

Terápiás célpontok preklinikai vizsgálata mellkasi daganatokban

Doktori tézisek

Berta Judit

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Döme Balázs PhD, osztályvezető főorvos
Dr. Hegedűs Balázs PhD, tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Szőke János PhD, osztályvezető főorvos
Dr. Lendvai Gábor PhD, tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Kerényi Tibor PhD, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Moldvay Judit PhD, egyetemi docens
Dr. Czebe Krisztina PhD, osztályvezető főorvos

Budapest

2013

BEVEZETÉS

A tüdőrák világszerte jelentős egészségügyi problémát jelent, az összes daganatos megbetegedés 13%-áért, illetve a daganat okozta halálozások 18%-áért volt felelős 2008-ban. A tüdőrákok körülbelül 15%-a kissejtes tüdőrák (SCLC), nagyobb hányada, 85%-a nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC). Szövettanilag ez utóbbi csoport 3 fő altípusra osztható: a laphámrákra (SCC), az adenocarcinómára (ADC) és a nagysejtes carcinómára (LCC).

A mellkasi daganatok másik típusa a malignus pleurális mesothelioma (MPM), egy rendkívül magas letalitással bíró rosszindulatú megbetegedés. A mellhártya üregének savós hártyával borított rétegét érinti, és a superficiális mesothelialis sejtekből fejlődik. Az MPM szoros kapcsolatban áll az azbeszttel való érintkezéssel, és egyes esetekben 20-40 évig terjedő lappangási periódust mutathat. A diagnózistól számolva azonban az MPM betegek várható medián túlélése mindössze 4-12 hónap.

Az utóbbi években a tumoros megbetegedések, így a mellkasi daganatok esetében is előretörték a célzott terapiák. Ahhoz, hogy megfelelő molekuláris célpontot találjunk, elengedhetetlen a daganatok növekedéséért és beereződéséért felelős molekuláris háttér ismerete. Ezért lényeges a különböző angiogén, lymphangiogén faktorok és onkogén fehérjék alapos tanulmányozása.

Munkánkban a közelmúltban felfedezett angiogén peptid, az apelin molekula lehetséges szerepét vizsgáltuk az NSCLC beereződésében, valamint a nyirokérképződés folyamatában.

Az apelin receptorát 1993-ban azonosították, a ligandot 1998-ban izolálták szarvasmarha gyomor homogenátumból. Az elmúlt években számos tanulmány jelent meg az apelin molekula szerepéről az angiogenesis folyamatában. Az embrionális periódus alatt az APJ expresszió főleg a fejlődő szív és az elsődleges vérerek endotél sejtjeire és endoteliális prekursor sejtjeire korlátozódik. Emellett lényeges a szerepe a béka embrió szabályos vaszkuláris mintázatának kialakulásában is. Az apelin és receptora később is nagymértékben kifejeződik a vérerek falában, különösen az endotél sejtjeiben. Az

apelin serkenti az emberi köldökvéna endotélsejtek és az egér agy mikrovaszkuláris sejtek *in vitro* növekedését, továbbá majom retinában az endotél sejtek migrációját és kapilláriszerű érhálózat formálódását. Fokozza az érképződést *in vivo* csirke chorioallantois membránban és egérben subcutan matrigel plug assay rendszerben. Az apelin/APJ rendszer szerepet játszik a vérér átmérő szabályozásában is.

Az apelin fokozott expressziója megfigyelhető több daganattípusban is. Glioblastoma multiforme esetében az angiogén tumor érhálózatban fokozottan expresszálódik az apelin és ligandja. Az apelint kifejezik invazív duktális vagy lobuláris emlőkarcinóma rosszindulatú tumorsejtjei. Rágcsáló emlőrák és melanóma esetén az apelin nagymértékű kifejeződése serkenti a tumorok beereződését és *in vivo* növekedését. Szájüregi laphámrák sejtek is expresszálják az apelint, és az apelin új prognosztikus faktorként szerepelhet ezen daganattípus esetében. Colon26 rágcsáló adenocarcinóma és Lewis tüdő adenocarcinóma endotél sejtjei is nagymértékben kifejezik az apelin receptorát. A vérerek belső átmérőjének növekedéséről írnak apelin hatására humán PC3 prosztata ráksejtekből és B16 egér melanóma sejtekből fejlődő tumorokban is. Az apelinerg rendszer szerepét NSCLC-ben a mi munkacsoportunk vizsgálta először.

Nemrégiben írták le, hogy az APJ-t kifejezik a humán nyirok endotél sejtek is, és az apelin indukálja ezeknek a sejteknek az *in vitro* endotél cső képzését, migrációját, valamint stabilizálja azokat permeabilitási esszében. *In vivo* az apelin/APJ rendszer aktiválása gátolta az UVB-indukált gyulladást a nyirokerek és vérerek abnormális növekedésének gátlásával. Vagyis az eredmények arra utalnak, hogy az apelin szerepet játszhat a nyirokerek stabilizálásában gyulladással szövetekben. További *in vitro* és *in vivo* kísérleti modellek szükségesek azonban az apelin pontos szerepének tisztázásához mind a fiziológiás, mind a patológiás nyirokér növekedésben.

A továbbiakban egy kismolekulával gátolható onkogén fehérje, az mTOR molekula temsirolimus általi gátlásának lehetőségét tanulmányoztuk malignus pleurális mesotheliomában. Számos tanulmányban írnak mesothelioma sejtek esetében a PI3K/AKT/mTOR útnak a hiperaktivációjáról. Az mTOR közvetítette jelek támogatják a

kemoterápiával szembeni rezisztenciát, így az mTOR gátlása több daganattípus esetében is kemoszenzitizáló aktivitással bír. A rapamycin, és ennek analógjai a temsirolimus és everolimus a mai napig a leginkább vizsgált mTOR gátlók. Több daganatnál is leírták már *in vitro* és *in vivo* ezen kismolekulák tumorelles aktivitását. A temsirolimust és/vagy everolimust a közelmúltban hagyták jóvá a vesesejtes karcinóma és köpenysejtes limfóma kezelésére. NSCLC és MPM esetében is vizsgálták már az mTOR gátlás lehetőségét, azonban ez a terület még további vizsgálatokat igényel.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Az apelin és receptora expressziójának vizsgálata NSCLC-ben.
2. Apelin hatásának vizsgálata az NSCLC-re *in vitro*.
3. Fokozott apelin expresszió hatása NSCLC-re *in vivo*.
4. Humán NSCLC daganatminták apelin expressziójának, beereződésének és klinikai viselkedésének összehasonlító/átfogó vizsgálata.
5. APJ receptor kifejeződésének vizsgálata humán nyirok endotél sejtvonalon.
6. Apelin hatásának vizsgálata a humán nyirok endotél sejtekre *in vitro*.
7. Mesothelioma sejtvonalak szferoidképző kapacitásának jellemzése és mTOR gátlás hatása a szferoidképzésre.

MÓDSZEREK

Beteganyag

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz 94 NSCLC-vel kezelt beteget választottunk ki, akiket nem kezeltek neoadjuváns terápiával. A szövettani diagnózist és az N-stádiumot hematoxylin és eozin-jelölt mintákon határoztuk meg. A molekuláris vizsgálatokhoz 46 NSCLC-vel kezelt beteg sebészi úton frissen eltávolított tumoros és normál tüdőszövetét használtuk.

Sejtvonalak

Viszsgálatainkhoz humán NSCLC és mesothelioma sejtvonalakat használtunk. A humán nyirok endotél sejtek fitymabőr eredetűek voltak, amelyekhez diszpázzal való kezelés, és sejtkaparóval történő eltávolítás után jutottunk hozzá. A sejteket mágneses szeparálással, anti-podoplanin szérummal szelektáltuk. Stabil transzfektáns sejtvonalakat úgy hoztunk létre, hogy kontroll illetve apelin-kódoló pcDNA 3.1 vektorokkal transzfektáltuk az NSCLC sejteket.

Hatóanyagok

In vitro kísérleteinkben az apelin-13, az apelin-36, egy módosított apelin-származék, az F13A, valamint a temsirolimus hatását vizsgáltuk.

Antigénkimutatási módszerek

Immuncitokémiával vizsgáltuk az apelin és receptora kifejeződését humán NSCLC vonalakon és humán nyirok endotél sejteken. ELISA-val mértük a sejtes apelin szekréciót az NSCLC vonalakban. Immunhisztokémiával határoztuk meg az apelin protein expressziót és a mikroér-sűrűséget humán és xenograft tumorokban. Az apelin és receptora expresszióját mRNS szinten reverz transzkripció PCR-rel mértük.

***In vitro* tesztek**

Az NSCLC vonalak proliferációját kolorimetriásan mértük 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) esszével. A humán nyirok endotél sejtek proliferációját BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) analízissel vizsgáltuk. A sejtek szferoidképző kapacitását letapadásmentes közegben, DMEM/Ham's F-12 médiumban vizsgáltuk, amelyet kiegészítettünk bFGF-fel, EGF-fel és B27-tel. A humán nyirok endotél sejtek migrációs képességét videómikroszkópos méréssel tanulmányoztuk. A sejtek endotél csővé formálódását Matrigelen, szérumentes közegben vizsgáltuk. Apoptózis indukciót „in situ cell death detection kit”-tel tanulmányoztuk. Western blot analízishez nátrium-dodecyl szulfát (SDS)-polyacrylamid gélelektroforézist végeztünk a sejtekkel.

***In vivo* vizsgálatok**

Az apelint kifejező, transzfektált NSCLC sejtek növekedését xenograft tumorokban vetettük össze a kontroll vektort expresszáló sejtek növekedésével nude egerekben.

Statisztikai módszerek

A statisztikai analízisek elvégzéséhez a Statistica 8.0 szoftver programot használtuk.

EREDMÉNYEK

Apelin és receptora expressziójának vizsgálata humán NSCLC sejtvonalakban

RT-PCR-rel igazoltuk az apelin expresszióját az NSCLC sejtvonalakban. Immuncitokémiával a citoplazmában tapasztaltunk pozitív immunreakciót mind az apelin, mind a receptora esetében az NSCLC vonalaknál. Az ELISA azt mutatta ki, hogy a sejtvonalak szekretálják az apelint a sejtenyésztió médiumukba.

Az apelin és APJ expresszió összehasonlítása NSCLC vonalak 2D-s és 3D-s tenyészeteiben

A következőkben 8 NSCLC vonalból képeztünk 3-dimenziós szferoidokat, majd kvantitatív valós idejű PCR-rel összevetettük az apelin illetve az APJ relatív expressziós szintjét a sejtvonalak 2D-s és 3D-s tenyészeteiben. Az apelin esetében 8 vonalból 7-nél, az APJ esetében 5-nél a 3D-s tenyészetekben mért apelin illetve APJ relatív expressziós szint többszöröse volt a 2D-s tenyészetekben mért szinteknek.

Apelin mRNS és protein expresszió vizsgálata NSCLC betegek tumoros és normál tüdőszövet mintáiban

46 nem tumoros és tumoros mRNS extraktum pár kvantitatív valós idejű PCR analízise szerint az apelin expressziós szintek a betegek tumoros mintáiban szignifikánsan magasabbak voltak, mint a normál tüdőszövet mintákban.

94 NSCLC-vel kezelt beteg paraffinba ágyazott mintájának immunhisztokémiai jelölése azt mutatta, hogy az apelin a citoplazmában fejeződik ki. Az apelin protein a humán bronchiális mirigyekben és a tumorról határos epitheliumban expresszálódott.

Összehasonlítva az NSCLC mintákban mért apelin mRNS szinteket az immunhisztokémiával detektált protein expressziós szintekkel, szignifikáns korrelációt találtunk.

Exogén apelin kezelés és apelin expressziós vektorral történő transzfekció hatása az NSCLC vonalak növekedésére *in vitro*

Sem az exogén apelin kezelés, sem az apelin expressziós vektorral való transzfekció nem befolyásolta az NSCLC sejtek *in vitro* proliferációját. Ugyanakkor az apelin expressziós vektorral való transzfekció a szekretált apelin szintjének szignifikáns emelkedését eredményezte.

Fokozott apelin expresszió hatása az NSCLC vonalak növekedésére *in vivo*

Az apelint túltermelő sejtekkel beoltott egerekben a tumorok növekedése gyorsabb volt a kontroll vektorral transzfektált sejteket hordozó egerekhez képest. A tumorok morfológiai analízise szerint az apelin-túltermelő tumorokban szignifikánsan nagyobb volt a mikroér-sűrűség, a kontroll tumorokhoz viszonyítva. Ugyanezt tapasztaltuk a tumorkapillárisok kerülete esetében is.

Humán NSCLC daganatminták apelin expressziójának, beereződésének és klinikai viselkedésének összehasonlító vizsgálata

Az apelin koncentráció és a klinikopatológiai változók összehasonlító statisztikai analízisét végeztük el 94 NSCLC-vel kezelt beteg esetében. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a korrall, dohányzással, nemmel, tumor stádiummal (T), nyirokcsomó stádiummal (N) vagy szövettani típussal. Ugyanakkor a magas apelin expresszió szignifikánsan gyakrabban párosult nagy érdenzitással. További vizsgálatainkban, a magas apelin expresszáló tumorokban a vérkapillárisok átlagos száma szignifikánsan nagyobb lett az alacsony expressziójú tumorokhoz képest. Habár a mikroerek kerülete is nagyobb volt a magas apelin expressziójú tumorok esetében, az eltérés nem bizonyult szignifikánsnak.

A megnövekedett apelin protein expresszió prognosztikus jelentősége

A betegek túlélési ideje, alacsony apelin expresszióval szignifikánsan hosszabbnak bizonyult a magas apelin expresszáló kategóriába sorolt betegekhez képest. A standard prognosztikus paraméterek (tumor kiterjedés, nyirokcsomó stádium és életkor) multivariációs analízise szerint, az apelin expresszió által prediktált kimenetel független a többi változótól.

Az APJ receptor kifejeződésének vizsgálata humán nyirok endotél sejtvonalon

A vizsgált humán nyirok endotél sejtvonalunk mRNS szinten kifejezte az APJ receptort. Az immuncitokémiai jelölés a citoplazmában mutatott pozitív APJ immunreakciót.

Apelin hatásának vizsgálata a humán nyirok endotél sejtekre *in vitro*

Exogén apelin kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a sejtek proliferációját *in vitro*, ugyanakkor a sejtek 3D-s tenyészeiben 10^{-6} M-os koncentrációban a szferoidok számát szignifikánsan növelte, bár átmérőjüket nem befolyásolta. Az exogén apelin-13 kezelés a sejtek migrációját dóziszfüggően serkentette a kontroll, kezeletlen sejtekhez képest. Az F13A önmagában kismértékben fokozta a sejtek migrációs képességét, az apelin-13-mal 1:1 arányban adva, ugyanakkor ez utóbbi szignifikáns serkentő hatását jelentős mértékben lecsökkentette. Endotél cső esszében az apelin-13 és az F13A kezelés is szignifikánsan növelte a formálódó csövek átlagos hosszát a kontroll, kezeletlen sejtekhez képest. Apoptózis esszében az UV sugárzás apoptózis indukáló hatását az exogén apelin kezelés szignifikánsan csökkentette. Western blot analízissel az apelin-13 kezelés serkentette az Erk1/2 és Akt molekulák aktivitását, az aktiváció csúcsát mindkét molekula esetében 15 percnél tapasztaltuk.

Mesothelioma sejtvonalak szferoidképző kapacitásának jellemzése és az mTOR gátlás hatása a szferoidképzésre

A következőkben 15 mesothelioma sejtvonal szferoidképző tulajdonságát vizsgáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy a 15 vonalból 6 sejtvonal képezett egyértelmű határozott szerkezetű, gömbszerű szferoidokat. Ez utóbbi vonalak közül két sejtvonal (SPC 111 és SPC 212) 3D-s tenyészetében vizsgáltuk az mTOR molekula temsirolimusszal való gátlásának hatását. A temsirolimus kezelés az MPM szferoid integritásra már 4 nap után negatív hatást gyakorolt, és szignifikánsan csökkentette a szferoidok számát és átlagos átmérőjét is.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. A vizsgált NSCLC vonalak expresszálták az apelint, ugyanakkor proliferációjukat nem befolyásolta az exogén apelin kezelés, illetve az apelin kódoló vektorral történő transzfekció.
2. Az apelint kifejező transzfektált sejtek subcutan tumorai szignifikánsan gyorsabban nőttek *in vivo*, és az intratumorális erek száma és átmérője is szignifikánsan nagyobb volt a kontroll tumorokhoz képest.
3. Humán NSCLC mintákban szignifikánsan megnőtt az apelin expressziójának mértéke a normál tüdőszövethez képest. A magas apelin-expresszió megnövekedett érdenzitással és rosszabb túléléssel párosult.
4. Eredményeink azt mutatják, hogy az apelin egy új angiogén faktor humán NSCLC-ben. Elsőként mutattunk ki kapcsolatot az apelin expresszió és egy humán daganattípus klinikai viselkedése között.
5. Humán nyirok endotél sejtek kifejezték az apelin receptorát. Exogén apelinnel történő kezelés nem befolyásolta a sejtek proliferációját *in vitro*, ugyanakkor szignifikánsan növelte migrációjukat, endotél cső esszében a képződő csövek átlagos hosszát, a sejtek 3D-s tenyészetében a szferoidok számát és szignifikánsan csökkentette az UV-besugárzás apoptózis indukáló hatását. Az exogén apelin kezelés aktiválta az Erk és a PI3K/Akt jelátviteli útvonalakat a nyirok endotél sejtekben. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az apelin lymphangiogén tulajdonsággal is rendelkezik.
6. Az MPM sejtvonalak 3D-s tenyészeiben az mTOR molekula temsirolimus-szal történő gátlása szignifikánsan csökkentette a szferoidok számát és átmérőjét, vagyis a temsirolimus kezelésnek hatása lehet az MPM sejtvonalak tumor iniciáló sejt kompartmentjére. Elsőként írtuk le, hogy az mTOR gátlás határozottan gyengíti humán MPM tumorok növekedését SCID egerekben, így az mTOR gátlás ígéretes új terápiás stratégia lehet MPM esetében.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. **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. Apelin expression in human non-small cell lung cancer: Role in angiogenesis and prognosis. *J Thorac Oncol.* 2010 Aug;5(8):1120-9. IF: 3.661
2. Hoda MA, Mohamed A, Ghanim B, Filipits M, Hegedus B, Tamura M, **Berta J**, Kubista B, Dome B, Grusch M, Setinek U, Micksche M, Klepetko W, Berger W. Temsirolimus Inhibits Malignant Pleural Mesothelioma Growth *in vitro* and *in vivo*: Synergism with Chemotherapy. *J Thorac Oncol.* 2011 May;6(5):852-63. IF: 4.040

Disszertációtól független közlemények:

1. Kenessey I, Keszthelyi M, Krámer Z, **Berta J**, Adám A, Dobos J, Mildner M, Flachner B, Cseh S, Barna G, Szokol B, Orfi L, Kéri G, Döme B, Klepetko W, Tímár J, Tóvári J. Inhibition of c-Met with the specific small molecule tyrosine kinase inhibitor SU11274 decreases growth and metastasis formation of experimental human melanoma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010 May;10(3):332-42. IF: 4.771
2. Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, **Berta J**, Milch H, Füzi M. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother.* 2008 Nov;62(5):978-85. IF: 4.328

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Dr. Döme Balázsnak és Dr. Hegedűs Balázsnak, hogy munkámat mindvégig figyelemmel kísérték.

Köszönetet mondok támogatásáért az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet volt vezetőjének, Dr. Strausz Jánosnak, és jelenlegi vezetőjének, Dr. Kovács Gábornak. Köszönöm Dr. Barta Imre értekezésemmel kapcsolatban adott tanácsait. Hálás vagyok a támogatásért Dr. Ostoros Gyulának és Dr. Bogos Krisztinának.

Köszönöm az OKTPI Tumorbiológiai Osztály valamennyi munkatársának: Keszthelyi Magdolnának, Rózsás Anitának, Török Szilviának, Cserepes T. Mihálynak és Albitz Piroskának, valamint az Országos Onkológiai Intézet munkatársainak: Dr. Tóvári Józsefnek, Dr. Ladányi Andreának, Dr. Dobos Juditnak, Parragné Derecskei Katalinnak és Sinka Andrásnének, hogy mindig segítségemre voltak. Köszönöm a támogatását a Semmelweis Egyetem, II. számú Patológiai Intézet vezetőjének, Prof. Tímár Józsefnek. Köszönöm a segítségét a II. sz. Patológiai Intézet munkatársainak, Dr. Kenessey Istvánnak és Garay Tamásnak.

Köszönetet mondok a Bécsi Orvostudományi Egyetem Mellkassebészeti Klinika vezetőjének, Prof. Walter Klepetkonak és a Rákkutató Intézet vezetőjének, Prof. Walter Bergernek, hogy kutató laboratóriumukban lehetőséget adtak kísérleteim elvégzésére. Szeretném megköszönni az Ernst Mach grant, az EACR ösztöndíj, valamint a Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj adományozóinak osztrák tanulmányutam anyagi támogatását. Valamint köszönöm segítő támogatását a bécsi labor munkatársainak: Dr. László Viktóriának, Dr. Thomas Klikovitsnak, Dr. Mir Alireza Hodának, Dr. Bahil Ghanimnak és Andreas Wagnernek.

Végül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak, hogy hosszú éveken át megteremtették a tudományos tevékenységemhez szükséges háttérrel, és mellettem álltak minden probléma leküzdésében.