

Állatorvostudományi Egyetem  
Biológiai Intézet

**A RAS jelátviteli hálózat aktivációjának vizsgálata BRAF  
mutáns melanóma sejtekben**

Készítette:

***Soós András Áron***

Témavezető:

*Dr. Garay Tamás Márton*, tudományos munkatárs  
MTA-SE Molekuláris Onkológia Kutatócsoport  
Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet

Belső konzulens:

*Dr. Vili Nóra*, tudományos segédmunkatárs  
ÁTE, Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

Budapest, 2017.

## **Tartalomjegyzék**

1. Rövidítések jegyzéke .....	3
2. Bevezetés .....	4
2.1. A daganatos betegségek .....	4
2.2. A malignus melanóma .....	4
2.3. A daganatok molekuláris háttere általában .....	5
2.3.1. (Proto)onkogének .....	5
2.3.2. (Tumor)szupresszor gének .....	6
2.4. A melanómában érintett molekuláris jelpályák .....	6
2.4.1. TKR – RAS – MAPK jelátvitel .....	6
2.4.2. TKR – RAS – PI3K-AKT jelátvitel .....	8
2.4.3. Egyes tumorokban található RAS, RAF mutációk .....	9
2.5. Molekulárisan célzott terápiák .....	9
2.5.1. Lehetséges molekuláris célpontok .....	10
2.5.2. Vemurafenib .....	10
2.6. Gyógyszer rezisztencia .....	11
2.6.1. Vemurafenibbel szembeni rezisztencia .....	11
2.7. A kutatócsoport vemurafenib rezisztenciára irányuló korábbi eredményei .....	12
3. Célkitűzések .....	13
4. Anyag és módszertan .....	14
4.1. A vizsgált sejtvonalak .....	14
4.2. A melanóma sejtek fenntartás .....	14
4.3. SRB assay .....	14
4.4. Szakirodalmazás .....	16
4.5. Immunoblot .....	16
4.6. Statisztika .....	17
5. Eredmények .....	18
5.1. SRB .....	18
5.2. Szakirodalom .....	19
5.3. Immunoblot .....	20
5.3.1. MAPK .....	20
5.3.2. PI3K – PTEN/AKT .....	22
5.3.3. Változás a RAS downstream effektorok relatív aktivációjában .....	25

5.3.4. Migrációval kapcsolatos fehérjék.....	26
6. Diskusszió.....	28
6.1. SRB.....	28
6.2. Immunoblot.....	29
7. Következtetések.....	31
8. Összefoglalás.....	32
9. Summary.....	33
10. Irodalomjegyzék.....	34
11. Köszönetnyilvánítás.....	38
12. Mellékletek.....	39

## **1. Rövidítések jegyzéke**

ATP	adenozin-trifoszfát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	dezoxiribonukleinsav
ECL	enhanced chemiluminescence
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERK	extracellular-signal regulated kinases
FBS	fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor
GAP	GTPase activating protein
GDP	guanozin-difoszfát
GEF	guanine-nucleotide exchange factor
GTP	guanozin-trifoszfát
HGF	hepatocyte growth factor
IGFR	insulin-like growth factor
MAPK	mitogén aktivált protein kinázok
p- előtag	foszfo- (pl. p-Erk)
PBS	phosphate-buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR $\beta$	platelet-derived growth factor receptor $\beta$
PSA	penicillin, streptomycin, ampicillin
PVDF	poli-vinilidén-difluorid
SDS	szódium-dodecil-szulfát
SRB	sulforhodamine-B
TBST	tris-buffered saline Tween20 detergenssel
TKR	tirozin-kináz receptor

## **2. Bevezetés**

### ***2.1. A daganatos betegségek***

Mai napig a vezető halálokok közé tartoznak a tumoros elváltozásokból adódó halálozások, a szív- és érrendszeri betegségek mellett, mind Magyarországon, mind az egész világon (**1. melléklet**). Az esetek nagy többségében nem az elsődleges, primer tumorok, hanem azok áttétei, metasztázisai okozzák a halált (Sporn, 1996; Hanahan and Weinberg 2000).

Daganatok akkor keletkeznek, ha a sejtek fölhalmozódnak, melyek a gazdaszervezet számára előnytelenek, sőt sokszor veszélyesek és attól függetlenek. Ez azért valósulhat meg, mert a sejtképzés és a sejtpusztulás közti egyensúly, homeosztázis felborul. Ennek hátterében a sejtképzés és a sejtpusztulás szabályozásában kulcsszerepet játszó gének hibái és az e szabályozásokat befolyásoló epigenetikai változások állnak (Niederhuber, 2014.). A daganatokat tehát ilyen értelemben genetikai betegségeknek tekinthetők.

### ***2.2. A malignus melanóma***

A melanoma malignum az a rákos megbetegedés, mely a pigmentsejtek, melanociták rosszindulatú transzformációja esetén alakul ki. Leggyakrabban a hám melanocitáiból fejlődik a kután melanóma, valamint extrakután formája is létezik. Ép bőrön is keletkezhet, de az esetek jelentős része pigmentált naevusból (anyajegyből) indul ki.

Előfordulása, azaz incidenciája hazánkban és világszerte is emelkedik (Siegel, 2016) (**2. melléklet**), mely összefüggésbe hozható az ózonréteg vékonyodásával és az ultraibolya (UV) sugárzás megnövekedésével, ennek való kitétséggel. A malignus melanomák közel 10%-ában familiaritás, örökletesség is megfigyelhető.

Diagnosztikában melanóma gyanúját kelti, ha a pigmentált lézió, kóros szöveti elváltozás (1) alakja, felszíne szabálytalan, aszimmetrikussá válik, (2) széle a környezetétől bizonytalanul, szabálytalanul határolódik el, (3) többféle színárnyalattal rendelkezik, (4) átmérője több, mint 5-6 mm (Gilde, 1996).

A melanomát szövettani vizsgálatokkal kell igazolni, valamint a tumor teljes excízióját követően két prognosztikai faktoral, a Clark szinttel és a Breslow féle maximális tumorvastagsággal lehet jellemezni (Balch, 1978; Breslow, 1979).

### **2.3. A daganatok molekuláris háttere általában**

A daganatok kialakulását több gén hibája okozza, a szabályozás befolyásolhatatlan zavarához különböző, változatos génhibák felhalmozódása elengedhetetlen. Ezek a hibák a daganatok kialakulásán, növekedésén és terjedésén kívül a számos lehetséges terápiás beavatkozásra adott reakciót, választ is nagymértékben befolyásolják (Strausberg, 2004). A tumorsejtek felhalmozódásának egyik oka a sejtosztódás, proliferáció szabályozásának hibája. Ez vagy azért alakul ki, mert a sejtet és utódait folyamatosan éri (vagy legalább megnövekedett mértékben) az osztódást aktiváló jel, vagy, mert a proliferáció gátlása eltűnik (vagy legalább csökken). A daganatsejtek felhalmozódásának másik oka a programozott sejthalál, apoptózis elmaradása. E két ok a daganatsejteken belül akár egyszerre is megjelenhetnek (Hanahan, 2011).

#### 2.3.1. (Proto)onkogének

A sejtproliferációt elősegítő legfontosabb géncsaládot protoonkogéneknek nevezzük, ezek aktiválódásukkor, azaz a génhiba kialakulásakor onkogénné válnak a tumorokban. Egy részüknek van retrovirális megfelelője, azonban a többségüknek nincs (Todd, 1999). Már az onkogén egyik alléljának a mutációja is vezethet a fehérje-termék funkcionális vagy szerkezeti hibájához. A humán tumorokban sok onkogén, onkogéncsalád ismert, ugyanakkor daganattípusonként előfordulási gyakoriságuk igen eltérő lehet. Főleg a jelátvitelben vesznek részt a (proto)onkogének, lehetnek növekedési faktorok (EGF, PDGF, FGF1-7), membrán- és citoplazmatikus receptorok (EGFR1, IGF1R, KIT), jelátvivő molekulák (RAS, SRC, RAF), vagy transzkripciós faktorok (FOS, MYC) (Adamson, 1987).

A protoonkogének meghibásodásakor új termék (fehérje) keletkezik vagy a normális termékből jön létre több. Ezek a génhibák segítik a sejt túlélését és szaporodását, illetve az apoptózis esélyét csökkentik. Az onkogénné vált protoonkogénekben „gain of function” (funkciónyerés) jellegű mutáció történik, mely a normális szabályozástól független funkció megjelenéséhez vezet. A receptorok meghibásodása esetén a legfontosabb változás a funkcióban az, hogy ligand nélkül is képesek működni. A jelátvivőknél az okozza a problémát, hogy a fehérje jeladás után nem inaktiválódik, folyamatosan bekapcsolva marad. A transzkripciós faktorok esetén akkor jelentkezik probléma, ha megváltozik a specificitásuk és nem csak azokra a génekre hatnak a faktorok, amelyekre a normális szabályozás szerint kellene (Carlo, 2008).

### 2.3.2. (Tumor)szupresszor gének

A szupresszor gének gátló funkciót látnak el, amely elsődlegesen a proliferáció gátlása. A tumoroknak az az előnyös, ha az apoptózis vagy a DNS-hibajavítás elmarad, melyet a szupresszor gének indukálnak. A szupresszor gének mutációik révén alakulnak ki a tumorszupresszor gének. A hibát ez esetben „loss of function” (funkcióvesztés) jellegű mutációk jelentik. Ezeknek a géneknek mindkét alléljának károsodnia kell, hogy megjelenjen az adott fenotípus. Ez megtörténhet „loss of heterozygosity” (heterozigótaság elvesztése) révén: amikor a jó allél eltűnik deléción vagy a promóter metilálása révén, és csak egy hibás allél marad (Beroukhim, 2006). Vannak olyan szupresszor gének, melyek az adott sejttípus túléléséért, fennmaradásáért felelnek („gate-keeper” funkció) és vannak, amelyek a genetikai információ állandóságának a biztosításáért, a DNS épségéért („care-taker” funkció) felelősek (Sherr, 2004).

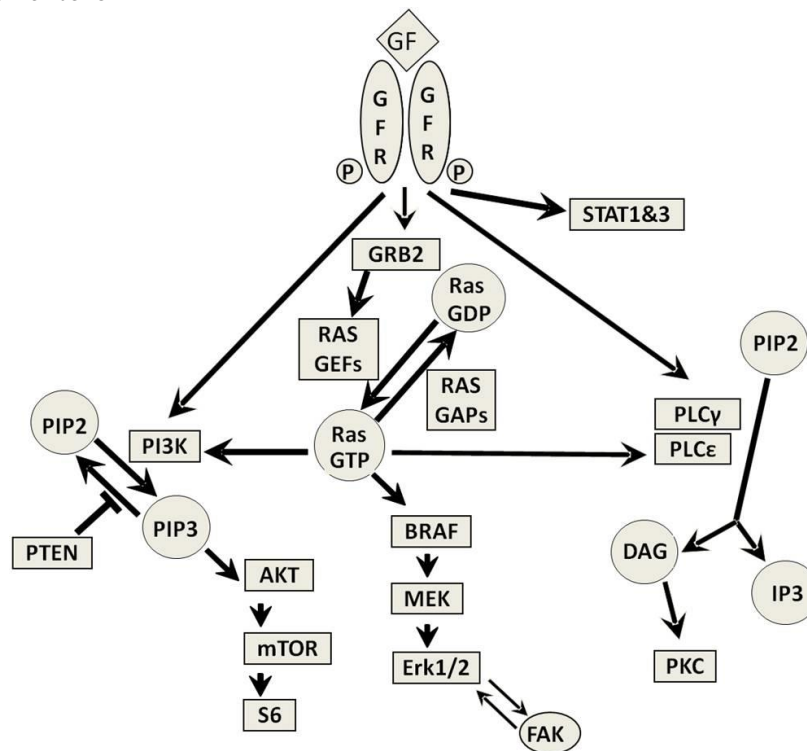
### **2.4. A melanomában érintett molekuláris jelpályák**

A jelátviteli utak fehérjék egymás utáni aktiválásából állnak, ami foszforilációt és defoszforilációt jelent elsősorban. A daganatok szempontjából azok a jelátviteli utak használhatóak, melyek a proliferációt serkentik és az apoptózist gátolják. Az egyes daganattípusokban más és más jelpályák dominálnak, részben a kiinduló sejttípushoz hasonlóan (Kopper és Tímár, 2007).

#### 2.4.1. TKR – RAS – MAPK jelátvitel

Számos molekulárisan komplex jelátviteli út szabályozza a sejtek proliferációját és migrációját. Ilyen az evolúciósan konzervatív TKR (tirozin-kináz receptor) – RAS – MAPK (mitogén aktivált protein kinázok) jelátviteli út (**1. ábra**), melyben számos humán daganatos betegség esetén mutáció található, így okozva a szabályozás zavarát (Carlomagno, 2014). A kémiai polipeptid növekedési faktorok fontos szabályozói a sejtosztódásnak és migrációnak (Carpenter and Cohen, 1990), melyek nagyon gyakran a tirozin-kináz receptorokon keresztül hatnak (pl. EGF – epidermal growth factor, PDGF – platelet-derived growth factor, FGF – fibroblast growth factor) (Heldin, 1995).

**1. ábra.** Növekedési faktor jelátviteli út a RAS központi elemmel, valamint a fő downstream.effektorok



Az ábrán látható a RAS fehérjétől downstream elhelyezkedő két párhuzamos útvonal, a MAPK és PI3K-AKT jelátviteli út (Tímár és mtsai., 2010. nyomán).

A TKR-ok felépítésére jellemző, hogy egy extracelluláris ligand-kötő helyből, egy transzmembrán doménből és két intracelluláris egységből állnak, azaz katalitikus és regulátor egységből. A TKR-ok működését tekintve a ligand (pl.: mitogén - növekedési faktor) bekötődése a receptor dimerizációjához vezet. Ezt követi a katalitikus domén aktiválódása és a tirozin autofoszforylációja. Az adapter fehérje komplexek (pl.: GRB2) vezetnek az aktivációs szignált a sejtmembrán citoplazma felőli oldalára és aktiválják az inaktív RAS-t (Lowenstein, 1992). A RAS protoonkogén fehérjecsald (HRAS, NRAS, KRAS1, KRAS2) tagjainak C-terminálisán lipidfarok (farnezil-, palmitoil- és geranilgeranil-csoportokból) található, ez lehetővé teszi a sejtmembrán citoplazmatikus felszínéhez való kötődést, valamint a RAS képes a guanozin nukleotidok hasítására. (Reuter, 2000; Malumbres, 2003). Inaktív állapotban GDP-t (guanozin-difoszfát) köt a RAS fehérje, aktív állapotban pedig GTP (guanozin-trifoszfát). Az aktiválást, „bekapcsolást”, vagyis a GTP RAS-hoz kötését a GEF (guanine-nucleotide exchange factor) stimulálja. A GTP bontását a RAS fehérje „kikapcsolásához” a RAS saját GTPáz aktivitása végzi, amit a GAP (GTPase activating protein) segít (Gilman, 1987; Karnoub, 2008). RAS mutációt hordozó



tumorsejtekben a RAS-fehérje képes a GDP-t GTP-re cserélni, viszont GTPáz aktivitását elveszti, így állandóan aktív, bekapcsolt állapotban van. Ezt az onkogén mutációk okozzák, melyek a RAS katalitikus aktivitásért felelős részét módosítják.

A RAS-tól „downstream” elhelyezkedő MAPK jelátviteli részlet első effektora a RAF protoonkogén család. A RAF szerin-treonin kináz család három tagja az ARAF, BRAF és CRAF. Közülük a BRAF fehérjének a génje kiemelkedően gyakran szenved mutációt humán tumorokban (Cargnello, 2011). Mindez azzal magyarázható, hogy a BRAF csak egy aminosav csere révén is függetlenedhet az „upstream” jelektől, míg az ARAF és CRAF esetén több genetikai lézió felhalmozódása is szükséges az onkogén átalakuláshoz. A BRAF kinázon az esetek 73-90%-ában a 600. kodonon valin-glutaminsav szubsztitúció (V600E) történik, ami a folyamatos jeltovábbítást okozza monomerként (McCubrey, 2007). Ugyanakkor más mutációk is előfordulhatnak: R461I, I462S, G463E, D549G, G469A/E. A BRAF-nak a V600E mutációja megtalálható az anyajegyek (benignus naevus) 84%-ában, ami arra enged következtetni, hogy e jelátviteli útvonal aktivációja szükséges, de nem elegendő a rosszindulatú transzformációhoz (Rubstein, 2010).

Az aktivált RAS megköti a RAF-ot, így az foszforilálódik, majd a RAF tovább aktiválja, azaz foszforilálja a jelátvitel következő tagját, a MEK-et, mely egy kettős specificitású kináz (képes foszforilálni a tirozint és a szerin/treonint is). Ezután az Erk1/2 (extracellular-signal regulated kinases) foszforiláció következik, majd további szubsztrátok aktiválódnak, melyek többféle sejtfunkciót szabályoznak, például a transzkripciót a sejtmagban (Lufen, 2001).

#### 2.4.2. TKR – RAS – PI3K-AKT jelátvitel

A RAS-tól szintén „downstream” elhelyezkedő másik jelátviteli út a PI3K-AKT útvonal (**1. ábra**). Az apoptózis elkerülése a tumorsejtek számára – a proliferáció mellett – nagyon fontos, s ezt a szerepet többek között a PI3K-AKT útvonal valósítja meg (Chang, 2003). Az aktivált RAS „bekapcsolhatja” a PI3K útvonalat, melynek sokat vizsgált downstream elemei az AKT és S6 fehérjék, valamint az útvonal fontos szupresszora a PTEN fehérje. Más fehérjék is kapcsolódhatnak ehhez a jelátviteli úthoz (RHO család tagjai), melyek a citoszkeleton szerveződését, a sejt tapadási tulajdonságait szabályozzák, ezzel a daganatsejtek inváziós készségét, alakját befolyásolják (Takai, 2001).

Az EGF és FGF2 által aktivált TKR – RAS – MAPK útvonal különösen fontos malignus melanóma esetén, mert e jelátviteli útvonalon található a BRAF és NRAS onkogén

mutációk, melyek 40-70%, valamint 10-30%-ban megtalálhatók a melanomás páciensekben (Davies, 2002; Saldanha, 2006).

#### 2.4.3. Egyes tumorokban található RAS, RAF mutációk

Más tumor típusoknál is gyakran találunk ezt a jelátviteli utat érintő mutációkat. A RAS gén 90 %-ban sérült hasnyálmirigyrákban (Almoguera, 1988), 30 %-ban tüdőrákban (Rodenhuis, 1988), 50%-ban vastag- és végbélrákok esetén (Bos, 1987; Vogelstein, 1988), 33%-ban epevezeték rákban (Tímár, 2010), 17%-ban a juvenilis mielomonocitás leukémiában (Flotho, 1999) és 19%-ban akut mieloid leukémiában (Stirewalt, 2001).

A BRAF gén mutációja mintegy 18%-ban figyelhető meg kolorektális daganatokban, 11%-ban gliomákban, 3%-ban tüdő adenokarcinómában, 4%-ban petefészek karcinómában, 2%-ban mellrákban és 14%-ban máj daganatban. A vizsgálatban azonban nem találtak BRAF mutációt a vizsgált neuroblastoma, húgyhólyag rák, leukémia és limfóma, méhnyak karcinoma, vesesejt karcinoma, pancreas karcinoma, prosztata karcinoma, gyomor karcinoma, here karcinoma és méh karcinoma sejtvonalakban (Davies, 2002). Továbbá pajzsmirigy daganat esetén 27%-ban szenved mutációt a BRAF gén (Tímár, 2010).

#### **2.5. Molekulárisan célzott terápiák**

A daganatok molekuláris hátterének alapjainak feltérképezése megnyitotta a lehetőséget, hogy ezt a tudást az orvoslásban, klinikumban is felhasználják a prevenció (megelőzés), diagnosztika és a terápia területén.

A molekulárisan célzott terápiák lényege, hogy specifikusan, csak a tumorsejtekre jellemző, hibás, de működőképes fehérjéket pusztítja, gátolja a gyógyszer. Ezek a célpont fehérjék általában a jelátviteli útvonalak onkogénjei: receptorok, downstream jelátvivők (Weinstein, 2006). A gátlás megvalósulhat kis molekulásúlyú inhibitorral, amely a fehérje aktív centrumaihoz kötve gátolja a működést, vagy az adott receptorokat kötő antitesttel. Előbbire jó példa az mTOR kinázt célzó temsirolimus (Klumpen, 2010). illetve a dolgozat témájául szolgáló vemurafenib. Az ellenanyag-terápiák közül az egyik legelterjedtebb az EGFR1-et gátló cetuximab (Bou-Assaly, 2010).

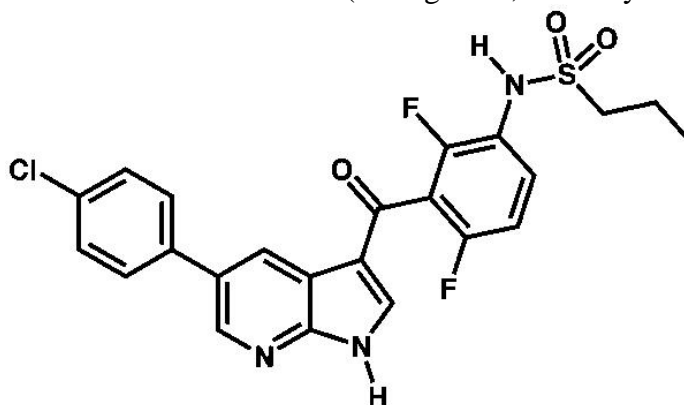
### 2.5.1. Lehetséges molekuláris célpontok

Lehetséges molekuláris célpontok azok, melyek szerkezetük révén jól megközelíthetőek és gátlásuk, megkötésük révén elérhető az adott molekula funkcióváltozása. Ilyen szerkezet többek közt az enzimműködést ellátó katalitikus domén, mely gyakran egy kis üreg, hasadék vagy zsebcske térszerkezeti és ide specifikusan kötődhet az inhibitor. Természetesen a gyógyszerrel támadható szerkezetből és a katalitikus funkcióból nem következik biztosan, hogy jó célpont lesz az adott fehérje. A kinázok jó terápiás célpontok, mert a daganatok osztódásához, túléléséhez igen fontosak, továbbá térszerkezetüket tekintve is jól gátolhatóak (Johnson, 1998; Zhang, 2009).

### 2.5.2. Vemurafenib

Ilyen molekulárisan célzott gátlószer a vemurafenib (Zelboraf, PLX4032) (**2. ábra**), mely szelektív, a V600E pontmutációval rendelkező BRAF protein-kináz inhibitora (kisebb mértékben más, a BRAF 600. kodonját érintő mutációra is szelektív, pl. V600K). Ezt a gyógyszert 2011-ben törzskönyvezte az Amerikai Gyógyszer- és Élelmiszerügyi Hatóság (FDA). A vemurafenibet a 600-as kodon mutációk által aktivált BRAF kinázzal rendelkező, metasztatikus melanómában szenvedő betegek kezelésére törzskönyvezték (Bollag, 2012).

**2. ábra.** A vemurafenib molekula szerkezete (Bollag et al., 2010. nyomán)



Működését tekintve, a vemurafenib a mutálódott BRAF kináz-aktivitását gátolja, úgy hogy a kináz ATP-kötő helyére köt (Bollag, 2010). Ezzel a foszforilációs kaskád gátlás alá kerül, végül a sejtproliferáció csökken. Noha a vemurafenib kezelés a terápia elején hatékonyabb,

mint a korábban használt dacarbazin, mégis a későbbiekben rezisztencia alakul ki a betegekben a gyógyszer ellen (Tsao, 2012; Lito, 2013).

## ***2.6. Gyógyszer rezisztencia***

Számos példát ismerünk, amikor bizonyos gyógyszeres kezelések hatékonysága a kezelés folyamán lecsökken vagy megszűnik, ami komoly kihívás elé állítja az orvostudományt. Ilyen eset lehet, hogy a szer koncentrációja csökken a sejtben transzportrendszereken keresztül, pl. ABC transzporterek (Szakács, 2004; Negoro, 2007), vagy a szer fokozottan inaktiválja a sejt (Parker, 1991). Továbbá lehetséges, hogy a terápiás szer által kiváltott károsodást fokozottan lesz képes javítani a sejt (Martin, 2008), vagy alternatív jelátviteli utak aktiválódása révén élnek túl a sejtek (Huang, 2011).

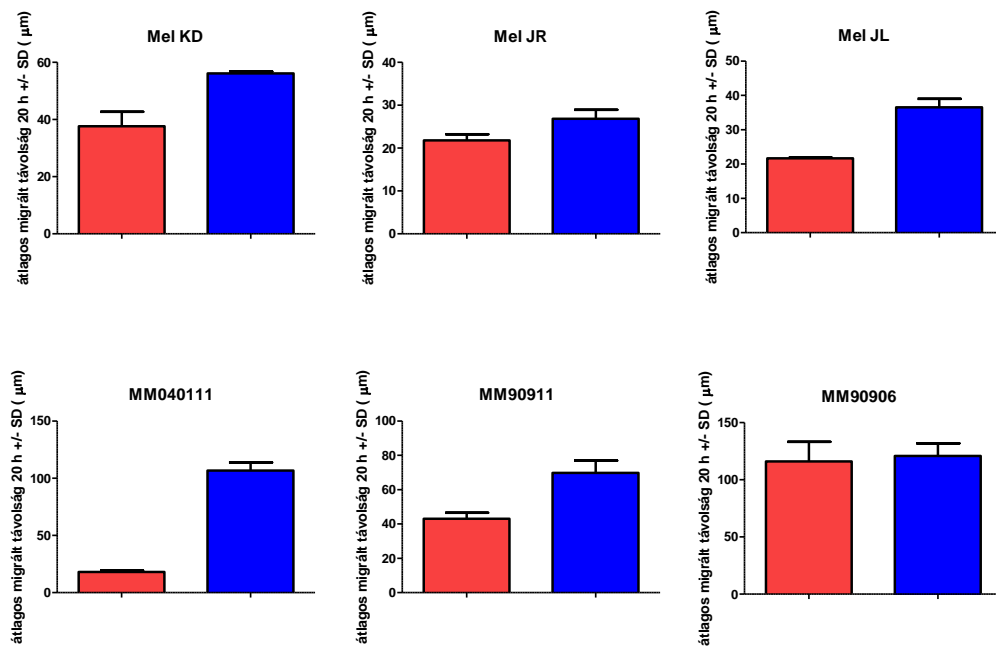
### 2.6.1. Vemurafenibbel szembeni rezisztencia

Amint fentebb említettem, a vemurafenib ellen rezisztencia alakul ki a terápia során. Noha nem rég óta használják ezt a szelektív gátlószert a klinikumban, már ismertek bizonyos rezisztencia mechanizmusok. Az egyik lehetséges mód, hogy a sejtek PDGFR $\beta$ -t túlexpresszálnak a sejt felszínén, ezzel alternatív túlélési jelpályákat aktiválnak vagy az NRAS fehérjén keletkeznek mutációk, mellyel a MAPK pályát reaktiválják (Nazarian, 2010). Egy másik leírt rezisztencia mechanizmus, hogy a sejt EGFR-t expresszál nagy mennyiségben, ezzel megnövelve a túlélést és a proliferációt serkentő jelátviteli utakon a szignalizációt (Gross, 2015). Továbbá, a tumort körülvevő sztróma sejtei is közvetíthetik a rezisztenciát. A sztróma sejtek HGF-et (hepatocyte growth factor) szekretálhatnak, mely a tumorsejtek HGF receptorain keresztül a MAPK és PI3K-AKT jelpályát stimulálhatja (Straussman, 2012). Szintén a vemurafenib rezisztencia egyik módja, hogy a BRAF-tól downstream található MEK aktiváló mutációt szenved, ezzel fokozva a proliferációt (Wagle, 2011) vagy az Erk1/2 reaktiválódik (Paraiso, 2010).

## 2.7. A kutatócsoport vemurafenib rezisztenciára irányuló korábbi eredményei

A kutatócsoport korábban videomikroszkópos vizsgálatokat végzett hat szenzitív-rezisztens melanóma sejtvonalpáron, melyeket én is a vizsgálataimban használtam. Arra az eredményre jutottak, hogy a rezisztencia kialakulása során a tumorsejtek migrációs aktivitása is megnövekszik kisebb-nagyobb mértékben (**3. ábra**), és a migrációs aktivitás növekedése kapcsolatba hozható a metasztázis képzés képességével.

**3. ábra.** A hat szenzitív-rezisztens melanóma sejtvonalpár migrációs aktivitása.



A sejtek 20 óra alatt átlagosan megtett távolsága µm-ben mérve ( $\pm$ SD). A vörös oszlopok az adott sejtvonaltól szenzitív/pre sejtpopulációhoz tartozó eredményeket, a kék oszlopok a rezisztens/post sejtpopulációk eredményeit mutatja.

### **3. Célkitűzések**

Mivel a gyakori V600E mutáns melanóma kezelésére használható szelektív inhibitor, a vemurafenib ellen rezisztencia alakul ki, ennek a jelenségnek a molekuláris háttéréről szeretnék pontosabb képet kapni, ami hozzájárulhat egy hatékonyabb kezelés kidolgozásához. Szakdolgozatom készítése során az alábbi célkitűzéseim voltak:

1. Meghatározni a vemurafenibbel szemben mutatott érzékenység változását a hat pár szenzitív-rezisztens humán melanóma sejtvonalon.
2. Leírni a rezisztencia kialakulása során a RAS jelátviteli hálózat aktivációs mintázatában bekövetkezett változásokat.
3. Megvizsgálni a rezisztens sejtpopulációkban tapasztalható megnövekedett migrációs aktivitásért felelős molekuláris változásokat.

## **4. Anyag és módszertan**

### ***4.1. A vizsgált sejtvonalak***

Kísérleteimben hat betegből származó szenzitív-rezisztens humán melanóma sejtvonalpárt használtam (**1. táblázat**). A három *in vitro* sejtvonal rezisztens sejtpopulációit mesterségesen, növekvő vemurafenib koncentráció jelenlétében tartva hozták létre koppenhágai együttműködő partnereink a szenzitív sejtekből. Egy osloei együttműködés keretében jutottunk hozzá a három *in vivo* sejtvonalpárhoz, melyek a betegek kezelés előtti és relapszus utáni biopsziáiból lettek létrehozva.

<i>In vivo</i> sejtvonalak		<i>In vitro</i> sejtvonalak	
Szenzitív	Rezisztens	Szenzitív	Rezisztens
MelKD pre	MelKD post	MM040111 sens	MM040111 res
MelJR pre	MelJR post	MM90911 sens	MM90911 res
MelJL pre	MelJL post	MM90906 sens	MM90906 res

**1. táblázat.** A kísérleteimben használt hat szenzitív-rezisztens humán melanóma sejtvonalpár

### ***4.2. A melanóma sejtek fenntartás***

A melanóma sejteket 10% FBS (fetal bovine serum) és 1% PSA (penicillin, streptomycin, amphotericin) tartalmú DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sejtenyésztő-folyadékban tartottam standard sejtenyésztő flaskákban 5% CO<sub>2</sub> tartalmú, telített páratartalmú légkörben 37 °C hőmérsékleten.

### ***4.3. SRB assay***

Az SRB (sulforhodamine-B) életképességi assay-t a vemurafenibnek a tumor sejtekre gyakorolt rövidtávú hatásának a vizsgálatára használtam. A sejtvonalak szenzitív-rezisztens voltak, azaz a vemurafenibbel szemben mutatott érzékenységet SRB életképességi assay-jel vizsgáltam. 5000 sejtet – melyet Bürker-kamrában számoltam meg – osztottam ki lyukakként 96-lyukú sejtenyésztő lemezre. 24 órán át inkubáltam a sejteket, hogy

letapadhasanak az edény aljára. A tápfolyadék párolgásának elkerülésére PBS-sel töltöttem fel a 96-lyukú sejtenyésztő lemez szélső lyukait, mintegy „pufferzónaként”. Majd tápfolyadékot cseréltem, hogy kezelhessem a melanóma sejteket. Hígítási sort készítve a terápiás szerből, 72 órára vemurafenibbel kezeltem a sejteket a növekvő koncentrációkkal, ahogy a **4. ábrán** is láthatóak (0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15  $\mu\text{M}$ , valamint vemurafenibet nem tartalmazó tápfolyadék, kontroll).

**4. ábra.** SRB assay kísérleti elrendezés.



Életképességi vizsgálat 96 lyukú sejtenyésztő lemezen. Láthatóak a vemurafenib kezelési koncentrációk, valamint a szélső, a tápfolyadék párolgásának minimalizálását célzó, PBS-sel feltöltött lyuk-sor.

A kezelés után az elpusztult sejteket kimostam, eltávolítottam PBS-sel. Az életben maradt és letapadt sejteket 10%-os triklórecetsavval a lyukak aljához fixáltam. A sejtek összfehérjetartalmát SRB-vel megfestettem, majd a fehérjéhez nem kötött festéket 1%-os ecetsavval lemostam és szárítás után a csapadékot 10 mM-os Tris pufferben feloldottam. Az így létrejött oldatot 570 nm-en fotometráltam, s a kapott adatokból, mely adatok az életben maradt sejtek összfehérje mennyisége, elkészítettem az egyes sejtvonalak relatív életképességét ábrázoló görbéjét és meghatároztam a GI50 értékeket. A GI50 érték az a koncentráció, ahol az adott sejtpopulációnak az 50%-ának gátolt a proliferációja, osztódása.



#### **4.4. Szakirodalmazás**

A kutatócsoport korábbi micro-array vizsgálatai alapján 142 fehérjéről kaptunk információt, melynek expressziója és aktiváltsága nagymértékben megváltozik ezekben a melanóma sejtvonalakban a rezisztencia kialakulásakor, valamint a migrációs aktivitás megnövekedésekor. A micro-array vizsgálatok alapján és szakirodalmazás segítségével választottam ki az általam vizsgálni kívánt fehérjéket, melyek a migrációs aktivitás megnövekedésében szerepet játszhatnak. Olyan fehérjéket, fehérjecsaládokat kerestem a Google Scholar és Pubmed adatbázisokban, melyek már leírtak más tumor típusokban, kapcsolatba hozhatóak gyógyszer rezisztenciával, valamint szerepet játszanak sejtmozgásban, de még nincs sok eredmény ezekkel kapcsolatban.

#### **4.5. Immunoblot**

A rezisztenciával kapcsolatba hozható növekedési jelátvitel effektorait, valamint a rezisztens sejtvonalakban megfigyelt migrációs aktivitás növekedéséért felelős fehérjék expresszióját és aktiváltságát immunoblot vizsgálatokkal elemeztem, mely egy gélelektroforézises módszer. Poli-akrilamid gélben, elektromos erőter hatására molekulasúly szerint szétválaszthatóak az egyes fehérjék, s a PVDF (poli-vinilidén-difluorid) membránra transzferált fehérjék antitestekkel, fotokémiai reakciók útján, specifikusan kimutathatóak. Az előhívott filmekken keletkezett jeleket denzitometráltam az ImageJ szoftverrel és a szenzitív-rezisztens sejt párokban különbségeket kerestem az adott fehérjék expressziójában és aktiváltsági állapotában. Az adott fehérje aktiváltsági szintjét a foszforilált formához specifikusan kötő ellenanyagok használatával tudtam vizsgálni.

Az immunoblot vizsgálatokhoz a fehérjeminták előkészítéséhez, a sejtekből való fehérje lizátum készítéséhez a Thermo Scientific RIPA-pufferjét (89900; Thermo Scientific) használtam és az ehhez tartozó protokollt követtem. 300-400 ezer sejtet osztottam ki sejtvonalanként 6-lyukú sejttenyésztő lemezre. Egy éjszakán át általános sejttenyésztő folyadékban inkubáltam őket, majd a tápfolyadék eltávolítása után PBS-sel mostam a sejteket. 100µl RIPA puffert és Thermo Scientific Halt Protease Inhibitor Cocktail-t (78430; Thermo Scientific) tettem a sejtekre, miközben jégen tartottam a sejttenyésztő lemezeket. Az elkészült lizátumot centrifugáltam, s a felülúszó fázisban megkaptam a fehérje mintákat. A minták koncentrációjának méréséhez pedig a Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit-jét (23225; Thermo Scientific) használtam és az ehhez tartozó protokollt

követtem. Egy standard koncentrációjú fehérje-sorhoz (20 – 1000 µg/ml) hasonlítottam az általam elkészült fehérje mintákat. A mintákhoz adtam a kétkomponensű reagenst, majd fotometrálas után kiszámítottam a mintáim fehérje koncentrációját.

Az immunoblot vizsgálatokhoz a BioRad kit-jeit és protokollját használtam. A gélöntéshez a BioRad kit-jét (1610173; BioRad) használtam, a szeparáló és a felső gélt is 45 percig hagytam polimerizálódni. A fehérjék futtatása running pufferben (3.03 g Tris, 14.4 g glicin, 5 ml 20%-os SDS, 1000 ml desztillált víz) 100 V-os áramfeszültségen történt, addig, míg a fehérje-front marker a gél aljáig nem ért (kb. 1.5 óra). A fehérjék transzferálása a gélből a PVDF membránra 250 mA áramerősségen, transzfer pufferben (3.03 g Tris, 14.4 g glicin, 40 ml metanol, 960 ml desztillált víz), jégben hűtve történt 2 órán keresztül. A membránok blokkolása egy órán át, szobahőmérsékleten, 5%-os zsírmentes tejporban történt, mely 1%-os TBST-ben (tris-buffered saline Tween20 detergenssel) volt feloldva. Ezt követően a primer antitestben (**3. melléklet**) egy éjszakán át (overnight) 4 °C-on inkubáltam a membránokat, majd 5-ször 5 percig mostam 1%-os TBST-ben őket.

A mosás után a primer antitestnek megfelelő szekunder antitestben (**3. melléklet**) inkubáltam a membránokat, 1 óra hosszan szobahőmérsékleten, majd ismét ötször öt percig mostam 1%-os TBST-ben őket.

Végül egy percig inkubáltam a membránokat a kétkomponensű ECL-keverékben (Amersham ECL kit; EMP001005), mely az előhíváshoz szükséges fotokémiai reakciókhoz szükséges. Az exponálási idő az egyes fehérjék vizsgálatokor eltérő volt (5-45 perc közt), a kibocsátott jel erősségétől függően.

A filmeket digitalizálás után az ImageJ szoftverrel denzitometráltam, s az így kapott area méretek arányosak voltak az egyes sejtvonalak adott fehérjéinek mennyiségével. Ezekből az eredményekből oszlopdiagramokat szerkesztettem, így tudtam összehasonlítani a fehérje expresszió, valamint foszforiláció változását a rezisztencia kialakulása során.

#### **4.6. Statisztika**

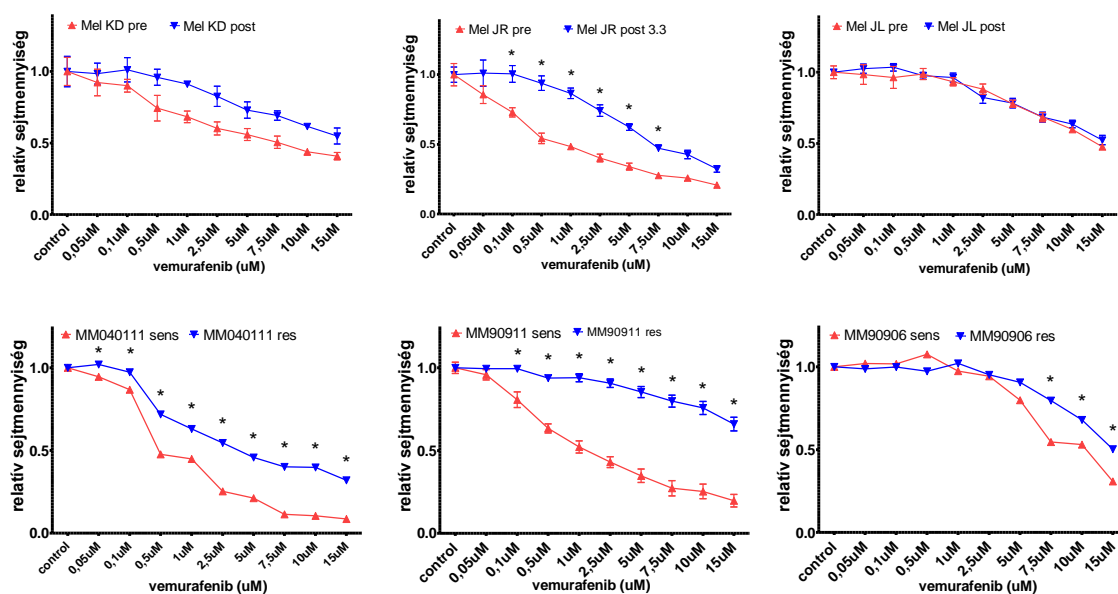
A statisztikai kiértékeléseket a GraphPad Prism 5 program segítségével végeztük. Az SRB életképességi assay esetén kétutas ANOVA analízist végeztünk Bonferroni post-hoc teszttel. Az eredményeket statisztikailag szignifikánsnak akkor tekintettem, ha a hozzájuk tartozó p érték  $p < 0,05$  volt. Továbbá a sejtek vemurafenib érzékenységét (GI 50 értékek) a mért adatokra illesztett görbe  $y = 0,5$  értékéhez tartozó koncentráció valamint a hozzá tartozó 95%-os konfidencia intervallum kalkulálásával jellemeztem.

## 5. Eredmények

### 5.1. SRB

Az SRB életképességi assay fotometrási adataiból a GraphPad Prism 5 szoftver segítségével az egyes sejtvonalak relatív életképességét (relative cell viability) ábrázoló görbéit megszerkesztettem a vemurafenib kezelési koncentrációk függvényében (**5. ábra**). A felső sorban a három *in vivo* sejtvonalpár relatív életképessége, míg az alsó sorban a három *in vitro* sejtvonalpár relatív életképessége látható. A vörös görbe az adott sejtvonal szenzitív/pre sejtpopulációihoz tartató eredményeket, a kék görbe a rezisztens/post sejtpopulációk eredményeit mutatja. Minden sejtvonal esetén két független kísérletben hat párhuzamos mérést végeztem (N=12).

**5. ábra.** A melanóma sejtvonalak relatív életképességét ábrázoló görbék



A vörös görbe az adott sejtvonal szenzitív/pre sejtpopulációihoz tartató eredményeket, a kék görbe a rezisztens/post sejtpopulációk eredményeit mutatja. Csillaggal jelöltem, ha az adott sejtvonal szenzitív és rezisztens párjának a relatív életképessége szignifikánsan különbözött az adott koncentrációjú kezelés mellett (N=12,  $p < 0.05$ ).

Az ANOVA vizsgálatok, melyek a sejtvonalak szenzitív-rezisztens párjainak a relatív életképessége közti különbségre irányultak adott koncentrációjú kezelés mellett, szignifikánsnak adódtak a MelJR, MM040111 és MM90911 sejtvonalpárokban. A MelKD

és MelJL esetén nem találtunk szignifikáns különbséget, az MM90906 sejtvonalpárt vizsgálva csak a magas koncentrációknál kaptam szignifikáns különbséget.

A MelKD pre sejtvonal GI50 értéke 3.05  $\mu\text{M}$ -nál található (konfidencia intervallum: 0.37 – 25.45  $\mu\text{M}$ ), a sejtvonal MelKD post párjánál ez az érték 11.7  $\mu\text{M}$ -nál (konfidencia intervallum: 2.27 – 61.07  $\mu\text{M}$ ) van. A MelJR pre sejtvonalnak 0.6  $\mu\text{M}$  (konfidencia intervallum: 0.21 – 1.64  $\mu\text{M}$ ) a GI50 értéke, míg a MelJR post sejtvonalnak 9.1  $\mu\text{M}$ -nál (konfidencia intervallum: 3.24 – 25.59  $\mu\text{M}$ ) adódott a GI50 érték. Az utolsó *in vivo*, MelJL pre sejtvonal GI50 értéke 19.3  $\mu\text{M}$ -nál (konfidencia intervallum: 3.79 – 98.31  $\mu\text{M}$ ) található, a MelJL post sejtvonal GI50 értéke pedig 23  $\mu\text{M}$  (konfidencia intervallum: 0.33 – 1581  $\mu\text{M}$ ). Az *in vitro* sejtvonalpárok SRB vizsgálataiból azt az eredményt kaptam, hogy az MM040111 sens sejtvonal GI50 értéke 0.5  $\mu\text{M}$  (konfidencia intervallum: 0.31 – 0.91  $\mu\text{M}$ ) és az MM040111 res sejtvonalnak 1.3  $\mu\text{M}$  (konfidencia intervallum: 0.85 – 2  $\mu\text{M}$ ) a GI50 értéke. Az MM90911 sens sejtvonalhoz tartozó GI50 érték 0.9  $\mu\text{M}$ -nál (konfidencia intervallum: 0.36 – 2.45  $\mu\text{M}$ ) található, az MM90911 res sejtvonal GI50 értéke 25  $\mu\text{M}$  fölött található (konfidencia intervallum nem megadható). Végül az MM90906 sens sejtvonalnak 8.4  $\mu\text{M}$  (konfidencia intervallum: 3.71 – 19.06  $\mu\text{M}$ ) a GI50 értéke, az MM90906 res sejtvonalpárjának 12.4  $\mu\text{M}$ -nál (konfidencia intervallum: 6.11 – 25.54  $\mu\text{M}$ ) van a GI50 értéke.

## 5.2. Szakirodalom

A rezisztens sejtvonalak migrációs aktivitásának megnövekedése háttérben álló molekuláris mintázat vizsgálatához két fehérjét választottam ki: a doublecortint és a citokeratin-6B-t. Azért ezt a két fehérjét választottam, mert már leírtak más tumortípusokban gyógyszer rezisztencia kapcsán és szerepet játszanak sejtmozgásokban, de még kevés eredmény található róluk az irodalomban.

A doublecortin az idegsejt migrációban szerepet játszó fehérje, melyről kimutatták, hogy prosztata tumorokban abnormális mértékben expresszálódik, valamint a mikrotubulusokban lokalizálva elősegíti a sejtmigrációt és a mikrotubulust célzó taxol kemoterápiás szer elleni rezisztenciát is elősegíti (Longoni, 2012).

A citokeratinok az epidermis sejtekben megtalálható intermedier filamentumokat felépítő fehérjék közé tartoznak. Ezen túl tumorképződésben valamint gyógyszerrezisztenciában is megfigyelték a szerepüket (Karantza, 2011). A citokeratin-17 a RAS-tól downstream

elhelyezkedő AKT-mTOR jelpályát aktiválja (Fortier 2010.). A citokeratin-8 mellrákokban multidrog rezisztenciában játszik szerepet (Liu, 2008).

### **5.3 Immunoblot**

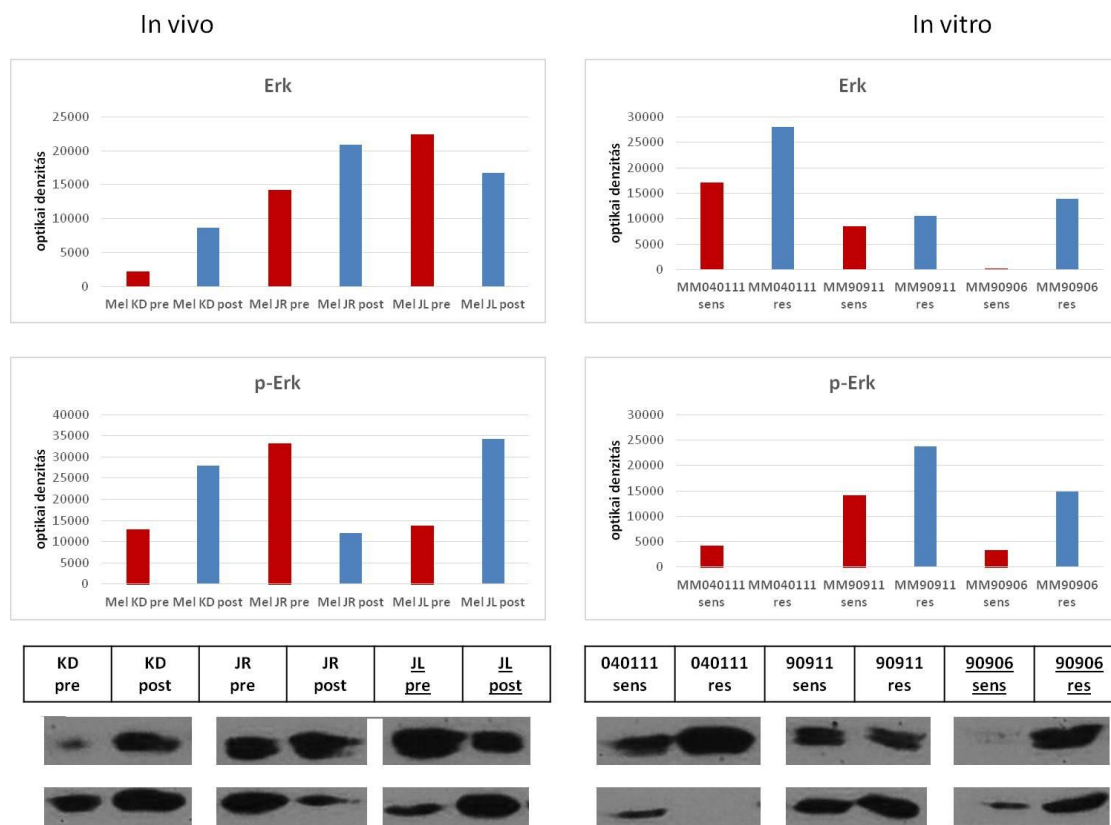
A rezisztenciával kapcsolatba hozható növekedési jelátvitel effektorait, valamint a rezisztens sejtvonalakban megfigyelt migrációs aktivitás növekedéséért felelős fehérjék expresszióját és aktiváltságát immunoblot vizsgálatokkal elemeztem.

Az immunoblotos előhívások eredményei az ábrák **(6-9., 11-12. ábra)** alsó részén láthatóak. Az adott sejtvonalban az adott fehérje mennyiségével arányos a látható fekete csík. Ezeket a sávokat denzitometrálna az ImageJ szoftverrel, a kapott area eredményekből megszerkesztettem az ábrák felső részén látható diagramokat. Mivel az immunoblot egy szemikvantitatív technika, így statisztikai vizsgálatok az eredmények összehasonlítására nem végezhetőek. Az Y-tengelyen a szoftver által számolt optikai denzitás (OD) látható, mely értékeket ezzel a képlettel számolt a program:  $OD = \log_{10}(255/\text{pixel value})$ . A vörös oszlopok az adott sejtvonal szenzitív/pre sejtpopulációihoz tartozó eredményeket, a kék oszlopok a rezisztens/post sejtpopulációk eredményeit mutatják.

#### **5.3.1. MAPK**

Vizsgáltam a növekedési faktor jelpálya RAS – MAPK részletében a downstream elemek expresszióját és aktivációját. Az össz-Erk1/2 és p-Erk1/2 fehérje festések eredménye a **6. ábrán** láthatóak.

**6. ábra.** Az Erk1/2 és p-Erk1/2 fehérje immunoblotos előhívásának eredménye és a denzitometrázás eredménye



Az immunoblotos előhívások eredményei az ábrák alsó részén láthatóak. A diagramok Y-tengelyén az optikai denzitás ( $OD = \log_{10}(255/\text{pixel value})$ ) látható. A vörös oszlopok az adott sejtvonal szenzitív/pre sejtpopulációihoz tartozó eredményeket, a kék oszlopok a rezisztens/post sejtpopulációk eredményeit mutatja.

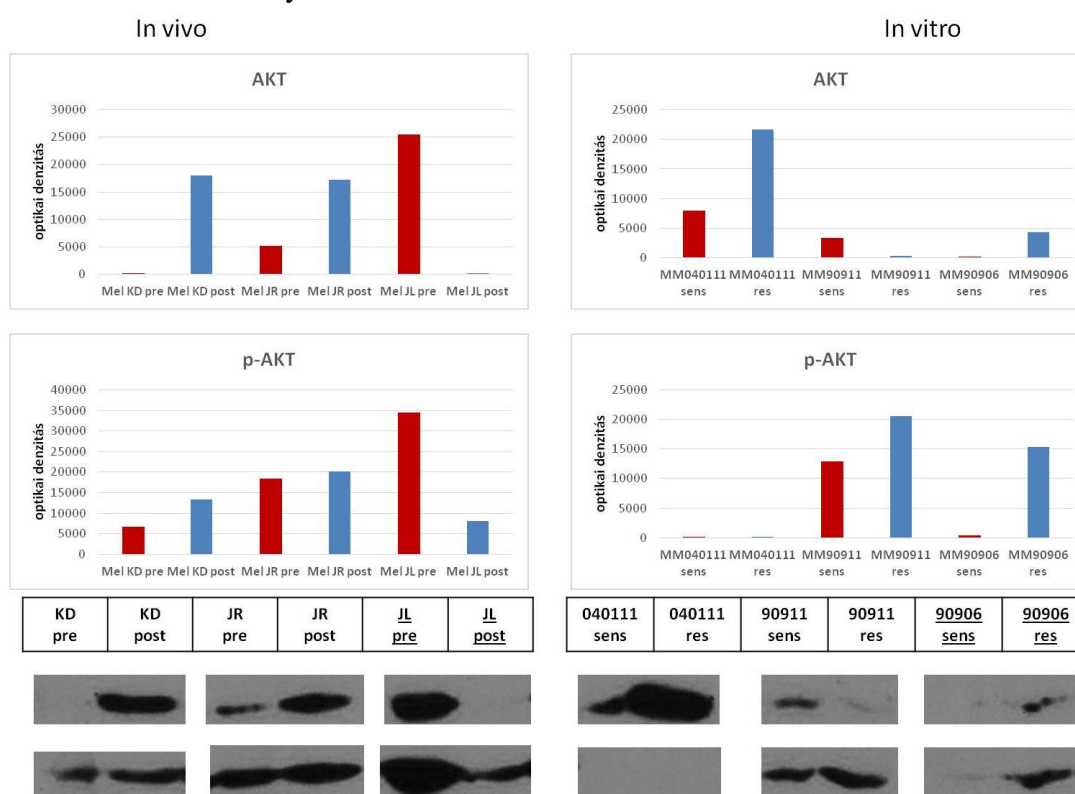
A RAS – MAPK jelátviteli útvonal Erk1/2 fehérjéjének expresszióját vizsgálva, az *in vivo* sejtvonalpárok közül a MelKD sejtvonalpár rezisztens tagjában megnőtt az expresszió a szenzitív sejtpopulációkhoz képest, míg a MelJL sejtvonalpár esetén csökkent e fehérje expressziója a rezisztencia megjelenésekor, a MelJR esetén nem tapasztaltam jelentős változást. Az *in vitro* sejtvonalpárokat vizsgálva az MM040111 és MM90906 sejtvonalpárban nőtt meg az Erk1/2 expresszió a rezisztens melanóma sejtekben.

Az Erk1/2 aktiváltságát foszfo-specifikus ellenanyaggal vizsgálva, az *in vivo* MelKD és MelJL sejtvonalpár esetén megnőtt a foszforiláció a rezisztens sejtekben a szenzitívekhez képest, viszont a MelJR sejtvonalpár esetén fordítva alakult az aktiváltság megváltozása. Az *in vitro* sejtvonalpároknál egy esetben találtunk növekedést a rezisztens sejtekben az aktiváltságot tekintve, az MM90906 sejtvonalpárban. Az MM040111 sejtvonalpárban pedig csökkent a foszfo-Erk a rezisztencia kialakulása során.

### 5.3.2. PI3K – PTEN/AKT

Vizsgáltam a növekedési faktor jelpálya PI3K – PTEN/AKT részletének downstream elemeinek expresszióját és aktivációját. Az össz-AKT és p-AKT, valamint az össz-S6 és p-S6, fehérje festésének eredménye a **7. és 8. ábrán** láthatóak.

**7. ábra.** Az AKT és p-AKT fehérje immunoblotos előhívásának eredménye és a denzitometráls eredménye

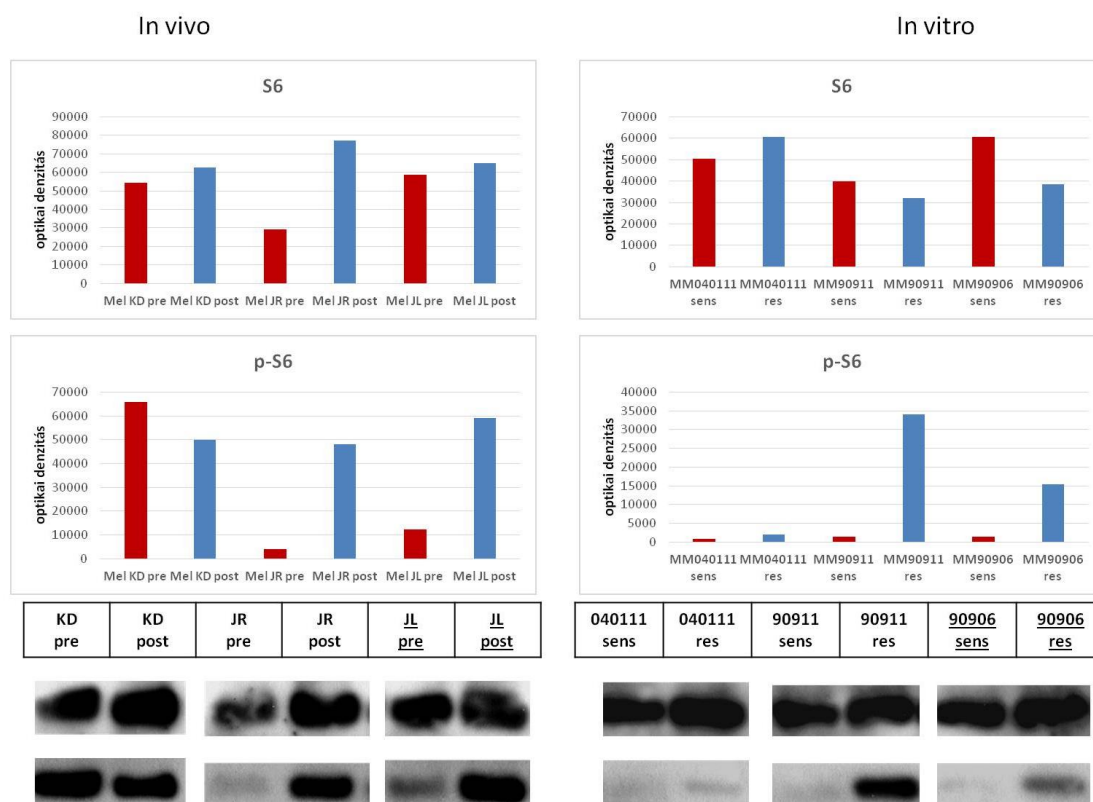


Az immunoblotos előhívások eredményei az ábrák alsó részén láthatóak. A diagramok Y-tengelyén az optikai denzitás ( $OD = \log_{10}(255/\text{pixel value})$ ) látható. A vörös oszlopok az adott sejtvonal szenzitív/pre sejt populációihoz tartozó eredményeket, a kék oszlopok a rezisztens/post sejt populációk eredményeit mutatja.

A PI3K – PTEN/AKT jelátviteli útvonal AKT fehérje expresszióját vizsgálva az *in vivo* sejtvonalpárok közül a MelKD és MelJR sejtvonalpár rezisztens tagjában megnőtt az expresszió a szenzitív sejt populációkhoz képest, míg a Mel JL sejtvonal esetén csökkent ezen fehérje expressziója a rezisztencia megjelenésekor. Az *in vitro* sejtvonalpárokat vizsgálva az MM040111 sejtvonalpárban nőtt meg az AKT expresszió a rezisztens melanóma sejtekben, a másik két sejtvonalpárnál nem találtam jelentős változást.

Az AKT aktiváltságát foszfo-specifikus ellenanyagok segítségével vizsgálva, az *in vivo* sejtvonalpároknál csak egy esetben találtam növekedést a rezisztens sejtekben az aktiváltságot tekintve, a MelKD sejtvonalpárban. A MelJL sejtvonalpárban pedig csökkent a foszfo-AKT a rezisztencia kialakulása során. Az *in vitro* MM90906 sejtvonalpár esetén megnőtt a foszforiláció a rezisztens sejtekben a szenzitívekhez képest, viszont az MM040111 és az MM90911 sejtvonalpár esetén nem változott az aktiváltság a szenzitív és rezisztens sejtpopulációkat összehasonlítva.

**8. ábra.** Az S6 és p-S6 fehérje immunoblotos előhívásának eredménye és a denzitometráls eredménye



Az immunoblotos előhívások eredményei az ábrák alsó részén láthatóak. A diagramok Y-tengelyén az optikai denzitás ( $OD = \log_{10}(255 / \text{pixel value})$ ) látható. A vörös oszlopok az adott sejtvonal szenzitív/pre sejtpopulációihoz tartozó eredményeket, a kék oszlopok a rezisztens/post sejtpopulációk eredményeit mutatja.

A PI3K – PTEN/AKT jelátviteli útvonalon, az előbb tárgyalt AKT fehérjétől downstream elhelykedő effektor, az S6 expresszióját vizsgálva csupán az *in vivo* MelJR esetén találtam

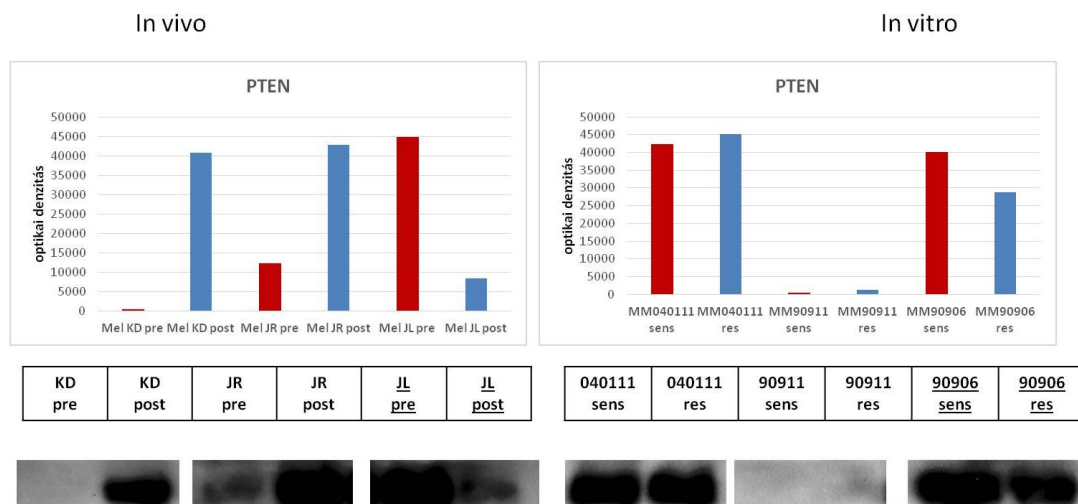


növekedést a fehérje expressziójában, az összes többi sejtvonalpár esetén nem változott jelentősen az S6 kifejeződés.

Az S6 fehérje aktiváltságát vizsgálva, az *in vivo* sejtvonalpároknál kettő esetben találtam növekedést a rezisztens sejtekben az aktiváltságot tekintve, a MelJR és MelJL sejtvonalpárokban. Az *in vitro* MM90911 és MM90906 sejtvonalpár esetén megnőtt a foszforiláció a rezisztens sejtekben a szenzitívekhez képest.

A PI3K – PTEN/AKT pályát szupresszáló fehérje, a PTEN expressziójának eredménye a **9. ábrán** látható.

**9. ábra.** A PTEN fehérje immunoblotos előhívásának eredménye és a denzitometráls eredménye



Az immunoblotos előhívások eredményei az ábrák alsó részén láthatóak. A diagramok Y-tengelyén az optikai denzitás ( $OD = \log_{10}(255/\text{pixel value})$ ) látható. A vörös oszlopok az adott sejtvonal szenzitív/pre sejtpopulációihoz tartató eredményeket, a kék oszlopok a rezisztens/post sejtpopulációk eredményeit mutatja.

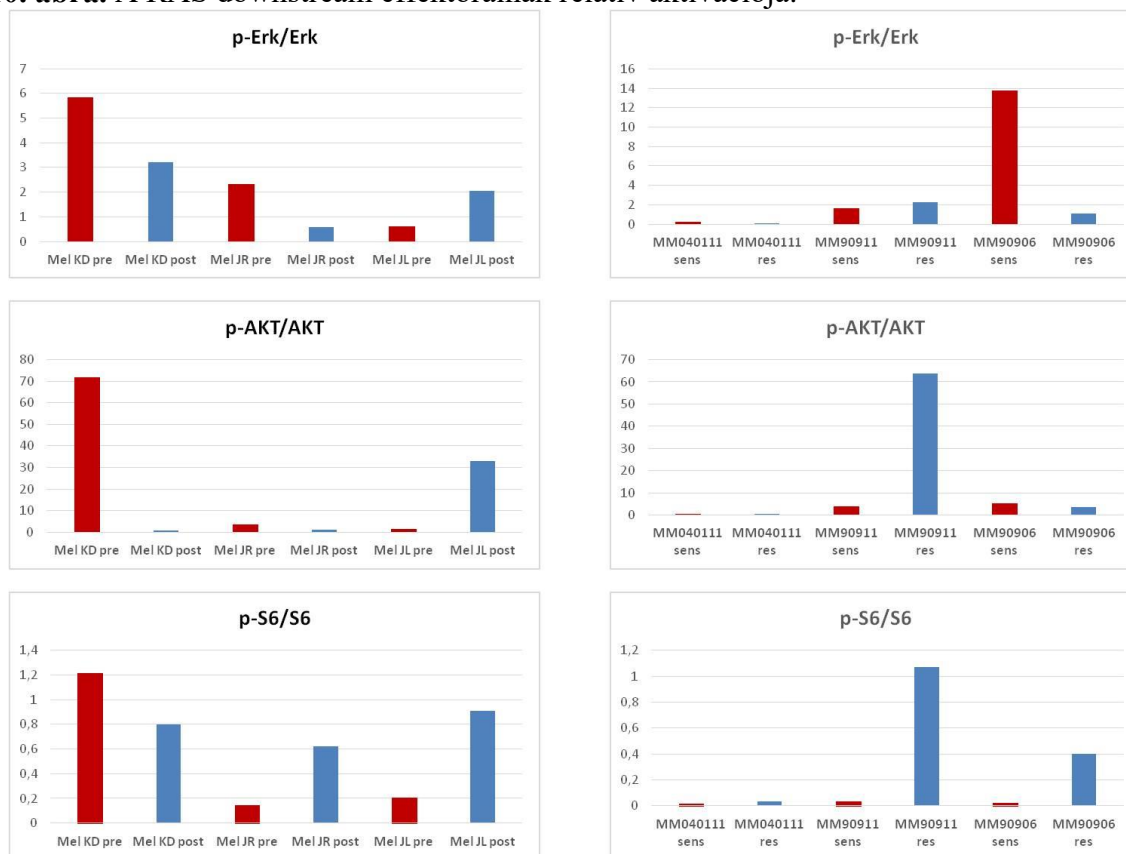
A PI3K – AKT jelátviteli utat szupresszáló fehérjét, a PTEN-t vizsgálva az *in vivo* sejtvonalpárokat vizsgálva a MelKD és a Mel JR sejtvonalpárban nőtt meg a PTEN expresszió a rezisztens melanoma sejtekben. Meg kell jegyezni, hogy a MelKD pre sejtvonal null-mutáns volt a PTEN-t tekintve. A MelJL sejtvonalpár esetén csökkent a PTEN expressziója a rezisztencia megjelenésekor.

Az *in vitro* sejtvonalpárokban nem találtam expressziós változást a rezisztens sejtpopulációkban a szenzitívekhez képest, viszont az MM90911 sejtvonal mindkét tagja, a szenzitív és a rezisztens is null-mutáns volt a PTEN fehérjét tekintve.

### 5.3.3. Változás a RAS downstream effektorok relatív aktivációjában

A vizsgált fehérjék foszforilált és összfehérje aránya megmutatja az adott jelátviteli út aktiváltságát vagyis, hogy a rendelkezésre álló jelátvivő molekulák milyen arányban vannak „bekapcsolva” (10. ábra)

10. ábra. A RAS downstream effektorainak relatív aktivációja.



A relatív aktivációt az egyes fehérjék denzitometrálta adataiból az alábbi módon számoltam ki: foszforilált fehérje mennyiség / összfehérje mennyiség. A vörös oszlopok az adott sejtvonal szenzitív/pre sejtpopulációihoz tartató eredményeket, a kék oszlopok a rezisztens/post sejtpopulációk eredményeit mutatja.

Összehasonlítottam sejtvonalanként az ábrán látható fehérjék (Erk1/2, AKT, S6) foszforilált és összfehérje mennyiségét.

A MelKD pre és MelKD post, MelJR pre, MelJL post, MM90906 sens, sejtvonalakban aktivált jelentősen az Erk1/2.

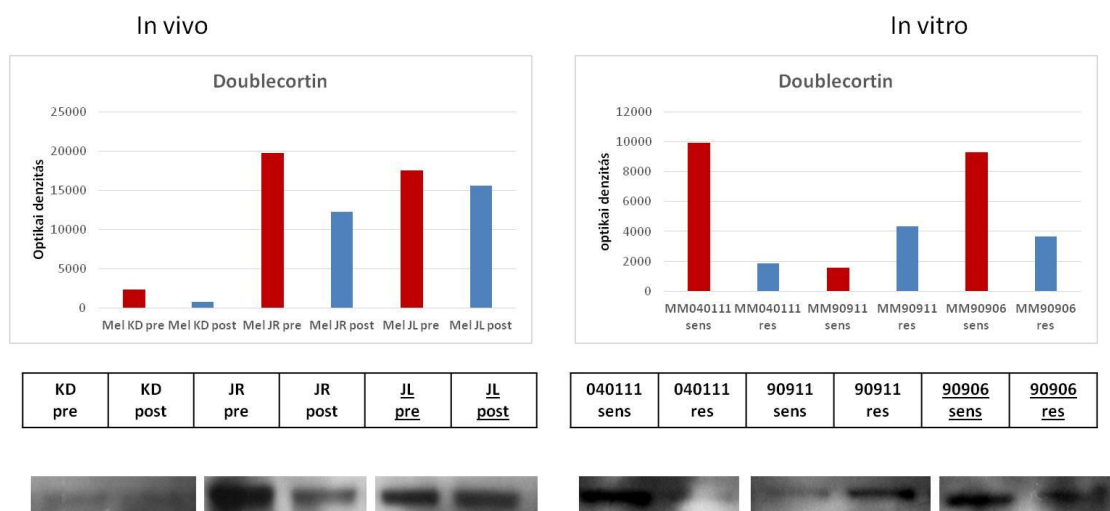
A MelKD pre, MelJL post és MM90911 res sejtvonalakban jelentősen aktivált az AKT.

Végül az S6 fehérje jelentősen aktivált a MelKD pre és MelKD post, MelJR post, MelJL post, MM90911 res és MM90906 res sejtvonalakban.

### 5.3.4. Migrációval kapcsolatos fehérjék

A szakirodalmi adatok alapján kiválasztott, a migráció megnövekedésével kapcsolatba hozható doublecortin és citokeratin-6B expressziójának vizsgálatának az eredménye a **11. és 12. ábrán** látható.

**11. ábra.** A doublecortin immunoblotos előhívásának eredménye és a denzitometráls eredménye

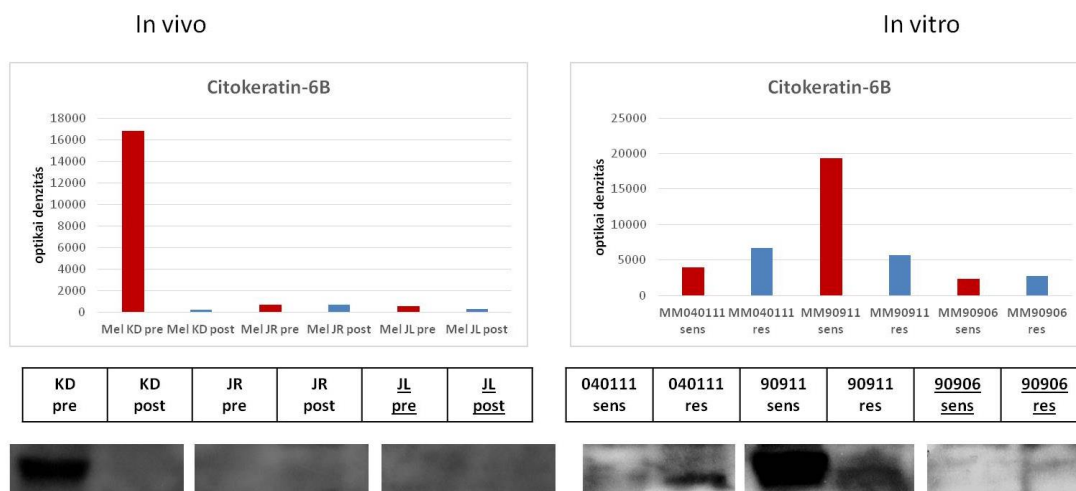


Az immunoblotos előhívások eredményei az ábrák alsó részén láthatóak. A diagramok Y-tengelyén az optikai denzitás ( $OD = \log_{10}(255/\text{pixel value})$ ) látható. A vörös oszlopok az adott sejtvonalt szenzitív/pre sejtpopulációhoz tartozó eredményeket, a kék oszlopok a rezisztens/post sejtpopulációk eredményeit mutatja.

A doublecortin expresszióját vizsgálva az *in vivo* sejtvonalpárokat nézve a MelJR sejtvonalpár esetén csökkent e fehérje expressziója a rezisztencia megjelenésekor, a másik két sejtvonalpárnál nem tapasztaltam jelentős változást.

Az *in vitro* sejtvonalpárok közül az MM90911 sejtvonalpár rezisztens tagjában megnőtt a doublecortin fehérje expressziója a szenzitív sejtpopulációkhoz képest, míg az MM040111 és MM90906 sejtvonalban csökkent a doublecortin expresszió a rezisztens sejtpopulációkban, a szenzitívekhez képest.

**12. ábra.** A citokeratin-6B immunoblotos előhívásának eredménye és a denzitometrálás eredménye



Az immunoblotos előhívások eredményei az ábrák alsó részén láthatóak. A diagramok Y-tengelyén az optikai denzitás ( $OD = \log_{10}(255/\text{pixel value})$ ) látható. A vörös oszlopok az adott sejtvonal szenzitív/pre sejtpopulációihoz tartató eredményeket, a kék oszlopok a rezisztens/post sejtpopulációk eredményeit mutatja.

A citokeratin-6B expresszióját vizsgálva az *in vivo* MelKD sejtvonalpár esetén csökkent a citokeratin-6B expressziója a rezisztencia megjelenésekor, a másik két sejtvonalpárnál nem tapasztaltam jelentős változást.

Az *in vitro* sejtvonalpárok közül az MM90911 sejtvonalpár rezisztens tagjában lecsökkent a citokeratin-6B fehérje expressziója a szenzitív sejtpopulációkhoz képest, míg a másik két *in vitro* sejtvonalpárban, az MM040111 és az MM90906 sejtvonalban nem tapasztaltam jelentős változást a fehérje expressziót tekintve.

## **6. Diskusszió**

### **6.1. SRB**

Két *in vivo*, a MelKD és MelJR, valamint két *in vitro*, az MM040111 és MM90911 sejtvonalpárban jelentős különbséget találtunk a szenzitív-rezisztens sejtpárok GI50 értékekben. Tehát ennél a négy sejtvonalpárnál a kapott SRB eredményekből számolt GI50 értékek és görbék jól bizonyítják a sejtvonalpárok szenzitív-rezisztens voltát. Ezzel igazoltam, hogy a rezisztencia mind a betegekben *in vivo*, mind a gátlószer növekvő koncentrációja mellett történő tenyésztés során *in vitro* kialakult. Noha a MelKD sejtvonal szenzitív és rezisztens párjának a relatív életképessége közt nem tapasztaltam statisztikailag szignifikáns különbséget az adott koncentrációjú kezelések mellett, mégis biológiailag relevánsnak tartjuk a szenzitív-rezisztens státuszt, a GI50 értékek változásával összevetve.

Viszont egy *in vivo*, a MelJL, valamint egy *in vitro*, az MM90906 sejtvonal esetén nem jelentősen nőtt a GI50 érték a rezisztens sejtekben. Sőt érdekes módon e sejtvonalak szenzitív páriaihoz tartozó GI50 értékek is igen magasak voltak, összehasonlítva a másik négy sejtvonalpárral. Tehát ezek a sejtvonalak is már a vemurafenib kezelés előtt nagyfokú rezisztenciával rendelkeztek, *de novo* rezisztenciáról beszélhetünk. Az MM90906 sejtvonal szenzitív és rezisztens párjának a relatív életképessége között szignifikáns különbséget tapasztaltam magas koncentrációjú kezelés mellett. Ezt a statisztikailag szignifikáns különbséget azonban a GI50 értékek csekély változásával összevetve biológiailag nem tartjuk relevánsnak.

A korábbi videomikroszkópos, migrációra irányuló eredmények és az SRB eredményeim alapján elmondható, hogy a rezisztencia kialakulása egyetlen esetben sem jár migrációs aktivitás csökkenéssel. Ugyakkor a *de novo* rezisztens sejtvonalpárok közül az *in vivo* vonalpár (MelJL pre és post) esetén a relapszus utáni biopsziából létrehozott sejtvonal migrációs aktivitása nagyobb volt. Ezzel szemben a gátlószer növekvő koncentrációja mellett történő sejtenyésztés nem eredményezte a migrációs aktivitás fokozódását a *de novo* rezisztens sejtvonalpárnál (MM90906). Ezek alapján elmondható, hogy a rezisztencia kialakulása mögötti molekuláris változások nem mindegyike jár migrációs aktivitás növekedéssel, ugyanakkor az agresszívebb, rezisztens fenotípus sok esetben megnyilvánul a migrációs aktivitás megnövekedésében is.

A GI50 értékek statisztikai vizsgálatokor kapott nagy konfidencia intervallumok azzal magyarázhatóak, hogy a logisztikus görbe illesztésekor extrapolálni kellett (a kezeléshez

használt koncentrációk kisebbek voltak a GI50 értéknél) az eredményeket, melyből a bizontalanság adódott.

## 6.2. Immunoblot

Egységes, mind a hat sejtvonalpárra érvényes rezisztencia mechanizmust nem találtam az immunoblot vizsgálataim során. Valamint az *in vivo* és *in vitro* rezisztenssé vált melanóma sejtek közt sem találtam egységes mechanizmust. Továbbá az SRB assay eredményei szerint de novo rezisztens sejtvonalakban, a MelJL és MM90906 sejtvonalakban sem egységes a rezisztencia mechanizmus.

A RAS-tól downstream elhelyezkedő effektorok relatív aktivációját vizsgálva egy-egy sejtvonalra egyedi rezisztencia mechanizmust figyeltem meg:

A MelKD sejtvonalat tekintve a rezisztencia kialakulása során csökkent az Erk1/2 aktiváltsága, viszont az S6 fehérje aktiváltsága nem számottevően csökkent, noha a tőle upstream elhelyezkedő AKT aktiváltsága nagyon alacsony. A MelKD post sejtvonalban tapasztalt alacsony AKT aktivitást jól magyarázza az, hogy a PTEN fehérje expressziója magas, mely az AKT aktivációját szupresszálja. Ez alapján arra lehet következtetni, hogy a PI3K útvonal aktivációja okozza a vemurafenib melletti túlélést a MelKD sejtvonal esetén, s az S6 fehérjét más alternatív útvonal aktiválja.

A MelJR sejtvonal esetén szintén alacsony Erk1/2 aktivitást tapasztaltam a rezisztens sejtpopulációban. Viszont az S6 fehérje ebben a rezisztens sejtvonalban is megnövekedett aktivitást mutat, mely aktivitást valamely más alternatív útvonal befolyásol valószínűleg.

A MelJL sejtvonalban a rezisztenciát az Erk1/2 és az AKT-S6 útvonal egyszerre történő aktivációja okozza (Paraiso, 2010).

Az MM90911 sejtvonalban az AKT-S6 aktivációja nőtt meg jelentősen a rezisztencia kialakulása során, mely a túlélést biztosítja (Shao and Aplin, 2010).

Végezetül, az MM90906 sejtvonal esetében sem az Erk1/2 aktiválódik a rezisztens sejtekben, hanem az S6 fehérjében látszik egy gyenge aktiváció a rezisztencia kialakulása során.

A szakdolgozatom eredményei arra engednek következtetni, hogy melanómákban a vemurafenib rezisztencia alternatív jelátviteli utak aktivációjával is megvalósulhat, nem szükséges minden esetben a gátolt MAPK útvonal reaktivációja (Van Allen, 2014).

A rezisztens sejtvonalakban megnövekedett migrációs aktivitás hátterében nem sikerült egységes molekuláris útvonalat igazolnunk. Az Erk1/2 fehérje aktivációja hatással van a

FAK-ra (fokális adhéziós kináz), mely a migrációt befolyásolja. A korábbi sejtmigrációval kapcsolatos eredmények és az Erk1/2 relatív aktivációja között nem találtam egységes összefüggést, feltehetően más jelátviteli útvonal a meghatározó ezeknek a sejteknek a migrációjában (Monami, 2006).

Összefoglalva, eredményeim alapján elmondható, hogy az *in vivo* kialakuló vemurafenib rezisztencia *in vitro* is létrejön, ugyanakkor a rezisztencia kialakulásának hátterében meghúzódva nem feltétlen ugyanazok a mechanizmusok játszódnak le *in vivo* és *in vitro*. A migráció és a rezisztencia növekedésének hátterében más mechanizmusok állnak, feltehetően csak a RAS jelátviteli hálózat gátlásával nem fog sikerülni a melanomás betegek gyógyítása a jövőben.

## **7. Következtetések**

Diplomamunkámban a vemurafenib ellen kialakuló rezisztencia molekuláris hátteréről kaptam pontosabb képet. Szakdolgozatomban a célkitűzéseim alapján az alábbi következtetésekre jutottam:

1. A vemurafenibbel szemben mutatott érzékenység négy sejtvonalpár (két *in vitro* és két *in vivo*) esetén mérhetően változott, míg kettő melanóma sejtvonalpár (egy *in vitro* és egy *in vivo*) esetén nem történt jelentős változás a kezelés hatására. Ebben a két esetben úgynevezett *de novo* rezisztencia volt jelen már a kezelés előtt.
2. A rezisztencia kialakulása során a RAS jelátviteli hálózatban sejtvonal függő aktivációs mintázatváltozások voltak, egységes mintázatváltozást nem tudtam azonosítani.
3. A rezisztens sejtpopulációkban megnövekedett migrációs aktivitásért felelős egységes molekuláris hátteret nem sikerült egyelőre igazolni, további vizsgálatok szükségesek ennek felderítésére.



## **8. Összefoglalás**

A melanóma a pigmentsejtek (melanociták) tumoros átalakulása során kialakuló rossz prognózisú daganatos megbetegedés, melynek előfordulása világszerte emelkedik. A melanomás betegek 40-70%-ában megtalálható az onkogén BRAF mutáció, mely az esetek 73-90%-ában egy valin glutaminsav szubsztitúció (V600E). V600 mutációt hordozó áttétes melanomás betegek kezelésére alkalmas a vemurafenib szelektív gátlószer, viszont a kezelés kezdeti sikere után néhány hónappal a páciensekben rezisztencia jelenik meg.

Szakedolgozatom célja volt a rezisztencia hátterében lezajló molekuláris mechanizmusok pontosabb feltérképezése, vagyis annak vizsgálata, hogy a RAS/BRAF/ERK valamint RAS/PI3K/AKT/S6 jelpálya mely elemei lehetnek fokozottan aktíválva, amelyek a rezisztenciát okozzák. Céлом volt továbbá a rezisztens sejtvonalak megnövekedett migrációs aktivitásának hátterében álló molekuláris mechanizmusok felderítése.

Munkám során összesen hat szenzitív-rezisztens melanóma sejtvonalpárt vizsgáltam, melyek közül három sejtvonalpár adott beteg kezelés előtti és relapszus utáni biopsziájából lett létrehozva, valamint három másik sejtvonalpár egy-egy tagjában a rezisztencia folyamatosan növekvő vemurafenib koncentráció mellett alakult ki, *in vitro*. Először SRB assay életképességi vizsgálat segítségével meghatároztam a sejtek vemurafenib kezeléssel szemben mutatott érzékenységét. Négy sejtvonalpár esetén mértünk alacsony GI50 értéket (0.5-3 $\mu$ M) amely a rezisztencia kialakulása során jelentősen emelkedett (1.3 - >25 $\mu$ M). További két sejtvonalpár esetén a kezdeti magas GI50 érték (8.4 és 19.3 $\mu$ M) már nem emelkedett számottevően (12.4 és 23 $\mu$ M) vagyis itt *de novo* rezisztens sejtekről beszélhetünk.

Immunoblottal vizsgáltam a megnövekedett GI50 értékkel kapcsolatba hozható növekedési jelpálya downstream effektorait, valamint a rezisztens sejtvonalakban megnövekedett migrációs aktivitás hátterében feltételezett fehérjéket. Vizsgálataim során sem a rezisztencia sem a megnövekedett migrációs aktivitás hátterében nem sikerült egységes molekuláris mintázatot kimutatnom.

Eredményeim igazolják, hogy az *in vivo* kialakuló vemurafenib rezisztencia *in vitro* is létrejön, ugyanakkor a hátterében lezajló molekuláris mehanizmusok *in vivo* és *in vitro* rezisztencia kialakulás során nem feltétlen egyeznek meg. A migráció és a rezisztencia növekedésének hátterében más mechanizmusok állnak, feltehetően csak a RAS jelátviteli hálózat gátlásával nem fog sikerülni a melanomás betegek gyógyítása a jövőben.

## **9. Summary**

Examination of RAS-signaling pathway's activation in BRAF mutant melanoma cells

Melanoma arises from the neoplastic transformation of melanocytes and has a dismal prognosis and steadily increasing incidence worldwide. 40-70% of melanoma cases harbour oncogenic BRAF among which valine to glutamic acid substitution (V600E) accounts for 73-90% of BRAF mutations. Vemurafenib is a selective inhibitor for the treatment of BRAF(V600E) mutant metastatic melanoma, however after the initial response resistance develops almost all patients after few months during therapy.

Our aim was to describe molecular mechanisms underlying vemurafenib resistance hence to investigate the activation of downstream elements of the RAS/BRAF/ERK and RAS/PI3K/AKT/S6 molecular pathways potentially leading to resistance. Further aim was to examine the molecular background of increased migrational activity of resistant cell-lines. Altogether six sensitive-resistant pairs of melanoma cell-lines were used for the experiments. Three pairs of cell-lines were established from biopsies of the same patient taken before the therapy and after the relapsus. Other three pairs of cell-lines were established culturing the cells in the presence of growing concentrations of vemurafenib, *in vitro*. First sensitivity to vemurafenib was determined using SRB assay. The four sensitive cell-lines were characterised with low GI50 values (0.5 - 3 $\mu$ M) parallel with increased GI50 values (1.3 - >25  $\mu$ M) in their resistant pairs. *De novo* resistance was found in two pairs of cell-lines in which high GI50 values (8.4 and 19.3 $\mu$ M) were measured in the pretreatment cell-lines and resistant ones showed hardly increased GI50 values (12.4 and 23 $\mu$ M).

Immunoblot experiments were performed to evaluate the molecular background of vemurafenib insensitivity and increased migrational activity in resistant cell-lines. No uniform activation pattern could be determined underlying resistance and increased migration.

In summary, our data proves that vemurafenib resistance can be induced *in vitro* as well, however, *in vitro* and *in vivo* emerging resistance does not necessarily share the same molecular mechanisms.

Furthermore, these results suggest that resistance and increased migratory activity can not be explained only by activational changes in the RAS pathway thus even inhibition of multiple sites of the RAS pathway will likely not be sufficient to overcome vemurafenib resistance in melanoma patients.

## **10. Irodalomjegyzék**

1. Adamson E. D., 1987: Oncogenes in development. *Development*, 99. 449–471.
2. Almoguera C., Shibata D., Forrester K., Martin J., Arnheim N., Perucho M., 1988: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53. 549–554.
3. Balch C. M., Murad T. M., Soong S. J., Ingalls A.L., Halpern N. B., Maddox W. A., 1978: A multifactorial analysis of melanóma: Prognostic histopathological features comparing Clark s and Breslow s staging methods. *Ann. Surg.*, 188. 6. 732-742.
4. Beroukhim R., Lin M., Park Y., Hao K., Zhao X., Garraway L. A., Fox E. A., Hochberg E. P., Mellinghoff I. K., Hofer M. D., Descazeaud A., Rubin M. A., Meyerson M., Wong W. H., Sellers W. R., Li C., 2006: Inferring loss-of-heterozygosity from unpaired tumors using high-density oligonucleotide SNP arrays. *PLoS Comput. Biol.*, 2. 5. e41.
5. Bollag G., Hirth P., Tsai J., Zhang J., Ibrahim P. N., Cho H., Spevak W., Zhang C., Zhang Y., Habets G., Burton E. A., Wong B., Tsang G., West B. L., Powell B., Shelloe R., Marimuthu A., Nguyen H., Zhang K. Y., Artis D. R., Schlessinger J., Su F., Higgins B., Iyer R., D'Andrea K., Koehler A., Stumm M., Lin P. S., Lee R. J., Grippo J., Puzanov I., Kim K. B., Ribas A., McArthur G. A., Sosman J. A., Chapman P. B., Flaherty K. T., Xu X., Nathanson K. L., Nolop K., 2010: Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanóma. *Nature*, 467. 7315. 596–599.
6. Bollag G., Tsai J., Zhang J., Zhang C., Ibrahim P., Nolop K., Hirth P., 2012: Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov.*, 11. 11. 873–886.
7. Bos J. L., Fearon E. R., Hamilton S. R., Verlaan-de Vries M., van Boom J. H., van der Eb A. J., Vogelstein B., 1987: Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327. 293–297.
8. Bou-Assaly W., Mukherji S., 2010: Cetuximab (erbitux). *American Journal of Neuroradiology*, 31. 4. 626-627.
9. Breslow A., 1979: Prognostic factors in the treatment of cutaneous melanóma. *J. Cutan. Pathol.*, 6. 208-212.
10. Cargnello M, Roux P. P., 2011: Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75. 50–83.
11. Carlo M. C., 2008: Oncogenes and Cancer. *N Engl J Med.*, 358. 502-511.
12. Carlomagno F., Mario Chiariello M., 2014: Growth factor transduction pathways: paradigm of anti-neoplastic targeted therapy. *J Mol Med*, 92. 723–733
13. Carpenter G., Cohen S., 1990: Epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 265. 14. 7709-7712.
14. Chang F., Lee J. T., Navolanic P. M., Steelman L. S., Shelton J. G., Blalock W. L., Franklin R. A., McCubrey J. A., 2003: Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 17. 590–603.
15. Davies H., Bignell G. R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M. J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B. A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G. J., Bigner D. D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho

- J. W., Leung S. Y., Yuen S. T., Weber B. L., Seigler H. F., Darrow T. L., Paterson H., Marais R., Marshall C. J., Wooster R., Stratton M. R., Futreal P.A., 2002: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417. 6892. 949–954.
16. Flotho C., Valcamonica S., Mach-Pascual S., Schmahl G., Corral L., Ritterbach J., Hasle H., Arico M., Biondi A., Niemeyer C. M., 1999: RAS mutations and clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia*, 13. 32–37.
  17. Gilde K., 1996: Leggyakoribb bördaganatok klinikuma. *Háziorvos Továbbképző Szemle*, 1. 32-35.
  18. Gilman A. G., 1987: G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*. 56. 615–649.
  19. Gross A. Niemetz-Rahn A., Nonnenmacher A., Tucholski J., Keilholz U., Fusi A., 2015: Expression and activity of EGFR in human cutaneous melanoma cell lines and influence of vemurafenib on the EGFR pathway. *Targ Oncol*, 10. 77-84.
  20. Hanahan D., Weinberg R. A., 2000: The hallmarks of cancer. *Cell*, 100. 1. 57-70.
  21. Hanahan D., Weinberg R. A., 2011: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144. 5. 646–674.
  22. Heldin C. H., 1995: Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, 80. 2. 213-223.
  23. Huang C., Park C. C., Hilsenbeck S. G., Ward R., Rimawi M. F., Wang Y., Shou J., Bissell M. J., Osborne C. K., Schiff R., 2011:  $\beta$ 1 integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast Cancer Research*, 13. R84.
  24. John E. Niederhuber Niederhuber J. E., Armitage J. O., Doroshow J. H., Kastan M. B., Tepper J. E., 2014: Abeloff's Clinical Oncology, fifth edition. Philadelphia, Elsevier Inc. 22.
  25. Johnson L. N., Lowe E. D., Noble M. E. M., Owen D. J., 1998: The Eleventh Datta Lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Letter*, 430. 1–11.
  26. Karnoub A. E., Weinberg R. A., 2008: Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9. 517–531
  27. Klumpen H. J., Beijnen J. H., Gurney H., Schellens J. H., 2010: Inhibitors of mTOR. *Oncologist*, 15. 12. 1262-1269.
  28. Kopper L., Tímár J., 2007: Molekuláris onkológia. Budapest, Semmelweis Kiadó. 20-21.
  29. Lito P., Rosen N., Solit D. B., 2013: Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med.*, 19. 1401–1409.
  30. Lowenstein E. J., Daly R. J., Batzer A. G., Li W., Margolis B., Lammers R., Ullrich A., Skolnik E. Y., Bar-Sagi D., Schlessinger J., 1992: The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell.*, 70. 3. 431–442.
  31. Lufen C., Karin M., 2001: Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410. 37-40.
  32. Malumbres M., Barbacid M., 2003: RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*, 3. 459–465.
  33. Martin L. P., Hamilton T. C., Schilder R. J., 2008: Platinum Resistance: The Role of DNA Repair Pathways. *American Association for Cancer Research*, 14. 5. 1291-1295
  34. McCubrey J. A., Steelman L. S., Chappell W. H., Abrams S. L., Wong E. W., Chang F., Lehmann B., Terrian D. M., Milella M., Tafuri A., Stivala F., Libra M., Basecke

- J., Evangelisti C., Martelli A. M., Franklin R. A., 2007: Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1773. 1263–1284.
35. Monami G., Gonzalez E. M., Hellman M., Gomella L. G., Baffa R., Iozzo R. V., Morrione A., 2006: Proepithelin Promotes Migration and Invasion of 5637 Bladder Cancer Cells through the Activation of ERK1/2 and the Formation of a Paxillin/FAK/ERK Complex. *Cancer Res.*, 66. 7103-7110.
  36. Nazarian R., Hubing S., Wang Q., Kong X., Koya R. C., Lee H., Chen Z., Lee M. K., Attar N., Sazegar H., Chodon T., Nelson S. F., McArthur G., Sosman J. A., Ribas A., Lo R. S., 2010: Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*, 468. 973–977.
  37. Negoro K., Yamano Y., Fushimi K., Saito K., Nakatani K., Shiiba M., Yokoe H., Bukawa H., Uzawa K., Wada T., Tanzawa H., Fujita S., 2007: Establishment and characterization of a cisplatin-resistant cell line, KB-R, derived from oral carcinoma cell line, KB. *Int J Oncol*, 30. 6. 1325-1332.
  38. Paraiso K. H. T., Fedorenko I. V., Cantini L. P., Munko A. C., Hall M., Sondak V. K., Messina J. L., Flaherty K. T., Smalley K. S. M., 2010: Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. *British Journal of Cancer*, 102. 1724–1730.
  39. Parker R. J., Eastman A., Bostick-Bruton F., Reed E., 1991: Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation. *J Clin Invest.*, 87. 3. 772–777.
  40. Reuter C., Morgan M., Bergmann L., 2000: Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies?. *Blood*, 96. 5. 1655–1669.
  41. Rodenhuis S., Slebos R. J., Boot A. J., Evers S. G., Mooi W. J., Wagenaar S. S., van Bodegom P. C., Bos J. L., 1988: Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res.*, 48. 5738–5741.
  42. Rubstein J. C., Sznol M., Pavlick A. C., Ariyan S., Cheng E., Bacchiocchi A., Kluger H. M., Narayan D., Halaban R., 2010: Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med.*, 8. 67.
  43. Saldanha G., Potter L., Daferno P., Pringle J. H., 2006: Cutaneous melanoma subtypes show different BRAF and NRAS mutation frequencies. *Clin Cancer Res.*, 12. 15. 4499-4505.
  44. Shao Y., Aplin A. E., 2010: Akt3-Mediated Resistance to Apoptosis in B-RAF–Targeted Melanoma Cells. *Cancer Res.*, 70. 16. 6670–6681.
  45. Sherr C. J., 2004: Principles of tumor suppression. *Cell*, 116. 2. 235–246.
  46. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A., 2016: Cancer Statistics *Ca A Cancer Journal For Clinicians*, 66. 7–30-
  47. Sporn M. B., 1996: The war on cancer. *Lancet*, 347. 9012. 1377-1381.
  48. Stirewalt D. L., Kopecky K. J., Meshinchi S., Appelbaum F. R., Slovak M. L., Willman C. L., Radich J. P., 2001: FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 97. 3589–3595.
  49. Strausberg R. L., Simpson A. J. G., Old L. J., Riggins G. J., 2004: Oncogenomics and the development of new cancer therapies. *Nature*, 429. 6990. 469–474.
  50. Straussman R., Morikawa T., Shee K., Barzily-Rokni M., Qian Z. R., Du J., Davis A., Mongare M. M., Gould J., Frederick D. T., Cooper Z. A., Chapman P. B., Solit

- D. B., Ribas A., Lo R. S., Flaherty K. T., Ogino S., Wargo J. A., Golub T. R., 2012: Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, 487. 7408. 500-504.
51. Szakács G., Annereau J. P., Lababidi S., Shankavaram U., Arciello A., Bussey K. J., Reinhold W., Guo Y., Kruh G. D., Reimers M., Weinstein J. N., Gottesman M. M., 2004: Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell*, 6. 2. 129–137.
  52. Takai Y., Sasaki T., Matozaki T., 2001: Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, 81. 1. 153–208
  53. Tímár J., Hegedűs B., Rásó E, 2010: KRAS Mutation Testing of Colorectal Cancer for Anti-EGFR Therapy: Dogmas Versus Evidence. *Current Cancer Drug Targets*, 10. 813-823.
  54. Todd R., Wong D. T., 1999: Oncogenes. *Anticancer Res.*, 19. 6A. 4729-4746.
  55. Tsao H., Chin L., Garraway L. A., Fisher D. E., 2012: Melanóma: from mutations to medicine. *Genes Dev.*, 26. 1131–1155.
  56. Van Allen E. M., Wagle N., Sucker A., Treacy D. J., Johannessen C. M., Goetz E. M., Place C. S., Taylor-Weiner A., Whittaker S., Kryukov G. V., Hodis E., Rosenberg M., McKenna A., Cibulskis K., Farlow D., Zimmer L., Hillen U., Gutzmer R., Goldinger S. M., Ugurel S., Gogas H. J., Egberts F., Berking C., Trefzer U., Loquai C., Weide B., Hassel J. C., Gabriel S. B., Carter S. L., Getz G., Garraway L. A., Schadendorf D., 2014: The Genetic Landscape of Clinical Resistance to RAF Inhibition in Metastatic Melanóma. *Cancer Discov.*, 4. 1. 94-109.
  57. Vogelstein B., Fearon E. R., Hamilton S. R., Kern S. E., Preisinger A. C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A. M., Bos J. L., 1988: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.*, 319. 525–532.
  58. Wagle N., Emery C., Berger M. F., Davis M. J., Sawyer A., Pochanard P., Kehoe S. M., Johannessen C. M., Macconail L. E., Hahn W. C., Meyerson M., Garraway L. A., 2011: Dissecting Therapeutic Resistance to RAF Inhibition in Melanóma by Tumor Genomic Profiling. *J Clin Oncol.*, 29. 3085-3096.
  59. Weinstein I. B., Joe A. K., 2006: Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol.*, 3. 8. 448-457.
  60. Zhang J., Yang P. L., Gray N. S., 2009: Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 9. 28-39.

## **11. Köszönetnyilvánítás**

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Garay Tamás Mártonnak, hogy segítségemre volt mindenben a szakdolgozatom megírásában. Köszönök minden beszélgetést, tanácsot, gondolatot, mely előbbre vitt szakmailag.

Köszönöm prof. dr. Tímár Józsefnek, a Semmelweis Egyetem II. számú Patológiai Intézet igazgatójának, hogy megteremtette a diplomamunkámhoz szükséges háttérrel.

Köszönöm dr. Hegedűs Balázsnak, a Sejtbiológiai Laboratórium vezetőjének, hogy lehetőséget adott a laborban való kutatómunkához és köszönöm a hasznos szakmai tanácsokat, észrevételeket.

Köszönöm a sok segítséget, ötletet a labor munkatársainak, Molnár Eszternek, dr. Rittler Dominikának, dr. Gaál Anikónak, dr. Bilecz Ágnesnek, Baranyi Marcellnek és a Kalcium-munkacsoport munkatársainak, Szendefiné Lór Krisztinának és Varga Karolinának.

Köszönet a sejtvonalakért Karianne Risberg-nek és Øystein Fodstad-nak, az Institute for Cancer Research Oslo University Hospital munkatársainak és Marco Donia-nak, a University of Copenhagen Herlev Hospital munkatársának.

Köszönet, volt belső konzulensemnek, Szabó Krisztiánnak és jelenlegi belső konzulensemnek, dr. Vili Nórának, az Állatorvostudományi Egyetem Biológiai Intézet munkatársainak.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok családomnak és szeretteimnek, akik bátorítottak csüggedt pillanataimban és mellettem álltak minden helyzetben.

## 12. Mellékletek

Év	Összesen	Ebből:									
		rosszindultú daganatok	heveny szívom-elhalás	egyéb ischaemiás szívbetegség	agyér-betegség <sup>a</sup>	hőrgyhurut, tüdőtagulat és asztma <sup>b</sup>	máj-betegségek	motorosjármű-balesetek	szándékos öngyilkosság		
1993	150 244	32 201	14 991	15 953	20 396	4 893	8 525	1 806	3 694		
1994	146 889	32 703	14 126	15 855	19 514	4 777	8 712	1 719	3 625		
1995	145 431	32 941	14 630	16 112	19 814	4 629	8 589	1 750	3 369		
1996	143 130	33 475	14 087	17 259	20 158	4 380	6 834	1 427	3 438		
1997	139 434	33 458	13 238	17 660	18 884	3 994	6 810	1 456	3 214		
1998	140 870	33 547	13 051	18 391	19 205	3 780	7 333	1 463	3 247		
1999	143 210	33 821	12 416	19 073	19 286	4 356	7 279	1 407	3 328		
2000	135 601	33 280	11 312	18 487	18 939	3 732	6 883	1 292	3 269		
2001	132 183	33 318	10 948	19 014	18 821	3 166	6 457	1 352	2 979		
2002	132 833	33 013	10 215	19 459	18 510	3 243	6 137	1 547	2 843		
2003	135 823	33 530	10 160	21 287	18 626	3 929	6 255	1 457	2 801		
2004	132 492	33 502	9 733	22 291	17 467	3 640	6 071	1 426	2 742		
2005 <sup>c</sup>	135 732	30 615	10 247	26 646	15 557	4 849	5 525	1 269	2 621		
2006	131 603	31 283	8 777	26 133	14 536	4 827	5 482	1 380	2 461		
2007	132 938	31 686	8 376	25 138	14 524	5 127	5 603	1 328	2 450		
2008	130 027	32 111	7 778	25 050	13 996	4 626	5 272	1 081	2 477		
2009	130 414	32 536	7 709	25 477	14 145	4 734	5 080	924	2 461		
2010	130 456	32 460	7 481	26 361	14 001	4 589	4 622	793	2 492		
2011	128 795	32 670	7 085	26 145	13 369	4 843	4 176	742	2 422		
2012	129 440	33 224	7 018	25 933	13 081	5 088	3 697	699	2 350		
2013	126 778	32 748	6 519	25 585	12 828	5 291	3 324	661	2 093		
2014	126 308	32 748	5 972	26 167	12 390	5 212	3 440	670	1 927		
2015	131 697	32 792	6 028	26 979	12 500	6 266	3 306	734	1 870		

**1. melléklet.** Halálozások a gyakoribb halálokok szerint Magyarországon 1993-2015. között. A táblázatban a nők és a férfiak halálozási adatai összesítve vannak. (KSH).

[http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat\\_eves/i\\_wnh001.html](http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_wnh001.html)



Év	Új esetek száma			Incidencia (új esetek száma/ 100000 lakos)	Exitusok száma			Mortalitás (meghaltak száma/ 100000 lakos)
	Férfi	Nő	Együtt		Férfi	Nő	Együtt	
2001	570	685	1255	12	188	137	325	3,2
2002	627	795	1422	14	170	158	328	3,2
2003	743	947	1690	17	153	177	330	3,3
2004	739	884	1623	16	202	142	344	3,4
2005	807	955	1762	17	180	172	352	3,5
2006	820	926	1746	17	171	148	319	3,2
2007	844	936	1780	18	197	145	342	3,4
2008	930	1085	2015	20	184	156	340	3,4
2009	950	1059	2009	20	190	128	318	3,2
2010	880	1031	1911	19	205	131	336	3,4
2011	977	1001	1978	20	214	154	368	3,7
2012	1066	1222	2288	23	210	169	379	3,8

*Megjegyzés:* az incidencia értékeket a melanoma esetszámok, a mortalitás értékeket a melanoma miatti halálesetek száma és a Központi Statisztikai Hivatal magyarországi népességi adatai alapján számoltuk ki. *Forrás:* Központi Statisztikai Hivatal, Demográfiai lekérdező (8).

**2. melléklet.** Az újonnan felismert melanómák és a melanóma miatt meghaltak száma, melanóma incidencia és mortalitás adatok 2001-2012 között Magyarországon  
Tóth és mtsai.: A Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika melanomás betegeinek epidemiológiai vizsgálata (2015.)

PRIMER ANTITEST					
Primer antitest	Gyártó	Katalógusszám	Hígítás	Idő, hőfok	Szekunder antitest
Erk1/2	Cell Signaling	9102	1:1000	overnight, 4°C	anti-egér
p-Erk1/2	Cell Signaling	9101	1:1000	overnight, 4°C	anti-nyúl
AKT	Cell Signaling	9272	1:1000	overnight, 4°C	anti-nyúl
p-AKT	Cell Signaling	4558	1:1000	overnight, 4°C	anti-nyúl
S6	Cell Signaling	2217	1:1000	overnight, 4°C	anti-nyúl
p-S6	Cell Signaling	2215	1:1000	overnight, 4°C	anti-nyúl
PTEN	Cell Signaling	9188	1:1000	overnight, 4°C	anti-nyúl
Doublecortin	Gene Tex	gtx07133	1:500	overnight, 4°C	anti-nyúl
Citokeratin6B	Gene Tex	gtx110426	1:500	overnight, 4°C	anti-nyúl
SZEKUNDER ANTITEST					
anti-egér	Jackson ImmunoResearch	715035151	1:1000	1 óra, szobahő	—
anti-nyúl	Jackson ImmunoResearch	711035152	1:1000	1 óra, szobahő	—

**3. melléklet.** A vizsgálataimban használt primer és szekunder antitestek.