol Oncol. 60(2): p. 238-44.

55. Munksgaard PS, Blaakaer J. (2012) The association between endometriosis and ovarian cancer: a review of histological, genetic and molecular alterations. Gynecol Oncol. 124(1): p. 164-9.
56. Berns EM, Bowtell DD. (2012) The changing view of high-grade serous ovarian cancer. Cancer Res. 72(11): p. 2701-4.
57. National Comprehensive Cancer Network http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/ovarian.pdf (Accessed February 25, 2014).
58. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M. (1996) Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. The New England journal of medicine. 334(1): p. 1-6.
59. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, Mannel RS, DeGeest K, Hartenbach EM, Baergen R. (2003) Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 21(17): p. 3194-200.
60. Miller DS, Blessing JA, Krasner CN, Mannel RS, Hanjani P, Pearl ML, Waggoner SE, Boardman CH. (2009) Phase II evaluation of pemetrexed in the treatment of recurrent or persistent platinum-resistant ovarian or primary peritoneal carcinoma: a study of the Gynecologic Oncology Group. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 27(16): p. 2686-91.
61. Markman M, Hoskins W. (1992) Responses to salvage chemotherapy in ovarian cancer: a critical need for precise definitions of the treated population. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 10(4): p. 513-4.
62. Harrap KR. (1985) Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative. Cancer treatment reviews. 12 Suppl A: p. 21-33.

63. Zorbas H, Keppler BK. (2005) Cisplatin damage: are DNA repair proteins saviors or traitors to the cell? Chembiochem : a European journal of chemical biology. 6(7): p. 1157-66.
64. Kelland LR. (1993) New platinum antitumor complexes. Critical reviews in oncology/hematology. 15(3): p. 191-219.
65. Reeves R, Adair JE. (2005) Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. DNA repair. 4(8): p. 926-38.
66. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. (2001) Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? Molecular pharmacology. 59(4): p. 657-63.
67. Yang Z, Schumaker LM, Egorin MJ, Zuhowski EG, Guo Z, Cullen KJ. (2006) Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 12(19): p. 5817-25.
68. Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. (2003) Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. The Journal of biological chemistry. 278(11): p. 9100-6.
69. Yu F, Megyesi J, Price PM. (2008) Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity. American journal of physiology. Renal physiology. 295(1): p. F44-52.
70. Kelland LR. (2000) Preclinical perspectives on platinum resistance. Drugs. 59 Suppl 4: p. 1-8; discussion 37-8.
71. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. (2002) Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(22): p. 14298-302.
72. Safaei R. (2006) Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. Cancer Lett. 234(1): p. 34-9.
73. Lee YY, Choi CH, Do IG, Song SY, Lee W, Park HS, Song TJ, Kim MK, Kim TJ, Lee JW, Bae DS, Kim BG. (2011) Prognostic value of the copper transporters, CTR1 and CTR2, in patients with ovarian carcinoma receiving platinum-based chemotherapy. Gynecol Oncol. 122(2): p. 361-5.

74. Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, Miyazaki K, Neamati N, Takebayashi Y. (2002) Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. Int J Cancer. 101(5): p. 488-95.

75. Nakayama K, Kanzaki A, Terada K, Mutoh M, Ogawa K, Sugiyama T, Takenoshita S, Itoh K, Yaegashi N, Miyazaki K, Neamati N, Takebayashi Y. (2004) Prognostic value of the Cu-transporting ATPase in ovarian carcinoma patients receiving cisplatin-based chemotherapy. Clin Cancer Res. 10(8): p. 2804-11.

76. Fu S, Naing A, Fu C, Kuo MT, Kurzrock R. (2012) Overcoming platinum resistance through the use of a copper-lowering agent. Molecular cancer therapeutics. 11(6): p. 1221-5.

77. Mayr D, Pannekamp U, Baretton GB, Gropp M, Meier W, Flens MJ, Scheper R, Diebold J. (2000) Immunohistochemical analysis of drug resistance-associated proteins in ovarian carcinomas. Pathol Res Pract. 196(7): p. 469-75.

78. Ikeda K, Sakai K, Yamamoto R, Hareyama H, Tsumura N, Watari H, Shimizu M, Minakami H, Sakuragi N. (2003) Multivariate analysis for prognostic significance of histologic subtype, GST-pi, MDR-1, and p53 in stages II-IV ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer. 13(6): p. 776-84.

79. Shiga H, Heath EI, Rasmussen AA, Trock B, Johnston PG, Forastiere AA, Langmacher M, Baylor A, Lee M, Cullen KJ. (1999) Prognostic value of p53, glutathione S-transferase pi, and thymidylate synthase for neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in head and neck cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 5(12): p. 4097-104.

80. Siddik ZH. (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene. 22(47): p. 7265-79.

81. Gossage L, Madhusudan S. (2007) Current status of excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in cancer. Cancer treatment reviews. 33(6): p. 565-77.

82. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC. (2006) DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. The New England journal of medicine. 355(10): p. 983-91.

83. Friboulet L, Olaussen KA, Pignon JP, Shepherd FA, Tsao MS, Graziano S, Kratzke R, Douillard JY, Seymour L, Pirker R, Filipits M, Andre F, Solary E, Ponsonnailles F, Robin A, Stoclin A, Dorvault N, Commo F, Adam J, Vanhecke E, Saulnier P, Thomale J, Le Chevalier T, Dunant A, Rousseau V, Le Teuff G, Brambilla E, Soria JC. (2013) ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. The New England journal of medicine. 368(12): p. 1101-10.

84. Chen P, Wiencke J, Aldape K, Kesler-Diaz A, Miike R, Kelsey K, Lee M, Liu J, Wrensch M. (2000) Association of an ERCC1 polymorphism with adult-onset glioma. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 9(8): p. 843-7.

85. Larrea AA, Lujan SA, Kunkel TA. (2010) SnapShot: DNA mismatch repair. Cell. 141(4): p. 730 e1.

86. Lin X, Howell SB. (1999) Effect of loss of DNA mismatch repair on development of topotecan-, gemcitabine-, and paclitaxel-resistant variants after exposure to cisplatin. Molecular pharmacology. 56(2): p. 390-5.

87. Fink D, Nebel S, Norris PS, Aebi S, Kim HK, Haas M, Howell SB. (1998) The effect of different chemotherapeutic agents on the enrichment of DNA mismatch repair-deficient tumour cells. British journal of cancer. 77(5): p. 703-8.

88. Brown R, Hirst GL, Gallagher WM, McIlwrath AJ, Margison GP, van der Zee AG, Anthoney DA. (1997) hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. Oncogene. 15(1): p. 45-52.

89. Prakash S, Johnson RE, Prakash L. (2005) Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. Annual review of biochemistry. 74: p. 317-53.

90. Knobel PA, Marti TM. (2011) Translesion DNA synthesis in the context of cancer research. Cancer cell international. 11: p. 39.
91. Bassett E, Vaisman A, Tropea KA, McCall CM, Masutani C, Hanaoka F, Chaney SG. (2002) Frameshifts and deletions during in vitro translesion synthesis past Pt-DNA adducts by DNA polymerases beta and eta. DNA repair. 1(12): p. 1003-16.
92. Turner N, Tutt A, Ashworth A. (2004) Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. Nature reviews. Cancer. 4(10): p. 814-9.
93. King MC, Marks JH, Mandell JB. (2003) Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. Science. 302(5645): p. 643-6.
94. Borst P, Rottenberg S, Jonkers J. (2008) How do real tumors become resistant to cisplatin? Cell cycle. 7(10): p. 1353-9.
95. Swisher EM, Sakai W, Karlan BY, Wurz K, Urban N, Taniguchi T. (2008) Secondary BRCA1 mutations in BRCA1-mutated ovarian carcinomas with platinum resistance. Cancer research. 68(8): p. 2581-6.
96. Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. Cell. 100(1): p. 57-70.
97. Righetti SC, Della Torre G, Pilotti S, Menard S, Ottone F, Colnaghi MI, Pierotti MA, Lavarino C, Cornarotti M, Oriana S, Bohm S, Bresciani GL, Spatti G, Zunino F. (1996) A comparative study of p53 gene mutations, protein accumulation, and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. Cancer research. 56(4): p. 689-93.
98. Gadducci A, Cosio S, Muraca S, Genazzani AR. (2002) Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications. European journal of gynaecological oncology. 23(5): p. 390-6.
99. Hengstler JG, Lange J, Kett A, Dornhofer N, Meinert R, Arand M, Knapstein PG, Becker R, Oesch F, Tanner B. (1999) Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase IIalpha to chemoresistance in ovarian cancer. Cancer research. 59(13): p. 3206-14.
100. Palmieri C, Gojis O, Rudraraju B, Stamp-Vincent C, Wilson D, Langdon S, Gourley C, Faratian D. (2013) Expression of steroid receptor coactivator 3 in

ovarian epithelial cancer is a poor prognostic factor and a marker for platinum resistance. British journal of cancer. 108(10): p. 2039-44.

101. Kolasa IK, Rembiszewska A, Felisiak A, Ziolkowska-Seta I, Murawska M, Moes J, Timorek A, Dansonka-Mieszkowska A, Kupryjanczyk J. (2009) PIK3CA amplification associates with resistance to chemotherapy in ovarian cancer patients. Cancer biology & therapy. 8(1): p. 21-6.

102. Farley J, Smith LM, Darcy KM, Sobel E, O'Connor D, Henderson B, Morrison LE, Birrer MJ. (2003) Cyclin E expression is a significant predictor of survival in advanced, suboptimally debulked ovarian epithelial cancers: a Gynecologic Oncology Group study. Cancer research. 63(6): p. 1235-41.

103. Ren JH, He WS, Nong L, Zhu QY, Hu K, Zhang RG, Huang LL, Zhu F, Wu G. (2010) Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy. Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals. 25(1): p. 75-80.

104. Ren A, Yan G, You B, Sun J. (2008) Down-regulation of mammalian sterile 20-like kinase 1 by heat shock protein 70 mediates cisplatin resistance in prostate cancer cells. Cancer research. 68(7): p. 2266-74.

105. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. (2013) Immunogenic cell death in cancer therapy. Annual review of immunology. 31: p. 51-72.

106. Roodhart JM, Daenen LG, Stigter EC, Prins HJ, Gerrits J, Houthuijzen JM, Gerritsen MG, Schipper HS, Backer MJ, van Amersfoort M, Vermaat JS, Moerer P, Ishihara K, Kalkhoven E, Beijnen JH, Derksen PW, Medema RH, Martens AC, Brenkman AB, Voest EE. (2011) Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. Cancer cell. 20(3): p. 370-83.

107. Lemmon MA, Schlessinger J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 141(7): p. 1117-34.

108. Sadowski I, Stone JC, Pawson T. (1986) A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. Molecular and cellular biology. 6(12): p. 4396-408.

109. Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. (1994) The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. Cell. 77(1): p. 121-31.

110. Hemming AW, Davis NL, Kluftinger A, Robinson B, Quenville NF, Liseman B, LeRiche J. (1992) Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. J Surg Oncol. 51(3): p. 147-52.

111. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol. 19(3): p. 183-232.

112. Kaira K, Horie Y, Ayabe E, Murakami H, Takahashi T, Tsuya A, Nakamura Y, Naito T, Endo M, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N. (2010) Pulmonary pleomorphic carcinoma: a clinicopathological study including EGFR mutation analysis. J Thorac Oncol. 5(4): p. 460-5.

113. Farndon JR, Nicholson S, Sainsbury JR, Harris AL. (1989) Epidermal growth factor receptors and breast cancer. Bristol Med Chir J. 104(2): p. 51-2.

114. Nicholson S, Wright C, Sainsbury JR, Halcrow P, Kelly P, Angus B, Farndon JR, Harris AL. (1990) Epidermal growth factor receptor (EGFr) as a marker for poor prognosis in node-negative breast cancer patients: neu and tamoxifen failure. J Steroid Biochem Mol Biol. 37(6): p. 811-4.

115. McKay JA, Murray LJ, Curran S, Ross VG, Clark C, Murray GI, Cassidy J, McLeod HL. (2002) Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. Eur J Cancer. 38(17): p. 2258-64.

116. Gyorffy B, Schafer R. (2010) Biomarkers downstream of RAS: a search for robust transcriptional targets. Current cancer drug targets. 10(8): p. 858-68.

117. Schlessinger J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 103(2): p. 211-25.

118. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. (2004) EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101(36): p. 13306-11.

119. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, Lorimer I, Zhang T, Liu N, Daneshmand M, Marrano P, da Cunha Santos G, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J, Shepherd FA. (2005) Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. The New England journal of medicine. 353(2): p. 133-44.

120. Gomez HL, Doval DC, Chavez MA, Ang PC, Aziz Z, Nag S, Ng C, Franco SX, Chow LW, Arbushites MC, Casey MA, Berger MS, Stein SH, Sledge GW. (2008) Efficacy and safety of lapatinib as first-line therapy for ErbB2-amplified locally advanced or metastatic breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 26(18): p. 2999-3005.

121. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. (2004) BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. Cancer research. 64(19): p. 7099-109.

122. Carlomagno F, Anaganti S, Guida T, Salvatore G, Troncone G, Wilhelm SM, Santoro M. (2006) BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. Journal of the National Cancer Institute. 98(5): p. 326-34.

123. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM. (2007) Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. The New England journal of medicine. 356(2): p. 125-34.

124. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Nature reviews. Cancer. 7(3): p. 169-81.

125. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC,

Settleman J, Haber DA. (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. The New England journal of medicine. 350(21): p. 2129-39.

126. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H. (2005) Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. PLoS medicine. 2(3): p. e73.

127. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Ogura T, Ando M, Miyazawa H, Tanaka T, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T. (2010) Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. The New England journal of medicine. 362(25): p. 2380-8.

128. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, Bergethon K, Shaw AT, Gettinger S, Cosper AK, Akhavanfard S, Heist RS, Temel J, Christensen JG, Wain JC, Lynch TJ, Vernovsky K, Mark EJ, Lanuti M, Iafrate AJ, Mino-Kenudson M, Engelman JA. (2011) Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. Science translational medicine. 3(75): p. 75ra26.

129. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B. (2005) EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. The New England journal of medicine. 352(8): p. 786-92.

130. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Yoshida K, Hida T, Tsuboi M, Tada H, Kuwano H, Mitsudomi T. (2006) Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 12(19): p. 5764-9.

131. Carter CA, Kelly RJ, Giaccone G. (2009) Small-molecule inhibitors of the human epidermal receptor family. Expert Opin Investig Drugs. 18(12): p. 1829-42.

132. Kancha RK, von Bubnoff N, Bartosch N, Peschel C, Engh RA, Duyster J. (2011) Differential sensitivity of ERBB2 kinase domain mutations towards lapatinib. PloS one. 6(10): p. e26760.

133. Gilmer TM, Cable L, Alligood K, Rusnak D, Spehar G, Gallagher KT, Woldu E, Carter HL, Truesdale AT, Shewchuk L, Wood ER. (2008) Impact of common epidermal growth factor receptor and HER2 variants on receptor activity and inhibition by lapatinib. Cancer research. 68(2): p. 571-9.

134. Zhou BB, Peyton M, He B, Liu C, Girard L, Caudler E, Lo Y, Baribaud F, Mikami I, Reguart N, Yang G, Li Y, Yao W, Vaddi K, Gazdar AF, Friedman SM, Jablons DM, Newton RC, Fridman JS, Minna JD, Scherle PA. (2006) Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. Cancer cell. 10(1): p. 39-50.

135. Park K, Lee JL, Park I, Park S, Ahn Y, Ahn JH, Ahn S, Song C, Hong JH, Kim CS, Ahn H. (2012) Comparative efficacy of vascular endothelial growth factor (VEGF) tyrosine kinase inhibitor (TKI) and mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor as second-line therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma after the failure of first-line VEGF TKI. Medical oncology. 29(5): p. 3291-7.

136. Bergers G, Hanahan D. (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. Nature reviews. Cancer. 8(8): p. 592-603.

137. R Development Core Team, (2011) R: A language and environment for statistical computing., R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.

138. Gautier L, Moller M, Friis-Hansen L, Knudsen S. (2004) Alternative mapping of probes to genes for Affymetrix chips. BMC bioinformatics. 5: p. 111.

139. Li Q, Birkbak NJ, Gyorffy B, Szallasi Z, Eklund AC. (2011) Jetset: selecting the optimal microarray probe set to represent a gene. BMC bioinformatics. 12: p. 474.

140. Blumenthal RD. (2005) An overview of chemosensitivity testing. Methods in molecular medicine. 110: p. 3-18.

141. ftp://caftpd.nci.nih.gov/pub/caARRAY/transcript_profiling. (elérve: 2012, május).

142. Jeffery IB, Higgins DG, Culhane AC. (2006) Comparison and evaluation of methods for generating differentially expressed gene lists from microarray data. BMC bioinformatics. 7: p. 359.

143. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 98(9): p. 5116-21.

144. Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P. (2004) Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. FEBS letters. 573(1-3): p. 83-92.

145. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. (2002) Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99(10): p. 6567-72.

146. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA. (2007) Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. The New England journal of medicine. 356(2): p. 115-24.

147. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Pili R, Bjarnason GA, Garcia-del-Muro X, Sosman JA, Solska E, Wilding G, Thompson JA, Kim ST, Chen I, Huang X, Figlin RA. (2009) Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 27(22): p. 3584-90.

148. Bild AH, Yao G, Chang JT, Wang Q, Potti A, Chasse D, Joshi MB, Harpole D, Lancaster JM, Berchuck A, Olson JA, Jr., Marks JR, Dressman HK, West M, Nevins JR. (2006) Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. Nature. 439(7074): p. 353-7.

149. Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S, Johnson DS, Trivett MK, Etemadmoghadam D, Locandro B, Traficante N, Fereday S, Hung JA, Chiew YE, Haviv I, Gertig D, DeFazio A, Bowtell DD. (2008) Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical

outcome. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 14(16): p. 5198-208.

150. Ahmed AA, Mills AD, Ibrahim AE, Temple J, Blenkiron C, Vias M, Massie CE, Iyer NG, McGeoch A, Crawford R, Nicke B, Downward J, Swanton C, Bell SD, Earl HM, Laskey RA, Caldas C, Brenton JD. (2007) The extracellular matrix protein TGFBI induces microtubule stabilization and sensitizes ovarian cancers to paclitaxel. Cancer cell. 12(6): p. 514-27.

151. Konstantinopoulos PA, Spentzos D, Karlan BY, Taniguchi T, Fountzilas E, Francoeur N, Levine DA, Cannistra SA. (2010) Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and with outcome in patients with epithelial ovarian cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 28(22): p. 3555-61.

152. Bonome T, Levine DA, Shih J, Randonovich M, Pise-Masison CA, Bogomolniy F, Ozbun L, Brady J, Barrett JC, Boyd J, Birrer MJ. (2008) A gene signature predicting for survival in suboptimally debulked patients with ovarian cancer. Cancer research. 68(13): p. 5478-86.

153. Mok SC, Bonome T, Vathipadiekal V, Bell A, Johnson ME, Wong KK, Park DC, Hao K, Yip DK, Donninger H, Ozbun L, Samimi G, Brady J, Randonovich M, Pise-Masison CA, Barrett JC, Wong WH, Welch WR, Berkowitz RS, Birrer MJ. (2009) A gene signature predictive for outcome in advanced ovarian cancer identifies a survival factor: microfibril-associated glycoprotein 2. Cancer cell. 16(6): p. 521-32.

154. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, Mannel RS, DeGeest K, Hartenbach EM, Baergen R. (2003) Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. J Clin Oncol. 21(17): p. 3194-200.

155. Nash MA, Loercher AE, Freedman RS. (1999) In vitro growth inhibition of ovarian cancer cells by decorin: synergism of action between decorin and carboplatin. Cancer research. 59(24): p. 6192-6.

156. Greaves M, Maley CC. (2012) Clonal evolution in cancer. Nature. 481(7381): p. 306-13.
157. Sebolt-Leopold JS, Herrera R. (2004) Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. Nature reviews. Cancer. 4(12): p. 937-47.
158. Akinleye A, Furqan M, Mukhi N, Ravella P, Liu D. (2013) MEK and the inhibitors: from bench to bedside. Journal of hematology & oncology. 6: p. 27.
159. English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S, Cobb MH. (1999) New insights into the control of MAP kinase pathways. Experimental cell research. 253(1): p. 255-70.
160. Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, Huang M, Lazarowski E, Pope RM, Collins MA, Dahlstrand EN, Earp HS, 3rd, Evans DR. (2000) Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. Nature. 403(6767): p. 328-32.
161. Palmer A, Gavin AC, Nebreda AR. (1998) A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. The EMBO journal. 17(17): p. 5037-47.
162. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science. 270(5240): p. 1326-31.
163. Yap TA, Carden CP, Kaye SB. (2009) Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. Nature reviews. Cancer. 9(3): p. 167-81.
164. Rahman MT, Nakayama K, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Ishikawa M, Sato E, Iida K, Nakayama N, Ishikawa N, Miyazaki K. (2013) KRAS and MAPK1 Gene Amplification in Type II Ovarian Carcinomas. International journal of molecular sciences. 14(7): p. 13748-62.
165. Yang JY, Yoshihara K, Tanaka K, Hatae M, Masuzaki H, Itamochi H, Takano M, Ushijima K, Tanyi JL, Coukos G, Lu Y, Mills GB, Verhaak RG. (2013) Predicting time to ovarian carcinoma recurrence using protein markers. The Journal of clinical investigation. 123(9): p. 3740-50.
166. Ouellet V, Guyot MC, Le Page C, Filali-Mouhim A, Lussier C, Tonin PN, Provencher DM, Mes-Masson AM. (2006) Tissue array analysis of expression microarray candidates identifies markers associated with tumor grade and

outcome in serous epithelial ovarian cancer. International journal of cancer. Journal international du cancer. 119(3): p. 599-607.

167. Ciuffreda L, Del Bufalo D, Desideri M, Di Sanza C, Stoppacciaro A, Ricciardi MR, Chiaretti S, Tavolaro S, Benassi B, Bellacosa A, Foa R, Tafuri A, Cognetti F, Anichini A, Zupi G, Milella M. (2009) Growth-inhibitory and antiangiogenic activity of the MEK inhibitor PD0325901 in malignant melanoma with or without BRAF mutations. Neoplasia. 11(8): p. 720-31.

168. Henderson YC, Chen Y, Frederick MJ, Lai SY, Clayman GL. (2010) MEK inhibitor PD0325901 significantly reduces the growth of papillary thyroid carcinoma cells in vitro and in vivo. Molecular cancer therapeutics. 9(7): p. 1968-76.

169. Boasberg PD, Redfern CH, Daniels GA, Bodkin D, Garrett CR, Ricart AD. (2011) Pilot study of PD-0325901 in previously treated patients with advanced melanoma, breast cancer, and colon cancer. Cancer chemotherapy and pharmacology. 68(2): p. 547-52.

170. Fung MK, Cheung HW, Ling MT, Cheung AL, Wong YC, Wang X. (2006) Role of MEK/ERK pathway in the MAD2-mediated cisplatin sensitivity in testicular germ cell tumour cells. British journal of cancer. 95(4): p. 475-84.

171. Schweyer S, Soruri A, Meschter O, Heintze A, Zschunke F, Miosge N, Thelen P, Schlott T, Radzun HJ, Fayyazi A. (2004) Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation. British journal of cancer. 91(3): p. 589-98.

172. Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ. (2000) Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. The Journal of biological chemistry. 275(50): p. 39435-43.

173. Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Ea CK, Cheng AL. (2002) Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation. Biochemical pharmacology. 63(8): p. 1423-30.

174. Persons DL, Yazlovitskaya EM, Cui W, Pelling JC. (1999) Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to

cisplatin. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 5(5): p. 1007-14.

175. Cui W, Yazlovitskaya EM, Mayo MS, Pelling JC, Persons DL. (2000) Cisplatin-induced response of c-jun N-terminal kinase 1 and extracellular signal--regulated protein kinases 1 and 2 in a series of cisplatin-resistant ovarian carcinoma cell lines. Molecular carcinogenesis. 29(4): p. 219-28.

176. Li W, Melton DW. (2012) Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene ERCC1 and increase melanoma chemoresistance. Oncogene. 31(19): p. 2412-22.

177. Singer G, Oldt R, 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, Shih Ie M. (2003) Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. Journal of the National Cancer Institute. 95(6): p. 484-6.

178. Lassus H, Sihto H, Leminen A, Joensuu H, Isola J, Nupponen NN, Butzow R. (2006) Gene amplification, mutation, and protein expression of EGFR and mutations of ERBB2 in serous ovarian carcinoma. Journal of molecular medicine. 84(8): p. 671-81.

179. Gershenson DM, Sun CC, Bodurka D, Coleman RL, Lu KH, Sood AK, Deavers M, Malpica AL, Kavanagh JJ. (2009) Recurrent low-grade serous ovarian carcinoma is relatively chemoresistant. Gynecologic oncology. 114(1): p. 48-52.

180. Farley J, Brady WE, Vathipadiekal V, Lankes HA, Coleman R, Morgan MA, Mannel R, Yamada SD, Mutch D, Rodgers WH, Birrer M, Gershenson DM. (2013) Selumetinib in women with recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum: an open-label, single-arm, phase 2 study. The Lancet. Oncology. 14(2): p. 134-40.

181. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, Pazdur R. (2003) FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets. The oncologist. 8(4): p. 303-6.

182. Cameron D, Casey M, Press M, Lindquist D, Pienkowski T, Romieu CG, Chan S, Jagiello-Gruszfeld A, Kaufman B, Crown J, Chan A, Campone M, Viens P, Davidson N, Gorbounova V, Raats JI, Skarlos D, Newstat B, Roychowdhury D, Paoletti P, Oliva C, Rubin S, Stein S, Geyer CE. (2008) A phase III randomized

comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. Breast cancer research and treatment. 112(3): p. 533-43.

183. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, Jagiello-Gruszfeld A, Crown J, Chan A, Kaufman B, Skarlos D, Campone M, Davidson N, Berger M, Oliva C, Rubin SD, Stein S, Cameron D. (2006) Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. The New England journal of medicine. 355(26): p. 2733-43.

184. Choueiri TK, Plantade A, Elson P, Negrier S, Ravaud A, Oudard S, Zhou M, Rini BI, Bukowski RM, Escudier B. (2008) Efficacy of sunitinib and sorafenib in metastatic papillary and chromophobe renal cell carcinoma. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 26(1): p. 127-31.

185. Gyorffy B, Surowiak P, Kiesslich O, Denkert C, Schafer R, Dietel M, Lage H. (2006) Gene expression profiling of 30 cancer cell lines predicts resistance towards 11 anticancer drugs at clinically achieved concentrations. International journal of cancer. Journal international du cancer. 118(7): p. 1699-712.

186. Sos ML, Michel K, Zander T, Weiss J, Frommolt P, Peifer M, Li D, Ullrich R, Koker M, Fischer F, Shimamura T, Rauh D, Mermel C, Fischer S, Stuckrath I, Heynck S, Beroukhim R, Lin W, Winckler W, Shah K, LaFramboise T, Moriarty WF, Hanna M, Tolosi L, Rahnenfuhrer J, Verhaak R, Chiang D, Getz G, Hellmich M, Wolf J, Girard L, Peyton M, Weir BA, Chen TH, Greulich H, Barretina J, Shapiro GI, Garraway LA, Gazdar AF, Minna JD, Meyerson M, Wong KK, Thomas RK. (2009) Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. The Journal of clinical investigation. 119(6): p. 1727-40.

187. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehar J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jane-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspesi P, Jr., de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C,

Palescandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA. (2012) The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. Nature. 483(7391): p. 603-7.

188. Hughes RC. (2001) Galectins as modulators of cell adhesion. Biochimie. 83(7): p. 667-76.

189. Liu FT, Rabinovich GA. (2005) Galectins as modulators of tumour progression. Nature reviews. Cancer. 5(1): p. 29-41.

190. Kramer MW, Waalkes S, Serth J, Hennenlotter J, Tezval H, Stenzl A, Kuczyk MA, Merseburger AS. (2011) Decreased galectin-8 is a strong marker for recurrence in urothelial carcinoma of the bladder. Urologia internationalis. 87(2): p. 143-50.

191. Nagy N, Bronckart Y, Camby I, Legendre H, Lahm H, Kaltner H, Hadari Y, Van Ham P, Yeaton P, Pector JC, Zick Y, Salmon I, Danguy A, Kiss R, Gabius HJ. (2002) Galectin-8 expression decreases in cancer compared with normal and dysplastic human colon tissue and acts significantly on human colon cancer cell migration as a suppressor. Gut. 50(3): p. 392-401.

192. Reticker-Flynn NE, Malta DF, Winslow MM, Lamar JM, Xu MJ, Underhill GH, Hynes RO, Jacks TE, Bhatia SN. (2012) A combinatorial extracellular matrix platform identifies cell-extracellular matrix interactions that correlate with metastasis. Nature communications. 3: p. 1122.

193. Lutcke A, Jansson S, Parton RG, Chavrier P, Valencia A, Huber LA, Lehtonen E, Zerial M. (1993) Rab17, a novel small GTPase, is specific for epithelial cells and is induced during cell polarization. The Journal of cell biology. 121(3): p. 553-64.

194. Munz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O. (2004) The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. Oncogene. 23(34): p. 5748-58.

195. Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S. (2004) Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. Human pathology. 35(1): p. 122-8.

196. Varga M, Obrist P, Schneeberger S, Muhlmann G, Felgel-Farnholz C, Fong D, Zitt M, Brunhuber T, Schafer G, Gastl G, Spizzo G. (2004) Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. Clin Cancer Res. 10(9): p. 3131-6.

197. Gires O, Stoecklein NH. (2014) Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences. Cellular and molecular life sciences : CMLS.

198. Boucheix C, Duc GH, Jasmin C, Rubinstein E. (2001) Tetraspanins and malignancy. Expert reviews in molecular medicine. 2001: p. 1-17.

199. Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. (2007) Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. Oncologist. 12(1): p. 20-37.

12. Saját publikációk jegyzéke

12.1. Disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Pénzváltó Z, Lánczky A, Lénárt J, Meggyesházi N, Krenács T, Szoboszlai N, Denkert C, Pete I, Győrffy B. (2014) MEK1 is associated with carboplatin resistance and is a prognostic biomarker in epithelial ovarian cancer. BMC Cancer, 14:837. IF: 3,319

Pénzváltó Z, Surowiak P, Győrffy B. (2014) Biomarkers for systemic therapy in ovarian cancer. Current Cancer Drug Targets, 14(3): p. 259-73.

IF: 3,582

Pénzváltó Z, Tegze B, Szász AM, Sztupinszki Z, Liko I, Szendrői A, Schafer R, Győrffy B. (2013) Identifying resistance mechanisms against five tyrosine kinase inhibitors targeting the ERBB/RAS pathway in 45 cancer cell lines. PloS One, 8(3): p. e59503. IF: 3,534

Tegze B, Szállási Z, Haltrich I, **Pénzváltó Z**, Tóth Z, Likó I, Győrffy B. (2012) Parallel evolution under chemotherapy pressure in 29 breast cancer cell lines results in dissimilar mechanisms of resistance. PloS One, 7(2): p. e30804.

IF: 3,730

Pénzváltó Z, Mihály Z, Győrffy B. (2009) Génexpresszió mérésén alapuló multigénes prognosztikai és prediktív előrejelzés emlőtumorokban, Magyar Onkológia, 53(4): p. 351-9.

13. Köszönetnyilvánítás

Doktori munkám alatt rengeteg segítséget és támogatást kaptam, amiért köszönettel tartozom. Elsősorban Dr. Győrffy Balázsnak, témavezetőmnek a közvetlen szakmai irányításért. Prof. Tulassay Tivadarnak és Prof. Szabó Attilának, akik a Gyermekklinika vezetői voltak tanulmányaim alatt. Dr. Tegze Bálintnak és Dr. Munkácsy Gyöngyinek, akik PhD-m alatt segítettek egyes kísérleti módszerek elsajátításában. A csoport minden további hallgatójának és dolgozójának, különös tekintettel Lánczky Andrásra és Dr. Sztupinszki Zsófiára akik bioinformatikai, statisztikai kérdésekben sokat segítettek, Lénárt Juli és Bartha Luca TDK hallgatókra, Dr. Menyhárt Otíliára és Dr. Mihály Zsuzsára, akik mind hozzájárultak a munkámhoz. A Gyermekklinikai teljes kutatócsoportjának is köszönettel tartozom, különös tekintettel Dr. Vannay Ádámra a kutatócsoport vezetőjére, Pap Domonkosra, Dr. Sziksz Ernára, Bernáth Máriára és az Anyagcsere labor munkatársaira, akik mindig segítőkészek voltak technikai kérdésekben. Köszönet a klinikus kollégáknak az Urológiai Klinikáról, a Charité egyetemről és az I, II Patológiai Klinikákról, akik nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak a munkánk klinikai kontextusba helyezésével, mintagyűjtés és patológiai kiértékelés által. Köszönöm továbbá minden szerzőtársamnak, hogy munkájával hozzájárult publikációink kialakításához. A PhD-m alatt több külföldi tanulmányúton részt vehettem, amiért köszönettel tartozom témavezetőmnek, aki ebben mindig támogatott, a fogadó intézményekben dolgozó témavezetőimnek és közvetlen kollégáimnak: Hajdu Ildikónak, Szállási Zoltánnak és Steven J Elledge-nek a Harvard Egyetemről, Jane Holland-nak, Giovanni Valentini-nek, Michael Gerloff-nak és Walter Birchmeier-nek a Max-Delbrück Molekuláris Biológiai Kutatóközpontból, Albert Gris-nek, Yasir Ibrahim-nak, Martin A. Rivas-nak és Violet Serra-nak a Vall'd Hebron Onkológiai Kutatóközpont munkatársainak. Mindemellett az utazásaimat lehetővé tevő szervezeteknek a Deutscher Akademischer Austauschdienst-nek és a European Association for Cancer Research-nek. Végül köszönöm férjemnek, családomnak és barátaimnak a támogatást.

14. Függelékek

14.1. Függelék 1

1. függelék: Sejtvonalanként a 14 ezer probe set alapján történt PAM osztályozás eredményei. A betűk a sejtvonalakon *in vitro* meghatározott érzékenységet (S: szenzitív, R: rezisztens, I: intermedier érzékenységű) jelölik. A színek a leave-one-out keresztvalidáció eredményei (kék: jól, piros: rosszul osztályozott, szürke: a keresztvalidáció során figyelmen kívül hagyott sejtvonalak).

sejtvonal	lapatinib	erlotinib	sorafenib	sunitinib	gefitinib
A-375	S	S	S	S	S
A427	R	R	I	S	R
A-498	I	R	R	R	R
AN3_CA	I	I	R	I	R
BT-20	S	I	I	I	R
C-33A	I	I	I	R	I
C-4I	I	S	S	I	I
C-4II	I	S	S	S	S
caOV3	S	S	S	S	S
CCRF-CEM	I	I	I	I	I
ChaGo-K-1	R	R	I	R	R
COLO-668	R	R	I	I	R
DMS 114	R	R	I	R	R
DMS 79	R	R	S	R	I
ES-2	R	I	R	I	I
HCT-15	S	S	S	S	S
HCT-8	S	R	I	S	S
HEC-1-B	R	R	R	R	R
Hep-3b	S	I	S	S	S
HOS	S	I	I	I	R
HT-1080	S	I	S	I	S
K-562	S	I	I	I	S
MCF-7	S	I	I	S	I
MOLT-4	R	R	I	I	I
NCI-H1650	S	S	R	S	R
NCI-H1975	R	R	I	R	R
NCI-H1993	I	S	S	I	I
NCI-H358	S	S	I	S	S
NCI-H441	S	S	S	S	I
NCI-H661	I	S	R	R	I
NCI-H69	R	I	S	I	S
NCI-H82	R	I	I	I	I
RAJI	R	R	I	R	I
RD	R	R	R	R	R
SHP-77	S	R	I	R	I
SK-N-AS	R	R	R	R	R
SNU-182	R	R	I	I	I

SNU-423	I	R	I	R	R
SNU-449	I	S	I	I	S
SNU-475	S	I	I	I	I
SW403	I	I	I	R	S
SW480	I	S	S	S	I
SW-620	R	I	S	S	I
SW948	S	S	I	S	R
WIDR	I	I	I	I	S

14.2. Függelék 2

2. függelék: A sunitinib rezisztencia biomarkereinek immunhisztokémiai vizsgálata vesesejtes karcinómákban, festődési frekvencia (világosszürke háttér) és intenzitás (sötétszürke háttér) értékek.

ID	CD9	CD9	EpCAM	EpCAM	LGALS8	LGALS8	RAB17	RAB17
P1	6	2	7	1	0	1	0	0
P2	6	2	7	1	0	0	0	0
P3	7	1	3	1	1	1	7	1
P4	7	2	6	2	2	1	6	1
P5	7	2	5	1	1	1	2	1
P6	7	2	6	1	2	1	0	1
P7	7	1	7	2	0	1	1	1
P8	6	1	7	1	0	0	0	0
P9	5	2	6	1	1	1	0	0
P10	6	1	7	1	2	1	3	1
P11	6	1	7	1	3	1	7	1
P12	3	1	7	1	1	1	0	0
P13	6	1	7	1	6	1	4	1
P14	5	2	4	1	1	1	1	1
P15	6	2	7	2	2	1	1	1
P16	7	1	7	1	1	1	0	1
P17	7	1	1	1	6	1	4	2
P18	6	2	n.a	n.a	n.a	n.a	4	2
P19	6	2	2	1	0	1	0	0
P20	6	2	3	1	1	1	3	1
P21	7	1	5	1	0	1	0	0
P22	7	2	0	1	1	1	0	0
P23	5	2	6	1	3	1	6	2
P24	5	2	0	0	3	1	5	2
P25	7	1	1	1	2	1	0	1
P26	7	2	4	1	3	1	1	1
P27	6	1	7	1	2	1	0	0
P28	6	1	7	1	2	1	2	1
P29	7	1	5	1	1	1	0	0
P30	6	2	7	1	5	1	0	0
P31	7	2	4	3	7	2	7	1
P32	7	2	4	1	4	2	5	1
P33	6	3	6	1	6	2	7	2
P34	6	2	5	1	6	2	7	2
P35	0	1	7	1	0	0	0	0
P36	0	0	7	1	0	0	0	0
P37	7	3	0	1	3	1	1	1
P38			0	0	0	0	2	1
P39	7	3	0	1	2	1	7	3
P40	7	3	1	1	2	1	6	3
P41	7	3	0	1	3	1	0	0
P42	7	3	0	1	4	1	0	0
P43	7	2	5	1	3	1	3	1

P44	7	3	6	1	6	2	6	2
P45	7	3	5	1	6	2	7	2
P46	7	2	5	1	1	1	0	1
P47	5	1	4	1	0	1	0	0
P48	7	1	5	1	0	1	0	0
P49	6	2	1	1	0	1	0	0
P50	6	3	2	1	2	1	1	1
P51	6	3	3	1	1	1	1	1
P52	6	1	7	1	4	1	3	1
P53	6	1	5	1	3	1	3	1
P54	6	2	2	1	0	0	0	0
P55	7	2	3	1	0	0	2	1
P56	6	3	2	1	0	1	1	1
P57	5	3	1	1	0	1	1	1
P58	7	2	7	1	7	1	5	1
P59	7	2	7	1	7	1	5	1
P60	7	2	5	1	1	1	0	0
P61	7	1	6	1	0	1	0	0
P62	5	2	6	1	6	1	3	1
P63	6	3	7	1	5	1	2	1
P64	7	3	5	1	1	1	0	0
P65	7	3	5	1	3	1	4	1
P66	7	1	6	1	3	1	0	1
P67	5	2	3	1	1	1	0	1
P68	7	3	4	1	1	1	0	0
P69	7	3	6	1	0	0	0	0
P70	7	3	1	1	0	0	5	1
P71	7	3	0	0	0	0	0	0
P72	7	2	1	1	2	1	4	1
P73	7	2	0	1	2	1	3	1
P74	7	2	1	1	2	1	0	1

14.3. Függelék 3

3. függelék: 34 petefészek daganat friss-fagyasztott mintáin készült qPCR alapú expresszió mérés eredményei és a betegek főbb klinikai adatai. (TXL-CRB: taxol-carboplatin, PMT: progresszió mentes túlélés, S: szerózus, E: endometrioid, D: differenciálatlan)

beteg	kor	hisztológia	grade	stádium	műtét	kemoterápia	ciklus	PMT	Relatív expresszió				
									RTF1	FUBP1	MEK1	CSDE1	CNOT8
OV1	65	S	2	IV	n.a.	TXL-CRB	6	n,a,	23,74	199,34	14,65	350,30	8,14
OV2	53	S	3	IVB	optimális	TXL-CRB	6	23,67	7,56	106,33	3,42	91,29	2,77
OV3	49	S	3	IIIC	szuboptimális	TXL-CRB	6	16,87	1,48	8,41	4,81	43,59	1,36
OV4	60	E	1	IIIC	optimális	TXL-CRB	4	17,47	10,24	78,02	11,18	87,58	2,83
OV5	59	S	3	IIIC	optimális	TXL-CRB	6	22,83	4,11	68,87	6,51	146,60	6,45
OV6	62	S	3	IIIC	optimális	TXL-CRB	6	18,93	5,89	71,30	7,01	77,48	3,38
OV7	68	S	3	IIIC	optimális	TXL-CRB	1	n,a,	7,22	24,41	5,06	56,33	16,10
OV8	58	S	2	IIIC	optimális	TXL-CRB	7	33,43	22,05	155,32	13,76	251,16	8,71
OV9	52	S	3	IIIC	optimális	TXL-CRB	6	42,20	5,39	25,62	8,69	35,16	5,47
OV10	58	S	3	IIIC	optimális	TXL-CRB	6	32,77	11,52	108,82	9,93	138,38	5,75
OV11	60	E	3	IIIC	intervallum	TXL-CRB	7	41,37	7,67	57,38	5,95	110,08	4,53
OV12	74	S	2	IIIC	optimális	TXL-CRB	6	32,43	10,71	9,44	9,69	29,46	1,19
OV13	62	S	2	IIIC	optimális	TXL-CRB	8	4,63	23,20	35,98	28,92	55,49	0,99
OV14	74	S	3	IIIC	szuboptimális	TXL-CRB	7	23,13	15,99	97,06	11,15	149,34	6,26
OV15	66	E	3	IIIC	optimális	TXL-CRB	5	5,07	4,05	97,17	3,38	92,14	3,92
OV16	53	S	2	IIIC	optimális	TXL-CRB	5	24,93	16,06	36,31	13,92	115,96	5,29
OV17	54	D	3	IIIC	optimális	TXL-CRB	6	24,23	10,26	20,24	22,42	93,64	6,71
OV18	67	S	3	IIIC	optimális	TXL-CRB	7	29,17	3,17	37,68	3,76	116,09	3,34
OV19	59	S	2	IIIC	optimális	TXL-CRB	6	6,10	12,63	47,26	19,10	92,35	4,90
OV20	50	S	3	IIIC	optimális	TXL-CRB	6	8,17	20,24	92,35	17,99	115,56	10,23
OV21	69	S	3	n.a.	optimális	TXL-CRB	6	39,27	5,85	23,30	5,20	92,35	4,38
OV22	62	S	2	IIIC	optimális	TXL-CRB	6	6,97	15,02	249,42	10,05	254,08	8,73
OV23	63	S	2	IIIC	optimális	TXL-CRB	8	39,73	13,82	54,28	9,66	104,39	7,06
OV24	40	S	3	IIIC	optimális	TXL-CRB	6	53,77	13,95	48,14	2,89	102,71	9,93
OV25	60	S	2	IVA	n.a.	TXL-CRB	6	n,a,	5,02	31,76	5,36	63,81	7,16
OV26	74	S	3	IIIC	optimális	TXL-CRB	6	6,70	31,47	22,20	16,10	24,52	1,16
OV27	56	S	3	IIIC	optimális	TXL-CRB	8	31,10	19,85	4,61	17,82	33,61	0,32
OV28	56	S	3	IIIC	szuboptimális	TXL-CRB	4	n,a,	7,29	60,65	13,23	146,60	4,11
OV29	61	S	1	IIIC	optimális	TXL-CRB	6	23,17	11,24	162,10	3,15	146,60	8,87
OV30	44	S	3	n.a.	n.a.	TXL-CRB	7	52,37	6,66	118,53	4,54	127,92	6,23
OV31	64	S	3	IIIC	szuboptimális	TXL-CRB	6	5,00	7,75	109,96	6,32	153,36	4,43
OV32	48	S	2	IIIC	optimális	TXL-CRB	6	45,27	7,70	29,29	5,06	55,17	1,47
OV33	48	S	3	IIIC	optimális	TXL-CRB	2	35,23	4,65	57,51	5,41	93,10	7,06
OV34	70	S	3	IV	n.a.	TXL-CRB	6	4,70	14,63	105,36	11,57	212,67	6,90

14.4. Függelék 4

4. függelék: Petefészekmintákon végzett MEK1 immunhisztokémiai festés eredményei.

Beteg	teljes túlélés (hónap)	MEK1 intenzitás átlag	MEK1 pozitivitás	Beteg	teljes túlélés (hónap)	MEK1 intenzitás átlag	MEK1 pozitivitás
OVI1	23,62	3,00	pozitív	OVI31	42,18	1,75	pozitív
OVI2	61,37	2,75	pozitív	OVI32	13,01	1,75	pozitív
OVI3	54,60	2,75	pozitív	OVI33	54,21	1,50	pozitív
OVI4	31,38	2,75	pozitív	OVI34	51,91	1,50	pozitív
OVI5	12,75	2,75	pozitív	OVI35	36,47	1,50	pozitív
OVI6	43,89	2,50	pozitív	OVI36	35,71	1,50	pozitív
OVI7	43,63	2,50	pozitív	OVI37	29,63	1,50	pozitív
OVI8	33,87	2,50	pozitív	OVI38	41,69	1,25	pozitív
OVI9	17,74	2,50	pozitív	OVI39	23,00	1,25	pozitív
OVI10	7,75	2,50	pozitív	OVI40	52,80	1,00	pozitív
OVI11	69,09	2,25	pozitív	OVI41	19,88	1,00	pozitív
OVI12	66,86	2,25	pozitív	OVI42	19,78	1,00	pozitív
OVI13	48,92	2,25	pozitív	OVI43	18,79	1,00	pozitív
OVI14	41,76	2,25	pozitív	OVI44	15,18	1,00	pozitív
OVI15	6,60	2,25	pozitív	OVI45	65,64	0,75	negatív
OVI16	80,49	2,00	pozitív	OVI46	56,57	0,75	negatív
OVI17	71,69	2,00	pozitív	OVI47	56,11	0,75	negatív
OVI18	61,96	2,00	pozitív	OVI48	25,40	0,75	negatív
OVI19	61,40	2,00	pozitív	OVI49	54,44	0,67	negatív
OVI20	58,64	2,00	pozitív	OVI50	55,39	0,50	negatív
OVI21	50,46	2,00	pozitív	OVI51	54,21	0,50	negatív
OVI22	45,40	2,00	pozitív	OVI52	23,06	0,50	negatív
OVI23	44,32	2,00	pozitív	OVI53	16,79	0,50	negatív
OVI24	42,18	2,00	pozitív	OVI54	102,83	0,33	negatív
OVI25	22,11	2,00	pozitív	OVI55	90,91	0,25	negatív
OVI26	18,96	2,00	pozitív	OVI56	58,12	0,25	negatív
OVI27	18,30	2,00	pozitív	OVI57	46,32	0,25	negatív
OVI28	8,08	2,00	pozitív	OVI58	36,63	0,25	negatív
OVI29	2,50	2,00	pozitív	OVI59	84,90	0,00	negatív
OVI30	43,07	1,75	pozitív				