

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**BRAF inhibitor és ER stresszt indukáló
gyógyszerjelölt molekula által előidézett molekuláris
eltérések**

Jelenlegi és lehetséges terápiák bőr melanomákban

Szász István

Témavezető: Prof. Dr. Balázs Margit



DEBRECENI EGYETEM
Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

BRAF inhibitor és ER stresszt indukáló gyógyszerjelölt molekula által előidézett molekuláris eltérések

Jelenlegi és lehetséges terápiák bőr melanomákban

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Egészségtudományok tudományágban

Írta: Szász István okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok Doktori Iskolája
(Megelőző Orvostan és Népegészségtan programja) keretében
Témavezető: Prof. Dr. Balázs Margit

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Nagy Endre, az MTA doktora
tagok: Dr. Penyige András, PhD
Prof. Dr. Tímár József, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2021. május 18. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Emri Gabriella, PhD
Dr. Tóvári József, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Nagy Endre, az MTA doktora
tagok: Dr. Emri Gabriella, PhD
Dr. Tóvári József, PhD
Dr. Penyige András, PhD
Prof. Dr. Tímár József, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2021. május 18. 15:00 (online formátum)

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze az egdi@unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben 2021. május 17. 14:00 óráig. A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

BEVEZETÉS

A melanoma malignum a melanocitákból kiinduló agresszív daganatos megbetegedés, mely a tumorok közül a legnagyobb mutációs rátával rendelkezik. A betegség kialakulását környezeti (UV sugárzás) és genetikai faktorok (örökletes és szerzett) együttes kombinációja határozza meg. A bőr melanoma megközelítőleg egy százaléka vezethető vissza öröklött mutációkra, míg a többi eset szomatikus mutációknak az eredménye. A leggyakrabban mutálódott gén a családi halmozódás esetén a *CDKN2A* tumorszupresszor gén mutációja. Emellett egyéb gének mutációja is szerepet játszik a familiáris eredetű melanomáknál, melyek családi esetek ~22%-ára jellemzőek.

A malignus melanoma genetikája

Az utóbbi évtizedben a melanomákban megtalálható, leggyakoribb aktivációs mutációt hordozó BRAF gént célzó terápiás eljárások száma jelentősen megnőtt, ennek ellenére az előrehaladott, áttétes betegek túlélési mutatói még mindig rosszak.

Teljes genom szekvenálási adatok alapján az UV mutagenézisre jellemző, a korábban ismert domináns mutációk alapján sikerült a melanomákat négy csoportba sorolni:

- BRAF mutáns melanomák (50- 60%)
- RAS mutáns melanomák (25%)
- NF1 mutáns melanomák (15%)
- BRAF/ NRAS/ NF1 tripla vad típusú melanomák (10%)

A kután melanomákban a leggyakrabban mutálódott gének az alábbiak: *BRAF* (63%), *NRAS* (23%), *P53* (19%), *p16INK4a* (19%), *PTEN* (12%). A *BRAF* és *NRAS* mutáció a szekvenált 121 melanoma mintában egyszerre nem fordult elő. A mutációk gyakran asszociálódtak génamplifikációkkal (*TERT*, *MITF*, *KIT*,

CCND1 és *CDK4*) vagy deléciókkal (*PTEN* 25%, *CDKN2A* 38%). Ezek a géneltérések potenciális terápiás célpontok.

A mitogén aktivált protein kináz szignalizációs útvonal

Az eukarióta sejtek egyik legfontosabb szignalizációs kaszkádja a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonal. Az útvonal sokféle molekuláris folyamatot szabályoz, mint pl: sejt osztódást, sejt differenciációt, apoptózist, sejt túlélést, rezisztenciát különböző hatóanyagokkal szemben. A kaszkád normális működése során a növekedési faktorok kötődnek receptoraikhoz, aktiválják és dimerizációra készítetik a transzmembrán receptor tirozin kinázokat. Az aktivált kinázok egyéb kofaktorokon keresztül a RAS fehérjét aktiválják, melyek a RAF fehérjék, majd a MEK fehérjék aktiválását eredményezik. Az aktivált MEK fehérje foszforilálja és az ERK fehérjéket, melyek bejutva a sejtmagba transzkripciós faktorként szabályozzák a fenti folyamatokban szerepet játszó gének expresszióját.

A MAPK szignalizációs útvonal fontosabb mutációi

A *BRAF* onkogén aktivációs mutációja a bőr melanomák 40-60 %-ban fordul elő. A második leggyakrabban előforduló mutáció az *NRAS* gént érinti (15-20%). A *BRAF* gén mutációja leggyakrabban egy timin adeninra történő transzverziója a 600-as kodonban, ami egy valin glutaminsav szubsztitúcióhoz vezet; innen származik a mutáció *V600E* elnevezése. Az aminosavak cseréje a fehérje aktivációs részén egy olyan konformáció változást okoz, aminek következtében a RAF fehérje, előzetes RAS aktiváció nélkül is folyamatosan, körülbelül 500 szoros aktivitással túlműködik és ezáltal az egész útvonal bekapcsolt állapotban marad. A 600-as kodonra más kevésbé gyakori szubsztitúciók is jellemzőek, mint például a valin cseréje lizinre (*V600K*), aszparginsavra (*V600D*), vagy argininre (*V600R*). Ezeket a 600-as kodont érintő mutációkat egységesen I-es típusú mutációknak nevezzük.

BRAF fehérje gátlók

Az utóbbi években számos, a mutáns BRAF fehérje működését gátló inhibitor fejlesztettek ki sikeresen, de csak három jutott el a melanoma terápiában történő alkalmazhatóságig; a vemurafenib, dabrafenib és az encorafenib. Ezek közül az első I-es típusú mutációt hordozó BRAF fehérjét gátló gyógyszer a vemurafenib (PLX4032) volt, melyet a PLX4720 alapvegyületből fejlesztettek tovább. Az FDA előrehaladott, metasztatikus melanomák target specifikus, célzott kezelésére 2011-ben fogadta el vemurafenibet, majd 2013-ban tovább bővült a melanomák molekuláris célzott terápiája, elfogadásra került egy újabb BRAF inhibitor, a dabrafenib (GSK2118436, Tafinlar). A sorban az utolsó az encorafenib (LGX818, BRAFTOVI), melyet az FDA 2018-ban fogadott el. A hatóanyag egy nagyon fontos tulajdonsága a másik kettővel szemben, hogy különböző kötési affinitása van az aszimmetrikus BRAF protomerekhez és tovább is marad kötésben velük. Napjainkban is számos ún. „pan-RAF” gátló tesztelése zajlik (pl: LXH254, TAK-632, MLN2480, CEP-32496), melyek szélesebb aktivitással rendelkeznek a BRAF izoformákra; azonban ezek még a korai klinikai fázisokban járnak és további vizsgálatok szükségesek még a hatékonyságuk, biztonságosságuk, használhatóságuk tisztázása érdekében. A BRAF inhibitorokkal történő monoterápia ma már kiegészül BRAF és MEK inhibitorokkal történő kombinált kezeléssel. Az encorafenib és binimetinib (BRAFTOVI és MEKTOVI) kombinált terápiát előrehaladott és metasztatikus melanomák kezelésére alkalmazzák BRAFV600E vagy BRAFV600K mutációt hordozó melanomás betegeknél.

BRAF gátlókkal szembeni rezisztencia

Annak ellenére, hogy a mutáns BRAF fehérjét célzó gyógyszerek az első terápiás szerek, amelyek ténylegesen meghosszabbítják az áttétes melanomában szenvedő betegek túlélését, sajnos egy idő után hatékonyságukat veszítik a daganatban kialakuló gyógyszer-rezisztencia miatt. A rezisztenciának időrendben három, jól elkülönülő fázisa van: (i) változások a sejt jelátviteli útvonalaiiban, ami egy új

homeosztázis kialakulásához vezet (egy napon belül); (ii) epigenetikai, immun-, és mikro környezet adaptáció, melyek a gyógyszerrel szembeni toleranciát eredményezi (egy hónapon belül); (iii) genetikai mutációkon keresztül rezisztens klónok kialakulása, melyek tökéletesen adaptálódnak az inhibitorokhoz, esetleg dependenssé is válnak (több hónap/ év). A mutáns BRAF-kináz gátlás direkt következménye, hogy az ERK függő negatív visszacsatolás nem tud megvalósulni és ahogy a tumor sejtek adaptálódnak a drog folyamatos jelenlétéhez egy új „alapállapot” jön létre.

Az endoplazmatikus retikulum, mint célpont a melanoma terápiában

A melanoma sejtek akárcsak más daganatos sejtek, számos olyan túlélési stratégiát használnak, melyekkel elkerülhető az apoptózis. Az egyik ilyen stratégia a „selejtfehérje” válasz (unfolded protein response, UPR) aktiválása, mely szabályozza az endoplazmatikus retikulumban (ER) stressz hatására bekövetkező apoptotikus folyamatokat, mely alapvetően kétféleképpen valósulhat meg. Egyrészt olyan onkogének aktivációján keresztül, melyek gátolják az ER stressz indukált apoptózist, másrészt ER dajkafehérjék túltermelésével, melyek segítenek a daganatnak leküzdeni az ER-re háruló megnövekedett stressz hatásait, melyek a daganatok megnövekedett fehérjetermeléséből erednek. Így nem meglepő, hogy az UPR lehetséges terápiás célpont és a fentieket figyelembe véve két szisztéma szerint támadható. A két módszer lényege ugyanaz és részben átfed, az UPR komponenseinek gátlásával, vagy az ER stressz további indukálásával a daganat sejtek apoptózisba kerülnek.

A közelmúltban Cerezo és munkatársai szintetizáltak és karakterizáltak egy új molekulacsaládot a thiazole benzensulfonamidokat (TZB), melyeknek daganatellenes tulajdonságát írták le. A molekulacsaládból a legígéretesebbnek a HA15 elnevezésű molekulát találták, ami daganatos sejtekben ER stresszt indukál, a HA15 az egyik fő dajkafehérje a BiP/GRP78/HSPA5 gátlásán keresztül és apoptózison, illetve autofágián keresztül a sejtek pusztulását eredményezi, míg a

normál sejtekre nincs hatással. Továbbá azt találták, hogy a szer hatékonysága független a melanoma sejtek által hordozott mutációktól és a BRAF inhibitorokkal szemben kialakult rezisztenciától. A HA15-öt hatékonyak találták prosztata, mell, vastagbél, hasnyálmirigy, glioma daganat sejtvonalaknál is.

Célkitűzések

Kutatásaink során két, molekuláris mechanizmusában eltérő melanoma ellenes gyógyszer hatását vizsgáltuk melanoma sejtvonalakon. Vizsgálataink fókuszában először a vemurafenib analóg PLX4720 nevű BRAF inhibitor volt. Ezt követően Cerezo munkacsoportja által szintetizált HA15 gyógyszerjelölt molekula hatását tanulmányoztuk meg BRAFV600E mutációt hordozó melanoma modellrendszereinkben. Vizsgálataink céljai:

- I. A PLX4720 BRAF inhibitor hatásának vizsgálata két melanoma sejtvonal páron (ugyanabból a beteg primer tumorából és metasztázisából származó sejtvonalak).
 - PLX4720 hatásaának vizsgálata a sejtek életképességére, rezisztens sejtvonalak létrehozása,
 - annak meghatározása, hogy milyen genomikai, gén- és protein expressziós különbségek járulnak hozzá a BRAF inhibitor rezisztencia kialakulásához,
 - a rezisztens és az eredeti sejtvonalak invazív képességének összehasonlítása,
 - a drog megvonás sejtostódásra gyakorolt hatásának vizsgálata.

- II. A Cerezo munkacsoportja által szintetizált HA15 nevű „melanoma ellenes” új gyógyszerjelölt molekula a sejtek életképességére, sejtostódásra gyakorolt hatásának vizsgálata *BRAF^{V600E}* mutáns és PLX4720 rezisztens sejtvonalaknál, különböző sejt tenyésztési körülményeket használva.
 - ER stressz és autofágia markerek génexpressziós vizsgálata különböző sejt tenyésztési körülmények között,
 - HA15 rezisztens sejtvonal létrehozása,
 - A HA15 szenzitív és rezisztens sejtvonal génexpressziós vizsgálata RNAseq analízis segítségével.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztés

Vizsgálatainkat 10 melanoma sejtvonalon végeztük el. Mindegyik sejtvonal *BRAF*^{V600E} mutációt hordozott és vad típusú volt az *NRAS* génre nézve. A sejtvonalak a WM983A^{p1}/WM983B^{m1}; WM278^{p2}/WM1617^{m2} és A375 sejtvonal voltak, illetve a PLX4720 rezisztens WM983A^{RES}, WM983B^{RES}, WM278^{RES}, WM1617^{RES}; továbbá a HA15 rezisztens WM983B^{HA15RES} voltak. A sejteket RPMI 1640 tápfolyadékban tenyésztettük (FBS 10%, 37°C, 5% CO₂). A rezisztens sejtvonalakat több hétig tartó folyamatos, nagy dózisu PLX4720/HA15 kezeléssel hoztuk létre.

Sejtproliferációs assay

A sejtek proliferációját WST-1 assay-vel határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. Az abszorbanciát 450 nm-en mértük EpochTM Microplate Spectrophotometer segítségével.

Inváziós assay

Az inváziós képesség meghatározásához BD Biocoat Matrigel inváziós kamrákat használtunk (pórus méret: 8 µm). A felső kamra 500 µl sejtszuszpenziót tartalmazott szérumentes tápfolyadékban, (5 x 10⁴ sejt/kamra). Az alsó kamrában 10% szérumot tartalmazó tápfolyadékot használtunk kemoattraktánsként. 24 óra inkubáció után az alsó kamrába átjutó sejteket metanollal fixáltuk és hematoxylin-eosinnal festettük. Az invazív sejteket fénymikroszkóp alatt 200x nagyításon 7 különböző látótérben számoltuk le és átlagoltuk.

Valós idejű kvantitatív PCR

A kandidáns gének relatív expressziós szintjeinek meghatározása valós idejű PCR módszerrel történt, LightCycler® 480 Real-Time PCR System berendezéssel.

RNS szekvenálás (RNS-Seq) és adatelemzés

Az RNS-Seq analízishez cDNS könyvtárakat 1 µg teljes RNS-ből készítettük Ultra II RNS Sample Prep kit felhasználásával a gyártó protokollja szerint. A könyvtár előkészítést és a szekvenálást az UD Genomed Kft. segítségével végeztük el. A nyers szekvenálási adatokat (fastq) a HISAT2 algoritmus segítségével illesztettük az emberi referencia genom GRCh38 verziójához, és BAM fájlokat állítottunk elő. A későbbi elemzést StrandNGS szoftverrel végeztük. A normalizáláshoz a DESeq1 algoritmust használtuk. A megváltozott expressziójú gének azonosításához t-tesztet alkalmaztuk Benjamini-Hochberg többszörös tesztkorrekcióval.

Útvonal elemzés

Az RNAseq és a microarray adatokból generált génlistáknál funkcionális dúsítási elemzést alkalmaztunk a biológiai útvonalak azonosítása céljából. Ehhez a ToppFun online szoftvert, alkalmaztunk. Az eszközt alapértelmezett beállításokkal és 0,05-ös p érték cut off-al használtuk. A funkcionális génhálózatok vizualizálásához a Cytoscape szoftver ClueGo (2.3.5. V.) szoftvert használtuk (3.5.1. V.) Alapértelmezett beállításokkal és 0,05-ös p-értékkel.

Fehérje expressziós vizsgálatok

Fehérje expressziós vizsgálatokhoz a Proteome Profiler Human XL Oncology Array Kit-et használtuk, mellyel 84 daganat specifikus fehérje egyidejű kimutatása lehetséges. A fehérje izolálást követően a fehérjék koncentrációját Quick Start™ Bradford Protein Assay-vel határoztuk meg a gyártó protokollja szerint.

Statisztikai elemzések

SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) szoftvert használtuk a további statisztikai elemzéseinkhez. Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztunk az adatok normál

eloszlásának meghatározásához. Pearson's korrelációval elemeztük az array CGH és qRT-PCR adatok közötti összefüggést. Mann-Whitney-Wilcoxon tesztet használtunk az invazív és nem invazív sejtvonalak mRNS expressziós adatainak összehasonlításához. Minden esetben a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

A PLX4720 sejtnövekedést gátló hatása a *BRAF^{V600E}* mutáns melanoma sejtvonalakon

A BRAFi (PLX4720) sejtnövekedés gátló hatásának meghatározásához két pár *BRAF^{V600E}* mutáns sejtvonalat (WM983A^{p1} és WM983B^{m1}, WM278^{p2} és WM1617^{m2}) kezeltünk különböző koncentrációjú hatóanyaggal (0, 5, 50, 500, 1000, 2000 és 5000 nM). Jelentős ($p < 0,001$) csökkenést figyeltünk meg a sejtek életképességében 500 nM PLX4720 koncentráció felett. A rezisztens sejtvonalvariánsok létrehozásához a sejteket ~ 10 hétig folyamatosan 5 μ M PLX4720-al kezeltük, és addig tenyésztettük, amíg a túlélő sejtek újra benőtték a tenyésztő flaskát.

A BRAFi megvonás hatása a rezisztens sejtvonalakra

A BRAFi rezisztens sejtvonalakat 5 μ M PLX4720 vagy azonos térfogatú oldószer (DMSO) jelenlétében tenyésztettük. Megfigyeltük, hogy a BRAF inhibitor megvonását követően a sejtek életképessége 3 rezisztens sejtvonalban (WM983A^{RES}, WM983B^{RES}, WM1617^{RES}) jelentősen csökkent, ugyanakkor a WM278^{RES} sejtek megnövekedett sejtosztódással válaszoltak a drog megvonására.

A rezisztens sejtvonalak invazív tulajdonságai

A BRAFi érzékeny és rezisztens sejtvonalak invazív potenciáljának összehasonlításához Matrigel-inváziós kamrákat használtunk. Az érzékeny

sejtvonalak kismértékű invazív képességgel rendelkeztek (invazív sejtek átlagos száma 0-1,8/mikroszkóp látótér). Ezzel szemben a négy rezisztens sejtvonal közül háromnál (WM983A^{RES} WM983B^{RES} WM278^{RES}) az invazív sejtek átlagos száma 2,5-29,3 között volt. Sem a WM1617, sem a sejtvonal rezisztens párja (WM1617^{RES}) nem volt invazív a kísérletek alapján. Ezt a megfigyelést tovább erősítette a jól ismert inváziós / proliferációs marker gének (TCF4 és LEF1 gének) közötti szignifikáns összefüggés felfedezése qRT-PCR alkalmazásával ($R=0,854$; $p=0,007$).

A BRAFi-érzékeny és rezisztens melanoma sejtvonalak gén kópia szám változásai

Array CGH-el valamennyi, a BRAFi kezelésre rezisztens sejtvonalban a 8q kromoszóma szakaszon DNS kópia szám növekedést találtunk. Ezen a szekvencián az *EXT1* (8q24.11), *SAMD12* (8q24.12) és a *REXO1L2P* (8q21.2) gének eltéréseit figyeltük meg. Ezenkívül génamplifikációt találtunk a 7q34 régióban a WM1617^{RES} sejtvonalban, ahol a *BRAF* gén lokalizálódik.

BRAFi-érzékeny és rezisztens sejtvonalak génexpressziós mintázata

A rezisztenciával összefüggésbe hozható, szignifikáns génexpressziós (Affymetrix Human Gene 1.0 microarray) változást 1903 génnél mutattunk ki. A rezisztens sejtvonalakban 437 olyan egyedi gént találtunk, melyek legalább kétszeres expressziós változást mutattak. A gének között 204 gén expressziója megnőtt és 233 gén expressziója csökkent a BRAFi szenzitív sejtekhez képest. A megnövekedett expressziójú gének elsősorban növekedési faktorok, növekedési faktor receptorok, extracelluláris mátrix, integrinek és sejtdhéziós molekulák voltak. Az overexpresszált gének számos biológiai folyamatban játszanak fontos szerepet a Gene Ontology (GO) osztályozása alapján, beleértve az angiogenezist, a sejtek migrációját, az érést és a sebgyógyulást. A legalább öt gént magába foglaló, szignifikánsan megváltozott jelátviteli útvonalak közül

kiemeljük az alábbiakat: az extracelluláris mátrix működésének szabályozó gének, az ECM-hez kapcsolódó fehérjéket kódoló gének, a fokális adhézióban részt vevő gének, az ECM glikoproteineket, kollagéneket és proteoglikánokat-, szekretált oldható faktorokat kódoló gének és a TNF jelátviteli útban részt vevő gének. Megfigyelésünk szerint az alul expresszált gének nem kapcsolhatók jelátviteli útvonalhoz vagy molekuláris funkcióhoz, ugyanakkor az alábbi biológiai folyamatokkal függenek össze: pigmentáció, celluláris lipid metabolikus folyamatok és melanocita differenciáció. qRT-PCR-al öt kandidáns gén (*PMEL*, *LOXL1*, *SERPINE1*, *EPHA2* és *WNT5A*) relatív génexpresszióját határoztuk meg, nagyon jó egyezést találtunk a qRT-PCR és microarray adatok között ($0.786 \leq R \leq 0.976$; $P \leq 0.05$).

BRAFi-érzékeny és rezisztens sejtvonalak fehérje expressziójának elemzése

Az eredeti és a rezisztens sejtvonalak közötti fehérje expresszióbeli különbségek meghatározásához Proteome Profiler Human XL Onkológiai arrayt használtunk, mely 84 daganatos elváltozással kapcsolatos fehérje expressziójának egyidejű detektálására ad lehetőséget. A rezisztens sejtvonalakban számos a BRAFi érzékeny sejtekhez viszonyítva eltérő mértékben expresszált fehérjét figyeltünk meg. A fehérjemintázatok elemzésekor hat fehérjét (ANGPLT4, EGFR, Endoglin, FGF2, Serpin E1 és VCAM-1) fokozott expresszió és két fehérjét (OPN és Survivin) csökkent expresszió jellemezte, melyek hasonló expressziós mintázatot mutattak valamennyi rezisztens sejtvonalban.

HA15 hatása a BRAFi érzékeny és rezisztens melanoma sejtvonalakon

A HA15 kezelés hatása a normál melanociták életképességére

Először a HA15 normál humán melanocitákra gyakorolt hatását vizsgáltuk normál sejtenyésztési körülmények között (a sejteket 10% FBS jelenlétében tenyésztettük). A melanociták életképességét WST-1 assay-vel határoztuk meg. A kontroll, DMSO-val (a HA15 oldószere) kezelt sejtek életképességét 100%-nak

tekintettük. Eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy a melanociták életképessége alacsony dózisú HA15 (10 μ M) kezelést követően is szignifikánsan csökkent ($p \leq 0,05$), és a koncentráció 100 μ M-re történő növelésével szignifikánsan tovább csökkent normál tenyésztési körülmények között ($p \leq 0.01$).

Az eredeti kéziratban használt sejttenyésztési körülmények szimulálásához a melanocitákat FBS nélkül tenyésztettük (a sejtek „éheztetése” összesen 62 órán át). Tizennégy órás éheztetés után 10 μ M HA15-at adtunk a sejt kultúrához, majd a melanocitákat 48 órán át tovább inkubáltuk. A 14 órás éheztetés után a sejteket 10% FBS jelenlétében 10 μ M HA15-vel kezeltük 48 órán át. A normál sejttenyésztési körülményekkel ellentétben az éheztetett melanociták életképessége 60% alá csökkent HA15 kezelés nélkül, 10 μ M HA15 hatására a melanociták életképesség tovább csökkent 45% alá.

A melanoma sejtvonalak vizsgálatok az egyik kísérleti elrendezésben 14 órán keresztül éheztettük a sejteket a gyógyszeres kezelés előtt, ami a sejtek életképességének jelentős csökkenését eredményezte az összes melanoma sejtvonalban. Ha azonban a tápoldatot 10 μ M HA15-t tartalmazó teljes médiumra (10% FBS) cseréltük, azt tapasztaltuk, hogy a sejtek életképessége 48 óra múlva teljesen visszatért. Ez egyértelműen azt mutatja, hogy a sejtek életképességét jelentősen befolyásolta az FBS megvonása, ugyanakkor a gyógyszernek nem volt számottevő hatása normál sejttenyésztési körülmények között.

Ez a megfigyelés ellentétes volt az irodalmi adatokkal. Annak érdekében, hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy az eredetileg rendelt hatóanyag (Selleck Chemicals Inc.) esetleg szennyezett volt, a HA15 hatóanyagot egy másik cégtől is megrendeltük (MedChemExpress Ltd.) és megismételtük a kísérleteket két BRAFi-érzékeny melanoma sejtvonalon (WM983A és WM983B). A kezelés 10 μ M HA15-el normál sejttenyésztési körülmények között történt, a sejtek életképességét 48 óra múlva határoztuk meg. Mindkét cégtől származó HA15

kezelés ugyanazt a hatást eredményezte. A sejtek életképességének drámai csökkenése csak 50 μM és 100 μM hatóanyag koncentrációnál következett be.

Az FBS megvonás hatása az A375 melanoma sejtek életképességére

A hosszú távú FBS megvonás A375 sejtek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálatához (a közölt sejttenyésztési körülményekhez hasonlóan) a sejteket 14 órán át FBS nélkül tenyésztettük, majd 48 órán keresztül FBS-sel és anélkül (összesen 62 óra), 14 óra éheztetés után 10 μM HA15-tel tenyésztettük tovább. Habár a sejtek morfológiáját a drog kezelés normál sejttenyésztési körülmények között nem befolyásolta, 62 órás FBS megvonása után a sejtek életképessége jelentősen csökkent a hatóanyag nélkül is. Abban az esetben, ha a hosszú távú FBS megvonást 10 μM HA15 kezeléssel kombináltuk az életképesség csökkenése jelentős volt, hasonlóan az irodalomban közölt adatokhoz. Vizsgálataink szerint a hosszú távú FBS megvonás (sejtek éheztetése) és a HA15 szinergisztikus hatást gyakorol a sejtek életképességére.

HA15 kezelés apoptózist kiváltó hatásának vizsgálata WM983A melanoma sejtekben

Mivel irodalmi adatok szerint a HA15 egyidejűleg apoptózist és autofágiát indukál, meghatároztuk az élő, apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát a kezelést követően Annexin V-FITC-apoptózis detektáló kit segítségével. A kísérleti körülmények a következők voltak: A WM983A melanoma sejteket 14 órán át éhezettük, majd 48 órán át különböző koncentrációjú HA15-tel (10 μM , 50 μM és 100 μM) kezeltük, a kontroll sejtek DMSO kezelt sejtek voltak. Az áramlási citometriai adatok alapján egyértelmű, hogy 10 μM HA15 kezelés nem befolyásolta sem a sejtek életképességét, sem az apoptózis mértékét, a kezelést követően a sejtek eloszlása hasonló volt a DMSO-val kezelt kontroll sejtekhez. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a HA15 nem indukált apoptózist 10 μM HA15 koncentrációnál, és nem befolyásolta a sejtek életképességét sem. Ugyanakkor a

drog magasabb koncentrációja egyértelműen a sejtek életképességének csökkenését eredményezte.

FBS megvonás és HA15 kezelés hatása stressz markergének expressziójára A375 melanoma sejtekben

A HA15 kezelés által kiváltott ER stressz vizsgálatára három fő stressz marker (*CHOP*, *XBP1* és *BIP*) génexpressziós szintjét határoztuk meg különböző sejtenyésztési körülmények között, különböző időpontokban. Először a sejteket éhezettük 14 órán át, majd a közölt sejtenyésztési körülményeknek megfelelően i.) FBS nélkül- ii.) FBS nélkül + 10 μ M HA15-el és iii.) FBS-el + 10 μ M HA15-el tenyésztettük tovább 24 és 48 órán keresztül. A három stressz marker gén expresszióját ezt követően határoztuk meg. A stressz markerek relatív génexpressziója hasonló volt a kontrollhoz 14 órás FBS megvonás után. Harmincnegyven óra elteltével azonban a markerek expressziója megnőtt az éhezett sejtekben (HA15 kezeléssel vagy anélkül; ellentétben a normál sejtenyésztési körülmények között tartott sejtekkel (FBS + HA15 +), az utóbbi körülmények között a marker gének expressziójának csak mérsékelt növekedését figyeltünk meg a kísérlet végén, még akkor is ha HA15-el lettek kezelve. A legnagyobb relatív expressziót az éhező, HA15 kezelt sejtekben az *XBP1* génre mutattuk ki.

Az FBS megvonás és a HA15 kezelés hatása az autofágia markergének expressziójára az A375 melanoma sejtvonalban

A HA15 autofágiát indukáló hatásának vizsgálatára, négy autofágia marker gént (*DRAM1*, *P62*, *ATG5* és *ATG*) választottunk és meghatározzuk a relatív génexpresszió mértékét a HA15 kezelés után normál és éhezett sejtenyésztési körülmények között. Megállapítottuk, hogy az éheztetés (FBS-14 órán át) nem váltott ki szignifikáns expressziós változást ezeknél a géneknél. A sejtek 38 órás éheztetése után mind a négy gén expressziós szintje megemelkedett, a legnagyobb relatív expressziót a *DRAM1* génre mutattuk ki. Az éhezett sejtek 10 μ M HA15-el (FBS- és +10 μ M HA15) történő kezelését követően két gén (*p62* és *ATG5*)

expressziója szignifikánsan megnőtt, ugyanakkor az autofágia markerek figyelemre méltó expressziós változását nem figyeltük meg a normál sejttenyésztési körülmények között tartott sejteknél még 48 órás HA15 kezelést követően sem. Összességében az autofágia marker gének expressziós mintázata hasonló volt az éhező sejtekben, melyeket HA15-vel kezeltünk 38 és 62 órás időpontokban is. Ezzel szemben a teljes tápoldatban (FBS + HA15 +, 62 óra) növekedő sejtekben csak a *DRAM1* gén expressziója emelkedett HA15 kezelés után.

HA15-rezisztens melanoma sejtvonalak létrehozása és jellemzése

Mivel a 10 μM HA15 kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a melanoma sejtek életképességét, a gyógyszer-rezisztens sejtvonallétrehozásához kiválasztottuk a leginkább HA15-érzékeny sejtvonalat (WM983B), és a sejteket folyamatosan kezeltük emelkedő koncentrációjú HA15-tel normál sejttenyésztési körülmények között. Megközelítőleg 10 hét elteltével két rezisztens sejtvonalat hoztunk létre, az egyik rezisztenssé vált 20 μM HA15 (WM983B^{HA15RES20 μM}), a másik 30 μM HA15 (WM983B^{HA15RES30 μM}) kezeléssel szemben. A rezisztens sejtek (WM983B^{HA15RES30 μM}) életképességét a folyamatos HA15-kezelés (30 μM HA15) nem befolyásolta, kivéve, ha a koncentrációt 50 μM -re növeltük. Ezzel ellentétben az eredeti WM983B sejtvonallétrehozásakor életképessége mindkét koncentrációnál szignifikáns csökkenést mutatott.

Mivel a HA15 a HSPA5/BiP fehérje (az UPR fő szabályozó fehérjéje) működését gátolja, meghatároztuk a BiP gén expressziós szintjét az eredeti WM983B és mindkét rezisztens sejtvonallétrehozásakor (WM983B^{HA15RES20 μM} és WM983B^{HA15RES30 μM}). A HA15 rezisztens sejtvonalak szignifikánsan megnövekedett BiP génexpressziót mutattak az eredeti WM983B sejtekben mért BiP expresszióhoz képest.

Megvizsgáltuk, hogy a rezisztens sejtek (WM983B^{HA15RES}) hogyan reagálnak a HA15 megvonását követően. A kísérlet során a rezisztens sejteknél a hatóanyagot DMSO-val helyettesítettük, és megállapítottuk, hogy a sejtek életképessége

csökkent és a sejtek morfológiája megváltozott. A rezisztens sejtek morfológiai változásai azt jelzik, hogy a sejtek gyógyszerfüggő fenotípust fejlesztettek ki, hasonlóan a BRAF inhibitor-rezisztens sejtvonalakhoz.

Az FBS megvonás hatása a WM983B melanoma sejtek génexpressziós mintázatára (RNS-Seq analízis)

Meghatároztuk az éhezett és a normális sejtenyészési körülmények között tenyésztett sejtek génexpressziós mintázatát RNS-Seq analízis segítségével. Az RNS-Seq adatokat kiértékelve 6531 felülszabályozott és 4890 alulszabályozott transzkriptumot találtunk az FBS megvonást követően WM983B melanoma sejtekben. A legnagyobb expressziós különbséget az *RP11-134F2.8* génnél figyeltük meg (217-szeres változás), mely egy DnaJ_C domént tartalmazó fehérjét kódol. Egy másik megnövekedett expressziót mutató gén az *RP11-618G20.1* (64-szeres változás) volt, mely egy hosszú, nem kódoló RNS-t kódol, és az angiogenezissel mutat összefüggést. Két a sejtek éheztetéssel összefüggő gén *SLCO4C1* (32-szeres változás) és a *PIK3IP1* (14-szeres változás) szintén megnövekedett expressziót mutatott az FBS megvonását követően a WM983B sejtpopulációban. A megváltozott expressziójú gének molekuláris funkcionális jellemzése szerint a gének kalciumion-kötéssel, ioncsatorna-aktivitással és iontranszmembrán transzporter-aktivitással, koleszterin és a szteroid bioszintézisben szerepet játszó, a kalcium jelátviteli és SREBF útvonalakkal vannak kapcsolatban.

A differenciáltan expresszált gének azonosítása HA15-rezisztens melanoma sejtvonalban RNS-Seq analízissel

HA15-rezisztens melanoma sejtvonalak (WM983B^{HA15RES}) létrehozása nem volt különösebben nehéz, mert a sejtek normál sejtenyészési körülmények között nem voltak érzékenyek a 10 μ M HA15 kezelésre. Amikor azonban a hatóanyag koncentrációt 20 μ M-ra és 30 μ M-re növeltük, a sejtek életképessége jelentősen csökkent, és néhány hét múlva a sejtek képesek voltak megbirkózni a

megnövekedett HA15 koncentrációval és stabil rezisztens sejtvonalakká váltak. Az RNS-seq analízis 2802 olyan gént tárt fel, melyek az extracelluláris mátrixhoz, az integrinhez, a kollagénhez, a mikrotubulushoz, a DNS replikációs origó kötődéséhez és a DNS helikáz aktivitáshoz kapcsolódnak és részt vesznek a sejtciklus szabályozásában, a mitotikus prometáfázisban, a testvérkromatidák kohéziójának felbontásában és a DNS szintézisében. A WM983B^{HA15RES} melanoma sejtvonalban a legnagyobb expressziót a fehérjét kódoló *PAPPA2* gén (Pappalysin 2) mutatta, továbbá a listán szereplő számos magasan expresszált gén specifikusan kapcsolódik a gyógyszer-rezisztenciához, mint például az *ABCC9* és az *IL13RA2*.

DISZKUSSZIÓ

A *BRAF* onkogén mutációinak felfedezése a rosszindulatú daganatok különböző típusaiban jelentős előrelépést jelentett a célzott terápiák kifejlesztésében. A bőr melanomákban leggyakrabban a *BRAF* onkogén *V600E* mutációját mutatták ki, mely a daganatok több, mint 40-60 %-ban előfordul és ma már a legfontosabb terápiás célpont az előrehaladott és áttétes daganatokban szenvedő betegek számára. A *BRAF*^{*V600E*} mutáció jelentőségének felismerését követően az új gyógyszerek száma drámai módon bővült, jelentős klinikai sikereket értek el a MAPK jelátviteli útvonal hibás molekuláinak működését gátló inhibitorokkal (vemurafenib, dabrafenib), citotoxikus T-sejt aktivációt kiváltó monoklonális antitest (CTLA-4) alkalmazásával, programozott sejthalál fehérje1 (PD-1/ PD-L1) gátlókkal. Mindezek a terápiás megoldások jelentősen javították az előrehaladott és metasztatikus melanomában szenvedő betegek prognózisát. Ugyanakkor a kezelések sikerét jelentősen beárnyékolja a gyógyszerekkel szemben kialakuló rezisztencia. Annak ellenére, hogy jelentős számú vizsgálat fókuszál a rezisztencia kialakulását meghatározó molekuláris eltérések megismerésére, a pontos mechanizmusok nem teljesen ismertek.

Kutatásaink célja a *BRAF^{V600E}* mutáns fehérjét célzó inhibitor (BRAFi: PLX4720, vemurafenib analóg) növekedés gátló hatásának vizsgálata volt melanoma sejtvonal modellrendszereken, továbbá célunk volt BRAFi-rezisztens sejtvonalak létrehozása, valamint a szerzett BRAFi rezisztencia hátterében álló genomiális és fehérje expressziós változások karakterizálása. Vizsgálataink másik célpontja egy, a közelmúltban szintetizált, endoplazmatikus retikulumban (ER) stresszt indukáló, „anti-melanoma” gyógyszerjelölt molekula (HA15) hatásának vizsgálata volt BRAFi szenzitív és BRAFi rezisztens melanoma sejtvonal modellrendszerekben. Vizsgálataink kezdetén felfigyeltünk arra, hogy az irodalomban leírt sejttenyésztési körülmények távol állnak az optimálistól, ezért célul tűztük ki a HA15 *BRAF^{V600E}* mutációt hordozó melanoma sejtek életképességére, génexpressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatát különböző sejttenyésztési körülmények között. Célunk volt annak tanulmányozása, hogy a HA15 kezeléssel szemben kialakul-e rezisztencia (ami HA15 hatását leíró Cerezo és munkatársai szerint nem alakul ki). Kísérleteink során sikerrel létesítettünk HA15 rezisztens sejtvonalakat, elemeztük a drogra érzékeny és rezisztens sejtvonalak génexpressziós mintázata közötti különbségeket RNAseq analízissel. Vizsgálataink során BRAFi-rezisztens sejtvonalakat hoztunk létre ugyanabból a betegből származó primer és metasztatikus melanoma sejtvonalakból. A négy rezisztens sejtvonal közül három invazívabb volt, mint az eredeti, BRAFi érzékeny sejtvonal. A melanomáról és más daganattípusokról ismert, hogy az epitheliális-mezenchymális tranzíció (EMT) fenotípusát mutatják, amely többek között fokozott invazivitással jár együtt.

Proteome Profiler Human XL Oncology Array alkalmazásával új, a szerzett BRAFi-rezisztenciával összefüggésbe hozható fehérje mintázatot írtunk le. A proteome array 84 daganatspecifikus fehérjéje közül számos, eltérő expressziójú fehérjét találtunk a rezisztens és érzékeny sejtvonalak között. Ugyanakkor ki kell emelni, hogy nyolc fehérje (ANGPTL4, EGFR, ENDOGLIN, FGF2, SERPINE1,

VCAM-1, Survivin és oszteopontin:OPN) expressziója valamennyi rezisztens sejtvonalban azonos irányban változott az érzékeny sejtvonalakhoz képest. Vizsgálatunk egyik érdekes eredménye, hogy mind a négy rezisztens sejtvonalban csökkent az OPN fehérje expressziója. Az OPN bizonyítottan potenciális biomarkernek tekinthető számos daganattípus esetén, expressziója a daganatprogresszióval áll összefüggésben. Gyógyszer rezisztenciával kapcsolatos szerepe még kevésbé tanulmányozott. Megfigyeléseink azt sugallják, hogy az OPN csökkent expressziója a szerzett BRAFi rezisztenciával kapcsolatban állhat, ennek megerősítése további vizsgálatokat igényel.

Az array CGH vizsgálataink során új, BRAFi rezisztenciához kapcsolódó gén kópiaszám változásokat találtunk, melyek minden rezisztens sejtvonalban az *EXT1*, *SAMD12* és *REXO1L2P* géneket érintették. Mindhárom gén megnövekedett kópiaszáma a rezisztencia kialakulását követően megnőtt. Irodalmi adatok szerint az *EXT1* gén szabályozza a tumor sejtek daganat összejszerű viselkedését a doxorubicin-rezisztens emlőrákos sejtekben továbbá elősegíti az EMT-szerű fenotípust kialakulását is.

Megfigyeltük, hogy a gyógyszer-rezisztencia kialakulása mellett a rezisztens melanoma sejtekben a drog megvonását követően BRAFi iránti függőség is kialakul. Modell rendszerünkben a PLX4720 megvonása a rezisztens melanoma sejtvonalak közül 3-ban a sejtek csökkent proliferációját eredményezte. Ez a megfigyelésünk egyrészt összhangban áll azzal a hipotézissel, miszerint a rezisztens sejtek kialakíthatják a gyógyszerfüggőséget, melynek klinikai jelentősége lehet, melyet a célzott kezelés során figyelembe kell venni.

A különböző BRAF és MEK/ERK inhibitorok és azok kombinációjával elért biztató terápiás alkalmazások mellett más molekuláris targeteket célzó gyógyszerek fejlesztése is folyamatban van, ezek célja elsődlegesen a gyógyszer-rezisztencia kialakulásának elkerülése. Cerezo munkacsoportja szintetizált egy ER stresszt indukáló, hatékony, a daganat sejtek proliferációját szelektíven gátló

vegyületet, melyet HA15-nek neveztek el. A gyógyszer hatását melanoma modellrendszerünkön vizsgálva a közölt koncentrációnál *in vitro* körülmények között nem találtuk ugyanazt a hatást, melyet leközöltek, ennek oka, hogy a melanoma sejtvonalak *in vitro* gyógyszeres kezelési körülményei nem voltak optimálisak. A sejtek életképességét normál (10% FBS) és FBS mentes (különböző ideig „éheztetett sejtek”) sejttenyésztési körülmények között vizsgáltuk, a publikáltakkal azonos HA15 koncentráció mellett (10 μ M HA15). Megállapítottuk, hogy kilenc melanoma sejtvonal (köztük 4 BRAFi-rezisztens) közül hét egyáltalán nem volt érzékeny a 10 μ M HA15 kezelésre. Ugyanakkor megfigyeltük, hogy ha a sejteket FBS nélkül tenyésztettük (az irodalomban közölt protokollnak megfelelően), életképességük 14 órás éheztetést követően jelentősen csökkent a drog hozzáadása nélkül is. Mivel az irodalmi adatok szerint a HA15 ER stresszt és autofágiát indukál, meghatároztuk, hogy önmagában a sejtek éheztetése milyen hatással van stressz (*CHOP*, *XBPI* és *BIP*) és autofágia (*DRAM1*, *P62*, *ATG5* és *ATG7*) marker gének expressziójára. Megfigyeltük, hogy a stressz markerek expressziója megnövekedett az „éheztetett” sejtekben HA15 kezelés nélkül is. Az autofágia marker gének expressziós mintázata hasonló volt a HA15-tel kezelt és kezeletlen, de FBS megvonás mellett tenyésztett sejtekben is. Az FBS megvonás számos molekuláris útvonalon keresztül okoz sejt stresszt, ez kísérleti körülmény a leggyakrabban alkalmazott módszer a stressz kiváltására sejtvonalak esetén. Mivel az irodalmi adatok szerint a HA15 hatását 14 órás FBS megvonását követően határozták meg, valamint a kísérletek végig FBS nélkül zajlottak, ez biztosan befolyásolta a sejtek viselkedését. Mindezek a sejttenyésztési/kezelési körülmények önmagukban is autofágia és apoptotikus mechanizmusokat váltott ki; ezért nem ideális kísérleti háttér annak bizonyítására, hogy ezeket a mechanizmusokat kizárólag a HA15 indukálja.

Vizsgáltuk, hogy hogyan változik a sejtek génexpressziós mintázata FBS megvonás mellett (14 óra). RNS-Seq analízissel összehasonlítottuk az optimális

(10% FBS) és FBS nélkül tenyésztett sejtek génexpressziós WM983B melanoma sejtekben. Nagyszámú differenciáltan expresszázó transzkriptet találtunk. A legnagyobb expressziós különbséget az *RP11-134F2.8* génnél mutattuk ki (217 x fold change). Ez a gén az ER DnaJ_C doméntartalmú fehérjét kódolja, mely részt vesz a hibás konformációjú fehérjék kötésében; a DNSJB11 fontos paralógja és a BiP (a HA15 target génje) kofaktora.

Fontos kiemelni, hogy az eredeti publikációval ellentétben HA15-rezisztens sejtvonalat tudtunk létrehozni. Érdekes az a megfigyelésünk, hogy a HA15-rezisztens sejtvonal hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, mint a BRAFi-rezisztens sejtvonalak. Ez nyilvánul abban, hogy a gyógyszer megvonását követően a sejtek proliferációja lecsökkent, továbbá a BRAF inhibitorokkal szembeni rezisztencia egyik mechanizmusa a cél fehérje génjének (mutáns BRAF) túlzott expressziójával jár együtt. A HA15-el szemben kialakult rezisztencia, korábbi eredményeinkhez hasonlóan. a HA15 célgén *BiP* expressziójának dóziszfüggő növekedését eredményezte a HA15-rezisztens sejtvonalban.

Összefoglalva bízunk abban, hogy a fentiekben leírt eredményeink elősegíthetik a BRAFi rezisztencia komplex mechanizmusainak alaposabb megismerését, és hozzájárulnak az új „anti-melanoma” drog (HA15) hatásmechanizmusának pontosabb feltárásához és annak megválaszolásához, hogy a HA15-nek milyen szerepe lehet a melanoma jövőbeni terápiájában.

FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS EREDMÉNYEK

Vizsgálataink alapvető célja két, különböző molekuláris mechanizmussal jellemezhető melanoma sejteket célzó gyógyszer hatásának vizsgálata volt.

BRAF inhibitor kezelés hatására kialakuló rezisztencia molekuláris mechanizmusának vizsgálata melanoma sejtvonal modell rendszerekben

- Sikeresen hoztunk létre BRAFi rezisztens, primer- és metasztatikus melanomákból származó sejtvonal modellrendszereket. Genomikai és proteomikai módszerekkel jellemeztük a szerzett rezisztenciával összefüggő molekuláris változásokat.
- Leírtuk, hogy a gyógyszer megvonása csökkenti a sejtproliferációt a rezisztens sejtvonalakban.
- BRAFi rezisztenciával összefüggésbe hozható, korábban nem vagy kevésbé ismert gén kópia szám eltéréseket találtunk az *EXT1*, *SAMD12* és *REXO1L2P* géneknél.
- Proteome profiler-analízissel megfigyeltük, hogy 6 fehérje (ANGPLT4, EGFR, Endoglin, FGF2, Serpin E1 és VCAM-1) expressziója minden rezisztens sejtvonalban jelentősen megemelkedett. Vizsgálatunk egyik érdekes eredménye, hogy az OPN expressziója valamennyi rezisztens sejtvonalban csökkent (a Survivin mellett), ami arra utal, hogy az OPN expresszió változása egyértelműen összefügg a szerzett BRAFi rezisztenciával, és a BRAFi rezisztencia, korai markere lehet.

A HA15 szelektív melanoma ellenes gyógyszer?

- Sikerült létrehozni HA15 rezisztens sejtvonalat, és megállapítottuk, hogy a HA15 rezisztens sejtek hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a BRAFi rezisztens sejtvonalak.
- Az irodalmi adatokkal ellentétben normál sejtenyésztési körülmények között a HA15 kezelés nem okozza a sejtek életképességének szignifikáns csökkenését. A gyógyszer által kiváltott „anti-melanoma” hatás részben a melanoma sejtek „éhezésének” a következménye, és nem kizárólagosan a gyógyszer hatásával hozható kapcsolatba.
- Az ER stressz és az autofágia markerek kvantitatív mérésével megállapítottuk, hogy a HA15 nem önmagában váltja ki az ER stresszt, hanem a sejtek FBS megvonás mellett történő tenyésztése és a HA15 együttes

hatásának az eredménye. Megfigyeltük a HA15 célfehérje (BiP) fokozott expresszióját dózisfüggő mértékben a rezisztens sejtvonalakban, ami arra utal, hogy a *BiP* gén túlzott expressziója szerepet játszhat a HA15 rezisztencia kialakulásában.

- A gyógyszer megvonása után a sejtek csökkent proliferációval reagáltak, valószínűleg azért, mert nemcsak a HA15-tel szembeni rezisztencia, hanem a gyógyszer függőség is kialakult a sejtekben.

Összefoglalva, sikeresen létrehoztunk gyógyszer-rezisztens melanoma sejtvonalakat két eltérő hatásmechanizmussal jellemezhető gyógyszer alkalmazásával. Új, a BRAF inhibitor rezisztencia kialakulásával összefüggő genomiális és fehérje expressziós változásokat találtunk. Egy új „melanoma ellenes” gyógyszerjelölt molekula *in vitro* karakterizálása során, megállapítottuk, hogy a drog hatása inkább mérsékelt, mint szignifikáns melanoma sejtekre, továbbá az alkalmazott koncentrációnál nem szelektív hatású, normál melanociták életképességét is csökkenti. Az irodalmi adatokkal ellentétben a melanoma sejtek a HA15 kezelés során rezisztenciát alakítanak ki. További vizsgálatokra van szükség a HA15 daganat ellenes hatásának tisztázása érdekében.



Nyilvántartási szám: DEENK/42/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szász István

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szász, I.**, Koroknai, V., Patel, V., Hajdú, T., Kiss, T., Ádány, R., Balázs, M.: Cell Proliferation Is Strongly Associated with the Treatment Conditions of an ER Stress Inducer New Anti-Melanoma Drug in Melanoma Cell Lines.
Biomedicines. 9 (2), 1-19, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9020096>
IF: 4.717 (2019)
2. **Szász, I.**, Koroknai, V., Kiss, T., Vízkeleti, L., Ádány, R., Balázs, M.: Molecular alterations associated with acquired resistance to BRAFV600E targeted therapy in melanoma cells.
Melanoma Res. 29 (4), 390-400, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0000000000000588>
IF: 2.75

További közlemények

3. Koroknai, V., **Szász, I.**, Hernandez, V. H., Fernandez, J. N., Cuenin, C., Herceg, Z., Vízkeleti, L., Ádány, R., Ecsedi, S., Balázs, M.: DNA hypermethylation is associated with invasive phenotype of malignant melanoma.
Exp. Dermatol. 29 (1), 39-50, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.14047>
IF: 3.368 (2019)
4. Koroknai, V., Patel, V., **Szász, I.**, Ádány, R., Balázs, M.: Gene Expression Signature of BRAF Inhibitor Resistant Melanoma Spheroids.
Pathol. Oncol. Res. 26 (4), 2557-2566, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-020-00837-9>
IF: 2.826 (2019)





5. Balázs, M., Koroknai, V., **Szász, I.**, Ecsedi, S.: Detection of CCND1 Locus Amplification by Fluorescence In Situ Hybridization.
In: The Retinoblastoma Protein. Ed.: Pedro G. Santiago-Cardona, Springer Science+Business Media, New York, NY, 85-100, 2018.
6. Vízkeleti, L., Kiss, T., Koroknai, V., Ecsedi, S., Papp, O., **Szász, I.**, Ádány, R., Balázs, M.: Altered integrin expression patterns revealed by microarray in human cutaneous melanoma.
Melanoma Res. 27 (3), 180-188, 2017.
IF: 3.135
7. Koroknai, V., Ecsedi, S., Vízkeleti, L., Kiss, T., **Szász, I.**, Lukács, A., Papp, O., Ádány, R., Balázs, M.: Genomic profiling of invasive melanoma cell lines by array comparative genomic hybridization.
Melanoma Res. 2, 100-107, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0000000000000227>
IF: 2.615

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 19,411

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,467

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, 2021.02.02.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki elsősorban témavezetőmnek, Dr. Balázs Margit egyetemi tanárnak mindazért a támogatásért és bölcsességért, mellyel doktori tanulmányaimat irányította.

Köszönöm Dr. Ádány Róza egyetemi tanárnak, hogy tanulmányaimat MTA Népegészségügyi Kutatócsoport kereteiben végezhettem és munkámat folyamatosan támogatta.

Köszönöm a kísérletek, elemzések során nyújtott kiemelkedő segítségét Koroknai Viktóriának, Kiss Tímeának, Vikas Patelnek és Jámbor Krisztinának.

Köszönöm a támogatását az Általános Orvostudományi Kar Népegészség- és Járványtani Intézet munkatársainak, különösen Kovács Györgyné asszisztensnek.

Végül szeretnék köszönetet mondani családomnak a támogatásért és türelemért, amit felém tanúsítottak doktori tanulmányaim során.

Munkámat támogatta az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA K112327), GINOP-2.3.2-15-2016-00005 projekt és az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-3 és ÚNKP-19-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Program. A munka az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.