

DOI:10.14753/SE.2017.2015

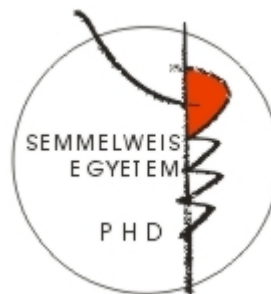
# Új prognosztikai markerek tüdő adenokarcinómában

Doktori értekezés

**Horváth-Rózsás Anita**

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulensek: Dr. Döme Balázs MD, Ph.D, osztályvezető főorvos

Dr. Tóvári József Ph.D, osztályvezető

Hivatalos bírálók: Dr. Szász A. Marcell MD, Ph.D, egyetemi tanársegéd

Dr. Bittner Nóra MD, Ph.D, osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Szende Béla DSc, professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Süttő Zoltán MD, Ph.D, egyetemi adjunktus

Dr. Czebe Krisztina MD, Ph.D, osztályvezető főorvos

Budapest

2016

**TARTALOMJEGYZÉK**

<b>1</b>	<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	4
<b>2</b>	<b>BEVEZETÉS</b> .....	8
2.1	TÜDŐDAGANATOK.....	8
2.1.1	Adenokarcinóma molekuláris patológiája.....	9
2.1.2	Prognosztikai és diagnosztikai markerek tüdő adenokarcinómában.....	10
2.1.3	Kezelési stratégiák tüdő adenokarcinóma esetében.....	11
2.2	ERYTHROPOIETIN JELÁTVITEL SZEREPE DAGANATOKBAN.....	13
2.2.1	Erythropoietin és receptora.....	13
2.2.2	Daganat-asszociált vérszegénység, lehetséges kezelések.....	15
2.2.3	EPO/EPOR szerepe daganatokban - preklinikai vizsgálatok.....	17
2.2.4	EPO/EPOR szerepe daganatokban - klinikai vizsgálatok.....	19
2.2.6	EPOR elleni ellenanyag.....	20
2.3	ACTIVIN/FOLLISZTATIN RENDSZER SZEREPE DAGANATOKBAN.....	21
2.3.1	TGF $\beta$ -szupercsalád, activin A receptorai, jelátviteli útvonalai.....	21
2.3.2	Activin A élettani szerepe.....	25
2.3.3	Activin A szerepe daganatokban.....	25
2.3.4	Activin A gátlásának lehetőségei.....	26
<b>3</b>	<b>CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	28
<b>4</b>	<b>MÓDSZEREK</b> .....	29
4.1	KLINIKAI ADATOK.....	29
4.1.1	EPOR expresszió mérése humán bronchoszkópos kefe mintákban.....	29
4.1.2	Activin A és follisztatin szint mérése humán vérmintákban.....	29
4.2	SEJTVONALAK.....	30
4.3	HATÓANYAGOK.....	31
4.4	HUMÁN VÉRMINTÁK GYŰJTÉSE.....	31
4.5	SEJTFELÜLSZÓK GYŰJTÉSE ELISA-HOZ.....	31
4.6	GÉN EXPRESSZIÓ VIZSGÁLATA VALÓS IDEJŰ PCR-REL.....	31
4.6.1	Az EPOR expressziójának valós idejű PCR-el való meghatározása.....	31
4.6.2	Activin receptorok expressziójának meghatározása tüdő adenokarcinóma sejtvonalakban.....	32
4.7	IMMUNHISZTOKÉMIA.....	33
4.8	ELISA.....	34
4.9	ACTIVIN A ÉS FOLLISZTATIN ELISA KIT TESZTELÉSE.....	34
4.10	IN VITRO TESZTEK.....	34
4.10.1	Sejtproliferációs tesztek (MTT, SRB).....	34
4.10.2	Migrációs teszt (Scratch assay).....	35
4.10.3	Activin A bioaktivitásának mérése sejtvonalak felülűszójában.....	36

4.11	IN VIVO MODELL .....	37
4.11.1	Xenograft tumorok .....	37
4.12	STATISZTIKAI MÓDSZEREK.....	37
<b>5</b>	<b>EREDMÉNYEK.....</b>	<b>39</b>
5.1	EPO/EPOR RENDSZER SZEREPE HUMAN TÜDŐ ADENOKARCINÓMÁBAN.....	39
5.1.1	Erythropoietin-receptor expressziója, rHuEPO $\alpha$ és gemcitabine kezelések in vitro hatása humán tüdő adenokarcinóma sejtek proliferációjára.....	39
5.1.2	rHuEPO $\alpha$ és gemcitabine kezelések in vivo hatása.....	41
5.1.3	Humán bronchoszkópos minták EPOR mRNS szintje és a betegek klinikopatológiai adatai közötti összefüggések.....	43
5.1.4	EPOR expressziós szint, mint prognosztikai marker .....	46
5.2	ACTIVIN A/FOLLISZTATIN SZEREPE HUMÁN TÜDŐ ADENOKARCINÓMÁBAN.....	47
5.2.1	ActA/FST szelekciója, receptorok expressziója.....	47
5.2.2	Adenokarcinóma sejtvonalak által termelt activin A molekula biokativitásának mérése .....	49
5.2.3	rhActA és rhFST kezelések in vitro hatása humán tüdő adenokarcinóma sejtek proliferációjára.....	50
5.2.4	Adenokarcinóma sejtvonalak in vitro migrációs képessége rhActA és rhFST kezelések hatására .....	52
5.2.5	Activin A és follisztatin ELISA tesztelése .....	54
5.2.6	Cirkuláló activin A szintje és összefüggések a betegek klinikopatológiai adataival.....	55
5.2.7	ActA szint, mint diagnosztikai és prognosztikai marker.....	59
5.2.8	Activin A szint és KRAS mutációs státusz összefüggése tüdő adenokarcinómában.....	63
5.2.9	FST szint jelentősége humán tüdő adenokarcinómában.....	67
<b>6</b>	<b>MEGBESZÉLÉS.....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>KÖVETKEZTETÉSEK .....</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>82</b>
<b>9</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>84</b>
<b>10</b>	<b>SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....</b>	<b>109</b>
<b>11</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>113</b>

**1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

ActA	activin A
ActR-IB	I. típusú activin receptor (ACVR1B), (ALK4)
ActR-IIA, ActR-IIB	II. típusú activin receptorok (ACVR2A, ACVR2B)
ADC	adenokarcinóma (adenocarcinoma)
AdSqLC	adenosquamous tüdő karcinóma (adenosquamous lung carcinoma)
ALK	anaplasztikus limfóma kináz (anaplastic lymphoma kinase)
ApoA1	apolipoprotein A1
ARDS	akut légúti distressz szindróma (acute respiratory distress syndrome)
ATP	adenozin-5'-trifoszfát (adenosine-5'-triphosphate)
AUC	görbe alatti terület (area under the curve)
BEST	Breast Cancer Erythropoietin Trial
bFGF	bázikus fibroblaszt növekedési faktor (basic fibroblast growth factor)
BFU-E	burst forming unit-erythroid
BIBF 1120	nintedanib
BMP	csont morfogénikus protein (bone morphogenic protein)
BrdU	5-bróm-2'-dezoxiuridin (5-bromo-2'-deoxyuridine)
CA 125	cancer antigen 125
CEA	carcinoembryonic antigen
CFU-E	colony forming unit-erythroid
CI	konfidencia intervallum (confidence interval)
CT	kemoterápia (chemotherapy)
CTC	cirkuláló tumorsejt (circulating tumor cell)
CYFRA 21-1	cytokeratin 19 fragments
DEPC	dietil-pirokarbonát
DNS	dezoxiribonukleinsav (deoxyribonucleic acid)
EGF	epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor, (epidermal growth factor

	receptor)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EML4	echinoderm microtubule-associated protein-like 4
EPC	endotél progenitor sejt (endothel progenitor cell)
EPO	erythropoietin
Epo-Cy5.5	erythropoietin receptor specifikus infravörös próba
EPOR	erythropoietin receptor
ERK	extracelluláris szignál regulált kináz (extracellular signal-regulated kinase)
ESA	erythropoiesist stimuláló ágens (erythropoiesis stimulating agent)
FBS	fötális szarvasmarha savó (fetal bovine serum)
F-EPOR	full-length form EPOR
FLRG	follistatin-related gene
FLT3	Fms-related tyrosine kinase
FMT	fluorescence-mediated tomography
FSH	folliculus stimuláló hormon (follicle stimulating hormone)
FST	follisztatin (follistatin)
GAPDH	glicerinaldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
GDF-11	növekedés-differenciációs faktor 11 (growth differentiation factor 11)
HAP2	haptoglobin-alpha 2
HCT	hematokrit (hematocrit)
Her-2	human epidermális növekedési faktor receptor 2 (human epidermal growth factor receptor 2)
Hgb	hemoglobin
HGF	hepatocyta-eredetű növekedési faktor (hepatocyte growth factor)
HIF-1 $\alpha$	hypoxia indukálta faktor -1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ )
HNSCC	fej-nyaki laphám karcinóma (head and neck squamous cell carcinoma)
HR	relatív kockázat (hazard ratio)
HRE	hypoxia reszponzív elem (hypoxia-response element)

HRP	torma-peroxidáz (horseradish peroxidase)
HSP-70	hősokkfehérje-70 (heat shock protein-70)
HUVEC	humán köldökzsinór véna endotél sejtek (human umbilical vein endothelial cells)
IHNBA	inhibin $\beta$ A
IL-8	interleukin-8
JAK2	janus kinase 2
JNK	jun N-terminal kinase
KLKs	kallikreins
KRAS	Kirsten patkány szarkóma virális onkogén homológ gén (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog gene)
lamC2	laminin C2
LCC	nagysejtes tüdőrák (large cell carcinoma)
mAb	monoklonális antitest (monoclonal antibody)
MAPK	mitogén aktivált protein kináz (mitogen activated protein kinase)
MEK	mitogén aktivált protein kináz kináz (mitogen activated protein kinase kinase)
MMP	mátrix-metalloproteáz (matrix-metalloproteinase)
NSCLC	nem-kissejtes tüdőrák (non-small cell lung cancer)
OS	teljes túlélés (overall survival)
PBC	platina-bázisú kemoterápia (platina based chemotherapy)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PDGF	vérlemezke eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor)
PI3K	foszfoinozitol-3-kináz (phosphatidylinositol 3-kinase)
PIGF	placenta-eredetű növekedési faktor (placental growth factor)
PKC	protein kináz C (protein kinase C)
PT	palliatív-terápia (palliative treatment)
qRT-PCR	kvantitatív valós idejű PCR (quantitative real-time PCR)
RCT	radio-kemoterápia (radio-chemotherapy)
rHuEPO	rekombináns humán erythropoietin (recombinant human erythropoietin)

RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RNS	ribonukleinsav (ribonucleic acid)
ROC	vevő működési karakterisztika (receiver operating characteristics)
RR	relatív rizikó (relative risk)
RT	radioterápia (radiotherapy)
S	műtét (surgery)
SAA	szérum amyloid A (serum amyloid A)
SCC	laphámsejtes karcinóma (squamous cell carcinoma)
SCID	súlyos kombinált immunhiány (severe combined immunodeficiency)
SCLC	kissejtes tüdőrák (small cell lung cancer)
SDS	nátrium-dodecyl szulfát (sodium dodecyl sulfate)
S-EPOR	szolubilis EPOR (soluble form EPOR)
SHP-1	Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1
SN	felülúszó (supernatant)
SOCS	suppressor of cytokine signalling protein
SRB	szulforodamin B (sulforhodamine B)
STAT	szignál transzducer és transzkripciós aktivátor (signal transducer and activator of transcription)
TCA	triklórecetsavval (trichloroacetic acid)
T-EPOR	trunkált-EPOR (truncated EPOR)
TGF- $\beta$	transzformáló növekedési faktor $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ )
TK	tirozin-kináz (tyrosine kinase)
TKI	tirozin-kináz gátlók (tyrosine kinase inhibitor)
T/N	tumor/normal (tumor/normal)
VEGF	vaszkuláris endotéliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)

## 2 BEVEZETÉS

### 2.1 Tüdődaganatok

A daganatos megbetegedések közül a legmagasabb halálozási rátával rendelkező tüdődaganatok komoly egészségügyi problémát jelentenek világszerte. A diagnosztika valamint a sebészeti-, radiológiai- és kemoterápiás kezelési stratégiák folyamatos fejlesztése ellenére az ötéves túlélés még mindig 10-15%-os, ezért a háttérben álló biológiai folyamatok jobb megismerése szükséges (1).

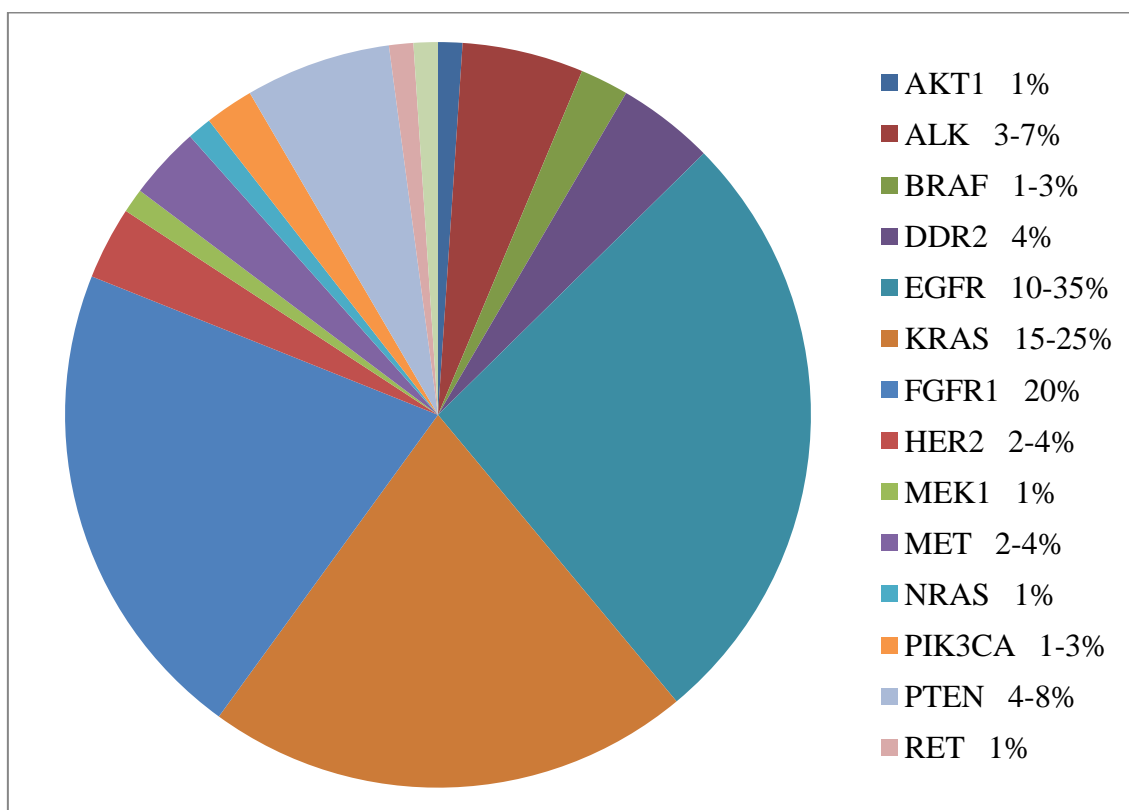
Korábban terápiás (onkológiai) szempontból a tüdőrákokat két nagy csoportba sorolták: nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) és kissejtes tüdőrák (SCLC) (2). Napjainkban a célzott terápiák folyamatos fejlesztésével, a tüdődaganatok terápiás és patológiai szövettan szempontjából való felosztása közeledni látszik egymáshoz, mely a kezelések hatékonyságának javulását eredményezhetik. Az újabb szempontok alapján az alábbi felosztást alkalmazzák. Laphámsejtes karcinóma (SCC), a tüdődaganatok 30-40%-át teszik ki, általában a tüdő epithél sejtjeiből eredeztethetőek, centrális elhelyezkedésűek, gyakorta nekrotizálnak és szoros összefüggést mutatnak a dohányzással. Adenokarcinóma (ADC), a tüdődaganatok 40%-át teszik ki (2), Clara-sejtekből illetve a II. típusú alveoláris sejtjeiből származtathatóak, nemdohányzók illetve nők körében gyakrabban előfordul, általában periférián alakulnak ki és pleuraérintettséget is mutathatnak. Adenosquamous tüdő karcinóma (AdSqLC), a tüdődaganatok 2,5-3%-át teszik ki, malignus laphám és mirigyhám komponensekből állnak, általában periférián alakulnak ki. Kissejtes tüdőrák, neuroendokrin jellegű hámtumor, a tüdődaganatok 13-15%-át teszik ki, a bronchiális rendszer endokrin sejtjeiből, a Kulchitsky-sejtekből származtatják, neurosecretoricus granulákat mutatnak, igen magas malignitásúak, általában centrálisan helyezkednek el és szintén szoros összefüggést mutatnak a dohányzással. Nagysejtes tüdőrák (LCC), a tüdődaganatok 5-10%-át teszik ki, malignus epitheliális tumorok, nagy, vezikuláris magok jellemzőek és kialakulásuk szoros összefüggést mutat a dohányzással. Egyik fontos alcsoportja a neuroendokrin variáns, mely a kissejtes tüdőrákkal mutat hasonlóságot. Karcinoid tüdődaganatok szintén neuroendokrin tumorok, igen ritkák a tüdődaganatok körében, a diffúz neuroendokrin



rendszer sejtjeiből származnak, vazóaktív anyagokat, szerotonint, bradikinint, hisztamint, polipeptid hormonokat termelnek (3).

### 2.1.1 Adenokarcinóma molekuláris patológiája

A tüdő adenokarcinóma molekuláris patológiájában ma már több úgynevezett „driver” onkogén mutáció is rendelkezésünkre áll, melyek meghatározása mind prognosztikai mind prediktív jelentőséggel bírnak. A három legismertebb ilyen komponens az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és Kirsten patkány szarkóma virális onkogén homológ gén (KRAS) mutációi, valamint az anaplasztikus limfóma kináz (ALK) génátrendeződése (1. ábra).



**1. ábra** Klinikailag releváns mutációk százalékos megoszlása tüdő adenokarcinómában Lovly és munkatársai nyomán <https://www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/>.

Tüdő adenokarcinómás betegeknél az EGFR-mutáció 15%-ban fordul elő, míg a gén amplifikációja 10%-ra tehető. Az EGFR tirozin-kináz (TK) doménjének 18-, 19-,

20-, 21-es mutációi a PI3K/AKT, ERK/MAPK és STAT jelátviteli útvonalakat serkentik és így fokozzák a sejt túlélési képességét valamint antiapoptotikus hatása van (4). Némely mutációk ezek közül, mindamellet, hogy serkentik a receptor kináz aktivitását, fokozzák a tirozin-kináz gátlók (TKI) kapcsolódását a receptorhoz (5). Annak megítélésére, hogy a beteg milyen érzékenységet mutathat majd az EGFR tirozin-kináz gátlókra, a leghatékonyabb a gén fent említett mutációinak vizsgálata. A 19-es exon deléciója (746-753 régióban) és a 21-es exon pontmutációja (L858R) a leggyakoribbak (85-90%) és pozitív prediktív értékük van az EGFR-TKI-k iránti érzékenység tekintetében. A 18-as és 20-as exon mutációi jóval ritkábbak (10-15%) és míg a 18-as exon mutációja szintén pozitív, addig a 20-as exon mutációja erősen negatív prediktív értékű a TKI-k hatékonyságának tekintetében (6).

Az EGFR-TKI iránti rezisztencia egy másik formája lehet, amikor nem az EGFR aktivitása befolyásolja elsősorban a daganat növekedését, hanem egy „downstream” jelátviteli molekula, mint például a KRAS onkogén aktiváló mutációja. Tüdő adenokarcinóma esetében a KRAS gén mutációi 30%-os gyakorisággal fordulnak elő, a gén 12-es és 13-as kodonjára kell minimálisan megadni a mutációs státuszt és mindkét esetben negatív prediktív értéke van.

Az tüdő adenokarcinómás betegek 5-7%-ában fordul elő egy másik génhiba, nevezetesen az ALK gén transzlokációja (7). Egy kromoszómátörést követően az ALK gén egy másik gén, leggyakrabban az EML4 génnel, történő fúziója során jön létre az EML4-ALK transzlokáció és így egy folyamatosan aktív tirozin-kináz fúziós protein keletkezik. Ezzel a transzlokációval rendelkező daganatok nagyfokú érzékenységet mutatnak az ALK tirozin-kináz gátlókra, mint például a crizotinibre (Xalkori; Pfizer, NY, USA) (8).

### **2.1.2 Prognosztikai és diagnosztikai markerek tüdő adenokarcinómában**

Mivel számottevő különbségek vannak az azonos stádiumú ADC betegek prognózisában, nagy szükség van a klinikailag megbízható, nem invazív biomarkerekre, melyek segítséget nyújtanak a megfelelő kezelés kiválasztásában és a betegség prognózisának előrejelzésében. Jelenleg csak néhány, vérből kimutatható biomarkert vizsgálnak tüdő ADC-ben. Ilyen fehérje markerek például a szérum cytokeratin 19

fragments (CYFRA 21–1), melyet előrehaladott tüdő ADC-ben vizsgáltak (9). További példák a carcinoembryonic antigen (CEA) (10), szérumszulfid A (SAA) (11, 12), cancer antigen 125 (CA 125) (10, 13), haptoglobin- $\alpha$  2 (HAP2) (14, 15), apolipoprotein A1 (ApoA1) (14, 16), kallikreins (KLKs) (17-19), laminin C2 (lamC2) (13) és a plazma fibrinogén (20). Tumorból származó, cirkuláló biomarkerek vizsgálatára is találunk példát, ilyenek a szabad nukleinsavak (úgy, mint a DNS és a microRNS-ek (21)), metabolitok (22, 23) vagy a cirkuláló tumorsejtek (CTCs) (21, 24, 25) melyek szintén alkalmasak lehetnek a betegség klinikai kimenetelének előrejelzésére. Bár mindent összevetve, a fent említett biomarkereket a klinikumban nem használják (26).

### **2.1.3 Kezelési stratégiák tüdő adenokarcinóma esetében**

A tüdődaganatok, így az adenokarcinóma esetében is manapság a komplex és kombinált onkoterápia a javasolt kezelési eljárás. A resezekabilis daganatok esetében a műtétet számtalanszor adjuváns kemoterápia, indokolt esetben sugárkezeléssel kiegészülve követi, illetve bizonyos esetekben neoadjuváns kemo/radioterápia kezelést is alkalmazhatnak, mely hatására resezekabilissá válhat a daganat. Az újabb kutatási eredményeknek köszönhetően az adenokarcinóma gyógyszeres terápiájában néhány célzott kezelés is elérhetővé vált, mely tovább növelheti a betegek túlélési esélyeit (3). Az előrehaladott stádiumú tüdő ADC betegek standard kemoterápiás kezelése, jó általános állapot esetében és EGFR aktiváló mutáció hiányában, a harmadik generációs szerek (gemcitabine, pemetrexed, taxánok, vinorelbine) platina-bázisú (cisplatin, carboplatin) kettős kombinációja (27). Ezen terápia esetében az átlag túlélés 3-4 hónapról (kezeletlen tüdő ADC) 8-14 hónapra emelkedett (28, 29). Újabb eredmények azt mutatják, hogy a pemetrexed/cisplatin kombináció, hatásosabbnak bizonyult a gemcitabine/cisplatin kombinációnál (30). A négy ciklus pemetrexed/cisplatin kombinációs kezelés után, folyamatos fenntartó kezelésként a pemetrexed szintén meghosszabbíthatja a beteg teljes túlélését (31).

EGFR aktiváló mutáció megléte esetében olyan kismolekulájú reverzibilis EGFR tirozin-kináz gátlókat használnak, melyek az ATP-vel versengve gátolják a kináz aktivitást és ezen keresztül a jelátviteli kaszkádot. Lokálisan előrehaladott vagy

metasztatikus ADC-ben első vonalban gefitinib (Iressa; Astrazeneca Pharmaceuticals, Wilmington, USA)- vagy erlotinib (Tarceva; Genentech Inc., San Francisco, USA)-monoterápia alkalmazható a betegség progressziójáig. A törzskönyvi előirat szerint másod- illetve harmadvonalban is alkalmazható a gefitinib-, erlotinib- monoterápia EGFR aktiváló mutáció meglétekor. A progresszió kialakulását követően platina-bázisú kombináció választandó harmadik generációs citotoxikus szerrel (3) vagy a T790M aktiváló mutáció felhalmozódásakor az osimertinib (Tagrisso, AstraZeneca Pharmaceuticals, Wilmington, USA) bizonyult hatékonynak. A cetuximab (Erbix; Merck, Darmstadt, Németország) egy monoklonális antitest (mAb), amely az EGFR extracelluláris, ligand-kötő doménjéhez kötődve fejt ki hatását, így a ligand függő EGFR aktivációt gátolja (32), vagyis a magasabb EGFR expresszió esetében hatékonyabb. A FLEX vizsgálatot követően, tüdőrákban a cetuximabot Európában nem törzskönyvezték, de fontos megjegyezni, hogy a két gátló mechanizmus kombinált alkalmazásával csökkenthető az EGFR reaktivációja így hatékonyabb EGFR gátlást lehet létrehozni (33).

A daganatok fennmaradásához, növekedéséhez és terjedéséhez elengedhetetlen az új érhalózat létrehozása, ezt hívjuk neoangiogenezisnek. Szolid tumorok esetében számos mechanizmust azonosítottak már, melyen keresztül a tumor vérellátása megvalósulhat (34). Ezek mind különböző angiogén faktorok hatására következnek be, így ezen faktorok gátlása is egy lehetséges terápiás útvonal a daganatok megfékezésére. Ilyen angiogén faktorok többek között a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), a bázikus fibroblaszt növekedési faktor (bFGF), a mátrix-metalloproteázok (MMP-k), az epidermális növekedési faktor (EGF), a placenta-eredetű növekedési faktor (PlGF), az interleukin-8 (IL-8), a hepatocita-eredetű növekedési faktor (HGF) és az angiopoetinek (35). Ezek közül a VEGF-A elleni humanizált monoklonális antitest a bevacizumab (Avastin; Genentech/Roche, San Francisco, USA), mely az ADC betegek körében elsőként elfogadott antiangiogén szer. Első vonalban a carboplatin és paclitaxel kombináció kiegészítéseként adható, majd monoterápiaként folytatható a bevacizumab fenntartó kezelésként a progresszió megjelenéséig. Az eddigi vizsgálatok eredményei alapján a bevacizumab kezelésben részesülőknél bizonyos kritériumnak kell megfelelniük. Ilyen kritériumok például: nem reszekálható, lokálisan előrehaladott vagy metastatikus

daganat, valamint különösen tekintettel kell eljárni az antikoaguláns kezelésben részesülő betegek esetében (36, 37). Egy másik törzskönyvezett antiangiogén szer a ramucirumab (Cynamza, ImClone Systems, New York City), egy humán monoklonális ellenanyag a VEGFR-2 receptor ellen. Másodvonalban, platina bázisú kezelés után progrediáló metasztatikus betegeknek adják, docetaxellel kombinálva. Számos egyéb VEGF útvonalat gátló antiangiogén gyógyszer jelenleg is vizsgálat alatt áll.

Szintén újabb lehetőségeket nyitnak a tüdőrák kezelésében a több célpontú gátlószereket, melyek több receptorra hatva, több útvonalat gátolnak egy időben. Ezidáig közülük 2014 végén a nintedanib (BIBF 1120/IMC1121B, Vargatef; Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Németország) hatóanyagú szert engedélyezték lokálisan előrehaladott, áttétet képzett vagy lokálisan kiújult tüdő adenokarcinóma esetében. A nintedanib egy olyan multi-target TKI, mely a VEGFR 1-3, PDGFR  $\alpha$  és  $\beta$ , FGFR 1-3, FLT3 receptorok tirozin-kináz aktivitását gátolja. A LUME-Lung 1 klinikai vizsgálatban kapott eredményeknek megfelelően, a korábban már kemoterápiás kezelésben részesülő betegeknél a nintedanib a docetaxellel kombinációban adható.

Mint már fentebb említettem a tüdő ADC betegek 30%-át érinti KRAS mutáció, ami 1% százalék kivételével kizárja az EGFR mutációkat, így az ezen mutációk esetében adható célzott kezelések lehetőségét is. Kutatások folynak, a szignalizációs útvonalban a RAS molekula alatt elhelyezkedő egyéb kulcsmolekulák, mint például a MEK (Mitogen-activated protein kinase kinase, MEK1 és MEK2) kináz enzim gátlására. Az egyik ilyen hatóanyag a selumetinib (AstraZeneca Pharmaceuticals, Wilmington, USA), a MEK1/2 enzim ATP független inhibitora. Jelenleg a SELECT-1 klinikai vizsgálatban tesztelik, másodvonalbeli kezelésnek, ADC KRAS mutáns betegeknek, docetaxellel kombinálva (Janne PA\_2016).

## **2.2 Erythropoietin jelátvitel szerepe daganatokban**

### **2.2.1 Erythropoietin és receptora**

Az erythropoietin (EPO) egy glikoprotein-hormon, alapvetően a vese peritubuláris sejtjeiben, kisebb mennyiségben azonban a májban is termelődik. A

csontvelőben történő vörösvérsejtképzés (erythroid precursorok: BFU-E és CFU-E sejtek) legfontosabb stimuláló faktora, serkenti a sejtosztódást és differenciálódást, valamint anti-apoptotikus hatása is van (38). Termelésének legfontosabb szabályozója a perifériás vérben keringő vörösvérsejtek száma, azok oxigénszállító kapacitása, vagyis a szervezet oxigénellátottsága: alacsony oxigénszint serkenti, magas pedig gátolja az EPO termelését. Hypoxia hatására megnő a hypoxia indukálta faktor (HIF)  $-1\alpha$  és  $-1\beta$  transzkripciós faktorok stabilitása és a sejtmagba jutva kötődnek az EPO gén promoter régiójában található hypoxia reszponzív elemhez (HRE), előidézve ezzel a gén fokozottabb átírását (39).

A humán EPO gént 1985-ben klónozták először, majd hamarosan megjelentek a klinikumban ma már világszerte alkalmazott különböző rekombináns formák (rHuEPO-k). Az endogén EPO molekulásúlyának közel 40%-át a glikolizált részek teszik ki, féléletideje a vérben öt óra. Rekombináns formái általában glikolizáltságban és egyéb módosulásokban térnek el az endogén formától, így ezek sokszor stabilabbak, hosszabb féléletidejűek. A klinikumban leggyakrabban használt három formája az epoetin  $\alpha$  (Eprex, Janssen-Cilag Ltd.), epoetin  $\beta$  (NeoRecormon, Roche) és a darbepoietin  $\alpha$  (Aranesp, Amgen).

Az erythropoietin receptora (EPOR) egy 59 kDa molekulásúlyú glikoprotein transzmembrán receptor, a citokin receptor szupercsalád tagja. Számos formája kifejeződik az erythroid progenitor sejtekben, így például a teljes (F-EPOR), a trunkált (T-EPOR) és a szolúbilis formák (S-EPOR), (40, 41). Bár a receptor mindhárom formája rendelkezik extracelluláris ligandkötő képességgel, a T-EPOR intracelluláris doménje, a S-EPOR esetében pedig mind a transzmembrán, mind az intracelluláris doménje hiányzik. Pontos szerepükről még nem sokat tudni, de azt megfigyelték, hogy az S-EPOR neuronális szövetben a F-EPOR antagonistájaként köti meg az erythropoietint (42). A receptor féléletideje igen rövid (1-2 óra), ennek is köszönhető, hogy a vérképző sejtekben a F-EPOR molekulák kevesebb, mint 1%-a kerül a sejtfelszínre (43).

EPO jelenlétében két EPOR molekula homodimerizálódik, majd az így létrejött konformáció változás eredményeként a JAK2 molekula autofoszforilációja következik be, mely az alábbi szignalizációs útvonalakat indítja be: STAT5 (illetve STAT3), MAPK/ERK, PI3K/AKT és PKC (44). Az ezen útvonalak által stimulált jelátvivő

fehérjék funkciójukat tekintve igen széles spektrumot ölelnek át, így például szerepük van a sejtproliferáció, az apoptózis, a differenciálódás és a kemorezisztencia szabályozásában (45). Az EPOR szignalizáció negatív szabályozói pedig a SHP-1 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1) (46) és a SOCS (supressor of cytokine signaling) fehérjék (47).

Számos korábbi kutatás bizonyította, hogy az EPO/EPOR szignalizációnak nem csak a vérképzésben van jelentősége. Kimutatták, hogy az EPOR megtalálható nem-vérképző sejtek felszínén is, így például vérerek endotél sejtjein és az izomsejteken is. EPO indukálta sejtproliferációt figyeltek meg a vese-, illetve bélrendszer sejtjein valamint myeloblasztoknál (48-51). További kutatások pedig rávilágítottak az EPO érképződést stimuláló hatására patkány mellkasi aortában (52), csirke chorioallantois membránban (53), női reproduktív szervekben (54), illetve sebgyógyulás során (55). Mindemellett az EPO-nak neuroprotektív szerepe is van a központi idegrendszert ért károsodások (pl. ischemia, trauma, neurotoxinok) esetén (56).

### 2.2.2 Daganat-asszociált vérszegénység, lehetséges kezelések

A vérszegénység daganatos betegeknél gyakori probléma, mely jelentősen csökkenti a betegek életminőségét és progressziómentes túlélését. A vérszegénység kiváltó oka lehet maga a daganat, vagy az annak kezelésére indított citotoxikus terápia (57). A vérszegénység előfordulásának gyakorisága változó a neoplasia típusának tekintetében (58, 59), de a szolid tumoros betegek nagyjából fele már vérszegény a diagnózis felállításakor. A vérszegénység hemoglobin (Hgb) szint szerinti osztályozására a National Cancer Institute az alábbi javaslatot tette (59) (**1. táblázat**).

**1. táblázat.** Az anaemia osztályozása (National Cancer Institute).

<b>Grade</b>	<b>Hemoglobin érték</b>
0 (normál érték)	12-16 g/dl nőknél, 14-18 g/dl férfiaknál
1 (enyhe)	10 g/dl – normál érték között
2 (közepes)	8-10 g/dl
3 (erős)	6,5-8 g/dl
4 (életveszélyes)	<6,5 g/dl

A tumoros vérszegénység patofiziológiája igen összetett. A tumor közvetve különböző útvonalakon befolyásolhatja a beteg Hgb-szintjét és a vérképzést. A tumorsejtek és az immunrendszer interakciójának következtében citokinek szabadulnak fel (interferon- $\gamma$ , interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ ), melyek megzavarják a vese EPO-termelését, valamint gátolják az erythroid prekursorok differenciálódását a csontvelőben. Ugyanakkor a makrofágok aktiválódása, a vörösvérsejtek fokozott fagocitózisa, azok rövidebb féléletidejéhez vezet, illetve csökken a hatékony vas felhasználás (60).

A daganatterápiában alkalmazott sugárkezelésnek, illetve a citotoxikus szereknek is szerepük van a vérszegénység kialakulásában. A platina bázisú kemoterápia mind a kissejtes, mind pedig a nem-kissejtes tüdőrák esetén első választásként adandó kombináció. A platina-bázisú kemoterápiák roncsolják a vese tubulus sejteket, ezáltal csökkentik az endogén EPO termelését (61). A platina-bázisú kemoterápia alkalmazása után a betegek 60%-ánál diagnosztizálnak enyhe, vagy közepes fokú vérszegénységet (59). A tüdődaganatos betegek körében ez az érték 50% és 86% között mozog, folyamatosan emelkedve a kemoterápiás kezelések számának növelésével (62).

A kemoterápia indukálta vérszegénység esetén többféle kezelés jöhet szóba: vértranszfúzió, erythropoiesist stimuláló ágens (ESA) adása a betegnek, ami az erythroid progenitor sejtek differenciálódásának korai fázisára, illetve az EPO-tól független útvonalat befolyásoló sotatercept (ACE-011) és luspatercept (ACE-536), ami az erythroid progenitor sejtek differenciálódásának késői fázisára van hatással (63, 64). Míg a nagyobb kockázattal (allergiás reakciók, fertőzések, hemolitikus reakciók, ARDS) járó vértranszfúzió (65) helyettesíthető a kevésbé rizikós ESA kezeléssel, ez utóbbi hátránya, hogy a kezelés következtében vénás tromboembólia alakulhat ki (66). Az újabb, vérszegénység kezelésére tesztelt gyógyszer, a sotatercept még klinikai vizsgálat alatt áll, de az eddigi eredmények alapján minimális mellékhatások mellett emelte a betegek Hgb és HCT szintjét (67).

Számos preklinikai és klinikai vizsgálatban tanulmányozták az ESA alkalmazásának előnyeit és hátrányait egyaránt. Bár az rHuEPO hatékony gyógyszer a vérszegénység korrekciójára, néhány klinikai vizsgálat alapján felmerült, hogy hatására



csökkenhet a betegek túlélése és a daganatok kontrollálhatósága (68). 2003-ban például az első két nagy klinikai vizsgálat váratlan eredményeket hozott. A Breast Cancer Erythropoietin Trial (BEST) idő előtt felfüggesztésre került, amikor a kutatók kimutatták, hogy a kemoterápia+EPO kezelt csoportban nagyobb a halálozási ráta, mint a csak kemoterápiában részesülők között (69). A másik, besugarazott fej-nyak daganatos betegek bevonásával végzett ENHANCE vizsgálatban az EPO-val előkezelt csoport progressziómentes túlélése lerövidült az előkezelésben nem részesülő csoportéhoz képest (70). Az előbbieket is beleértve 8 klinikai vizsgálat zárult a betegek szempontjából rossz eredménnyel – azaz az ESA kezelés gyorsította a progressziót és növelte a halálozást daganatos betegeknél. Ugyanakkor számos meta-analízis készült, amelyek alapján a daganat progressziójára és a betegek túlélésére az ESA kezelés nem volt hatással (71-74), vagy éppen pozitívan befolyásolta azt (75).

### **2.2.3 EPO/EPOR szerepe daganatokban - preklinikai vizsgálatok**

Szenajch és kollégái feltételezik, hogy az EPO/EPOR expresszió pozitívan korrelál a diszplázia mértékével. Míg a normál emlő, petefészek, méhnyak sejteken és melanocitákon szinte nem is detektálható EPO/EPOR jelenlét, addig expressziójuk folyamatosan emelkedik a benignus formától a leginvaszívabb forma irányába. Ezek alapján úgy gondolják, hogy az EPO/EPOR rendszernek szerepe lehet a malignus átalakulásban (45). Az EPO/EPOR expressziójának megléte felveti a kérdést, hogy akár az endogén EPO, akár az exogén rHuEPO vagy más ESA kezelés hatására változik-e a tumorsejtek proliferációja, túlélési képessége.

*In vitro* kísérletekben a sejtproliferációt általában 1-5 napon keresztül vizsgálták, 0,25 és 100 U/ml közötti rHuEPO kezelés mellett. Bár bizonyos tumorsejttípusok esetében sikerült kimutatni az rHuEPO *in vitro* hatását a sejtosztódásra (76, 77), az eddigi eredmények alapján tüdőrák sejtvonalakra nem volt befolyással (78-82).

*In vivo* xenograft modellek még pontosabb képet adhatnak az ESA kezelés patofiziológiás hatásáról. Elliott és munkatársai 2012-ben 31 addigi *in vivo* tanulmány eredményeit összegezték és azt vizsgálták, hogy a sokszor igen magas dózisban adott ESA hatására nő-e a tumorméret és, hogy egyéb kezelésekkel kombinálva szinergisztikus hatást fejtenek-e ki. A tanulmányok felében, 14 esetben nem volt

hatással az ESA kezelés a tumor növekedésére, illetve a kezelésre, 13 tanulmányban számoltak be arról, hogy önmagában ugyan nem volt hatása az EPO-nak, de az alkalmazott kezelésnek fokozta a hatását, illetve 2-2 tanulmány számolt be az EPO tumornövekedést serkentő, illetve gátló hatásáról (83). Ebből is látható, hogy különböző daganattípusok esetében az eredmények igencsak különbözőek és az EPO-EPOR jelátvitel hatása a tumorok progressziójára és a terápiára nem egyértelmű. Saját kutatócsoportunk kimutatta, hogy humán vastagbél (HT25) és laphámrák (A431) xenograft modelleken az rHuEPO jelenléte szignifikánsan csökkentette a tumorhypoxiát, a HIF-1 $\alpha$  és a VEGF expresszióját, miközben nem hatott a tumorok növekedésére. Vizsgálatainkban az rHuEPO ugyanakkor szignifikánsan növelte a tumor asszociált endotél sejtek proliferációját, és az intratumorális erek kerületét. Az így megnövekedett érfelszín segítette a gyógyszerek tumorsejtekhez való eljutását és erősítette a kemoterápia tumorelles hatását (84). Egy újabb kutatásban azt találtuk, hogy az rHuEPO nem módosította az EPOR+ A431 tumorsejtek *in vitro* proliferációját, de növelte a besugárzás proliferációra, apoptózisra és a klonogén kapacitásra gyakorolt hatását. Ugyanebben a vizsgálatban a kizárólag rHuEPO-val történő kezelés csökkentette a tumorális HIF-1 $\alpha$  expressziót, de nem hatott a tumor növekedésre, bár az rHuEPO szignifikánsan növelte az *in vivo* radioterápia hatását (85).

A Lewis tüdőrák sejtvonal EPOR expressziója szintén kérdéses. Míg Sigounas és Shannon szerint expresszálja az EPOR-t, addig Okazaki és munkatársai, mint EPOR-negatív sejtvonalat használták kísérletükben (86). Az ESA kezelés önmagában nem befolyásolta a tumor növekedését, kemoterápiával kombinálva azonban szignifikánsan csökkentette a tumorméretet a csak kemoterápiával kezelt csoporthoz képest (87). Ezzel szemben Okazaki és munkatársai eredményei azt mutatják, hogy mint EPOR-negatív tumormodell alkalmazva, ESA kezelés hatására szignifikáns tumornövekedés volt tapasztalható (88). Az EPOR endotél sejteken való kifejeződése, illetve az EPO kezelés sejtosztódást serkentő hatása endotél sejteken (88) azt sugallja, hogy az EPO direkt hatással lehet a tumor kapilláris hálózatára. Korábbi kísérletek azt is alátámasztják, hogy az rHuEPO mozgósítani tudja az endotél progenitor sejteket (EPC) (88, 89), egy csontvelőből származó sejtpopulációt, amelynek klinikai jelentősége van NSCLC betegeknél (90). Humán tüdőrák (A549) xenograft modellben az EPO-beta nem befolyásolta sem a tumornövekedést, sem a tumorméretet, majd bevacizumabbal - az

érképződést gátló humanizált monoklonális antitesttel - kombinálva nem növelte annak tumorelles aktivitását sem (91).

#### **2.2.4 EPO/EPOR szerepe daganatokban - klinikai vizsgálatok**

A tumorhypoxia kulcsfontosságú elem a daganatok progressziójában, mivel jelentős hatással van az érképződésre, a kezeléssel szembeni rezisztenciára, és a tumorsejtek metabolizmusára (92). Tüdőrákos betegekben gyakran alakul ki anaemia, mely szisztémás és intratumorális hypoxiához vezet (93). Irodalmi adatok alapján a hypoxia növeli a tumorsejtek agresszivitását, és elősegíti a malignus progressziót. Továbbá a tumorhypoxia alapvető hatással van nem csak a prognózisra, de a terápiára adott válaszra is (92), ezért indokoltak a tüdőrákos betegek intratumorális oxigén státuszának korrekciójára irányuló kísérletek. Rekombináns humán EPO-t az 1980-as évek végétől használják a klinikumban daganatos-anaemiás betegek kiegészítő kezeléseként. Előnyei a következők: hatására csökken a vérszegénység, ezáltal javul a betegek életminősége; a tumorszövet oxigenizációjának növelésével csökken a szövet hypoxiája, mely a kemoterápia és sugárkezelés fokozottabb hatékonyságához vezethet (94); valamint biztonságosabb és hatékonyabb, mint a vértranszfúzió. A mellékhatások kiküszöbölése érdekében beszabályozták az ESA szerek használatát és az érvényben lévő határozatban megfogalmazzák, miszerint csupán nem kuratív célú, kemoterápiával összefüggő anaemia esetén adható. Mindez érthető, mivel az EPO/EPOR rendszer funkciója daganatos betegek esetén még nem kellően ismert.

Mind humán, mind kísérleti eredmények azt mutatják, hogy számos malignus folyamatban, így NSCLC-ben is, az EPO/EPOR jelátvitelnek fontos szerepe van a tumorsejtek proliferációjában, migrációjában, invazivitásában és apoptózisában (95). Yasuda és kollégái normál és malignus tüdőszövetben vizsgálták az EPO és EPOR expresszióját, valamint a MAPK/ERK1/2 útvonal aktivációját. A malignus mintáknál ugyan kisebb intenzitással, de a normál tüdőszöveten is kimutatható volt az EPOR expressziója. A MAPK/ERK1/2 foszforilációja viszont csak a malignus tüdőszövetben volt látható, a makrofágokat kivéve. A kapott eredmények alapján feltételezik, hogy normál körülmények között a tüdőszövet a globinok különböző formáit termeli, majd

hypoxiás stressz hatására, az EPO termelése fokozódik és a MAPK útvonalon keresztül fokozott sejtosztódásba kezdenek (96).

Vansteenkiste és munkatársai 2012-ben elvégzett meta-analízisükben 12 SCLC/NSCLC klinikai vizsgálat eredményét használták fel. Az eredményeik alapján elmondható, hogy az ESA kezelések csökkentik a vértranszfúziók számát, és nem befolyásolják a betegek progressziómentes, illetve teljes túlélését. Beteg-szintű adatanalízis során azonban kiderült, hogy a darbepoietinnel kezelt csoportban nagyobb valószínűséggel következhet be tromboembóliás mellékhatás (10,5%) a kontroll csoporthoz képest (7,2%) (97).

Hat nagyobb, különböző daganattípusokat magába foglaló meta-analízis eredményei pedig arra engednek következtetni, hogy az ESA kezelés nincs hatással a progresszió mértékére, bár bizonyos betegpopulációk esetében (pl. fej-nyak tumoros betegek) befolyásolhatja a progressziómentes túlélést és/vagy a teljes túlélést (98).

A vérszegénység sok daganatos beteg gyógyulását nehezíti meg és jelentősen rontja az életminőséget, ezért a vérszegénység korszerű és hatékony kezelése elengedhetetlen a daganatterápiában is. Az EPO/EPOR rendszer daganatokban betöltött szerepének megértéséhez azonban további preklinikai és klinikai vizsgálatok szükségesek. Egy valóban specifikus humán EPOR elleni ellenanyag nélkülözhetetlen a rendszer pontos működésének feltárásához, mely lehetővé tenné érzékenyebb módszerek alkalmazását mind preklinikai modellekben, mind humán vizsgálatok során. Az eddigi klinikai eredményeket figyelembe véve, érdemes lenne a vizsgálatba bevont betegpopulációt kisebb, patológiai szövettani típus alapján eltérő csoportokra bontva is vizsgálni, hogy megismerjük a területen eddig megjelent számos ellentmondásos eredmény hátterét.

### **2.2.6 EPOR elleni ellenanyag**

A fent említett kérdés, nevezetesen, hogy van-e összefüggés az EPOR expresszió és a kedvezőtlen, EPO kezelést követő klinikai kimenetel között, valamint a számos ellentmondásos preklinikai eredmény tisztázását megnehezíti, hogy a mai napig nincs kereskedelmi forgalomban olyan EPOR elleni ellenanyag, mely hatékonyan és nagy biztonsággal detektálná az EPOR-t. Így a legtöbb olyan korábbi vizsgálat,

amelyben EPOR-t detektáltak a tumorszövetben, álpozitív eredményt hozott az EPOR specifikus antitestek hiánya miatt (99). 2006-ban Steve Elliott és munkatársai bebizonyították, hogy az addig leggyakrabban használt human EpoR ellen tervezett poliklonális ellenanyag (clone C-20, Santa Cruz Biotechnologies) keresztreagál a HSP-70 (heat shock protein 70) fehérjével (100). Addigra azonban számos olyan tanulmány íródott, melyben a kérdéses antitesttel bizonyították be az EPOR jelenlétét immunhisztokémiai eljárással különböző daganatfélésekben, így például emlődaganat (76, 101, 102), méhnyakdaganat (103), pajzsmirigydaganat (104), méhtestdaganat (105), fej-nyak daganat (106) és tüdődaganat (107) esetében. Saintigny és munkatársai is a C-20 antitesttel mutatták ki, hogy az EPO/EPOR együttes kifejeződése rövid túléléssel társul I. stádiumú NSCLC betegek esetében, és felvetették az endogén EPO lehetséges szerepét eme tumorok progressziójában (108, 109). A ma használt újabb EPOR elleni ellenanyagok (M-20, Santa Cruz Biotechnologies; MAB307, R&D Systems; A82, Amgen – nincs forgalomban) körül is sok még a kérdés, ugyanis a velük detektált fehérjék tömege az 50-75 kDa tartományban mozog.

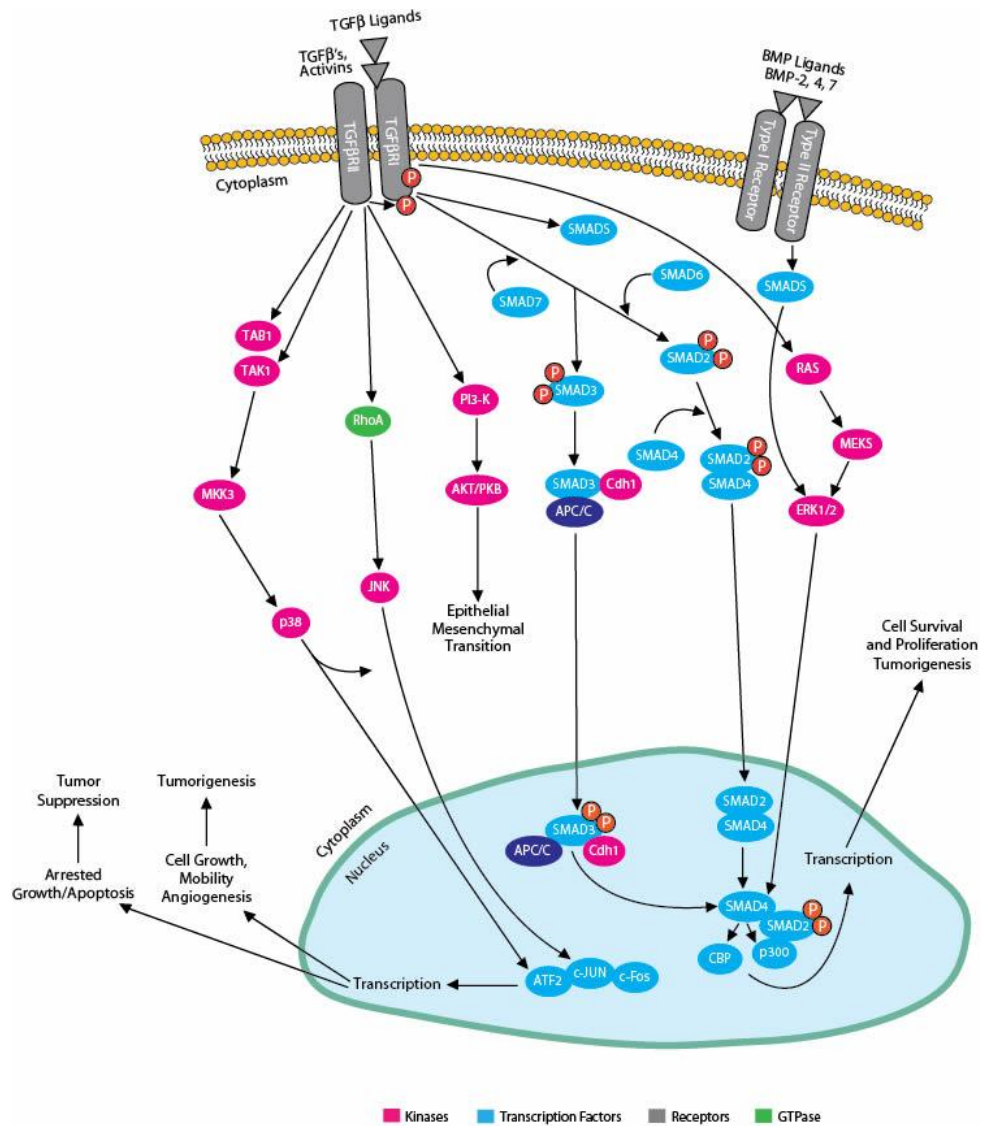
Doleschel és munkatársai 2012-ben kifejlesztettek egy új, EPOR specifikus infravörös próbát (Epo-Cy5.5), mely lehetővé teszi, hogy FMT (fluorescence-mediated tomography) használatával folyamatosan kövessék xenograft modellben az EPOR státuszt. Kutatásuk során három NSCLC sejtvonalat használtak (H838, A549, H2030). A három vonal közül a H838 és az A549 bizonyult EPOR pozitívnak, melyek közül a H838 adott erősebb jelet (110).

## **2.3 Activin/Follisztatin rendszer szerepe daganatokban**

### **2.3.1 TGF $\beta$ -szupercsalád, activin A receptorai, jelátviteli útvonalai**

A transforming growth factor (TGF)- $\beta$  szupercsalád tagjai különböző sejtfunkciókat szabályozó, multifunkcionális citokinek, amit az összetett intracelluláris jelátviteli rendszerük tesz lehetővé. A család tagjai közé tartoznak többek között a csontfejlődést irányító bone morphogenic proteinek (BMP) és az activinek és inhibinek, amiket először a hypophysis folliculus stimuláló hormon (FSH) szekrécióját szabályozó citokineként írtak le (111, 112). Az activin A (ActA) két inhibin  $\beta$ A (IHNBA)

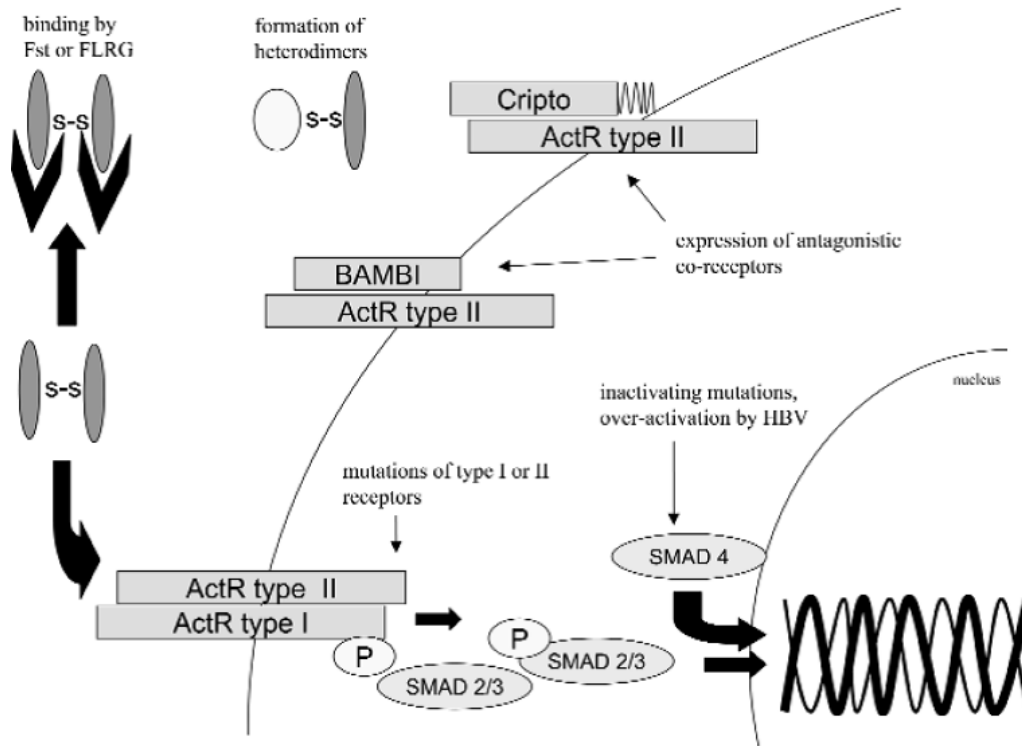
alegységből épül fel, melyek kovalens kötéssel alkotnak homodimer formát (113). Receptorai egyszeres transzmembrán doménal rendelkező szerin/treonin kinázok. Az ActA molekula először a ligandkötéstől függetlenül aktív II. típusú activin receptorok valamelyikéhez (ActR-IIA vagy ActR-IIB) kötődik a sejtfelszínen, így indukálja az I. típusú activin receptorral (ActR-IB) való csatlakozást, annak foszforilációját és fokozza a receptor kináz aktivitását (114). Az így aktív receptor komplex közvetlenül köti és foszforilálja a receptor által szabályozott (R-SMADs) SMAD2/3 fehérjéket. A foszforiláció után a fehérjék kapcsolódnak a SMAD4-gyel (co-SMAD) és az így keletkezett komplex transzlokálódik a sejtmagba, ahol co-faktorokkal együtt szabályozzák különböző gének expresszióját (114). Fontosabb célgénjei az activin szignalizációnak a p15INK4B (115, 116) és a lipid-foszfatáz SHIP-1 (117). Az ActA intracelluláris jelátvitelében a SMAD útvonal mellett számos alternatív mechanizmus aktivációját megfigyelték több sejttípusban, mint például a MAPK, ERK1/2, a PI3K/AKT útvonalat (118) és a p38 kináz enzimeket (119). Mindemellett szintén leírták, hogy az ActA stimulálja a Rho és jun N-terminal kinázt (JNK) (**2. ábra**) (120).



2. **ábra** A TGF- $\beta$  szupercsalád tagjai által aktivált szignalizációs útvonalak ábrázolása. (Novus Biological <http://www.novusbio.com/tgfbetapathway.html>)

Ezen útvonalak aktiválása különböző, igen szigorú mechanizmusok által szabályozott folyamat. Az ActA-t felépítő alegységek expressziójának szabályozása mellett, az extracelluláris activin-kötő molekulák, mint például a follisztatin (FST) és a follistatin-related gene (FLRG), illetve az antagonista co-receptor BAMBI és Cripto is fontos negatív szabályozói az activin szignalizációnak. Szintén ide tartoznak az intracellulárisan működő jelátvitelt gátló (I-SMAD) fehérjék. A gátló SMAD fehérjék, így a SMAD7 szerkezete is, abban különbözik az R-SMAD-októl, hogy nincs foszforilációs alegységük. Kapcsolódik ugyan a receptor komplexhez, de azok nem

foszforilálódnak, nem kapcsolódnak a SMAD4-hez és ezáltal gátolják a további jelátvitelt (**3. ábra**) (121, 122).



**3. ábra** Az ActA szignalizáció gátlásának grafikus ábrázolása. Fiziológiás körülmények között az activin A szignalizáció egy több szinten szabályozott mechanizmus. Grusch et al. nyomán (122).

Mint láthatjuk számos szabályozó mechanizmusa van az ActA szignalizációnak. Ezek közül tanulmányunk során a legjobban ismert, az ActA-hoz hasonlóan, a keringésben is megtalálható, ActA specifikus kötőfehérjére, a follisztatinra koncentráltunk (123-126). A follisztatinnak három expresszált izoformáját ismerjük: follisztatin-288 (FST-288), follisztatin-303 (FST-303) és follisztatin-315 (FST-315), melyek többféle mechanizmus révén gátolják az activin A molekulát (127, 128). Két follisztatin molekula körülveszi az ActA molekulát, így inaktiválja azt és megakadályozza annak receptorhoz kötődését (124, 129, 130). A FST-288 általában a sejtmembránban helyezkedik el és itt zárja körül az ActA molekulát és indítja el ezáltal az endocitózist és a lizoszómális lebontást. A FST-303 általában egy kevésbé expresszált forma, mint a többi izoforma és kisebb affinitást mutat a sejt felszíni



proteoglikánok felé, de képes az ActA kötésére mind a keringésben, mind a sejt felszínen (131).

### 2.3.2 Activin A élettani szerepe

Az ActA molekula multifunkcionális biológiai jelentőségét már leírták számos sejt típusban és szövetben egyaránt, így például a mezoderma kialakulásában, (132), embrionális őssejt biológiában (133), szaporodás biológiában (134), erythroid differenciálódásban (135), szisztémás gyulladásban (136), sejthalál indukciójában (137), sebgyógyulásban (138) és fibrózisban (139) egyaránt. Sejt szinten a differenciálódásban, a sejtszám szabályozásában és a szöveti szerkezet kialakításában van fontos szerepe (139).

### 2.3.3 Activin A szerepe daganatokban

Az ActA, mint szekretált fehérje, hatását kifejtheti mind a tumorsejtekre, mind a sztrómára. Irodalmi adatok alapján a tumoros környezetben szintén hozzájárulhat az alábbi folyamatokhoz: gyulladás (140), fibrózis (139, 141), angiogenezis (142) makrofágok aktiválása (143), nitric oxid (NO) felszabadítása, extracelluláris matrix fehérjék szabályozása (144) és az emelkedett MMP-k expressziója (145). Az activin szignalizáció komponenseinek szabályozatlan expresszióját, esetleges mutációját már számos malignus folyamat kapcsán leírták, így például emlődaganatban (146, 147), tüdődaganatokban (148-151), vastagbél daganatban (152), prosztatata daganatban (153), petefészek daganatban (154), máj daganatban (121, 155), nyelőcső daganatban (156), valamint melanómában (157).

Az ActA-t, mint a tumorsejtek osztódását gátló molekulát írták le emlő-, máj- és vastagbél- daganatban, valamint a tumorszövetben csökkent ActA expressziót, az ActA antagonisták emelkedett szintjét vagy éppen az activin receptorok vagy a SMAD fehérjék csökkent működését figyelték meg (146, 147, 152, 155). Ezzel ellentétben a fej-nyaki laphám karcinómában (HNSCC), a nyelőcső adenokarcinómában és a malignus pleurális mezoteliómában az emelkedett ActA expresszió agresszívebb tumorsejteket eredményezett (156, 158-162). Ezidáig két tanulmányban számoltak be az

ActA jelentőségéről tüdő ADC-ben, bár az eredmények ellentmondásosak. Seder és munkatársai 2009-ben azt találták, hogy I stádiumú tüdő ADC betegek szövetmintájában az ActA molekula overexpressziója rosszabb prognózissal párosult (148). 2015 Shan és Li viszont arról számoltak be, hogy a tüdő ADC szövetben csökkent ActA expresszió volt megfigyelhető, valamint negatív korreláció volt az ActA fehérje szintje és a nyirokcsomó metasztázisok száma között (149). A FST-t, mint az ActA antagonistáját, szintén tanulmányozták már számos malignus folyamat során, úgy, mint melanómában, prosztatata daganatban és hepatocelluláris karcinómában (155, 157, 163), Chen és munkatársai pedig tüdő ADC-ben. Utóbbiban emelkedett szérumban FST szintet találtak illetve megállapították róla, hogy jó biomarkere lehetne a tüdő ADC diagnózis felállításának (151). Kissejtes tüődaganattal kapcsolatban ezidáig egyetlen preklinikai modellben vizsgálták az activin A/follisztatin rendszer jelentőségét. Ogino és munkatársai leírták, hogy a FST gátló hatással volt a távoli, szervi metasztázisok képzésére SCLC sejtek esetében (150).

#### 2.3.4 Activin A gátlásának lehetőségei

Az irodalomban az activin A gátlásának több lehetséges módja is felmerül. Az egyik ezek közül a kis molekulájú, szerin/treonin kináz gátlók (A83-01, SB431542), melyek több, a TGF- $\beta$  családba tartozó citokin receptorának kináz aktivitását gátolják. Másik lehetséges módja, az IIA illetve IIB típusú activin receptorok extracelluláris részét tartalmazó szolubilis receptorok, a sotatercept=ACE-011 illetve a luspatercept=ACE-536 (Acceleron Pharma Inc., Massachusetts, USA), mely az activin A/B, növekedés-differenciációs faktor (GDF) -11 és egyéb, TGF- $\beta$  családba tartozó ligandokat köti meg, így akadályozva meg azok transzmembrán receptorokhoz való kötődését és a SMAD szignalizációs útvonal elindítását. Harmadik lehetőségként jön szóba a 2013-ban Novartis által fejlesztett bimagrumab (BYM338, Novartis Int. AG, Basel, Svájc), egy humán monoklonális ellenanyag a II. típusú activin receptorok (IIA/B) ellen.

A83-01 potenciális inhibitora az ALK5, ALK4 és ALK7 receptoroknak, ezeken keresztül blokkolja a Smad2/3 foszforilációját, viszont nincs hatással a családba tartozó I. típusú BMP receptorokra, p38 MAPK/ERK útvonalra. Számos daganattípusban, ahol

a TGF- $\beta$  család szignalizációs útvonalának szerepe van a daganat progressziójában, vizsgálják mind az A83-01, mind a kevésbé hatékony SB431542 kináz inhibitorok jelentőségét preklinikai kísérletben (164-169).

A sotatercept és luspatercept, a szolubilis csapda-receptorok, nagy affinitással kötődnek az activin A-hoz és TGF- $\beta$  szupercsaládba tartozó egyéb proteinekhez, ezzel meggátolva az ActRIIA/B receptorokon keresztül közvetített szignalizációt. Mivel a TGF- $\beta$  ligandokról (köztük az ActA-ról) már bebizonyosodott, hogy fontos szerepet töltenek be többek között a csont homeosztázisban (oszteoklasztok aktivitását serkentik, oszteoblasztokét viszont gátolják), erythropoiesis szabályozásában és bizonyos daganatok progressziójában, az általuk aktivált jelátviteli útvonalak gátlása kulcsfontosságú lehet a fent említett zavarok, akár együttes kezelésében (170). Hatékonyságukat már klinikai vizsgálatokban elemzik kemoterápia- indukálta anaemia és különböző daganatok csontmetasztázisai esetében is.

A Novartis új monoklonális ellenanyagát, a bimagrumabot ezidáig izomsorvadásos betegségek kapcsán vizsgálták preklinikai és klinikai vizsgálatokban (171), de relevanciája a dagantokhoz kötődő kachexia kezelésében már felmerült (172).

### 3 CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során az EPO/EPOR és az ActA/FST rendszer jelentőségének feltárását tűztük ki célul, illetve mint prognosztikai és diagnosztikai markereket vizsgáltuk tüdő adenokarcinómában.

1. Erythropoietin-receptor expressziójának meghatározása, illetve a rHuEPO $\alpha$  és gemcitabine kezelések *in vitro* hatása humán tüdő adenokarcinóma sejtek proliferációjára.

2. rHuEPO $\alpha$  és gemcitabine kezelések hatásának vizsgálata xenograft tumorokban.

3. Humán bronchoszkópos minták EPOR mRNS szintjének meghatározása és összefüggések keresése a betegek klinikopatológiai adataival. EPOR expressziós szint vizsgálata, mint prognosztikai marker.

4. ActA és FST szekréciónak és az activin receptorok expressziójának meghatározása, valamint a rhActA és rhFST kezelések *in vitro* hatása humán tüdő adenokarcinóma sejtek proliferációjára és migrációjára.

5. Cirkuláló ActA és FST szintjének meghatározása és összefüggések keresése a betegek klinikopatológiai adataival. Keringő ActA, FST szint, mint diagnosztikai és prognosztikai marker vizsgálata.

6. Activin A szint és KRAS mutációs státusz összefüggéseinek vizsgálata tüdő adenokarcinómában.

## **4 MÓDSZEREK**

### **4.1 Klinikai adatok**

#### **4.1.1 EPOR expresszió mérése humán bronchoszkópos kefe mintákban**

Klinikai vizsgálatunk során 43 előrehaladott stádiumú (stage III-IV) ADC beteg bronchoszkópos kefe mintájában határoztuk meg az EPOR expresszióját. A betegeket 2009. január és 2010. december között diagnosztizálták az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézetben. A minták felhasználhatóságához minden beteg beleegyező nyilatkozatot tett valamint a vizsgálatot a helyi etikai bizottság engedélyével végeztük (153/PI/10; 2521-0/2010-1018EKU). A diagnózis felállításához használt bronchoszkópos kefe mintákat -80°C tároltuk az RNS izolálásáig. Minden betegtől két mintát vettünk, egyet a tumorszövetből, egyet pedig a tumortól távolabb eső, normál endobronchiális felszínről. Minden mintát, a felhasználást megelőzően citológus elemzett. A kohortunkba 19 férfi és 24 nő beteget vontunk be, átlag életkoruk 61 év. Stádiumukat az American Joint Committee on Cancer/Union Internationale Contre le Cancer TNM klasszifikáció VII. kiadása alapján határoztuk meg.

#### **4.1.2 Activin A és follisztatin szint mérése humán vérmintákban**

Az activin A és follisztatin szint meghatározásához klinikai vizsgálatunkba két intézet betegeit vontuk be: Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet (n=39) és a Bécsi Orvostudományi Egyetem, Mellkassebészeti Osztály (n=25). ADC betegek vér mintáját a diagnózis megállapításának időpontjában, illetve a műtéti beavatkozás előtt, 2011 és 2014 közötti időintervallumban gyűjtöttük be. Kontroll (n=46) kohortnak egészséges egyéneket, illetve olyan betegeket vontunk be a vizsgálatba, akiknek a betegségeik megegyeztek az ADC betegek társbetegségeikkel, és amelyek az irodalom szerint szintén befolyásolhatják az ActA/FST szintjét a vérben (173-177): COPD, cukorbetegség, asztma, máj különböző megbetegedései, érrendszeri betegségek. Az ActA - KRAS státusz összefüggésének vizsgálatához olyan ADC betegek vérplazma mintájában határoztuk meg az ActA szintet (n=34), akiknek ismert volt a KRAS

státusza. Az ActA és FST prognosztikai jelentőségét Kaplan-Meier görbékkel jellemeztük, diagnosztikai értéküknek becslésére pedig ROC (Receiver Operating Characteristic) analízist használtunk. A ROC analízist széles körben alkalmazzák a diagnosztikai tesztek hatékonyságának elemzésére. A teszt során a beteg és az egészséges csoportok között hasonlítják össze a diagnosztikai szenzitivitást és specificitást az igaz, hamis pozitív és az igaz, hamis negatív eredmények arányából. Grafikus ábrázolás során a ROC görbe alatti terület mérőszáma (AUC=Area Under the Curve) a teszt diagnosztikai hatékonyságát fejezi ki. A görbe alatti terület akkor maximális (=1), amikor a teszt a betegek és az egészségesek eredményeit maximalisan (100%) képes elkülöníteni. A modellt 70%-os AUC esetén elfogadhatónak, 80-90% körüli értékét pedig kiemelkedőnek értékelik a gyakorlatban. A minták felhasználhatóságához minden beteg beleegyező nyilatkozatot tett, valamint a vizsgálatot a helyi etikai bizottságok engedélyével végeztük: Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet (2521-0/2010-1018EKU), Bécsi Orvostudományi Egyetem (#904/2009).

## 4.2 Sejtvonalak

Az *in vitro* és *in vivo* kísérleteinkhez használt humán tüdő adenokarcinóma vonalak H1975, H358, H1650 és HCC827, a kontroll sejtvonalként használt K562, humán erythroleukémia sejtvonal, valamint a HepG2, hepatocelluláris karcinóma sejtvonal az American Type Culture Collection-tól (Manassas, VA) származtak. Az A549 sejtvonalat Professor Walter Berger bocsátotta rendelkezésünkre. A tüdő adenokarcinóma sejtvonalakat, valamint a K562 sejtvonalat RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) tápfolyadékban tartottuk, 10% főtális szarvasmarha savó (FBS, Sigma) és 1% penicillin-streptomycin (Sigma) mellett. A HepG2 sejtvonalat MEM médiumban 1 mM nátrium-piruváttal, 1% nem-esszenciális aminosavval és 10% FBS-el kiegészítve tartottuk. A humán köldökzsinór véna endotél sejtvonalat (HUVEC) frissen begyűjtött köldökzsinórból izolálták Professor Alexander Bertalanffy laborjában (178) EC növekedési faktorokkal kiegészített EBM-2 Basal tápfolyadékban tenyésztettük (Lonza Cologne GmbH, Walkersville, MD). A sejtvonalakat 37°C-ra állított inkubátorban tartottuk 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett.

### **4.3 Hatóanyagok**

*In vitro* és *in vivo* kezelések során az alábbi hatóanyagokkal dolgoztunk: rekombináns humán erythropoietin-alfa (rHuEPO $\alpha$ , Eprex, Janssen-Cilag, Shaffhausen, Switzerland), gemcitabine (Gemzar, Lilly, France), rekombináns humán activin A (rhActA) (R&D Systems, Minneapolis, USA) és rekombináns humán follisztatin (rhFST) (R&D Systems, Minneapolis, USA).

### **4.4 Humán vérminták gyűjtése**

Az ActA és FST szint meghatározásához tüdő ADC betegek vérmintáját szérumszeparátor csőbe gyűjtöttük, (Tiger Top SST Plus Blood Coll Tubes REF:367985, Becton Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, USA), lefugáltuk és a szérumszérium aliquotokat felhasználásukig -80°C-on tároltuk (179).

### **4.5 Sejtfelülűszók gyűjtése ELISA-hoz**

ELISA-hoz, illetve az activin A bioaktivitásának teszteléséhez  $1.5 \times 10^6$  sejtet raktunk ki T25 sejtenyésző edényben, majd 24 órát inkubáltuk 2 ml FBS mentes tápfolyadékban. Az inkubációs idő elteltével a sejtfelülűszót lefugáltuk (800 rpm, 5 perc, 24°C), az aliquotokat -80°C-on tároltuk.

### **4.6 Gén expresszió vizsgálata valós idejű PCR-rel**

#### **4.6.1 Az EPOR expressziójának valós idejű PCR-el való meghatározása**

A következőképpen jártunk el mind a humán minták, mind a humán sejtvonalak esetében. Mintáinkból Trizol reagenssel (Invitrogen) izoláltuk az összes RNS-t, a teljesen DNS mentes minta elérése érdekében pedig RNase-free DNase kitet használtunk (Ambion, Austin, TX) a gyártó leírásának megfelelően. Minden minta esetében 12,5  $\mu$ l RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk az alábbi

reakcióeleggyel: deoxy-NTP (0.5mM), oligo-dT és random primer keveréke (3  $\mu$ M végkoncentráció, Applied Biosystems), RNasin ribonukleáz-inhibitor (20U/reakció; Promega, Wisconsin, USA), reverz transzkripció puffer (500 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub> és 50 mM ditiotritol), M-MLV reverz transzkriptáz (200U/reakció; Sigma) és DEPC-kezelt víz. 50 percig inkubáltuk 37°C-on, majd 10 percig 85°C-on. Az átírás eredményét és az RNS-minták tisztaságát  $\beta$ -aktin amplifikálásával ellenőriztük (primerek: sense, 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3' és antisense, 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3').

A reverz transzkripcióval kapott cDNS mintákat qRT-PCR reakcióval elemeztük tovább az Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System készülék segítségével, TaqMan Universal PCR Master mixszel és TaqMan EPOR (Hs000181092\_m1),  $\beta$ -aktin (Hs03023880\_g1) illetve GAPDH (Hs02786624\_g1) génexpressziós esszével (Applied Biosystems, Foster City, CA). A reakció paraméterei a következők voltak: 50°C (2 perc), 40 ciklusban 95°C (10 mp), 60°C (1 perc) és 72°C (1 perc). A kiindulási mRNS relatív mennyiségét egy ismert koncentrációjú DNS minta hígítási sorához viszonyítva állapítottuk meg és normalizáltuk a saját  $\beta$ -aktin illetve a sejtvonalak esetében GAPDH expressziójához. A tumorszövet EPOR expresszióját egy következő lépésben normalizáltuk az ugyanazon beteghez tartozó normál endobronchiális szövet EPOR expressziójával (T/N).

#### **4.6.2 Activin receptorok expressziójának meghatározása tüdő adenokarcinóma sejtvonalakban**

Az ADC sejtvonalak activin receptorok (ACVR1B, ACVR2A, ACVR2B) expressziós szintjének meghatározásához a fentiekhez hasonlóan jártunk el. Trizol reagenssel izoláltuk az összes RNS-t, 2 $\mu$ g RNS-t reverz transzkripcióval cDNS-é írtuk át majd SYBR Green (Life Technologies) valós-idejű PCR reakcióval határoztuk meg az expressziós szintet. A reakció során használt primer szekvenciák a **2. táblázatban** láthatóak. Belső kontrollnak a normalizáláshoz GAPDH háztartási gént használtuk, valamint a génexpresszió szemi-quantitatív meghatározását a  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  módszerrel végeztük (155).



**2. táblázat** Activin receptorok expressziós szintjének meghatározásához használt primer szekvenciák, amplicon méretek és kapcsolódási hőmérsékletek SYBER Green valós-idejű PCR reakcióban.

Gén	Primer szekvenciák sense/antisense	Amplicon méret (bp)	Kapcsolódási hőmérséklet
ACVR1B/ALK4	CCGGTACACAGTGACAAT/ CACTCTCGCATCATCTTC	619	53°C
ACVR2A/ActR2	TGGCTCCAGAGGTATTA/ CGCAACCATCATAGACT	454	50°C
ACVR2B/ActR2B	CTCATCACGGCCTTCCAT/ AGCGAGCCTCTGCATCAT	619	56°C
GAPDH	CTGGCGTCTTCACCACCAT/ GCCTGCTTCACCACCTTCT	499	49°C

#### 4.7 Immunhisztokémia

Endotél- ill. tumorsejtek osztódásának mértékét vizsgáltuk xenograft tumorokban. *In vivo* kísérletünkben az rHuEPO $\alpha$ -val kezelt, illetve kontroll csoport egereit 5-bróm-2'-deoxiuridinnel (BrdU, 200 mg/kg, Sigma) kezeltük intraperitoneálisan. Egy óra inkubáció után a tumorokat eltávolítottuk és fagyasztottuk. 5  $\mu$ m vastag fagyasztott metszeteket készítettünk és festettük őket (180). A BrdU-pozitív sejteket anti-BrdU monoklonális ellenanyaggal (Becton Dickinson, Bioscience, San Jose, CA) és TRITC-konjugált anti-egér IgG-vel (1:100, Sigma) detektáltuk. Következő lépésként a metszeteket monoklonális patkány anti-egér CD31 ellenanyaggal (1:20, Becton Dickinson), majd biotinált anti-patkány IgG-vel és streptavidin-FITC-el (Vector Laboratories, Burlingame, CA) inkubáltuk, hogy elkülöníthessük az endotél sejteket a tumorsejtektől. A sejtmagokat TOTO-3-al reagáltattuk (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Független intratumorális területeken számoltuk mind a jelölt (osztódó) és mind a nem-jelölt (nem osztódó) H1975 tumor és egér endotél sejtmagok százalékát, ahogy azt már korábban leírtuk (84, 180-183).

## 4.8 ELISA

Az activin A és follisztatin fehérje szintjét humán vér szérumban valamint humán sejtvonalak felülúszójában ELISA kit segítségével határoztuk meg a gyártó (R&D Systems, Minneapolis, USA) által megadott protokollnak megfelelően (kat. szám: DAC00B és DFN00).

## 4.9 Activin A és follisztatin ELISA kit tesztelése

A tesztelés során arra kerestük a választ, hogy a kísérleteinkben használt activin A és follisztatin ELISA kit csak a szabad ActA és FST molekulákat méri, vagy a FST által kötött ActA komplexet is. Az activin A ELISA teszthez frissen vett humán plazma mintát kezeltünk különböző koncentrációjú rhFST-vel (2ng/ml, 50ng/ml, 100 ng/ml, illetve egy kezelés nélküli kontroll minta) majd 2 órát inkubáltuk 37°C-on. A follisztatin ELISA tesztelése során, rhActA kezelést alkalmazva, hasonlóképpen jártunk el.

## 4.10 *In vitro* tesztek

### 4.10.1 Sejtproliferációs tesztek (MTT, SRB)

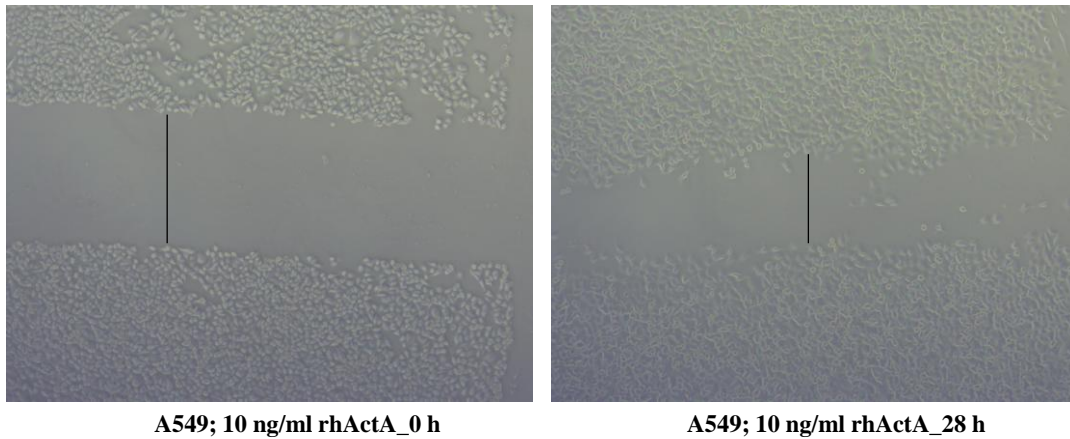
rHuEPO $\alpha$  és gemcitabine kezelés *in vitro* hatását vizsgáltuk humán ADC sejtvonalakra.  $5 \times 10^3$  db H358, H1975 és H1650 sejtet raktunk ki 96 lyukú sejttenyésztő edénybe (6-6 párhuzamos mintát) 10% FBS-t tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban. 24 óra elteltével lecseréltük a tápfolyadékot lyukanként 150  $\mu$ l 3% FBS-t, illetve a különböző koncentrációjú kezeléseket tartalmazó tápfolyadékokra. A kezelések a következők voltak: 1 és 3 IU/ml rHuEPO $\alpha$ , 1 és 10  $\mu$ g/ml gemcitabine illetve az rHuEPO $\alpha$  (1, 3 IU/ml) és gemcitabine (1, 10  $\mu$ g/ml) kombinációja. 48 óra inkubáció után a kezelések sejtproliferációra gyakorolt hatását a szulforodamin B (SRB) kolorimetriás teszt segítségével határoztuk meg. A kezelés végeztével a sejteket 10%-os triklórecetsavval (TCA) rögzítettük 4°C-on 60 percig, majd ötször átöblítettük a lyukakat desztillált vízzel és 15 percig festettük 1%-os ecetsavban oldott 0,4%-os SRB-vel. A nem-kötött festéket 1%-os ecetsavval távolítottuk el, majd száradás után a

fehérjéhez kötött festéket 200 µl 10 mM-os Tris oldattal (pH=10,5) feloldottuk. 570 nm-en mértük az abszorbanciát Varioskan microplate reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) készülék segítségével. A vizsgálatot kétszer megismételtük.

rhActA és rhFST kezelés *in vitro* hatását vizsgáltuk humán ADC sejtvonalak proliferációjára.  $3 \times 10^3$  db H358, H1975, H1650, HCC827 és A549 sejtet raktunk ki 96 lyukú sejttenyésztő edénybe (5-5 párhuzamos mintát) 10% FBS-t tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban. A sejtek letapadása után a tápfolyadékot 1% FBS tartalmúra cseréltük és 24 órát inkubáltuk. Az inkubációs idő elteltével lecseréltük a tápfolyadékot lyukanként 150 µl 1% FBS-t, illetve a különböző koncentrációjú kezeléseket tartalmazó tápfolyadékokra. A kezeléseket a következők voltak: 1, 10 és 50 ng/ml rhActA és 1, 10 és 50 ng/ml FST. 72 óra inkubáció után a kezeléseket sejtproliferációra gyakorolt hatását az EZ4U kit segítségével határoztuk meg a gyártó (Biomedica Immunoassays, Vienna, Austria) által megadott protokollnak megfelelően (kat. szám: BI-5000). 450 és 620 nm-en mértük az abszorbanciát a Varioskan microplate reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) készülék segítségével. A vizsgálatot kétszer megismételtük.

#### **4.10.2 Migrációs teszt (Scratch assay)**

$3 \times 10^5$  db H1975, H358 és A549 sejtet raktunk ki 12 lyukú sejttenyésztő edénybe, majd a sejtek letapadása után 200 µl-es steril pipettaheggyel megkarcoltuk a konfluens sejttenyésztetet, szabad felszínt teremtve a sejtek migrációjának (scratch assay). Egy PBS-es mosással eltávolítottuk a karcolás következtében keletkezett sejtörmeléseket, majd 1% FBS-t és a kezelőszert - rhActA (10ng/ml és 50ng/ml), rhFST (10ng/ml és 50ng/ml) - tartalmazó tápfolyadékot tettünk a sejtekre. A sejt migrációt Zeiss Axiovert 40C mikroszkóp segítségével, a következő időpontokban történt fotózással követtük nyomon: 0h, 4h, 8h, 16h, 20h, 24h, 28h (**4. ábra**). A képeket az Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) segítségével elemeztük.



**4. ábra Migrációs teszt (Scrach assay) metodikáját szemléltető ábra.** Az ábrán az A549 sejtvonal esetében, 10 ng/ml rhActA kezelés hatására bekövetkezett sávszélesség változásának a meghatározása látható a kísérlet kezdeti- (0h) és végpontjában (28h).

#### 4.10.3 Activin A bioaktivitásának mérése sejtvonalak felülúszójában

A human tüdő ADC sejtvonalak által termelt activin A molekula biológiai aktivitásának méréséhez  $5 \times 10^5$  db ADC és HepG2 sejtet raktunk ki 6 lyukú sejtenyésztő edénybe 2 ml tápfolyadékban és egy éjszakát inkubáltuk. Másnap az ADC sejtvonalak felülúszóját begyűjtöttük, a HepG2 sejtekről pedig eltávolítottuk a médiumot, PBS-el megmostuk és kezeltük őket: human ADC sejtvonalak 0,5 ml felülúszójával, vagy 0 - 0,5 ng/ml rhActA-val 0,5 ml médiumban. A HepG2 sejteket 30 percig inkubáltuk 37°C-on, majd lízis pufferrel begyűjtöttük őket. 20  $\mu$ g fehérjét választottunk szét nátrium-dodecyl szulfát (SDS)-polyacrylamid gélelektroforézissel, PVDF membránra blottoltuk a proteineket és a blokkolást 5%-os tejporral végeztük TBST-ben (162). Az elsődleges ellenanyaggal (p-SMAD2, Cell Signaling, #3101; total SMAD2, Cell Signaling, #5339, hígítás 1:1000 illetve beta-actin, Sigma, A5441, hígítás 1:5000) egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk a membránt. Másodlagos ellenanyagként torna-peroxidáz (HRP) konjugált anti-nyúl/egér antitestet használtunk (3% BSA, Dako) 1:10 000 hígításban és az előhívást a Clarity Western ECL reagenssel végeztük (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

## 4.11 *In vivo* modell

### 4.11.1 Xenograft tumorok

*In vivo* vizsgálatunk során  $1,5 \times 10^6$  db H1975 humán tumorsejtet oltottunk szubkután nőstény SCID (CB17/ICR-*Prkdc*<sup>scid</sup>) egerekbe. Az egereket az intézményi állatjóléti szabályoknak megfelelően 12 órás fény-sötét ciklusban tartottuk, patogénmentes körülmények között, mikroizolátor ketrecekben (engedélyszám: 22.1/1268/3/2010).

### 4.11.2 Kezelések

Az oltást követő 5. napon az egereket négy csoportba osztottuk és a következő kezelésekben részesítettük őket. Az egyik csoportot rHuEPO $\alpha$ -val kezeltük intraperitoneálisan háromszor egy héten az 5. naptól kezdve a 33. napig bezárólag, a humán-dózisnak megfelelő 150 IU/kg koncentrációval (fiziológias sóoldatban, 0,1 ml végső térfogatban). A másik csoportot 100 mg/kg gemcitabinnal (184-186) kezeltük intraperitoneálisan összesen négy alkalommal a 20, 24, 27 és 31 napokon. A harmadik csoport rHuEPO $\alpha$  és gemcitabine kombinációs kezelésben részesült. A rHuEPO $\alpha$ -t intraperitoneálisan háromszor egy héten az 5. naptól kezdve a 33. napig bezárólag 150 IU/kg koncentrációban, míg a gemcitabint (100 mg/kg) négy alkalommal a 20, 24, 27 és 31 napokon adtuk az egereknek. Kontroll csoportunkat fiziológias sóoldattal kezeltük minden alkalommal. A tumorok méretét kaliperrel mértük a 19. naptól kezdődően, háromszor egy héten és cm<sup>3</sup>-ben fejeztük ki az alábbi képlet alapján: hosszúság x szélesség<sup>2</sup> x  $\pi/6$ .

## 4.12 Statisztikai módszerek

Az adatok kiértékelése során két csoport közötti statisztikai szignifikanciát t-test-el, több mint két csoport közötti különbséget pedig ANOVA post hoc Scheffé-, Bonferroni- vagy Dunn-tesztel határoztuk meg. Abban az esetben, amikor a mintáink asszimmetrikus eloszlásúak voltak Mann-Whitney U-tesztet használtunk. A kategorikus

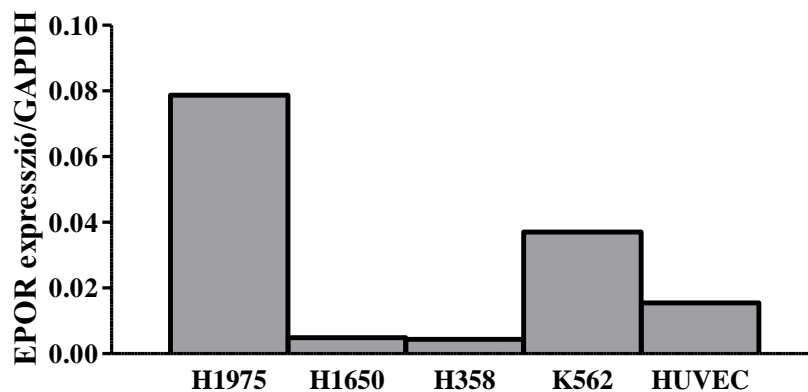
adatokat Fisher exact teszttel és Chi-négyzet próbával számoltuk. A teljes túlélést, mint időintervallumot (OS) a diagnózis pillanatától a halál időpontjáig határoztuk meg. A betegek teljes túlélési analízisét a Kaplan-Meier módszerrel végeztük el és log-rank teszttel határoztuk meg a különbségek szignifikanciáját. A klinikai paraméterek multivariációs analízisét Cox regressziós modellel készítettük. Szignifikáns eltérést állapítottunk meg, amikor  $p < 0,05$  értéket kaptunk. A statisztikai analízisek elvégzéséhez a PASW Statistics 18.0 csomagot (Predictive Analytics Software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA) és a Statistica 9.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) programokat használtuk.

## 5 EREDMÉNYEK

### 5.1 EPO/EPOR rendszer szerepe human tüdő adenokarcinómában

#### 5.1.1 Erythropoietin-receptor expressziója, rHuEPO $\alpha$ és gemcitabine kezelések *in vitro* hatása humán tüdő adenokarcinóma sejtek proliferációjára

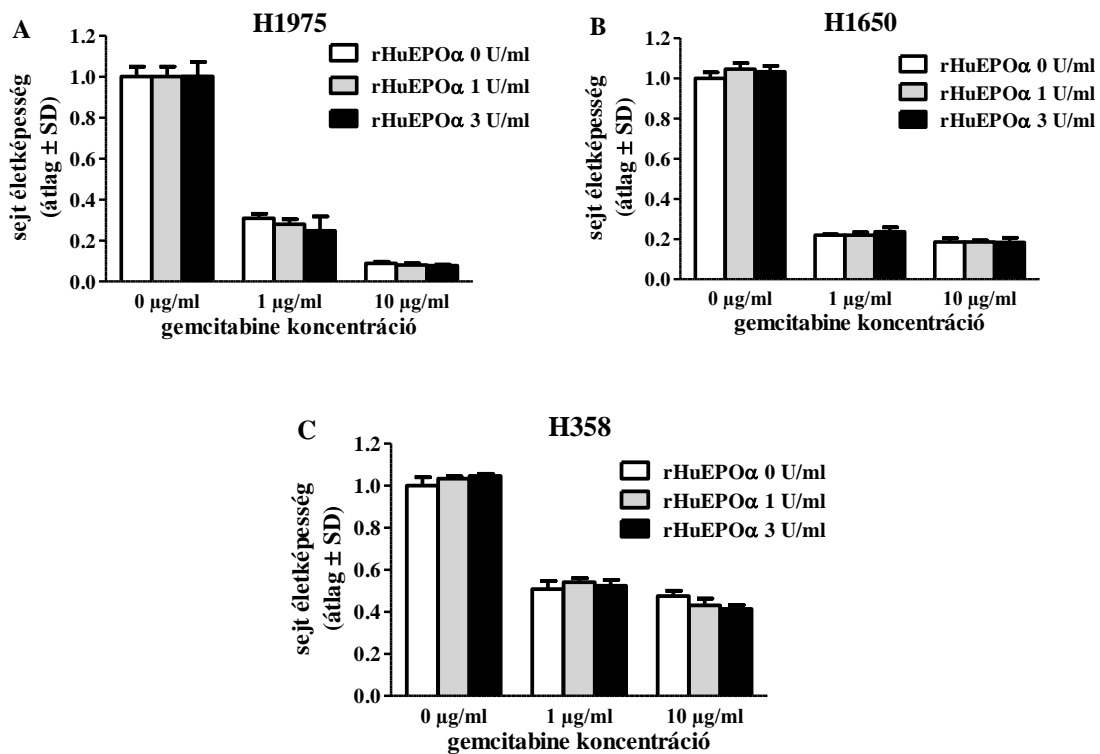
Kvantitatív valós idejű PCR-rel határoztuk meg a három humán tüdő ADC sejtvonala EPOR mRNS szintjét. HUVEC és K562 leukémia sejtvonalaikat, mint pozitív kontrollokat vontuk be a vizsgálatba. A H1650 és a H358 sejtvonalaik igen alacsony szinten, míg a H1975 még a pozitív kontroll K562-nél is magasabb szinten expresszálta az EPOR-t (5. ábra).



**5. ábra EPOR expresszió humán tüdő ADC sejtvonalaikban.** Kvantitatív valós idejű PCR-rel mutattuk ki az EPOR mRNS expressziót a humán tüdő ADC sejtvonalaikban és a kontroll HUVEC és K562 sejtvonalaikban. A legmagasabb szinten a H1975 ADC sejtvonala expresszálta az EPOR-t.

Továbbá annak megítélésére, hogy rHuEPO $\alpha$  különböző koncentrációi (1, 3 U/ml) milyen hatással vannak az ADC sejtek osztódására, proliferációs tesztet használtunk. Az exogén rHuEPO $\alpha$  egyik koncentrációjában sem befolyásolta a három ADC sejtvonala *in vitro* osztódási képességét a kezeltlen sejtekhez képest, 48 órás kísérletben.

A különböző koncentrációjú gemcitabine kezelés (1, 10  $\mu\text{g/ml}$ ), a vártaknak megfelelően, szignifikánsan lecsökkentette mind a három tüdő ADC sejtvonal proliferációját ( $p < 0.001$ ). A rHuEPO $\alpha$  önmagában nem befolyásolta az ADC sejtek osztódását és a gemcitabinnal kombinálva sem fokozta annak anti-proliferatív hatását. (6. A-C ábra).

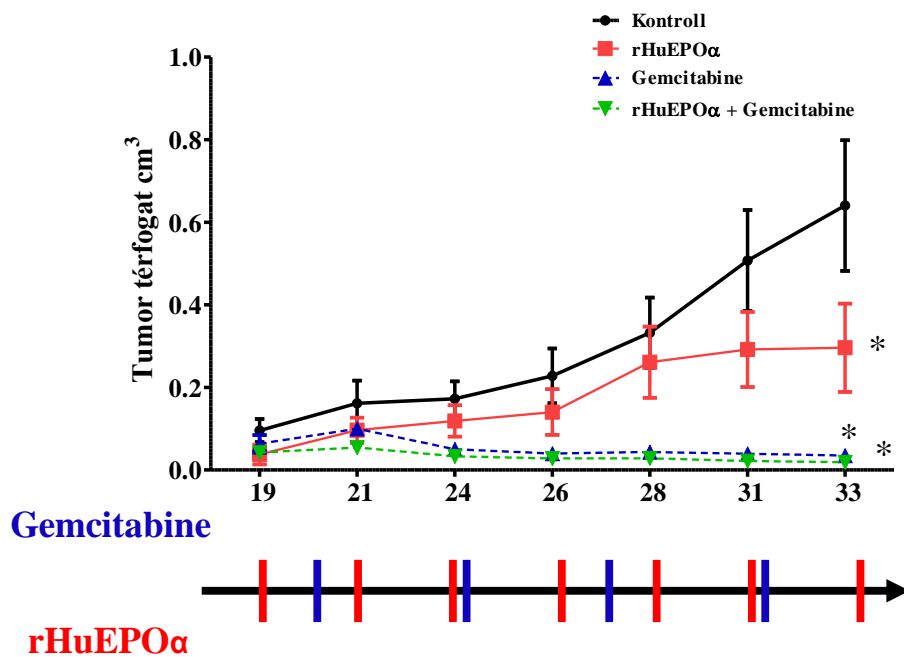


**6. ábra** Exogén rHuEPO $\alpha$  és gemcitabine hatása ADC sejtek *in vitro* proliferációjára. (A) H1975, (B) H1650 és (C) H358 sejteket kezeltünk különböző koncentrációjú rHuEPO $\alpha$ -val (1, 3 IU/ml) gemcitabine jelenlétében (1, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) vagy a nélkül. A sejszámot 48 órás kezelés után a szulfurodamin B kolorimetriás teszt segítségével becsültük meg. Bár a gemcitabine szignifikánsan lecsökkentette az ADC sejtek proliferációját ( $p < 0.001$ ), az rHuEPO $\alpha$  kezelés (sem önmagában sem a gemcitabinnal kombinálva) nem befolyásolta az ADC sejtek *in vitro* osztódását.



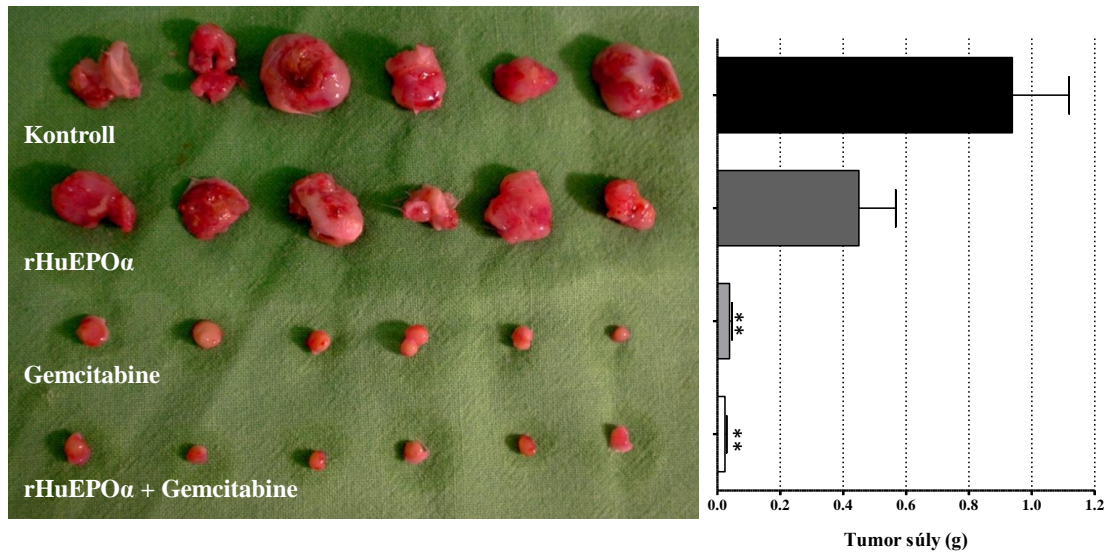
### 5.1.2 rHuEPO $\alpha$ és gemcitabine kezelések *in vivo* hatása

Következő lépésként *in vivo* tanulmányoztuk a rHuEPO $\alpha$  és gemcitabine hatását az EPOR-t legmagasabb szinten expresszáló H1975 sejtvonal növekedésére. Kísérletünk során szubkután injektáltuk a H1975 sejtvonalat immundeficiens egerekbe, majd kezeltük őket rHuEPO $\alpha$ -val, gemcitabinnal vagy a kettő kombinációjával. A tumornövekedés szignifikánsan lecsökkent a kizárólag gemcitabinnal kezelt csoportban. Kevésbé markáns, de szintén szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a tumorméret tekintetében a rHuEPO $\alpha$ -val kezelt csoportban, míg a két szer kombinációjával kezelt csoportban nem tudtuk kimutatni azok szinergisztikus hatását (7. ábra).



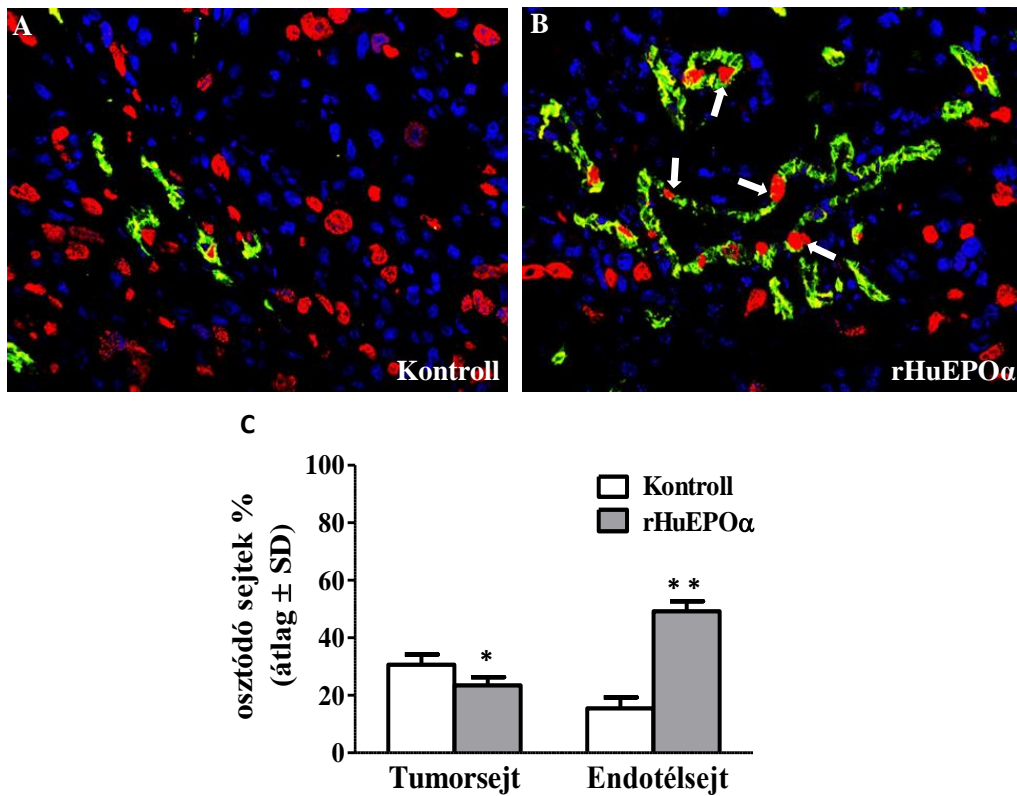
7. ábra Exogén rHuEPO $\alpha$  és gemcitabine hatása humán tüdő ADC sejtek *in vivo* növekedésére SCID egerekben. Növekedési görbék a kontroll, rHuEPO $\alpha$  (150 IU/kg), gemcitabine (100 mg/kg) és rHuEPO $\alpha$  (150 IU/kg) plusz gemcitabine (100 mg/kg) csoportokban; \*p < 0.05 versus kontroll.

A xenograft tumorok súlyuk tekintetében a gemcitabine és a rHuEPO $\alpha$ +gemcitabine kombinációs csoportokban mutatott szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest (8. ábra).



**8. ábra H1975 xenograftok tömege az *in vivo* kísérlet végpontjában.** Sebészileg eltávolított H1975 xenograftok a kísérlet végén (33. napon), illetve a tumorok tömege a kontroll, rHuEPO $\alpha$  (150 IU/kg), gemcitabine (100 mg/kg) és rHuEPO $\alpha$  (150 IU/kg) plusz gemcitabine (100 mg/kg) csoportokban, \*\* $p < 0.001$ , versus kontroll.

*In vivo* rHuEPO $\alpha$  kezelt xenograftokban BrdU jelöléssel detektáltuk az osztódó H1975 tumorsejteket, illetve az osztódó egér érendotél sejteket (**9. A-B ábra**). rHuEPO $\alpha$  kezelés nem csak fokozta az érendotélsejtek *in vivo* proliferációját, de meglepő módon szignifikánsan lecsökkentette az EPOR-t magas szinten expresszáló H1975 ADC sejtvonal *in vivo* növekedési mutatóját (**9. C ábra**).

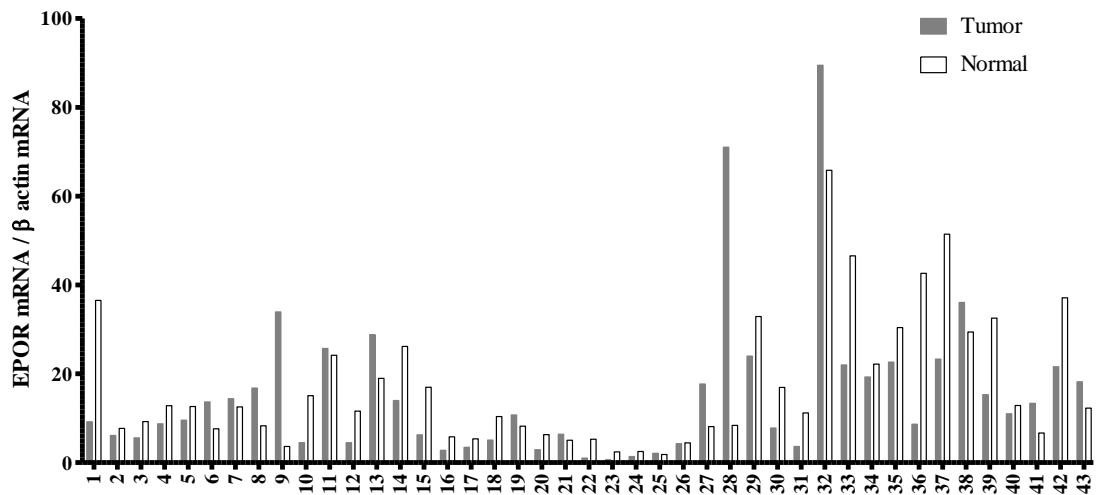


**9. ábra** A rHuEPO $\alpha$  kezelés hatása az endotélsejtek és a tumorsejtek proliferációjára a H1975 xenograft tumorokban. Reprezentatív immunfluoreszcens képek a kontroll (A) és a rHuEPO $\alpha$ -kezelt (B) egerekből származó tumorokról. A metszeteket a CD31 endotél markerrel (zöld), a proliferációt detektáló, BrdU markerrel (piros) valamint a sejtmagokat jelölő markerrel, TOTO-3 (kék) festettük meg. A nyilak (B) proliferáló endotélsejteket jelölnek. (C) Endotélsejtek és tumorsejtek osztódását jelölő index a kísérlet 33. napján a kontroll és a rHuEPO $\alpha$ -kezelt csoportban. \* $p = 0.021$ , versus kontroll; \*\* $p < 0.001$ , versus kontroll.

### 5.1.3 Humán bronchoszkópos minták EPOR mRNS szintje és a betegek klinikopatológiai adatai közötti összefüggések

A tumorszövet EPOR expressziójának klinikai relevanciájának megállapításához, bronchoszkópos kefe minták EPOR expressziójával és a betegek klinikopatológiai adataival végeztünk összehasonlító statisztikai analízist. Yasuda és munkatársainak (96) eredményeivel egybehangzóan a mi előzetes kísérleteink is szignifikáns eltéréseket mutattak a normál tüdőszövet EPOR expressziójában. Ennek

megfelelően a tumorszövetben mért EPOR expressziós értékeket normalizáltuk a beteg normál endobronchiális szövetében mért EPOR expressziós szintekkel (T/N) (**10. ábra**). Nem találtunk összefüggést az életkor, dohányzás, nem, stádium és a kezelések tekintetében (**3. táblázat**).



**10. ábra** EPOR expresszió a tumoros (T) és a normál (N) szövetmintákban előrehaladott stádiumú tüdő ADC betegekben. qRT-PCR méréshez ADC betegek bronchoszkópos kefe mintáját használtuk. Két mintát mértünk meg minden betegből, egyet a tumorból (T), egyet pedig a tumormentes, endobronchiális területről (N).

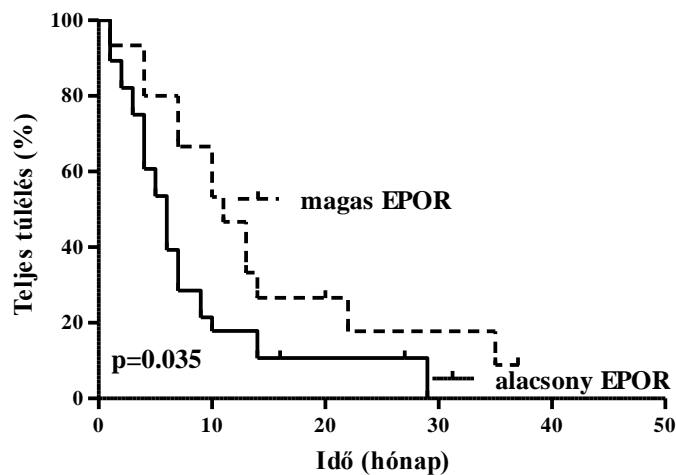
**3. táblázat** Korreláció ADC betegek EPOR expressziója és klinikopatológiai tulajdonságaik között (n=43).

	ADC betegszám (%)	EPOR expresszió (T/N)		<i>p</i> érték
		Alacsony (%) <sup>a</sup>	Magas (%) <sup>a</sup>	
<b>Betegek</b>	<b>43</b> (100%)	<b>28</b> (65.1%)	<b>15</b> (34.9%)	
<b>Életkor (évek)<sup>b</sup></b>				
61<	20 (46.5)	13 (46.4)	7 (46.7)	
61≥	23 (53.5)	15 (53.6)	8 (53.3)	<b>0.99<sup>c</sup></b>
<b>Dohányzás*</b>				
Nemdohányzó	2 (4.7)	1 (3.6)	1 (6.7)	
Dohányzó vagy ex-dohányos	30 (69.8)	21 (75)	9 (60)	<b>0.53<sup>d</sup></b>
<b>Nem</b>				
Férfi	19 (44.2)	13 (46.4)	6 (40)	
Nő	24 (55.8)	15 (53.6)	9 (60)	<b>0.69<sup>c</sup></b>
<b>Stage</b>				
III	14 (32.6)	9 (32.1)	5 (33.3)	
IV	29 (67.4)	17 (60.7)	10 (66.7)	<b>0.93<sup>c</sup></b>
<b>Kezelés**</b>				
PBC	15 (34.9)	7 (25)	8 (53.3)	
RCT	12 (27.9)	10 (35.7)	2 (13.3)	
PT	9 (20.9)	6 (21.4)	3 (20)	
S	3 (7)	2 (7.1)	1 (6.7)	
S+CT és/vagy RT	1 (2.3)	1 (3.6)	0 (0)	<b>0.34<sup>c</sup></b>

<sup>a</sup> T/N a tumor illetve normál szövet expressziójának aránya. Alacsony érték az egy alatti érték.; <sup>b</sup> Cut-off érték, medián értéket jelöl.; <sup>c</sup> Chi-négyzet teszt; <sup>d</sup> Fisher-féle egzakt próba; A zárójelben feltüntetett értékek százalékok; ADC, adenokarcinóma; PBC, Platina-bázisú kemoterápia; RCT, Radio-kemoterápia; PT, Palliatív-terápia; CT, kemoterápia; RT, radioterápia; S, műtét; \*, 11 ADC beteg esetében a dohányzási szokás ismeretlen; \*\*, 3 ADC beteg esetében a kezelés ismeretlen

#### 5.1.4 EPOR expressziós szint, mint prognosztikai marker

Kaplan-Meier analízissel elemeztük az előrehaladott stádiumú ADC betegek túlélési adatait magas és alacsony EPOR szint függvényében. A rendelkezésünkre álló 43 beteg adataiból azt kaptuk, hogy a betegek magas EPOR szintje szignifikánsan hosszabb túléléssel párosult az alacsony EPOR szinttel rendelkező betegekhez képest (medián teljes túlélés 11 versus 6 hónap,  $p = 0.035$ ; **11. ábra**).



**11. ábra** Az alacsony EPOR expresszió rosszabb túléléssel párosult előrehaladott stádiumú humán tüdő adenokarcinómában. Kaplan-Meier túlélési görbéje az III-IV-es stádiumú ADC betegeknek ( $n = 43$ ), a qRT-PCR-rel mért, alacsony és magas EPOR expresszió függvényében.

Multivariáns analízis során (az általános prognosztikai változókat vizsgálva, úgy, mint életkor, nem, tumor stádium és dohányzási szokás) azt kaptuk, hogy a kezelés előtti EPOR szint a többi változótól független prognosztikai faktor ( $p = 0.031$ ; **4. táblázat**). További független prognosztikai faktornak bizonyult még a rossz túléléshez kapcsolódóan kohortunkban az életkor és a nem ( $p = 0.012$  és  $0.018$ ).

**4. táblázat** Előrehaladott stádiumú ADC betegek különböző prognosztikai faktorainak elemzése multivariáns analízissel.

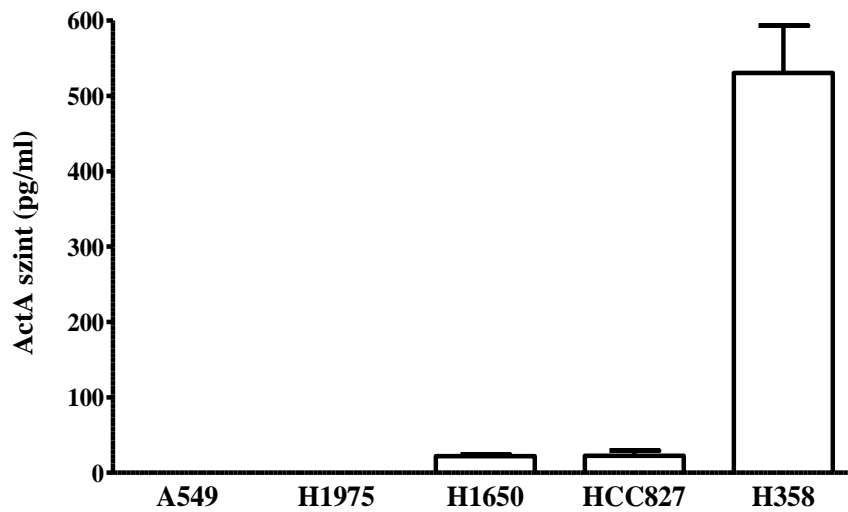
<b>Paraméterek</b>	<b>RR</b>	<b>95% CI</b>	<b><i>p</i> érték</b>
<b>Életkor</b>	1.077	(1.017-1.142)	<b>0.012</b>
<b>Nem</b> (férfi vs. nő)	0.364	(0.157-0.843)	<b>0.018</b>
<b>Stage</b> (III vs. IV)	0.615	(0.291-1.302)	0.204
<b>Dohányzás</b> (valaha vs. sohasem dohányzott)	0.67	(0.258-1.741)	0.342
<b>EPOR</b> (alacsony vs. magas)	0.431	(0.201-0.926)	<b>0.031</b>

RR, relatív rizikó; CI, konfidencia intervallum

## **5.2 Activin A/Follisztatin szerepe humán tüdő adenokarcinómában**

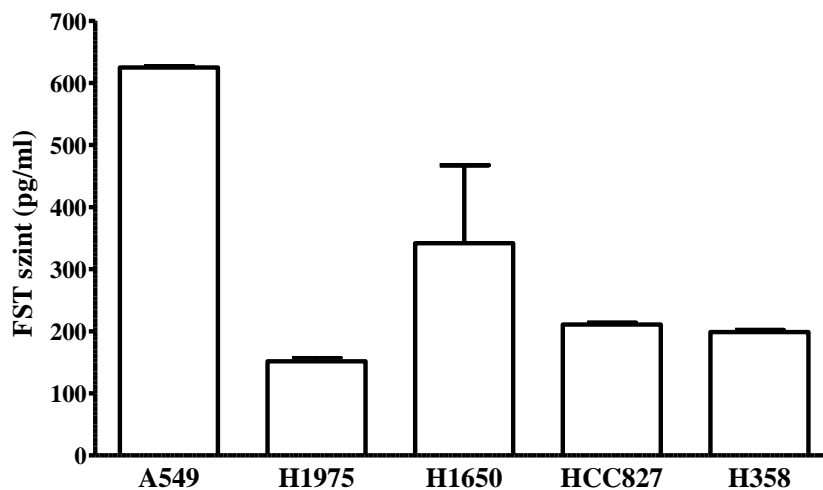
### **5.2.1 ActA/FST szekréciónja, receptorok expressziója**

Öt különböző humán tüdő adenokarcinóma sejtvonal ActA és FST termelését ELISA-val határoztuk meg. Ötből három sejtvonal felülúszójában tudtuk kimutatni az ActA jelenlétét (H1650, HCC827, H358). Ezek közül két sejtvonal esetében viszonylag alacsony (22.4 és 22.1 pg/ml), míg a H358 esetében magasabb (530.6 pg/ml) koncentrációban volt jelen a fehérje (**12. ábra**).



**12. ábra ActA szekréció humán tüdő ADC sejtvonalakban.** ADC sejtvonalatokat 24 órán át inkubáltuk szérummentes tápfolyadékban, majd a felülúszóból ELISA-val meghatároztuk az ActA szintjét. Ötből három sejtvonalt szekretálta az ActA molekulát.

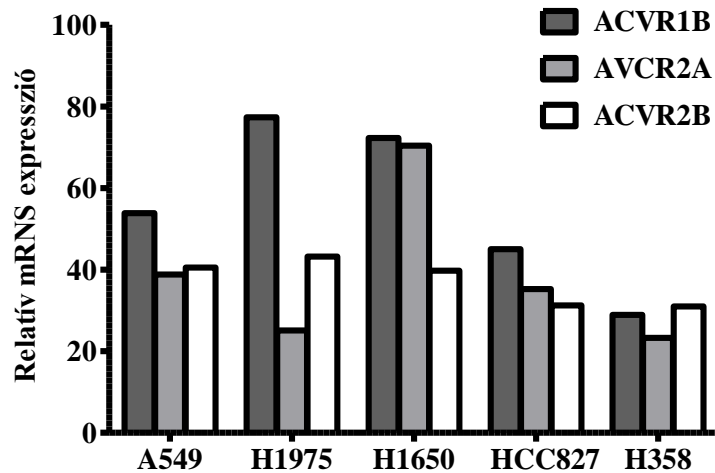
A FST esetében, mind az öt sejtvonalt termelte a fehérjét: a koncentrációk szintje 151.6 pg/ml (H1975) és 624.8 pg/ml (A549) között volt mérhető (**13. ábra**).



**13. ábra FST szekréció humán tüdő ADC sejtvonalakban.** Az ADC sejtvonalak felülúszójából, az ActA szint méréséhez hasonlóan, meghatároztuk az FST szintet is ELISA-val. Mind az öt sejtvonalt felülúszójában detektálható volt a FST molekula.



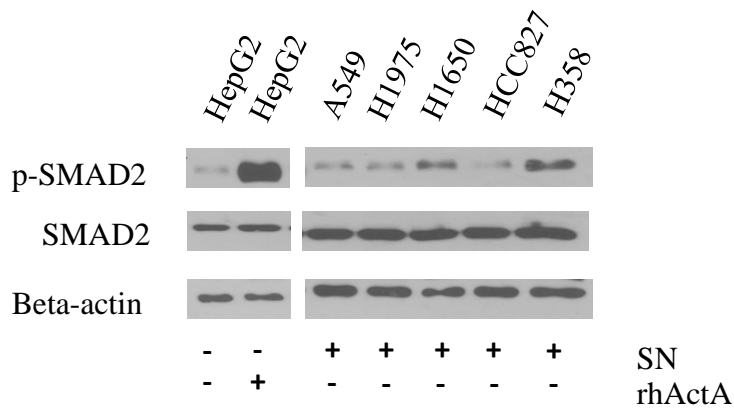
Kvantitatív valós idejű PCR-el mértük meg az activin receptorok mRNS szintjét az öt ADC sejtvonaltban. Mindegyik sejtvonalt expresszált mind a II. típusú, mind az I. típusú (ACVR1B) activin receptorokat (**14. ábra**).



**14. ábra** Activin receptorok expressziója humán tüdő ADC sejtvonaltakban. Mind az öt sejtvonaltban detektálható volt a három activin receptor (ACVR2A, ACVR2B, ACVR1B) jelenléte kvantitatív valós idejű PCR-el. A mérés során GAPDH háztartási génhez normalizáltunk.

### 5.2.2 Adenokarcinóma sejtvonaltak által termelt activin A molekula biokativitásának mérése

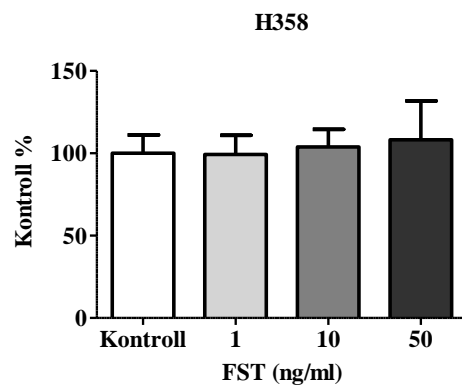
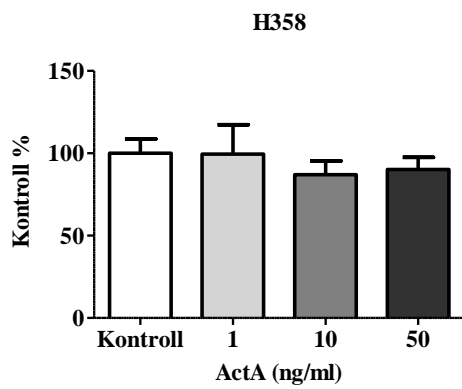
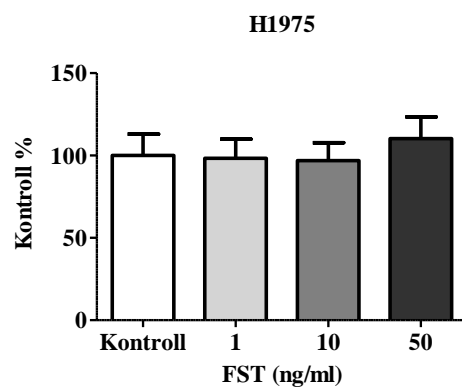
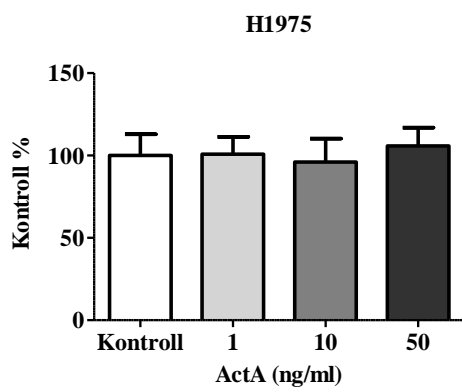
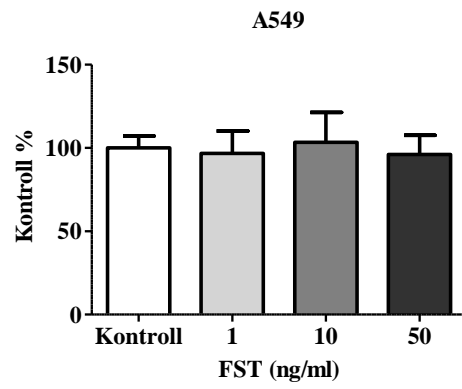
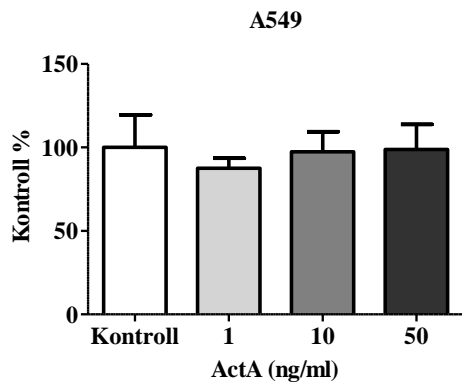
Korábbi irodalmi adatokból tudjuk, hogy a HepG2 hepatocelluláris karcinóma sejtek érzékenyen reagálnak az ActA molekulára. Mivel az exogén ActA kezelés ezekben a sejtekben a SMAD2 foszforilációját eredményezi, a rendszer kiváló a különböző eredetű ActA bioaktivitásának tesztelésére (152). A mérés során az öt különböző humán tüdő ADC sejtvonalt felülőszójával kezeltük a HepG2 sejteket. Az öt sejtvonalt közül, az ActA-t legmagasabb szinten szekretáló H358 sejtvonalt (12. ábra) felülőszója indukálta a SMAD2 foszforilációját, valamint a két, ActA-t igen alacsony szinten szekretáló sejtvonalt közül a H1650 esetében látható kisebb fokú SMAD2 foszforiláció, míg a HCC827 esetében nem figyelhető meg eltérés (15. ábra).

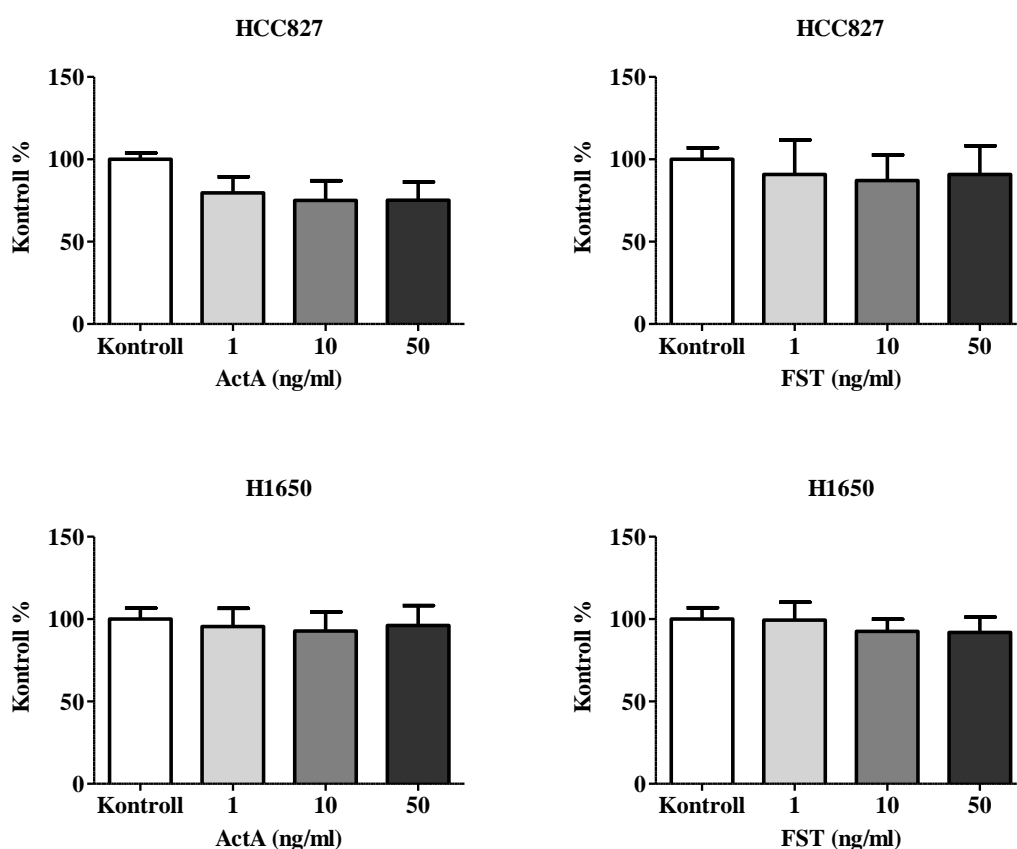


**15. ábra** Humán tüdő ADC sejtvonalak felülűszójával kezelt HepG2 sejtek SMAD2 foszforilációja. Az öt sejtvonal közül a H1650 és H358 sejtvonalak által termelt ActA váltotta ki a SMAD2 foszforilációját, vagyis a két sejtvonal által termelt ActA biológiailag aktív molekula. (SN, felülűszó)

### 5.2.3 rhActA és rhFST kezelések *in vitro* hatása humán tüdő adenokarcinóma sejtek proliferációjára

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a rhActA és rhFST kezelés milyen hatást gyakorol az activin receptorokkal rendelkező sejtvonalak proliferációjára. Azt tapasztaltuk, hogy a rhActA és rhFST 72 órás kezelés során egyik koncentrációban sem befolyásolta az ADC sejtvonalak *in vitro* proliferációs képességét (**16. ábra**).



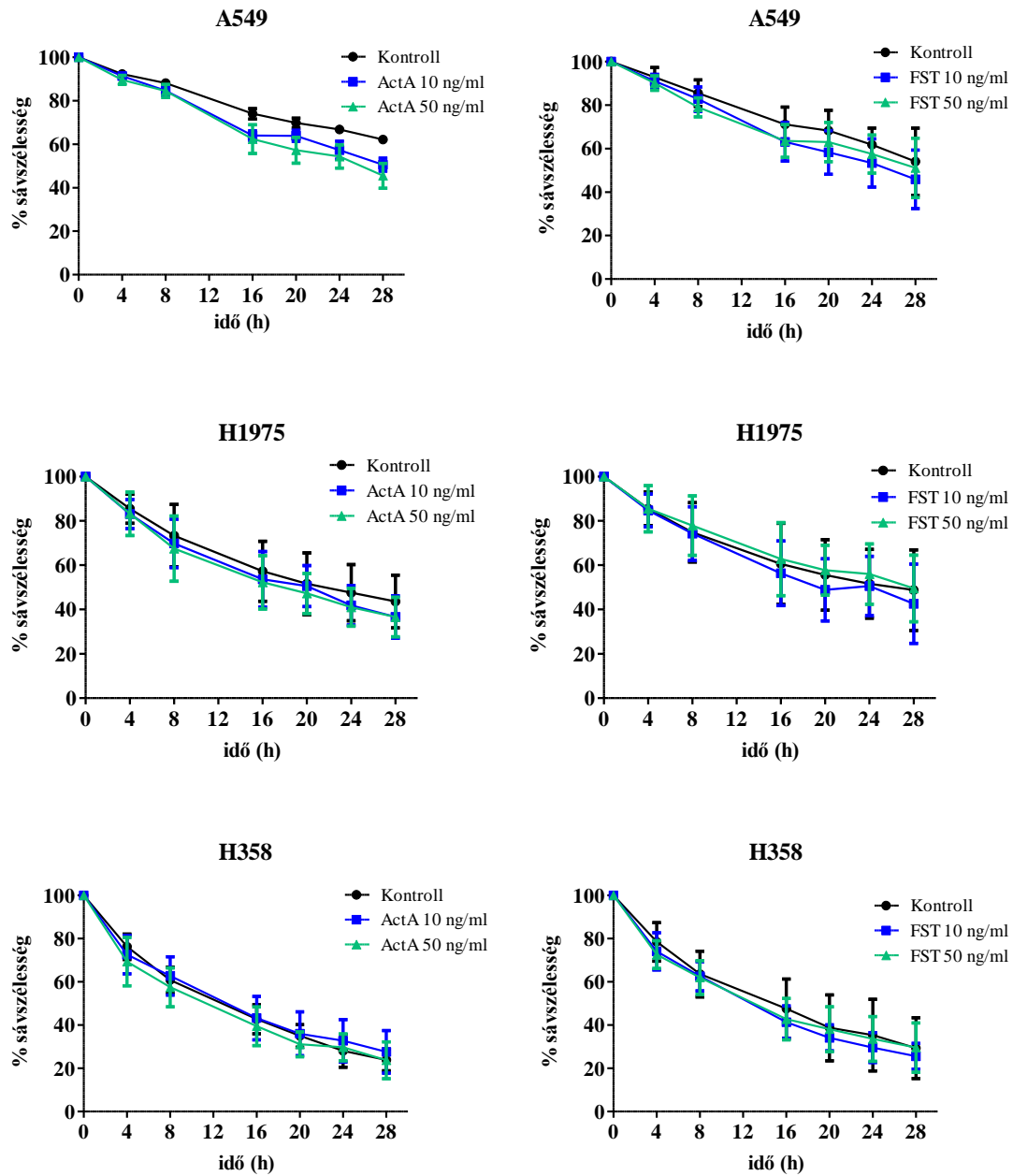


**16. ábra** *In vitro* proliferációs teszt human tüdő ADC sejtvonalakkal. Sem az rhActA sem a rhFST kezelés nem mutatott szignifikáns hatást a sejtek proliferációjára. (5 párhuzamos minta, kétszer ismételve, a kontroll %-ában)

#### 5.2.4 Adenokarcinóma sejtvonalak *in vitro* migrációs képessége rhActA és rhFST kezelések hatására

Mivel a klinikai adatainkban a keringő ActA koncentrációja összefüggést mutatott a távoli, szervi illetve a nyirokcsomó metasztázisokkal (ld. lentebb), megvizsgáltuk, hogy a rhActA és a rhFST *in vitro* befolyásolja-e az ADC sejtvonalak motilitási képességét. A sejtek migrációs képességét az úgynevezett karcolási próba (scratch assay) segítségével mértük össze a kezelt és kezeletlen csoportokban. A vizsgálatba három sejtvonalat vontunk be: H358 sejtvonalat, mely a legmagasabb szinten szekretálta az ActA-t, H1975 sejtvonalat, mely az ActA-t nem, a FST-t pedig igen alacsony szinten szekretálta, valamint az A549 sejtvonalat, melynek felülűszójában a legmagasabb FST-t detektáltuk (**12-13. ábrák**). Egyik sejtvonal esetében sem

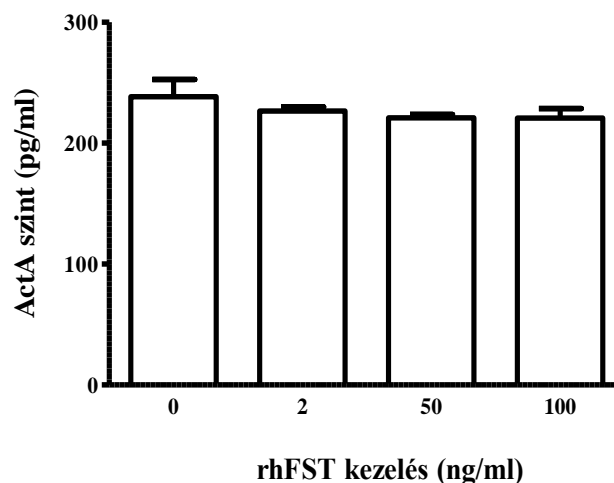
befolyásolták szignifikánsan a kezeléseket a sejtek *in vitro* migrációs képességét (17. ábra).



17. ábra *In vitro* sejtmotilitási vizsgálat humán tüdő ADC sejtvonalakkal. Jelentős motilitást serkentő, illetve csökkentő hatást sem a rhFST, sem a rhActA kezelésekre nem észleltünk a vizsgálatba bevont sejtvonalak esetében.

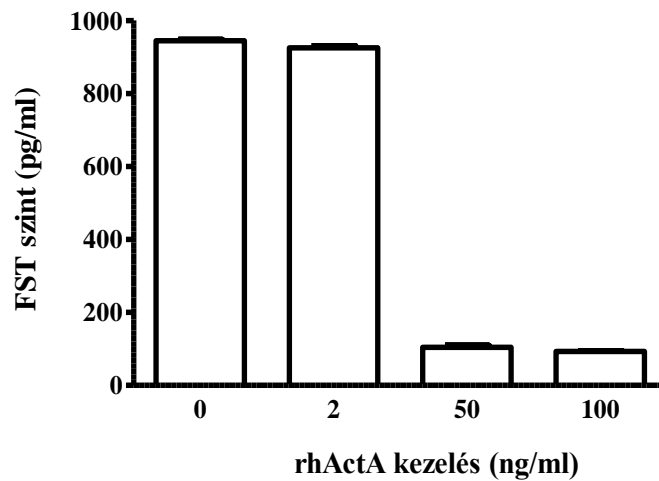
### 5.2.5 Activin A és follisztatin ELISA tesztelése

Mivel a FST az ActA fehérje természetes antagonistája, fontosnak tartottuk tisztázni, hogy a méréseinkhez használt ActA és FST ELISA kitek csak a szabad ActA-t és FST-t mérik vagy esetleg a kötött formában lévő ActA/FST komplexet is. Ennek megítéléséhez a mérés előtt rhActA-val és rhFST-nal kezeltük a humán plazma mintánkat. Az ActA ELISA esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a kezeletlen és a különböző koncentrációjú (2, 5, 100 ng/ml) rhFST-nal kezelt plazma ActA szintje között. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az ActA ELISA méri mind a szabad (aktív), mind a FST által kötött (inaktív) ActA molekulát (**18. ábra**).



**18. ábra** Az ActA ELISA tesztelése. Az ActA ELISA által detektált ActA koncentrációt nem befolyásolta a plazma minta rhFST előkezelése, ami arra utal, hogy az ActA ELISA méri mind a szabad (aktív), mind a FST által kötött (inaktív) ActA molekulát.

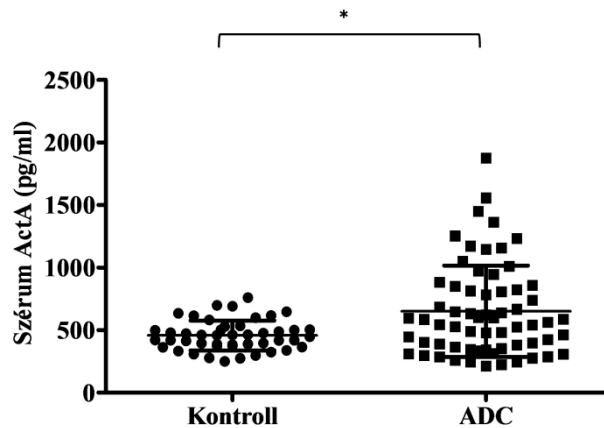
A fentiekkel ellentétben, a plazmában az 50 és 100 ng/ml rhActA kezelést követően lecsökkent az ELISA-val detektálható FST szintje a kezeletlenhez viszonyítva, ami arra utal, hogy a FST ELISA kit csak a szabad formában lévő FST-t detektálja, míg az ActA által kötöttet nem (**19. ábra**).



**19. ábra A FST ELISA tesztelése.** A rhActA kezelés lecsökkentette a mérhető FST szintet, vagyis a FST ELISA az ActA kötött FST-t nem detektálja.

### 5.2.6 Cirkuláló activin A szintje és összefüggések a betegek klinikopatológiai adataival

64 ADC beteg és 46 életkor- és nem-azonos kontroll kohort szérumban határoztuk meg az ActA szintet. A kontroll csoportban az átlag ActA szint  $457.2 \pm 119.6$  pg/ml volt, míg a betegek mintájában szignifikánsan magasabb értéket detektáltunk  $650.0 \pm 365.3$  pg/ml ( $p=0.015$ , **20. ábra**).



**20. ábra** Tüdő adenokarcinómás betegek szérum ActA koncentrációja a kontroll csoporthoz képest. Az ActA koncentrációja szignifikánsan magasabb a tüdő ADC betegek szérumban ( $p=0.015$ , vs. kontroll).

A betegek klinikopatológiai adataik a magas és alacsony ActA szérum koncentráció (mediánál kettéosztva) függvényében a **5. táblázatban** láthatóak. A vér ActA szintje és a betegség stádiuma, a kezelési stratégiák és a nem szignifikánsan korrelációt mutatott, míg az életkor és dohányzási státusz esetében szignifikáns összefüggés nem volt kimutatható.



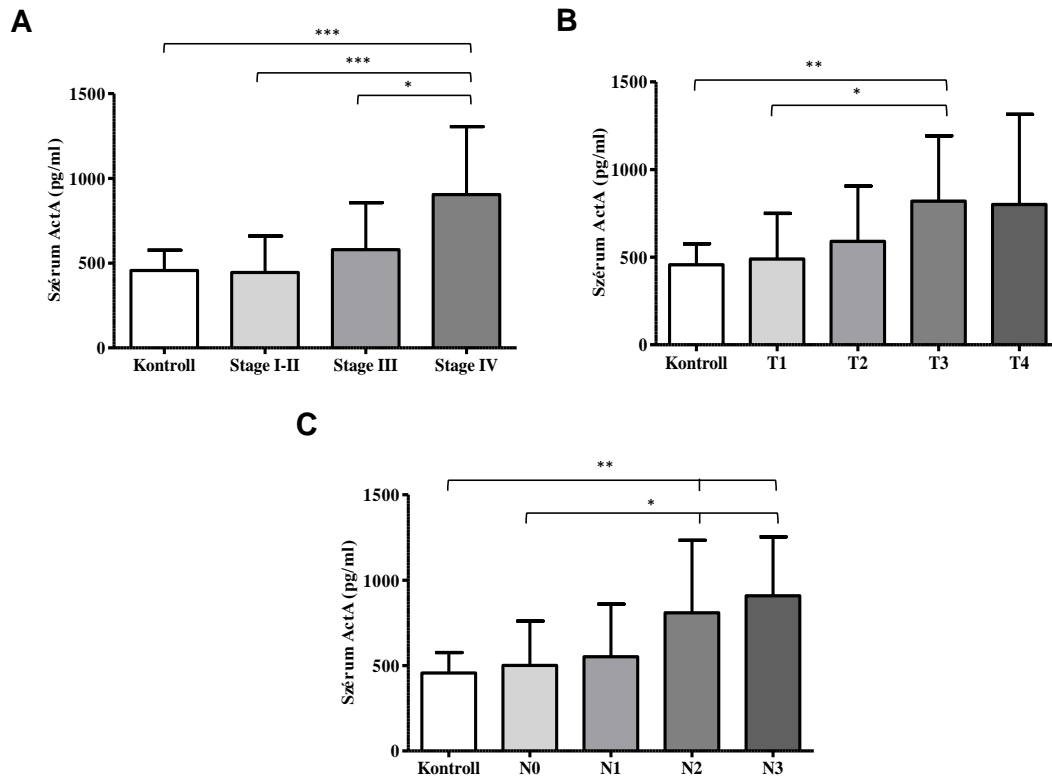
**5. táblázat** Korreláció ADC betegek ActA szérumszintje és klinikopatológiai tulajdonságaik között (n=64).

	ADC betegszám (%)	Szérumszint ActA szint <sup>a</sup>		p érték <sup>b</sup>
		Alacsony (%)	Magas (%)	
<b>Betegek</b>	<b>64</b> (100%)	<b>32</b> (50%)	<b>32</b> (50%)	
<b>Életkor (évek)<sup>a</sup></b>				
< 62	29 (45)	18 (62)	11 (38)	
≥ 62	35 (55)	14 (40)	21 (60)	<b>0.079</b>
<b>Dohányzás*</b>				
Nemdohányzó	5 (8)	4 (80)	1 (20)	
Dohányzó vagy ex-dohányos	58 (91)	27 (47)	31 (53)	<b>0.15</b>
<b>Nem</b>				
Férfi	36 (56)	14 (39)	22 (61)	
Nő	28 (44)	18 (64)	10 (36)	<b>0.044</b>
<b>Stage</b>				
I-II	22 (34)	17 (77)	5 (23)	
III	19 (30)	9 (47)	10 (53)	
IV	23 (36)	6 (26)	17 (74)	<b>0.0027</b>
<b>Kezelés*</b>				
(R)CT**	33 (51)	11 (33)	22 (67)	
S	3 (5)	3 (100)	0 (0)	
S+(R)CT	7 (11)	5 (71)	2 (29)	
PT	21 (33)	13 (62)	8 (38)	<b>0.028</b>

<sup>a</sup> Cut-off érték, medián értéket jelöl.; <sup>b</sup> Chi-négyzet teszt; A zárójelben feltüntetett értékek százalékok; ADC, adenokarcinóma; ActA, activin A; PBC, Platina-bázisú kemoterápia; (R)CT, Radio-kemoterápia; PT, Palliatív-terápia; S, műtét; \*1 ADC beteg esetében nincs adat; \*\*9 beteg célzott terápiában részesült

A megfelelő ADC diagnózis felállításához a vér ActA szint szenzitivitás/specifitás mutatóit a ROC curve analízissel határoztuk meg (szenzitivitása 60.9% (95% CI: 47.93-72.90 %), specifitása 65.2% (95 % CI: 49.8-78.7 %)), a görbe alatti terület (AUC) értéke pedig 0.637 (95 % CI: 0.534-0.741) volt.

Szintén megállapítottuk a keringő ActA koncentráció és a stage, a T és az N státusz összefüggését (**21. ábra**).



**21. ábra** Tüdő adenokarcinómás betegek szérum ActA szintje korrelál a daganat progressziójával. Az emelkedett ActA T és N státusz valamint stage függést mutat a betegek szérum mintájában (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

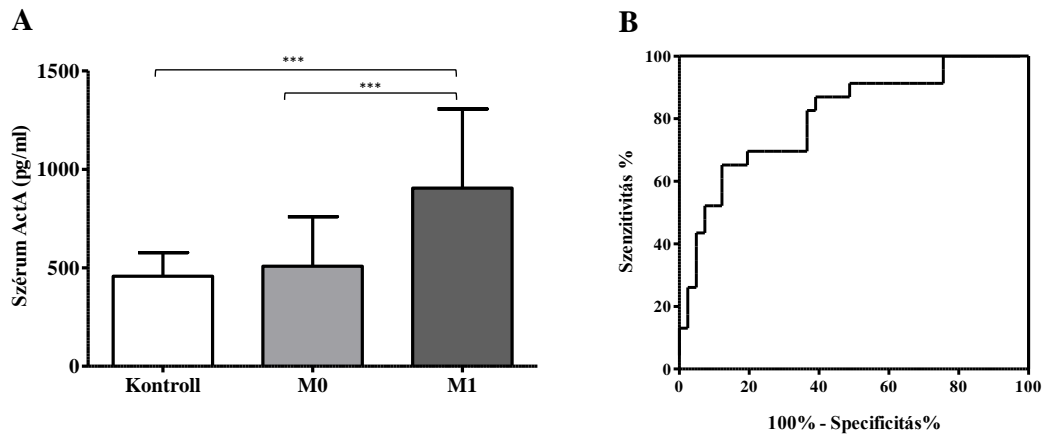
A szérum ActA szint szignifikánsan magasabb volt a IV. stádiumú betegek esetében, mint a kontroll, illetve az alacsonyabb stádiumú betegek mintájában. Szintén szignifikánsan emelkedett volt az ActA szint a T3 státuszú betegek esetében a kontrollhoz és a T1 státuszú betegek értékéhez képest. Továbbá a magasabb ActA szint összefüggést mutatott a nyirokcsomók érintettségével. A betegek és a kontroll kohort részletes szérum ActA értékeiket az alábbi **6. táblázatban** foglaltuk össze.

**6. táblázat.** Activin A szérumban koncentráció ADC betegek és kontroll kohort esetében.

	Activin A szérumban		
	n	ActA átlag	SD
<b>Kontroll</b>	46	457.2	119.6
<b>ADC T1</b>	15	489.5	260.5
<b>ADC T2</b>	25	589.7	315.7
<b>ADC T3</b>	16	819.7	373.2
<b>ADC T4</b>	8	800.3	514.9
<b>ADC N0</b>	27	501.7	259.0
<b>ADC N1</b>	10	552.0	308.5
<b>ADC N2</b>	20	808.8	424.7
<b>ADC N3</b>	7	908.8	345.2
<b>ADC M0</b>	41	507.5	251.8
<b>ADC M1</b>	23	904.1	401.8
<b>ADC Stage I</b>	14	380.8	137.5
<b>ADC Stage II</b>	8	557.4	283.8
<b>ADC Stage III</b>	19	579.9	277.2
<b>ADC Stage IV</b>	23	904.1	401.8

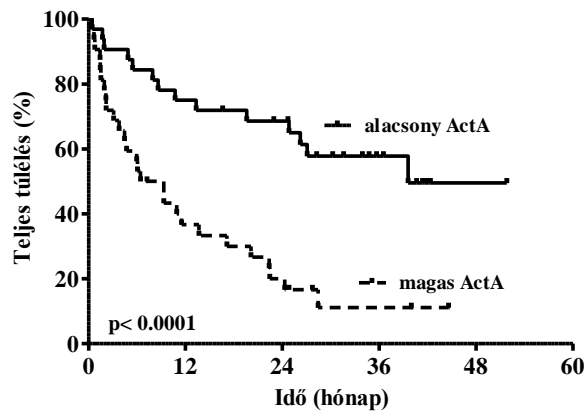
### 5.2.7 ActA szint, mint diagnosztikai és prognosztikai marker

Metasztázis tekintetében a szérumban ActA koncentráció szignifikánsan magasabb volt a metastázissal rendelkező betegek vérében, mint az M0 státuszú betegekében ( $p < 0.001$ , **22 A. ábra**). Annak megítélésére, hogy a szérumban ActA szint alkalmas-e a metastázissal rendelkező ADC csoport és a M0 státuszú betegcsoport elkülönítésére ROC curve analízist használtunk (**22 B. ábra**): szenzitivitás 82.6% (95% CI: 61.2-95.1%), specificitás 63.4 %, (95 % CI: 46.9-77.9 %), AUC=0.806 (95% CI: 0.693-0.919).



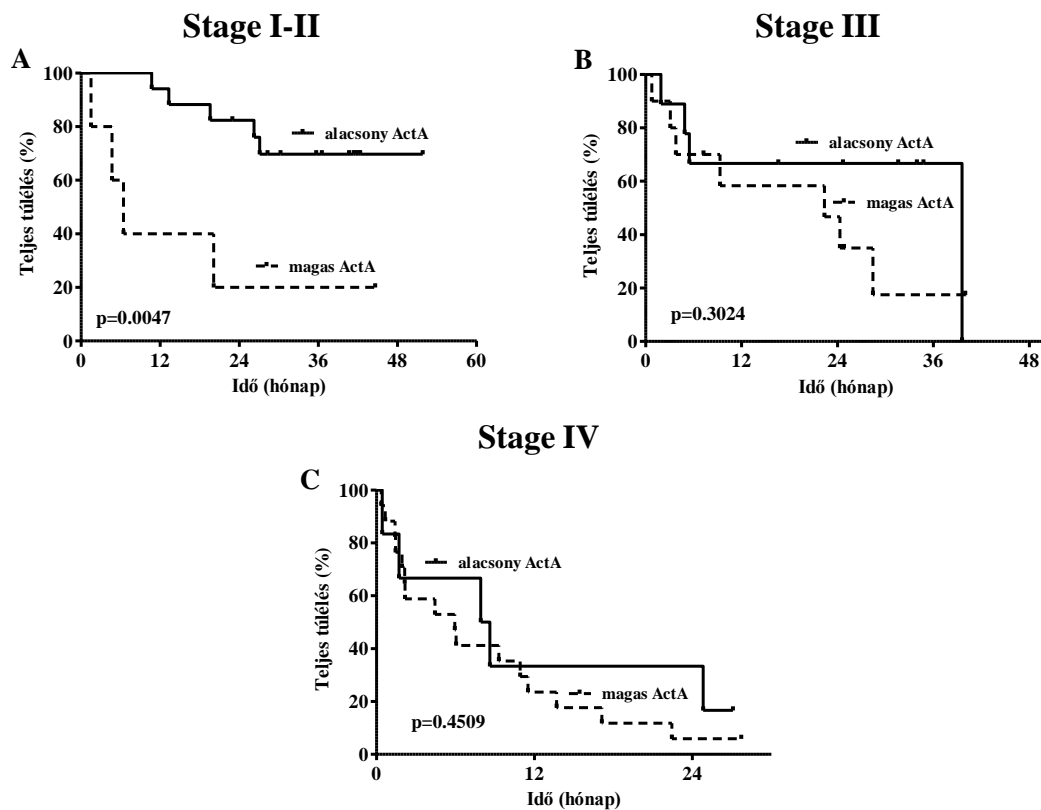
**22. ábra Actin A szint mint diagnosztikai marker. (A)** Szérum ActA szint emelkedett a M1 státuszú betegek körében a kontrollhoz és az M0 státuszú betegekhez képest (\*\*\*)  $p < 0.001$ ). **(B)** Szérum ActA szint egy lehetséges biomarker a metasztatikus ADC betegek szűrésére. AUC: 0.806 (95% CI: 0.693-0.919).

Mivel a nyirokcsomó metasztázisok és a távoli szervi metasztázisok esetében is szignifikánsan emelkedett ActA szintet detektáltunk az ADC betegek vérében, következő lépésként Kaplan-Meier analízissel vizsgáltuk a betegek teljes túlélését magas és alacsony szérum ActA szint függvényében. A vizsgálatba bevont beteg kohortunk osztályozását az ActA koncentráció medián értékével hajtottuk végre. Azt találtuk, hogy a magas szérum ActA szinttel rendelkező betegek túlélése szignifikánsan rövidebb volt, mint azon betegeké, akiknek alacsony volt a szérum ActA szintjük (**23. ábra**,  $p < 0.0001$ ).



**23. ábra** Kaplan-Meier görbe az ADC betegek teljes túléléséről a szérum ActA függvényében (cut off érték, a medián érték). Tüdő ADC betegek magas szérum ActA szintje szignifikánsan rövidebb túléléssel párosult, mint a betegek alacsony szérum ActA szintje. (medián teljes túlélés 7.9 vs. 39.6 hónap volt, HR: 0.2768, 95% CI: 0.1450-0.5286;  $p < 0.0001$ ).

A betegek stádium besorolása alapján, a stage I-II szub-kohortban az alacsony szérum ActA szint szintén szignifikánsan jobb túléléssel párosult ( $p=0.0047$ ), míg a stage III és IV szub-kohortok esetében az azonos tendencia látszik ugyan, de az a szignifikáns különbséget nem éri el (**24. A-C ábra**).



**24. ábra** Kaplan-Meier görbe a különböző stádiumú ADC betegek teljes túléléséről a szérumban ActA függvényében. **(A)** Korai stádium (Stage I-II) ADC betegek csoportjában az alacsony szérumban ActA szint szignifikánsan hosszabb túléléssel párosult (medián OS meghatározhatatlan vs. 6.4 hónap, HR: 0.05945, CI: 0.008380-0.4217,  $p=0.0047$ ). **(B)** Hasonló tendencia volt megfigyelhető a Stage III betegek csoportjában (medián OS: 39.6 vs. 22.4 hónap, HR: 0.5349, CI: 0.1628-1.757) és **(C)** a Stage IV betegek között is (medián OS: 8.3 vs. 5.9 hónap, HR: 0.6951, CI: 0.2700-1.789).

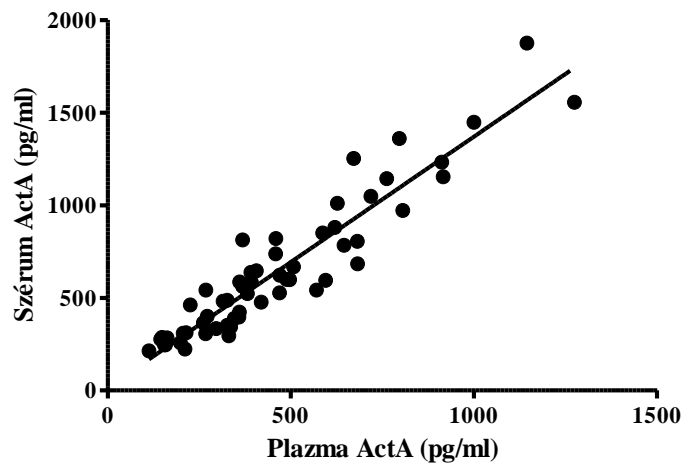
Multivariáns analízissel kimutattuk, hogy a szérumban ActA koncentráció a teljes ADC kohortunkban egy, a többi paramétertől (betegek életkora, neme és tumor stage) független prognosztikai marker (**7. táblázat**,  $p=0.004$ ).

7. táblázat Cox regressziós modell (n=64)

<b>Szérum ActA szint</b>			
<b>Paraméterek</b>	<b>HR</b>	<b>95% CI</b>	<b>p érték</b>
<b>Életkor (év)</b>			0.807
<62	0.918	0.460-1.828	
≥62	1		
<b>Nem</b>			0.115
Nő	1		
Férfi	1.775	0.869-3.625	
<b>Stage</b>			0.130
<b>Szérum ActA szint</b>			<b>0.004</b>
Alacsony ActA	1		
Magas ActA	4.142	1.583-10.837	
Rövidítések: HR, rizikó hányados; CI, konfidencia intervallum			

### 5.2.8 Activin A szint és KRAS mutációs státusz összefüggése tüdő adenokarcinómában

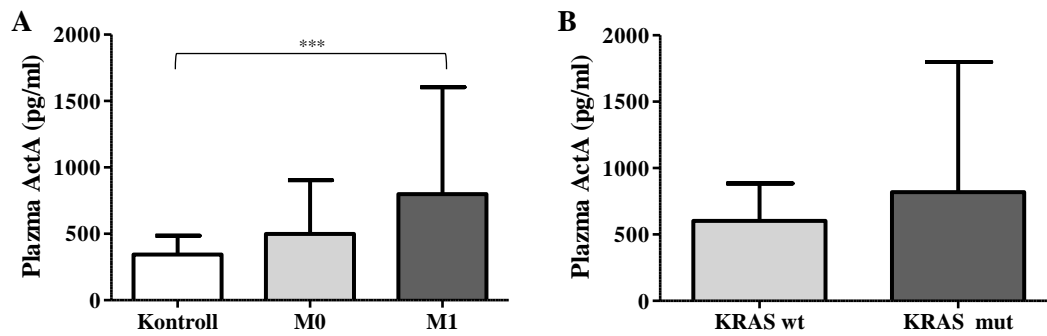
A rendelkezésünkre álló, ismert KRAS státuszú, 34 ADC beteg plazma mintájában határoztuk meg az ActA szintet és kerestük az összefüggéseket a betegek M státuszával és teljes túlélésével. A szérum ActA ADC kohortba bevont betegek esetében csak minimális esetben állt rendelkezésünkre a betegek KRAS mutációs státusza, ezért döntöttünk a nagyobb, de még mindig kibővítésre szoruló, másik ADC kohort mellett, akiktől plazma minta állt rendelkezésünkre. Az ActA szint meghatározásához használt ELISA kit protokolljában leírtaknak megfelelően, a human vér szérumban mért ActA szint magasabb a plazmában mért ActA szintnél, de a kettő szignifikánsan korrelál egymással. 58 ADC betegből álló szub-kohort esetében mértük meg a betegek szérum és plazma mintájában is az ActA szintet. A szérumban mért ActA szint ( $640.9 \pm 371.9$ ) szignifikánsan magasabb volt a plazmában mért szinthez ( $461.4 \pm 257.2$ ) képest ( $p=0.006$ ), de a két csoport igen szoros korrelációt mutatott egymással (**25. ábra**,  $R=0.932$ ,  $p < 0.0001$ ).



**25. ábra** Plazma és szérum ActA szint korrelációja ADC betegek mintájában.  
( $R=0.932$ ,  $p < 0.0001$ )

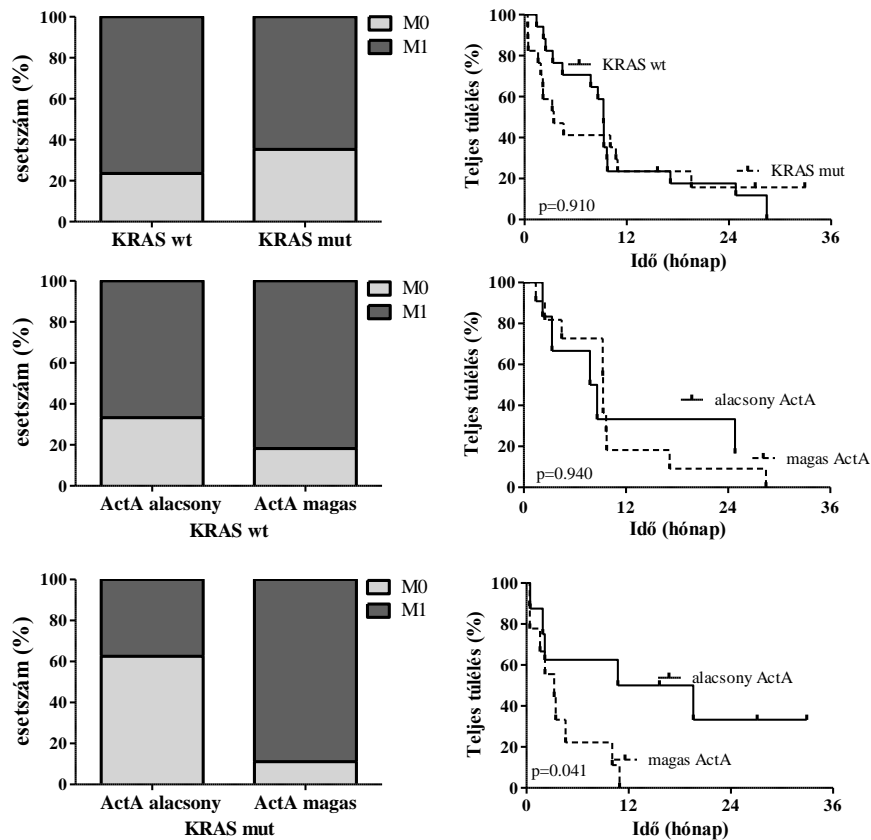
34 ADC beteg és 66 kontroll kohort plazma mintájában határoztuk meg az ActA szintet, majd megvizsgáltuk az ActA koncentráció tekintetében a metasztázist és a KRAS státuszt. A kontroll csoportban az átlag ActA szint  $344.0 \pm 142.4$  pg/ml volt, míg a betegek mintájában szignifikánsan magasabb értéket detektáltunk  $711.2.0 \pm 718.2$  pg/ml ( $p < 0.0001$ ). Metasztázis tekintetében, csak úgy, mint a nagyobb, szérumos kohortban, az M1 státuszú ADC betegeknek szignifikánsan magasabb volt a plazma ActA szintjük ( $799.4 \pm 805.1$ ) a kontrollhoz képest ( $p < 0.001$ ), bár az M0 státuszú betegekhez képest ( $499.5 \pm 404.9$ ) nem mutatott szignifikáns különbséget (**26. A ábra**). Az ADC kohortunkat KRAS vad (wt) ( $603.2 \pm 280.9$ ;  $n=17$ ) és KRAS mutáns ( $819.2 \pm 979.8$ ;  $n=17$ ) státusz szerint szétválasztva, nem találtunk szignifikáns különbséget az ActA szint tekintetében (**26. B ábra**,  $p=0.8363$ ).





**26. ábra ADC betegek plazma ActA szintjének összefüggése az M státusszal és a KRAS mutációs státusszal. (A)** Plazma ActA szint emelkedett a M1 státuszú betegek körében (\*\*\*) $p<0.001$ ). **(B)** KRAS státusz tekintetében nincs szignifikáns különbség a betegek ActA szintje között ( $p=0.8363$ ).

Bár a KRAS mutáns és vad státuszú ADC betegek plazma ActA szintje között nincs különbség, tovább vizsgáltunk, hogy a KRAS státusznak milyen összefüggései lehetnek a betegek különböző paramétereivel. Ahogy a **27. A-B ábrán** látható, KRAS státusz nem befolyásolta a betegek M státuszának eloszlását és a betegek teljes túlélése között sem volt szignifikáns eltérés a KRAS vad és KRAS mutáns ADC betegek között. A **27. C-D ábrán** a KRAS vad ADC betegek adatai láthatóak, ahol a magas ActA szinthez valamivel több M1 státuszú beteg tartozik, mint az alacsony ActA szinttel rendelkező betegek körében, de a teljes ADC kohort esetében tapasztalt szignifikáns különbséget ez meg sem közelíti. Hasonlót láthatunk a KRAS vad ADC betegek teljes túlélését vizsgáló Kaplan-Meier analízis során kapott görbén, vagyis nincs eltérés a magas és alacsony ActA szinttel rendelkező betegek teljes túlélésében. A **27. E-F ábrán** pedig a KRAS mutáns ADC betegek adatait tüntettük fel, ahol a teljes kohortban is tapasztalt tendenciák láthatóak. A magas ActA szinttel rendelkező betegek körében jóval magasabb a metasztázis megjelenése és a teljes túlélés szignifikánsan rövidebb, mint az alacsony ActA plazma koncentrációval rendelkező betegek esetében.



**27. ábra** ADC betegek ActA szint, KRAS státusz, M státusz és teljes túlélés összefüggésének vizsgálata. (A-B) ADC betegek KRAS vad és mutáns státusza alapján történő felosztása és M státuszának valamint teljes túlélésének vizsgálata. Nincs szignifikáns különbség a KRAS vad és mutáns betegek M státusza és teljes túlélésük között (medián OS: 9.3 vs. 3.4 hónap, HR: 1.043, CI: 0.5033-2.161,  $p=0.910$ ). (C-D) KRAS vad ADC betegek ActA szintjének, M státuszának és teljes túlélésének vizsgálata. Nincs szignifikáns különbség az alacsony és magas ActA szinttel rendelkező betegek M státusza és teljes túlélése között (medián OS: 8.2 vs. 9.3 hónap, HR: 0.9581, CI: 0.3141-2.923,  $p=0.940$ ). (E-F) KRAS mutáns ADC betegek ActA szintjének, M státuszának és teljes túlélésének vizsgálata. A magas ActA szint esetében emelkedett a metasztázisok száma és a teljes túlélés szignifikánsan rövidebb volt az alacsony ActA szinttel rendelkező betegekhez képest (medián OS: 15.2 vs. 3.3 hónap, HR: 0.3062, CI: 0.09837-0.9533,  $p=0.041$ ).

### **5.2.9 FST szint jelentősége humán tüdő adenokarcinómában**

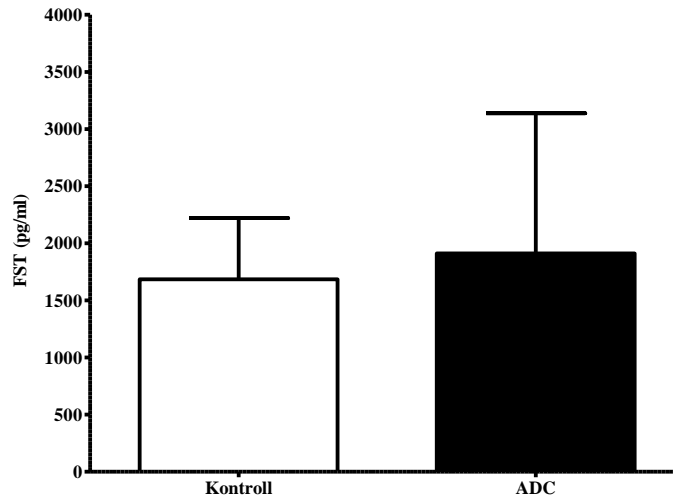
Mivel a cirkuláló ActA molekula aktivitását részben a FST molekulához való kötődése szabályozza, az ActA mérésekhez használt szérumban (64 tüdő ADC beteg és 46 életkor- és nem-azonos kontroll kohort) határoztuk meg a FST koncentrációt és kerestük az összefüggéseket a betegek klinikopatológiai adataival (**8. táblázat**)

**8. táblázat** Korreláció ADC betegek FST szérum szintje és klinikopatológiai tulajdonságaik között (n=64).

	ADC betegszám (%)	Szérum FST szint <sup>a</sup>		<i>p</i> érték <sup>b</sup>
		Alacsony (%)	Magas (%)	
<b>Betegek</b>	<b>64</b> (100%)	<b>32</b> (50%)	<b>32</b> (50%)	
<b>Életkor (évek) <sup>a</sup></b>				
< 62	29 (45)	14 (48)	15 (52)	
≥ 62	35 (55)	18 (51)	17 (49)	<b>0.8</b>
<b>Dohányzás*</b>				
Nemdohányzó	5 (8)	2 (40)	3 (60)	
Dohányzó vagy ex-dohányos	58 (91)	29 (50)	29 (50)	<b>0.67</b>
<b>Nem</b>				
Férfi	36 (56)	22 (61)	14 (39)	
Nő	28 (44)	10 (36)	18 (64)	<b>0.044</b>
<b>Stage</b>				
I-II	22 (34)	13 (59)	9 (41)	
III	19 (30)	9 (47)	10 (53)	
IV	23 (36)	10 (43)	13 (57)	<b>0.56</b>
<b>Kezelés*</b>				
(R)CT**	33 (51)	16 (49)	17 (51)	
S	3 (5)	0 (0)	3 (100)	
S+(R)CT	7 (11)	5 (71)	2 (29)	
PT	21 (33)	11 (52)	10 (48)	<b>0.23</b>

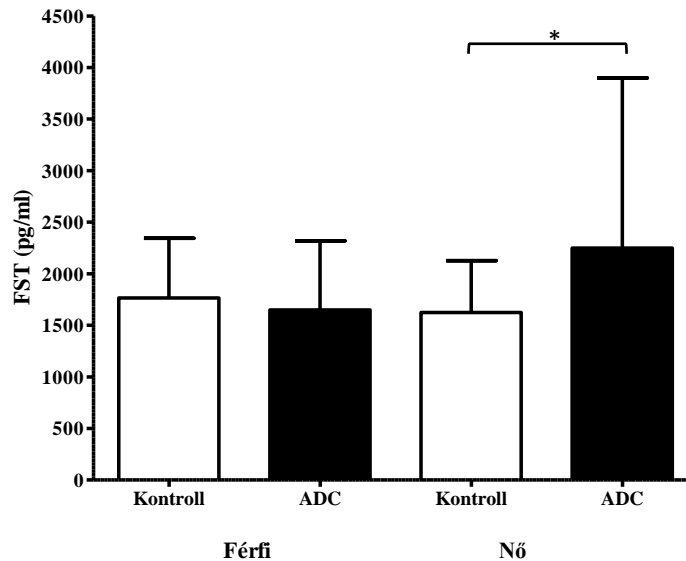
<sup>a</sup> Cut-off érték, medián értéket jelöl.; <sup>b</sup> Chi-négyzet teszt; A zárójelben feltüntetett értékek százalékok; ADC, adenokarcinóma; FST, follisztatin; PBC, Platina-bázisú kemoterápia; (R)CT, Radio-kemoterápia; PT, Palliatív-terápia; S, műtét; \*1 ADC beteg esetében nincs adat; \*\*9 beteg célzott terápiában részesült

Nem találtunk különbséget a beteg és a kontroll kohort szérumszintje között ( $1685 \pm 536.1$  pg/ml vs.  $1912 \pm 1227$  pg/ml,  $p=0.621$ , **28. ábra**).



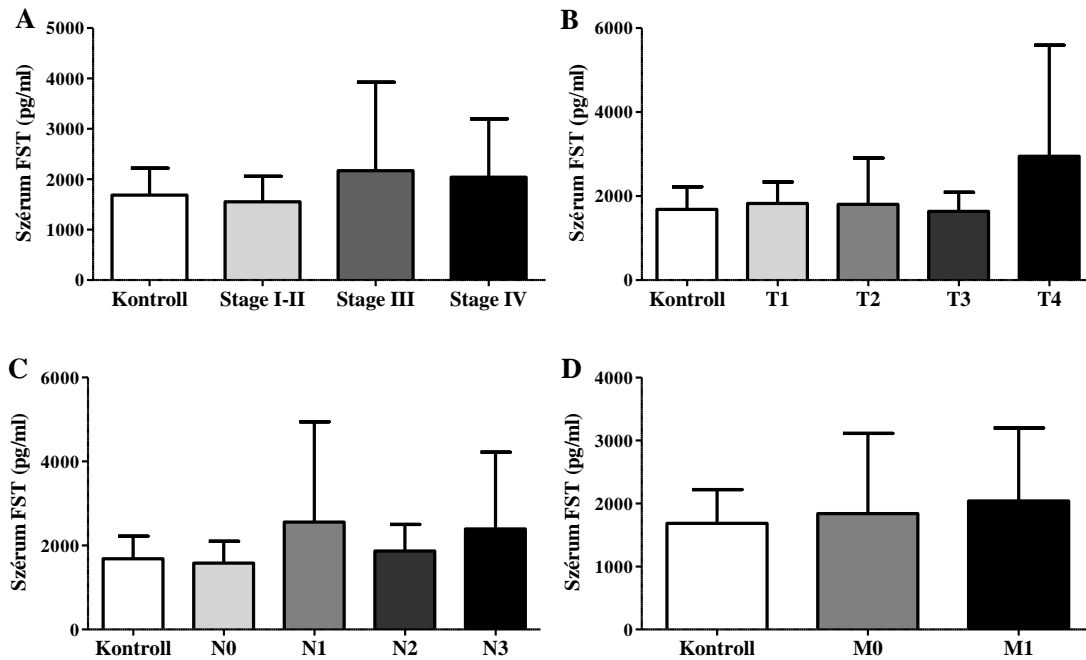
**28. ábra Szérumszint meghatározása tüdő ADC és kontroll csoportban.** Szérumszintben nincs szignifikáns különbség a tumormentes kontroll kohort és a tüdő ADC betegek mintái között ( $p=0.621$ ).

Nemek függvényében vizsgálva a szérumban FST szintet azt találtuk, hogy mind a férfi kontroll, nő kontroll és férfi ADC beteg kohort vérében hasonló koncentrációban van jelen a FST ( $1766 \pm 578.9$  pg/ml,  $1623 \pm 503.6$  pg/ml és  $1650 \pm 670.9$  pg/ml). A nő ADC betegek szérumban viszont szignifikánsan magasabb FST szintet detektáltunk ( $2249 \pm 1649$  pg/ml,  $p=0.031$ , vs. nő kontroll csoport, **29. ábra**).



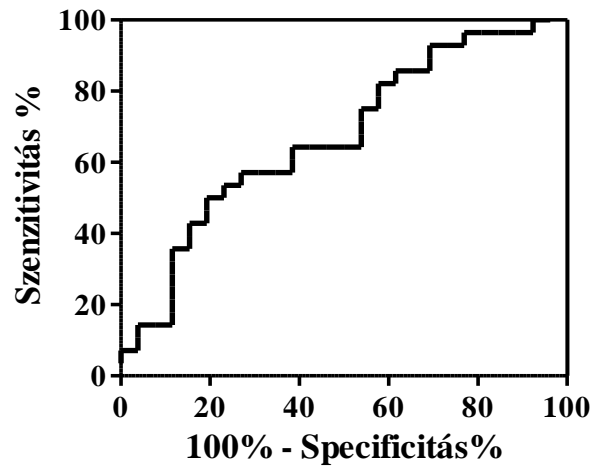
**29. ábra Szérumban FST szint meghatározása nemek függvényében.** Keringő FST szint a nő beteg kohortban szignifikánsan emelkedett volt a kontroll nő kohorthoz képest ( $p=0.031$ ), míg a férfi kohortban nem tapasztaltunk eltérést.

A szérumban ActA eredményeinkre alapozva, valamint az ADC beteg kohortban mért magasabb szórás értékek miatt megvizsgáltuk, hogy a szérumban FST szint összefüggésben van-e a stage-vel, TNM státusszal, és teljes túléléssel. Az ActA-tól eltérően, sem a stage, sem a TNM státusz esetében nem találtunk összefüggést a FST szérumban szintjével (30. A-D ábra).



**30. ábra Szérumban FST szint meghatározása stage és TNM függvényében. (A-D)** Nem találtunk összefüggést a keringő FST szint és a betegek stage valamint TNM státusza között.

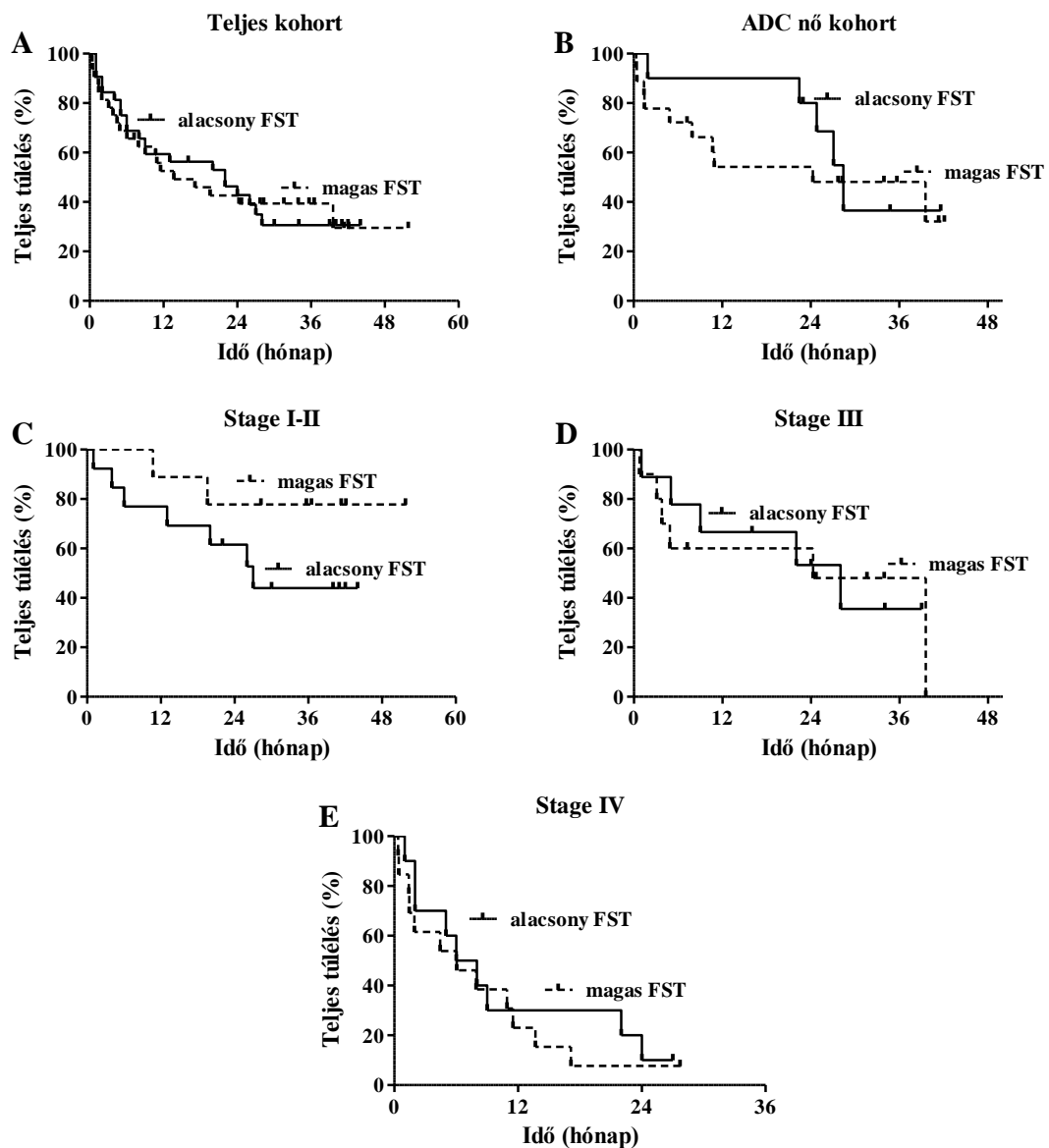
ROC curve analízissel megvizsgáltuk a szérumban lévő FST-t is, mint diagnosztikai markert. Sem a teljes kohortban, sem a női kohortban - ahol szignifikánsan emelkedett FST értékeket mértünk - nem volt kimutatható, hogy a FST ADC specifikus diagnosztikai markerként lenne értékelhető (**31. ábra**).



**31. ábra** FST szint, mint diagnosztikai marker a női kohortban. (A) Szérumban lévő FST szint elemzése ROC curve analízissel: szenzitivitás 60.7% (95% CI: 40.5-78.5%), specificitás 61.5% (95% CI: 40.6-79.8%), a görbe alatti terület: AUC=0.672 (95% CI: 0.5271-0.8163).

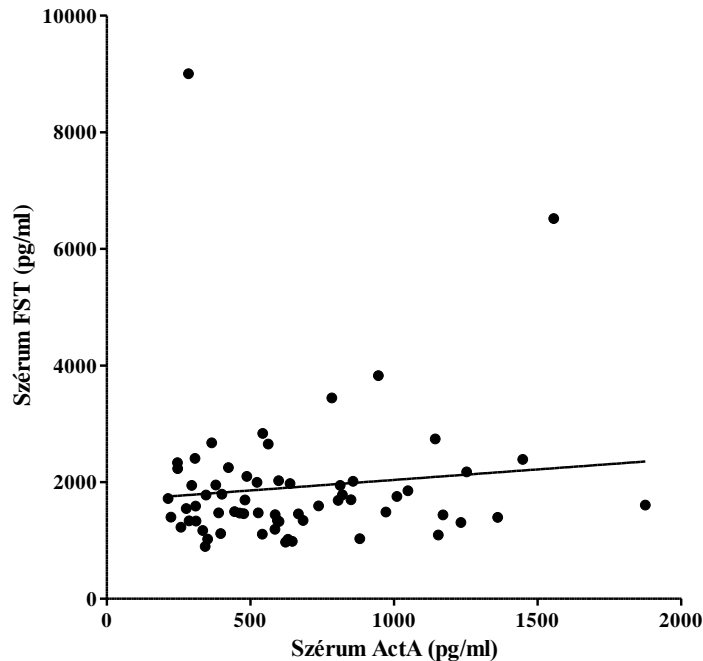
Továbbá megvizsgáltuk, hogy a szérumban lévő FST szint mennyiben függ össze a betegek túlélési adataival. Azt találtuk, hogy sem a teljes kohortban, sem az emelkedett FST szintet mutató női kohortban, illetve sem a teljes kohortot stádiumokra osztva nem volt összefüggés a betegek teljes túlélése és a FST koncentrációja között (**32. A-E ábra**).





**32. ábra** Kaplan-Meier görbe az ADC betegek teljes túléléséről a szérumban mért FST függvényében. (A) Sem a teljes kohortban ( $p=0.933$ ), (B) sem a nő betegek között ( $0.565$ ), (C-E) sem a különböző stadiumú betegek között nem volt szignifikáns összefüggés a teljes túlélés és a FST szint között (Stage I-II  $p=0.149$ ; Stage III  $p=0.996$ ; Stage IV  $p=0.531$ ).

Ezt követően összehasonlítottuk az ADC betegek mintájában mért ActA és FST szintet és megállapítottuk, hogy a két fehérje szérumban koncentrációja nem korrelál egymással (**33. ábra**).



**33. ábra** Korreláció a szérumban ActA és FST koncentráció között ADC betegek esetében. Nem találtunk szignifikáns korrelációt a két fehérje szérumban koncentrációja között.

Az irodalomban találkozhatunk olyan vizsgálatokkal, ahol a FST/ActA arányát is elemezték, mint prognosztikai jelentőséggel bíró markert (163), ezért minden ADC beteg és kontroll egyed esetében megállapítottuk az FST/ActA arányát is és megnéztük, hogy az így kapott érték milyen prognosztikai és diagnosztikai értékkel bír az általunk használt kohortokban. Azt találtuk, hogy hasonlóan a szérumban FST szintjéhez, az FST/ActA arány sem mutatott szignifikáns összefüggést a különböző klinikai paraméterekkel és a betegség kimenetelével.

## 6 MEGBESZÉLÉS

Az NSCLC prognózisának előrejelzésére számos vér markert azonosítottak már, de ezen tanulmányok eredményei igencsak különbözőek. (9-26). Kutatócsoportunk ezek közül a markerek közül a már sokat kutatott, anaemiás daganatos betegek szempontjából igen nagy jelentőséggel bíró EPOR molekulára és az NSCLC-ben kevesebbet vizsgált, de számos daganattípusban már leírt, eltérő prognosztikai értékkel bíró activin A és follisztatin molekulára koncentrált.

Az EPOR expresszióját többféle tumortípusban megfigyelték, köztük humán NSCLC-ben is, bár a pontos szerepe ez utóbbi tumortípusban még kérdéses. Ennek feltárására III-IV stádiumú ADC betegek bronchoszkópos kefe mintájában határoztuk meg az EPOR mRNS expressziós szintjét és kerestük az összefüggéseket a betegek klinikopatológiai adataival és a prognózissal. Tanulmányunk során azt az újszerű megállapítást tehetjük, miszerint azon előrehaladott stádiumú tüdő ADC betegek, akiknek magas az EPOR mRNS expressziója, jobb prognózisra számíthat szemben az alacsony EPOR mRNS szinttel rendelkező betegekkel.

Az EPOR expressziója nem-hematopoetikus szövetekben is megfigyelhető, ami az EPO pleiotrop hatására enged következtetni. Megannyi különböző tumor sejtvonalban (többek között NSCLC-ben), illetve a daganat-strómát alkotó érhalózati komponensein is megfigyelhető az EPOR expressziója (95). Ebből következik, hogy jogosan kérdőjeleződik meg az rHuEPO egyértelműen jótékony hatása, ugyanis az EPOR szignalizáción keresztül, iatrogén hatásaként, felgyorsíthatja a tumorsejtek proliferációját illetve az angiogenezist. Korábbi eredményekkel összhangban (78-82), annak ellenére, hogy az általunk vizsgált összes human ADC sejtvonal expresszálta az EPOR-t mRNS szinten, az exogén adott rHuEPO $\alpha$  (önmagában vagy gemcitabinnal kombinálva) *in vitro* nem befolyásolta a sejtek osztódó képességét. Ezzel ellentétben az önmagában adott rHuEPO $\alpha$  kezelés, a human sejtvonal, H1975 (a vizsgált ADC sejtvonalak közül a legmagasabb EPOR expresszióval bíró sejtvonal) xenograftokban szignifikánsan lecsökkentette a tumorsejtek proliferációját. Az rHuEPO $\alpha$  *in vivo* intratumorális hatásának háttere még nem egészen tisztázott. Egy lehetséges magyarázat, miszerint a rHuEPO $\alpha$  kezelés hatására lecsökkent az intratumorális hypoxia, így akadályozva meg a fő hypoxia szabályozó, HIF-1 $\alpha$  aktiválódását (187).

Szintén e hipotézist támasztja alá a rHuEPO $\alpha$  -val kezelt H1975 xenograftokban talált tumor endotél sejtek szignifikánsan emelkedett proliferációja (és feltételezhetően ennek következtében a megnövekedett felszínű intratumorális kapilláris rendszer). Kutatócsoportunk korábbi eredményei is ezt támasztják alá, ahol human vastagbél daganat (HT25) és epidermoid carcinoma (A431) xenograft modellekben tapasztaltuk, hogy a rHuEPO kezelés hatására ugyan szignifikánsan lecsökkent az intratumorális hypoxia, a HIF-1 $\alpha$  valamint a VEGF expressziója, de a tumor növekedésére nem volt hatással. Szintén ezekben a kísérletekben sikerült kimutatni, hogy a rHuEPO kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett a tumor-asszociált endotélsejtek proliferációja és az intratumorális erek átmérője. A megnövekedett érfelszín tette lehetővé a kemoterápiás szerek pontosabb eljuttatását a tumorsejtekhez és így azok antitumorális hatásának fokozását (84). Egy újabb tanulmány során kutatócsoportunk szintén megállapította, hogy míg az EPOR-t expresszáló A431 sejtvonal proliferációját *in vitro* nem befolyásolta az rHuEPO kezelés, addig emelte a sugárkezelés proliferációra, apoptózisra és klonogén aktivitásra gyakorolt hatását. *In vivo* kísérletek során pedig megállapíthattuk, hogy a rHuEPO kezelés hatására lecsökkent a HIF-1 $\alpha$  expressziója a tumoron belül, de a tumor növekedésére nem volt hatással. Mindemellett a rHuEPO szignifikánsan megnövelte a sugárkezelés *in vivo* hatékonyságát (85).

Az EPOR szignalizáció és a betegség kimenetele - köztük a betegek teljes túlélése - közötti összefüggések feltárására ezidáig csak néhány NSCLC beteg adatait dolgozták fel (107, 108). Illetve mindkét tanulmányban, mely az EPOR expresszió prognosztikai értékét vizsgálta human NSCLC mintákon (107), olyan anti-EPOR ellenanyagokkal kivitelezett immunhisztokémiai vizsgálatokra alapozták megállapításaikat, melyek specifitása azóta megkérdőjeleződött (109). A ma is használatban lévő EPOR ellenanyagok használhatósága, specifikus EPOR jelölése igencsak korlátozott (100). Szintén fontos itt megemlítenünk, hogy a poszttranszlációs módosítások, illetve az alternatív splicing során is megváltozhat az EPOR szerkezete (41, 188), ami magyarázatul szolgálhat a specifikus EPOR elleni ellenanyag hiányára. Ebből kifolyólag, vizsgálataink során az EPOR expresszió szerepét human ADC betegek körében, mRNS szinten határoztuk meg qRT-PCR-rel. Azon meghatározás mellett, miszerint *in vivo* a rHuEPO $\alpha$  kezelésnek tumor növekedést csökkentő hatása van, azt a fontos megállapítást tehetjük, hogy az előrehaladott stádiumú ADC betegek

bronchoszkópos kefe mintájából történő, EPOR expressziós szint meghatározásából következtetni lehet a betegség kimenetelére. A betegek követése során azt tapasztaltuk, hogy a kezelések előtti alacsony EPOR szint esetében szignifikánsan rövidebb volt a túlélés, mint a magas EPOR szinttel rendelkező betegek esetében, ESA kezelés nélkül. Bár számos, klinikai kutatásokat összefoglaló metaanalízis számol be arról, hogy az ESA szerek nem befolyásolják a betegek prognózisát különböző daganattípusokban (98), köztük az NSCLC-ben sem (97), a mi eredményeink arra mutatnak rá, hogy a rHuEPO $\alpha$  kezelés közvetve vagy közvetlenül akár még csökkentheti is a tüdő ADC betegek progresszióját. Bár jelenlegi kutatási eredményeink megerősítéséhez további tüdő ADC beteg kohortok bevonására lenne szükség.

A vizsgálatainkba bevont másik marker az ActA, tudomásunk szerint a mi kutatócsoportunk írta le először, miszerint a vérben emelkedett szintjéről a tüdő ADC progressziójára és a betegség kedvezőtlen kimenetelére lehet következtetni. Tumortípustól függően az ActA-nak lehet pro- illetve antitumor hatása is. Emlő-, máj- és vastagbél daganatokban az ActA gátolja a tumor növekedését (147, 152, 155). Bizonyos tumortípusok viszont rezisztensé válhatnak az ActA tumor növekedést-gátló hatására. Ezekben a daganatokban az ActA nemhogy gátolja, hanem serkenti a tumorsejtek osztódását és agresszivitását egyaránt (148, 158).

Ezidáig két tanulmányban számoltak be az ActA expressziójának jelenőségéről tüdő ADC betegek szövetszövetmintájában, de a publikált eredmények ellentmondásosak. Az egyik oldalról Shan és munkatársai csökkent ActA fehérje szintet állapítottak meg tüdő ADC szövetszövetmintákban, illetve a csökkent ActA expressziót előrehaladottabb stádiummal hozták összefüggésbe (149). A másik oldalról Seder és munkatársai I stádiumú tüdő ADC betegek szövetszövetmintájában, mRNS és fehérje szinten is overexpressziót állapítottak meg, valamint negatív prognosztikai értéket tulajdonítottak az ActA-nak (148).

Jelenlegi eredményeink arra engednek következtetni, hogy az ActA egy újszerű, cirkuláló prognosztikus biomarker tüdő ADC-ben, illetve koncentrációja direkt összefüggést mutat a primer tumor méretével és a nyirokcsomó érintettségével. Eredményeinket alátámasztják korábbi tanulmányok, melyekben emlő-, endometrium-, nyaki- és szájüregi daganatokon végzett vizsgálatok során (173-175) az emelkedett cirkuláló ActA-t a primer tumorszövetből származtatták. Fontos megemlíteni, hogy

Seder és munkatársai vizsgálataiban a primer tüdő ADC minták 78%-a mutatott immunreakciót (148). A mi vizsgálataink során pedig az öt tüdő ADC sejtvonalból három expresszált detektálható ActA fehérjét. A tumorsejtekhez hasonlóan, a tumor mikro környezetéhez tartozó egyéb sejttípusok, mint például a tumor-asszociált fibroblasztok (175) illetve a neutrofil granulociták (176) is hozzájárulhatnak a primer tumor ActA termeléséhez. Amikor a keringő ActA szint szabályozásának hátterét próbáljuk tisztázni, nem szabad megfeledkezni az ActA természetes kötőfehérjéről a FST-ről sem (177). Melanóma, prosztata és hepatocelluláris carcinoma esetében például leírták, hogy az ActA növekedést-gátló hatása elleni rezisztencia oka a FST overexpressziója volt (155, 157, 163). Irodalmi adatok alapján a primer tüdő ADC sejtvonalak is expresszálnak FST-t és a betegek szérum FST szintje is emelkedett ebben a típusú daganatos megbetegedésben is (151, 189).

Mindemellett míg Seder és munkatársai azt közölték, hogy a FST-nak anti-proliferatív hatása van a tüdő ADC sejtvonalakra (148), addig Chen és munkatársai szerint *in vitro* a FST megvédi a tüdő ADC sejteket az ActA-indukálta apoptózistól (151). Munkánk során, mi azt tapasztaltuk, hogy bár a tüdő ADC sejtek *in vitro* szekretálják a FST-t, vérmintában emelkedett FST szintet csak a nő ADC kohort esetében tudtunk kimutatni. Vizsgálataink arra is kiterjedtek, hogy az általunk használt ELISA kit csak a szabad formában lévő FST molekulákat méri, az ActA kötött formát nem. Fontos megjegyezni, hogy egyéb, FST-hoz hasonló kötőmolekulák (például a BMP (190) és az angiogenin (191)) jelenléte szintén megemelheti a szabad FST szintet a vérben. Egy assay segítségével, mely során a SMAD2 foszforilációját mérjük HepG2 sejtekben, kimutattuk, hogy a magas FST expressziós szint ellenére, a tüdő ADC sejtvonalak biológiailag aktív ActA fehérjét expresszálnak. Az FST overexpresszió mellett, az activin receptorok expressziójának hiánya (146) is okozhatja az ActA elleni rezisztenciát. Kísérleteink során viszont bebizonyosodott, hogy a vizsgálatainkba bevont öt tüdő ADC sejtvonal közül mindegyik expresszálta mind az I., mind a II. típusú activin receptorokat. Ebből arra következtethetünk, hogy ebben a tumortípusban, ez a fajta rezisztencia nem jellemző. További mechanizmusok (mint például a SMAD4 vagy a tumor szupresszor p15INK4B hiánya) szintén szóba jöhetnek, amikor az ActA anti-tumor hatása elleni rezisztencia kialakulásának módjait keressük, mintahogyan ezt már leírták egyéb daganattípusokban is (152, 192).

Az ActA daganatok nyirokcsomó érintettségét befolyásoló szerepéről egy korábbi tanulmányban azt közölték, hogy míg emlő daganatban nincs összefüggésben az N státusszal, addig nyaki- és szájüregi daganatok esetében a nyirokcsomók érintettsége emelkedett tumorszöveti ActA expresszióval járt együtt (160, 193). A csoportunk egy újabb megállapítása szerint pedig, ahol NSCLC betegek tumoros érintettségi és normál mediasztinális nyirokcsomóinak határozták meg a gén expressziós profilját microarray analízissel, az INHBA (az ActA alegysége) volt a legerősebben up-regulált gén a nyirokcsomó metasztázisokban (194). Egy másik tanulmányban viszont az ActA-t, mint potenciális anti-lymphangiogén faktort azonosítottuk (195), azonban ugyanazon tanulmány kísérletes részében az ActA nem befolyásolta a melanóma sejtek nyirokcsomó-metasztatikus képességét (195). Ezek az ellentmondásos eredmények azt sugallják, hogy az ActA szignalizáció végső hatása a tumorok nyirokcsomó érintettségében nem egyértelmű, ezért ezek az eredmények további vizsgálatok szükségességét vonják maguk után.

Klinikailag kiemelkedően fontos lenne egy olyan keringő faktor azonosítása, mely a tüdő daganat távoli metasztázist adó kapacitását határozza meg. Kutatócsoportunk úgy véli, ilyen biomarkert ezidáig nem sikerült beazonosítani. Kutatásaink központi jelentőségű megállapítása, miszerint távoli metasztázist adó tüdő adenokarcinómás betegek vérében az ActA szintje szignifikánsan magasabb volt a metasztázissal nem rendelkező betegekéhez képest. Annak megállapítása, hogy ez az emelkedett ActA szint oka vagy éppen következménye a metasztázisoknak, további kutatásokat igényel. Mindazonáltal eredményeinket alátámasztják korábbi emlő- és prosztata daganatokkal folytatott kísérletek, ahol az emelkedett vér ActA szint összefüggést mutatott a csontok daganatos érintettségével (196, 197), illetve egy *in vivo* kísérletben kimutatták, hogy a FST overexpressziójával sikerült gátolni a SCLC sejtek metasztatizáló képességét (150), ami tovább erősíti az ActA szerepének jelentőségét a metasztázisok képződésében.

A KRAS mutációval rendelkező ADC betegek helyzetét nehezíti, hogy számukra ezidáig célzott terápiás kezelés nem áll rendelkezésre. Ezért a KRAS és ActA összefüggésének vizsgálata klinikailag nagy jelentőséggel bírhat. Eredményeink a KRAS mutáció és az emelkedett ActA összefüggésére engednek következtetni (bár a kis számú kohortunk mindenképpen további betegek bevonását teszi szükségessé), amit

számos korábbi irodalmi adat is igazolt már (198). Ezek alapján az irodalomban sokszor ellentmondásos eredmények a TGF- $\beta$  család tagjainak pro- illetve antitumor hatásáról is magyarázatot nyernek. Ugyanis a tumor típusa és stádiuma mellett, a RAS szignalizációnak is fontos szerepet tulajdonítanak a TGF-  $\beta$  család tagjainak tumor szupresszor hatásról, a tumor képződését és progresszióját befolyásoló funkcióra kapcsolásában. Ez pedig a RAS és a TGF szignalizációs útvonal kapcsolódási pontjain keresztül valósulhat meg.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy kutatócsoportunk elsőként írta le, hogy tüdő ADC betegek vérében az ActA szint szignifikánsan emelkedett, illetve hogy a keringő ActA koncentrációja a diagnózis pillanatában, egy független prognosztikai faktor ebben a daganattípusban. Szintén jelentőségteljes megállapítás, miszerint a szérumban ActA koncentráció egy használható biomarker tüdő ADC betegek metasztatikus betegségének meghatározására, valamint tovább vizsgálendő a KRAS mutációval rendelkező ADC szub-kohortban is. Bár további független és előrejelző vizsgálatok szükségesek az ActA/FST rendszer prognosztikai és diagnosztikai jelentőségének feltárásához tüdő ADC betegek körében, az activin szignalizáció inhibitorait már klinikai vizsgálatokban tesztelik, ezzel is alátámasztva a rendszer fontosságát malignus tumorokban.



## 7 KÖVETKEZTETÉSEK

1. qRT-PCR-rel mutattuk ki az EPOR mRNS expressziót a humán tüdő ADC sejtvonalakban. A legmagasabb szinten a H1975 ADC sejtvonal expresszálta az EPOR-t. Az rHuEPO $\alpha$  kezelés viszont sem önmagában, sem a gemcitabinnal kombinálva nem befolyásolta az ADC sejtek *in vitro* osztódását.

2. Exogén rHuEPO $\alpha$  hatására lecsökkent a H1975 sejtek *in vivo* növekedése SCID egerekben, valamint felgyorsította az érendotél sejtek *in vivo* proliferációját valamint lecsökkentette az EPOR-t magas szinten expresszáló H1975 ADC sejtvonal *in vivo* növekedési mutatóját.

3. Az alacsony EPOR expresszió rosszabb túléléssel párosult előrehaladott stádiumú humán tüdő adenokarcinómában, illetve a kezelés előtti EPOR szint a többi változótól független prognosztikai faktor.

4. Az ActA-t ötből három, a FST-t mind az öt vizsgált ADC sejtvonal szekretálta, illetve mind az öt sejtvonalban detektálható volt a három activin receptor jelenléte. Ennek ellenére a rhActA és rhFST kezelések *in vitro* nem befolyásolták az ADC sejtvonalak proliferációs és migrációs képességét.

5. Szérum ActA koncentráció szoros összefüggést mutatott az ADC betegek TNM státuszával és túlélésükkel. A FST szint csak az ADC nő kohort esetében volt emelkedett. Az ActA szint egy jó prognosztikai marker és egy lehetséges biomarker a metasztatikus ADC betegek szűrésére.

6. KRAS mutáns ADC betegek körében a magas ActA szint esetében emelkedett a metasztázisok száma és a teljes túlélés szignifikánsan rövidebb volt az alacsony ActA szinttel rendelkező betegekhez képest, míg a KRAS vad ADC betegeknél a magas és alacsony ActA szintű betegek között nem volt különbség sem a metasztázisokban sem a túlélésben.

## 8 ÖSSZEFOGLALÁS

A tüdő adenokarcinómás betegek kezelési stratégiája komoly kihívást jelent a klinikusok számára. A rHuEPO-t széles körben alkalmazzák daganatos anaemia kezelésére, bár annak mellékhatásait illetően a kísérleti és klinikai adatok igencsak ellentmondásosak. Egy másik fontos terület a biomarkerek kutatása, mely hozzájárulhat a korai diagnózis és a megfelelő kezelési stratégia felállításához.

Kutatásunk célja volt feltárni az EPOR expressziójának valamint a keringő ActA és FST szintjének jelentőségét tüdő adenokarcinómában. Vizsgálataink első részében a rHuEPO $\alpha$  hatását tanulmányoztuk különböző ADC sejtvonalakon valamint H1975 xenograft modellben. Bár az összes ADC sejtvonal expresszálta az EPOR-t, a rHuEPO $\alpha$  sem önmagában, sem a gemcitabinnal kombinálva nem befolyásolta az ADC sejtek *in vitro* proliferációját. Xenograft modellünkben a rHuEPO $\alpha$  kezelés hatására lecsökkent a tumor növekedése a kontroll csoporthoz képest, gemcitabinnal kombinálva viszont nem tudtuk kimutatni annak szinergisztikus hatását. *In vivo* a rHuEPO $\alpha$  kezelés hatására szignifikánsan lecsökkent a tumorsejtek osztódása, míg a tumor endotél sejtek proliferációja felgyorsult. Klinikai vizsgálatainkban a III-IV. stádiumú ADC betegek magas intratumorális EPOR mRNS szintje szignifikánsan hosszabb túléléssel párosult az alacsony EPOR szinthez képest. Kutatásunk második részében megállapítottuk, hogy a szérumban ActA fehérje szintje szignifikánsan emelkedett tüdő ADC betegek vérében a kontroll csoporthoz képest és korrelációt mutat a T és N státusszal. M1 státusz esetében szignifikánsan magasabb volt az ActA szintje a M0 státuszhoz képest. A magas ActA szint rövidebb túléléssel párosult, valamint kimutattuk, hogy független prognosztikai faktor a vizsgált betegpopulációban. A szérumban FST szint csak az ADC nő kohortban volt szignifikánsan emelkedett (a nő kontrollhoz képest). *In vitro* kísérleteinkben az ötből két ADC sejtvonal szekretált biológiailag aktív ActA-t, míg a FST-t mind az öt sejtvonal. Az I. és II. típusú ActA receptorok mRNS expressziója is kimutatható volt mind az öt sejtvonalban.

Végezetül tanulmányunk során megállapítottuk, hogy a magas szöveti EPOR mRNS szint egy lehetséges pozitív, míg a keringő ActA fehérje szintje egy negatív prognosztikai marker tüdő ADC-ben. Mindemellett az utóbbi paraméter egy új non-invaszív biomarkerként szolgálhat a már metasztázissal rendelkező ADC betegek szűrésére.

## SUMMARY

Therapeutic decision making for the treatment of lung ADC is often challenging. rHuEPOs are widely used for the correction of anaemia in cancer patients but the experimental and clinical data on the effects of rHuEPO treatment are inconsistent. Further important area, is biomarkers that can facilitate early detection and predict therapeutic efficacy.

The aim of the study was to investigate tumor cell and tissue EPOR and circulating activin A and follistatin expressions in human lung ADC. First, we studied the effect of rHuEPO $\alpha$  in different ADC cell lines and in the H1975 xenograft model. Although all of the ADC cell lines expressed the EPOR, rHuEPO $\alpha$  treatment alone or in combination with gemcitabine treatment, had no effect on the *in vitro* cell proliferation. In the xenograft model, however, although rHuEPO $\alpha$  treatment alone decreased the tumor growth compared to control, we could not detect its synergistic effect with gemcitabine. Furthermore, in the tumor tissue rHuEPO $\alpha$  significantly decreased tumor cell proliferation and at the same time resulted in accelerated tumor endothelial cell proliferation. A total of 43 patients with stage III–IV ADC and complete clinicopathological data were included into clinical experiments. Their high intratumoral EPOR mRNA levels were associated with significantly increased overall survival. We also reported that serum ActA protein levels are significantly elevated in lung ADC patients as compared to controls. ActA levels also correlated with more advanced disease stage and T and N factors. M1 patients had significantly higher ActA levels than M0 patients. High serum ActA level was associated with poor overall survival and was confirmed as an independent prognostic factor. Serum FST levels were increased only in female LADC patients (vs. female controls). Two out of five ADC cell lines secreted biologically active ActA, while FST was produced in all of them. Transcripts of both type I and II ActA receptors were detected in all five LADC cell lines.

In summary, our studies reveal that high EPOR level is a potential novel positive prognostic marker in human lung ADC and suggest that measuring blood ActA levels in lung ADC patients might improve the prediction of prognosis, but also indicates that this latter parameter might be a novel non-invasive biomarker for identifying lung ADC patients with organ metastases.

## 9 IRODALOMJEGYZÉK

1. Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2013) Cancer statistics, 2013, *CA Cancer J Clin* 63, 11-30.
2. Chansky, K., Sculier, J. P., Crowley, J. J., Giroux, D., Van Meerbeeck, J., Goldstraw, P., International Staging, C., and Participating, I. (2009) The International Association for the Study of Lung Cancer Staging Project: prognostic factors and pathologic TNM stage in surgically managed non-small cell lung cancer, *J Thorac Oncol* 4, 792-801.
3. Gyula, O., Andras, B., Zoltan, B., Katalin, B., Attila, C., Janos, F., Maria, G., Akos, H., Laszlo, K., Gabor, K., Gyorgy, L., Judit, M., Tamas, M. F., Zsuzsa, M., Pal, R., Zsolt, O., Janos, S., Zoltan, S., Istvan, S., Klara, S., Jozsef, T., and Edina, T. (2012) [Basic principles for the prevention, diagnosis and therapy of lung cancer], *Magy Onkol* 56, 114-132.
4. Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J., and Haber, D. A. (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer, *Nat Rev Cancer* 7, 169-181.
5. Moldvay, J., and Petak, I. (2012) [EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer management: sensitivity and resistance], *Magy Onkol* 56, 38-49.
6. Beau-Faller, M., Prim, N., Ruppert, A. M., Nanni-Metellus, I., Lacave, R., Lacroix, L., Escande, F., Lizard, S., Pretet, J. L., Rouquette, I., de Cremoux, P., Solassol, J., de Fraipont, F., Bieche, I., Cayre, A., Favre-Guillevin, E., Tomasini, P., Wislez, M., Besse, B., Legrain, M., Voegeli, A. C., Baudrin, L., Morin, F., Zalcman, G., Quoix, E., Blons, H., and Cadranet, J. (2014) Rare EGFR exon 18 and exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer on 10 117 patients: a multicentre observational study by the French ERMETIC-IFCT network, *Ann Oncol* 25, 126-131.
7. Oxnard, G. R., Binder, A., and Janne, P. A. (2013) New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, 1097-1104.
8. Shaw, A. T., Yeap, B. Y., Solomon, B. J., Riely, G. J., Gainor, J., Engelman, J. A., Shapiro, G. I., Costa, D. B., Ou, S. H., Butaney, M., Salgia, R., Maki, R. G., Varella-Garcia, M., Doebele, R. C., Bang, Y. J., Kulig, K., Selaru, P., Tang, Y.,

- Wilner, K. D., Kwak, E. L., Clark, J. W., Iafrate, A. J., and Camidge, D. R. (2011) Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis, *Lancet Oncol* 12, 1004-1012.
9. Ono, A., Takahashi, T., Mori, K., Akamatsu, H., Shukuya, T., Taira, T., Kenmotsu, H., Naito, T., Murakami, H., Nakajima, T., Endo, M., and Yamamoto, N. (2013) Prognostic impact of serum CYFRA 21-1 in patients with advanced lung adenocarcinoma: a retrospective study, *BMC cancer* 13, 354.
  10. Salgia, R., Harpole, D., Herndon, J. E., 2nd, Pisick, E., Elias, A., and Skarin, A. T. (2001) Role of serum tumor markers CA 125 and CEA in non-small cell lung cancer, *Anticancer research* 21, 1241-1246.
  11. Biran, H., Friedman, N., Neumann, L., Pras, M., and Shainkin-Kestenbaum, R. (1986) Serum amyloid A (SAA) variations in patients with cancer: correlation with disease activity, stage, primary site, and prognosis, *Journal of clinical pathology* 39, 794-797.
  12. Khan, N., Cromer, C. J., Campa, M., and Patz, E. F., Jr. (2004) Clinical utility of serum amyloid A and macrophage migration inhibitory factor as serum biomarkers for the detection of nonsmall cell lung carcinoma, *Cancer* 101, 379-384.
  13. Korbakis, D., Dimitromanolakis, A., Prassas, I., Davis, G. J., Barber, E., Reckamp, K. L., Blasutig, I., and Diamandis, E. P. (2015) Serum LAMC2 enhances the prognostic value of a multi-parametric panel in non-small cell lung cancer, *British journal of cancer* 113, 484-491.
  14. Maciel, C. M., Junqueira, M., Paschoal, M. E., Kawamura, M. T., Duarte, R. L., Carvalho Mda, G., and Domont, G. B. (2005) Differential proteomic serum pattern of low molecular weight proteins expressed by adenocarcinoma lung cancer patients, *Journal of experimental therapeutics & oncology* 5, 31-38.
  15. Kang, S. M., Sung, H. J., Ahn, J. M., Park, J. Y., Lee, S. Y., Park, C. S., and Cho, J. Y. (2011) The Haptoglobin beta chain as a supportive biomarker for human lung cancers, *Molecular bioSystems* 7, 1167-1175.
  16. Cheng, T., Dai, X., Zhou, D. L., Lv, Y., and Miao, L. Y. (2015) Correlation of apolipoprotein A-I kinetics with survival and response to first-line platinum-

- based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer, *Medical oncology* 32, 407.
17. Molina, R., Filella, X., Auge, J. M., Fuentes, R., Bover, I., Rifa, J., Moreno, V., Canals, E., Vinolas, N., Marquez, A., Barreiro, E., Borrás, J., and Viladiu, P. (2003) Tumor markers (CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in patients with non-small cell lung cancer as an aid in histological diagnosis and prognosis. Comparison with the main clinical and pathological prognostic factors, *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 24, 209-218.
  18. Planque, C., Li, L., Zheng, Y., Soosaipillai, A., Reckamp, K., Chia, D., Diamandis, E. P., and Goodglick, L. (2008) A multiparametric serum kallikrein panel for diagnosis of non-small cell lung carcinoma, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 1355-1362.
  19. Unal, D., Eroglu, C., Tasdemir, A., Karaman, H., Kurtul, N., Oguz, A., Goksu, S. S., and Kaplan, B. (2015) Is Human Kallikrein 11 in Non-small Cell Lung Cancer Treated Chemoradiotherapy Associated with Survival?, *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association* 48, 98-105.
  20. Zhu, J. F., Cai, L., Zhang, X. W., Wen, Y. S., Su, X. D., Rong, T. H., and Zhang, L. J. (2014) High plasma fibrinogen concentration and platelet count unfavorably impact survival in non-small cell lung cancer patients with brain metastases, *Chinese journal of cancer* 33, 96-104.
  21. Rolfo, C., Castiglia, M., Hong, D., Alessandro, R., Mertens, I., Baggerman, G., Zwaenepoel, K., Gil-Bazo, I., Passiglia, F., Carreca, A. P., Taverna, S., Vento, R., Peeters, M., Russo, A., and Pauwels, P. (2014) Liquid biopsies in lung cancer: the new ambrosia of researchers, *Biochimica et biophysica acta* 1846, 539-546.
  22. Wikoff, W. R., Hanash, S., DeFelice, B., Miyamoto, S., Barnett, M., Zhao, Y., Goodman, G., Feng, Z., Gandara, D., Fiehn, O., and Taguchi, A. (2015) Diacetylspermine Is a Novel Prediagnostic Serum Biomarker for Non-Small-Cell Lung Cancer and Has Additive Performance With Pro-Surfactant Protein B,

- Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 33, 3880-3886.
23. Fahrman, J. F., Kim, K., DeFelice, B. C., Taylor, S. L., Gandara, D. R., Yoneda, K. Y., Cooke, D. T., Fiehn, O., Kelly, K., and Miyamoto, S. (2015) Investigation of Metabolomic Blood Biomarkers for Detection of Adenocarcinoma Lung Cancer, *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 24, 1716-1723.
  24. Krebs, M. G., Sloane, R., Priest, L., Lancashire, L., Hou, J. M., Greystoke, A., Ward, T. H., Ferraldeschi, R., Hughes, A., Clack, G., Ranson, M., Dive, C., and Blackhall, F. H. (2011) Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 1556-1563.
  25. Wang, J., Wang, K., Xu, J., Huang, J., and Zhang, T. (2013) Prognostic significance of circulating tumor cells in non-small-cell lung cancer patients: a meta-analysis, *PLoS One* 8, e78070.
  26. Holdenrieder, S., Nagel, D., and Stieber, P. (2010) Estimation of prognosis by circulating biomarkers in patients with non-small cell lung cancer, *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 6, 179-190.
  27. Azzoli, C. G., Baker, S., Jr., Temin, S., Pao, W., Aliff, T., Brahmer, J., Johnson, D. H., Laskin, J. L., Masters, G., Milton, D., Nordquist, L., Pfister, D. G., Piantadosi, S., Schiller, J. H., Smith, R., Smith, T. J., Strawn, J. R., Trent, D., Giaccone, G., and American Society of Clinical, O. (2009) American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 6251-6266.
  28. Ettinger, D. S., Akerley, W., Bepler, G., Blum, M. G., Chang, A., Cheney, R. T., Chirieac, L. R., D'Amico, T. A., Demmy, T. L., Ganti, A. K., Govindan, R., Grannis, F. W., Jr., Jahan, T., Jahanzeb, M., Johnson, D. H., Kessinger, A., Komaki, R., Kong, F. M., Kris, M. G., Krug, L. M., Le, Q. T., Lennes, I. T., Martins, R., O'Malley, J., Osarogiagbon, R. U., Otterson, G. A., Patel, J. D.,

- Pisters, K. M., Reckamp, K., Riely, G. J., Rohren, E., Simon, G. R., Swanson, S. J., Wood, D. E., Yang, S. C., and Members, N. N.-S. C. L. C. P. (2010) Non-small cell lung cancer, *J Natl Compr Canc Netw* 8, 740-801.
29. Bittner, N., Ostoros, G., and Geczi, L. (2014) New treatment options for lung adenocarcinoma--in view of molecular background, *Pathol Oncol Res* 20, 11-25.
  30. Scagliotti, G. V., Parikh, P., von Pawel, J., Biesma, B., Vansteenkiste, J., Manegold, C., Serwatowski, P., Gatzemeier, U., Digumarti, R., Zukin, M., Lee, J. S., Mellemaard, A., Park, K., Patil, S., Rolski, J., Goksel, T., de Marinis, F., Simms, L., Sugarman, K. P., and Gandara, D. (2008) Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 3543-3551.
  31. Paz-Ares, L. G., de Marinis, F., Dediu, M., Thomas, M., Pujol, J. L., Bidoli, P., Molinier, O., Sahoo, T. P., Laack, E., Reck, M., Corral J., Melemed, S., John, W., Chouaki, N., Zimmermann, A. H., Visseren-Grul, C., and Gridelli, C. (2013) PARAMOUNT: Final overall survival results of the phase III study of maintenance pemetrexed versus placebo immediately after induction treatment with pemetrexed plus cisplatin for advanced nonsquamous non-small cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 31, 2895-2902.
  32. Pennell, N. A., and Lynch, T. J., Jr. (2009) Combined inhibition of the VEGFR and EGFR signaling pathways in the treatment of NSCLC, *Oncologist* 14, 399-411.
  33. Tebbutt, N., Pedersen, M. W., and Johns, T. G. (2013) Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy, *Nat Rev Cancer* 13, 663-673.
  34. Dome, B., Hendrix, M. J., Paku, S., Tovari, J., and Timar, J. (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications, *Am J Pathol* 170, 1-15.
  35. Dome, B., and Magyar, M. (2008) [Tumor vasculature as a therapeutic target in non-small cell lung cancer], *Magy Onkol* 52, 247-259.



36. Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., Lilienbaum, R., and Johnson, D. H. (2006) Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer, *N Engl J Med* 355, 2542-2550.
37. Crino, L., Dansin, E., Garrido, P., Griesinger, F., Laskin, J., Pavlakis, N., Stroiakovski, D., Thatcher, N., Tsai, C. M., Wu, Y. L., and Zhou, C. (2010) Safety and efficacy of first-line bevacizumab-based therapy in advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (SAiL, MO19390): a phase 4 study, *Lancet Oncol* 11, 733-740.
38. Lacombe, C., and Mayeux, P. (1999) The molecular biology of erythropoietin, *Nephrol Dial Transplant* 14 Suppl 2, 22-28.
39. Ebert, B. L., and Bunn, H. F. (1999) Regulation of the erythropoietin gene, *Blood* 94, 1864-1877.
40. Arcasoy, M. O., Jiang, X., and Haroon, Z. A. (2003) Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer, *Biochem Biophys Res Commun* 307, 999-1007.
41. Nakamura, Y., Komatsu, N., and Nakauchi, H. (1992) A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells, *Science* 257, 1138-1141.
42. Sakanaka, M., Wen, T. C., Matsuda, S., Masuda, S., Morishita, E., Nagao, M., and Sasaki, R. (1998) In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4635-4640.
43. Supino-Rosin, L., Yoshimura, A., Altaratz, H., and Neumann, D. (1999) A cytosolic domain of the erythropoietin receptor contributes to endoplasmic reticulum-associated degradation, *Eur J Biochem* 263, 410-419.
44. Boudot, C., Petitfrere, E., Kadri, Z., Chretien, S., Mayeux, P., Haye, B., and Billat, C. (1999) Erythropoietin induces glycosylphosphatidylinositol hydrolysis. Possible involvement of phospholipase c-gamma(2), *J Biol Chem* 274, 33966-33972.
45. Szenajch, J., Wcislo, G., Jeong, J. Y., Szczylik, C., and Feldman, L. (2010) The role of erythropoietin and its receptor in growth, survival and therapeutic response of human tumor cells From clinic to bench - a critical review, *Biochimica et biophysica acta* 1806, 82-95.

46. Minoo, P., Zadeh, M. M., Rottapel, R., Lebrun, J. J., and Ali, S. (2004) A novel SHP-1/Grb2-dependent mechanism of negative regulation of cytokine-receptor signaling: contribution of SHP-1 C-terminal tyrosines in cytokine signaling, *Blood* 103, 1398-1407.
47. Jegalian, A. G., and Wu, H. (2002) Differential roles of SOCS family members in EpoR signal transduction, *J Interferon Cytokine Res* 22, 853-860.
48. Anagnostou, A., Lee, E. S., Kessimian, N., Levinson, R., and Steiner, M. (1990) Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5978-5982.
49. Juul, S. E., Ledbetter, D. J., Joyce, A. E., Dame, C., Christensen, R. D., Zhao, Y., and DeMarco, V. (2001) Erythropoietin acts as a trophic factor in neonatal rat intestine, *Gut* 49, 182-189.
50. Ogilvie, M., Yu, X., Nicolas-Metral, V., Pulido, S. M., Liu, C., Ruegg, U. T., and Noguchi, C. T. (2000) Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts, *J Biol Chem* 275, 39754-39761.
51. Westenfelder, C., Biddle, D. L., and Baranowski, R. L. (1999) Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors, *Kidney Int* 55, 808-820.
52. Carlini, R. G., Reyes, A. A., and Rothstein, M. (1995) Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro, *Kidney Int* 47, 740-745.
53. Ribatti, D., Presta, M., Vacca, A., Ria, R., Giuliani, R., Dell'Era, P., Nico, B., Roncali, L., and Dammacco, F. (1999) Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo, *Blood* 93, 2627-2636.
54. Yasuda, Y., Masuda, S., Chikuma, M., Inoue, K., Nagao, M., and Sasaki, R. (1998) Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis, *J Biol Chem* 273, 25381-25387.
55. Haroon, Z. A., Amin, K., Jiang, X., and Arcasoy, M. O. (2003) A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response, *Am J Pathol* 163, 993-1000.

56. Digicaylioglu, M., and Lipton, S. A. (2001) Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades, *Nature* 412, 641-647.
57. Ludwig, H., Van Belle, S., Barrett-Lee, P., Birgegard, G., Bokemeyer, C., Gascon, P., Kosmidis, P., Krzakowski, M., Nortier, J., Olmi, P., Schneider, M., and Schrijvers, D. (2004) The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients, *Eur J Cancer* 40, 2293-2306.
58. Knight, K., Wade, S., and Balducci, L. (2004) Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature, *Am J Med* 116 Suppl 7A, 11S-26S.
59. Groopman, J. E., and Itri, L. M. (1999) Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment, *J Natl Cancer Inst* 91, 1616-1634.
60. Bohlius, J., Weingart, O., Trelle, S., and Engert, A. (2006) Cancer-related anemia and recombinant human erythropoietin--an updated overview, *Nat Clin Pract Oncol* 3, 152-164.
61. Wood, P. A., and Hrushesky, W. J. (1995) Cisplatin-associated anemia: an erythropoietin deficiency syndrome, *J Clin Invest* 95, 1650-1659.
62. Langer, C. J., Hirsch, F. R., Cortes-Funes, H., Sawyer, S. T., and Thatcher, N. (2003) Targeted molecular mechanisms of epoetin alfa, *Lung Cancer* 41 Suppl 1, S133-145.
63. Carrancio, S., Markovics, J., Wong, P., Leisten, J., Castiglioni, P., Groza, M. C., Raymon, H. K., Heise, C., Daniel, T., Chopra, R., and Sung, V. (2014) An activin receptor IIA ligand trap promotes erythropoiesis resulting in a rapid induction of red blood cells and haemoglobin, *Br J Haematol* 165, 870-882.
64. Suragani, R. N., Cadena, S. M., Cawley, S. M., Sako, D., Mitchell, D., Li, R., Davies, M. V., Alexander, M. J., Devine, M., Loveday, K. S., Underwood, K. W., Grinberg, A. V., Quisel, J. D., Chopra, R., Pearsall, R. S., Seehra, J., and Kumar, R. (2014) Transforming growth factor-beta superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis, *Nat Med* 20, 408-414.

65. Eder, A. F., and Chambers, L. A. (2007) Noninfectious complications of blood transfusion, *Arch Pathol Lab Med* 131, 708-718.
66. Corrales-Rodriguez, L., and Blais, N. (2012) Lung cancer associated venous thromboembolic disease: a comprehensive review, *Lung Cancer* 75, 1-8.
67. Raftopoulos, H., Laadem, A., Hesketh, P. J., Goldschmidt, J., Gabrail, N., Osborne, C., Ali, M., Sherman, M. L., Wang, D., Glaspy, J. A., Puccio-Pick, M., Zou, J., and Crawford, J. (2016) Sotatercept (ACE-011) for the treatment of chemotherapy-induced anemia in patients with metastatic breast cancer or advanced or metastatic solid tumors treated with platinum-based chemotherapeutic regimens: results from two phase 2 studies, *Support Care Cancer* 24, 1517-1525.
68. Bohlius, J., Schmidlin, K., Brillant, C., Schwarzer, G., Trelle, S., Seidenfeld, J., Zwahlen, M., Clarke, M., Weingart, O., Kluge, S., Piper, M., Rades, D., Steensma, D. P., Djulbegovic, B., Fey, M. F., Ray-Coquard, I., Machtay, M., Moebus, V., Thomas, G., Untch, M., Schumacher, M., Egger, M., and Engert, A. (2009) Recombinant human erythropoiesis-stimulating agents and mortality in patients with cancer: a meta-analysis of randomised trials, *Lancet* 373, 1532-1542.
69. Leyland-Jones, B. (2003) Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly, *Lancet Oncol* 4, 459-460.
70. Henke, M., Laszig, R., Rube, C., Schafer, U., Haase, K. D., Schilcher, B., Mose, S., Beer, K. T., Burger, U., Dougherty, C., and Frommhold, H. (2003) Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet* 362, 1255-1260.
71. Hedenus, M., Vansteenkiste, J., Kotasek, D., Austin, M., and Amado, R. G. (2005) Darbepoetin alfa for the treatment of chemotherapy-induced anemia: disease progression and survival analysis from four randomized, double-blind, placebo-controlled trials, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 6941-6948.
72. Boogaerts, M., Oberhoff, C., Ten Bokkel Huinink, W., Nowrousian, M. R., Hayward, C. R., and Burger, H. U. (2006) Epoetin beta (NeoRecormon) therapy

- in patients with solid tumours receiving platinum and non-platinum chemotherapy: a meta-analysis, *Anticancer research* 26, 479-484.
73. Glaspy, J., Crawford, J., Vansteenkiste, J., Henry, D., Rao, S., Bowers, P., Berlin, J. A., Tomita, D., Bridges, K., and Ludwig, H. (2010) Erythropoiesis-stimulating agents in oncology: a study-level meta-analysis of survival and other safety outcomes, *British journal of cancer* 102, 301-315.
  74. Ludwig, H., Crawford, J., Osterborg, A., Vansteenkiste, J., Henry, D. H., Fleishman, A., Bridges, K., and Glaspy, J. A. (2009) Pooled analysis of individual patient-level data from all randomized, double-blind, placebo-controlled trials of darbepoetin alfa in the treatment of patients with chemotherapy-induced anemia, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 2838-2847.
  75. Aapro, M., Osterwalder, B., Scherhag, A., and Burger, H. U. (2009) Epoetin-beta treatment in patients with cancer chemotherapy-induced anaemia: the impact of initial haemoglobin and target haemoglobin levels on survival, tumour progression and thromboembolic events, *British journal of cancer* 101, 1961-1971.
  76. Acs, G., Acs, P., Beckwith, S. M., Pitts, R. L., Clements, E., Wong, K., and Verma, A. (2001) Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer, *Cancer Res* 61, 3561-3565.
  77. Takeshita, A., Shinjo, K., Higuchi, M., Miyawaki, S., Takemoto, Y., Kishimoto, Y., Saito, K., Takuchi, H., Kuriyama, K., Kimura, Y., Asou, N., Takahashi, M., Hotta, T., Kanamaru, A., Ueda, R., and Ohno, R. (2000) Quantitative expression of erythropoietin receptor (EPO-R) on acute leukaemia cells: relationships between the amount of EPO-R and CD phenotypes, in vitro proliferative response, the amount of other cytokine receptors and clinical prognosis. Japan Adult Leukaemia Study Group, *Br J Haematol* 108, 55-63.
  78. Berdel, W. E., Danhauser-Riedl, S., Oberberg, D., and Zafferani, M. (1992) Effects of hematopoietic growth factors on malignant nonhematopoietic cells, *Semin Oncol* 19, 41-45.

79. Mundt, D., Berger, M. R., and Bode, G. (1992) Effect of recombinant human erythropoietin on the growth of human tumor cell lines in vitro. Micro-titer-tetrazolium assay, *Arzneimittelforschung* 42, 92-95.
80. Rosti, V., Pedrazzoli, P., Ponchio, L., Zibera, C., Novella, A., Lucotti, C., Della Cuna, G. R., and Cazzola, M. (1993) Effect of recombinant human erythropoietin on hematopoietic and non-hematopoietic malignant cell growth in vitro, *Haematologica* 78, 208-212.
81. Berdel, W. E., Oberberg, D., Reufi, B., and Thiel, E. (1991) Studies on the role of recombinant human erythropoietin in the growth regulation of human nonhematopoietic tumor cells in vitro, *Ann Hematol* 63, 5-8.
82. Dunlop, E. A., Percy, M. J., Boland, M. P., Maxwell, A. P., and Lappin, T. R. (2006) Induction of signalling in non-erythroid cells by pharmacological levels of erythropoietin, *Neurodegener Dis* 3, 94-100.
83. Elliott, S., and Sinclair, A. M. (2012) The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells, *Biologics* 6, 163-189.
84. Tovari, J., Gilly, R., Raso, E., Paku, S., Bereczky, B., Varga, N., Vago, A., and Timar, J. (2005) Recombinant human erythropoietin alpha targets intratumoral blood vessels, improving chemotherapy in human xenograft models, *Cancer Res* 65, 7186-7193.
85. Lovey, J., Bereczky, B., Gilly, R., Kenessey, I., Raso, E., Simon, E., Dobos, J., Vago, A., Kasler, M., Dome, B., Timar, J., and Tovari, J. (2008) Recombinant human erythropoietin alpha improves the efficacy of radiotherapy of a human tumor xenograft, affecting tumor cells and microvessels, *Strahlenther Onkol* 184, 1-7.
86. Sigounas, G., Sallah, S., and Sigounas, V. Y. (2004) Erythropoietin modulates the anticancer activity of chemotherapeutic drugs in a murine lung cancer model, *Cancer Lett* 214, 171-179.
87. Shannon, A. M., Bouchier-Hayes, D. J., Condron, C. M., and Toomey, D. (2005) Correction of anaemia through the use of darbepoetin alfa improves chemotherapeutic outcome in a murine model of Lewis lung carcinoma, *British journal of cancer* 93, 224-232.

88. Okazaki, T., Ebihara, S., Asada, M., Yamanda, S., Niu, K., and Arai, H. (2008) Erythropoietin promotes the growth of tumors lacking its receptor and decreases survival of tumor-bearing mice by enhancing angiogenesis, *Neoplasia* 10, 932-939.
89. Heeschen, C., Aicher, A., Lehmann, R., Fichtlscherer, S., Vasa, M., Urbich, C., Mildner-Rihm, C., Martin, H., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2003) Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization, *Blood* 102, 1340-1346.
90. Dome, B., Timar, J., Dobos, J., Meszaros, L., Raso, E., Paku, S., Kenessey, I., Ostoros, G., Magyar, M., Ladanyi, A., Bogos, K., and Tovari, J. (2006) Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer, *Cancer Res* 66, 7341-7347.
91. Kataoka, M., Moriya, Y., Moriguchi, Y., Iwai, T., Fujimoto-Ouchi, K., Shirane, M., Kondoh, K., and Mori, K. (2010) Effect of erythropoietin on human tumor growth in xenograft models, *Mol Med Report* 3, 95-101.
92. Bertout, J. A., Patel, S. A., and Simon, M. C. (2008) The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer, *Nat Rev Cancer* 8, 967-975.
93. Crawford, J., Kosmidis, P. A., Hirsch, F. R., and Langer, C. J. (2006) Targeting anemia in patients with lung cancer, *J Thorac Oncol* 1, 716-725.
94. Hadland, B. K., and Longmore, G. D. (2009) Erythroid-stimulating agents in cancer therapy: potential dangers and biologic mechanisms, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 4217-4226.
95. Tovari, J., Pirker, R., Timar, J., Ostoros, G., Kovacs, G., and Dome, B. (2008) Erythropoietin in cancer: an update, *Curr Mol Med* 8, 481-491.
96. Yasuda, Y., Hara, S., Hirohata, T., Koike, E., Yamasaki, H., Okumoto, K., and Hoshiai, H. (2010) Erythropoietin-responsive sites in normal and malignant human lung tissues, *Anat Sci Int* 85, 204-213.
97. Vansteenkiste, J., Glaspy, J., Henry, D., Ludwig, H., Pirker, R., Tomita, D., Collins, H., and Crawford, J. (2012) Benefits and risks of using erythropoiesis-stimulating agents (ESAs) in lung cancer patients: study-level and patient-level meta-analyses, *Lung Cancer* 76, 478-485.

98. Aapro, M., Jelkmann, W., Constantinescu, S. N., and Leyland-Jones, B. (2012) Effects of erythropoietin receptors and erythropoiesis-stimulating agents on disease progression in cancer, *British journal of cancer* 106, 1249-1258.
99. Fandrey, J. (2008) Erythropoietin receptors on tumor cells: what do they mean?, *Oncologist* 13 Suppl 3, 16-20.
100. Elliott, S., Busse, L., Bass, M. B., Lu, H., Sarosi, I., Sinclair, A. M., Spahr, C., Um, M., Van, G., and Begley, C. G. (2006) Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression, *Blood* 107, 1892-1895.
101. Acs, G., Zhang, P. J., Rebbeck, T. R., Acs, P., and Verma, A. (2002) Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma, *Cancer* 95, 969-981.
102. Arcasoy, M. O., Amin, K., Karayal, A. F., Chou, S. C., Raleigh, J. A., Varia, M. A., and Haroon, Z. A. (2002) Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer, *Lab Invest* 82, 911-918.
103. Acs, G., Zhang, P. J., McGrath, C. M., Acs, P., McBroom, J., Mohyeldin, A., Liu, S., Lu, H., and Verma, A. (2003) Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression, *Am J Pathol* 162, 1789-1806.
104. Eccles, T. G., Patel, A., Verma, A., Nicholson, D., Lukes, Y., Tuttle, R. M., and Francis, G. L. (2003) Erythropoietin and the erythropoietin receptor are expressed by papillary thyroid carcinoma from children and adolescents. Expression of erythropoietin receptor might be a favorable prognostic indicator, *Ann Clin Lab Sci* 33, 411-422.
105. Acs, G., Xu, X., Chu, C., Acs, P., and Verma, A. (2004) Prognostic significance of erythropoietin expression in human endometrial carcinoma, *Cancer* 100, 2376-2386.
106. Arcasoy, M. O., Amin, K., Chou, S. C., Haroon, Z. A., Varia, M., and Raleigh, J. A. (2005) Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in head and neck cancer: relationship to tumor hypoxia, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 20-27.



107. Dagnon, K., Pacary, E., Commo, F., Antoine, M., Bernaudin, M., Bernaudin, J. F., and Callard, P. (2005) Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in non-small cell lung carcinomas, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 993-999.
108. Saintigny, P., Besse, B., Callard, P., Vergnaud, A. C., Czernichow, S., Colombat, M., Girard, P., Validire, P., Breau, J. L., Bernaudin, J. F., and Soria, J. C. (2007) Erythropoietin and erythropoietin receptor coexpression is associated with poor survival in stage I non-small cell lung cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 4825-4831.
109. Brown, W. M., Maxwell, P., Graham, A. N., Yakkundi, A., Dunlop, E. A., Shi, Z., Johnston, P. G., and Lappin, T. R. (2007) Erythropoietin receptor expression in non-small cell lung carcinoma: a question of antibody specificity, *Stem Cells* 25, 718-722.
110. Doleschel, D., Mundigl, O., Wessner, A., Gremse, F., Bachmann, J., Rodriguez, A., Klingmuller, U., Jarsch, M., Kiessling, F., and Lederle, W. (2012) Targeted near-infrared imaging of the erythropoietin receptor in human lung cancer xenografts, *J Nucl Med* 53, 304-311.
111. Ling, N., Ying, S. Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., and Guillemin, R. (1986) A homodimer of the beta-subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone, *Biochem Biophys Res Commun* 138, 1129-1137.
112. Ling, N., Ying, S. Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., and Guillemin, R. (1986) Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin, *Nature* 321, 779-782.
113. Schmierer, B., and Hill, C. S. (2007) TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility, *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 970-982.
114. Attisano, L., Wrana, J. L., Montalvo, E., and Massague, J. (1996) Activation of signalling by the activin receptor complex, *Molecular and cellular biology* 16, 1066-1073.

115. Burdette, J. E., Jeruss, J. S., Kurley, S. J., Lee, E. J., and Woodruff, T. K. (2005) Activin A mediates growth inhibition and cell cycle arrest through Smads in human breast cancer cells, *Cancer Res* 65, 7968-7975.
116. Ho, J., de Guise, C., Kim, C., Lemay, S., Wang, X. F., and Lebrun, J. J. (2004) Activin induces hepatocyte cell growth arrest through induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B and Sp1, *Cellular signalling* 16, 693-701.
117. Valderrama-Carvajal, H., Cocolakis, E., Lacerte, A., Lee, E. H., Krystal, G., Ali, S., and Lebrun, J. J. (2002) Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP, *Nature cell biology* 4, 963-969.
118. Dupont, J., McNeilly, J., Vaiman, A., Canepa, S., Combarnous, Y., and Taragnat, C. (2003) Activin signaling pathways in ovine pituitary and LbetaT2 gonadotrope cells, *Biol Reprod* 68, 1877-1887.
119. Murase, Y., Okahashi, N., Koseki, T., Itoh, K., Udagawa, N., Hashimoto, O., Sugino, H., Noguchi, T., and Nishihara, T. (2001) Possible involvement of protein kinases and Smad2 signaling pathways on osteoclast differentiation enhanced by activin A, *J Cell Physiol* 188, 236-242.
120. Zhang, L., Deng, M., Parthasarathy, R., Wang, L., Mongan, M., Molkenin, J. D., Zheng, Y., and Xia, Y. (2005) MEKK1 transduces activin signals in keratinocytes to induce actin stress fiber formation and migration, *Molecular and cellular biology* 25, 60-65.
121. Deli, A., Kreidl, E., Santifaller, S., Trotter, B., Seir, K., Berger, W., Schulte-Hermann, R., Rodgarkia-Dara, C., and Grusch, M. (2008) Activins and activin antagonists in hepatocellular carcinoma, *World J Gastroenterol* 14, 1699-1709.
122. Grusch, M., Rodgarkia-Dara, C., Bursch, W., and Schulte-Hermann, R. (2008) Activins and the liver, in *Transforming Growth Factor-Beta in Cancer Therapy*, Volume I (Jakowlew, S., Ed.), pp 483-508, Humana press, Totowa, NJ.
123. Osteen, K. G., Igarashi, T. M., and Bruner-Tran, K. L. (2003) Progesterone action in the human endometrium: induction of a unique tissue environment which limits matrix metalloproteinase (MMP) expression, *Front Biosci* 8, d78-86.

124. de Winter, J. P., ten Dijke, P., de Vries, C. J., van Achterberg, T. A., Sugino, H., de Waele, P., Huylebroeck, D., Verschueren, K., and van den Eijnden-van Raaij, A. J. (1996) Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors, *Mol Cell Endocrinol* 116, 105-114.
125. Caniggia, I., Lye, S. J., and Cross, J. C. (1997) Activin is a local regulator of human cytotrophoblast cell differentiation, *Endocrinology* 138, 3976-3986.
126. Ogawa, K., Funaba, M., Mathews, L. S., and Mizutani, T. (2000) Activin A stimulates type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2) production in mouse peritoneal macrophages, *J Immunol* 165, 2997-3003.
127. Zhao, J., Taverne, M. A., van der Weijden, G. C., Bevers, M. M., and van den Hurk, R. (2001) Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II, *Biol Reprod* 65, 967-977.
128. Schneyer, A. L., Wang, Q., Sidis, Y., and Sluss, P. M. (2004) Differential distribution of follistatin isoforms: application of a new FS315-specific immunoassay, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 5067-5075.
129. Duggal, G., Heindryckx, B., Warriar, S., O'Leary, T., Van der Jeught, M., Lierman, S., Vossaert, L., Deroo, T., Deforce, D., Chuva de Sousa Lopes, S. M., and De Sutter, P. (2013) Influence of activin A supplementation during human embryonic stem cell derivation on germ cell differentiation potential, *Stem Cells Dev* 22, 3141-3155.
130. Thompson, T. B., Lerch, T. F., Cook, R. W., Woodruff, T. K., and Jardetzky, T. S. (2005) The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding, *Dev Cell* 9, 535-543.
131. Loomans, H. A., and Andl, C. D. (2014) Intertwining of Activin A and TGFbeta Signaling: Dual Roles in Cancer Progression and Cancer Cell Invasion, *Cancers (Basel)* 7, 70-91.
132. McDowell, N., and Gurdon, J. B. (1999) Activin as a morphogen in *Xenopus* mesoderm induction, *Semin Cell Dev Biol* 10, 311-317.

133. Beattie, G. M., Lopez, A. D., Bucay, N., Hinton, A., Firpo, M. T., King, C. C., and Hayek, A. (2005) Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers, *Stem Cells* 23, 489-495.
134. de Kretser, D. M., Hedger, M. P., Loveland, K. L., and Phillips, D. J. (2002) Inhibins, activins and follistatin in reproduction, *Hum Reprod Update* 8, 529-541.
135. Maguer-Satta, V., Bartholin, L., Jeanpierre, S., Ffrench, M., Martel, S., Magaud, J. P., and Rimokh, R. (2003) Regulation of human erythropoiesis by activin A, BMP2, and BMP4, members of the TGFbeta family, *Exp Cell Res* 282, 110-120.
136. Jones, K. L., de Kretser, D. M., Patella, S., and Phillips, D. J. (2004) Activin A and follistatin in systemic inflammation, *Mol Cell Endocrinol* 225, 119-125.
137. Chen, J. G., Zhu, J., Parkin, D. M., Zhang, Y. H., Lu, J. H., Zhu, Y. R., and Chen, T. Y. (2006) Trends in the incidence of cancer in Qidong, China, 1978-2002, *Int J Cancer* 119, 1447-1454.
138. Munz, B., Smola, H., Engelhardt, F., Bleuel, K., Brauchle, M., Lein, I., Evans, L. W., Huylebroeck, D., Balling, R., and Werner, S. (1999) Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair, *Embo J* 18, 5205-5215.
139. Werner, S., and Alzheimer, C. (2006) Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease, *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 157-171.
140. Phillips, D. J., de Kretser, D. M., and Hedger, M. P. (2009) Activin and related proteins in inflammation: not just interested bystanders, *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 153-164.
141. Yndestad, A., Haukeland, J. W., Dahl, T. B., Bjoro, K., Gladhaug, I. P., Berge, C., Damas, J. K., Haaland, T., Loberg, E. M., Linnestad, P., Birkeland, K., Konopski, Z., Halvorsen, B., Berge, R. K., and Aukrust, P. (2009) A Complex Role of Activin A in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, *The American journal of gastroenterology* 104, 2196-2205.
142. Wagner, K., Peters, M., Scholz, A., Benckert, C., Ruderisch, H. S., Wiedenmann, B., and Rosewicz, S. (2004) Activin A stimulates vascular

- endothelial growth factor gene transcription in human hepatocellular carcinoma cells, *Gastroenterology* 126, 1828-1843.
143. Sierra-Filardi, E., Puig-Kroger, A., Blanco, F. J., Nieto, C., Bragado, R., Palomero, M. I., Bernabeu, C., Vega, M. A., and Corbi, A. L. (2011) Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers, *Blood* 117, 5092-5101.
  144. Itoh, F., Watabe, T., and Miyazono, K. (2014) Roles of TGF-beta family signals in the fate determination of pluripotent stem cells, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 32, 98-106.
  145. Yoshinaga, K., Mimori, K., Inoue, H., Kamohara, Y., Yamashita, K., Tanaka, F., and Mori, M. (2008) Activin A enhances MMP-7 activity via the transcription factor AP-1 in an esophageal squamous cell carcinoma cell line, *Int J Oncol* 33, 453-459.
  146. Jeruss, J. S., Sturgis, C. D., Rademaker, A. W., and Woodruff, T. K. (2003) Down-regulation of activin, activin receptors, and Smads in high-grade breast cancer, *Cancer Res* 63, 3783-3790.
  147. Razanajaona, D., Joguet, S., Ay, A. S., Treilleux, I., Goddard-Leon, S., Bartholin, L., and Rimokh, R. (2007) Silencing of FLRG, an antagonist of activin, inhibits human breast tumor cell growth, *Cancer Res* 67, 7223-7229.
  148. Seder, C. W., Hartojo, W., Lin, L., Silvers, A. L., Wang, Z., Thomas, D. G., Giordano, T. J., Chen, G., Chang, A. C., Orringer, M. B., and Beer, D. G. (2009) Upregulated INHBA expression may promote cell proliferation and is associated with poor survival in lung adenocarcinoma, *Neoplasia* 11, 388-396.
  149. Shan, Y., and Li, S. (2015) Expression of Cripto-1 gene protein and Activin-A in human lung adenocarcinoma tissue, *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* 28, 739-743.
  150. Ogino, H., Yano, S., Kakiuchi, S., Muguruma, H., Ikuta, K., Hanibuchi, M., Uehara, H., Tsuchida, K., Sugino, H., and Sone, S. (2008) Follistatin suppresses the production of experimental multiple-organ metastasis by small cell lung cancer cells in natural killer cell-depleted SCID mice, *Clinical cancer research* :

- an official journal of the American Association for Cancer Research 14, 660-667.
151. Chen, F., Ren, P., Feng, Y., Liu, H., Sun, Y., Liu, Z., Ge, J., and Cui, X. (2014) Follistatin is a novel biomarker for lung adenocarcinoma in humans, PLoS One 9, e111398.
  152. Hempen, P. M., Zhang, L., Bansal, R. K., Iacobuzio-Donahue, C. A., Murphy, K. M., Maitra, A., Vogelstein, B., Whitehead, R. H., Markowitz, S. D., Willson, J. K., Yeo, C. J., Hruban, R. H., and Kern, S. E. (2003) Evidence of selection for clones having genetic inactivation of the activin A type II receptor (ACVR2) gene in gastrointestinal cancers, Cancer Res 63, 994-999.
  153. Kang, H. Y., Huang, H. Y., Hsieh, C. Y., Li, C. F., Shyr, C. R., Tsai, M. Y., Chang, C., Chuang, Y. C., and Huang, K. E. (2009) Activin A enhances prostate cancer cell migration through activation of androgen receptor and is overexpressed in metastatic prostate cancer, J Bone Miner Res 24, 1180-1193.
  154. Do, T. V., Kubba, L. A., Antenos, M., Rademaker, A. W., Sturgis, C. D., and Woodruff, T. K. (2008) The role of activin A and Akt/GSK signaling in ovarian tumor biology, Endocrinology 149, 3809-3816.
  155. Grusch, M., Drucker, C., Peter-Vorosmarty, B., Erlach, N., Lackner, A., Losert, A., Macheiner, D., Schneider, W. J., Hermann, M., Groome, N. P., Parzefall, W., Berger, W., Grasl-Kraupp, B., and Schulte-Hermann, R. (2006) Deregulation of the activin/follistatin system in hepatocarcinogenesis, J Hepatol 45, 673-680.
  156. Seder, C. W., Hartojo, W., Lin, L., Silvers, A. L., Wang, Z., Thomas, D. G., Giordano, T. J., Chen, G., Chang, A. C., Orringer, M. B., and Beer, D. G. (2009) INHBA overexpression promotes cell proliferation and may be epigenetically regulated in esophageal adenocarcinoma, J Thorac Oncol 4, 455-462.
  157. Stove, C., Vanrobaeys, F., Devreese, B., Van Beeumen, J., Mareel, M., and Bracke, M. (2004) Melanoma cells secrete follistatin, an antagonist of activin-mediated growth inhibition, Oncogene 23, 5330-5339.
  158. Yoshinaga, K., Yamashita, K., Mimori, K., Tanaka, F., Inoue, H., and Mori, M. (2008) Activin a causes cancer cell aggressiveness in esophageal squamous cell carcinoma cells, Annals of surgical oncology 15, 96-103.

159. Bufalino, A., Cervigne, N. K., de Oliveira, C. E., Fonseca, F. P., Rodrigues, P. C., Macedo, C. C., Sobral, L. M., Miguel, M. C., Lopes, M. A., Paes Leme, A. F., Lambert, D. W., Salo, T. A., Kowalski, L. P., Graner, E., and Coletta, R. D. (2015) Low miR-143/miR-145 Cluster Levels Induce Activin A Overexpression in Oral Squamous Cell Carcinomas, Which Contributes to Poor Prognosis, *PLoS One* 10, e0136599.
160. Kelner, N., Rodrigues, P. C., Bufalino, A., Fonseca, F. P., Santos-Silva, A. R., Miguel, M. C., Pinto, C. A., Leme, A. F., Graner, E., Salo, T., Kowalski, L. P., and Coletta, R. D. (2015) Activin A immunoexpression as predictor of occult lymph node metastasis and overall survival in oral tongue squamous cell carcinoma, *Head & neck* 37, 479-486.
161. Taylor, C., Loomans, H. A., Le Bras, G. F., Koumangoye, R. B., Romero-Morales, A. I., Quast, L. L., Zaika, A. I., El-Rifai, W., Andl, T., and Andl, C. D. (2015) Activin a signaling regulates cell invasion and proliferation in esophageal adenocarcinoma, *Oncotarget* 6, 34228-34244.
162. Hoda, M. A., Munzker, J., Ghanim, B., Schelch, K., Klikovits, T., Laszlo, V., Sahin, E., Bedeir, A., Lackner, A., Dome, B., Setinek, U., Filipits, M., Eisenbauer, M., Kenessey, I., Torok, S., Garay, T., Hegedus, B., Catania, A., Taghavi, S., Klepetko, W., Berger, W., and Grusch, M. (2012) Suppression of activin A signals inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells, *British journal of cancer* 107, 1978-1986.
163. Tumminello, F. M., Badalamenti, G., Fulfaro, F., Incorvaia, L., Crescimanno, M., Flandina, C., Sepporta, M. V., and Leto, G. (2010) Serum follistatin in patients with prostate cancer metastatic to the bone, *Clinical & experimental metastasis* 27, 549-555.
164. Yamamura, S., Matsumura, N., Mandai, M., Huang, Z., Oura, T., Baba, T., Hamanishi, J., Yamaguchi, K., Kang, H. S., Okamoto, T., Abiko, K., Mori, S., Murphy, S. K., and Konishi, I. (2012) The activated transforming growth factor-beta signaling pathway in peritoneal metastases is a potential therapeutic target in ovarian cancer, *Int J Cancer* 130, 20-28.

165. Taniguchi, Y., Kawano, K., Minowa, T., Sugino, T., Shimojo, Y., and Maitani, Y. (2010) Enhanced antitumor efficacy of folate-linked liposomal doxorubicin with TGF-beta type I receptor inhibitor, *Cancer Sci* 101, 2207-2213.
166. Tojo, M., Hamashima, Y., Hanyu, A., Kajimoto, T., Saitoh, M., Miyazono, K., Node, M., and Imamura, T. (2005) The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta, *Cancer Sci* 96, 791-800.
167. Halder, S. K., Beauchamp, R. D., and Datta, P. K. (2005) A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers, *Neoplasia* 7, 509-521.
168. Matsuyama, S., Iwadate, M., Kondo, M., Saitoh, M., Hanyu, A., Shimizu, K., Aburatani, H., Mishima, H. K., Imamura, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2003) SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor-beta-induced proliferation of human osteosarcoma cells, *Cancer Res* 63, 7791-7798.
169. Duan, W., Li, R., Ma, J., Lei, J., Xu, Q., Jiang, Z., Nan, L., Li, X., Wang, Z., Huo, X., Han, L., Wu, Z., Wu, E., and Ma, Q. (2015) Overexpression of Nodal induces a metastatic phenotype in pancreatic cancer cells via the Smad2/3 pathway, *Oncotarget* 6, 1490-1506.
170. Fields, S. Z., Parshad, S., Anne, M., Raftopoulos, H., Alexander, M. J., Sherman, M. L., Laadem, A., Sung, V., and Terpos, E. (2013) Activin receptor antagonists for cancer-related anemia and bone disease, *Expert Opin Investig Drugs* 22, 87-101.
171. Lightfoot, A. P., McCormick, R., Nye, G. A., and McArdle, A. (2014) Mechanisms of skeletal muscle ageing; avenues for therapeutic intervention, *Curr Opin Pharmacol* 16, 116-121.
172. Ma, J. D., Heavey, S. F., Revta, C., and Roeland, E. J. (2014) Novel investigational biologics for the treatment of cancer cachexia, *Expert Opin Biol Ther* 14, 1113-1120.
173. Reis, F. M., Cobellis, L., Tameirao, L. C., Anania, G., Luisi, S., Silva, I. S., Gioffre, W., Di Blasio, A. M., and Petraglia, F. (2002) Serum and tissue expression of activin a in postmenopausal women with breast cancer, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87, 2277-2282.



174. Petraglia, F., Florio, P., Luisi, S., Gallo, R., Gadducci, A., Vigano, P., Di Blasio, A. M., Genazzani, A. R., and Vale, W. (1998) Expression and secretion of inhibin and activin in normal and neoplastic uterine tissues. High levels of serum activin A in women with endometrial and cervical carcinoma, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83, 1194-1200.
175. Sobral, L. M., Bufalino, A., Lopes, M. A., Graner, E., Salo, T., and Coletta, R. D. (2011) Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A, *Oral oncology* 47, 840-846.
176. Chen, Y., Wu, H., Winnall, W. R., Loveland, K. L., Makanji, Y., Phillips, D. J., Smith, J. A., and Hedger, M. P. (2011) Tumour necrosis factor-alpha stimulates human neutrophils to release preformed activin A, *Immunology and cell biology* 89, 889-896.
177. Walton, K. L., Makanji, Y., and Harrison, C. A. (2012) New insights into the mechanisms of activin action and inhibition, *Mol Cell Endocrinol* 359, 2-12.
178. Bertalanffy, P., Dubsky, P., Wolner, E., and Weigel, G. (1999) Alterations of endothelial nucleotide levels by mycophenolic acid result in changes of membrane glycosylation and E-selectin expression, *Clin Chem Lab Med* 37, 259-264.
179. Kirschner, M. B., Pulford, E., Hoda, M. A., Rozsas, A., Griggs, K., Cheng, Y. Y., Edelman, J. J., Kao, S. C., Hyland, R., Dong, Y., Laszlo, V., Klikovits, T., Vallely, M. P., Grusch, M., Hegedus, B., Dome, B., Klepetko, W., van Zandwijk, N., Klebe, S., and Reid, G. (2015) Fibulin-3 levels in malignant pleural mesothelioma are associated with prognosis but not diagnosis, *British journal of cancer* 113, 963-969.
180. Dome, B., Paku, S., Somlai, B., and Timar, J. (2002) Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance, *J Pathol* 197, 355-362.
181. Dome, B., Timar, J., and Paku, S. (2003) A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases, *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 655-661.

182. Dezsó, K., Bugyik, E., Papp, V., Laszlo, V., Dome, B., Tóvári, J., Timár, J., Nagy, P., and Paku, S. (2009) Development of arterial blood supply in experimental liver metastases, *Am J Pathol* 175, 835-843.
183. Bugyik, E., Dezsó, K., Reiniger, L., Laszlo, V., Tóvári, J., Timár, J., Nagy, P., Klepetko, W., Dome, B., and Paku, S. (2011) Lack of angiogenesis in experimental brain metastases, *J Neuropathol Exp Neurol* 70, 979-991.
184. July, L. V., Beraldi, E., So, A., Fazli, L., Evans, K., English, J. C., and Gleave, M. E. (2004) Nucleotide-based therapies targeting clusterin chemosensitize human lung adenocarcinoma cells both in vitro and in vivo, *Mol Cancer Ther* 3, 223-232.
185. Higgins, B., Kolinsky, K., Smith, M., Beck, G., Rashed, M., Adames, V., Linn, M., Wheeldon, E., Gand, L., Birnboeck, H., and Hoffmann, G. (2004) Antitumor activity of erlotinib (OSI-774, Tarceva) alone or in combination in human non-small cell lung cancer tumor xenograft models, *Anticancer Drugs* 15, 503-512.
186. Wu, Y., Yang, L., Hu, B., Liu, J. Y., Su, J. M., Luo, Y., Ding, Z. Y., Niu, T., Li, Q., Xie, X. J., Wen, Y. J., Tian, L., Kan, B., Mao, Y. Q., and Wei, Y. Q. (2005) Synergistic anti-tumor effect of recombinant human endostatin adenovirus combined with gemcitabine, *Anticancer Drugs* 16, 551-557.
187. Belozero, V. E., and Van Meir, E. G. (2005) Hypoxia inducible factor-1: a novel target for cancer therapy, *Anticancer Drugs* 16, 901-909.
188. Elliott, S., Busse, L., McCaffery, I., Rossi, J., Sinclair, A., Spahr, C., Swift, S., and Begley, C. G. (2010) Identification of a sensitive anti-erythropoietin receptor monoclonal antibody allows detection of low levels of EpoR in cells, *J Immunol Methods* 352, 126-139.
189. Planque, C., Kulasingam, V., Smith, C. R., Reckamp, K., Goodglick, L., and Diamandis, E. P. (2009) Identification of five candidate lung cancer biomarkers by proteomics analysis of conditioned media of four lung cancer cell lines, *Molecular & cellular proteomics : MCP* 8, 2746-2758.
190. Iemura, S., Yamamoto, T. S., Takagi, C., Uchiyama, H., Natsume, T., Shimasaki, S., Sugino, H., and Ueno, N. (1998) Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and

- epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9337-9342.
191. Gao, X., Hu, H., Zhu, J., and Xu, Z. (2007) Identification and characterization of follistatin as a novel angiogenin-binding protein, *FEBS letters* 581, 5505-5510.
  192. Destro, A., Ceresoli, G. L., Baryshnikova, E., Garassino, I., Zucali, P. A., De Vincenzo, F., Bianchi, P., Morengi, E., Testori, A., Alloisio, M., Santoro, A., and Roncalli, M. (2008) Gene methylation in pleural mesothelioma: correlations with clinico-pathological features and patient's follow-up, *Lung Cancer* 59, 369-376.
  193. Wang, Z., Zhang, N., Song, R., Fan, R., Yang, L., and Wu, L. (2015) Activin A expression in esophageal carcinoma and its association with tumor aggressiveness and differentiation, *Oncology letters* 10, 143-148.
  194. Grigoriou, M., Tagett, R., Draghici, S., Dima, S., Nastase, A., Florea, R., Sorop, A., Ilie, V., Bacalbasa, N., Tica, V., Laszlo, V., Mansuet-Lupo, A., Damotte, D., Klepetko, W., Popescu, I., and Regnard, J. F. (2015) Gene-expression Profiling in Non-small Cell Lung Cancer with Invasion of Mediastinal Lymph Nodes for Prognosis Evaluation, *Cancer genomics & proteomics* 12, 231-242.
  195. Heinz, M., Niederleithner, H. L., Puujalka, E., Soler-Cardona, A., Grusch, M., Pehamberger, H., Loewe, R., and Petzelbauer, P. (2015) Activin A is anti-lymphangiogenic in a melanoma mouse model, *The Journal of investigative dermatology* 135, 212-221.
  196. Incorvaia, L., Badalamenti, G., Rini, G., Arcara, C., Fricano, S., Sferrazza, C., Di Trapani, D., Gebbia, N., and Leto, G. (2007) MMP-2, MMP-9 and activin A blood levels in patients with breast cancer or prostate cancer metastatic to the bone, *Anticancer research* 27, 1519-1525.
  197. Leto, G., Incorvaia, L., Badalamenti, G., Tumminello, F. M., Gebbia, N., Flandina, C., Crescimanno, M., and Rini, G. (2006) Activin A circulating levels in patients with bone metastasis from breast or prostate cancer, *Clinical & experimental metastasis* 23, 117-122.
  198. Grusch, M., Petz, M., Metzner, T., Ozturk, D., Schneller, D., and Mikulits, W. (2010) The crosstalk of RAS with the TGF-beta family during carcinoma

progression and its implications for targeted cancer therapy, *Curr Cancer Drug Targets* 10, 849-857.

## 10 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Hoda MA\*, **Rozsas A**\*, Lang E, Klikovits T, Lohinai Z, Torok S, Berta J, Bendek M, Berger W, Hegedus B, Klepetko W, Renyi-Vamos F, Grusch M, Dome B\*\*, Laszlo V\*\*.  
(2016) High circulating activin A level is associated with tumor progression and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 7(12):13388-99.

\*megosztott első szerző, \*\*megosztott utolsó szerző

**Rózsás A**, Berta J, Rojkó L, Horváth LZ, Keszthelyi M, Kenessey I, László V, Berger W, Grusch M, Hoda MA, Török S, Klepetko W, Rényi-Vámos F, Hegedűs B, Döme B, Tóvári J. (2013) Erythropoietin receptor expression is a potential prognostic factor in human lung adenocarcinoma. *PLoS One*, 8(10):e77459.

**Rózsás A**, Ostoros Gy, Hegedűs B, Döme B, Tóvári J. (2013) Az erythropoietin jelátvitel szerepe humán nem-kissejtes tüdőrákban. *Medicina Thoracalis*, 66(1):21-30.

A disszertációtól független közlemények:

Hoda MA, Pirker C, Dong Y, Schelch K, Heffeter P, Kryeziu K, van Schoonhoven S, Klikovits T, Laszlo V, **Rozsas A**, Ozsvar J, Klepetko W, Doeme B, Grusch M, Hegedues B, Berger W. (2016) Trabectedin is active against malignant pleural mesothelioma cell and xenograft models and synergizes with chemotherapy and bcl-2 inhibition in vitro. *Mol Cancer Ther.*, pii: molcanther.0846.2015.

Hoda MA, Dong Y, **Rozsas A**, Klikovits T, Laszlo V, Ghanim B, Stockhammer P, Ozsvar J, Jakopovic M, Samarzija M, Brcic L, Bendek M, Szirtes I, Reid G, Kirschner MB, Kao SC, Opitz I, Weder W, Frauenfelder T, Nguyen-Kim TD, Aigner C, Klepetko W, van Zandwijk N, Berger W, Dome B, Grusch M, Hegedus B. (2016) Circulating activin A is a novel prognostic biomarker in malignant pleural mesothelioma - A multi-institutional study. *Eur J Cancer*, 63:64-73.

Hegedűs B, Moldvay J, Berta J, Lohinai Z, **Rózsás A**, Cserepes MT, Fábíán K, Ostoros G, Tóvári J, Rényi-Vámos F, Tímár J, Döme B. (2015) Excerpts from the collaborative lung cancer research program of Semmelweis University, the National Institute of Oncology and Korányi Institute of TB and Pulmonology (2010-2015)]. *Magy Onkol*, 59(4):282-5.

Kirschner MB, Pulford E, Hoda MA, **Rozsas A**, Griggs K, Cheng YY, Edelman JJ, Kao SC, Hyland R, Dong Y, László V, Klikovits T, Valley MP, Grusch M, Hegedus B, Dome B, Klepetko W, van Zandwijk N, Klebe S, Reid G. (2015) Fibulin-3 levels in malignant pleural mesothelioma are associated with prognosis but not diagnosis. *Br J Cancer*, 113(6):963-9.

Laszlo V, Hoda MA, Garay T, Pirker C, Ghanim B, Klikovits T, Dong YW, **Rozsas A**, Kenessey I, Szirtes I, Grusch M, Jakopovic M, Samarzija M, Brcic L, Kern I, Rozman A, Popper H, Zöchbauer-Müller S, Heller G, Altenberger C, Ziegler B, Klepetko W, Berger W, Dome B, Hegedus B. (2015) Epigenetic down-regulation of integrin  $\alpha 7$  increases migratory potential and confers poor prognosis in malignant pleural mesothelioma. *J Pathol*, 237(2):203-14.

Lohinai Z, Hoda MA, Fabian K, Ostoros G, Raso E, Barbai T, Timar J, Kovalszky I, Cserepes M, **Rozsas A**, Laszlo V, Grusch M, Berger W, Klepetko W, Moldvay J, Dome B, Hegedus B. (2015) Distinct Epidemiology and Clinical Consequence of Classic Versus Rare EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 10(5):738-46.

Garay T, Kenessey I, Molnár E, Juhász É, Réti A, László V, **Rózsás A**, Dobos J, Döme B, Berger W, Klepetko W, Tóvári J, Tímár J, Hegedűs B. (2015) Prenylation inhibition-induced cell death in melanoma: reduced sensitivity in BRAF mutant/PTEN wild-type melanoma cells. *PLoS One*, 10(2):e0117021.

Ghanim B, Klikovits T, Hoda MA, Lang G, Szirtes I, Setinek U, **Rozsas A**, Renyi-Vamos F, Laszlo V, Grusch M, Filipits M, Scheed A, Jakopovic M, Samarzija M, Brcic L, Stancic-Rokotov D, Kern I, Rozman A, Dekan G, Klepetko W, Berger W, Glasz T,

Dome B, Hegedus B. (2015) Ki67 index is an independent prognostic factor in epithelioid but not in non-epithelioid malignant pleural mesothelioma: a multicenter study. *Br J Cancer*, 112(5):783-92.

Torok S, Vegvari A, Rezeli M, Fehniger TE, Tovari J, Paku S, Laszlo V, Hegedus B, **Rozsas A**, Dome B, Marko-Varga G. (2015) Localization of sunitinib, its metabolites and its target receptors in tumour-bearing mice: a MALDI-MS imaging study. *Br J Pharmacol*, 172(4):1148-63.

Berta J, Hoda MA, Laszlo V, **Rozsas A**, Garay T, Torok S, Grusch M, Berger W, Paku S, Renyi-Vamos F, Masri B, Tovari J, Groger M, Klepetko W, Hegedus B, Dome B. (2014) Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncotarget*, 5(12):4426-37.

Cserepes M, Ostoros G, Lohinai Z, Raso E, Barbai T, Timar J, **Rozsas A**, Moldvay J, Kovalszky I, Fabian K, Gyulai M, Ghanim B, Laszlo V, Klikovits T, Hoda MA, Grusch M, Berger W, Klepetko W, Hegedus B, Dome B. (2014) Subtype-specific KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma: a retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy. *Eur J Cancer*, 50(10):1819-28.

Höftberger R, Titulaer MJ, Sabater L, Dome B, **Rózsás A**, Hegedus B, Hoda MA, Laszlo V, Ankersmit HJ, Harms L, Boyero S, de Felipe A, Saiz A, Dalmau J, Graus F. (2013) Encephalitis and GABAB receptor antibodies: novel findings in a new case series of 20 patients. *Neurology*, 81(17):1500-6.

Zimmermann M, Nickl S, Lambers C, Hacker S, Mitterbauer A, Hoetzenecker K, **Rozsas A**, Ostoros G, Laszlo V, Hofbauer H, Renyi-Vamos F, Klepetko W, Dome B, Ankersmit HJ. (2012) Discrimination of clinical stages in non-small cell lung cancer patients by serum HSP27 and HSP70: a multi-institutional case-control study. *Clin Chim Acta*, 413(13-14):1115-20.

Berta J, Kenessey I, Dobos J, Tovari J, Klepetko W, Jan Ankersmit H, Hegedus B, Renyi-Vamos F, Varga J, Lorincz Z, Paku S, Ostoros G, **Rozsas A**, Timar J, Dome B. (2010) Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *J Thorac Oncol*, 5(8):1120-9.



## 11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Döme Balázs és Tóvári József témavezetőimnek sokéves segítségüket és támogatásukat.

Köszönöm az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet, a Bécsi Orvostudományi Egyetem Mellkasebészeti Klinika és Transzlációs Onkológiai Kutatólaboratórium, az Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály valamint a Semmelweis Egyetem Mellkasebészeti Klinika vezetőinek, hogy támogatták munkámat, lehetőséget biztosítva kutatásaim elvégzéséhez.

Külön köszönettel tartozom az OKTPI Tumorbiológiai Osztály, valamint a Transzlációs Onkológiai Kutatólaboratórium minden egyes dolgozójának, hogy munkám során mindig segítségemre voltak.

Köszönöm a Magyar Pulmonológiai Alapítvány, az Osztrák-Magyar Akció Alapítvány és az EACR támogatását.

Végezetül köszönöm férjemnek, családomnak és barátaimnak a kitartást, biztatást és a biztos hátteret.