

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Gergely Péter Attila

**Tirozin-kináz gátló anyagok
kemopreventív hatásának vizsgálata
állatkísérletes modellekben**

**DEBRECENI EGYETEM
IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2019**

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Tirozin-kináz gátló anyagok
kemopreventív hatásának vizsgálata
állatkísérletes modellekben**

Dr. Gergely Péter Attila

TÉMAVEZETŐ: Dr. Hortobágyi Tibor



**DEBRECENI EGYETEM
IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2019**

Prof. Dr. Ember István (1952-2013) emlékének ajánlva

*„Tigris! Tigris! éjszakánk
Erdejében sárga láng,
Mely örök kéz szabta rád
Rettentő szimetriád?”*

/William Blake: A Tigris (fordította: Szabó Lőrinc)/

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Célkitűzés	4
3. Irodalmi áttekintés	7
3.1. <i>A daganatos betegségek általános jellemzői</i>	7
3.2. <i>A protein-kinázok szerkezete, működése</i>	8
3.3. <i>A protein-kinázok aberráns működése és szerepe a daganatok kialakulásában</i>	11
3.4. <i>A célzott terápia jelentősége</i>	12
3.5. <i>A kis molekulájú protein-kináz gátlók (KMI)</i>	13
3.5.1. <i>Hematológiai daganatok terápiája KMI-kkal</i>	14
3.5.2. <i>Szolid tumorok terápiája KMI-kkal</i>	15
3.5.3. <i>TKI-ral szembeni rezisztencia kialakulásának mechanizmusai</i>	19
3.6. <i>A DMBA-kezelt egér mint tumormodell</i>	20
4. Anyagok és módszerek	23
4.1. <i>Új TKI vegyületek daganat gátló hatásának vizsgálata CBA/Ca fajtájú H-2^K egerek DMBA indukált daganatos elváltozásaiban</i>	23
4.1.1. <i>Kísérleti állatok és kísérleti elrendezés</i>	23
4.2. <i>Imatinib-mezilát daganat gátló hatásának vizsgálata NMRI egerek DMBA indukált daganatos elváltozásaiban</i>	26
4.2.1. <i>Kísérleti állatok és kísérleti elrendezés</i>	26
5. Eredmények	28
5.1. <i>Első kísérlet</i>	28
5.2. <i>Második kísérlet</i>	32
5.2.1. <i>Génexpresszió</i>	32
5.2.2. <i>Génkapcsolatok</i>	36
6. Megbeszélés	37

7. Összefoglalás	46
<i>Summary</i>	<i>47</i>
8. Irodalomjegyzék	48
9. Publikációs lista	62
10. Tárgyszavak	65
11. Köszönetnyilvánítás	66

Rövidítések jegyzéke

ADP	adenozin-difoszfát
ALK	anaplasztikus limfóma-kináz
AML	akut mieloid leukémia
ATP	adenozin-trifoszfát
CDK	ciklin-dependens-kináz
c-kit	össejt-faktor-receptor
CML	krónikus mieloid leukémia
CLL	krónikus limfoid leukémia
DDR	diszkoidin-domén-receptor
DMBA	7,12- dimetilbenz[a]antracén
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
EGFR	epidermális növekedési faktor
EMA	EU gyógyszerengedélyezési hivatala
EPHA	efrin A-típusú receptor
ERK	extracelluláris szignál-regulált kináz
FDA	USA gyógyszerengedélyezési hivatala
FGFR	fibroblaszt eredetű növekedési faktor-receptor
FLT3	Fms-like (Fms-szerű) tirozin-kináz 3
HDAC	Histon-deacetiláz gátló
HER	humán epidermális receptor
HNF	máj eredetű nukleáris faktor
Hsp90	hő-sokk fehérje 90
GSK3	glikogén-szintáz-kináz 3
GTP	guanozin-trifoszfát
i.p.	intraperitoneális
JAK	Janus-arcú-kináz
KMI	kis molekulájú inhibitor
miR	micro-RNS
MAPK	mitogén-aktivált protein-kináz
MDR	multidrog rezisztencia
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid

NF κ B	nukleáris faktor κ B
NSCLC	nem-kissejtes tüdőkarcinóma
nt	nukleotid
PDGFR	vérlemezke eredetű növekedési faktor
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PK	protein-kináz
PKC	protein-kináz C
PTK	protein-tirozin-kináz
RNS	ribonukleinsav
ROR1	receptor tirozin-kináz-szerű árva receptor 1
RTK	receptor tirozin-kináz
Ser/ThrK	szerin/treonin-kináz
TAA	tumor-asszociált antigén
TGF β 1	transzformáló növekedési faktor β 1
TPA	tetradekanoilforbol 13 acetát
TSA	tumor-specifikus antigén
TK	tirozin-kináz
TKI	tirozin-kináz-inhibitor
VEGFR	vaszkuláris epidermális növekedési faktor

1. Bevezetés

A protein-kinázok (PK) kulcsfontosságú szerepet töltenek be olyan sejtszintű folyamatokban, mint például a metabolizmus, proliferáció, apoptózis, immunválasz vagy idegrendszeri funkciók. A PK-k celluláris fehérjék foszforilálásán keresztül szabályozzák a különböző enzimműködéseket [1], meghibásodásuk pedig számos patológias állapothoz vezethet, mint például daganatos megbetegedések vagy gyulladásos folyamatok.

A rosszindulatú daganatok összetett betegségek, melyekre a sejtek kontrollálatlan osztódása jellemző. Jelenleg nyolc fő tulajdonságot említhetünk az efféle daganatos sejtekkel kapcsolatban, melyeket a tumorfejlődés során sajátítanak el, és amelyekkel jól magyarázható a természetük [2]. Ezek a tulajdonságok a következők: folyamatos osztódás, a növekedési szabályozók kikerülése, a programozott sejthalállal szembeni ellenállás, replikációs immortalitás elérése, invázió, áttétképzés, elrejtőzés az immunrendszer elől, valamint az energiaháztartás újraprogramozása [2, 3]. A protein-kinázok a tumorfejlődés több különböző állomásán játszanak szerepet, mint például a folyamatos osztódás, a növekedési szabályozók kikerülése vagy az invázió és áttétképzés [4]. Ezekből kifolyólag, a PK-k az egyik legintenzívebben tanulmányozott gyógyszer-célponttá váltak az elmúlt 2 évtizedben a daganatokkal szembeni küzdelemben [5].

Kanner és munkatársai 1991-ben felvetették, hogy a p120 mind a non-receptoriális, mind a ligand-aktivált transzmembrán tirozin-kinázoknak és szerin/treonin kinázoknak (Ser/ThrK) szubsztrátja. Ezen túl pedig a mitogén-stimulált és tirozin-kináz onkogén-indukált szignalizációs útvonalaknak is alkotóeleme [6]. Ez az elmélet bizonyítást nyert, és elkezdődött a „protein-kinázok kora”.

Napjainkig a humán PK családnak 518 tagját fedezték fel, melyeket 9 csoportba oszthatunk. Közülük a tirozin-kinázok (TK) – és gátló molekuláik – a daganatterápia legígéretesebb célpontjai [7]. A TK-k további két csoportra oszthatók receptor és nem-receptor tirozin-kinázok. A receptor tirozin-kinázok (RTK) transzmembrán fehérjék, melyek egy extracelluláris ligand-kötő és egy intracelluláris kináz doménből állnak [8]. A nem receptor tirozin-kinázok pedig a citoszolban, a sejtmagban vagy a plazma membrán belső felszínén találhatóak, és a sejtosztódásban, valamint a differenciáció szabályozásában vesznek részt [9].

2. Célkitűzés

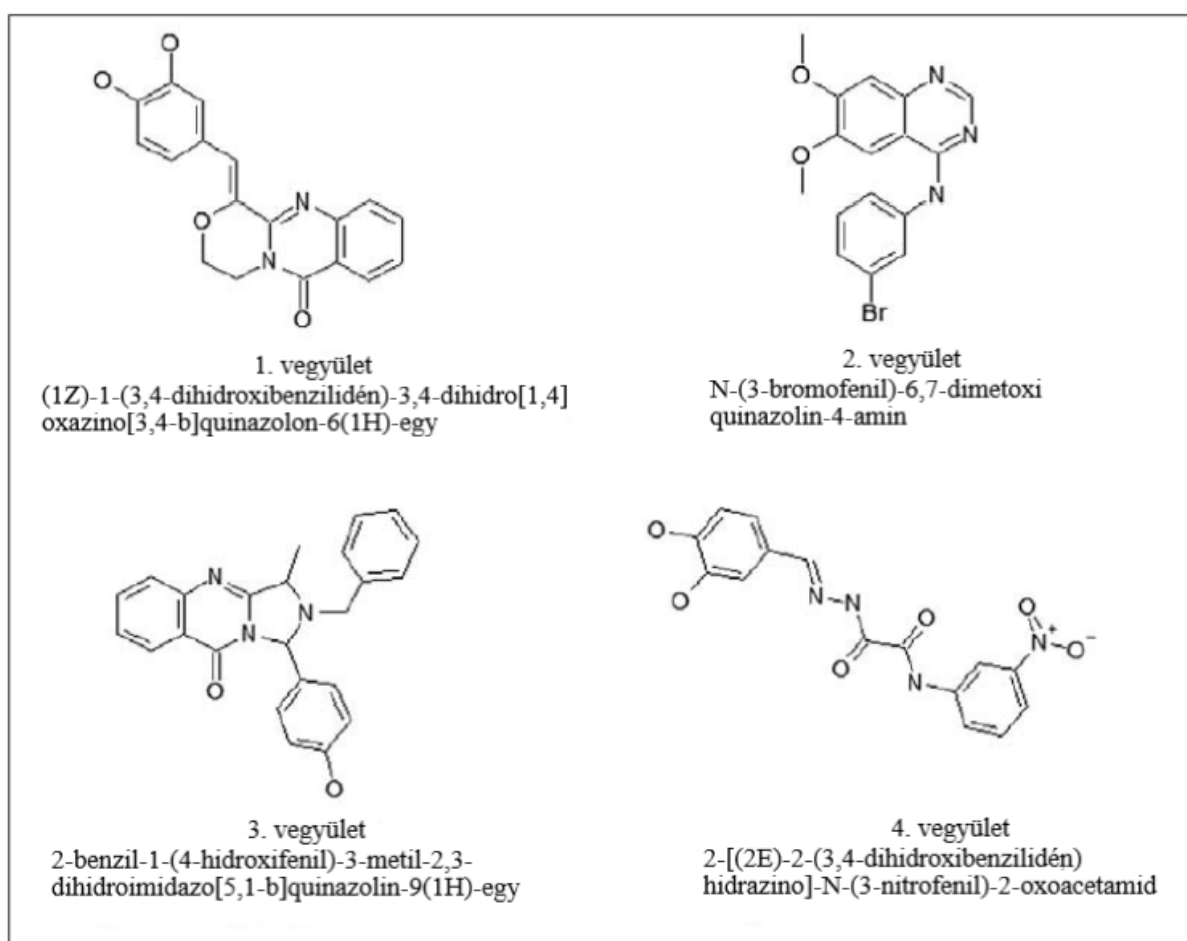
A TK-ok működése szigorú kontroll alatt áll. A nem osztódó sejtekben a kináz aktivitás alacsony. Ezzel ellentétben, a rákos sejtekben mérhető TK expresszió extrém mértékben megemelkedik, amely a különböző mechanizmusok eredményeképpen kialakuló ligand vagy receptor túlexpressziónak köszönhető [10-15] [213]. Amennyiben protein-kináz inhibitorokkal (TKI) csökkenteni lehetne a másodlagos szignalizációs útvonal intenzitását, az hatékony lehetne a daganatellenes terápiában [16]. Sőt, a molekuláris folyamatok mérséklésével talán a daganatok prevenciójára is lehetőségünk nyílna nagyfokú karcinogén ártalomnak kitett egyénekben (pl. vegyiparban, mérgező vegyszerekkel dolgozók esetében), ami – mint minden betegség tekintetében – kiemelt fontosságú a daganatos betegségek csökkentése szempontjából. Kutatásainkat abban a szellemben végeztük, hogy megpróbáljunk részben ismert, részben kísérleti fázisban lévő, tirozin-kináz gátló hatással bíró molekulákat vizsgálni abban a tekintetben, használhatók lennének-e daganatmegelőző (ún. kemopreventív) hatású gyógyszerként.

Hollósy és Kéri számos olyan TKI aktivitással rendelkező vegyületet azonosított, melyek másodlagos növényi metabolitból származnak. A szerkezeti aktivitás azonosítását és a kémiai módosítással történő optimalizációt követő *in vitro* tesztelés után több daganatellenes gyógyszerjelölt molekula született [17].

A molekulák teszteléséhez, további vizsgálatához *in vivo* kísérletekre volt szükség. A 7,12-dimetilbenz[a]antracén (DMBA) egy széleskörűen alkalmazott policiklikus aromás szénhidrogén vegyület, mely karcinogenezist kezdeményez különböző onkogén mutációk indukálásán keresztül, mint pl. a *Hras* és *Kras* [214], melyek expressziója fokozódik [18]. Ezen mutációk eredményeképpen tüdő tumor, laphámsejt karcinóma, vaszkuláris daganatok (hemangiómák), intesztinális, emlő, méh vagy hematológiai eredetű malignus betegségek alakulnak ki [19, 20]. Kutatócsoportunk kifejlesztett egy állatmodellt a külső karcinogének hatására bekövetkezett onko/szuppresszor génexpresszió-változás vizsgálatára, melyhez a DMBA jelentős kémiai karcinogenitását használtuk fel. A DMBA-t „rövid-távú” *in vitro* kísérletekhez használják potenciális antikarcinogén vegyületek lehetséges kemopreventív hatásának felderítésére, amely – ha létezik – megszünteti a DMBA-indukált onkogén expressziót [21]. Ezt a modellt korábban már alkalmazták humán citosztatikus vegyületek karcinogén hatásának vizsgálatára [22].

Kísérleteink első felében 4, egyelőre preklinikai kísérletekben szereplő TKI molekula potenciális antineopláziás és kemopreventív tulajdonságait tanulmányoztuk DMBA-val kezelt egerek májában, tüdejében, csontvelőjében és veséjében. A molekulák ezen tulajdonságait a *Hras* és *Trp53* gének expressziójának vizsgálata alapján igyekeztünk megbecsülni.

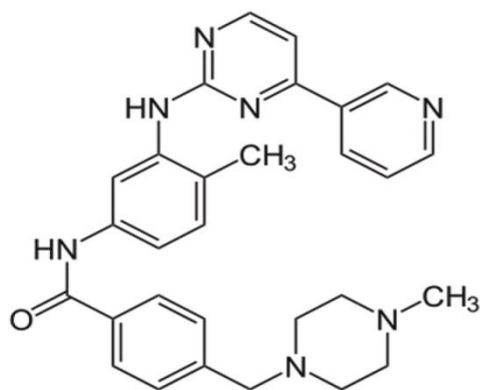
Korábbi *in vitro* tanulmányok alapján az (1Z)-1-(3,4-dihidroxibenzilidén)-3,4-dihidro[1,4]oxazino[3,4-b]quinazolon-6(1H)-egy (1. vegyület), N-(3-bromofenil)-6,7-dimetoxi quinazolin-4-amin (2. vegyület), 2-benzil-1-(4-hidroxifenil)-3-metil-2,3-dihidroimidazo[5,1-b]quinazolin-9(1H)-egy (3. vegyület) és 2-[(2E)-2-(3,4-dihidroxibenzilidén)hidrazino]-N-(3-nitrofenil)-2-oxoacetamid (4. vegyület) (1. ábra) ígéretes antikarcinogén vegyületek [23-25].



1. ábra. A kísérletek első fázisában tanulmányozott 4 TKI vegyület szerkezete. (A Vichem Chemie Research Ltd. engedélyével)

Kutatásunk második felében pedig egy már ismert, a mindennapi klinikai gyakorlatban széleskörűen alkalmazott kis molekulájú tirozin-kináz gátló molekula, az imatinib-mezilát esetleges kemopreventív hatásait vizsgáltuk, DMBA-kezelt egerekben, a *Hras*, *Kras*, *Myc* és

Trp53 gének csontvelőben, agyban, vesében, májban, tüdőben, nyirokcsomóban, lépben és csecsemőmirigyben mért expresszióinak tanulmányozásán keresztül. További célként jelöltük meg a lehetséges génkapcsolatok felderítését a *Hras*, *Kras*, *Myc*, *Trp53* gének esetében.



2. ábra. Az imatinib-mezilát szerkezete [26].

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A daganatos betegségek általános jellemzői

A sejthomeosztázis talán legfontosabb eleme a sejtosztódás és sejthalál közötti egyensúly. Amennyiben ez az egyensúly a sejtosztódás irányába dől el, daganat alakul ki. Általánosságban elmondható, hogy a daganatfejlődés elindulásához, génmutációra van szükség. A darwini evolúciónak megfelelően a rákos sejtek random mutációkon, valamint epigenetikai változásokon keresztül tesznek szert a kontrollálatlan osztódás képességére, amit a tumoros sejtek klonális szelekciója követ [27] [215]. Meghatározott ún. mester transzkripciós faktorok által kódolt celluláris hálózatok egyedi genetikai programot hoznak létre, amelyek befolyásolják a kromatin organizációt és epigenetikus állapotokat. A sejthomeosztázis ezt követően dinamikusan fenntartott a különböző regulációs fehérjék által, amelyeknek az expresszióját számos transzkripciós és transzlációs kontroll, illetve ún. degradációs rendszerek befolyásolják [3]. A jelentős celluláris fenotípusok, mint a proliferáció, sejthalál és differenciáció számtalan intracelluláris és extracelluláris információ alapján jönnek létre [28] [206]. Daganat kialakulás kapcsán legtöbbször a sejtosztódást, illetve a sejthalált (apoptózis) szabályozó gének károsodásáról van szó. Előbbieket más néven onkogéneknek nevezzük, melyek ún. „gain-of-function”, azaz funkciónyerő mutáción mehetnek keresztül, ezáltal kontrollálatlan, folyamatos sejtosztódást eredményeznek. Az utóbbiak pedig a tumorsuppresszor gének, melyeknek feladata, hogy oxidatív stressz, illetve helyrehozhatatlan genetikai vagy sejtkárosodás esetén apoptózist indukáljanak. Ún. „loss-of-function”, azaz funkcióvesztő mutációik esetén azonban ezt a feladatot nem látják el, így a károsodott vagy rendellenesen működő, osztódó sejtek megmenekülnek a sejthalál elől [29].

Az onkogének és tumorsuppresszor gének alapvető szerepet játszanak a tumorfejlődésben. A „klasszikus” emlős RAS proto-onkogének (*HRAS*, *KRAS*, *NRAS*), a *MYC* proto-onkogének és a tumorsuppresszor TP53 gén különösen nagy figyelmet érdemelnek. A Ras fehérjék kisméretű GTP-áz transzkripciós faktorok, melyek szabályozó szerepet töltenek be a MAPK és PI3K másodlagos jelátviteli útvonalakban. Ha károsodik a funkciójuk, az sejtproliferációhoz, illetve sejthalálhoz vezethet [30]. A mutáns Ras fehérjék állandóan aktívak, amely aktivitás kontrollálatlan sejtosztódást eredményez, és összefüggésbe hozható a humán rosszindulatú daganatok közel egyharmadával, mint például a hasnyálmirigy, bőr, tüdő, kolorektális daganatokkal vagy a mielóma multiplexszel [31]. A *Myc* a *MYC* onkogénecsald (*Myc*, *Mycn* és *Mycl*) egyik tagja. Ez a gén egy olyan foszfoproteint kódol,

amely különböző módokon képes transzformálni a sejteket [32, 33]. Tekintve, hogy a humán tumorok közel 70%-ával kapcsolatba hozható [34], a *Myc* a tumorigenezis és tumorfejlődés egyik fő regulátoraként említhető, azáltal, hogy modulálja a sejtosztódásban, apoptózisban tumorszuppresszióban, DNS-javításban, angiogenezisben, valamint invázióban szerepet játszó gének aktivitását [35]. A P53 az egyik legkiterjedtebben tanulmányozott tumorszuppresszor fehérje, mivel a humán tumorok közel felében mutatható ki génjének mutációja [36], ezért joggal nevezik a "genom őrzőjének" [27]. A léziók legtöbbje a DNS-kötő doménben található, mindazonáltal a *TP53* gén valamennyi régiójában előfordulhat mutáció [37, 38]. A *TP53* mutációknak két formája létezik: „funkcióvesztő”, illetve „funkciónyerő” mutációk [39]. A „funkcióvesztő” mutációk az onko-szuppresszor képesség elvesztését eredményezik, míg a „funkciónyerő” mutációk több különböző hatással járhatnak, mint fokozottabb tumor sejt invázió és motilitás [40], kemorezisztencia [41], osztódás [42] és javuló túlélés [43].

2000-ben Weinstein bevezette az ún. „onkogén addikció” fogalmát, ami azt jelenti, hogy a tumoros sejteknek látszólag egy onkogén-szignalizációs útvonal elég ahhoz, hogy fenntartsák a proliferációjukat és a túlélésüket. Ez a hipotézis azt vetíti előre, hogy egy szimpla, abnormálisan aktiválódott protein és az általa konstitutívan aktivált, károsodott szabályozású proliferációs útvonal eredményeképpen a tumoros sejtek egy új, egyedi függő viszonyba kerülnek, és ez az onkogén-mutáció a feltétele az életben maradásuknak [44].

A protein foszforiláció a legtöbb sejtfunkció regulálásában esszenciális jelentőségű [5]. Amióta ismert az a tény, hogy a kináz-aktivitás káros szabályozása az egyik legjelentősebb tényező abban, hogy a daganatos sejtek elkerülik a sejtosztódás és túlélés fiziológiai korlátaikat, a protein-kinázok képezik a legfontosabb célpontok egyikét a daganatterápia modern kori kutatásában [45].

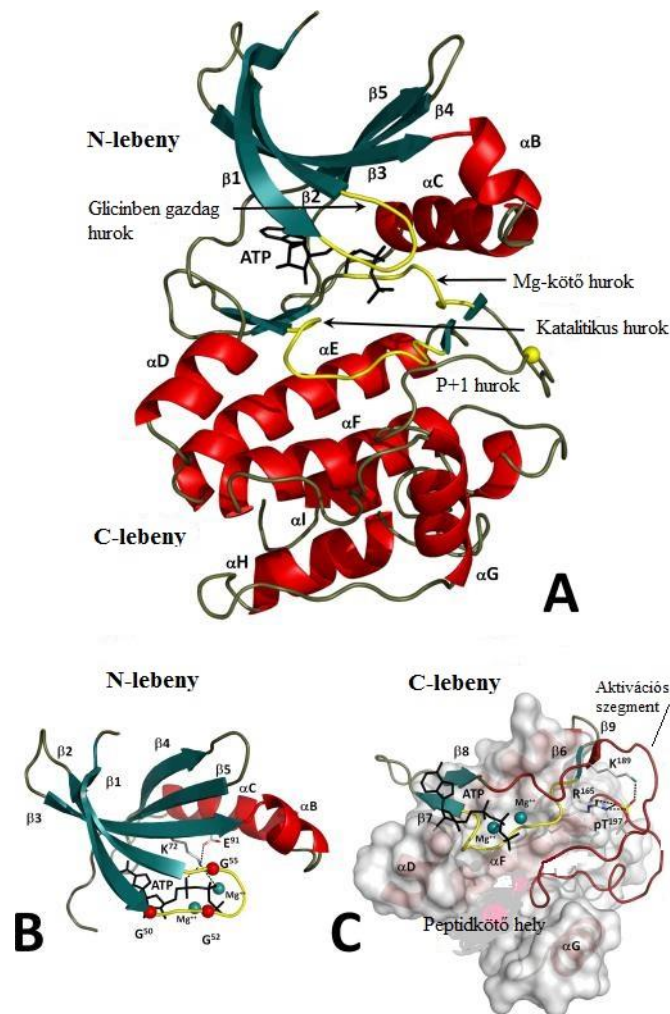
3.2. A protein-kinázok szerkezete, működése

A protein-kinázok olyan enzimek, amelyek különböző fehérjék szerin, treonin vagy tirozin aminosavaira történő foszfátcsoport áthelyezését katalizálják. A donor az adenzin-trifoszfát (ATP) molekula. A protein-foszforiláció az egyik legfontosabb esemény a különböző sejtfunkciók szabályozásában. Számos onkoprotein működéséhez is szükség van foszforilációra [3]. Az eukarióta protein-kinázok szupercsaládja 518 tagból áll, és rendkívül széles körű szabályozást végez a sejtszintű útvonalak tekintetében [7]. A szerteágazó funkcióikkal ellentétben meglepően hasonló szerkezetű katalitikus doménnel rendelkeznek, mely az ATP molekuláról áthelyezi a foszfátcsoportot a szubsztrátra [46]. A katalitikus

domén 2 lebenyből áll, melyeket egy összekötő hurok tart egyben. Az aktív hely a két lebeny közötti legmélyebb ponton található. A katalitikus reakció 3 lépésből áll. 1) ATP és peptidkötés, 2) foszfát-transzfer az ATP-ről a szubsztrátra, majd 3) az ADP és foszforilált szubsztrát disszociációja. A megfelelő működéshez fontos, hogy a kináz domén olyan konformációt vegyen fel, mely alkalmassá teszi mind az ATP, mind a szubsztrát megkötésére, illetve, hogy a foszfátcsoporthoz elég közel tudja orientálni a foszfát akceptor hidroxil csoportjához. Ezért a restriktív katalitikus környezet létrehozása érdekében nem meglepő, hogy a kináz családok aktivált konformációja nem különbözik egymástól jelentősen [47].

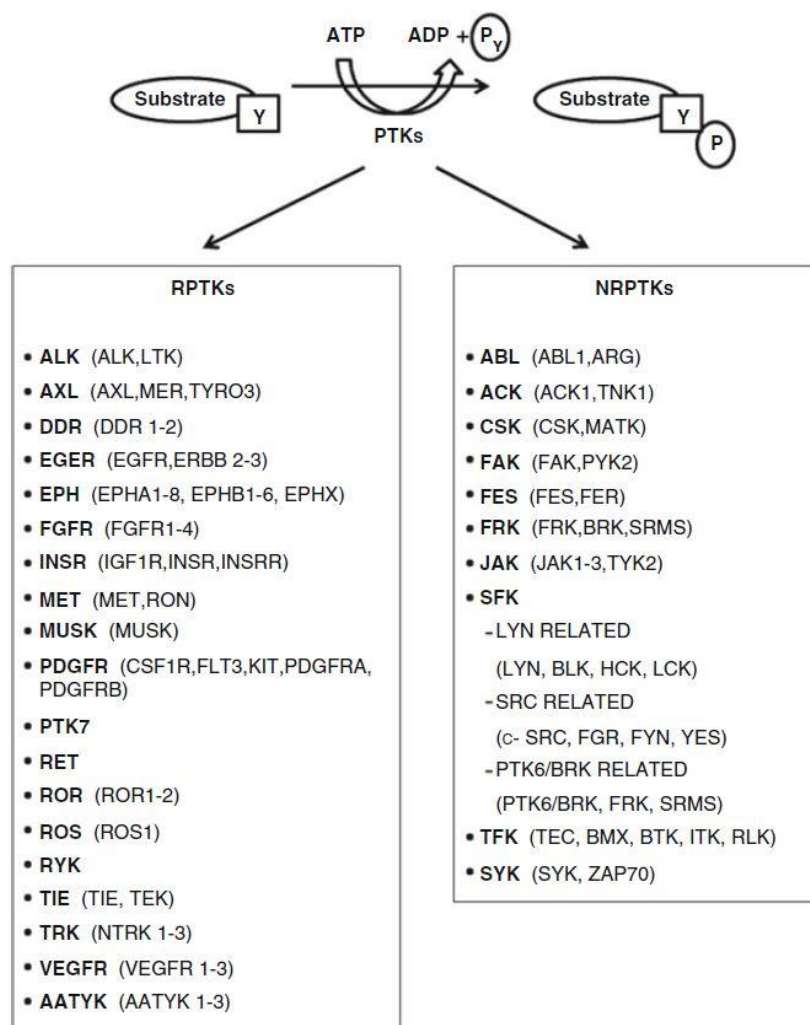
A különböző protein-kinázok között nagy jelentősége van a receptor tirozin-kinázoknak (RTK-k), amelyek egy transzmembrán receptorból és egy intracelluláris kináz-doménből állnak, és fontos onkológiai célpontot képviselnek [9]. Az 58 ismert RTK közül 30-ról bizonyosodott be, hogy részt vesznek az onkogenezisben [44]. A RTK-k által elindított kaszkádok közül kettőnek van nagy jelentősége a daganatos sejtfejlődésben. Az egyik a Ras-Raf-Mek-Erk, a másik pedig a PI3K-Akt tengely, melynek eredményeképpen proliferációt (p21, GSK3, NF- κ B), protein szintézist (p70, S6K) és sejt túlélést (p53, Bim, Foxo1) szabályozó fehérjék működése módosul [48].

Az aktív és inaktív állapotok között vannak szerkezeti eltérések. Az első az, hogy aktív konformáció esetén az aktivációs hurok egy kihelyezett, prominens helyzetben van, míg inaktív állapotban rejtett vagy visszahajló helyzetben található, blokkolva ezzel a szubsztrát kötődését. A második eltérés az, hogy aktivált állapotban egy sóhíd, valamint egy R-gerinc alakul ki a kináz fehérjében, létrehozva ezzel az aktivált α -helix-In konformációt [49].



3. ábra. **A.** A protein-kinázok jellegzetes „két-lebenyes” szerkezete. Az N-terminális lebenyben van a konzervált αC -helix. A C-lebeny általában helikális. Az ATP molekula rendszerint a két lebeny közötti hasadékba kötődik. **B.** Az N-lebeny szerkezete. A glicinben gazdag kacs koordinálja az ATP-foszfátot. **C.** A katalitikus és a szabályozó gépezet a konzervált C-lebeny magjához kötött. A kihelyezett aktivációs szegmentum a (sötét-piros) tartalmaz egy foszforilációs helyet, ami a $\beta 9$ (K^{189}) és a HRD-arginin (R^{165})-hez kötődik [3].

A harmadik különbség az, hogy nonkompetitív ATP-inhibitorok kötődhetnek az ATP-kötőhely mellé közvetlenül, és inaktív állapotban tarthatják a kinázt [50]. A negyedik fontos pont pedig az, hogy számos RTK rendelkezik autoinhibíciós képességgel, melyet a juxtamembrán vagy a C-terminális hajt végre [51].



4. ábra. A receptor-protein-kinázok és a non-receptor tirozin-kinázok felosztása [216].

3.3. A protein-kinázok aberráns működése és szerepe a daganatok kialakulásában

Mivel a kinázok fontos szerepet töltenek be a szignalizációs útvonalakban, általában inaktív állapotban várnak egy specifikus stimulációs jelre. Ezáltal részben vagy teljesen aktív konformációba kerülnek, amit aztán oligomerizáció, a juxtamembrán autoinhibitoros kapcsolat megszakadása és autofoszforyláció követ. Azonban különböző onkogén mutációknak köszönhetően ez a szabályozás felborulhat, és a kinázok konstitutív aktivációját eredményezheti. A konstitutív aktiváció pedig növeli a daganatsejtek túlélését, fokozza a proliferációs képességüket, citotoxikus gyógyszerekkel szembeni rezisztenciájukat, a tumorokban pedig növeli az angiogenezis képességet, az invazivitást és metasztázishajlamot [9].

Számos ilyen mutációt ismerünk. Előfordul, hogy a receptor vagy non-receptor kináz fuzionál egy másik proteinnel – többnyire kiegyenlített kromoszóma transzlokáció következtében –, és a ligand hiányában is konstitutív lesz a kináz oligomerizációja, aktivációja. Erre példa a Philadelphia-kromoszóma transzlokációval történő kialakulása és 9q34.12 *ABL* és a 22q11.21*BCR* gének fúziójának eredménye a BCR-ABL kóros fehérjeCML esetében, amikor is a BCR fehérjében lévő tetramerizációs domén felülírja az ABL katalitikus alegységének autoinhibícióját, folyamatos aktivitást és sejtszétválást eredményezve [15].

Második módja a kinázok diszregulációjának az, amikor az autoreguláció károsodik. Az Fms-szerű tirozin-kináz 3-ban (FLT3) bekövetkező mutáció AML-ben ligand nélkül is aktiválja a tirozin-kinázt [52]. Egy másik példa az epidermális növekedési faktor receptor-kináz doménjében bekövetkezett deléciók, illetve pontmutációk a nem-kissejtes tüdődaganatok esetén: ezek az eltérések fokozzák a receptor érzékenységet a ligand felé, és módosítják a szignalizációt [53].

Harmadik diszregulációs lehetőség a RTK vagy a ligandjának fokozott vagy aberráns expressziója. Erre az esetre példa az ERBB2 (HER2/neu) receptor TK túlzott mértékű kifejeződése emlő daganatokban [54], illetve a vérlemezke-eredetű növekedési faktor (PDGF) fokozott expressziója a dermatofibroma protuberans betegségben [55].

Végül kiemelendő diszregulációs mechanizmus a TK-aktivációt negatívan szabályozó faktorok mennyiségének csökkenése, illetve a kinázgátló proteinek csökkent expressziója [56].

3.4. A célzott terápia jelentősége

A célzott terápia, azon belül a kinázok gátlása az „onkogén addikció” elmélete alapján született meg, és lényege, hogy a rosszindulatú daganatsejteket anélkül pusztítsuk el, hogy az egészséges sejtek jelentős károsodást szenvednének [57]. Ezt úgy tudjuk legkönnyebben elérni, ha tumor specifikus- vagy tumor asszociált antigéneket (TSA illetve TAA) veszünk célba [58]. Igazság szerint a különböző eredetű tumorsejtek olyan molekulákat expresszálnak, amelyek a normális sejtműködéshez nem megfelelőek vagy nagyon gyakran az organogenezis időszakában fontosak, ezért potenciális célpontjai lehetnek a célzott terápiának. Ilyen például a receptor tirozin-kináz-szerű árva receptor 1 (ROR1) onkofötális protein, melyet többek között a neuronális sejtek expresszálnak, és amelyek túlzott mértékű kifejeződését azonosították több különböző daganat esetén is (pl.: krónikus limfoid leukémia, CLL, emlődaganat), míg a normális felnőtt sejtek esetén nincs jelen [59, 60].

A célzott daganatterápiában az intracelluláris sejtalkotókhoz kötődő monoklonális antitestek és a sejtfelszíni antigénekhez kötődő kis molekulájú tirozin-kináz gátlók nagy szerepet játszanak [61]. A kis molekulájú inhibitorok (KMI) egyedi szerkezetű molekulákhoz kötődnek, melyek szükségesek a tumorsejt növekedéséhez és funkcionálásához. A KMI-k számos célpontja közül a RTK-k speciális szerkezettel és tulajdonságokkal bírnak, ezért képesek az extracelluláris szignálokat a sejt belseje felé közvetíteni, illetve speciális szerkezetük lehetővé teszi, hogy ellenük specifikus inhibitor molekulát fejlesszünk [62]. A KMI-k direkt módon képesek gátolni az ATP vagy a szubsztrát kötődését a kináz doménhez, míg más inhibitor molekulák a RTK-k dimerizációját gátolják. A legtöbb onkogén RTK alacsony vagy semmilyen aktivitással nem rendelkezik az egészséges szövetekben, azonban hiperaktív vagy túlzott mértékben expresszálódik a tumorsejtekben, ami ismét egy kedvező tulajdonság a célzott terápia szempontjából, mivel az aktivitás/számbeli különbségből kifolyólag, a KMI-k kevésbé támadják az egészséges sejteket [63]. Mindazonáltal a jelenleg használt KMI-knak rendszerint több célpontja is van, és számos molekulát nem specifikus útvonalon keresztül gátolnak, ezáltal kedvezőtlen hatásokat is eredményeznek a specifikus/szelektív KMI-kkal szemben [64].

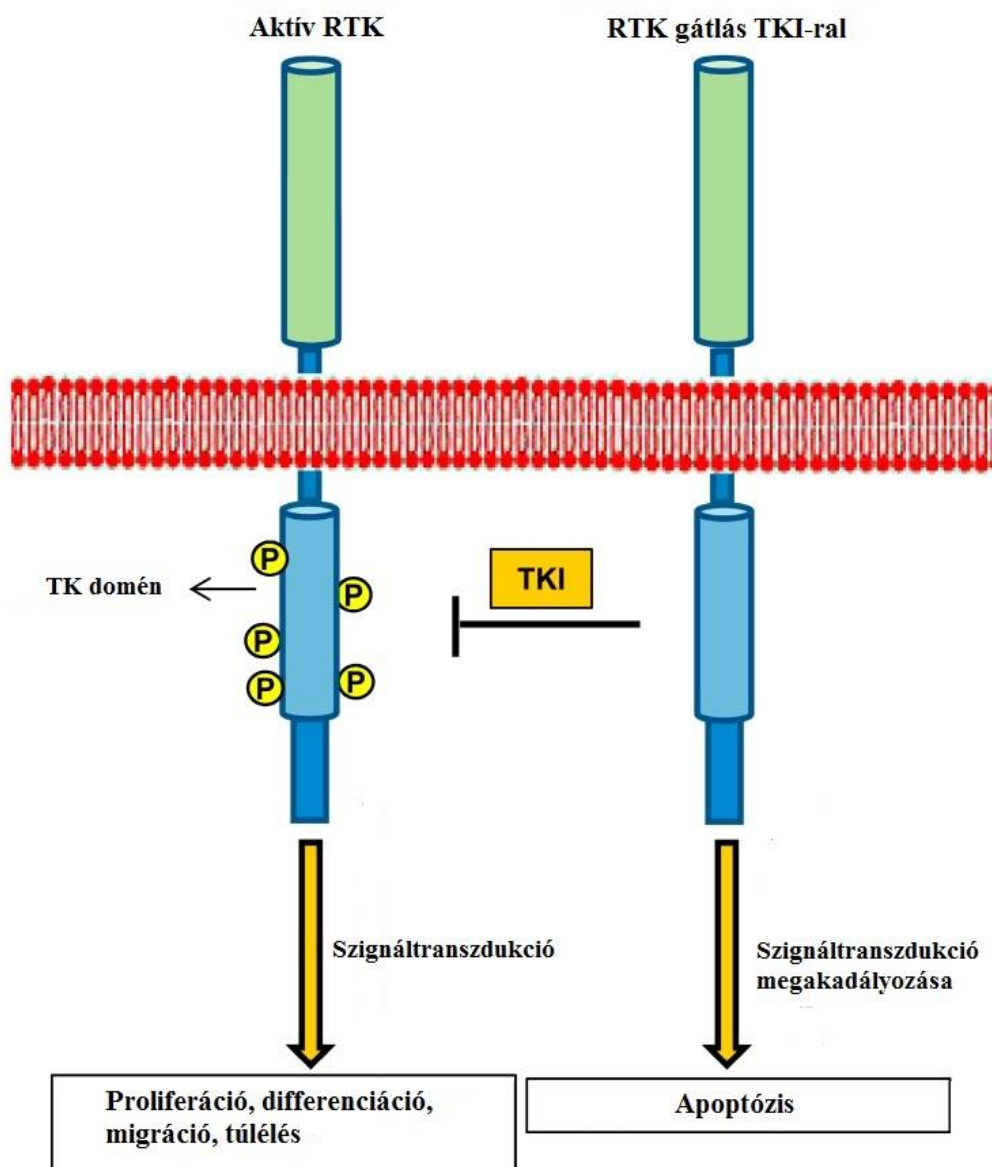
3.5. A kis molekulájú protein-kináz gátlók (KMI)

A protein-kináz gátlók olyan szignalizációs útvonalakat gátolnak, melyek esszenciálisak a sejtek túléléséhez. Képesek átjutni a plazma membránon, és interakcióba lépni a RTK-k citoplazmatikus doménjével, gátolva a katalitikus alegység működését azáltal, hogy megakadályozzák az ATP vagy a szubsztrát kötődését [65]. A TKI-k száma egyre növekszik, és széles körben alkalmazzák őket a daganatokkal szembeni küzdelemben, monoterápiaként, illetve más kemoterápiás készítményekkel kombinációban egyaránt [66].

A TKI-k három csoportba sorolhatók. A legtöbbjük ATP-kompetitív inhibitor, és az I. csoportba tartozik. A konzervatív ATP-kötő helynek, illetve az intracelluláris ATP-vel való versengésnek köszönhetően számos nehézséggel kell szembe nézniük a kutatóknak a specifikus/szelektív TKI fejlesztés során. Ezért a TKI-knak több kináz célpontja is lehet, így előfordul, hogy az antitumoros aktivitás a többszörös gátlásnak köszönhető.

A II. és III. csoport tagjai nem ATP-kompetitívek, és hatásukat a TK domén szerkezeti átalakításán keresztül érik el. A konformáció-változásnak köszönhetően a TK domén elveszti kináz aktivitását. Sőt, ezek a molekulák képesek a TK domén foszforilációját is megakadályozni [67].

A TKI-k tárgyalásakor külön foglalkozunk a hematológiai daganatok, illetve a szolid tumorok terápiájában alkalmazott TKI-kkal.



5. ábra. A RTK inhibitorok megakadályozzák a RTK kináz doménjének foszforilációját, ezáltal az aktivációját. Így gátolják az aberráns sejtproliferációt, differenciációt, migrációt, túlélést, illetve így indukálnak apoptózist.

3.5.1. Hematológiai daganatok terápiája KMI-kkal

A hematológiai daganatok esetében az első sikeresen alkalmazott kis molekulájú TKI az **imatinib-mezilát** (Gleevec, Glivec) volt. Ez a hatóanyag egy 2-fenilaminopirimidin

származék, mely specifikusan képes gátolni az ABL (jellemzően CML-ben fordul elő), a PDGFR TK-t (krónikus mielomonocitás leukémiában és hipereozinofil szindrómában gyakori) és a c-KIT (hízósejtes leukémiában gyakori) receptor TK-t, ezáltal komplett hematológiai és citogenetikai remissziót képes elérni a legtöbb krónikus fázisban lévő CML-es, valamint mielomonocitás leukémiás beteg esetében [68, 69], azonban az AML-es betegek kapcsán a terápiára adott válaszok változóak, és nem korrelálnak a KIT szignalizáció gátlásával [70].

A vérképzőszervi neoplazmák esetén további fontos célpont az FLT3. Az FLT3 egy receptor TK, mely szinte az összes AML-es beteg blasztjain megtalálható, és a juxtamembrán régió duplikációja [71] vagy különböző pontmutációk [72] által aktiválódik. Számos kis molekulájú inhibitor hatóanyag áll fejlesztés alatt, melyek gátolják a hematopoetikus sejtek növekedését, illetve apoptózist indukálnak [73], és hatékonyak bizonyultak egér modellekben létrehozott FLT3-indukált leukémiában [74]. A humán alkalmazás egyelőre kérdéses, mivel az *in vitro* sikerek ellenére a betegek gyakran nem reagálnak az FLT3 inhibitorokra [75].

Egyéb terápiás célpontok lehetnek: a fibroblaszt növekedési faktor receptor 1 (FGFR1), mely fúzióra, és konstitutív aktivációra hajlamos mieloproliferatív szindrómában [76], illetve az FGFR3, melynek mutációját kimutatták mielóma multiplexben [77]. Az anaplasztikus limfóma-kináz (ALK) génjét érintő transzlokáció patognomikus anaplasztikus nagy-sejtes limfómában, és az ALK receptor TK több különböző partner fehérjével történő fúzióját eredményezi [78]. A Janus-arcú-kináz 2 (JAK) – egy non-receptor TK – BCR-el történő fúzióját akut leukémiák és atípusos CML esetekben írták le [79], míg a JAK2 génjében bekövetkező aktiváló pontmutációt (V617F) a legtöbb policitémia verás beteg esetében, valamint egyes esszenciális trombocitómia és idiopátiás mielofibrózis kapcsán igazolták [80, 81].

3.5.2. Szolid tumorok terápiája KMI-kkal

Számos szolid tumor esetében kiderült, hogy kialakulásukban szerepe van a TK-k aberráns vagy konstitutív aktivációjának. A gasztrointesztinális stromális tumorok (GIST) legtöbbje hordoz c-KIT [82] vagy PDGFR α -mutációt [83], mely a receptorok folyamatos foszforilálódásával és aktivációjával jár. Ezen információk alapján került sor az imatinib GIST-tel rendelkező betegekben történő alkalmazására, és a vizsgálatok alapján a betegek több, mint 50%-a reagált a hatóanyagra, azonban komplett remissziót nem tudott elérni [84]. Ez alapján arra következtethetünk, hogy a GIST sejtek túlélése és proliferációja csak részben

függ a c-KIT mutációtól. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) szintén számos daganatban mutálódott vagy túlzott mértékben expresszált (1. táblázat). A **gefitinib** és az **erlotinib** anilinoquinazolin származékok, melyek specifikus, kompetitív gátlószerei a receptor általi ATP kötésnek, és 2004 óta elfogadottak az Amerikai Élelmiszer-biztonsági és Gyógyszerészeti Hivatal által a refrakter, lokálisan előrehaladott vagy metasztatikus nem-kissejtes tüdőkarinóma kezelésére. A gefitinib parciális választ eredményezett ezen betegek 11-19%-ában [85], míg az erlotinib ugyanezen betegek 9%-ában ért el parciális remissziót, és javította a progressziómentes túlélést egy fázis III vizsgálatban [86]. Sajnos azonban a nem-kissejtes tüdődaganat kezdeti kemoterápiájának részeként egyik hatóanyag sem ért el nagyobb sikert, mint a kiindulási hatóanyag önmagában [87]. EGFR inhibitorok jelenleg is szerepelnek fázis I és fázis II vizsgálatokban különböző szolid tumorok esetében [88]. Az EGFR túlzott mértékben expresszálódik a glioblasztómák közel 40%-ában, illetve ezen daganatok egy részében az extracelluláris domén deléciójának köszönhető a fokozott aktivitása [89]. Mindazonáltal a gefitinib csak minimális eredményt ért el a glioblasztómák esetén fázis II vizsgálatokban [90]. A szolid tumorok terápiájában elterjedőben van még a **sunitinib**, amelyet metasztatikus vesesejtes karcinóma kezelésére használnak [91], szintúgy a **sorafenib** a világossejtes veserák kezelésére [92], a lapatinib előrehaladott mellrák kezelésére [93], a **pazopanib** lokálisan előrehaladott vagy metasztatikus vesesejtes karcinóma kezelésére [94], a **vandetanib** előrehaladott nem-kissejtes tüdőrák kezelésére [95], valamint az **axitinib**, mint a metasztatikus vesesejtes karcinóma másodvonalbeli terápiás vegyülete [96]. A kis molekulású hatóanyagok ezen csoportja hatalmas lehetőséget jelent a malignus betegségek célzott gyógyításában. Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a másodlagos jelátviteli útvonalak intenzitásának csökkentése TKI-k által ígéretes célpont lehet az anti-tumor terápiában [16]. A jelenleg alkalmazott vagy kísérleti fázisban lévő TKI-k összegzését az 1. és 2. táblázat mutatja.

Hatóanyag neve	Célpont	Daganat	FDA	EMA
			által befogadott	
Afatinib	HER2, EGFR	Nem-kissejtes tüdő-, emlő-, fej-nyak laphám karcinóma	+	+
Canertinib	EGFR, HER2, 4	Nem-kissejtes tüdő-, emlő-, fej-nyak laphám, ovárium karcinóma	-	-
Cediranib	VEGFR-k	Nem-kissejtes tüdő-, vese-, kolorektális karcinóma	-	-
Crizotinib	MET	Nem-kissejtes tüdőkarcinóma, anaplasztikus nagy sejt limfóma, neuroblasztóma	+	+
Crenolanib	MET, ALK, FLT3, PDGFR α,β	AML, GIST, glióma	-	+
Dacomitinib	EGFR	Nem-kissejtes tüdőkarcinóma, fej-nyak karcinóma, gyomorkarcinóma, glióma	-	+
Erlotinib	EGFR	Nem-kissejtes tüdő-, hasnyálmirigy karcinóma	+	+
Gefitinib	EGFR	Nem-kissejtes tüdőkarcinóma, AML	+	+
Ibrutinib	BTK	CLL, MCL	+	+
Icotinib	EGFR	Nem-kissejtes tüdőkarcinóma	+	-
Lapatinib	HER2, EGFR	Emlőkarcinóma	+	+
Lenvatinib	VEGFR2, 3	Pajzsmirigykarcinóma (Japánban elfogadott)	+	+
Neratinib	EGFR, HER2	Nem-kissejtes tüdő-, emlőkarcinóma	-	+
Quizartinib	FLT3	AML	-	+
Tandutinib	FLT3	CML, vesesejtes karcinóma	-	-
Tivantinib	MET	vesesejtes karcinóma, emlőkarcinóma	-	-
Tivozanib	VEGFR1, 2, 3	vesesejtes karcinóma, emlőkarcinóma	-	+
Vatalanib	VEGFR2	Nem-kissejtes tüdőkarcinóma, diffúz nagy B-sejtes limfóma, kolorektális adenokarcinóma	-	+

1. táblázat. Specifikus/szelektív TKI-k, melyek RTK-okat gátolnak. HER: humán epidermális receptor; EGFR: epidermális növekedési faktor receptor; VEGFR: vaszkuláris növekedési faktor receptor; PDGFR: vérlemezke eredetű növekedési faktor; ALK: anaplasztikus limfóma receptor tirozin-kináz; FLT3: Fms-szerű tirozin-kináz 3; BTK: Bruton-féle tirozin-kináz, AML: akut mieloid leukémia; CLL: krónikus limfoid leukémia; MCL: köpenysejtes limfóma, CML: krónikus mieloid leukémia.

Hatóanyag neve	Célpont	Daganat	FDA	EMA
			által befogadott	
Amuvatinib	ALK, MER, KIT, RET, PDGFR-k, FLT3, RAD 51	Nem-kissejtes tüdőkarinóma	-	-
Axitinib	VEGFR-k, PDGFR-k, KIT	vesesejtes karinóma	+	+
Cabozantinib	VEGF, RET, MET, NTRKB, TIE2, AXL	medulláris pajzsmirigy karinóma, metasztatikus medulláris pajzsm. karinóma	+	+
Dasatinib	BCR-ABL, SRC, KIT, PDGFR-k, EPH, CSK	CML, ALL	+	+
Foretinib	VEGFR2, MET	Nem-kissejtes tüdő-, gyomor-, emlő-, papilláris vesekarinóma	-	-
Golvatinib	VEGFR2, MET	Gyomor-, hepatocelluláris karinóma, melanóma, glioblasztóma	-	+
Imatinib	ABL, KIT, PDGFR-k	GIST, leukémiák	+	+
Nilotinib	BCR-ABL, KIT, LCK, EPHA3, 8, DDR1, 2	CML	+	+
Pazopanib	PDGFR-k, VEGFR-k	előrehaladott lágyszűz - és vesesejtes karinóma	+	+
Ponatinib	BCR-ABL, PDGFR α , SRC, KIT, FGFR, VEGFR-k	CML, Philadelphia-kromoszóma pozitív AML	+	+
Regorafenib	TIE2, PDGFR-k, RET, KIT, B-RAF	metasztatikus kolon karinóma	+	+
Sorafenib	VEGFR-k, PDGFR-k, B-RAF, MEK, ERK	előrehaladott vesesejtes karinóma, hepatocelluláris karinóma	+	+
Sunitinib	VEGFR2, PDGFR β , KIT, RET, CSF1R, FLT3	vesesejtes karinóma, GIST	+	+
Vandetanib	EGFR, VEGFR-k, RET, Tie-2, FGFR1	metasztatikus medulláris pajzsmirigy karinóma	+	+

2. táblázat. Többszörös támadáspontú kinázgátlók. ALK: anaplasztikus limfóma receptor tirozin-kináz; FLT3: FMS-szerű tirozin-kináz 3; PDGFR: vérlemezke eredetű növekedési faktor; VEGFR: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor; EPHA: efrin A-típusú receptor, DDR: diszkoidin domén receptor; FGFR: fibroblaszt típusú növekedési faktor; SRC: szarkóma.

A daganatterápia kapcsán nagyon gyakori, hogy a tumoros sejtek rezisztensek lesznek a kemoterápiás molekulával szemben. Erre egy jó magyarázat lehet a tumoros-öszejt-hipotézis. Az elmélet szerint a tumoros sejtek között van egy csoport, az öszejtek csoportja, mely képes aszimmetrikus osztódásra, differenciálódásra, megújulásra, illetve a terápiás hatóanyagokkal szembeni rezisztencia kialakítására. Így aztán, bár a kemoterápia elpusztítja a sejtek nagy részét, marad egy csoport, mely rezisztens, és képes lesz új tumormasszát létrehozni [97].

Azon rezisztens esetek, melyek nem magyarázhatók ezzel a teóriával, két csoportba sorolhatók. Az egyik rezisztencia mechanizmus az adaptált, a másik pedig a szerzett, ezen utóbbit TKI rezisztenciának is nevezik. Előbbi arra vonatkozik, hogy egyes tumorsejtek képesek párhuzamos túlélési szignalizációs útvonalakat aktiválni, melyek kívül esnek az adott hatóanyag hatáskörén. A daganatos sejtekben több különböző RTK és RTK ligand expresszálódik [98], melyeknek hatása konvergálódik egy közös szignalizációs útvonalban, erősítve ezzel a túlélést. A kemoterápiával szembeni rezisztencia elérhető úgy, hogy a konvergáló útvonalak közül egy vagy több olyan erősödik fel, melyre nem terjed ki a gyógyszer hatása [99] vagy pedig a tumor új növekedési faktorokat termel, gyógyszer-indukált autokrin vagy a stroma általi parakrin módon [100].

A hosszan tartó kemoterápiás kezelés közben kialakult szerzett rezisztencia magyarázatára több modellt is publikáltak. , Lehetséges, hogy a kinázban bekövetkezett primer aktiváló genetikai elváltozáson kívül egy másodlagos mutáció is kialakul ugyanabban- vagy egy másik onkoproteinben, mely ugyannak a szignalizációs útvonalnak a szereplője, mint az első fehérjetermék. Az első esetre példa az EGFR-ben előforduló T790M mutáció, mely csökkenti a TKI molekula kötődését az aberráns receptorhoz. Utóbbira példa az EGFR útvonalban szereplő *MET* gén amplifikációja, amely a PI3K-AKT-mTOR útvonal folyamatos aktivációját, ezáltal gyógyszer-rezisztenciát eredményez [101]. A rezisztencia kialakulásának teljes megértésével talán lehetséges lesz személyre szabott hatóanyag kombinációkat megalkotni, melyek kivédhetik vagy esetleg meg is akadályozhatják a rezisztencia kialakulását.

3.5.3. TKI-ral szembeni rezisztencia kialakulásának mechanizmusai

A daganatgátlók alkalmazása során régóta ismert jelenség, hogy rezisztencia alakul ki a vegyület ellen és a daganat növekedése tovább folytatódik. Hamar kiderült, hogy az újonnan fejlesztett TKI-ra is igaz az, hogy rezisztencia alakul ki ellenük, azonban új rezisztencia mechanizmusok is tetten érhetők. A TKI vegyületek esetén a rezisztencia mechanizmusát tekintve két módon lehet jelen, egyrészt meglévő (primary) rezisztenciáról, másrészt szerzett (acquired) rezisztenciáról lehet beszélni. A rezisztencia mögött legtöbbször többféle mechanizmus húzódik meg ún. membrán transzporterek expressziójának megnövekedése (multidrug rezisztencia (MDR) kialakulása), a glutation rendszer és a teljes sejt metabolizmusának változása [207]. Mind a meglévő, mind a szerzett rezisztencia esetén más mechanizmusok dominálnak. A tumor sejtek mikrokörnyezete (tumor microenvironment,

TME) szintén nagy mértékben hozzájárul rezisztencia kialakulásához [208]. Ilyenek lehetnek az angiogenezis, vascularis re-modeling, tumor őssejtek toborzása és a daganat által aktivált fibroblasztok jelenléte. A szerzett rezisztencia esetén a TKI vegyületek mutációs szelekciót okoznak a sejtek között, így főleg azok tudnak elszaporodni, melyek eleve nem voltak érzékenyek a TKI kezelésre és ezzel végső soron a rezisztencia jelenhet meg. A mutáció mellett alternatív splicing, alternatív/kompenzációs jelátviteli utak beindulása és epigenetikai változások is állhatnak a háttérben. A relapszus és rezisztencia kérdése az imatinibbel kezelt betegek esetében a Bcr-Abl kináz domén pontmutációjával van összefüggésben [209]. Azóta számos pontmutáció lehetőséget írtak le a Bcr-Abl kinázra vonatkozóan. Loop mutációk aktivációja stabilizálja az aktív konformációt és ezzel hozzáférhetetlenné teszi az imatinib számára. Ezekben az esetekben a nilotinib [210] és a dasatinib [211] megfelelő hatékonyságot mutathat. Jelentőséggel bírhat egy adott betegpopulációban annak előre jelzése, hogy TKI-ra mennyire lesz érzékeny az adott beteg vagy eleve rezisztenciával kell számolni.

Epigenetikai mechanizmusok is hozzájárulhatnak rezisztencia kialakulásához, melyre igen jó példa az EGFR, melynek szüksége van a chaperone hő-sokk fehérje 90-re (Hsp90) a megfelelő csomagoláshoz és funkcióhoz. A histon-deacetiláz gátló (HDAC) panobinostat növeli a Hsp90 acetilációját és ezzel növeli az EGFR-hez való asszociációját. Következésképpen a survival signalling fehérje downregulálódik és sejthalál következik be [212].

Árnyalja a képet az is, hogy az egyes TKI vegyületek hatékonysága és ellene kialakuló rezisztencia attól is függ, milyen daganatról van szó, ezért a kezelés során a megfelelő TKI kiválasztása különleges figyelmet érdemel.

3.6. A DMBA-kezelt egér mint tumormodell

A humán és állati eredetű daganatok kialakulásának és fejlődésének az az alapja, hogy a sejtosztódást, differenciációt és sejthalált meghatározó gének valamelyikében (időnként több génben is) mutáció következik be, melynek következtében aberráns lesz a gén által kódolt fehérje működése, és felborul a sejt fiziológiás szabályozó rendszere, folyamatos sejtosztódást, a differenciáció és programozott sejthalál elmaradását eredményezve. Általában több egymást követő esemény vezet idáig. A különböző kémiai anyagok karcinogén tulajdonsága abból fakad, hogy képesek a DNS-hez kötődni és szomatikus mutációkat előidézni [102]. Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy ezek a mutációk kritikus, sejthomeosztázist irányító génekben következnek be, és kulcsszerepük a daganatfejlődés

elindításában. A proto-onkogének onkogénekké történő konverziója az egyik legfontosabb lépés a tumorgenezis során, így feltételezhető, hogy a hatékony kémiai karcinogén anyagok ezeket a géneket veszik célba [103].

A proto-onkogének *Ras* családjának pontmutációi kiemelt jelentőséggel bírnak a daganatevolúció során, mind a hematológiai mind a szolid tumorokat tekintve [104]. A *Ras* onkogének karcinogenezis kezdeti időszakában betöltött szerepéről szóló első bizonyíték a 7,12-dimetilbenz[*a*]antracén (DMBA) által indukált premalignus egér bőr papillomák tanulmányozásából született [105]. Ez, illetve más hasonló témájú tanulmányok megalkották a „többlépcsős daganatfejlődés” fogalmát, amely azt jelenti, hogy a kémiai karcinogének hatására kialakuló daganatok evolúciójában 3 különböző szakaszt lehet azonosítani. Ezek az iniciáció, a promóció és a progresszió. Az iniciáció egy gyors, irreverzibilis folyamat, mely során a kémiai karcinogén reaktív formája interakcióba lép a célsejt DNS-ével, és reverzibilis vagy irreverzibilis változásokat hoz rajta létre. A kulcsfontosságú proto-onkogének mutációja, illetve a mutációk fixálódása következik be, amelynek következtében elindul a tumorfejlődés [106]. A promóció folyamata jóval lassabb és reverzibilis, mely során megnövekedett intenzitású DNS-szintézis és sejtosztódás (klonális expanzió) figyelhető meg, a daganatos őssejteken epigenetikai változások is bekövetkezhetnek, megváltozik a sejtek differenciálódása, és manifesztálódik a tumor [107]. A progresszió során pedig a daganatos sejtek új mutációkat szenvedhetnek, melyek eredményeképp a premalignus lézióból rosszindulatú elváltozás lesz, amely képes az invázióra, angiogenezisre és metasztázisképzésre [108].

Jelenleg a leggyakrabban alkalmazott kémiai iniciációs ágens a DMBA, mely mind hematológiai, mind szolid tumorok iniciációjára alkalmas, és testfelszíni, valamint szisztémás adagolása is hatékony [19]. A DMBA elsődleges célpontja a *Hras* gén – A-T transzverziót okoz a 61-es kodonban [109] – de megfigyelték már a *Kras* és *Nras* gének mutációját is DMBA-indukált tumor modellekben [110]. A DMBA-indukált tumor modellek nagy hatékonysággal alkalmazhatók humán tumorok vizsgálatához. Számos bizonyíték támasztja alá, hogy a humán daganatok szintén többlépcsős evolúciós folyamaton mennek keresztül [111]. Régóta ismert elképzelés hogy a rosszindulatú daganatok a DNS-károsodást, génmutációt szenvedett őssejtek kontrollálatlan proliferációjának eredményei, mely károsodást sokszor kémiai mutagén ágensok okozzák [112]. A humán daganatokhoz hasonlóan a többlépcsős egér-tumor-modellben is az első lépés az őssejtpopulációban bekövetkezett aktiváló proto-onkogén mutáció. A humán daganatfejlődés többi stádiuma is párhuzamot mutat a kémiai karcinogének által indukált egér tumorgenezis szakaszaival [113].

Ráadásul számos hasonlóságot találhatunk genetikai és molekuláris szinten a humán és egér daganatok között, melyek a tumorevolúció során jelennek meg. Ilyenek például a *ras* géncsaládban bekövetkező aktiváló mutációk, az EGFR aktivációja, az Akt és Stat3-mediált szignalizációs útvonalak aktivációja, a transzformáló növekedési faktor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) fokozott expressziója, valamint későbbi stádiumokban a *Trp53* mutációi [114]. Ezek a tumor modellek alkalmasak potenciális antikarcinogén vegyületek tesztelésére, melyek iniciációra, promócióra vagy progresszióra gyakorolt hatását tudjuk vizsgálni – mint például a karcinogén ágensek metabolizációjának befolyásolását (felszívódás csökkentése vagy kiürülés serkentése); a karcinogén molekula DNS-kötődésének megakadályozását, kompetitív gátlást; a sejtek proliferációjának, differenciálódásának módosítását; a génaktivációk gátlását vagy a reaktív oxigén és nitrogén gyökök termelődésének csökkentését –[115], ezáltal az egyes hatóanyagok terápiás, sőt esetleges kemopreventív hatása is felderíthető [116].

Egy nem régi tanulmányban potenciális vizsgálták antikarcinogén vegyületek gátló hatását a molekuláris epidemiológiai biomarkerek, a *Ha-ras* onkogén és *p53* (*Trp53*) tumorsuppresszor gének DMBA-indukált expressziójára. Számos kemopreventív gyógyszert is vizsgáltak már ebben a rendszerben, mint például a kalkon analógokat, a flavonoid bioszintetikus útvonal intermedier vegyületeit vagy az Afobazol-t, a 2-Merkaptoimidazol származékát [117-119]. Ezeken felül természetes hatóanyagok *in vivo* vizsgálatára is alkalmas a rendszer, mint ahogy a mi kutatócsoportunk is már korábban tanulmányozta a Macskakarom és Lapacho kivonatok potenciális kemopreventív hatásait [120].

Tanulmányunkban ismert, illetve preklinikai fázisban lévő tirozin-kináz gátló vegyületek kémiai karcinogenezist befolyásoló hatását vizsgáltuk DMBA-indukált egér-tumor-modellben, a karcinogenezis során aktiválódó, illetve mutációt szenvedő gének expressziójának meghatározásán keresztül. A vizsgálatokban kitértünk ezen vegyületek lehetséges kemopreventív hatásának felmérésére is, különös tekintettel a már klinikai használatban lévő, jó terápiás eredményeket elérő imatinib-mezilát kemopreventív hatásának vizsgálatára.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Új TKI vegyületek daganat gátló hatásának vizsgálata CBA/Ca fajtájú H-2^K egerek DMBA indukált daganatos elváltozásaiban

4.1.1. Kísérleti állatok és kísérleti elrendezés

6-8 hetes (20 ± 4 g), konvencionális körülmények között nevelt, CBA/Ca fajtájú H-2^K haplotípusú egereket vizsgáltunk (minden csoportban 6 nőtényt).

Ezeket a laboratóriumi állatokat 1920-tól tenyésztik, Bagg albinó nőtény és DBA hím keresztezésével. A CBA/Ca altörzs az emlősökben kialakuló daganatok vizsgálatában az egyik leggyakrabban használt kísérleti állat, melyet hisztokompatibilitás szerint H-1^a, H-2^k és H-3 alcsoportokként ismerünk [217]. A CBA/Ca egereket gyakran használják leukémia kutatásában, mert különböző vegyületekre érzékenyek, emellett a spontán kialakuló leukémia aránya alacsony. A törzs hajlamos myeloid leukémiára benzol vagy ionizáló sugárzások hatására.

A kísérletet a Pécsi Orvostudományi Egyetem Állatkísérleti Bizottsága engedélyezte. Az állatokat hozzászokattuk a laboratóriumi körülményekhez, és a kísérlet teljes időtartama alatt tetszés szerinti tápot és vizet biztosítottunk számukra. Két kontrollcsoportot alakítottunk ki, az egyik esetben az állatok sem kémiai karcinogént (DMBA) sem vizsgált anyagot sem kaptak, csupán a vivőanyagokat fecskendeztük beléjük (negatív kontroll). Egy másik csoportban a vizsgált anyagok felhasználásakor is használt, azzal azonos mennyiségű DMBA-t és vivőanyagokat injektáltunk, a jelölt molekulák nélkül (pozitív kontroll). Ezen csoportok létrehozására a későbbi vizsgálati eredmények összehasonlítása miatt volt szükség. Minden egyes vizsgálandó vegyület hatásának tanulmányozásához 4 kísérleti csoportot hoztunk létre (5. ábra). 24 órával az utolsó DMBA vagy kísérleti vegyülettel történő kezelést követően az állatok életét kíméletesen (nyúltvelő roncsolással) kioltottuk. Az 1., 2., 3. és 4. vegyületet a Vichem Chemie Kft., Budapest, Magyarország bocsátotta rendelkezésünkre.

Első csoport - negatív kontroll: 6 egér DMSO	Második csoport - pozitív kontroll: 6 egér DMBA
Harmadik csoport - párhuzamos kezelés	Negyedik csoport - előkezelés a vegyülettel
6 egér 1. vegyület és DMBA együtt	6 egér 1. vegyület, 24 óra múlva DMBA
6 egér 2. vegyület és DMBA együtt	6 egér 2. vegyület, 24 óra múlva DMBA
6 egér 3. vegyület és DMBA együtt	6 egér 3. vegyület, 24 óra múlva DMBA
6 egér 4. vegyület és DMBA együtt	6 egér 4. vegyület, 24 óra múlva DMBA
Ötödik csoport - utókezelés a kísérleti vegyülettel	Hatodik csoport - önálló kezelés a vegyülettel
6 egér DMBA, 24 óra múlva 1. vegyület	6 egér 1. vegyület (DMBA adás nincs)
6 egér DMBA, 24 óra múlva 2. vegyület	6 egér 2. vegyület (DMBA adás nincs)
6 egér DMBA, 24 óra múlva 3. vegyület	6 egér 3. vegyület (DMBA adás nincs)
6 egér DMBA, 24 óra múlva 4. vegyület	6 egér 4. vegyület (DMBA adás nincs)

3. táblázat Az első kísérlet tervezete.

Első rész: negatív kontroll.

Egy csoport állat (n=6), amely negatív kontrollként szolgált, egyszeri 10 ml/kg intraperitoneális (i.p.) dimetil-szulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich Budapest, Magyarország) kezelésben részesült.

Második rész: pozitív kontroll.

Egy csoport állat (n=6), amely pozitív kontrollként szolgált egyszeri 20 mg/kg i.p. DMBA (Sigma Aldrich Budapest, Magyarország) kezelésben részesült, melyet DMSO-ban oldottunk fel (Sigma Aldrich Budapest, Magyarország).

Harmadik rész: párhuzamos kezelés.

4 csoport (n=6) egeret kezeltünk DMSO-ban oldott DMBA-val és a 4 kísérleti vegyülettel, egymással párhuzamosan (a módszerek és mennyiségek az első két beállításnak megfelelően alakultak). Mind a 4 csoport tagjai 10 mg/kg dózisban, i.p. injektlás útján részesültek az 1. vagy 2. vagy 3. vagy 4. kísérleti vegyületből.

Negyedik rész: előkezelés a kísérleti vegyülettel.

A kísérleti vegyülettel történő előkezelést követő DMBA hatást 4 állatcsoportban vizsgáltuk. Minden csoport állatait i.p. kezeltük a 4 kísérleti vegyület valamelyikének (1., 2., 3. vagy 4.) egyszeri dóziséval (10 mg/kg). 24 óra elteltével min a 4 csoport állatai egyszeri 20 mg/kg i.p. DMBA kezelésben részesültek. 24 órával később az állatok életét kíméletesen kioltottuk.

Ötödik rész: utókezelés a kísérleti vegyülettel.

A kísérleti vegyületek hatását DMBA előkezelést követően vizsgáltuk. 4 állatcsoportot előkezelünk DMBA-val, majd 24 órával később a kísérleti vegyületekkel (a fent említetteknek megfelelően). A vegyületekkel történő kezelést követő 24 óra múlva az állatok életét kíméletesen kioltottuk.

Hatodik rész: önálló kezelés a kísérleti vegyülettel.

A 4 állatcsoport tagjai egyszeri 10 mg/kg dóziséval i.p. kezelésben részesültek az 1. vagy a 2. vagy a 3. vagy a 4. vegyületből; majd 24 óra elteltével kíméletesen kioltottuk az életüket.

4.1.2. RNS izoláció- és génexpresszió-vizsgálatok

Az állatok életének kíméletes kioltása (az eljárás a PTE állatkísérleti etikai kódexe alapján, nyúltvelő roncsolással történt) után eltávolítottuk a májukat, a tüdejüket, a csontvelőjüket, illetve a veséjüket, és minden szervből 100-100 mg-ot eltettünk további feldolgozás céljából. A minták homogenizálása után a teljes celluláris RNS-t izoláltuk TRIZOL reagens segítségével (Invitrogen, Paisley, UK). Az RNS minőségét denaturáló gél-elektroforézis és 260/280 nm-en történő abszorpció méréssel ($A_{260}/A_{280} > 1,8$) állapítottuk meg. A szükséges hígítás elvégzése után 10 μ g RNS-t dot-blottoltunk Hybond N⁺ nitrocellulóz membránra (ECL kit, Amersham, Little Chalfont, Egyesült Királyság), majd pedig *Trp53* és *Ha-ras* génekre specifikus kemilumineszcens próbákkal hibridizáltuk (személyes közlés Szeberényi József Professzortól, Pécsi Orvostudományi Egyetem, Magyarország). Az RNS izolációja, hibridizálása és detektálása a gyártó instrukcióinak megfelelően történt. A kemilumineszcens jeleket röntgen filmekben detektáltuk, a filmeket beszkenneltük, és a Quantiscan (Biosoft, Cambridge, Egyesült Királyság) nevű számítógépes szoftver segítségével értékeltük. A konstitutívan kifejeződő β -*aktin*-nal rehibridizált membránok szolgáltak a gén expresszió összehasonlításának bázisaként. Az eredményeket a β -*aktin* expressziójának hányadosaként fejeztük ki. A statisztikai analízist t-tesztel végeztük, melyet az SPSS statisztikai szoftver (SPSS Inc., IL, USA) segítségével hajtottuk végre. A 7-10 ábrán látható oszlopok fölötti

sávok kétszeres standard deviációt jeleznek. Az expressziós arányokban tapasztalható különbségek szignifikanciáját a t-teszt alapján határoztuk meg, és statisztikailag szignifikánsnak minősítettük a különbséget, ha a $p < 0,05$ volt.

4.2. Imatinib-mezilát daganat gátló hatásának vizsgálata NMRI egerek DMBA indukált daganatos elváltozásaiban

4.2.1. Kísérleti állatok és kísérleti elrendezés

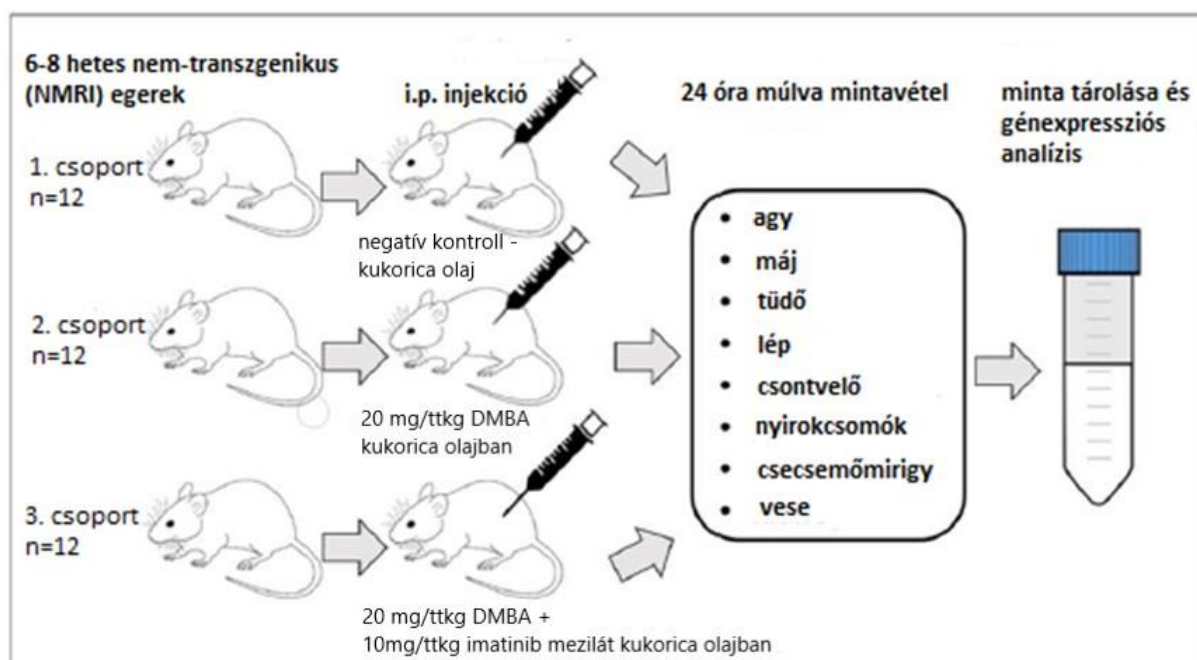
6-8 hetes (25 ± 5 g), hagyományosan nevelt NMRI tenyésztésű egereket (csoportonként $n=12$, 6 hím és 6 nőstény) vizsgáltunk.

Az NMRI egy svájci eredetű laboratóriumi egértörzs, 1937 óta tenyésztik. A leggyakrabban és igen széles körben használt laboratóriumi állat, különleges tulajdonságai nincsenek, idős korban hajlamos a veseelégtelenségre. [218]

A kísérletet a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérleti Bizottsága etikailag jóváhagyta (BA 02/2000-16/2011). Egy-egy ketrecben 6 azonos nemű állatot helyeztünk el, $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12h:12h világos: sötét ciklusban. Az állatoknak szabad hozzáférést biztosítottunk a vízhez és a standard rágcsálótáplálékhoz a kísérlet teljes időtartama alatt.

A kísérleti vegyületek vizsgálatához három állatcsoportot alakítottunk ki (6. ábra). Az első csoport tagjait – akik negatív kontrollként szolgáltak – intraperitoneálisan (i.p.) kezeltük a hatóanyagok vivőanyagával (kukorica olaj). A második csoport állatai – pozitív kontroll csoport – kukorica olajban oldott DMBA kezelésben részesültek egyszeri 20 mg/ttkg i.p. dózisban (mindkét anyagot a Sigma Aldrich Kft. Budapest, Magyarország-tól vásároltuk). A harmadik csoport állatait szimultán kezeltük i.p. 10 mg/ttkg dózisú imatinib-meziláttal (4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil]benzamid-metánszulfonát – Novartis Pharma GmbH termék, gyári nevén Glivec) és 20 mg/ttkg dózisú kukorica olajban oldott i.p. DMBA-val. 24 órával az injekciók beadása után az állatok életét kíméletesen, túlaltatással (ketamin/xylazin 50/5 mg/ttkg) kioltottuk, majd eltávolítottuk a májukat, lépüket, veséjüket, tüdejüket, csecsemőmirigyüket, csontvelőjüket és az agyukat. A

szerveket gyorsfagyasztás céljából folyékony nitrogénbe helyeztük, majd további vizsgálatokhoz -80 °C-on tároltuk.



6. ábra. Kísérleti terv. A 6-8 hetes ($n=36$) konvencionálisan tenyésztett NMRI egereket 3 csoportba randomizáltuk: a negatív kontroll csoport tagjai i.p. kapták a vivőanyagot (kukorica olaj) (1. csoport, $n=12$), a pozitív kontroll csoport (2. csoport, $n=12$) i.p. DMBA kezelést kapott 20 mg/ttkg egyszeri dózisban. A 3. csoport állatait i.p. imatinib-meziláttal (10 mg/ttkg dózisban) és DMBA-val (20 mg/ttkg dózisban) kezeltük. 24 órával a kezeléseket követően az állatok életet kíméletesen kioltottuk, a szerveiket eltávolítottuk és további analízis céljából eltároltuk.

4.2.2. RNS izolálás

Minden szervből 100 mg szövetmintát homogenizáltunk MagNA Lyzer Green Beads csövekben (Roche (Magyarország) Kft.) a MagNA Lyzer eszköz segítségével (Roche (Magyarország) Kft.). Teljes RNS mennyiséget izoláltunk a szövet homogenizátumokból az EXTRAzol RNS izoláló kit segítségével (Invitrogen Life Technologies Magyarország Kft.). Az RNS minőségét 260/280 nm-en történő abszorpcióméréssel (A_{260}/A_{280} nagyobb, mint 1,8) állapítottuk meg.

4.2.3. Génexpressziós vizsgálatok

Egylépéses PCR vizsgálatot végeztünk a Kapa SYBR FAST Egylépéses RTqPCR KIT (Kapa Biosystems) segítségével LightCycler 480 qPCR platformon, egy 96-lyukú lemezen. A vizsgálat magában foglalt reverz transzkripciót és target amplifikációt is.

A következő egér tumorsuppresszor génekre specifikus primereket (IDT) használtuk: *Hras*, (5'-AATTGGGGGAGCAAGGACAT-3'); *Kras* (5'-TATCCTGCTTCCCATCAGTGTTTC-3'); *Myc* (5'-GTTGTGCTGGTGAGTGGAGA-3'); *Trp53* (5'-CTTCACTTGGGCCTTCAAAA-3'), kontroll génnek pedig a *Gapdh*-t (5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3') alkalmaztuk a kvantitatív amplifikáció során.

Az RTqPCR-t 5 percig 42 °C-on, illetve 3 percig 95 °C-on történő inkubációt követően kezdtük el, amely inkubációt 50 ciklus (95 °C-on 10 mp-ig, 55 °C-on 20 mp-ig, 72 °C-on 20 mp-ig) követett, és minden kör végén fluoreszcens értékelést végeztünk. Minden próbát olvadáspont analízissel fejeztünk be (95 °C-on 5 mp-ig, 65 °C-on 60 mp-ig, 97 °C-on), hogy biztosítsuk az amplifikáció specifitását. A fluoreszcens értékeket a $\Delta\Delta C_p$ módszert követően számoltuk ki az Exor4 szoftver (Roche (Magyarország) Kft.) segítségével, a gén expressziókat pedig relatív mennyiségi értékeként jelenítettük meg.

4.2.4. Adatelemzés, statisztikai értékelés

Az adatok statisztikai elemzését az R szotver [202] és az SPSS 21.0 szotver (SPSS Inc., IL, USA) segítségével végeztük. Az mRNS-ek expressziós szintjében megjelenő különbséget kétmintás Student t-próbával számoltuk ki, és akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0,05$. A különböző kísérleti csoportokban/szervekben megjelenő génkapcsolatok bemutatására szolgáló gén-gén interakciós hálózatot a GeneMania Cytoscape 3.4.0. alkalmazás használatával készítettük el. Fizikai, koexpressziós és gén-gén interakciót elemeztünk [121]. A hő térképet (heat map) pedig a Gene-E program 3.0.204 verziójával rajzoltuk meg [203].

5. Eredmények

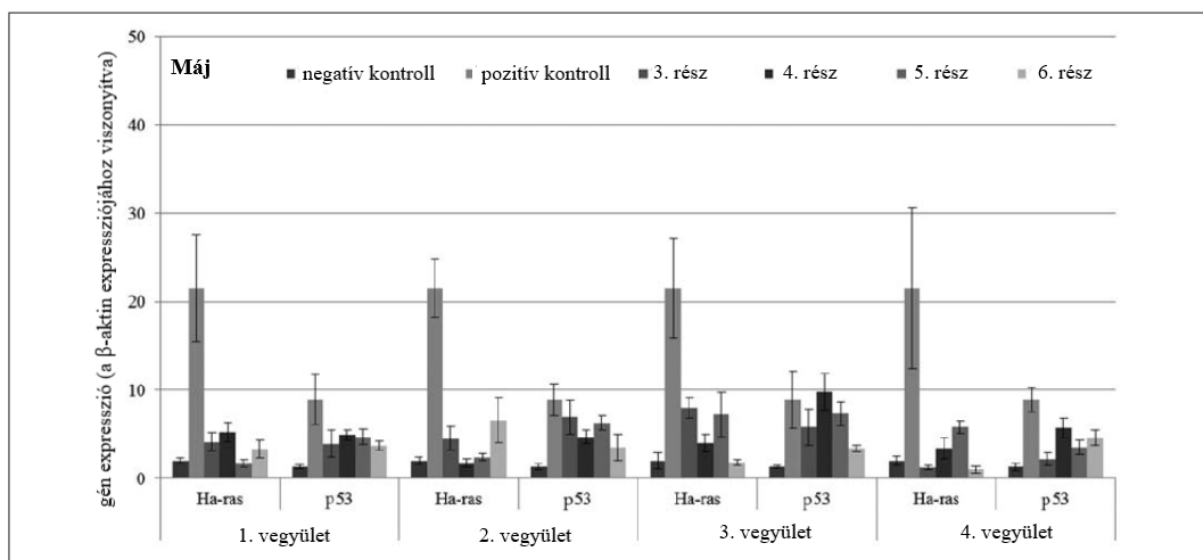
5.1. Első kísérlet

A DMBA, amely egy pluripotens kémiai karcinogén vegyület, figyelemre méltó mértékben emelte a *Trp53* és *Ha-ras* expresszióját ebben a „rövid-távú” kísérletes modellben. A DMBA önmagában adva emelte a vizsgált kulcsszerepű onko/suppresszor gének expresszióját, közel

az összes szervben, majdnem minden kísérleti részben. A DMSO önmagában – ami negatív kontrollként szolgált, és a DMBA oldószereként használtuk –, valamennyi szervben elenyésző befolyással bírt a vizsgált gének expressziójára. Az eredményeket a 7-10. ábra szemlélteti, minden oszlop az adott rész eredményeinek átlagát mutatja. Általánosságban elmondható, hogy a kísérleti vegyületek – párhuzamosan, 24 órával a DMBA kezelés előtt vagy 24 órával a DMBA kezelés után adva – jelentősen csökkentették a vizsgált gének DMBA-indukált túlzott mértékű expresszióját.

Máj

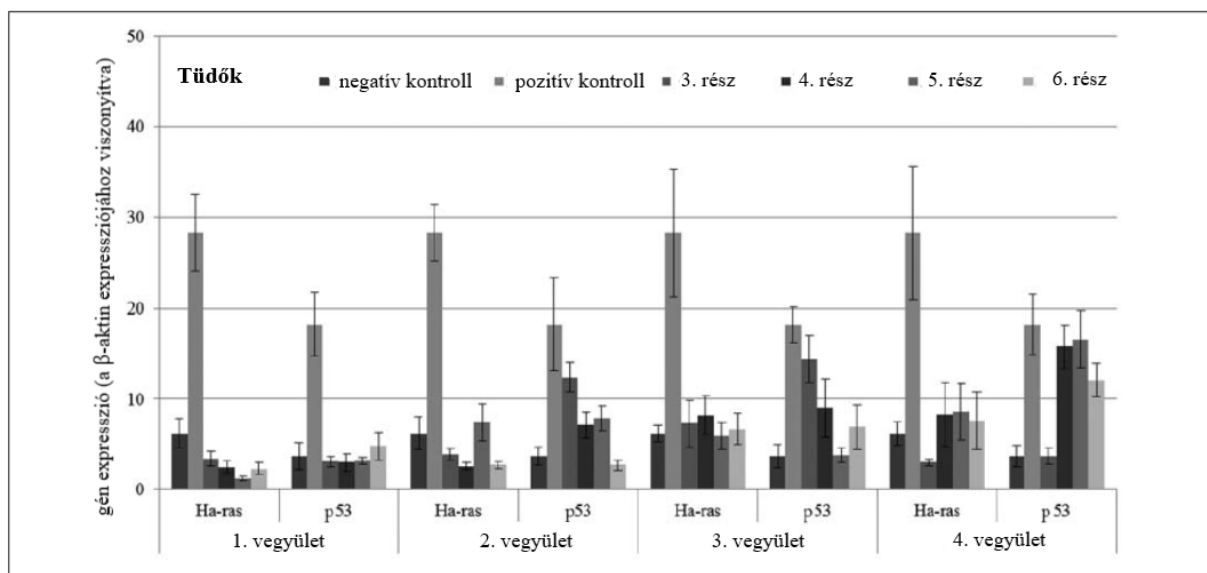
A máj gén expressziós mintázatát a 7. ábra mutatja. Mind a 4 vegyület csökkentette a *Ha-ras* DMBA-indukált fokozott kifejeződését. Az 1. vegyület leginkább utókezelésként (a DMBA adminisztráció után 24 órával) alkalmazva, az ötödik részben csökkentette a *Ha-ras* expresszióját. A 2. és 3. vegyülettel történő előkezelés (24 órával a DMBA előtt) szignifikánsan ($p < 0,05$), egészen a negatív kontroll állatokban detektált szintre csökkentette a *Ha-ras* kifejeződését. A DMBA és a 4. vegyület párhuzamos adminisztrációja (harmadik rész) szintén mérsékelte a *Ha-ras* fokozott expresszióját. A májban mérhető *Trp53* kifejeződést az 1. és 4. vegyület volt képes csökkenteni a harmadik, negyedik és ötödik rész protokollja szerint alkalmazva. Az 1. vegyület nem ért el statisztikailag szignifikáns változást a génexpresszió szintjében. A 4. vegyület, a DMBA-val párhuzamosan adagolva szignifikánsan (a negatív kontroll szintjére) csökkentette a *Trp53* mRNS mennyiségét.



7. ábra. *Ha-ras* és *Trp53* gén expressziós mintázat a CBA/Ca egerek májából 24 órával a különböző kezelések kombinációja után.

Tüdők

A tüdők génexpressziós mintázatát a 8. ábra szemlélteti. Mind a 4 tirozin-kináz gátló vegyület csökkentette a *Ha-ras* gén kifejeződésének mértékét a negatív kontroll szintjére. A pozitív kontrollhoz hasonlítva ez a csökkenés szignifikáns mértékű ($p < 0,05$). A 2. vegyület hatékony gátlószernek bizonyult a negyedik részben. A DMBA-val párhuzamosan alkalmazva (harmadik rész), a 4. vegyület jelentősen ($p < 0,05$) (a negatív kontroll szintjére) csökkentette a *Ha-ras* expresszióját. Az 1. vegyület szignifikánsan csökkentette a DMBA által megemelt *Trp53* mRNS szintet a harmadik, negyedik és ötödik részben. A 2. és 3. vegyülettel történő kezelés szintén csökkentette a *Trp53* expresszióját a harmadik, negyedik és ötödik részben, melyek közül a negyedik és ötödik részben bekövetkezett változás tekinthető szignifikánsnak ($p < 0,05$).

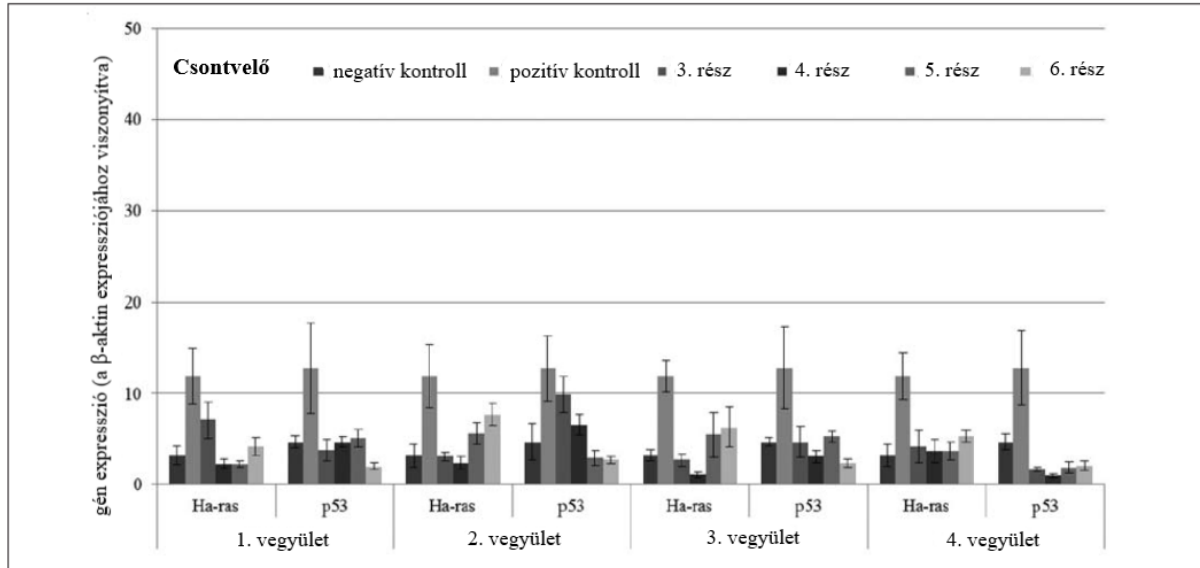


8. ábra. *Ha-ras* és *Trp53* génexpressziós mintázat a CBA/Ca egerek tüdejéből 24 órával a különböző kezelések kombinációja után.

Csontvelő

A csontvelő génexpressziós mintázatát a 9. ábra mutatja. A kísérleti vegyületek mérsékeltek a DMBA-indukált emelkedett *Ha-ras* mRNS szintet. A 2., 3. és 4. vegyület szignifikánsan csökkentette a *Ha-ras* expresszióját ($p < 0,05$) a kísérlet harmadik, ötödik és hatodik részében. Az 1. vegyület szintén szignifikáns ($p < 0,05$) redukciónak ért el a *Ha-ras* kifejeződésében, elő-, illetve utókezelésként alkalmazva (negyedik és ötödik rész). Mind a négy vegyület csökkentette a *Trp53* expresszióját valamennyi kísérleti részben (harmadik, negyedik és ötödik rész). Az 1. és 3. vegyület egészen a negatív kontroll szintjéig mérsékelte a *Trp53*

kifejeződését. A 4. vegyület szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a *Trp53* expresszióját mindhárom kísérleti részben (harmadik, negyedik és ötödik rész). A 2. vegyület által kifejtett mérséklő hatás nem bizonyult szignifikánsnak a harmadik részben, de az elő- és utókezelési kísérleti elrendezésben (negyedik és ötödik rész) jelentősen csökkent a *Trp53* expressziója.

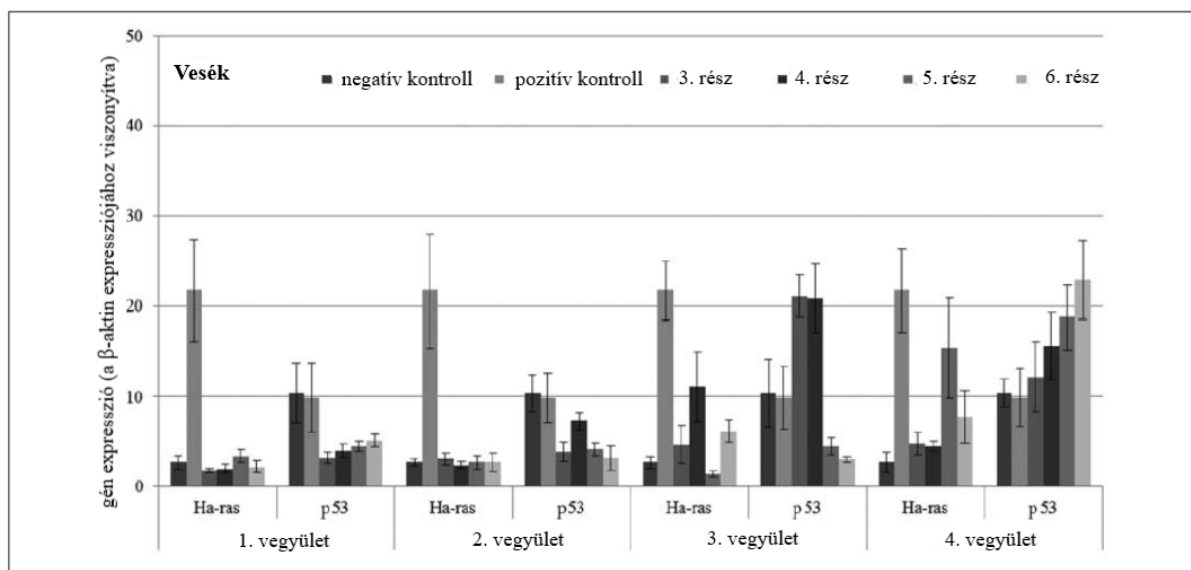


9. ábra. *Ha-ras* és *Trp53* génexpressziós mintázat a CBA/Ca egerek csontvelőjéből 24 órával a különböző kezelések kombinációja után.

Vesék

A vesék génexpressziós mintázatát a 10. ábra szemlélteti. Mind a 4 vizsgált vegyület csökkentette a *Ha-ras* gén kifejeződésének mértékét a pozitív kontrollhoz viszonyítva. Az 1., 2. és 3. vegyület szignifikánsan redukálta a *Ha-ras* gén expresszióját a harmadik, negyedik és ötödik kísérleti elrendezésben ($p < 0,05$). Az 1. és 2. vegyület a negatív kontroll szintjére csökkentette a *Ha-ras* mRNS mennyiségét. A harmadik és negyedik kísérleti részhez viszonyítva a 3. vegyület nagyobb mértékű redukción eredményezett a *Ha-ras* gén kifejeződésében az ötödik részben. A *Trp53* tumorszuppresszor gén expressziójának mértéke magasabbnak bizonyult a vesében, mint bármelyik másik vizsgált szervben. A DMBA-kezelés (pozitív kontroll) nem okozott további növekedést a gén kifejeződésében. Az 1. és 2. vegyület csökkentette a *Ha-ras* és *Trp53* gének expresszióját minden kísérleti elrendezésben. Ez a mérséklődés szignifikáns volt ($p < 0,05$), kivéve a 2. vegyület hatása a *Trp53* tekintetében, a negyedik részben. A 3. és 4. vegyület szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a *Ha-ras* kifejeződését a harmadik, negyedik és ötödik részben. A 3. vegyület – a DMBA-kezelés előtt és után alkalmazva (harmadik és negyedik rész) – növelte a *Trp53* gén expresszióját az állatok

veséjében. A 4. vegyület önmagában, illetve a DMBA-val párhuzamosan alkalmazva szintén növelte a *Trp53* mRNS szintet a vesékben.



10. ábra. *Ha-ras* és *Trp53* génexpressziós mintázat a CBA/Ca egerek veséjéből 24 órával a különböző kezelések kombinációja után.

5.2. Második kísérlet

5.2.1. Génexpresszió

A három kísérleti rész génexpressziós mintázatát a 11. és 12. ábra mutatja. Fontos kiemelni, hogy az eltérő nemű csoportok génexpressziós mintázatában nem találtunk jelentős különbséget.

Csontvelő

A csontvelőben a DMBA injekció csökkentette a *Hras*, *Kras* és *Myc* expresszióját, és növelte a *Trp53* kifejeződését. A DMBA+imatinib-mezilát kombináció még tovább csökkentette a *Hras*, *Kras* és *Myc* expressziót. A negatív kontrollhoz viszonyítva, szignifikánsan alacsonyabb *Kras* expresszió volt kimutatható a második ($p < 0,05$) és harmadik ($p < 0,05$) kísérleti csoportban. A kombinált kezelés szintén szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a tumorszuppresszor *Trp53* gén kifejeződését, összehasonlítva az első (kontroll) és harmadik (DMBA+imatinib-mezilát) csoportot.

Agy

A negatív kontrollhoz viszonyítva, a DMBA adminisztráció emelkedett proto-onkogén és tumorsuppresszor génexpressziót eredményezett az agyban, bár ezek az eltérések nem bizonyultak szignifikánsnak. A DMBA-val és imatinib-meziláttal folytatott kombinált kezelés csökkentette a vizsgált gének kifejeződését, mindazonáltal ez a változás sem volt szignifikáns.

Vese

A DMBA fokozta a *Hras*, *Kras* és *Myc* proto-onkogének, illetve a *Trp53* tumorsuppresszor gén expresszióját. A szimultán DMBA és TKI kezelés csökkentette a vizsgált gének kifejeződését.

Máj

A DMBA adminisztráció csökkentette a *Hras*, *Kras*, *Myc* és *Trp53* gének kifejeződését. A kombinált DMBA+TKI kezelés hatására a gének expressziójában bekövetkezett csökkenés mérséklődött.

Tüdő

A tüdőben a *Kras* ($p < 0,05$), *Myc* és *Trp53* mRNS szintje emelkedett, míg a *Hras* gén kifejeződése csökkent a DMBA injekció hatására. A DMBA és TKI szimultán adagolása csökkentette a proto-onkogének (*Hras*, *Kras*, *Myc*) expresszióját, és növelte a *Trp53* mRNS szintjét.

Nyirokcsomók

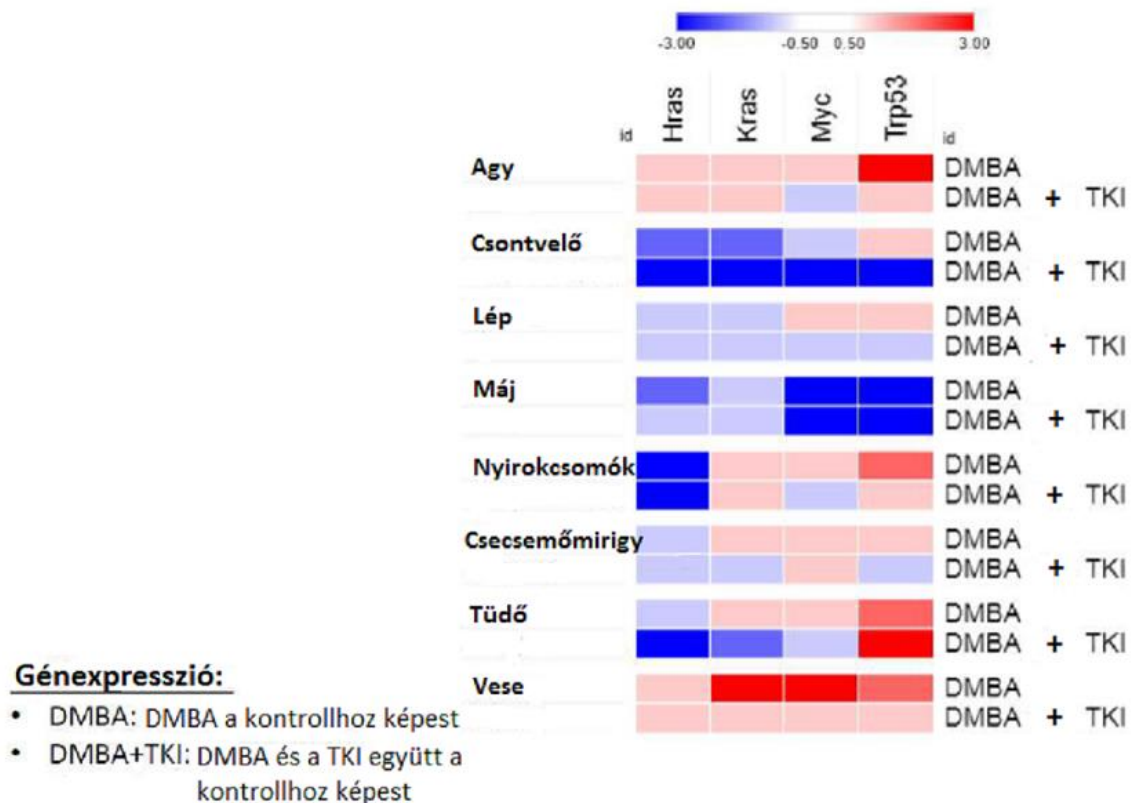
A nyirokcsomókban a DMBA csökkentette a *Hras* kifejeződését, míg a *Kras* és *Trp53* gének expresszióját növelte, amely növekedés változatlanul megmaradt a kombinált DMBA és TKI kezelést követően is. Mindazonáltal a *Myc* expressziója növekedett a DMBA kezelés hatására, de csökkent a DMBA és TKI együttes adásának eredményeképpen. Azonban az mRNS szintjében bekövetkezett változás statisztikailag nem volt szignifikáns.

Lép

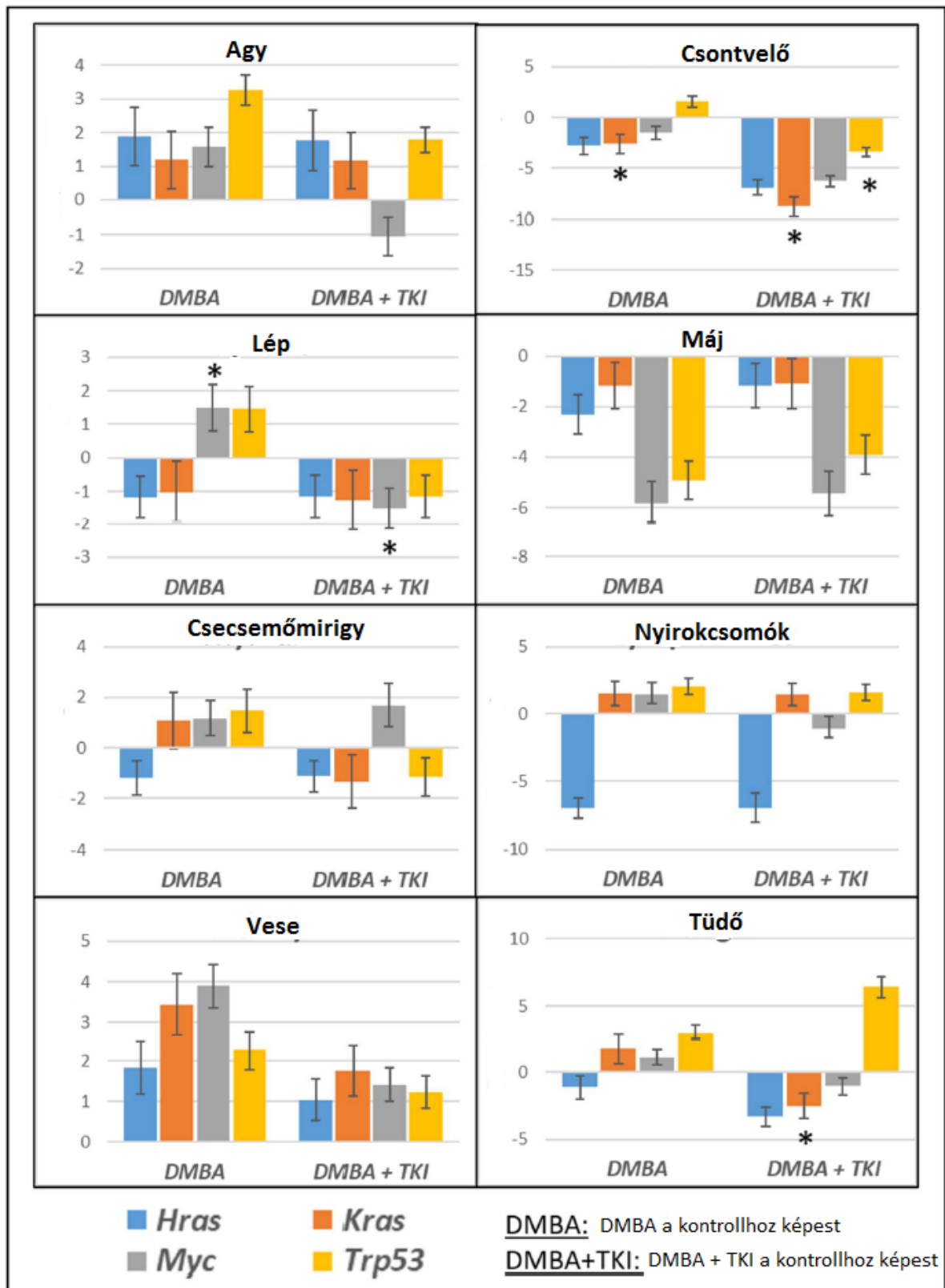
A *Hras* és *Kras* gének kifejeződése csökkent a DMBA injekció hatására, azonban nem változott a kombinált DMBA és TKI adminisztrációt követően. A DMBA injekció növelte a *Myc* expresszióját ($p < 0,05$), a kombinált kezelés (DMBA+TKI) pedig csökkentette a *Trp53* kifejeződését.

Csecsemőmirigy

A csecsemőmirigyben emelkedett a *Kras*, *Myc* és *Trp53* expressziója DMBA hatására, míg a *Hras* kifejeződése csökkent. A kombinált DMBA és imatinib-mezilát adminisztráció következményeként a *Kras* és *Trp53* kifejeződését alacsonyabbnak mértük, mint a negatív kontroll állatok esetében. Ráadásul, a *Myc* expressziója emelkedést mutatott, míg a *Hras* kifejeződése változatlan maradt a kombinált kezelést követően.



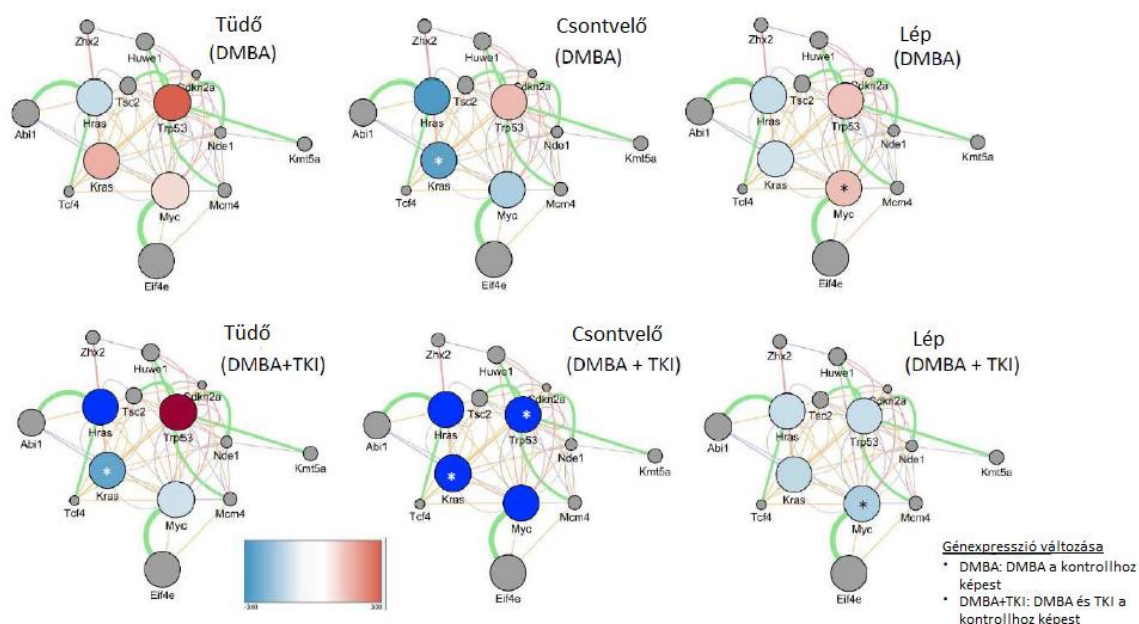
11. ábra: A génexpressziós mintázatok hő térképe a negatív kontrollhoz viszonyítva. A kék területek negatív (expresszió csökkenés) regulációt, míg a piros területek pozitív (expresszió növekedés) regulációt jeleznek.



12. ábra. A különböző kísérleti csoportok génexpressziós mintázata az egyes szerveknek megfelelően. Az y-tengelyen a génexpresszió nagyságrendi változása ábrázolódik. * $p < 0,05$.

5.2.2. Génkapcsolatok

A 13. ábra szemlélteti a vizsgált szervekben bekövetkező génexpresszió változások mennyiségi vonatkozásait, illetve a különböző szabályozó gének lehetséges interakcióit. Szignifikáns eltéréseket figyeltünk meg a csontvelő, a tüdők és a lép génexpressziós mintázatában. A hálózati analízisünk pedig azt mutatja, hogy a *Hras*, *Kras* és *Myc* proto-onkogének, valamint a *Trp53* tumorsuppresszor gén kiterjedt kapcsolati rendszerben áll más szabályozó génekkel. A *Zhx2* (amely RAF-ként is ismert) egy homodimer transzkripciós faktor, amely a cinkujjú és homeobox géncsaládhoz tartozik [122], az *Abi1* (ABL interaktor 1) egy adaptor fehérje, amely számos szignáltranszdukciós útvonalat serkent, szabályozza az aktin polimerizációját és a citoszkeleton átépülését, ezáltal szerepe van a sejtosztódásban [123]. A *Tcf4* (transzkripciós faktor 4) esszenciális a neuronális fejlődéshez [124], a *Tsc2* (TSC komplex alegység 2) gén egy tumorsuppresszor fehérjét kódol (tuberin), melynek mutációi (a *Tsc1* által kódolt hamartin fehérje mutációival együtt) felelősek a sclerosis tuberosa komplex kialakulásáért [125]. A *Huwe1* gén kódolja az E3 ubikvitin ligáz proteint, amely az Mcl1 (mieloid sejtes leukemia szekvencia 1 (Bcl-2 kapcsolt)) anti-apoptotikus fehérje ubikvitinációjáért és degradációjáért felelős [126]. A *Cdkn2a* (ciklindependens kináz inhibitor 2a) egy fontos tumorsuppresszor gén, amelynek legalább 3 alternatív splicing variánsa ismert. Ezen variánsok közül kettő CDK4 inhibitort kódol, egy pedig egy p53 stabilizáló fehérjét, ezáltal a *Cdkn2a* kiemelkedő szerepet játszik a sejtciklus G1 kontrolljában [127]. Az *Nde1* (nudE idegrendszeri fejlődést szabályozó fehérje 1) gén egy olyan fehérjét kódol, melynek fontos szerepe van a mikrotubulus organizációban, mitózisban és neuronális vándorlásban, és melynek mutációja összefüggésbe hozható a lisszenkefáliával [128]. A *Kmt5a* (lizinmetiltranszferáz5a) egy transzkripciós represszor fehérjét kódol, és fontos a sejtosztódáshoz, valamint a kromatin-kondenzációhoz [129]. Az *Mcm4* (minikromoszóma-fenntartó komplex komponens 4) gén egy nagymértékben konzervált fehérjét kódol, és az eukarióta genom replikációjának iniciációjában van szerepe [130]. Az *Eif4e* (eukarióta transzláció iniciációs faktor 4E) proto-onkogénként funkcionál, mivel a terméke elősegíti a transzláció elindulását [131].



13. ábra. Gén-gén interakciós hálózat, mely mutatja a *Hras*, *Kras*, *Myc* és *Trp53* gének expressziójának adott szervben bekövetkező nagyságrendi változását, illetve azok kapcsolatait 10 funkcionális génnel. A kapcsolódó géneket a Cytoscape GeneMania nevű applikációjának segítségével választottuk. Szignifikanciaszint: $p < 0,05$.

6. Megbeszélés

A PhD munkám ideje alatt különböző tirozin-kináz gátló molekulák onko-illetve tumorsuppresszor gén expressziójára gyakorolt hatását vizsgáltam DMBA-indukált egér tumormodellben, kísérleteimet a Pécsi Tudományegyetem Népegészségtani Intézet kutatócsoportjának keretein belül végeztem. A kutatás első fázisában a (1Z)-1-(3,4-dihidroxibenzilidén)-3,4-dihidro[1,4]oxazino[3,4-b]quinazolon-6(1H)-egy (1. vegyület), N-(3-bromofenil)-6,7-dimetoxi quinazolin-4-amin (2. vegyület), 2-benzil-1-(4-hidroxifenil)-3-metil-2,3-dihidroimidazo[5,1-b]quinazolin-9(1H)-egy (3. vegyület) és 2-[(2E)-2-(3,4-dihidroxibenzilidén)hidrazino]-N-(3-nitrofenil)-2-oxoacetamid (4. vegyület) antikarcinogén vegyületek *Hras* és *Trp53* génexpressziójára gyakorolt hatását tanulmányoztuk a DMBA-val kezelt egerek májában, tüdejében, csontvelőjében és veséjében.

Általánosságban elmondható, hogy az alkalmazott molekuláris epidemiológiai kulcsszerepű onko/suppresszor gén teszt rendszer hűen ábrázolta valamennyi vizsgált vegyület biológiai hatását. A DMSO (a DMSO sűrűsége $1,1 \text{ g/cm}^3$), illetve a DMSO-tartalmú oldatok (az itt alkalmazott koncentrációban) – melyeket gyakran használnak különböző sejtkultúra-

kísérletekben – érdemben nem befolyásolják a különböző biológiai funkciókat. Az általunk vizsgált *Hras* onko- és *Trp53* tumorszuppresszor gének, mint a kémia karcinogenezis korai biomarkerei, expresszió fokozódással jelzik a szövetet ért karcinogén ártalmat. Potenciális kemopreventív vegyületek ellensúlyozhatják a karcinogén hatást, csökkentve a biomarkerek kifejeződésének mértékét, a pozitív kontrollhoz hasonlítva. A DMBA – egy pluripotens és teljes karcinogén [132] – növelte a vizsgált gének expresszióját az általunk tanulmányozott szervekben. Egy korábbi kísérletünkben demonstráltuk, hogy a *Hras* és *Trp53* kifejeződése szignifikánsan megemelkedik 24 órával a DMBA-kezelés után, nőstény CBA/Ca (érzékeny H-2k haplotípus) egerek májában, tüdejében és veséjében. A korábbi kísérlet következtetései erősen korrelálnak tanulmányunk első fázisának eredményeivel [133].

Mindazonáltal, a DMBA – a lipofil megoszlásnak [134] és metabolikus aktiváció hiányának [135] köszönhetően – nem gyakorolt jelentős hatást a *Trp53* vesében bekövetkező kifejeződésére. A DMBA leginkább a tüdőre (ahol a CYP1A1 nagy mennyiségben van jelen), a májra (ahol a CYP1A2 nagy mennyiségben van jelen), illetve olyan szövetekre nézve bír jelentős karcinogén hatással, ahol az aktiváló enzimek nagymértékben megtalálhatóak [133, 135, 136]. A tüdőkarinómákban észlelt megnövekedett *Trp53* expresszió [137], valamint az általános kémiai karcinogének által fokozott I. fázisú metabolizáló enzimaktivitás [138] korrelál eredményeinkkel.

Az 1., 2. és 3. vegyület önmagában adva valamennyi kísérleti elrendezésben, valamennyi vizsgált szervben csökkent mértékű expresszió növekedést eredményezett, mint a DMBA-kezelés, ami a vizsgált quinazolin-típusú molekulák lehetséges kemopreventív hatására utal.

A tirozin-kinázok jelentős szerepet töltenek be mind a mitogén-stimulált, mind pedig az onkogén-indukált szignalizációs útvonalakban [6]. Az epidermális növekedési faktor (EGFR) és a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGFR) fontos alkotóelemei ezeknek a celluláris proliferációt serkentő másodlagos jelátviteli útvonalaknak [6], és tirozin-kináz inhibitorokkal gátolhatók [139].

Az 1. és 2. vegyület csökkentette a DMBA által megnövelt *Hras* és *Trp53* expressziót is valamennyi vizsgált szervben, minden kísérleti elrendezésben, a TKI hatásnak köszönhetően. A TKI vegyületek gátló hatása a tirozin-kináz (TK) másodlagos jelátviteli útvonalra legalább 48 óráig érvényesül [140]. Ez a tény alátámasztja az általunk alkalmazott protokollt, a DMBA-kezelés előtt 24 órával, a DMBA-val párhuzamosan, illetve a DMBA után 24 órával adott kísérleti vegyületekkel nyert eredményeket.

Sőt, korábban kimutatták, hogy az 1. vegyület TK gátló hatással ($IC_{50}=70-100\ \mu M$) bír SW-620 humán vastagbél karcinóma sejteken [23]. Liu és munkatársai kimutatták, hogy a PTK

gátlás (genisztein által) 48 órán keresztül mérsékelte mind a bazális, mind a PDGF által stimulált patkány máj csillagsejtek proliferációját a tirozin foszforiláció akadályozásának köszönhetően [140]. A *Hras* gén kifejeződésében bekövetkezett redukció összefügg a Ras extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK) útvonal gátlásával (ami az azonnali-korai génekhez közvetít jelet, mint pl. a *c-fos*, *c-jun*, a különböző transzkripciós faktorok expressziójának növelése, ezáltal a sejtproliferáció serkentése érdekében), emiatt kemopreventív jellegűnek tekinthető [141]. Sőt, Liu és mtsai, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) teszt segítségével kimutatták, hogy a PTK gátlás csökkentette a ciklin D1, egy sejtciklus szabályozó fehérje szintjét [140]. Ez a folyamat csökkentette az ERK útvonal aktivitását, illetve a ciklin D1 indukálhatóságát [142], aminek alacsonyabb mértékű sejtsztódás lett a következménye. Cheng és munkatársai alátámasztották ezeket az eredményeket, kiemelve, hogy az L929 sejtekben az oridonin megállította a sejtciklust a G2M fázisban, illetve apoptózist indukált, mely az ERK-p53 apoptotikus útvonal serkentésén és a PTK-mediált túlélési útvonal gátlásán alapult [143]. Az előbb említett irodalmi adatok korrelálnak a kísérleti TKI vegyületek által a májban – valamennyi kísérleti elrendezésben – okozott *Hras* onkogén expresszió redukálásával [6, 140, 142, 143]. Szintén igaz ez a korreláció a *Trp53* szuppresszor gén expressziójával kapcsolatban is.

Hasonló a helyzet a 3. és 4. vegyület esetében is, annyi különbséggel, hogy a vesékben csak a *Hras* kifejeződését tudták mérsékelten csökkenteni. Ez magyarázható részben a lipofil ágensek vesében történő felszaporodásával, részben pedig a *Trp53* malignus betegségekben megfigyelhető túlzott mértékű expressziójával: a *Trp53* korai túlexpresszáció részben a *Hras* (és a *c-Myc*) – karcinogén ártalmak miatti – túlzott kifejeződésének a következménye [144]. A *Trp53* fokozott mértékű megjelenése kulcsszereppel bír az EGFR TK útvonal elindításában, aminek eredményeként csökken a sejtciklus intenzitása a G0G1 fázisban történő megállás és apoptózis indukció következtében. Ennek hatalmas klinikai jelentősége van, pl. nem-kissejtes tüdőkarinómában (NSCLC) szenvedő betegekben [145].

A 4. vegyülettel kezelt csoport állatainak veséiben – a 3. és a 6. részben egyaránt – emelkedett *Trp53* mRNS szintet detektáltunk. Ez az eredmény különbözik attól, amit korábbi *in vitro* vizsgálatok alapján vártunk [23-25]. Mivel az 1., 2. és 3. vegyület által kialakított génexpressziós mintázat megerősíti ezeket az *in vitro* kísérleteket, további vizsgálatok szükségesek a 4. vegyület vesére kifejtett hatását illetően. A p53 Janus-arcú tulajdonságú, egyszerre van pro-apoptotikus hatása, és képes transzaktiválni olyan géneket, melyeknek a terméke anti-apoptotikus fehérjeként funkcionál [146]. A vizsgálati rendszerünk képes más

apoptotikus útvonalak jelzésére is, annak érdekében, hogy a 4. vegyület *Trp53* expressziót emelő hatása mögötti eseményeket is meghatározhassuk, így a jövőben más apoptotikus géneket is igyekszünk vizsgálni. A receptor tirozin-kináz útvonalak, mint pl. az EGFR, magas aktivitása számos malignus betegség (mint pl. a magas grádusú glióma vagy a hemangioblasztóma) kifejlődésében szerepet játszik [147]. Sőt, Chang és munkatársai kimutatták, hogy a primer tüdődaganatokban szenvedő betegekben (akikben nyirokcsomó áttéteket is diagnosztizálnak) a p53 és EGFR mutációk gyakran megelőzik a nyirokcsomó áttétek kialakulását (az EGFR expresszió heterogenitása terápiás aspektusban tekintendő) [148]. Ezáltal az EGFR komplex biológiai természete potenciális lehetőséget teremt az EGFR inhibitorok terápiás alkalmazására a rákkezelés számos területén, úgymint proliferatív, agiogén, invazív vagy metasztatikus aspektusban [16]. Például az alkaloid típusú staurosporin potens inhibitora a protein-kináz C (PKC)-nek és a különböző PDGFR fehérjéknek. Azok a molekulák, melyek növekedési-faktor szignalizációs útvonalakat mérsékelnek, a PKC, a foszfinozítid specifikus foszfolipáz C és inozitol(1,4,5) trifoszfát-indukált Ca^{2+} -kiáramlás gátlásán keresztül [149], azok *in vivo* antitumoros hatással rendelkeznek, és a kemopreventív vegyületek jótékony egészségügyi hatását erősítik. Az említett szignalizációs útvonalak gátlása magyarázhatja a kísérleti vegyületeink hatását, és jelentős összhangban áll az *in vivo* kísérleteink eredményeivel. Az *in vivo* modellen végzett előző kísérletünk során azt a megállapítást tettük, hogy a vizsgált vegyület génexpressziót csökkentő hatása függ az adminisztrációs protokolltól is [117]. Egy kemopreventív hatóanyag több ponton is interakcióba léphet a többlépcsős karcinogenezis folyamatával [150], például módosíthatja a membrán transzportot, a metabolizmust, reaktív szabadgyököket semlegesíthet, gátolhatja a sejtosztódást, védheti a DNS szerkezeti integritását, befolyásolhatja a DNS metabolizmust és javítást, valamint kontrollálhatja a gén expressziót [151]. Ezek alapján példaként említhető, hogy egy olyan vegyület, amely a karcinogén szervezeten belüli aktiválódását gátolja, több eredménnyel jár, ha a karcinogén ágens előtt kerül be a szervezetbe. Ezzel ellentétben egy olyan hatóanyag, ami a metabolizmust befolyásolja, később kezd el dolgozni [152]. Annak érdekében, hogy meghatározzuk, hogy a vizsgált vegyületeknek a tirozin-kináz gátláson kívül van-e más hatása, illetve, hogy a DMBA karcinogenezisre kifejtett hatásuk függ-e az adminisztráció idejétől, három kísérleti elrendezést alakítottunk ki a DMBA és a vizsgált vegyületek adagolási sorrendjének alapján. A kísérletünk eredményei talán hozzájárulhatnak ezen vegyületek kemopreventív hatásának jövőbeli feltérképezéséhez.

A génexpresszió protein szintézisre gyakorolt befolyása microRNS-ek általi modifikáción keresztül valósul meg. A miRNS-ek 21-24 nukleotid (nt) hosszúságú, endogén, nem-kódoló

RNS molekulák, amelyek a multicelluláris eukarióta organizmusokban a génexpresszió poszt-transzkripció szabályozásában játszanak szerepet. Bizonyos miRNS-ek képesek transzkripció faktorokat szabályozni, mint pl. a máj eredetű nukleáris faktort (HNF) [204]. Kutatócsoportunk számos miRNS kísérlettel foglalkozott már korábban, és azt állapítottuk meg, hogy a miR-21 – összhangban az irodalommal [153] – hatással van a *Trp53* és más anti-apoptotikus gén kifejeződésére. Jelen tanulmányunk vizsgálatait tervezzük a későbbiekben kiterjeszteni a miRNS mérések szintjére.

Kutatásunk második fázisában pedig egy már ismert és a klinikai gyakorlatban széleskörűen alkalmazott hatóanyag, az imatinib-mezilát esetleges kemopreventív hatását vizsgáltuk. Az imatinib-mezilát egy kismolekulájú tirozin-kináz inhibitor, melyet a CML és gasztrointesztinális stromális tumor (GIST) kezelésében használnak [84, 154]. A mi kutatásunk az elsők közé tartozik, melyek az imatinib lehetséges kemopreventív hatását igyekeztek felderíteni. Ebben a rövidtávú kísérletben a DMBA által okozott génexpressziós változásokat vizsgáltuk a kísérleti állatok különböző szerveiben. Sőt, bioinformatikai analízis segítségével igyekeztünk meghatározni a különböző proto-onkogének (*Hras*, *Kras*, *Myc*), a tumorsuppresszor, *Trp53* gén, valamint 10, funkcionálisan korreláló gén közötti kapcsolatokat is. Eredményeink azt sugallják, hogy az imatinib-mezilát rendelkezhet javító szereppel a CML és GIST-en kívül egyéb betegségek tekintetében is.

A kísérletünk legfontosabb eredményei közé tartozik, hogy a rövid távú DMBA kezelés i) növelte mindhárom proto-onkogén (*Hras*, *Kras*, *Myc*) expresszióját az agyban és a vesében; ii) növelte a *Kras* és *Myc* szintjét a tüdőben, nyirokcsomókban és a csecsemőmirigyben; iii) fokozta a *Trp53* tumorsuppresszor gén kifejeződését, amely egy kémiai karcinogénnel szemben tett adaptív fiziológiás ellenlépésnek tekinthető. Ezek a jelenségek összhangban állnak azon tanulmányok eredményeivel, melyek a DMBA-t potens kémiai karcinogénnek, ezáltal hatékony malignus tumort indukáló szernek tekintik. A DMBA egy poliaromás hidrokarbon vegyület, mely pontmutációkat okoz olyan proto-onkogéneknél, mint a *Hras* [105]. Kísérletünkben azt figyeltük meg, hogy a DMBA csökkentette a *Hras*, *Kras* és *Myc* expresszióját a májban és a csontvelőben. Ez a megfigyelés azzal lehet magyarázható, hogy a DMBA egy karcinogenezist indukáló vegyület, melyet rendszerint egy karcinogenezist promotáló vegyülettel pl. 12-O-tetradekanoilforból 13 acetáttal (TPA) szimultán alkalmaznak [155]. Ebből következően előfordulhat, hogy a máj és a csontvelő esetében a DMBA önmagában nem elég a tumorigenezishez. A lépben az emelkedett *Myc* szint volt az egyetlen prominens és szignifikáns génexpressziós változás. Számos tanulmány számolt már be a *Myc*

tumorfejlődésben betöltött szerepéről. Talán a legismertebb összefüggés az, hogy majdnem minden Burkitt limfóma sejtvonal hordoz mutációt, ezáltal a *Myc* túlzott expressziója jellemző rájuk, együttesen valamely immunoglobulin nehéz vagy könnyű lánc szabályozó egységének vagy más, nem véletlenszerű szomatikus mutációval [156, 157]. Ezek a tények jól korrelálnak a mi eredményeinkkel, nevezetesen, hogy a DMBA kezelés fokozta a *Myc* kifejeződését a lépben és a nyirokcsomókban.

A *Hras*, *Kras*, *Myc* és *Trp53* túlzott mértékű expressziója nagyobb jelentőséggel bír, tekintve, hogy kiterjedt génhálózattal rendelkeznek, a gén-gén interakciók pedig kiemelt jelentőségűek a daganat-evolúció szempontjából [205]. A *Zhx2*-t (más néven RAF) korábban összefüggésbe hozták a Hodgkin limfómával [158] és a hepatocelluláris karcinómával [159]; az *Abi1*-nek (Abl interaktor 1) szerepe van a rosszindulatú daganatok fejlődésében és inváziójában [160], csakúgy, mint a neuroblasztómák propagációjában [161]. A *Tcf4* (transzkripciós faktor 4) aberráns működését kimutatták glioblasztómákban [162] és kolorektális daganatokban [163]. A *Tsc2* gén (TSC komplex 2. alegység) egy tumorszuppresszor fehérjét kódol (tuberin), amelynek mutációját összefüggésbe hozták már agydaganatokkal, valamint tüdő, vese, bőr, szív, méh és szem eredetű tumorokkal [164, 165]. A *Huwei1* egy E3 ubikvitin ligáz fehérjét kódol, amely szükséges a kolorektális karcinóma és ováriumtumorok fejlődéséhez [166, 167]. A *Cdkn2* (ciklin dependens kináz inhibitor 2a) egy fontos tumorszuppresszor gén, melynek mutációja számos daganatos elváltozásra hajlamosít, mint pl. uroteliális karcinóma, örökletes melanóma, hasnyálmirigy-daganat vagy nem-kissejtes tüdő karcinóma [168-170]. Az *Nde1* (nudE neuron fejlődéshez szükséges fehérje 1) egy olyan proteint kódol, mely esszenciális a mikrotubulus-organizációhoz és a mitózishoz, illetve korábbi tanulmányok rávilágítottak az akut és krónikus leukémiák fejlődésében betöltött szerepére [171, 172]. Az *Mcm4* (mikrokromoszóma fenntartó komplex komponens 4) upregulációját írták le ovárium-, bőr- és nyelőcső daganatokban [173-175]. Az *Eif4e* (eukarióta transzláció iniciációs faktor 4) proto-onkogénként funkcionál, mivel a fehérje termékéről az a feltételezés terjedt el, hogy olyan proteinek expresszióját szabályozza, melyek elengedhetetlenek a sejtciklus-progresszióhoz, sejt-túléléshez és motilitáshoz. Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy ez a transzlációs faktor irányítja a sejt-transzformációt, tumorigenezist vagy tumor progressziót a prosztata-karcinómákban, limfómákban, krónikus mieloid leukémiában (CML), illetve tüdő-daganatokban [176].

Mint az a tanulmányunkban szemléltetett proto-onkogének és tumorszuppresszor gének között fennálló gén-gén interakciós hálózattól látható, a rosszindulatú daganatok fejlődése több transzformációs lépésből áll, és számos onkogén, valamint tumorszuppresszor gén

interakciójának függvénye. Ez a hálózat és események sorozata számos lehetőséget kínál, hogy hatékonyan tudjuk befolyásolni a tumorgenezis folyamatát.

A tüdőben a proto-onkogének (*Hras*, *Kras*, *Myc*) kifejeződése és kapcsolataik más, transzkripciós faktort vagy sejtosztódást szabályozó fehérjét kódoló génekkel (*Tcf4*, *Abi1* és *Zhx2*) látványosan csökkent a kombinált DMBA+TKI kezelés hatására, míg a *Trp53* expressziója növekedett. A negatív kontrollhoz viszonyítva a *Kras* expressziójában bekövetkezett csökkenés szignifikáns volt. A csontvelőben a DMBA+TKI kombinált terápia szignifikánsan csökkentette a *Kras* proto-onkogén és *Trp53* tumorsuppresszor gén kifejeződését és kapcsolatait. A DMBA+TKI kezelés szignifikánsan tudta csökkenteni a DMBA által indukált *Myc* proto-onkogén emelkedett expresszióját és génkapcsolatait. A *Trp53* tumorsuppresszor gén kifejeződése szintén csökkent a kombinált kezelést követően, habár ez a csökkenés nem bizonyult szignifikánsnak.

A rövidtávú kísérletünk eredményei azt sugallják, hogy a protein-tirozin-kináz gátló (imatinib-mezilát) kezelés - a DMBA kémiai karcinogénnel szimultán adagolva - befolyásolhatja a vizsgált proto-onkogének és tumorsuppresszor gén kifejeződési mintázatát, ezáltal az ezen gének által irányított tumorgenezist is.

Az imatinib-mezilát egy jól ismert kis molekulájú tirozin-kináz inhibitor. Kutatásunkban ez a hatóanyag képes volt szignifikánsan csökkenteni a *Kras* onkogén expresszióját a csontvelőben és a tüdőben, csakúgy, mint a *Myc* onkogén kifejeződését a lépben. Ezekon kívül a *Myc* mRNS szintje alacsonyabbnak mutatkozott a csontvelőben, az agyban, a vesékben, a tüdőkben és a nyirokcsomókban. A *Hras* mRNS-el kapcsolatban hasonló eredményeket kaptunk, miszerint csökkent a mennyisége a csontvelőben, vesékben és a tüdőkben, habár ezek az eltérések statisztikailag nem voltak szignifikánsak. Ezen onkogének csökkent expressziója valószínűsíthetően az imatinib-mezilát tirozin-kináz gátló hatásának tulajdonítható, mint azt már a közelmúltban megjelent tanulmányok igazolták. Többek között, Lorri Puil és munkatársai publikálták, hogy a BCR-ABL mutáció képes aktiválni a Ras szignalizációs útvonalat CML-ben úgy, hogy direkt kapcsolatot létesít a Grb2 és mSos1 között, melyek felelősek az inaktív, GDP-kötött Ras géncsalád, GTP-kötött aktív formává való átalakításáért. Ezáltal, a BCR-ABL kináz aktivitásának gátlása csökkentheti a RAS szignalizáció intenzitását CML-ben [177]. A Ras jelátvitel mellett a BCR-ABL indirekt módon képes aktiválni a *Myc*-t vagy a Janus-aktivált kináz 2 (JAK2) [178], vagy a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) [179] útvonalon keresztül. Ezen információk birtokában azt feltételezhetjük, hogy az imatinib csökkentette a *Myc* expresszióját még a DMBA-indukált fokozott mértékű kifejeződés előtt. Callahan R. és munkatársai felfedték, hogy az imatinib-

mezilát képes volt emlő-tumork teljes regresszióját indukálni, illetve visszaállítani a lobuloalveoláris fejlődést és laktációt a *Notch4* és *Myc* szignalizáció gátlásán keresztül, mely eredmény szintén alátámasztja az imatinib-mezilát terápiás célú alkalmazását a CML és GIST-től eltérő betegségekben is [180].

A PDGF izoformákat és receptoraikat (PDGFR-k) a növekedési faktorok és receptor-tirozin-kinázok prototípusainak tekintik több, mint 25 éve. Ezek elengedhetetlenek a normális gasztrulációhoz, illetve kraniális, neuronális, kardiális, pulmonális, gasztrointesztinális, gonadális, hematológiai, bőr-, vese- és vázrendszeri fejlődéshez, csakúgy, mint a vérképzéshez. Ezen hatásait olyan másodlagos jelátviteli útvonalak befolyásolásán keresztül éri el, mint a Ras aktiválása, valamint a lefelé irányuló Raf és MAPK kaszkádrendszer [181]. Mindazonáltal, a PDGFR génjének túlzott mértékű expressziója vagy annak mutációja tumor kialakuláshoz és fejlődéshez vezethet [182]. A közelmúltban megjelent tanulmányok rávilágítottak, hogy mekkora szerepe van a PDGF receptoroknak a különböző idegrendszeri daganatok fejlődésében, mint pl.: a glioblasztóma [183], ependimóma [184], meningeóma [185] és a schwannóma (melyben a PDGFR mutáció általában a c-kit túlzott mértékű aktivációjával párosul [186]) tekintetében. Az agydaganatokon kívül a mutáns PDGFR-k jelentőségét számtalan egyéb malignus betegség esetében hangsúlyozták, így pl. a dermatofibroszarkóma protuberansz [187], a gasztrointesztinális strómális tumor (GIST) [83], az oszteoszarkóma [188], az alveoláris rabdomioszarkóma [189], a krónikus mieloid leukémia (CML) [190], a prosztata karcinóma [191], a májdaganatok [192], a nem-kissejtes tüdőkarcinóma [193], a kolorektális karcinóma [194] és a mellrák [195] esetében. Számos kísérlet történt már a PDGFR-k aktivitásának korlátozására, mint a tirozin-kináz inhibitorok (pl. imatinib és szorafenib) vagy bizonyos antitestek, melyek célpontjai a különböző PDGF izoformák vagy maguk a receptork. Általánosságban elmondható, hogy az antitestek sokkal specifikusabb terápiás molekulák, mindazonáltal adminisztrációjuk drága és sokszor kényelmetlen. A tirozin-kináz gátlók nem annyira specifikusak, több kináz gátlására is képesek - ennek következtében több mellékhatásuk is van -, mint pl. az imatinib, amely képes gátolni a PDGFR-kat, az ABL kinázokat és az összejt receptor c-KIT-et. Mindazonáltal a tumorterápiában előnyösebb lehet, ha a tumorgenezis több komponensét is gátoljuk [182].

A *Kras*, *Hras* és *Myc* több különböző onkogén-útvonalnak is a végrehajtói, és kedvező lenne, ha egy molekulával a tumorgenezisnek egy későbbi, közös pontját tudnánk gátolni. A p53 a legismertebb tumorszuppresszor fehérje, mivel képes sejtciklus leállást vagy sejthalált indukálni, amennyiben hipoxiás körülményeket vagy helyrehozhatatlan genetikai mutációkat észlel, ugyanakkor a *Trp53* gén mutációi a humán daganatok több, mint felével összefüggésbe

hozható [196]. Egyre nő azon bizonyítékok száma, melyek szerint ezek a mutációk ún. "funkcióvesztő" mutációk, mindazonáltal a megváltozott értelmű, ún. "misszensz" mutációk (nem megfelelő bázispár beépülése a DNS-be) olyan párhuzamos "funkciónyerés"-hez vezethet, mely általában káros hatással bír a sejtre nézve [197]. Számos tanulmány bizonyította, hogy a mutáns p53-nak kulcsszerepe van a tumorfejlődésben, progresszióban és invázióban, mint pl. a mellrák [198], tüdőrák [199], kolorektális daganat [200], különböző agydaganatok, illetve gasztrikus adenokarcinóma [201] esetében. Jelen tanulmányunkban a rövid távú imatinib-mezilát kezelés - szimultán alkalmazva a DMBA-val - szembetűnően fokozta a *Trp53* expresszióját a tüdőben, míg csökkentette azt más szervekben. Ezek az eredmények a p53 tumorsuppresszor fehérje génjében bekövetkező "funkciónyerő" mutációt valószínűsítene, melyet az imatinib-mezilát igyekezett korrigálni az aberráns fehérje szintjének csökkentésével.

A mostani és korábbi eredményeink alapján az a véleményünk, hogy az imatinib-mezilát egy ígéretes kemoterápiás molekula különböző malignus daganatok kezelésére és megelőzésére egyaránt azáltal, hogy csökkenti a proto-onkogének és a mutáns tumorsuppresszor *Trp53* gén expresszióját.

7. Összefoglalás

Kutatásunk célja különböző (preklinikai fázisban, illetve már klinikai alkalmazásban lévő) TKI-k proto-okogének (*Hras*, *Kras*, *Myc*), illetve egy tumorszuppresszor gén (*Trp53*) expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata volt, DMBA-indukált egér tumormodellben. Kísérleteinkkel a vegyületek lehetséges kemopreventív hatásait is szeretnénk volna felderíteni. Kutatásunk első fázisának „rövid-távú” *in vivo* kísérletének eredményei bizonyítékkul szolgálhatnak a négy vizsgált vegyület - (1Z)-1-(3,4-dihidroxibenzilidén)-3,4-dihidro[1,4]oxazino[3,4-b]quinazolon-6(1H)-egy (1. vegyület), N-(3-bromofenil)-6,7-dimetoxi quinazolin-4-amin (2. vegyület), 2-benzil-1-(4-hidroxifenil)-3-metil-2,3-dihidroimidazo[5,1-b]quinazolin-9(1H)-egy (3. vegyület) és 2-[(2E)-2-(3,4-dihidroxibenzilidén)hidrazino]-N-(3-nitrofenil)-2-oxoacetamid (4. vegyület) feltételezett antineoplasztikus és kemopreventív hatását illetően. Az ebben a vizsgálatban alkalmazott molekuláris epidemiológiai biomarker modell bemutatja a malignus transzformáció első sejtszintű lépéseit, csakúgy, mint a lehetséges antitumoros beavatkozásokat. A megállapításaink arra utalnak, hogy az 1., 2. és 3. vegyület preventív jelleggel bír a DMBA-indukált karcinogenezis korai lépéseivel szemben. A 4. vegyület esetében ígéretes eredmények mutatkoztak a májjal, tüdővel és csontvelővel kapcsolatban, de a vesét illetően csak a *Hras* expresszió támasztja alá az *in vivo* eredményeket, így további kutatások szükségesek.

Kutatásunk második fázisában pedig arra derítettünk fényt, hogy az imatinib-mezilát csökkentheti a *Hras*, *Kras*, *Myc* és *Trp53* gének kifejeződését bizonyos szervekben, 24 órával az egyszeri TKI dózis beadását követően, DMBA-indukált egér tumormodellben. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az imatinibnek lehet preventív és kuratív szerepe is a malignus daganatok esetében.

Összegzésképpen elmondható, hogy a tirozin-kináz gátló vegyületeknek nem csupán a már kialakult daganatos betegségek esetében lehet terápiás hatása, hanem a nagyfokú karcinogén ártalomnak kitett szervezet esetében kemopreventív jelleggel is bírhatnak. Ezen tulajdonság megerősítésére számos további *in vitro* és *in vivo* kísérlet szükséges, melyek segíthetik a daganatmegelőző hatással bíró gyógyszerek fejlesztését.

Summary

The aim of our research was to examine the effects of several (preclinically tested and clinically used) protein tyrosine kinase inhibitors on the expression of proto-oncogenes (*Hras*, *Kras*, *Myc*) and tumor suppressor gene (*Trp53*) in a DMBA-induced mouse tumour model. In addition, we wanted to assess the possible chemopreventive effects of these drugs in the same tumour model to help drug- or nutraceutical food development.

The results of the first phase experiments prove that the four examined compounds - (1Z)-1-(3,4-dihydroxybenzilidene)-3,4-dihydro[1,4]oxazino[3,4-b]quinazolin-6(1H)-one (1st compound), N-(3-bromophenyl)-6,7-dimethoxy quinazolin-4-amine (2nd compound), 2-benzyl-1-(4-hydroxyphenyl)-3-methyl-2,3-dihydroimidazo[5,1-b]quinazolin-9(1H)-one (3rd compound) and 2-[(2E)-2-(3,4-dihydroxybenzilidene)hydrazino]-N-(3-nitrophenyl)-2-oxoacetamide (4th compound) have possible antineoplastic and chemopreventive effects. The molecular biological marker applied in this study shows the first cellular steps of malignant transformation, as well as the possible antitumor interventions. Our results suggest that compound 1, 2 and 3 have preventive effects against the early steps of DMBA-induced carcinogenesis. In connection with compound 4, we gained promising results from the liver, lungs and bone marrow, however, in the kidneys, only *Hras* expression supported the *in vivo* results, therefore further work is needed.

In the second phase of our study we revealed that imatinib mesylate was able to decrease the expression of *Hras*, *Kras*, *Myc* and *Trp53* genes in certain organs, 24 hours after TKI administration in the DMBA-induced mouse tumour model. These results suggest that imatinib might have both preventive and curative role in malignant hematologic and solid tumours.

In conclusion we can state, that tyrosine kinase inhibitors can have not only therapeutic potential in the treatment of malignant diseases, but also chemopreventive effects in the case of high carcinogenic exposure. To confirm this hypothesis further studies are needed.

8. Irodalomjegyzék

1. Roskoski, R., Jr., *A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors*. Pharmacol Res, 2015. **100**: p. 1-23.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Tsai, C.J. and R. Nussinov, *The molecular basis of targeting protein kinases in cancer therapeutics*. Semin Cancer Biol, 2013. **23**(4): p. 235-42.
4. Kumar, C.C. and V. Madison, *Drugs targeted against protein kinases*. Expert Opin Emerg Drugs, 2001. **6**(2): p. 303-15.
5. Cohen, P., *Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century?* Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(4): p. 309-15.
6. Kanner, S.B., A.B. Reynolds, and J.T. Parsons, *Tyrosine phosphorylation of a 120-kilodalton pp60src substrate upon epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptor stimulation and in polyomavirus middle-T-antigen-transformed cells*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(2): p. 713-20.
7. Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1912-34.
8. Volinsky, N. and B.N. Kholodenko, *Complexity of receptor tyrosine kinase signal processing*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(8): p. a009043.
9. Krause, D.S. and R.A. Van Etten, *Tyrosine kinases as targets for cancer therapy*. N Engl J Med, 2005. **353**(2): p. 172-87.
10. Taniuchi, K., et al., *Immunohistochemical analysis of platelet-derived growth factor and its receptors in fibrohistiocytic tumors*. J Cutan Pathol, 1997. **24**(7): p. 393-7.
11. Krishnamurti, U. and J.F. Silverman, *HER2 in breast cancer: a review and update*. Adv Anat Pathol, 2014. **21**(2): p. 100-7.
12. Lagunas-Rangel, F.A. and V. Chavez-Valencia, *FLT3-ITD and its current role in acute myeloid leukaemia*. Med Oncol, 2017. **34**(6): p. 114.
13. Pao, W., et al., *EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13306-11.
14. Murnyak, B., et. al., *[Occurrence and molecular pathology of high grade gliomas]*. Ideggyogy Sz, 2013. **66**(9-10): p. 312-21.
15. Smith, K.M., R. Yacobi, and R.A. Van Etten, *Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain*. Mol Cell, 2003. **12**(1): p. 27-37.
16. Woodburn, J.R., *The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy*. Pharmacol Ther, 1999. **82**(2-3): p. 241-50.

17. Hollosy, F. and G. Keri, *Plant-derived protein tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2004. **4**(2): p. 173-97.
18. Gyongyi, Z. and G. Somlyai, *Deuterium depletion can decrease the expression of C-myc Ha-ras and p53 gene in carcinogen-treated mice*. In Vivo, 2000. **14**(3): p. 437-9.
19. Ward, J.M., et al., *Differential carcinogenic effects of intraperitoneal initiation with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene or urethane and topical promotion with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in skin and internal tissues of female SENCAR and BALB/c mice*. Environ Health Perspect, 1986. **68**: p. 61-8.
20. Sugiyama, T., et al., *7,12-DMBA-induced rat leukemia: a review with insights into future research*. Leuk Res, 2002. **26**(12): p. 1053-68.
21. Perjesi, P., Z. Gyongyi, and Z. Bayer, *Effect of E-2-(4'-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone on the 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene-induced onco/suppressor gene action in vivo II: A 48-hour experiment*. Anticancer Res, 2000. **20**(3A): p. 1839-48.
22. Ember, I., et al., *Oncogene and suppressor gene expression as a biomarker for ethylene oxide exposure*. Cancer Detect Prev, 1998. **22**(3): p. 241-5.
23. Orfi, L., et al., *Heterocondensed quinazolones: synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activity of 3,4-dihydro-1H,6H-[1,4] oxazino-[3,4-b]quinazolin-6-one derivatives*. Bioorg Med Chem, 1996. **4**(4): p. 547-51.
24. Orfi, L., et al., *Improved, high yield synthesis of 3H-quinazolin-4-ones, the key intermediates of recently developed drugs*. Curr Med Chem, 2004. **11**(19): p. 2549-53.
25. Strawn, L.M., et al., *Flk-1 as a target for tumor growth inhibition*. Cancer Res, 1996. **56**(15): p. 3540-5.
26. Kadivar, A., et al., *Formulation and in vitro, in vivo evaluation of effervescent floating sustained-release imatinib mesylate tablet*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0126874.
27. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
28. Csete, M. and J. Doyle, *Bow ties, metabolism and disease*. Trends Biotechnol, 2004. **22**(9): p. 446-50.
29. Forbes, S.A., et al., *COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D945-50.
30. Malumbres, M. and M. Barbacid, *RAS oncogenes: the first 30 years*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 459-65.
31. Cox, A.D., et al., *Drugging the undruggable RAS: Mission possible?* Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(11): p. 828-51.
32. Eilers, M., et al., *Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells*. Nature, 1989. **340**(6228): p. 66-8.
33. Beckman, R.A. and L.A. Loeb, *Genetic instability in cancer: theory and experiment*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(6): p. 423-35.

34. Nesbit, C.E., J.M. Tersak, and E.V. Prochownik, *MYC oncogenes and human neoplastic disease*. Oncogene, 1999. **18**(19): p. 3004-16.
35. Kuzyk, A. and S. Mai, *c-MYC-induced genomic instability*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014. **4**(4): p. a014373.
36. Kandoth, C., et al., *Mutational landscape and significance across 12 major cancer types*. Nature, 2013. **502**(7471): p. 333-339.
37. Leroy, B., et al., *The TP53 website: an integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D962-9.
38. Murnyak, B. and T. Hortobagyi, *Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutations in cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(40): p. 64910-64920.
39. Muller, P.A. and K.H. Vousden, *Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities*. Cancer Cell, 2014. **25**(3): p. 304-17.
40. Adorno, M., et al., *A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis*. Cell, 2009. **137**(1): p. 87-98.
41. Gaiddon, C., et al., *A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(5): p. 1874-87.
42. Song, H., M. Hollstein, and Y. Xu, *p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(5): p. 573-80.
43. Lin, C., et al., *R280T mutation of p53 gene promotes proliferation of human glioma cells through GSK-3beta/PTEN pathway*. Neurosci Lett, 2012. **529**(1): p. 60-5.
44. Weinstein, I.B., *Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis*. Carcinogenesis, 2000. **21**(5): p. 857-64.
45. Zhang, J., P.L. Yang, and N.S. Gray, *Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(1): p. 28-39.
46. Huse, M. and J. Kuriyan, *The conformational plasticity of protein kinases*. Cell, 2002. **109**(3): p. 275-82.
47. Nolen, B., S. Taylor, and G. Ghosh, *Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation*. Mol Cell, 2004. **15**(5): p. 661-75.
48. Keskin, O., et al., *Protein-protein interactions: organization, cooperativity and mapping in a bottom-up Systems Biology approach*. Phys Biol, 2005. **2**(2): p. S24-35.
49. Taylor, S.S. and A.P. Kornev, *Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(2): p. 65-77.
50. Deindl, S., et al., *Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70*. Cell, 2007. **129**(4): p. 735-46.
51. Lietha, D., et al., *Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase*. Cell, 2007. **129**(6): p. 1177-87.

52. Chen, W., et al., *Acute myeloid leukaemia with FLT3 gene mutations of both internal tandem duplication and point mutation type*. Br J Haematol, 2005. **130**(5): p. 726-8.
53. Lynch, T.J., et al., *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2004. **350**(21): p. 2129-39.
54. Liu, W., et al., *ERBB2 Overexpression Establishes ERBB3-Dependent Hypersensitivity of Breast Cancer Cells to Withaferin A*. Mol Cancer Ther, 2016. **15**(11): p. 2750-2757.
55. Wang, Y., et al., *The platelet-derived growth factors (PDGFs) and their receptors (PDGFRs) are major players in oncogenesis, drug resistance, and attractive oncologic targets in cancer*. Growth Factors, 2016. **34**(1-2): p. 64-71.
56. Watanabe, D., et al., *Suppressor of cytokine signalling-1 gene silencing in acute myeloid leukaemia and human haematopoietic cell lines*. Br J Haematol, 2004. **126**(5): p. 726-35.
57. Sharma, S.V. and J. Settleman, *Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy*. Genes Dev, 2007. **21**(24): p. 3214-31.
58. Hojjat-Farsangi, M., *Small-molecule inhibitors of the receptor tyrosine kinases: promising tools for targeted cancer therapies*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(8): p. 13768-801.
59. Daneshmanesh, A.H., et al., *Ror1, a cell surface receptor tyrosine kinase is expressed in chronic lymphocytic leukemia and may serve as a putative target for therapy*. Int J Cancer, 2008. **123**(5): p. 1190-5.
60. Zhang, S., et al., *ROR1 is expressed in human breast cancer and associated with enhanced tumor-cell growth*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e31127.
61. Zwick, E., J. Bange, and A. Ullrich, *Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(3): p. 161-73.
62. Hubbard, S.R. and W.T. Miller, *Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(2): p. 117-23.
63. Robertson, S.C., J.A. Tynan, and D.J. Donoghue, *RTK mutations and human syndromes when good receptors turn bad*. Trends Genet, 2000. **16**(6): p. 265-71.
64. Sessel, S. and A. Fernandez, *Selectivity filters to edit out deleterious side effects in kinase inhibitors*. Curr Top Med Chem, 2011. **11**(7): p. 788-99.
65. Johnson, L.N., *Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds*. Q Rev Biophys, 2009. **42**(1): p. 1-40.
66. Canonici, A., et al., *HER-targeted tyrosine kinase inhibitors enhance response to trastuzumab and pertuzumab in HER2-positive breast cancer*. Invest New Drugs, 2018.
67. Garuti, L., M. Roberti, and G. Bottegoni, *Non-ATP competitive protein kinase inhibitors*. Curr Med Chem, 2010. **17**(25): p. 2804-21.

68. O'Brien, S.G., et al., *Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2003. **348**(11): p. 994-1004.
69. Magnusson, M.K., et al., *Activity of STI571 in chronic myelomonocytic leukemia with a platelet-derived growth factor beta receptor fusion oncogene*. Blood, 2002. **100**(3): p. 1088-91.
70. Kindler, T., et al., *Efficacy and safety of imatinib in adult patients with c-kit-positive acute myeloid leukemia*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3644-54.
71. Iwai, T., et al., *Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia*. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. Leukemia, 1999. **13**(1): p. 38-43.
72. Yamamoto, Y., et al., *Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2434-9.
73. Wadleigh, M., et al., *After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies*. Blood, 2005. **105**(1): p. 22-30.
74. Weisberg, E., et al., *Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412*. Cancer Cell, 2002. **1**(5): p. 433-43.
75. Fischer, T., et al., *Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3*. J Clin Oncol, 2010. **28**(28): p. 4339-45.
76. Macdonald, D., A. Reiter, and N.C. Cross, *The 8p11 myeloproliferative syndrome: a distinct clinical entity caused by constitutive activation of FGFR1*. Acta Haematol, 2002. **107**(2): p. 101-7.
77. Chesi, M., et al., *Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3*. Nat Genet, 1997. **16**(3): p. 260-4.
78. Pulford, K., et al., *The emerging normal and disease-related roles of anaplastic lymphoma kinase*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(23): p. 2939-53.
79. Lacronique, V., et al., *A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia*. Science, 1997. **278**(5341): p. 1309-12.
80. James, C., et al., *A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera*. Nature, 2005. **434**(7037): p. 1144-8.
81. Kralovics, R., et al., *A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders*. N Engl J Med, 2005. **352**(17): p. 1779-90.
82. Hirota, S., et al., *Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors*. Science, 1998. **279**(5350): p. 577-80.

83. Heinrich, M.C., et al., *PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors*. Science, 2003. **299**(5607): p. 708-10.
84. Nishida, T., et al., *Efficacy and safety profile of imatinib mesylate (ST1571) in Japanese patients with advanced gastrointestinal stromal tumors: a phase II study (STI571B1202)*. Int J Clin Oncol, 2008. **13**(3): p. 244-51.
85. Kris, M.G., et al., *Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial*. JAMA, 2003. **290**(16): p. 2149-58.
86. Shepherd, F.A., et al., *Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(2): p. 123-32.
87. Herbst, R.S., et al., *Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2*. J Clin Oncol, 2004. **22**(5): p. 785-94.
88. Baselga, J., et al., *Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types*. J Clin Oncol, 2002. **20**(21): p. 4292-302.
89. Frederick, L., et al., *Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas*. Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1383-7.
90. Rich, J.N., et al., *Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma*. J Clin Oncol, 2004. **22**(1): p. 133-42.
91. Motzer, R.J., et al., *Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**(2): p. 115-24.
92. Tatsugami, K., et al., *Efficacy and safety of sorafenib for advanced renal cell carcinoma: real-world data of patients with renal impairment*. Oncotarget, 2018. **9**(27): p. 19406-19414.
93. Cameron, D., et al., *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 Res Treat, 2008. **112**(3): p. 533-43.
94. Motzer, R.J., et al., *Randomized Phase III Trial of Adjuvant Pazopanib Versus Placebo After Nephrectomy in Patients With Localized or Locally Advanced Renal Cell Carcinoma*. J Clin Oncol, 2017. **35**(35): p. 3916-3923.
95. Herbst, R.S., et al., *Vandetanib plus docetaxel versus docetaxel as second-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer (ZODIAC): a double-blind, randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2010. **11**(7): p. 619-26.
96. Escudier, B., et al., *Genotype Correlations With Blood Pressure and Efficacy From a Randomized Phase III Trial of Second-Line Axitinib Versus Sorafenib in Metastatic Renal Cell Carcinoma*. Clin Genitourin Cancer, 2015. **13**(4): p. 328-337 e3.

97. MacDonagh, L., et al., *Lung cancer stem cells: The root of resistance*. Cancer Lett, 2016. **372**(2): p. 147-56.
98. Mueller, M.M. and N.E. Fusenig, *Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 839-49.
99. Engelman, J.A., et al., *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling*. Science, 2007. **316**(5827): p. 1039-43.
100. Trusolino, L. and A. Bertotti, *Compensatory pathways in oncogenic kinase signaling and resistance to targeted therapies: six degrees of separation*. Cancer Discov, 2012. **2**(10): p. 876-80.
101. Huang, M.H., et al., *MEK inhibitors reverse resistance in epidermal growth factor receptor mutation lung cancer cells with acquired resistance to gefitinib*. Mol Oncol, 2013. **7**(1): p. 112-20.
102. DiGiovanni, J., *Multistage carcinogenesis in mouse skin*. Pharmacol Ther, 1992. **54**(1): p. 63-128.
103. Barbacid, M., *ras genes*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 779-827.
104. Verlaan-de Vries, M., et al., *A dot-blot screening procedure for mutated ras oncogenes using synthetic oligodeoxynucleotides*. Gene, 1986. **50**(1-3): p. 313-20.
105. Balmain, A., et al., *Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas*. Nature, 1984. **307**(5952): p. 658-60.
106. Brookes, P. and P.D. Lawley, *Evidence for the Binding of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons to the Nucleic Acids of Mouse Skin: Relation between Carcinogenic Power of Hydrocarbons and Their Binding to Deoxyribonucleic Acid*. Nature, 1964. **202**: p. 781-4.
107. Yuspa, S.H. and M.C. Poirier, *Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade*. Adv Cancer Res, 1988. **50**: p. 25-70.
108. Hennings, H., et al., *Malignant conversion of mouse skin tumours is increased by tumour initiators and unaffected by tumour promoters*. Nature, 1983. **304**(5921): p. 67-9.
109. Brown, K., A. Buchmann, and A. Balmain, *Carcinogen-induced mutations in the mouse c-Ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(2): p. 538-42.
110. Ise, K., et al., *Targeted deletion of the H-ras gene decreases tumor formation in mouse skin carcinogenesis*. Oncogene, 2000. **19**(26): p. 2951-6.
111. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
112. Leedham, S.J. and N.A. Wright, *Expansion of a mutated clone: from stem cell to tumour*. J Clin Pathol, 2008. **61**(2): p. 164-71.
113. Kangsamaksin, T., et al., *A perspective on murine keratinocyte stem cells as targets of chemically induced skin cancer*. Mol Carcinog, 2007. **46**(8): p. 579-84.

114. Kemp, C.J., *Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(6): p. 460-73.
115. DiGiovanni, J., *Modification of multistage skin carcinogenesis in mice*. Prog Exp Tumor Res, 1991. **33**: p. 192-229.
116. Kleiner, H.E., et al., *Oral administration of the citrus coumarin, isopimpinellin, blocks DNA adduct formation and skin tumor initiation by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in SENCAR mice*. Carcinogenesis, 2002. **23**(10): p. 1667-75.
117. Szanyi, I., et al., *In vivo effects of afobazole (2-mercaptobenzimidazole derivative) on the 7,12-dimethylbenz [alpha]anthracene-induced oncogene and suppressor gene expression*. In Vivo, 2007. **21**(6): p. 1059-63.
118. Perjesi, P., Z. Bayer, and I. Ember, *Effect of E-2-(4'-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone on the 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene-induced onco/suppressor gene action in vivo. I: A 24-hour experiment*. Anticancer Res, 2000. **20**(1A): p. 475-81.
119. Perjesi, P., et al., *Effect of the chalcone analog E,E-bis(2-hydroxybenzylidene) acetone on the 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced Ha-ras gene activity in vivo*. In Vivo, 2006. **20**(1): p. 141-6.
120. Budan, F., et al., *Mixtures of Uncaria and Tabebuia extracts are potentially chemopreventive in CBA/Ca mice: a long-term experiment*. Phytother Res, 2011. **25**(4): p. 493-500.
121. Montojo, J., et al., *GeneMANIA: Fast gene network construction and function prediction for Cytoscape*. F1000Res, 2014. **3**: p. 153.
122. Kawata, H., et al., *Zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) 2, a novel member of the ZHX family, functions as a transcriptional repressor*. Biochem J, 2003. **373**(Pt 3): p. 747-57.
123. Biesova, Z., C. Piccoli, and W.T. Wong, *Isolation and characterization of e3B1, an eps8 binding protein that regulates cell growth*. Oncogene, 1997. **14**(2): p. 233-41.
124. in 't Hout, F.E., et al., *High expression of transcription factor 4 (TCF4) is an independent adverse prognostic factor in acute myeloid leukemia that could guide treatment decisions*. Haematologica, 2014. **99**(12): p. e257-9.
125. Xu, L., et al., *Alternative splicing of the tuberous sclerosis 2 (TSC2) gene in human and mouse tissues*. Genomics, 1995. **27**(3): p. 475-80.
126. Jackson, P.K., et al., *The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(10): p. 429-39.
127. Nobori, T., et al., *Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers*. Nature, 1994. **368**(6473): p. 753-6.
128. Kitagawa, M., et al., *Direct association of LIS1, the lissencephaly gene product, with a mammalian homologue of a fungal nuclear distribution protein, rNUDE*. FEBS Lett, 2000. **479**(1-2): p. 57-62.

129. Couture, J.F., et al., *Structural and functional analysis of SET8, a histone H4 Lys-20 methyltransferase*. Genes Dev, 2005. **19**(12): p. 1455-65.
130. Musahl, C., et al., *A human homologue of the yeast replication protein Cdc21. Interactions with other Mcm proteins*. Eur J Biochem, 1995. **230**(3): p. 1096-101.
131. Pelletier, J., J.D. Brook, and D.E. Housman, *Assignment of two of the translation initiation factor-4E (EIF4EL1 and EIF4EL2) genes to human chromosomes 4 and 20*. Genomics, 1991. **10**(4): p. 1079-82.
132. Flesher, J.W., J. Horn, and A.F. Lehner, *7-Sulfooxymethyl-12-methylbenz[a]anthracene is an exceptionally reactive electrophilic mutagen and ultimate carcinogen*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **231**(1): p. 144-8.
133. Budan, F., et al., *Early modification of c-myc, Ha-ras and p53 expressions by chemical carcinogens (DMBA, MNU)*. In Vivo, 2009. **23**(4): p. 591-8.
134. Lo, S.M., *Distribution of labeled DMBA in rat tissues and organs and its excretion from the body*. Fed Proc Transl Suppl, 1965. **24**(4): p. 699-702.
135. Shimada, T., et al., *Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in Salmonella typhimurium NM2009*. Drug Metab Dispos, 2001. **29**(9): p. 1176-82.
136. Rendic, S. and F.J. Di Carlo, *Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors*. Drug Metab Rev, 1997. **29**(1-2): p. 413-580.
137. McLemore, T.L., et al., *Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(16): p. 1333-9.
138. Wakui, S., et al., *Prenatal 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl exposure modulates induction of rat hepatic CYP 1A1, 1B1, and AhR by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene*. Toxicol Appl Pharmacol, 2006. **210**(3): p. 200-11.
139. Ogawara, H., et al., *A specific inhibitor for tyrosine protein kinase from Pseudomonas*. J Antibiot (Tokyo), 1986. **39**(4): p. 606-8.
140. Liu, X.J., et al., *Effects of the tyrosine protein kinase inhibitor genistein on the proliferation, activation of cultured rat hepatic stellate cells*. World J Gastroenterol, 2002. **8**(4): p. 739-45.
141. Thomson, S., L.C. Mahadevan, and A.L. Clayton, *MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction*. Semin Cell Dev Biol, 1999. **10**(2): p. 205-14.
142. Ishizuka, S., et al., *Extracellular signal-regulated kinase mediates renal regeneration in rats with myoglobinuric acute renal injury*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **254**(1): p. 88-92.

143. Cheng, Y., et al., *Oridonin induces G2/M arrest and apoptosis via activating ERK-p53 apoptotic pathway and inhibiting PTK-Ras-Raf-JNK survival pathway in murine fibrosarcoma L929 cells*. Arch Biochem Biophys, 2009. **490**(1): p. 70-5.
144. Sandor, J., T. Ambrus, and I. Ember, *[The function of the p53 gene suppressor in carcinogenesis]*. Orv Hetil, 1995. **136**(35): p. 1875-83.
145. Xiong, X., et al., *Antitumor activity of a novel EGFR tyrosine kinase inhibitor against human lung carcinoma in vitro and in vivo*. Invest New Drugs, 2009. **27**(1): p. 1-11.
146. Janicke, R.U., et al., *The do's and don'ts of p53 isoforms*. Biol Chem, 2009. **390**(10): p. 951-63.
147. Chen, G.J., et al., *Overexpression and activation of epidermal growth factor receptor in hemangioblastomas*. J Neurooncol, 2010. **99**(2): p. 195-200.
148. Chang, Y.L., et al., *Comparison of p53 and epidermal growth factor receptor gene status between primary tumors and lymph node metastases in non-small cell lung cancers*. Ann Surg Oncol, 2011. **18**(2): p. 543-50.
149. Powis, G. and A. Kozikowski, *Growth factor and oncogene signalling pathways as targets for rational anticancer drug development*. Clin Biochem, 1991. **24**(5): p. 385-97.
150. Loeb, L.A. and C.C. Harris, *Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective*. Cancer Res, 2008. **68**(17): p. 6863-72.
151. De Flora, S. and L.R. Ferguson, *Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents*. Mutat Res, 2005. **591**(1-2): p. 8-15.
152. Wattenberg, L.W., *Chemoprevention of cancer*. Cancer Res, 1985. **45**(1): p. 1-8.
153. Yang, C.S., Z. Li, and T.M. Rana, *microRNAs modulate iPS cell generation*. RNA, 2011. **17**(8): p. 1451-60.
154. Miura, M., *Therapeutic drug monitoring of imatinib, nilotinib, and dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia*. Biol Pharm Bull, 2015. **38**(5): p. 645-54.
155. Xiao, M., et al., *IFNgamma promotes papilloma development by up-regulating Th17-associated inflammation*. Cancer Res, 2009. **69**(5): p. 2010-7.
156. Spencer, C.A. and M. Groudine, *Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells*. Adv Cancer Res, 1991. **56**: p. 1-48.
157. Johnston, J.M. and W.L. Carroll, *c-myc hypermutation in Burkitt's lymphoma*. Leuk Lymphoma, 1992. **8**(6): p. 431-9.
158. Nagel, S., et al., *Transcriptional deregulation of homeobox gene ZHX2 in Hodgkin lymphoma*. Leuk Res, 2012. **36**(5): p. 646-55.
159. Luan, F., et al., *Reduced nucleic ZHX2 involves in oncogenic activation of glypican 3 in human hepatocellular carcinoma*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **55**: p. 129-35.

160. Steinestel, K., et al., *Expression and Y435-phosphorylation of Abelson interactor 1 (Abi1) promotes tumour cell adhesion, extracellular matrix degradation and invasion by colorectal carcinoma cells*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 145.
161. Liu, X., et al., *MiR-181a/b induce the growth, invasion, and metastasis of neuroblastoma cells through targeting ABI1*. Mol Carcinog, 2018. **57**(9): p. 1237-1250.
162. Zhang, J.X., et al., *Unique genome-wide map of TCF4 and STAT3 targets using ChIP-seq reveals their association with new molecular subtypes of glioblastoma*. Neuro Oncol, 2013. **15**(3): p. 279-89.
163. Meyer, M.B., P.D. Goetsch, and J.W. Pike, *VDR/RXR and TCF4/beta-catenin cistromes in colonic cells of colorectal tumor origin: impact on c-FOS and c-MYC gene expression*. Mol Endocrinol, 2012. **26**(1): p. 37-51.
164. Prizant, H., et al., *Uterine-specific loss of Tsc2 leads to myometrial tumors in both the uterus and lungs*. Mol Endocrinol, 2013. **27**(9): p. 1403-14.
165. Northrup, H., et al., *Tuberous Sclerosis Complex*, in *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
166. Peter, S., et al., *Tumor cell-specific inhibition of MYC function using small molecule inhibitors of the HUWE1 ubiquitin ligase*. EMBO Mol Med, 2014. **6**(12): p. 1525-41.
167. Yang, D., et al., *Huwe1 Sustains Normal Ovarian Epithelial Cell Transformation and Tumor Growth through the Histone H1.3-H19 Cascade*. Cancer Res, 2017. **77**(18): p. 4773-4784.
168. Kim, P.H., et al., *Genomic predictors of survival in patients with high-grade urothelial carcinoma of the bladder*. Eur Urol, 2015. **67**(2): p. 198-201.
169. Jouenne, F., et al., *Germline CDKN2A/P16INK4A mutations contribute to genetic determinism of sarcoma*. J Med Genet, 2017. **54**(9): p. 607-612.
170. Bradly, D.P., et al., *CDKN2A (p16) promoter hypermethylation influences the outcome in young lung cancer patients*. Diagn Mol Pathol, 2012. **21**(4): p. 207-13.
171. Van der Reijden, B.A., et al., *The NDE1 gene is disrupted by the inv(16) in 90% of cases with CBFB-MYH11-positive acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2010. **24**(4): p. 857-9.
172. La Starza, R., et al., *A new NDE1/PDGFRB fusion transcript underlying chronic myelomonocytic leukaemia in Noonan Syndrome*. Leukemia, 2007. **21**(4): p. 830-3.
173. Xie, L., T. Li, and L.H. Yang, *E2F2 induces MCM4, CCNE2 and WHSC1 upregulation in ovarian cancer and predicts poor overall survival*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017. **21**(9): p. 2150-2156.
174. Ishimi, Y. and D. Irie, *G364R mutation of MCM4 detected in human skin cancer cells affects DNA helicase activity of MCM4/6/7 complex*. J Biochem, 2015. **157**(6): p. 561-9.
175. Choy, B., et al., *MCM4 and MCM7, potential novel proliferation markers, significantly correlated with Ki-67, Bmi1, and cyclin E expression in esophageal adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, and precancerous lesions*. Hum Pathol, 2016. **57**: p. 126-135.

176. Laemmli, U.K., et al., *Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4*. J Mol Biol, 1970. **49**(1): p. 99-113.
177. Puil, L., et al., *Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway*. EMBO J, 1994. **13**(4): p. 764-73.
178. Xie, S., et al., *Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl*. Oncogene, 2002. **21**(47): p. 7137-46.
179. Notari, M., et al., *A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2507-16.
180. Callahan, R., B.A. Chestnut, and A. Raafat, *Original Research: Featured Article: Imatinib mesylate (Gleevec) inhibits Notch and c-Myc signaling: Five-day treatment permanently rescues mammary development*. Exp Biol Med (Maywood), 2017. **242**(1): p. 53-67.
181. Andrae, J., R. Gallini, and C. Betsholtz, *Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine*. Genes Dev, 2008. **22**(10): p. 1276-312.
182. Heldin, C.H., *Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment*. Cell Commun Signal, 2013. **11**: p. 97.
183. Nister, M., et al., *Expression of messenger RNAs for platelet-derived growth factor and transforming growth factor-alpha and their receptors in human malignant glioma cell lines*. Cancer Res, 1988. **48**(14): p. 3910-8.
184. Moreno, L., et al., *Role of platelet derived growth factor receptor (PDGFR) over-expression and angiogenesis in ependymoma*. J Neurooncol, 2013. **111**(2): p. 169-76.
185. Wen, P.Y., et al., *Phase II study of imatinib mesylate for recurrent meningiomas (North American Brain Tumor Consortium study 01-08)*. Neuro Oncol, 2009. **11**(6): p. 853-60.
186. Mukherjee, J., et al., *Human schwannomas express activated platelet-derived growth factor receptors and c-kit and are growth inhibited by Gleevec (Imatinib Mesylate)*. Cancer Res, 2009. **69**(12): p. 5099-107.
187. Malhotra, B. and S.M. Schuetze, *Dermatofibrosarcoma protruberans treatment with platelet-derived growth factor receptor inhibitor: a review of clinical trial results*. Curr Opin Oncol, 2012. **24**(4): p. 419-24.
188. Betsholtz, C., et al., *Coexpression of a PDGF-like growth factor and PDGF receptors in a human osteosarcoma cell line: implications for autocrine receptor activation*. Cell, 1984. **39**(3 Pt 2): p. 447-57.
189. Taniguchi, E., et al., *PDGFR-A is a therapeutic target in alveolar rhabdomyosarcoma*. Oncogene, 2008. **27**(51): p. 6550-60.
190. Golub, T.R., et al., *Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation*. Cell, 1994. **77**(2): p. 307-16.

191. Ko, Y.J., et al., *A multi-institutional phase ii study of SU101, a platelet-derived growth factor receptor inhibitor, for patients with hormone-refractory prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(4): p. 800-5.
192. Gotzmann, J., et al., *A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes*. Oncogene, 2006. **25**(22): p. 3170-85.
193. Tsao, A.S., et al., *Immunohistochemical overexpression of platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFR-beta) is associated with PDGFRB gene copy number gain in sarcomatoid non-small-cell lung cancer*. Clin Lung Cancer, 2011. **12**(6): p. 369-74.
194. Lindmark, G., et al., *Stromal expression of platelet-derived growth factor beta-receptor and platelet-derived growth factor B-chain in colorectal cancer*. Lab Invest, 1993. **69**(6): p. 682-9.
195. Coltrera, M.D., et al., *Expression of platelet-derived growth factor B-chain and the platelet-derived growth factor receptor beta subunit in human breast tissue and breast carcinoma*. Cancer Res, 1995. **55**(12): p. 2703-8.
196. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. **88**(3): p. 323-31.
197. Kim, M.P., Y. Zhang, and G. Lozano, *Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer*. Front Oncol, 2015. **5**: p. 249.
198. Bertheau, P., et al., *p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy*. Breast, 2013. **22 Suppl 2**: p. S27-9.
199. Yang, L., et al., *Mutations of p53 and KRAS activate NF-kappaB to promote chemoresistance and tumorigenesis via dysregulation of cell cycle and suppression of apoptosis in lung cancer cells*. Cancer Lett, 2015. **357**(2): p. 520-6.
200. Li, X.L., et al., *P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(1): p. 84-93.
201. Fischer, N.W., A. Prodeus, and J. Garipey, *Survival in males with glioma and gastric adenocarcinoma correlates with mutant p53 residual transcriptional activity*. JCI Insight, 2018. **3**(15).
202. <http://www.r-project.org>
203. <http://www.broadinstitute.org/cancer/software/ GENE-E/index.html>
204. Dufour JF, Clavien PA. Signaling Pathways in Liver Diseases. Springer-Verlag GmbH 2009; 495.
205. Daganatok és daganatmegelőző állapotok molekuláris epidemiológiája - Molekuláris epidemiológiája; Ember István, Kiss István Medicina Könyvkiadó Zrt., 2005
206. Hortobágyi T., Szabó R., Murányi B., *The therapeutic relevance of DNA methylation analysis in cancer*. Clinics in Oncology, 2017. **2**: p. 1289.
207. Steven A. Rosenzweig, *Acquired Resistance to Drugs Targeting Tyrosine Kinases*. Adv Cancer Res., 2018. **138**: p. 71–98.

208. Klemm F, Joyce JA., *Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer*. Trends Cell Biol., 2015. **25**(4): p. 198–213.
209. O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, et al., *In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants*. Cancer Res., 2005. **65**(11): p. 4500–4505.
210. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Brügger J, Cowan-Jacob SW, Ray A, et al., *Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl*. Cancer Cell, 2005. **7**(2): p. 129–141.
211. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL., *Overriding Imatinib Resistance with a Novel ABL Kinase Inhibitor*. Science, 2004. **305**(5682): p. 399–401.
212. Edwards A, Li J, Atadja P, Bhalla K, Haura EB., *Effect of the histone deacetylase inhibitor LBH589 against epidermal growth factor receptor-dependent human lung cancer cells*. Mol Cancer Ther., 2007. **6**(9): p. 2515–2524.
213. Murnyák B., Csonka T., Klekner Á., Hortobágyi T.: *Occurrence and molecular pathology of low grade gliomas. (Alacsony grádusú gliális daganatok előfordulása és molekuláris patológiája)*. (in Hungarian) Ideggyógyászati Szemle/Clinical Neuroscience, 2013. **66**: p. 305-311.
214. Hester M. Wain, et al., *Guidelines for Human Gene Nomenclature*, Genomics, 2002. **79**(4), p. 464-470.
215. Murnyák B., et al, *Epigenetics of meningiomas*. Biomed Research International. 2015; 2015:532451.
216. Bonavida, B. ed.: *Resistance to Targeted Anti-Cancer Therapeutics V.10*. Springer International Publishing Switzerland 2016: p. 3,4
217. <https://www.criver.com/products-services/find-model/cba-mouse?region=3631>
218. <http://mtweb.cs.ucl.ac.uk/mus/mus/binnaz/OUTBREDS/Useful-info-TO-READ/NMRI%20version%20Gb%200607.pdf>

9. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/77/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gergely Péter
Neptun kód: EIF9IY
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10036942

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gergely, P.**, Murnyák, B., Bencze, J., Kurucz, A., Varjas, T., Gombos, K., Hortobágyi, T.: Tyrosine kinase inhibitor Imatinib mesylate alters DMBA-induced early onco/suppressor-gene expression with tissue-specificity in mice.
Biomed. Res. Int. 2019, 1-12, 2019.
IF: 2.583 (2017)
2. **Gergely, P.**, Budán, F., Szabó, I., Mezey, G., Németh, Á., Huszár, A., Iványi, J., Gombos, K., Knapp, Á., Örfi, L., Kéri, G., Ember, I.: Kinase inhibitors reduce 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced onco-suppressor gene expression in short-term experiments.
Eur. J. Oncol. 17 (1), 11-21, 2012.
IF: 0.75

További közlemények

3. R. Szabó, R., **Gergely, P.**: Az intenzív transzport jogi és finanszírozási besorolása.
In: Intenzív Transzport. Szerk.: Kádár Balázs, Trust Air Kft., Budapest, 511-517, 2018.
4. Bán, Á., Patonai, Z., Fogarasi, K., Schneider, P., Boda, R., **Gergely, P.**: Fogászati sérülésekről készült láttelepek komplex terminológiai, fogászati és igazságügyi orvosszakértői elemzése.
Orv. hetil. 159 (51), 2154-2161, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2018.31212>
IF: 0.322 (2017)
5. Schneider, P., Patonai, Z., **Gergely, P.**, Fogarasi, K.: Testi sértés vagy emberölési kísérlet?: a pontatlan orvosi szakkifejezések használatának hatása a büntetőeljárás-kimenetelére.
Belügyi szle. 66 (9), 147-163, 2018.





6. Bencze, J., Pocsai, K., Murnyák, B., **Gergely, P.**, Juhász, B., Szilvássy, Z., Hortobágyi, T.: The melanin-concentrating hormone system in human, rodent and avian brain.
Open Med. 13 (1), 264-269, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/med-2018-0040>
IF: 0.484 (2017)
7. **Gergely, P.**, Kádár, B.: A prehospitális ellátás igazságügyi vonatkozásai.
In: Diagnosztikus és terápiás eljárások a prehospitális gyakorlatban. Szerk.: Kádár Balázs, TrustAir Kft, Budapest, 527-537, 2014.
8. Szabó, G. T., Nagy-Baló, E., Kracsó, B., Rácz, I., Vajda, G., Rácz, K., **Gergely, P.**, Herczeg, L., Édes, I., Kőszegi, Z.: Pathological validation of a new angiographic area at risk prediction.
Exp. Clin. Cardiol. 20 (1), 422-427, 2014.
9. Hrabovszky, E., Molnár, C. S., Borsay, B. Á., **Gergely, P.**, Herczeg, L., Liposits, Z.: Orexinergic Input to Dopaminergic Neurons of the Human Ventral Tegmental Area.
PLoS One. 8 (12), e83029, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083029>
IF: 3.534
10. Hrabovszky, E., Sipos, M. T., Molnár, C. S., Ciofi, P., Borsay, B. Á., **Gergely, P.**, Herczeg, L., Bloom, S. R., Ghatei, M. A., Dhillon, W. S., Liposits, Z.: Low degree of overlap between kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin immunoreactivities in the infundibular nucleus of young male human subjects challenges the KNDy neuron concept.
Endocrinology. 153 (10), 4978-4989, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2012-1545>
IF: 4.717
11. Ember, Á., Budán, F., Nowrasteh, G., Varjas, T., Prantner, I., Göbel, G., Horváth, Ö. P., Illényi, L., Cseh, J., Perjési, P., Orsós, Z., **Gergely, P.**, Fehér, K., Ember, I., Kiss, I.: Application of molecular epidemiological biomarkers by monitoring the effects of treatment in colorectal cancer during follow-up study.
Eur. J. Oncol. 16 (2), 99-104, 2011.
IF: 0.531
12. Budán, F., Szabó, I., Varjas, T., Nowrasteh, G., Dávid, T., **Gergely, P.**, Varga, Z., Molnár, K., Kádár, B., Orsós, Z., Kiss, I., Ember, I.: Mixtures of Uncaria and Tabebuia extracts are potentially chemopreventive in CBA/Ca mice: a long-term experiment.
Phytother. Res. 25 (4), 493-500, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3281>
IF: 2.086
13. Szabó, G. T., Veisz, R., **Gergely, P.**, Rácz, K., Herczeg, L., Rácz, I., Kolozsvári, R., Fülöp, L., Édes, I., Kőszegi, Z.: A Holistic Coronary Care program algoritmusának validálása kóronctani és CT-eredmények alapján.
Cardiol. Hung. 40 (3), 191-196, 2010.





14. Szabó, G. T., Veisz, R., **Gergely, P.**, Balkay, L., Herczeg, L., Varga, J., Kolozsvári, R., Ungvári, T., Rácz, I., Édes, I., Kőszegi, Z.: Integration of Standard Myocardial and Epicardial Segmentation: validation by Computed Tomography and Autopsy Studies.
Comput. Cardiol. 36, 349-351, 2009.
15. Ember, Á., Budán, F., Nowrasteh, G., Varjas, T., Göbel, G., Horváth, Ö. P., Illényi, L., Cseh, J., Perjési, P., **Gergely, P.**, Ember, I., Kiss, I.: Molekuláris biomarkerek alkalmazása a colorectális carcinómás betegeken, a műtéti hatás monitorozására követéses vizsgálattal.
Egészségtudomány. 53 (2), 50-60, 2009.
16. Ghodratollah, N., Varjas, T., Benkő, Á., Szabó, L., **Gergely, P.**, Papp, A., Horváth, Ö. P., Ember, I.: Fruit Café, egy növényi eredetű kivonat hatása génexpressziókra: klinikai epidemiológiai előkísérletek.
Magy. epidemiol. 5 (1), 41-54, 2008.
17. **Gergely, P.**, Kékes, N., Dombi, Z.: Gén-, ill. kromoszómaszintű változások a fontosabb daganatokban.
In: Daganatok és daganatmegelőző állapotok molekuláris epidemiológiája. Szerk.: Ember István, Kiss István, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 284-315, 2005.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,007

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
3,333**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.03.20.



10. Tárgyszavak

Magyar tárgyszavak: receptor tirozin-kináz, *Hras*, *Kras*, *Myc*, *Trp53*, DMBA-indukált egér tumormodell, kemoprevenció, génexpresszió, gén-gén interakciók.

Angol tárgyszavak: receptor tyrosine kinase, *Hras*, *Kras*, *Myc*, *Trp53*, DMBA-induced mouse tumor model, chemoprevention, gene expression, gene-gene interaction.

11. Köszönetnyilvánítás

Néhai Ember István professzoron kívül köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Kiss Istvánnak, Dr. Bencze Jánosnak, Dr. Budán Ferencnek, Dr. Ember Ágostonnak, Dr. Fogarasi-Nuber Katalinnak, Dr. Fülöp Péternek, Dr. Gombos Katalinnak, Dr. Holló Krisztinának, Dr. Huszár Andrásnak(†), Dr. Iványi Jánosnak, Dr. Kádár Balázsnak, Dr. Kéri Györgynek(†), Dr. Kurucz Andreának, Dr. Mezey Gézának, Dr. Murnyák Balázsnak, Dr. Németh Árpádnak, Dr. Orsós Zsuzsának, Dr. Órfi Lászlónak, Dr. Szabó Istvánnak, Dr. Török Péternek, Dr. Varjas Tímeának, Brunnerné Bayer Zsuzsának, Csidei Jánosnének, Csörge Tímeának, Déri Tibornének, Fóris Máriának, Harth Csabánének, Herczeg Mónikának, Nádasdi Norbertnek, Oláh Zsuzsannának, Pál Erzsébetnek, Rónai Krisztinának, Szabolcsi Péternek, Szántódiné Molnár Ágnesnek, Varga Szilviának és Wenczler Máriának, hogy munkájukkal hozzájárultak ahhoz, hogy ez az értekezés elkészülhessen.

Külön köszönetet mondok témavezetőmnek, Prof. Dr. Hortobágyi Tibornak az aktív témavezetésért és a publikáció anyagi forrásának megteremtéséért, Prof. Dr. Antal Miklósnak és Prof. Dr. Kappelmayer Jánosnak a jó tanácsokért, Dr. Herczeg Lászlónak, volt főnökömnek, hogy a napi rutin munkavégzés melletti kutatásra lehetőséget adott.

Örök hálával tartozom családomnak, Dr. Szombathy Zitának, Gergely Nórának és Sárának; szüleimnek, Dr. Gergely Pálnak és Dr. Bagyó Juliannának, testvéremnek, Gergely István Dánielnek soha nem múló szeretetükért, támogatásukért és kitartó bátorításukért.