

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2428.

HÁMORI LILLA

Patobiokémia
című program

Programvezető: Dr. Mandl József, professzor emeritus

Témavezető: Dr. Szakács Gergely, tudományos főmunkatárs

Drog rezisztencia vizsgálata *Brcal*-hiányos egér emlőtumor modellen

Doktori értekezés

Hámori Lilla

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szakács Gergely, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., egyetemi kutató
Dr. Helyes Zsuzsanna, Ph.D., DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina, Ph.D., DSc. egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Papp Gergő, Ph.D., tudományos munkatárs
Dr. Szarka András, Ph.D., habil., DSc., egyetemi tanár

Budapest
2020

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítésjegyzék	5
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. Bevezetés	9
2.2. A rák	11
2.3. Emlőrák	12
2.4. Emlőrák kezelésének lehetőségei	12
2.5. Emlőrák altípusai	13
2.5.1. Növekedési faktor receptorok és hormonreceptorok jelentősége emlőrákok esetében	14
2.5.1.1. Hormon- és célzott terápia	16
2.5.2. Tripla-negatív emlőrák	16
2.5.2.1. Tripla-negatív emlőrák kezelése	17
2.5.3. BRCA1-hez köthető öröklődő emlő- és petefészekrák	17
2.5.3.1. A BRCA1 legfontosabb funkciói	18
2.5.3.2. Hibajavítás, instabil genom, a sejtciklus szabályozása	20
2.5.3.3. P53 szerepe	21
2.5.3.4. BRCA1 mutációt hordozó betegek terápiás lehetőségei	22
2.6. Rezisztencia	22
2.6.1. Epithelialis-mesenchymalis átalakulás (EMT)	24
2.6.1.2. Az EMT átmeneti állapota	27
2.6.2. A tumor mikrokönyezete	28
2.7. Preklinikai modellek a rákkutatásban	30
2.7.1. Genetikailag módosított egérmodellek (GEMM)	32
2.7.1.1. BRCA1 vizsgálatára alkalmas egérmodell	32
2.7.2. In vitro modellek	35
3. Célkitűzések	37
4. Módszerek	38
4.1. Állatkísérletek	38

4.2. Primer tumorsejtek izolálása, fenntartás	39
4.3. Egér mesenchymalis őssejtek izolálása, fenntartása	39
4.4. Genotipizálás	40
4.5. Az MSC-k és a tumorsejtek differenciáltatása, sejtfelszíni marker mintázat vizsgálata	40
4.6. Emlőtumor sejtvonalak	41
4.7. Növekedés és motilitás vizsgálatok	42
4.8. RNS izolálás és RT-PCR	42
4.9. Immuncitokémia	43
4.10. Szekretált faktorok vizsgálata	44
4.11. Teljes genom szekvenálás és adatelemzés	44
4.12. Citotoxicitási tesztek és felhasznált vegyületek	45
4.13. Lentivirális transzdukció	45
4.14. Áramlási citometria	46
4.15. Szérumkoncentráció mérés	46
5. Eredmények	48
5.1. Pegilált liposzómális doxorubicin (PLD) terápiás hatásának vizsgálata <i>Brcal^{-/-}; p53^{-/-}</i> egér emlőtumor modellen	48
5.2. Rezisztencia vizsgálata <i>Brcal^{-/-}; p53^{-/-}</i> egér emlőtumor sejtvonalon	53
5.2.1. <i>Brcal^{-/-}; p53^{-/-}</i> egér emlőtumor sejtek és egér csontvelői mesenchymalis őssejtek izolálása	55
5.2.2. Az izolált egér csontvelői mesenchymalis őssejtek jellemzése	56
5.2.3. <i>Brcal^{-/-}; p53^{-/-}</i> egér emlőtumorból stabil sejtvonalt (CST) létrehozása	57
5.2.4. A CST sejtek genetikai hátterének igazolása	58
5.2.5. A létrehozott <i>Brcal^{-/-}; p53^{-/-}</i> (CST) sejtvonalt karakterizálása	58
5.2.5.1. A CST sejtek a tumorsejtekre jellemzően gyorsan osztódnak	59
5.2.5.2. A CST sejteket fokozott motilitás jellemzi	59
5.2.5.3. A CST sejtvonalt genomjában nagyszámú kettős szálú DNS törés mutatható ki	60

5.2.6. A CST sejt vonal instabil genommal rendelkezik és BRCA1-hiányos sejtekre jellemző mutációs mintázatot mutat -----	62
5.2.7. A CST sejtek drog érzékenysége a Brca1-hiányos sejtekéhez hasonló -----	63
5.2.8. A CST sejtek tumorképző potenciáljának vizsgálata -----	64
5.2.9. A CST sejtekből kialakuló tumorok ciszplatin kezelés hatására rezisztenssé válnak -----	65
5.3. Az EMT-MET vizsgálata a létrehozott CST sejt vonalon -----	68
5.3.1. A CST sejtek mesenchymalis markereket expresszálnak -----	68
5.3.2. A CST sejtek differenciációs képességgel rendelkeznek -----	71
5.3.3. A CST sejtek képesek mesenchymalis-epithelialis átalakulásra -----	73
5.4. <i>Brca1^{-/-}, p53^{-/-} tumorok genetikai módosítása CST sejt vonal lentivirális transzdukciója révén</i> -----	76
5.4.1. Fluoreszcens fehérjét expresszáló CST sejtek létrehozása és karakterizálása --	76
5.4.2. A CST-mCherry sejtek megtartották tumorképző potenciáljukat -----	78
5.4.3. A CST-mCherry sejtek megőrizték drog érzékenységüket, így a modell alkalmas a ciszplatin kezelés hatására bekövetkező, az mCherry ⁺ tumorsejtek és a mikrokörnyezet kölcsönhatását érintő, változások tanulmányozására -----	78
6. Megbeszélés -----	83
7. Következtetés -----	91
8. Összefoglalás -----	92
9. Summary -----	93
10. Irodalomjegyzék -----	94
11. Saját publikációk jegyzéke -----	116
11.1. <i>A disszertációhoz kapcsolódó közlemények</i> -----	116
11.2. <i>A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények</i> -----	116
12. Köszönetnyilvánítás -----	117

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

<i>RÖVIDÍTÉS</i>	<i>MAGYAR</i>	<i>ANGOL</i>
<i>ATM</i>	<i>ataxia telangectasia mutáns</i>	<i>ataxia telangectasia mutated</i>
<i>ATR</i>	<i>ataxia telangiectasia and Rad3-mal összefüggő</i>	<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related</i>
<i>BCSC</i>	<i>emlőrák őssejt</i>	<i>breast cancer stem cell</i>
<i>BRCA</i>	<i>emlőrákra hajlamosító gén</i>	<i>breast cancer susceptibility gene</i>
<i>BRCT</i>	<i>BRCA1 C-terminális</i>	<i>BRCA1 C-terminal</i>
<i>BSA</i>	<i>borjú szérum albumin</i>	<i>bovine serum albumine</i>
<i>CDK</i>	<i>ciklin-függő kináz</i>	<i>cyclin-dependent kinase</i>
<i>CK</i>	<i>citokeratin</i>	<i>cytokeratin</i>
<i>COSMIC</i>	<i>rákra jellemző szomatikus mutációk katalógusa</i>	<i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
<i>CSC</i>	<i>rák őssejt</i>	<i>cancer stem cell</i>
<i>ECM</i>	<i>extracelluláris mátrix</i>	<i>extracellular matrix</i>
<i>EGF</i>	<i>epidermális növekedési faktor</i>	<i>epidermal growth factor</i>
<i>EGFR</i>	<i>epidermális növekedési faktor receptor</i>	<i>epidermal growth factor receptor</i>

<i>EMR1 (=F4/80)</i>	<i>EGF-szerű modult tartalmazó mucinszerű hormon receptor-szerű 1</i>	<i>EGF-like containing hormone receptor-like 1</i>
<i>EMT</i>	<i>epithelialis-mesenchymalis átalakulás</i>	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
<i>ER</i>	<i>ösztrogén receptor</i>	<i>estrogen receptor</i>
<i>FBS</i>	<i>magzati borjú szérum</i>	<i>fetal bovine serum</i>
<i>FGF</i>	<i>fibroblaszt növekedési faktor</i>	<i>fibroblast growth factor</i>
<i>FOXC2</i>	<i>forkhead box fehérje</i>	<i>forkhead box protein</i>
<i>GEMM</i>	<i>genetikailag módosított egér modell</i>	<i>genetically engineered mouse model</i>
<i>GEM</i>	<i>genetikailag módosított modell</i>	<i>genetically engineered model</i>
<i>GFP</i>	<i>zöld fluoreszcens fehérje</i>	<i>green fluorescent protein</i>
<i>G-CSF</i>	<i>granulocita kolónia stimuláló faktor</i>	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
<i>HER2</i>	<i>epidermális növekedési faktor receptor2</i>	<i>epidermal growth factor receptor 2</i>
<i>HGF</i>	<i>hepatocita növekedési faktor</i>	<i>hepatocyte growth factor</i>
<i>HR</i>	<i>homológ rekombináció</i>	<i>homologous recombination</i>

<i>IDC-NOS/NST</i>	<i>invazív duktális karcinóma - máshogy nem osztályozható/nincs specifikus típusa</i>	<i>Invasive ductal carcinoma - not otherwise specified/ no special type</i>
<i>IGF</i>	<i>inzulin-szerű növekedési faktor</i>	<i>insulin-like growth factor</i>
<i>KO</i>	<i>gén kiütött</i>	<i>knockout</i>
<i>MAPK</i>	<i>mitogén-aktivált protein kináz</i>	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
<i>MET</i>	<i>mesenchymalis-epithelialis átalakulás</i>	<i>mesenchymal-epithelial transition</i>
<i>MMP</i>	<i>mátrix metalloproteáz</i>	<i>matrix metalloproteinase</i>
<i>MSC</i>	<i>mesenchymalis őssejt</i>	<i>mesenchymal stem cell</i>
<i>MTD</i>	<i>maximálisan tolerálható dózis</i>	<i>maximum tolerated dose</i>
<i>NHEJ</i>	<i>nem-homológ végegyesítés</i>	<i>non-homologous end joining</i>
<i>NER</i>	<i>nucleotid excíziós javítás</i>	<i>nucleotide excision repair</i>
<i>NLS</i>	<i>nukleáris lokalizációs szignál</i>	<i>nuclear localization signal</i>
<i>PARP</i>	<i>poli (ADP-ribóz) polimeráz</i>	<i>poly (ADP-ribose) polymerase</i>
<i>PDGFR (=CD140A)</i>	<i>vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor</i>	<i>platelet-derived growth factor</i>
<i>PDX</i>	<i>betegből származó xenograft</i>	<i>patient-derived xenograft</i>

<i>PLD</i>	<i>pegilált liposzómális doxorubicin</i>	<i>pegylated liposomal doxorubicin</i>
<i>PR</i>	<i>progeszteron receptor</i>	<i>progesterone receptor</i>
<i>PGP</i> (=MDR1, ABCB1)	<i>P-glikoprotein</i>	<i>P-glycoprotein</i>
<i>PI3K</i>	<i>fosztatidil-inozitol-3-kináz</i>	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
<i>SCA-1</i> (=LY6A)	<i>őssejt antigén 1</i>	<i>stem cell antigen-1</i>
<i>SNV</i>	<i>egyedi nukleotid variáns</i>	<i>single-nucleotide variant</i>
<i>TAF</i>	<i>tumor-asszociált fibroblaszt</i>	<i>tumor-associated fibroblast</i>
<i>TGF-B</i>	<i>transzformáló-növekedési faktor-béta</i>	<i>transforming growth factor beta</i>
<i>TNBC</i>	<i>tripla negatív emlőrák</i>	<i>triple negative breast cancer</i>
<i>TNF-A</i>	<i>Tumor nekrosis faktor-α</i>	<i>tumor necrosis factor-α</i>
<i>VEGF</i>	<i>vaszkuláris endotél növekedési faktor</i>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<i>VEGFR2</i> (=FLK1)	<i>vaszkuláris endotél növekedési faktor receptor 2</i>	<i>vascular endothelial growth factor-2</i>
<i>ZO-1</i>	<i>zona occludens protein 1</i>	<i>zona occludens protein 1</i>

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Bevezetés

Napjainkban a rák a második vezető halálozási ok a világon. 2018-ban a WHO adatai alapján 9.6 millió ember halálát okozta, a világon tehát minden hatodik ember valamilyen rákos megbetegedés következtében vesztette életét. Míg a tüdőrák mindkét nemet egyaránt érintő ráktípus, mely 2018-ban több, mint 2 millió ember életét követelte, addig nők esetében az emlődaganat a leggyakrabban előforduló típus [1].

Az emlőrák incidenciája évről évre növekszik, a szűrővizsgálatoknak és az új célzott terápiáknak köszönhetően a mortalitás viszont csökken. A hormonterápia és a célzott terápiák alkalmazása azokban az esetekben lehetséges, amelyekben az emlőtumor valamilyen specifikusan célozható markert expresszál, például ösztrogén- és/vagy progeszteron receptort vagy humán epidermális növekedési faktor receptor 2-t (HER2). A kialakuló emlődaganatok egy része azonban a tripla-negatív emlőrákok (TNBC) altípusába tartozik, melyek nem expresszálnak specifikus markereket, így ezekben az esetekben csak hagyományos kemoterápia alkalmazható, amelyre azonban az esetek többségében a terápia során rezisztencia alakul ki. A TNBC tumorok egy részében továbbá olyan, DNS hibajavító mechanizmusokban szerepet játszó gének mutációja is kimutatható, mint a *BRCA*.

A *BRCA1* és *BRCA2* gének csíravonalbeli hibájához köthető az öröklődő emlő- és petefészek rák kialakulása, a *BRCA* mutációt hordozó nőknél annak valószínűsége, hogy 80 éves korukig emlődaganat alakuljon ki, 80%. A kialakuló *BRCA1* deficiens emlődaganatokra agresszív fenotípus és rossz prognózis jellemző, kezelésük során platinavegyületekkel, illetve néhány éve PARP inhibitorokkal sikerek érhetőek el, azonban a gyógyulás esélyeit, a hagyományos kemoterápiához hasonlóan, rontja a terápia során kialakuló rezisztencia. A tumorsejtek citotoxikus szerekekkel szembeni ellenálló képessége, rezisztenciája mögött különböző molekuláris mechanizmusok állhatnak. A rezisztencia mellett a rákkezelés másik nagy problémája az áttétek kialakulása. A rákos megbetegedések miatt bekövetkező halálesetek ~90%-át áttétek (metasztázisok) kialakulása okozza.

Mind az áttétképzésben és a drog rezisztenciában jelentős folyamatok az epithelialis-mesenchymalis (EMT) és a mesenchymalis-epithelialis átalakulás (MET) [2, 3]. Az EMT

során a sejtek elveszítik hámsejtekre jellemző tulajdonságaikat, morfológiájuk, polaritásuk, motilitásuk is megváltozik és mesenchymalis sejtekre jellemző tulajdonságokra tesznek szert [4-6]. A tumorsejtek tehát számos olyan molekuláris változáson mennek keresztül, melyek lehetővé teszik többek között a folyamatos osztódást, a sejthalál elkerülése révén a túlélést, illetve EMT-MET révén az áttétképzéshez szükséges invazív fenotípus kialakítását. Ezeknek a molekuláris változásoknak a megismeréséhez, a tumorsejtek egyedi jellemzőinek felderítéséhez megfelelő *in vitro* modellek alkalmazása jelenti az első lépést. A rák komplexitása miatt, a tumorok kialakulását, a tumorsejtek és a mikrokörnyezet kapcsolatát, illetve a tumor kezelésre adott válaszát azonban állatmodellek alkalmazása révén tudjuk vizsgálni.

Doktori munkám során célom egy olyan modellrendszer megalkotása volt, amely lehetővé teszi a *BRCA1*-deficiens emlőtumor tanulmányozását, a tumorok kialakulásának és a tumor-mikrokörnyezet kapcsolatának vizsgálatát, különös tekintettel a terápia során kialakuló rezisztenciára.

2.2. A rák

A daganatos megbetegedéseket sokszor tévesen a modern kor betegségének tekintjük, holott az első emlőrákról szóló írásos emlék az ókori Egyiptomból származó Edwin Smith-papirusz, amely időszámításunk előtt 3000-ben íródott [7]. A ma is használatban lévő kifejezések szintén az ókorból származnak, Hippokratész a rosszindulatú daganatoknak a *karkinos* elnevezést adta, mert azok morfológiája rákra emlékeztették, később Galen, a jóindulatú elváltozásokra az *onkos* (duzzanat) szót használta [8]. A rák kifejezést ma általánosan használja a köznyelv a rosszindulatú (malignus) daganatokra, orvosi értelemben azonban csak a hám eredetű malignus daganatokat nevezzük karcinómának. A daganatokat, vagy másnéven tumorokat, szaknyelven neoplasiának hívjuk, mely R.A. Willis, brit onkológus definíciója alapján, egy abnormális szövetszaporulat, koordinálatlan növekedési képességgel, mely a kiváltó tényező megszűnése után is tart [9].

A daganatokat korábban kizárólag genetikai betegségként határozták meg, vagyis kialakulásukat sorozatos mutációk létrejöttével magyarázták. Ez az állítás napjainkban is igaz, viszont kiegészítésre szorul, nem hagyhatók figyelmen kívül ugyanis az epigenomban bekövetkező változások sem. A tumor iniciáció és progresszió során, olyan epigenetikai folyamatok zajlanak le, mint például a DNS metiláltságának globális csökkenése, illetve a hiszton módosítások (például acetiláció csökkenése), amelyek együttesen a nukleoszóma átrendeződéshez járulnak hozzá, végső soron pedig tumor specifikus gének csendesítéséhez vezetnek [10]. A genetikai és epigenetikai események tehát nem választhatók el egymástól, amennyiben a rák kialakulását vizsgáljuk.

A neoplasiát alkotó tumorsejtek kialakulása többlépcsős folyamat, amely során az egészséges sejtek proliferációja megváltozik, növekedési kontrollja megszűnik, tumoros sejtté transzformálódnak, epigenetikai, illetve genetikai változás következtében. A DNS-ben történő változások (proto)onkogéneket, tumorszupresszor géneket érintenek.

A tumorsejtek tulajdonságait a 2000-ben megjelenő, *Hallmarks of Cancer* című publikációjában Douglas Hanahan és Robert Weinberg foglalta össze, majd 2011-ben négy további „fémjellel” bővítette a listát [11]. A tumorsejtek legfontosabb tulajdonságai közé

tartozik, hogy képesek fenntartani növekedési és osztódási képességüket, megváltozott anyagcseréjük és az érképződés indukálása révén tápanyagellátásukat biztosítani tudják, immortalizálódnak, gyulladást indukálnak, elkerülik a szervezet védekező mechanizmusait az immunrendszer kijátszása révén, sejtthál gátlása pedig lehetőséget biztosít a mutációk felhalmozásához, mely végsősoron instabil genomhoz vezet.

2.3. Emlőrák

Az emlőrák világszerte a leggyakoribb nőket érintő daganat típus, nyolc nőből egynél élete során kifejlődik emlődaganat. Európa országaiban, köztük Magyarországon is a leggyakrabban előforduló ráktípus nők körében [12], 2018-ban 8215 új beteget diagnosztizáltak emlőrákkal a WHO adatai alapján. Az emlőrák incidenciája évről évre növekszik, a szűrővizsgálatoknak és az új célzott terápiáknak köszönhetően a mortalitás viszont csökken.

Az emlőben kialakuló daganatok heterogenitásából adódóan az egyes emlőrák típusok prognózisa eltérő, így különböző kezelési stratégiák alkalmazása szükséges. A kezelés hatékonyságát növeli a korai stádiumban való felismerés, ekkor az ötéves túlélés lokális és regionális tumor esetében 98.8% és 85.5% míg a késői stádiumú, áttétes emlőrákok esetében 27.4% [13, 14].

2.4. Emlőrák kezelésének lehetőségei

Emlőtumor felismerését követően, a daganat stádiumának megállapítása az első lépés, mely a nyirokcsomók érintettsége és a távoli áttét jelenléte vagy hiánya alapján történik, illetve meg kell határozni az altípust szövettan és molekuláris patológia révén. Emlőkarcinóma kezelésére többnyire a sebészi eltávolítást, a sugárterápiát, a kemoterápiát és amennyiben lehetséges a hormon- és/vagy célzott terápiát együttesen alkalmazzák [14-16]. A tumor sebészi úton történő eltávolítása „in situ” (0. stádium) tumorok esetében lehetséges, amennyiben a daganat mérete és elhelyezkedése ezt lehetővé teszi. A műtétet követően a beteg sugárkezelésben részesül a helyi kiújulás megelőzése céljából, illetve stádium és

szöveti jellemzőktől függően gyógyszeres utókezelés is javasolt lehet [15, 16]. Szintén a tumor mérete és elhelyezkedése miatt szükséges lehet neoadjuváns kemoterápia, amelynek célja a tumor méretének csökkentése a sebészi eltávolítás vagy az emlőkonzerváló sebészi beavatkozás érdekében [15, 16]. Öröklődő emlődaganat esetében olyan magas a betegség kiújulásának az esélye, hogy az emlő megtartása nem javasolt, illetve az ellenoldali emlő megelőző eltávolítását is el kell végezni [15].

Az egész testre ható (szisztémás) gyógyszeres kezelés megválasztásakor legfontosabb szempontok a stádium, illetve szövettani és molekuláris patológia révén az altípus megállapítása.

2.5. Emlőrák altípusai

A kiindulási szövet alapján, a kialakuló rosszindulatú daganat leggyakrabban duktális vagy lobuláris karcinóma. A duktális karcinóma a mirigyek kivezetőcsövének hámból, a lobuláris karcinóma az emlőmirigyek állományából alakul ki. Attól függően, hogy a daganat a kiindulási szöveten belül marad vagy a környező szövetekre is áttérjed, megkülönböztetünk „in situ”, nem-invazív és invazív típusokat. Az emlőrákok 72.5 %-a az úgynevezett invazív duktális karcinóma (IDC) máshogy nem osztályozható (angolul „not otherwise specified” (NOS) vagy „no special type” (NST)) típusába tartozik [13, 14].

A molekuláris jellemzők vizsgálatakor a hormonreceptorok (ER – ösztrogén receptor, PR- progeszteron receptor) és az epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2) jelenlétét, illetve hiányát vizsgálják, figyelembe véve a Ki67 proliferációs markert is. Az imént felsorolt markerek állapota alapján a következő altípusokat különböztetjük meg: Luminális A-szerű (ER-pozitív, HER2-negatív, Ki67 alacsony, PR magas), Luminális B-szerű HER2-negatív (ER-pozitív, HER2-negatív és/vagy Ki67 magas vagy PR alacsony), Luminális B-szerű HER2-pozitív (ER-pozitív, HER2-pozitív, Ki67 bármilyen, PR bármilyen), HER2-pozitív-szerű nem luminális (HER2-pozitív, ER- és PR-negatív) illetve bazális-szerű (tripla-negatív emlőrák (TNBC): ER- és PR-negatív, HER2-negatív) [14, 16, 17]. A receptorok állapota alapján, az emlőrák altípusok prognózisát és szisztémás kezelési lehetőségeit az *1. táblázat* foglalja össze.

1. táblázat Emlőrák altípusok előfordulása, prognózisa és kezelési lehetőségei [14].

	HR⁺, HER2⁻	HER2⁺ (HR⁺ vagy HR⁻)	Tripla-negatív
Előfordulási gyakoriság (%)	70	15-20	15
Prognózis			
I. stádium (5 éves túlélés)	≥99	≥94	≥85
Metasztatikus (átlag teljes túlélés)	4-5 év	5 év	10-13 hónap
Szisztémás kezelés	<ul style="list-style-type: none"> • Endokrin terápia • Kemoterápia (néhány beteg esetében) 	<ul style="list-style-type: none"> • Kemoterápia plusz célzott HER2 terápia • Endokrin terápia (ha HR⁺ is) 	Kemoterápia

2.5.1. Növekedési faktor receptorok és hormonreceptorok jelentősége emlőrákok esetében

A növekedési faktor receptorok és a hormonreceptorok (HR) fontos szerepet játszanak a sejtek osztódásában, növekedésében. Normál sejtek esetében a sejtosztódás szigorúan szabályozott folyamat, a sejtek ciklusba lépéséhez nélkülözhetetlen a mitogén hatást biztosító növekedési faktorok jelenléte, melyek jelátviteli útvonalak közvetítésével aktiválják a ciklus beindításához szükséges géneket (szérumfüggőség). A sejttípusok többsége továbbá csak akkor képes osztódni, ha a sejthártya integrin molekulái közvetítésével kapcsolatot tudnak kialakítani az extracelluláris mátrix (ECM) megfelelő komponenseivel (laminin, fibronectin). A fokális adhéziós kináz (FAK) részt vesz az integrin-mediált jelátviteli útvonalakban, de citokinek és növekedési faktorok is aktiválhatják, így overexpressziója rákos sejtek túléléséhez, proliferációjához és migrációjához vezet [18]. Míg a normál sejtekre jellemző a denzitásfüggő osztódás is, addig a tumorsejtek számos különböző útvonalon keresztül képesek fenntartani osztódási képességüket: növekedési faktorokat termelnek (autokrin), a környező strómasejtek növekedési faktor termelését indukálják (parakrin), termelt növekedési faktorokra válnak hiperérzékennyé a növekedési faktor receptorok számának növelésével, vagy a receptorok

szerkezetében végbemenő változások révén a ligandum jelenlététől függetlenül aktiválódnak.

A növekedési faktor receptorok közé tartozik, az ErbB receptor család, melynek széles körben tanulmányozott tagja az epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2 vagy ErbB2). A HER2 állapota emlőrák esetében diagnosztikai jelentőséggel bír. Ezek, a tirozin-kináz aktivitással rendelkező transzmembrán receptorok aktiválódásuk során, a ligandum kötést követően dimerizálódnak, melyet autofoszforyláció követ, majd a foszforylálódott tirozinokat citoplazmatikus fehérjék ismerik fel, melyek olyan útvonalakat aktiválnak, amelyek a sejtek proliferációját, differenciációját, migrációját és túlélését befolyásolják. HER2 esetében a leggyakrabban aktiválódó útvonalak a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonal, a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K)/Akt és a protein-kináz C (PKC) útvonalak. Emlőrák esetében a HER2 gén amplifikációja és/vagy fehérje túltermelődése gyorsan növekedő, agresszív, áttétképzésre hajlamos tumort eredményez. Az invazív emlőrások 15-20%-a HER2⁺, melyek jellemzően agresszív, rossz prognózisú típusok [19].

Az emlőszövet növekedésének és differenciációjának legfontosabb szabályozói az ösztrogén és a progeszteron [17]. Az ösztrogént megkötni képes ER fokozott expressziója a kialakuló emlődaganatok ~70%-ban kimutatható [17, 20], amely a HER2-höz hasonlóan diagnosztikai szempontból is jelentős, illetve a kezelési stratégia megválasztásához is támpontot nyújt. Az szteroid hormonreceptorok (ER, PR), intracelluláris receptorok, melyek inaktív állapotban hősokk fehérjékhez kötődnek, melyről a ligandum bekötését követően konformációváltozás következtében képesek leválni, dimerizálódni és a sejtmagba transzlokálódni, ahol aztán közvetlenül vagy közvetetten képes a célgénre hatni a célgén promóter régiójában található ösztrogén hormonválasz elemhez (Estrogen Response Element) kötve vagy transzkripciós faktorokon keresztül. Az ER receptornak két altípusát ismerjük, ER α és ER β , emlődaganatok esetében az ER β kevésbé karakterizált. Az ER α hatását ciklin D1, Myc, Bcl-2 és VEGF szabályozásán keresztül fejti ki, jelentős szerepet játszva ezzel a sejtciklus, a sejt túlélése és az érékpeződés stimulálásában [21].

2.5.1.1. *Hormon- és célzott terápia*

HR⁺ és/vagy HER2⁺ emlődaganatok esetében, vagyis amennyiben a tumorsejtek valamilyen specifikus markert expresszálnak, lehetőség van a célzott terápiára.

A hormon- vagy endokrin terápia sikerességét bizonyítja, hogy az I. stádiumú hormon-függő daganatok endokrin terápiával történő kezelése a betegek 5 éves túlélését 99%-a növelte [14]. ER-pozitív mellrák kezelésére alkalmazható endokrin terápia három csoportját különböztetjük meg, ezek a szelektív-ösztrogén receptor módosítók (SERM), szelektív-ösztrogénreceptor downregulátor (SERD) illetve aromatázgátlók. A leggyakrabban alkalmazott SERM a tamoxifen, előrehaladott metasztatikus emlőrák, in situ duktális karcinóma esetében, valamint megelőző terápiaként is alkalmazzák sikeresen.

Annak ellenére, hogy a HER2-t expresszáló tumorok gyorsan növekedő, kedvezőtlen prognózisú tumoroknak számítanak, a célzott terápia révén, anti-HER2 ellenanyagok (trastuzumab, pertuzumab) és kis molekulású tirozin-kináz inhibitorok (lapatinib, neratinib) korai stádiumban való alkalmazása 90% fölé emelte az ötéves túlélést [14]. Magyarországon 2013 óta a trastuzumab neoadjuváns terápia formájában is elérhető. Metasztatikus emlőrák esetén a betegeket antraciklin- és/vagy taxán alapú (paclitaxel/docetaxel) kemoterápiát kapnak trastuzumabbal kombinációban. De novo kialakuló trastuzumab rezisztencia esetén, a T-DM1 hatásosabb kezelőanyag, mely egy monoklonális antitest (trastuzumab) és kis molekulatömegű vegyület (citotoxikus maytanzinoid származék) kombinációja [22, 23], azonban jelenleg Magyarországon nem érhető el támogatott formában, helyette a lapatinib és kapecitabin kombinált terápiát alkalmazzák, amellyel szintén növelhető a betegek teljes túlélése.

2.5.2. *Tripla-negatív emlőrák*

A tripla-negatív emlőtumorok elnevezése, a tumorok immunhisztokémiai jellemzőiből származik, a hormonreceptorok (ER, PR) és a HER2 hiányára utal. A TNBC nem egy betegség, hanem egy immunhisztokémiai állapot, különböző tumorokra jellemző, melyek biológiailag heterogének és a kemoterápiára adott válaszukban is eltérőek, így kezelésük rendkívül nagy kihívást jelent az orvostudomány számára. A tripla-negatív

emlőtumorokat sokszor tévesen a bazális-szerű emlőtumorokkal azonosítják, holott molekuláris elemzések alapján igazolt, hogy ugyan a TNBC-k nagyrésze, 71-91%-a rendelkezik bazális-szerű fenotípussal, de nem minden TNBC bazális-szerű [24]. A bazális-szerű elnevezés arra utal, hogy ezek a tumorok gén expressziójukat tekintve megegyeznek a normál emlőszövet bazális/mioepitheliális sejtjeivel, vagyis bazális citokeratinokat expresszálnak (CK5/6, CK14, CK17), caveolinokat (caveolin 1 és 2), ciklin-D1-t, vimentint és P-cadherint viszont negatívak a hormonreceptorokra és HER2-re [25]. Továbbá a bazális-szerű emlőtumorok 65-80%-a hordoz valamilyen *TP53*-t érintő mutációt (míg a lumináris típusok 26%-ban, HER2-pozitív szerű nem lumináris emlőtumor típus 50%-ban található meg a mutáció) [26, 27].

2.5.2.1. Tripla-negatív emlőrák kezelése

A tripla negatív emlőrakkal diagnosztizált betegek esetében (összes emlőrák 15-20%-a) [14], célzott rákellenes szerek nem alkalmazhatók [28-30]. A rosszindulatú daganatok esetében jellemző a magas osztódási ráta, a kemoterápiás szerek pedig ezekre a gyorsan osztódó sejtekre hatnak. Az emlőrák kezelésére ma már számos, különböző szerkezetű, hatásmechanizmusú vegyület áll rendelkezésünkre, a leggyakrabban alkalmazott kemoterápiás szerek az antraciklinek (doxorubicin, epirubicin) és a taxánok (paklitaxel, docetaxel), illetve ezek kombinációi további vegyületekkel, mint például az 5-fluorouracillal, ciklofoszfamiddal, gemcitabinnel [14]. Neoadjuváns kemoterápia részeként, taxán és antraciklin kezeléssel a TNBC betegek 30-50%-a esetében sikerül teljes remissziót elérni [31, 32].

2.5.3. *BRCA1*-hez köthető öröklődő emlő- és petefészekrák

A tripla-negatív emlőrások alcsoportját képezik a *BRCA* génmutációt hordozó tumorok. A *BRCA1*, illetve *BRCA2* gének csírvonal mutációja nagy valószínűséggel öröklődő emlő- és petefészekrák kialakulását eredményezi. Az összes kialakuló daganat mindegy 5-10%-a familiáris [33], ezek legtöbbször családi halmozódást mutatnak és a sporadikus daganatokhoz képest fiatalabb korban alakulnak ki, a leggyakoribb familiáris

daganattípusok az említett öröklődő emlő- és petefészekrák és a Lynch-szindróma (öröklött nonpolyposis vastagbélrák) [34], ritka, de többszörös daganatokra prediszponáló betegség a Li-Fraumeni-szindróma, melyet a *TP53* gén csíravonalbeli mutációja okoz [35].

A *BRCA1* gént (breast cancer susceptibility gene 1) Mary-Claire King fedezte fel, az öröklődő emlő- és petefészekrákkal való összefüggést 1994-ben publikálták [36]. A *BRCA1* és *BRCA2* gének autoszómális domináns öröklődést mutatnak, vagyis az utódoknak 50% esélye lesz a mutáció hordozására, és mivel a hibás gént nem csak anyai, de apai ágon is örökölhetik, anélkül hordozhatják azt, hogy korábban anyai ágon kialakult volna emlő- vagy petefészek rák a családban [34]. A *BRCA1* génhibát hordozók esetében, annak a valószínűsége, hogy 80 éves korukig emlőrák alakuljon ki 60-80%, petefészek rák kialakulására pedig ~40% az esély [37], illetve nagyobb a kockázata egyéb daganat típusok kialakulásának is, mint a vastagbélrák, hasnyálmirigy rák [38] és a gyomorrák [39]. Mivel a *BRCA1* gén homozigóta deléciója már embionális korban letális, humán betegek esetében a mutációk csak az egyik allélt érintik [40]. A daganatképződés során azonban a vad típusú allél sérül, így emlő- és petefészekrák alakul ki. Arra egyelőre nincs magyarázat, hogy miért ezeket a szerveket érinti a betegség, egyes elméletek szerint a pubertáskori túlzott ösztrogén termelődés hatására fokozott sejtosztódás biztosíthat lehetőséget a mutációk felszaporodására [41]. A *BRCA1* gén szomatikus mutációja ritka, de a sporadikus TNBC betegek esetében 40% a *BRCA1* mutációt hordozók aránya [42]. A mutációkon túl, a sporadikus TNBC 30%-ban a *BRCA1* funkció változása mutatható ki, a *BRCA1* mRNS vagy fehérje sérülésének következtében. A *BRCA1* gén mutációjának hiányában kialakuló *BRCA1* diszfunkció, amely a *BRCA1* mutációt hordozó sejtekéhez hasonló fenotípust eredményez sporadikus tumorok esetében, az úgynevezett „BRCAness” jelensége. A *BRCA* mutációt hordozó daganatok 90%-a TNBC közé tartozik.

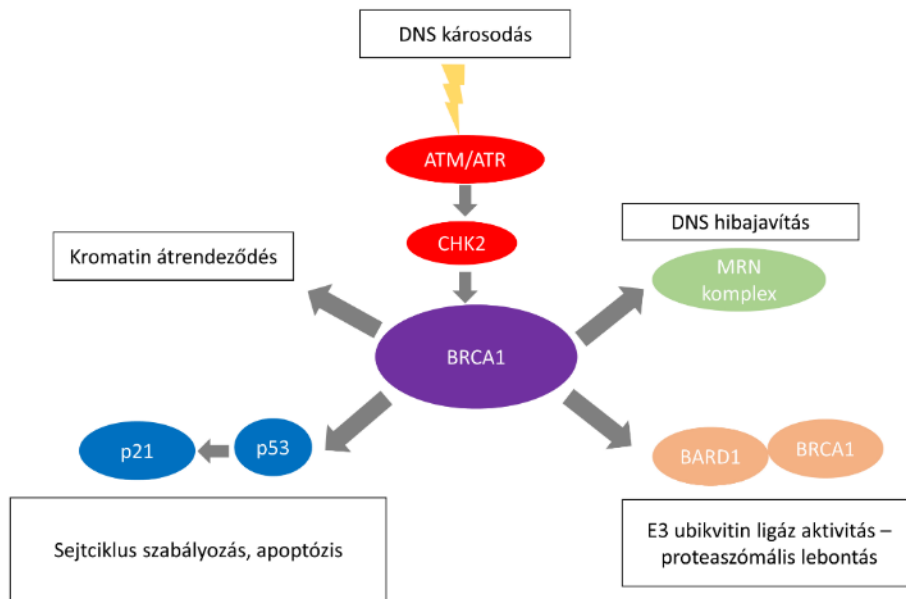
2.5.3.1. A *BRCA1* legfontosabb funkciói

Kettős szálú DNS törés vagy a replikációs villa blokkja esetén a hiba felismerését szenzor fehérjék végzik, melyek mediátorokon keresztül a DNS hibajavítását, vagy apoptózist indukálnak. Legfontosabb mediátorok közé tartozik a *BRCA1*. A *BRCA1*–

ABRAXAS–RAP80 komplex a DNS károsodás helyén az ubikvitinilált hisztonokhoz kapcsolódni, melynek feltétele, a H2AX, mediátor of DNA damage checkpoint protein 1 és a RING finger protein 8 fehérjék foszforilációja [43]. A BRCA1 ubikvitinálja a CtIP fehérjét, majd az MRN komplexszel együttműködve CtIP mediálta szálvisszafejtés révén aktiválja a HR-t [44].

A BRCA1 fehérje feladatai közé tartozik a sejtciklus ellenőrzőpontjainak megfelelő működése. A DNS károsodást követően, a BRCA1-BARD1 heterodimer szükséges ahhoz, hogy a sejtciklus G1/S fázisban történő felfüggesztése megtörténjen (ATM foszforilációja aktiválja a p53-t, ami a p21 - CDK inhibitor - expresszióját serkenti) [45], részt vesz továbbá a G2/M fázis szabályozásában a CHK1 kináz aktiválása révén [46].

BRCA1 feladata a kettős szálú DNS törések kijavítása homológ rekombináció (HR) révén, a sejtciklus megállítása, közvetetten apoptózis indukálása és a kromatin átrendeződés révén a transzkripció befolyásolása, a genom integritásának fenntartása (1. ábra).



1. ábra A BRCA1 főbb funkcióinak áttekintése. A BRCA1 részt vesz a DNS hibajavításban, E3 ubikvitin ligáz aktivitása révén a proteasómális lebontásban, szerepe van a sejtciklus szabályozásában, az apoptózisban és közvetett módon szabályozza a transzkripciót, kromatin átrendeződés révén. (Sharma, B. és munkatársai, 2018, nyomán) [47].

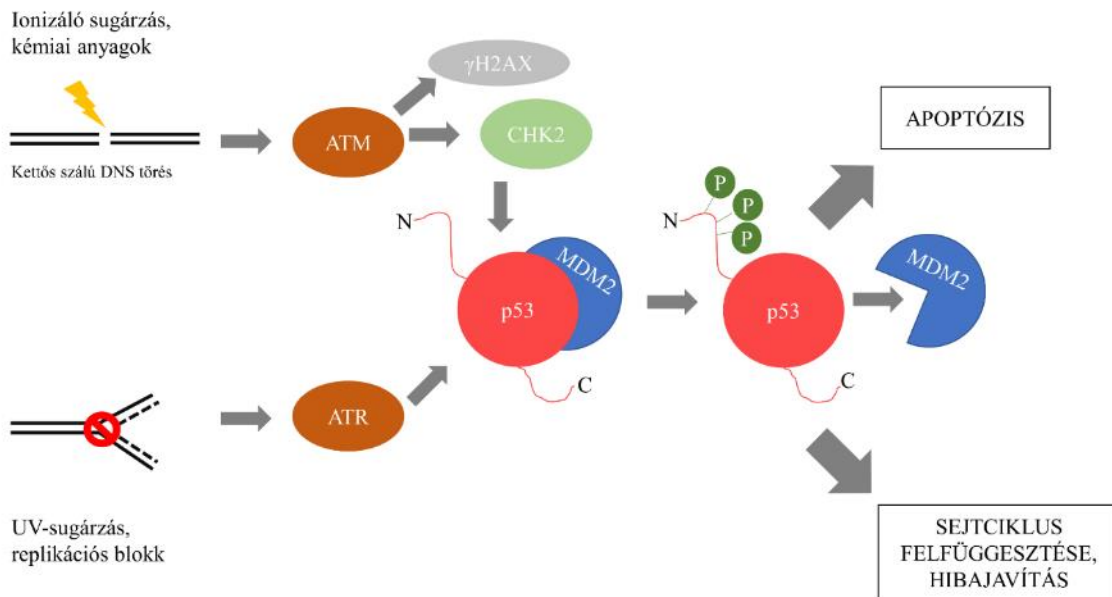
2.5.3.2. Hibajavítás, instabil genom, a sejtciklus szabályozása

DNS hibajavító mechanizmusaiban szerepet játszó gének, mint az imént bemutatott *BRCA1* gén, mutációja révén a genom instabillá válása az egyik legfontosabb esemény [17]. A genomi instabilitás a mutációk felhalmozódásának következménye. A daganatok kialakulásához közvetlenül hozzájáruló mutációkat driver mutációnak nevezzük, az érintett géneket pedig driver géneknek. A driver mutációk révén a tumorsejtek szelekciós előnyre tesznek szert, mely lehet az osztódási képesség fenntartása, vagy a túlélés az apoptotikus jelek elkerülése révén. Emlőrák esetében a leggyakoribb driver mutációk a következők: *TP53*, *PIK3CA*, *MAP3K1*, *GATA3*, *CDH1*, *BRCA1*, *PTEN*, *PIK3R1*, *AKT1*, és *RB* [48]. Azokat a mutációkat, melyek nem nyújtanak szelekciós előnyt a daganatsejtek számára, járulékos (passanger) mutációknak nevezzük, ezek általában nagy számban fordulnak elő a tumorsejtekben. A DNS hibajavító mechanizmusaiban szerepet játszó fehérjék génjeit érintő mutációk hozzájárulnak a genom integritásának felbomlásához. DNS károsodás esetén a sejtben válasz útvonalak aktiválódnak, melyek a következők: bázisexcíziós repair, mismatch repair, nukleotid excíziós repair (NER), homológ rekombináció (HR), nem-homológ végegyesítés (NHEJ) [49]. A dupla szálú DNS törések esetén nem áll rendelkezésre egy templátként szolgáló szál, aminek alapján elvégezhető a korrekció. A két szálú DNS törések javítása leghatékonyabban a HR révén történik, mely során a DNS adott szakaszán lévő törés kijavításához a testvérkromatida szolgál templátként, így ez a mechanizmus hibamentes reparációt tesz lehetővé [49]. Azokban a sejtekben, amelyekben a HR nem működik megfelelően, például *BRCA* gének deficienciája miatt, a NHEJ útvonalon keresztül történik a javítás. A NHEJ során a tört végek templát nélkül kerülnek összeillesztésre, éppen ezért ez az útvonal kevésbé pontos, hibákra hajlamos, ami újabb mutációk kialakulását okozhatja [49]. Amennyiben a hibajavítás nem lehetséges, apoptózis indukálódik. A sejtciklus szigorú szabályozásáért, a hibajavítás vagy az apoptózis indukálásáért többek között a p53 fehérje felel. A *BRCA1*-mutációt hordozó tumorokban legtöbbször a p53 mutációja is kimutatható [50, 51], feltételezhető, hogy a p53 inaktivációja hozzájárul a karcinogenezishez.

2.5.3.3. P53 szerepe

A *TP53* gén a p53 tumorszuppresszor fehérjét kódolja, mely a sejtciklus szigorú szabályozásában vesz részt, gátolja a korlátlan növekedést és osztódást, jelátviteli útvonalaikat érintő változások tehát folyamatos proliferációhoz vezethetnek.

Normál körülmények között a p53 szintje alacsony a sejtben, köszönhetően a p53 proteaszómális lebontásának, melyet az MDM2 RING-finger típusú E3 ubikvitin protein ligáz közvetít [52]. DNS sérülése esetén a p53 aktiválódik poszttranszlációs módosítások révén és a sejtmagban akumulálódik, transzaktiváció révén pedig olyan cél géneket aktivál, melyek a sejtciklus megállításához, hibajavításhoz (p21 aktiválás révén) és/vagy apoptózishoz vezetnek [53, 54]. (2. ábra).



2. ábra A p53 aktiválása és funkciói. Kettős szálú DNS törés, illetve replikációs blokk esetén az ATR és ATM kináz aktiválódnak. Az ATM γ H2AX hiszton foszforilációja mellett a CHK2 kinázt aktiválja. ATR, ATM és CHK2 a p53 N-terminálisának foszforilációja révén p53 MDM2-ről való leválását idézi elő, így p53 felszabadul, a károsodás mértékétől függően a sejtciklus felfüggesztését, a hibajavítást vagy apoptózist indukál. (Weber, A. M. és munkatársai, 2014, nyomán)[55]

2.5.3.4. *BRCA1* mutációt hordozó betegek terápiás lehetőségei

A *BRCA1* mutáció következtében kialakuló emlődaganatok leggyakrabban tripla-negatív emlőrákok közé sorolhatók, vagyis nem expresszálnak se hormonreceptorokat, se növekedési faktor receptort, molekuláris markereik alapján a bazális-szerű emlőrákok csoportjába tartoznak, agresszív, rossz prognózisú tumorok [25]. *BRCA1* mutációt hordozó TNBC betegek esetében a taxánokra, melyek a mikrotubulus gátlásán keresztül indukálják a sejthalált, rezisztencia alakul ki [56-58], mely összefüggésbe hozható a *BRCA1* proapoptotikus funkciójával, vagyis annak hiányában nem aktiválódik a mitotikus orsó ellenőrző pont a sejtciklus során, így nem áll le a sejtosztódás [57]. Esetükben tehát a taxán alapú kemoterápia nem alkalmazható. A *BRCA1* hibát hordozó sejtekre jellemző, sérült hibajavító mechanizmusok révén a kettős szálú törések nem javítódnak ki, így alkalmazhatók olyan vegyületek, amelyek a DNS szálai között hoznak létre keresztkötéseket, ilyenek a platinavegyületek. A platinavegyületek neoadjuváns kemoterápia részeként alkalmazva hatásosnak bizonyult hibás *BRCA1*-gyel rendelkező TNBC betegek esetében [59, 60] ciszplatin monoterápiával 60% feletti teljes patológiai remissziót sikerül elérni [61].

A *BRCA* fehérjékkel ellentétben a PARP enzimek az egyszálú DNS-törések javítását végzik a bázisexcíziós repair mechanizmus aktiválása révén. PARP inhibitorokkal kezelve a *BRCA1* mutációt hordozó tumorsejteket, szintetikus letalitás idézhető elő, mely a tumorsejtek pusztulásához vezet. 2018 óta a *BRCA1* mutációt hordozó daganatos betegek PARP inhibitorokkal (olaparib, talazoparib) való kezelésére is lehetőség nyílt az elsővonalú szisztémás kezelést követően [62-65].

2.6. *Rezisztencia*

A rákellenes szerek klinikumban történő alkalmazása jelentősen javította a betegségmentes túlélést és a betegek életminőségét, azonban a kezdeti kedvező hatást sok esetben visszaesés és a betegség kiújulása követi, melynek oka a kialakuló drog rezisztencia. Több ráktípus esetében, mint a veserák, a hepatocelluláris karcinóma és a rosszindulatú melanóma, a rezisztencia már a kezelést megelőzően jelen van, ekkor úgynevezett intrinsic vagy elsődleges rezisztenciáról beszélünk [66]. A terápiás kezelés hatására kialakuló

rezisztencia szerzett rezisztencia (acquired resistance). A rezisztencia kialakulásának háttérében számos különböző mechanizmus állhat, csökkenhet a kemoterápiás szer vagy drog felvételének a hatékonysága vagy megemelkedhet a sejtek efflux tevékenysége, ezáltal csökken az aktív hatóanyag sejten belüli koncentrációja, aktiválódhat a méregtelenítő rendszer, beindulhatnak DNS javító mechanizmusok illetve a drog által indukált apoptotikus sejthalál is kikerülhetővé válhat [67].

A tumorsejtek drogszenzitivitásának kis mértékű változása is rezisztencia kialakulását eredményezheti, ugyanakkor a kemoterápia során alkalmazott rákellenes szerek dózisának emelése sok esetben a súlyos mellékhatások miatt nem lehetséges. A mellékhatások csökkentése és a hatékonyság növelése azonban nem csak új gyógyszerek fejlesztése révén érhető el, hanem a klinikumban már alkalmazott vegyületek „becsomagolása”, formulációja is lehetővé teszi ezt. A liposzómális formuláció segítségével a kialakuló mellékhatások mértéke és mennyisége csökkenthető, jobb farmakokinetikai hatások érhetőek el [68]. Azonban az intravénás beadást követően a liposzómákat a mononukleáris fagocita-rendszer felismeri, a liposzóma felszínéhez kötött molekulák (pl.: polietilén-glikol (PEG)) révén azonban ún. lopakodó liposzómák hozhatók létre, melyek a keringési idejük megnyújtásával jelentősen megnövelik a terápia eredményességét [69]. A doxorubicin egy széleskörben alkalmazott kemoterápiás szer, számos ráktípus esetében alkalmazható, azonban súlyos, limitáló mellékhatásai vannak. A doxorubicin formulált változata a pegilált liposzómális doxorubicin (PLD vagy Doxil®/Caelyx®) különböző tumortípusoknál hatékonyan bizonyult [70], jelenleg petefészek daganatok kezelésére használják, rezisztenciára kutatásban azonban nem vizsgálták.

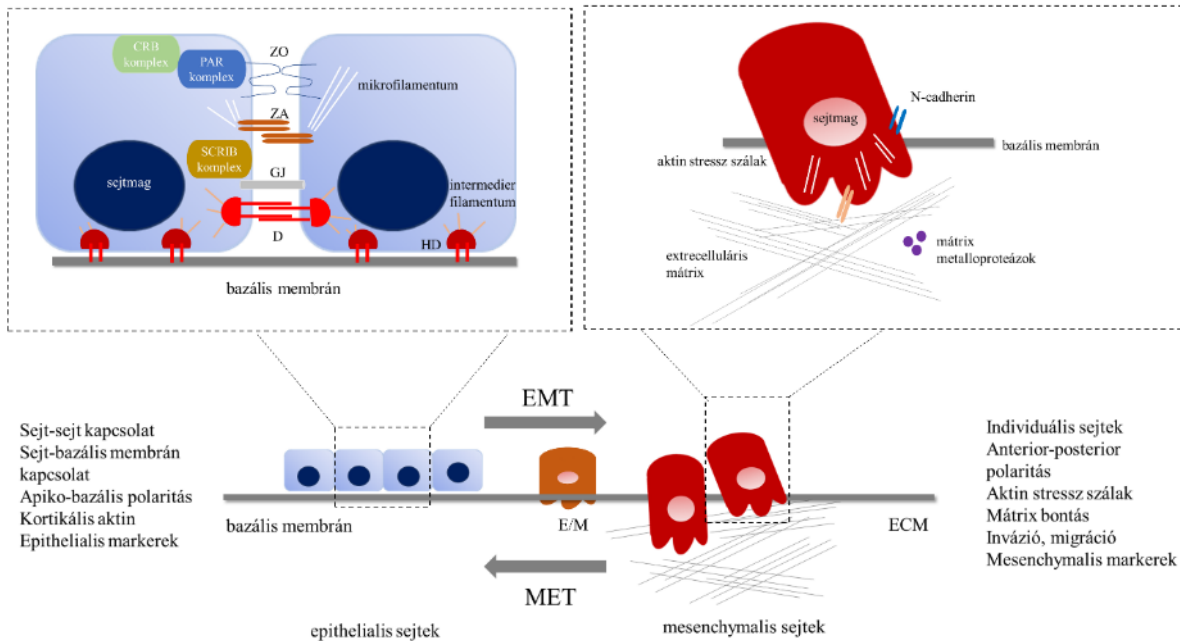
A hormonterápia és a célzott terápia sikere annak köszönhető, hogy a tumorsejtekre specifikusak, illetve az egészséges szövetek számára is kevésbé káros anyagokat tartalmaznak, azonban a rezisztencia kialakulása még ezekben az esetekben is problémát jelent. Tamoxifen kezelés hatására az emlőkarcinómák 20-30%-ban kialakul a rezisztencia [71], a kialakuló rezisztenciát okozhatja többek között az ER jelátviteli útvonalában bekövetkező változások, ER növekedési faktor receptor közötti „crosstalk”, ER downregulációja, PI3/AKT/mTOR útvonal aktivációja [72].

Trastuzumab rezisztencia kialakulásának hátterében is több különböző mechanizmus állhat, például mutáció következtében a HER2 tirozin-kináz doménban, a HER2 csonkolt izoformája jön létre (p95HER2) melyet nem ismer fel az antitest, ugyanakkor a receptor dimerizációra képes, így továbbra is képes a foszforilációs kaszkád beindítására [73]. Apoptotikus útvonalak változása szintén rezisztenciához vezethet, genom és fehérje szintű vizsgálatok során kimutatták, hogy trastuzumab rezisztens sejtekben a TRAIL receptorról induló útvonal gátlás alatt áll [74]. További mechanizmusok lehetnek a génamplifikáció, a ErbB receptor család másik tagjának emelkedett expressziója (HER3), alternatív útvonalak aktiválódása is.

A terápia rezisztencia kutatása során ugyanakkor egyre nagyobb figyelmet kap a tumor őssejtek vizsgálata, az epithelialis-mesenchymalis átalakulás, illetve a tumoron belüli heterogenitás és a mikrokörnyezet szerepe is. In vitro rendszereken és betegmintákon végzett vizsgálatok alapján, leginkább terápiára adott válasz révén kialakult génexpressziós mintázatok elemzésével, a terápia során kialakuló rezisztencia és az EMT összefüggését sikerült igazolni [75]. Az ennek hátterében meghúzódó mechanizmust számos összefoglaló közlemény tárgyalja [75-77], melyek lényege, hogy az „EMT sejtek” a legtöbb rákellenes gyógyszer által kiváltott apoptózist el tudják kerülni, képesek a drogok toxikus hatását semlegesíteni, illetve olyan molekulákat expresszálnak, amelyek lehetővé teszik az immunrendszer támadásának elkerülését [3].

2.6.1. Epithelialis-mesenchymalis átalakulás (EMT)

Celluláris plaszticitás példája az EMT folyamata, mely során az epithelialis sejtek polaritása megváltozik, elveszítik kapcsolatukat a bazális membránnal és a szomszédos sejtekkel, sejtvázuk átszerveződik, melynek következtében mesenchymalis sejtekre jellemző tulajdonságokra tesznek szert, mint a migráció képessége (3. ábra). Mesenchymalis-epithelialis átalakulás az EMT fordítottja. MET során a mesenchymalis sejtek háms sejtekre jellemző tulajdonságokra tesznek szert, melynek az egyedfejlődés mellett az áttétképzésben, a mikrometasztázisok kialakulásakor van szerepe.



3. ábra Az EMT összefoglaló illusztrációja. Az epithelialis (kék) és mesenchymalis (piros) sejtek főbb jellemzői és az EMT során bekövetkező morfológiai és molekuláris változások bemutatása. ZO - zonula occludens (szoros kapcsolat), ZA – zonula adherens (adherens kapcsolat), GJ – gap junction (rés kapcsolat), D – dezmoszóma, HD – hemidezmoszóma. (Lamouille, S. és munkatársai, 2014 nyomán) [78].

Elsőként Elizabeth D. Hay írta le az EMT folyamatát [79, 80] csirkeembrió morfogenezisének vizsgálata során. Az EMT legfontosabb eseményei az epithelialis sejtek polaritásának változása, a sejt-kapcsolatok (zonula occludens, zonula adherens, desmosoma, nexus, hemidesmosoma) felbomlása és a citoskeleton átrendeződése [4, 6, 78]. A sejtek polaritásának kialakításában három komplex játszik szerepet, a PAR komplex az apikális polaritás kialakításáért felel [81], apikális lokalizációját a CRB komplex segíti elő, míg a SCRIB komplex a hámsjtek bazolaterális részén helyezkedik el, a bazális membrán identitását határozza meg [82, 83].

A sejtek aktin citoskeletoni rendszere dinamikus struktúra, amelyre jellemző a folyamatos átrendeződés. Az egyedi sejtek mozgásához is az aktin hálózat dinamikus szerveződésére van szükség, mely révén lamellipodium, filopodium és az invadopodium jön létre [84, 85]. A RhoGTPázok (Rho family small guanosine triphosphatases) fontos szerepet játszanak az invázió és a migráció folyamataiban, vagyis az EMT-ben is: RhoA aktin stressz

szálak formálódását indukálja, szabályozza a citoskeletáris változásokat, melyek a sejt-sejt, sejt-mátrix kapcsolatokra hatnak, a Rac1 a lamellipodium kialakulásában és a membrán fodrok kialakulásában vesznek részt, Cdc42 a filopodium formálódásban játszik szerepet [84, 85].

A malignus transzformáció és az áttétképzés egyik legfontosabb lépése a sejtkapcsoló struktúrák felbomlása. A hámsejtek alaphártyához rögzítése a hemidezmoszómák révén történik, míg a sejt-sejt kapcsolatokat számos sejtkapcsoló struktúra biztosítja. A zonula occludens (tight junction, szoros kapcsolat) a sejtek apikális részén körbefutó képlet, funkciója a hámsejtek mechanikai összetartása, illetve barrier, gátolja az intercelluláris térben történő anyag kicserélődést [86]. A zonula adherens vagy adherens kapcsolat szintén a hámsejt apikális részén, övszerűen körbefutó struktúra, amit a cadherin molekulák alkotnak. Intracelluláris részük α -, β - és γ -catenin, vinculin, α -actinin, esetenként placoglobinnal keresztül a sejt aktin vázához rögzül. Az adhézión öv nem csak a sejtek statikus rögzítését, hanem a hozzá kapcsolódó aktin váz elemeinek összehúzódnak a sejthalak megváltozását is szolgálja [87]. Az adhézión övet alkotó cadherin molekulák részt vesznek a dezmoszómák kialakításában is (intermediér filamentumokhoz (citokeratinok) kapcsolódnak) [88], fontos szerepet játszanak tehát a sejtkapcsoló struktúrák kialakításában és azok felbomlásában is.

A klasszikus cadherineknél közé tartozó E-cadherin szerepét karcinómákban igazolták [89, 90], ahogy azt is, hogy az E-cadherin expresszió csökkenése és az áttétképzés összefüggésbe hozható [91, 92]. A „cadherin-switch” kifejezés arra a váltásra utal, amely EMT során következik be a sejtekben, mikor az E-cadherin expresszió csökkenését az N-cadherin upregulációja követi [93, 94]. Az E-cadherin transzkripció szintű szabályozása számos transzkripciós faktor által szabályozott, a leginkább tanulmányozott a SNAIL1, a SNAIL2 (SLUG), a ZEB1 (δ EF1), ZEB2 (Sip1), and TWIST [4, 6, 78]. Ezeknek a represszoroknak az expressziója számos jelátviteli útvonalon keresztül megtörténhet: TGF β , MAPK, Wnt, Notch, JAK/STAT [4, 6, 78].

Az E-cadherin funkciójának sérülése a sejtkapcsolatok meggyengüléséhez vezet, melynek következtében β -catenin szabadul fel, addig kötött formájából, és a sejtmagban olyan transzkripciós faktorokat aktivál, amelyek a Wnt jelátviteli útvonalon keresztül a sejtek proliferációját serkenti [95]. Az E-cadherin génexpressziójának csökkenése növekedési

faktorokról induló útvonalak eredménye lehet, mely egyidőben a mátrix metalloproteázok génexpresszióját indukálják [85].

A 1990-es évek elején kiderült, hogy az E-cadherin expresszió csökkenése révén, az EMT összefüggésbe hozható az áttétképzéssel [96] majd kevesebb, mint 10 évvel később ezt megerősítette, hogy sikerült kimutatni karcinóma sejtekben SNAIL hatására történő EMT-t [97]. Mára számos publikáció támasztja ezt alá [93, 98, 99]. Lokális invázió során EMT révén a tumorsejtek képessé válnak arra, hogy a tumorfészekből kiváljanak, sejtadhézió csökkenése révén, a bazális membránt átlépve, a stróma folyamatos bontásával migráljanak a nyirokerek, kapillárisok felé, amelyekbe bejutva aztán távoli szervekhez, szövetekhez képesek eljutni (metasztázis). A metastázis létrehozásának képessége az, amely a tumorokat igazán halálössé teszi, mi sem bizonyítja ezt jobban, mint a tény, hogy a rákos megbetegedések általi halálozások 90%-át az áttétek kialakulása okozza [100, 101].

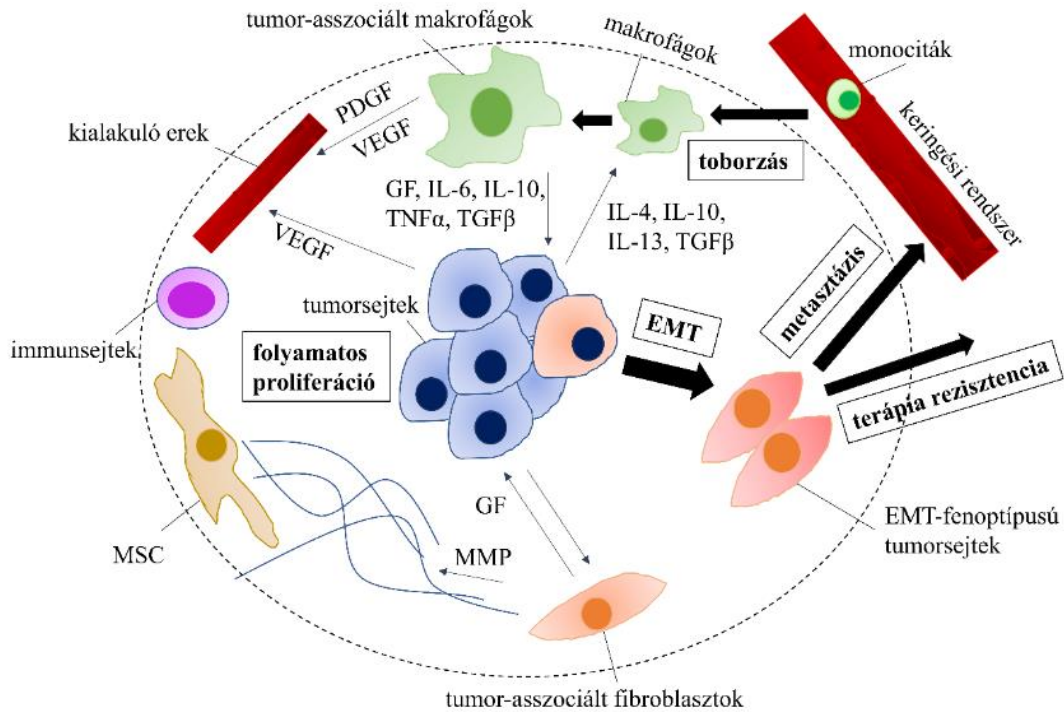
2.6.1.2. Az EMT átmeneti állapota

Míg az EMT-vel foglalkozó korai tanulmányok epithelialis és mesenchymalis végállapotokat különböztettek meg, az elmúlt években napvilágot látott modern elképzelés szerint, létezik egy úgynevezett átmeneti vagy hibrid állapot (E/M). Az E/M hibrid sejtek egyszerre rendelkeznek hámsejtekre jellemző markerekkel, mint az E-cadherin, ugyanakkor a sejtkapcsolataik már fellazultak, így motilitásuk és inváziós képességük megemelkedett [6, 102], vagyis olyan sejtek, amelyek kollektív migrációra képesek, őssejt-jellemzőkkel rendelkeznek, hibrid állapotnak köszönhetően könnyebben alkalmazkodnak a változó környezethez, ezáltal pedig nem csak az áttétképzésben, de a rezisztenciában is jelentős szerepük lehet [103]. Több különböző ráktípus esetében, sikerült kimutatni a hibrid állapot jelenlétét, emlőrák esetében hibrid állapot markereként azonosították az integrin- β 4 fehérjét, amelynek szintje TNBC sejtvonalakon kemoterápiával történő kezelést követően megemelkedett és agresszív fenotípussal társult [104]. Szintén a hibrid állapotot igazolja az E-cadherin és a vimentin ko-expressziója, melyet emlőrák esetében összefüggésbe tudtak hozni megemelkedett migrációs és inváziós képességgel, valamint agresszív fenotípussal

[105]. Az E/M hibrid állapot vizsgálata és megértése tehát szükségessé válik a rezisztenciával szembeni harcban.

2.6.2. *A tumor mikrokörnyezete*

A tumor mikrokörnyezetének jelentős szerepe van a tumor progresszióban, invázióban és az áttétképzésben is, az utóbbi tíz évben megjelenő tanulmányok pedig bebizonyították, hogy a kezelés eredményességét is befolyásolja [106-108]. A tumor mikrokörnyezetét vagy más néven strómáját heterogén sejtpopuláció alkotja, fibroblasztok és más mesenchymalis sejtek (környező szövetekből, csontvelőből) mellett immunsejtek, és endothel sejtek vesznek részt a kialakításában (4. ábra). A tumor és a stróma kapcsolata kölcsönös, a tumorsejtek számos olyan faktort termelnek (PDGF, TGF- β 1, bFGF, CTGF, VEGF) melyek hatására a fibroblasztok tumor-asszociált fibroblasztokként segítik a tumorsejtek növekedését, proliferációját, invázióját növekedési faktorok, metalloproteázok termelése révén [109, 110]. Emellett a tumorsejtek immunsejteket gyűjtenek maguk köré citokinek, kemokinek révén, melyek az immunrendszer kikerülésében segítik a tumorsejteket.



4. ábra A tumor mikrokozonyatának sematikus ábrázolása. MSC – mesenchymalis őssejt, ECM – extracelluláris mátrix, GF – növekedési faktor, MMP – mátrix metalloproteáz, PDGF – podocita növekedési faktor, VEGF – vaszkuláris endotél növekedési faktor, IL-interleukin, EMT- epithelialis-mesenchymalis átalakulás. (Son, B. és munkatársai, 2017. nyomán) [109].

A tumor mikrokozonyatának jelentős szerepe van az áttétképzésben. Stephan Paget nevéhez fűződik a „seed and soil” hipotézis, mely szerint az áttét kialakulásának helye nem random, azaz a különböző sejtek (seed) különböző affinitással adnak áttétet a különböző célszervekben (soil) [111]. Az elméletet éveken át tévesnek gondolták, mondván csupán anatómiai alapon megmagyarázható az áttét kialakulásának helye. Végül Hart és Filder igazolta Paget elméletét [112]. Az úgynevezett premetasztatikus niche-t úgy lehet definiálni, mint egy, a tumorsejteket támogató és befogadó környezetet [113]. A premetasztatikus niche kialakítása során a tumorsejtek mieloid sejteket gyűjtenek maguk köré, kemokinek révén, melyek segítik a primer tumorsejteket az immunrendszer kikerülésében, illetve a célszervben a másodlagos tumor kialakítását is támogatják [114, 115]. Az áttétképzés helyének előkészítésében a stróma sejtek átprogramozása is jelentős folyamat, mely során többek között a fibroblasztok mátrix metalloproteáz (MMP) expressziója megemelkedik [116].

A rezisztencia kialakulásának hátterében számos mechanizmus állhat, jelentős szerepet játszhatnak a tumor és a tumor mikrokörnyezet kölcsönhatásai, illetve az olyan komplex folyamatok, mint az EMT, továbbá az áttétképzés és a rezisztencia kapcsolata is ismert. A kezelés során fellépő terápia rezisztencia mellett, a sikeres kezelés esélyeit rontja, amennyiben megfelelő target hiányában célzott terápia nem alkalmazható, ilyen a *BRCA1*-hiányos tripla-negatív emlőtumorok esete. A *BRCA1*-negatív emlőtumorok kezelése során kialakuló rezisztencia további tanulmányozásához szükség van megfelelő modellrendszerekre.

2.7. Preklinikai modellek a rákkutatásban

A tumorsejtek egyedi jellemzőinek felderítéséhez az első lépést még mindig az *in vitro* modellek alkalmazása jelenti, hiszen ezek lehetőséget biztosítanak az olyan összetett folyamatok lépésről-lépésre történő megértésére, mint az epithelialis-mesenchymalis átalakulás, amely, ahogy láthattuk, nem csak az áttétképzésben, de a terápia sikerteleségéhez vezető rezisztenciában is szerepet játszhat. A rák azonban összetett betegség, ahhoz, hogy teljes képet kaphassunk róla, illetve megfelelő terápiás szereket tudjunk fejleszteni, a tumorsejtek egyedi tulajdonságain túl vizsgálnunk kell a tumor egészét, a tumor és a mikrokörnyezet kapcsolatát, az immunrendszer reakcióit melyre az állatmodellek biztosítanak megfelelő platformot.

Az állatmodellek közül a rákkutatás leggyakrabban transzplantációs modelleket alkalmaz, megkülönböztetünk szingenikus, allograft, xenograft modelleket. Szingenikus transzplantációs modell esetében a graftot, vagyis az átültetni kívánt tumordarabot vagy tumorsejteket, azzal megegyező genetikai hátterű, beltenyésztett állatba (hostba) ültetik vissza. A modell hátránya a genetikai komplexitás hiánya. Allograft esetében a graft és a host ugyanabból a fajtól származik, de genetikailag nem identikusak. Xenograft modellekben a graft és a host különböző fajtól származik, így a graftot immunhiányos egérbe ültetik vissza elkerülve ezzel az immunreakciót. Az immunrendszer hiánya mellett a xenograft modellek

hátránya továbbá, hogy a tumorsejtek tenyésztése során elveszik a primer tumor heterogenitása. A xenograftok egy újabb változata a patient-derived xenograft (PDX), ez esetben a humán betegből származó tumordarab a kísérleti állatba kerül beültetésre, az in vitro sejtenyésztési szakasz kihagyásával, majd a kialakuló tumor állatról állatra tovább oltható. A PDX modell nagy előnye, hogy megőrzi az eredeti tumor felépítését, heterogenitását, hisztopatológiai tulajdonságait, ugyanakkor esetleges új kezelőanyagok tesztelése során a tumor reakciója azonnal követhető (bőr alá ültetett tumor esetében egyszerűen mérhető), lehetővé téve a személyre szabott terápiát [117]. Emlőtumrok esetében PDX modellek használata révén sikerült bizonyítani például a PARP inhibitorok kedvező hatását TNBC-ben [118, 119].

A kísérleti állatok megválasztásakor leggyakrabban kisemlős fajok kerülnek kiválasztásra. Az egyik leggyakrabban alkalmazott kísérleti állat a mai napig a laboratóriumi egér. A preklinikai egérmodellek általános jellemzését az 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat Preklinikai állatmodellek a rákkutatásban [120-122].

Preklinikai egérmodellek a rákkutatásban								
Modell	Beültetés helye	Immunrendszer állapota	Mikrokörnyezet vizsgálható	Tumor heterogén	Tumor kialakulás, fejlődés vizsgálható	Kezelőanyagokra adott válasz vizsgálható	Költség és időigény	Egyéb előny/hátrány
Szingenikus/ Allograft	ortotopikus/ heterotopikus	immunrendszer intakt	igen	nem	nem	igen	alacsony	sejtek alkalmazkodnak a tenyésztési körülményekhez, egér fajspecifitás
Xenograft	ortotopikus/ heterotopikus	immundeficiencia	nem	nem	nem	igen, de immunterápiára nem	magasabb	sejtek alkalmazkodnak a tenyésztési körülményekhez
PDX	ortotopikus/ heterotopikus	immundeficiencia	részben (eredeti stróma hamar eltűnik)	igen	nem	igen, de immunterápiára nem	magasabb	nem minden tumor típus esetében használható, személyre szabott terápia fejlesztésére alkalmas
GEMM		immunrendszer intakt	igen	igen	igen	igen	magas	egyedi génfunkciók vizsgálhatók, humán betegségek klinikailag releváns modelle, de a genetikai háttér a klinikai tumorokban összetettebb, egér fajspecifitás

2.7.1. Genetikailag módosított egérmmodellek (GEMM)

A genetikailag módosított állatok révén lehetőségünk nyílt a gének működésének megértésére. Napjainkban a humán betegségek modellezésére széles körben alkalmazott genetikailag módosított egérmmodellekben a tumor kialakulása az első lépésektől, a tumor progresszió át követhető, vizsgálhatók továbbá a tumor-stróma kölcsönhatások az állat immunrendszerének bármilyen szintű módosítása nélkül, vagyis immunválasz tanulmányozására is lehetőségünk nyílik, amellet, hogy a tumor mikroevolúciójáról is közelebbi képet kaphatunk [120, 122]. A GEMM-ben a humán tumorokat molekuláris és hisztopatológiai tulajdonságaikban is megisméltő tumorok fejlődnek, melyek használatával, a tumorelles szerek tesztelése során, nem csak a tumorsejtekre de a tumor mikroörnyezetére és az egész szervezetre gyakorolt hatásainak megismeréséhez közelebb juthatunk, ezáltal javítva a klinikai vizsgálatokban is jól teljesítő potenciális antitumor vegyületek arányán.

A génkiütött vagy knockout (KO) állatok létrehozása lehetővé tette ez egyes gének hiányából adódó fenotípusos változások vizsgálatát, vagyis a gének funkciójáról sokkal árnyaltabb képet kaphatunk. Azoknak a géneknek a tanulmányozását, amelyek kiütése a fejlődés korai stádiumában letális, a feltételes vagy kondicionális génkiütés teszi lehetővé, mely révén egy adott gént idő – vagy szövetspecifikusan tudunk kiütni. A kondicionális kiütéshez a Cre-lox rendszert alkalmazhatjuk, mely a Cre rekombinázt enzim helyspecifikus, úgynevezett loxP helyeken történő hasításán alapul. Szövetspecifikus génhányal rendelkező egerek létrehozásához, a Cre rekombinázt szövetspecifikusan expresszáló egereket és a DNS megfelelő helyein loxP szekvenciákat hordozó egereket keresztezünk.

2.7.1.1. *BRCA1* vizsgálatára alkalmas egérmmodell

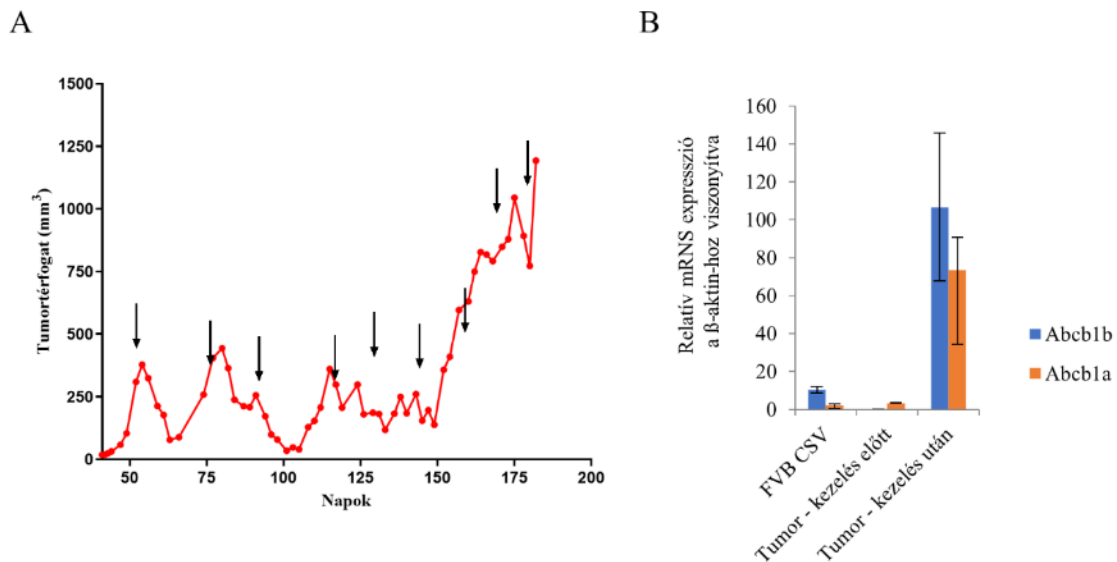
Korábban láthattuk a *BRCA1* jelentőségét a sejt normál működésének megörzésében, a *BRCA1* génben történő változás rossz prognózisú daganatok kialakulásához vezet, melyek ellen nincs igazán hatékony kezelési eljárás, ezért továbbra is szükség van a *BRCA1* gén vizsgálatára.

A *Brcal* emlő fejlődésében és a tumorképződésben betöltött szerepének a vizsgálatára már több mint 20 távoli mutáció vizsgálata lehetséges genetikailag módosított egerek révén [123]. Mivel a *BRCA1* csírvonalbeli hiánya az embriogenezis során letálisnak bizonyult, heterozigóta formában pedig nem okozza tumorok kialakulását, így a *Brcal* GEMM létrehozásához kondicionális génkiütés bizonyult megfelelő eszközhöz, mely a *Cre* rekombináz citokeratin 14 (CK14), β -laktoglobulin, MMTV-LTR vagy WAP által irányított expressziója révén vált lehetségessé [124-126]. A *Brcal* hiánya hámszövetben ugyan emlőtumorok kialakulásához vezet, viszont hosszú időt vesz igénybe és a tumor kialakulásának gyakorisága is alacsony [127, 128]. A *p53* gént érintő további deléciója azonban jelentősen megnövelte az emlőtumor incidenciáját ezekben az állatokban [127-130].

Liu et al. 2007-ben létrehozott egy olyan egérmódellet, melyben a *Brcal* és *p53* gének kondicionális kiütése révén a humán *BRCA1*-hez köthető emlődaganatokkal megegyező tulajdonságokkal rendelkező tumorok alakulnak ki [124]. A *Brcal* gén specifikus deléciójához Cre-loxP rendszer használatával, a *Brcal* gén 5-13 exonjának két oldalára loxP helyek kerültek, majd ezeket az állatokat *K14cre;p53^{F/F}* állatokkal keresztezték, így az utódokban, epithelialis sejtekre specifikusan *p53* és *Brcal* gének deléciója megtörténik, a *Cre* rekombináz citokeratin 14 (*K14cre*) szövetspecifikus aktivációja révén. Hisztopatológiai tulajdonságaik alapján a kialakuló tumorok 91%-a karcinóma (IDC-NOS), 6%-a adenomioepithelioma (lumináris és mioepithelialis sejtek), 3%-a karcinoszarkóma (CK8-pozitív epithelialis és CK8-negatív, vimentin-pozitív mesenchymalis sejtek) [124]. A karcinoszarkóma (vagy metaplasztikus karcinóma) sejtek EMT-fenotípust mutatnak, vagyis a sejtek epithelialis-mesenchymalis átalakulás révén invazív fenotípusra tesznek szert, mely eredménye egy rendkívül agresszív, terápia rezisztens emlőtumor típus [131, 132].

A kialakuló *Brcal^{-/-}; p53^{-/-}* tumorok tehát mind molekuláris, mind hisztopatológiai tulajdonságaikban megegyeznek a humán *BRCA1*-hez köthető emlődaganatokkal, bazális markereket expresszálnak, mint a citokeratin 5 (CK5), és 14 (CK14), illetve tripla negatívak, tehát nem expresszálnak hormonreceptorokat sem HER2-t, valamint instabil genommal rendelkeznek [124].

Ez az állatmodell a humán *BRCA1*-hez köthető öröklődő emlőrák klinikailag releváns modellje, alkalmas a különböző tumorelles kezelőanyagok hatásának vizsgálatára. A tumor kialakulása átlagosan 213 nap alatt történik meg, a tumorok átoltása révén ez az idő jelentősen csökkenthető. Az átültetést követően létrejövő tumorok az eredeti tumorról megegyező szövettani képet és molekuláris mintázatot mutatnak, valamint a drog érzékenyséjük is az eredeti tumoréval megegyező [124, 133]. A *Brc1^{-/-}; p53^{-/-}* tumorok ortotopikus transzplantációját követő maximálisan tolerálható dóziszú (MTD) doxorubicin, illetve docetaxel kezelésre a tumorok kezdetben reagálnak, később azonban rezisztensé válnak, míg ciszplatin kezelés hatására nem alakul ki rezisztencia [133]. A doxorubicin hatására kialakuló rezisztencia mögött a P-glikoprotein (Pgp) expresszió emelkedése áll [133], melyet kutatócsoportunk is igazolt, az *Abcb1a* és *Abcb1b* gének mRNS expressziójának doxorubicin rezisztens tumorokban történő szignifikáns emelkedése révén [134] (5. ábra).



5. ábra *Brc1^{-/-}; p53^{-/-}* egér emlődaganatok doxorubicinra rezisztenssé válnak, a fokozott *Pgp*-expresszió következtében. A) A reprezentatív görbe a tumor térfogat változását mutatja az idő függvényében, a doxorubicin kezelések (5 mg/kg iv. doxorubicin) időpontját a fekete nyilak jelölik. B) Az *Abcb1a* és *Abcb1b* gének (egérben a *Pgp*-t két gén kódolja) mRNS-szintjének változása a *Brc1^{-/-}; p53^{-/-}* tumorok doxorubicin kezelése előtt és után. Kontrollként feltüntettük az FVB egerek csontvelőjéből izolált sejtek (FVB CSV) *Abcb1a*-b mRNS-szintjeit is. [134]

Ugyan a PARP inhibitorok a BRCA1 mutációt hordozó tumorok kezelésében nagy előrelépést jelentettek, a *K14cre;Brca1^{F/F};p53^{F/F}* egérmodellen végzett kísérletei során Rottenberg és munkatársai olaparibbal (PARP inhibitor) történő kezelés hatására kialakuló rezisztenciáról számolt be [135], olaparib és ciszplatin vagy carboplatin kombinációjával azonban növelhető volt a túlélés [135]. A modell hiányossága azonban, hogy míg a klinikumban ciszplatin kezelés hatására rezisztencia alakul ki, addig ezen a modellen más csoport által végzett korábbi kísérletek során nem sikerült rezisztenciát kialakítani [135].

A *K14cre;Brca1^{F/F};p53^{F/F}* egérmodell alkalmas tehát a potenciális új terápiás anyagok (akár kombinációik) tesztelésére, alkalmazása révén megjósolható a betegek kezelésének kimenetele, az adott kezelőanyag hatékonysága, illetve a kialakuló rezisztencia mögött lévő mechanizmusok megértéséhez is közelebb juthatunk.

Ahogy minden modellnek, a GEM-nek is rendelkezik limitációkkal, mint a klonális heterogenitás csökkenése [136, 137], emellett a fajok közötti különbségek sem hagyhatóak figyelmen kívül, illetve a GEMM létrehozása drága és időigényes. A GEMM-ben kialakuló tumorok genetikai módosítására azonban költséghatékony lehetőségként kínálkozik, a létrejövő tumorokból sejtvonal létrehozása, és a sejtvonal módosítása. A *Brca1^{-/-}; p53^{-/-}* tumorok részletesebb tanulmányozásához és esetleges módosításához tehát érdemes sejtvonalakat is bevonni a kutatásba.

2.7.2. *In vitro* modellek

Az *in vitro* tumormodellek a rákkutatás leggyakrabban használt eszközei, lehetővé teszik a tumorsejtek molekuláris mechanizmusainak felderítését, mely elengedhetetlen a heterogén tumorszövet esetében. Ez a heterogenitás megjelenik a kialakuló tumorok különbözőségében (intertumorális heterogenitás), illetve intratumorálisan is. Az intratumorális heterogenitás következtében a tumorokat felépítő tumorsejtek morfológiája, gén expressziós mintázata, anyagcseréje, motilitása, proliferációja és a metasztatikus potenciálja is eltérő lehet [138, 139]. A tumorsejtek heterogenitása lehetővé teszi a változó

mikrokörnyezeti körülményekhez való alkalmazkodást, ez pedig jelentősen csökkenti a terápia sikerességét. A heterogén sejtekből felépülő tumor tanulmányozására, a sejt-sejt kapcsolatok, a különböző sejttypusok kölcsönhatásának megismerése, valamint a sejtek egyedi jellemzőinek vizsgálata, jól definiált, kontrollált környezetben, sejttenyészetek alkalmazása révén van lehetőségünk.

A tumorsejtek jellemzésének fontos lépése továbbá a genomi mutációk feltérképezése melyre teljes genom szekvenálás révén nyílik lehetőségünk. Vizsgálhatjuk a spontán kialakuló és a valamilyen környezeti hatásra, például kezelés következtében kialakuló mutációkat is. Mutáció analízis során vizsgálhatunk SNV-eket (single nucleotide variant), a megváltozott bázisok környezetét is figyelembe véve triplet spektrumot, mely információt biztosít a bázisszubsztitúció előtti és utáni bázisokról, illetve a teljes mutációs spektrumot, az inzerciókat, a deléciókat, kromoszomális átrendeződéseket. A tumoros mintákban a már említett heterogenitás megnehezíti a szekvenálási eredmények kezelését, ezért izogenikus sejtvonalak használata javasolt.

Továbbá a sejtvonalak genetikai módosítása is lehetséges, amely költséghatékony és viszonylag egyszerű megoldást kínál a kialakuló, valamilyen genetikai módosításon már átesett tumorok további módosítására, hiszen nincs szükség új GEMM létrehozására. Fluoreszcens fehérjét kódoló gén gazda DNS-be való integrációjához, emlős sejtek esetén, gyors és hatékony megoldás a lentivirális transzdukció, amely a tranziens transzfekció egyszerű használatát és sebességét egyesíti a stabil expressziójával. A fluoreszcens fehérjével történő jelölés lehetővé teszi a sejtek követését in vivo [140], ezáltal megfigyelhető a tumor progressziója [141], angiogenezis [142], az áttétképzés, illetve a tumor-mikrokörnyezet kölcsönhatások [143, 144] is vizsgálhatóvá válnak.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám céljával egy olyan modellrendszer kidolgozását tűztük ki, amely lehetővé teszi a *BRCA1*-hez köthető öröklődő emlődaganatok tanulmányozását. A kísérletek alapjául szolgáló egérmodellben [124] *Brca1* és *p53* gének kondicionális deléciója révén spontán módon emlődaganatok alakulnak ki, amelyek a humán *BRCA1*-hez köthető öröklődő emlődaganatokkal, molekuláris és hisztológiai tulajdonságaik tekintetében is számos hasonlóságot mutatnak. Célunk új terápiák hatásának vizsgálata, a kialakuló rezisztencia mechanizmusának tanulmányozása és olyan modellek létrehozása volt, melyek lehetővé teszik a rezisztencia vizsgálatát. Ezeket a következő pontokban fogalmaztuk meg:

1. Pegilált liposzómális doxorubicin (PLD) hatásának vizsgálata *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőtumor modellen.
2. *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőtumor sejtvonal létrehozása és karakterizálása.
3. Ciszplatin rezisztencia molekuláris hátterének vizsgálata *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőtumor sejtvonalon.
4. *Brca1*-deficiens tumorsejtek celluláris plaszticitásának vizsgálata.
5. *Brca1*^{-/-}, *p53*^{-/-} tumorok genetikai módosítása lentivirális transzdukció révén.

4. MÓDSZEREK

Az epithelialis-mesenchymalis átalakulás terminológiájának helyesírásával kapcsolatban sok a bizonytalanság. Dolgozatomat a *Magyar Orvosi Nyelv* című folyóiratban megjelent ajánlást vettem alapul [145], mely a következőket mondja: „*Magyar nyelvű tudományos közleményben epithelialis – mesenchymalis átalakulás formájában írják. A tranzíció jövevényszó, jelentése átmenet, átalakulás vagy kicserélődés. A szakkifejezés a hámszövetnek mesenchymalis szövétté válására utal. A kétféle szövet közötti viszonyt (átalakulás) nagyköötőjellel fejezzük ki. A mesenchyma sajátos alapszövet, magyar neve nincs.*”

4.1. Állatkísérletek

Az állatkísérletek elvégzése az Országos Állategészségügyi Intézet és a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont Állatkísérleti Bizottságának engedélyével (01/2574–6/2015) valamint az Európai Unió állatkísérletes előírásainak betartásával történt. A kísérletek az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai Osztályának állatházában történtek.

Kísérleteinkhez genetikailag módosított FVB egértörzsből származó *Brca1^{-/-}; p53^{-/-}* tumorokat [124] használtunk, melyek Dr. Sven Rottenberg (University of Bern) jóvoltából állnak rendelkezésünkre. A tumor darabokat altatás alatt (20 mg/kg zolazepam, 12.5 mg/kg xylazine, 3 mg/kg butorphanol, 20 mg/kg tiletamine) ortotopikusan 6-8 hetes nőstény FVB egerek tejlécébe ültettük be. A tumor méretét hetente háromszor ellenőriztük, a szélességét és hosszúságát tolmérő segítségével határoztuk meg, majd a következő formula segítségével számoltuk ki a térfogatokat: $\text{térfogat} = \text{hosszúság} \times (\text{szélesség}^2/2)$. Az állatok állapotát minden nap ellenőriztük. Amikor a tumor mérete elérte a $\sim 200 \text{ mm}^3$ -t, a tumorokat eltávolítottuk vagy az állatokat maximálisan tolerálható dózisu (MTD) droggal (doxorubicin (DOX) 5 mg/kg, pegilált liposzómális doxorubicin (PLD) 8 mg/kg, ciszplatin (CP) 6 mg/kg) kezeltük, intravénásan, a farki vénán keresztül. A kezeléseket 10 (DOX, PLD) vagy 14 (CP)

naponta ismételtük, amennyiben a tumor térfogata nem csökkent 50%-kal a kezdeti állapothoz képest. Amennyiben a kezelésre adott válasz több volt, mint 50%, akkor a következő dózist csak akkor kapták az egerek, ha a tumor újra elérte az eredeti méretét. Amikor a tumorok elérték a 2000 mm³ méretet, az állatokat nyaki diszlokációval eutanáziában részesítettük, a tumorokat eltávolítottuk. A tumorsejtek beültetése során 1.5×10^6 sejtet (CST vagy CST-mCherry) injektáltunk 6-8 hetes nőstény GFP-t expresszáló FVB (FVB.Cg-Tg(CAG-EGFP)B5Nagy/J) egerek emlőszövetébe. A tumorméretnek változásának bemutatásához az adatok átlagát \pm SEM ábrázoltuk.

4.2. Primer tumorsejtek izolálása, fenntartás

A tumorokat 70%-os alkohollal, majd PBS-sel átmostuk, 5 mm-es darabokra vágtuk, majd 200 μ l/ml kollagenázt és 0,6 μ l/ml diszpázt tartalmazó emésztő médiummal (DMEM) 37°C-on, 1,5-2 órán keresztül folyamatos vortexelés mellett (15 percenként 1 perc) emésztettük, az emésztés végén a sejtsuszpenziót 40 μ m-es szűrőn átszűrtük, majd centrifugálással üleptítettük. A sejteket primer kultúrának kedvező tápban (DMEM/F12 + 10% FBS + 5% lószérum + 5mmol/L glutaminnal és 50 egység/mL penicillin/sztreptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) tenyésztettük 37°C-on, 5% CO₂ mellett. A le nem tapadó sejteket két naponta médium cserével távolítottuk el. A konfluens primer tenyészet sejtjeit PBS-sel átmostuk, 0,1% tripszinnel 10-15 percig inkubáltuk 37°C-on, majd a sejteket tenyésztő edénybe ültettük. Az átoltást követően a médiumból a lószérum megvonásával a tumorsejtek növekedésének kedveztünk, így a kultúra ~3 hét alatt kitisztult, homogén tumorsejt tenyészeté vált, a szubkultiválás a korábban leírt módon folytatódott.

4.3. Egér mesenchymalis őssejtek izolálása, fenntartása

Az egér mesenchymalis őssejtek izolálását Dr. Kudlik Gyöngyi (TTK, Enzimológiai Intézet) és Dr. Uher Ferenc (Dél-pesti Centrumkórház, Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet) segítségével a Peister A. et al által leírt módszer alapján végeztük [146]. Röviden, egerek combcsontjából komplett médiummal (DMEM/F12 + 10% FBS + 5% lószérum +

5mmol/L glutaminnal és 50 egység/mL penicillin/sztreptomicin (Thermo Fisher Scientific) kimostuk a csontvelőt. A sejteket ezután kétszer megmostuk HBSS-ben, egy 25 cm²-es flaskába oltottuk $2-5 \times 10^6$ sejtdenzitással. A sejteket 37°C-on, 5% CO₂ mellett tenyésztettük 3 napig, majd médiumcserével eltávolítottuk a le nem tapadó sejteket. A konfluens tenyészetet PBS-es mosást követően 5 perc tripszines EDTA-s inkubálással passzáltuk.

4.4. Genotipizálás

A *K14cre;Brcal^{F/F};p53^{F/F}* egértörzsben található szövet-specifikus *Brcal* deléció jelenlétének ellenőrzéséhez a delécióra specifikus primereket terveztünk a [124] alapján. A deléció-specifikus primerek mellett használtunk ép egér *Brcal*-et felismerő primereket is, így egy forward (P1, 5'-TAT CAC CAC TGA ATC TCT ACC G-3'), egy normál *Brcal*-et felismerő reverse (P2, 5'-GAC CTC AAA CTC TGA GAT CCA C-3'), valamint egy *Brcal* deléció-specifikus reverse (P4, 5'-TCC ATA GCA TCT CCT TCT AAA C-3') primerrel dolgoztunk. Az izolált DNS templátokat a P1-P2, illetve P1-P4 primer párok felhasználásával PCR reakcióval sokszoroztuk. Mivel a *Brcal*-deletált minták esetében képződő végtermék jóval nagyobb (594bp), mint a normál, nem sérült *Brcal*-gyel rendelkező minták esetén (390bp), hiszen a normál *Brcal*-et felismerő primer (P2) a deletálódott szakasz területén található, ezért ezeket 1%-os agaróz gélen megfuttatva ellenőrizhető, hogy az adott sejtek a beültetett tumorból vagy a vad típusú gazdaállatból származnak-e.

4.5. Az MSC-k és a tumorsejtek differenciáltatása, sejtfelszíni marker mintázat vizsgálata

Egér mesenchymalis őssejtek és tumorsejtek differenciáltatását és a sejtfelszíni marker mintázat vizsgálatát Dr. Kudlik Gyöngyi (TTK, Enzimológiai Intézet) és Dr. Uher Ferenc (Dél-pesti Centrumkórház, Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet) végezték. Csontirányú differenciáltatáshoz a sejteket β -glicerofoszfát (10 mM), dexametazon (10^{-8} M) és aszkorbinsav (50 μ g/ml) tartalmú (minden Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) DMEM médiumban (kiegészítve 10 % FBS, 5 % lószérum, 2 mM L-glutaminnal, 50 egység/ml penicillinnel és 50 μ g/ml sztreptomicinnel (minden Thermo Fisher Scientific)

inkubáltuk 2 hétig. 14 nap után a sejteket 8%-os PFA-val fixáltuk, majd a csont-irányú differenciálódás során a sejtek által termelt, majd lerakódott extracelluláris kalciumot alizarinvörös (Sigma-Aldrich) festékekkel mutattuk ki. A zsír-irányú differenciáltatáshoz az előbb leírt kiegészített DMEM médiumhoz dexametazont (10^{-7} M) és izobutil-1-metilxanhtint (0,5 mM) (Sigma-Aldrich) adtunk, a sejteket 7 napig inkubáltuk, majd 8%-os PFA-val (Sigma-Aldrich) fixáltuk őket. A zsírsejt differenciációt jelző lipidcseppeket Oil Red O (Sigma-Aldrich) festéssel tettük láthatóvá metilénkék (Sigma-Aldrich) háttérfestés mellett. A kontroll, nem differenciáltatott sejteket 8%-os PFA-val fixáltuk, majd Giemsa festékekkel (Sigma-Aldrich) (a gyári festék 10%-os desztillált vizes oldata) tettük láthatóvá. A differenciáltatott sejtekről készült digitális felvételek elkészítéséhez Nikon Coolpix 4500 kamerát (Nikon GmbH, Düsseldorf, Germany) használtunk Olympus CK2 inverz mikroszkóphoz (Olympus, Tokio, Japan). kapcsolva, 10x objektív használata mellett.

A tumorsejtek és az MSC-k sejtfelületi marker mintázatának vizsgálatához 5×10^5 sejtet jelöltünk fluoreszceinizotiocianáttal (FITC) konjugált anti-CD90.1, CD24, F4/80 és CD146 valamint fikoeritrinnel (PE) konjugált anti-CD44, CD73, Flk1 és Sca-1 monoklonális ellenanyagokkal fél óráig, 4°C-on és sötétben. A felsorolt ellenanyagok mind patkányban termeltetett, BD Pharmingen által gyártott immunoglobulinok. A jelölést követően a minták fluoreszcencia intenzitását FACSCalibur áramlási citométerrel (Becton Dickinson) mértük. Az adatok kiértékelését CellQuest™ (Becton Dickinson) szoftverrel végeztük.

4.6. Emlőtumor sejtvonalak

A CST sejtvonalt tenyésztéséhez DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) + 10% FBS + 5mmol/L glutamin és 50 egység/mL penicillin/sztreptomycin (Sigma-Aldrich) tápfolyadékot használtunk. A 4T1 sejtvonalt Dr. Csiszár Ágnes (Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna) szíves felajánlása révén állt rendelkezésünkre. A humán emlő daganat sejtvonalt panel (MCF7, MDA-MB-231) az NCI DTP kollekciónak szarmazik. A 4T1 és a humán emlőrák sejtvonaltak tenyésztéséhez RPMI tápoldatot (Thermo Fisher Scientific) használtunk 10% FBS-sel, 5mmol/L glutaminnal és 50 egység/mL

penicillin/sztreptomicinnel kiegészítve (Thermo Fisher Scientific). Minden sejtvonal fenntartása 37°C-on, 5% CO₂ mellett történt.

4.7. Növekedés és motilitás vizsgálatok

A kétszereződési idő (doubling time (T_d)) meghatározásához a következő formulát használtuk: $T_d = \ln 2/K$, ahol a K a növekedési ráta, melyet a következő egyenletből számolunk ki: $N_t = N_0 \times e^{K \times t}$, ahol N_t a sejtszám t időben, N_0 a sejtszám 0 időpillanatban. A sejteket minden nap megszámloltuk 4 napon keresztül, a mérésekhez minden esetben TC-10-es automata sejtszámloló készüléket (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA) használtunk. A növekedési ráta meghatározásához 24-lyukú lemezen 2×10^4 sejt/lyuk denzitásban kiültettük a sejteket és automata video mikroszkóp segítségével 12 óránként, 3 napon keresztül képeket készítettünk a sejtekről. A motilitási vizsgálatokhoz a sejteket 6-lyukú lemezre ültettük ki 1×10^6 sejt/lyuk denzitásban, majd 24 óra elteltével 200 µl-es pipettaheggyel „sebet” karcoltunk a konfluens egysejtrétegbe. A sebgyógyulási képesség vizsgálatához ezután 6 óránként 48 órán keresztül készítettünk képeket a „sebről”. A növekedési görbe és a motilitási esszé során a képeket a JuLI Stage Real-Time Cell History Recorder (NanoEnTek, Seoul, Korea) termosztátba helyezhető automata video mikroszkóppal készítettük világos látótér (bright field) és 4×/0.16 U Plan S-Apo objektív használatával. A sebzáródás kvantifikálásához az ImageJ szoftver MRI Wound Healing eszközt (Volker Baecker, Montpellier RIO Imaging, Montpellier, France) használtuk.

4.8. RNS izolálás és RT-PCR

A 3×10^6 lecentrifugált sejtet 600 µl TRIzol™ reagenssel (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) felszuszpendáltunk, majd az RNS izoláláshoz Direct-zol® MiniPrep kitted (Zymo Research) használtunk a gyártó által megadott módon. A cDNS átírást Promega Reverz Transcription System segítségével végeztük, 500ng RNS-t írtunk át cDNS-sé. A Real-Time PCR vizsgálatokhoz endogén kontrollként GAPDH TaqMan® próbát (Thermo Fisher Scientific) használtunk. Az E-cadherin, vimentin, citokeratin 8 és citokeratin 14 gének

mRNS expresszióját a megfelelő TaqMan® primerekkel kvantifikáltuk. Az RT-PCR analízist StepOne™ Real-Time PCR készüléken végeztük (Life Technologies), az mRNS expresszió változását pedig a $2^{\Delta\Delta Ct}$ módszerrel számítottuk. A relatív mRNS szint változásokat 3 független kísérlet átlagaként ábrázoltuk \pm SEM (standard error of mean).

4.9. Immuncitokémia

A vizsgálni kívánt sejteket 8×10^4 sejt/lyuk sűrűségben 8-lyukú kamrára ültettük, majd 24 óra elteltével sejteket PBS-sel mostuk és 4%-os PFA-val fixáltuk. A blokkolás egy éjszakán át történt 0,5%-os BSA-s PBS-sel melyet 0,1% TritonX-100 és 5% kecskeszérummal egészítettünk ki. A sejteket az elsődleges antitestekkel (3. táblázat) 1:100-1:500 hígításban, 24 órán keresztül 4 °C-on inkubáltuk. A másodlagos ellenanyagokat (Alexa Flour 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555) 1:250 hígításban használtuk, 2-3 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A sejtmagot DAPI-val (Life Technologies) jelöltük. A lépések közötti mosás DPBS-sel (PBS + 0,9 mM Ca^{2+} + 0,5 mM Mg^{2+} , pH 7.2) végeztük. A detektáláshoz ZEISS LSM-710 (Carl Zeiss microscopy GmbH, Jena, Germany) konfokális lézerpasztázó mikroszkópot használtunk, 40×/1.4 plán-akromát olajimmerziós objektívvel. A képek feldolgozása ZEN szoftveverrel (Carl Zeiss microscopy GmbH, Jena, Germany) történt. A γ H2AX fókuszok számolásához az ImageJ FindFoci plugint használtuk.

3. táblázat A munka során használt ellenanyagok összefoglaló táblázata.

Antitest	Katalógusszám	Gyártó
anti-E-cadherin	ab11512	Abcam (Cambridge, UK)
anti-vimentin (V9)	sc-6260	SantaCruz (Dallas, Texas, USA)
anti-citokeratin 8	ab53280	Abcam (Cambridge, UK)
anti-citokeratin 14	ab7800	Abcam (Cambridge, UK)
anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139)	ab11174	Abcam (Cambridge, UK)

4.10. Szekretált faktorok vizsgálata

A szekretált faktorok mennyiségi meghatározásához a Mouse Inflammatory Cytokines Multi-Analyte ELISA kitet (Qiagen, Hilden, Germany) használtuk a gyártói protokoll szerint. Röviden, a vizsgált sejtek négy napos felülszóiából 50 μ l-t kevertünk össze 50 μ l Assay pufferrel, majd szobahőmérsékleten 2 óráig inkubáltuk a keveréket egy ELISA mikrolemezen. Az inkubálás végén az oldatot leszívtuk, majd 350 μ l mosófolyadékkal kétszer átmostuk a mikrolemezt. A minták jelölését az antitestekkel szobahőmérsékleten 1 órán keresztül végeztük, mostuk, majd további 30 percen keresztül 100 μ l Avidin-HRP oldattal inkubáltuk. Újabb mosást követően a 100 μ l előhívó, majd 100 μ l leállító oldat hozzáadása után a mikrolemezt 450nm-es abszorbancia-hullámhosszon olvastuk le. A kit a következő citokinek mérésére alkalmas: IL1A, IL1B, IL2, IL4, IL6, IL10, IL12, IL17A, IFN γ , TNF α , G-CSF és GM-CSF. A Szekretált faktorok mérését Dr. Kudlik Gyöngyi (TTK, Enzimológiai Intézet) végezte.

4.11. Teljes genom szekvenálás és adatelemzés

A teljes genom szekvenálás adatelemzését Dr. Szüts Dávid és Póti Ádám (TTK, Enzimológiai Intézet) végezték, a CST egysejt klónok szekvenálása a Novogene (Beijing, Kína) által történt. A nyers szekvencia leolvasások minőségi ellenőrzése Fast QC [147] szoftverrel történt, az adatok nyírását, vagyis a rossz minőségű leolvasásokat illetve az Illumina adapterszekvenciák eltávolítását a Trimmomatic szoftverrel végeztük [148]. A szekvencia illesztés a GRCm38.p6 referencia genomra BWA programmal történt [149]. A mutációk azonosításához a GATK szoftvercsomagba tartozó HaplotypeCaller-t használtuk, további annotáláshoz a dbSNP adatbázist (egér dbSNP142) alkalmaztuk. SNV-k (single nucleotide variants) szűrését minimum 10x lefedettség mellett végeztük és COSMIC adatbázis alapján csoportosítottuk. A homozigóta és heterozigóta mutációk meghatározását, a 30 COSMIC v2 mutációs mintázatokra újraillesztve, deconstructSigs R szoftvercsomaggal végeztük [150] alapbeállítások mellett. A kópiaszám változások becslése (16 kb méretű „bin”-ekre osztva) goleft indexcov szoftveverrel történt [151], ploiditás predikciója

szakaszonként konstans illesztéssel történt rpart R csomagot használatával [152]. A *K14cre;Brca1^{F/F};p53^{F/F}* egér [124] tumorokhoz tartozó kópiaszám profilokat a GEO (Gene Expression Omnibus) adatbázisból töltöttük le (GSE122076); ploeditási szint predikciója az aCGH (microarray-based comparative genomic hybridization) adatok szakaszonként konstans illesztésével történt, a ploeditási szintek minden próba esetében külön lettek átlagolva. A projekt során elemzett teljes genom szekvencia elérhető az Európai Nukleotid Archívumában (European Nucleotide Archive). Hozzáférési szám: PRJEB36418.

4.12. Citotoxicitási tesztek és felhasznált vegyületek

A sejtek viabilitását PrestoBlue® reagenssel (Life Technologies) mértük a gyártó által megadott protokoll szerint. Röviden, a sejteket 96-lyukú mikrolemezeken tenyésztettük, majd a letapadást követő 24 órán belül a sejteket kezeltük, 120 órás inkubációt követően a sejteket 5%-os PrestoBlue®/PBS oldatban inkubáltuk, majd a viabilitást spektrofotometriás módszerrel mértük EnSpire mikrolemez olvasóval (Perkin Elmer). A mért adatok elemzését Prism szoftverrel végeztük a szigmoidális dózis-válasz modellt alkalmazva és az IC₅₀ értékeket szigmoidális görbe illesztéssel határoztuk meg.

A citotoxicitási esszében használt vegyületeket az Accord Healthcare-től (ciszplatin, epirubicin), a Selleckchemtől (olaparib), a Sigma-Aldrich-től (paclitaxel, SN-38, doxorubicin), TEVA-tól (etoposide), Tocris-tól (veliparib), Merk-től (gemcitabine) és a MedChemExpress-től (talazoparib, rucaparib) szereztük be. A pegilált liposzomális doxorubicint (Doxil®/Caelyx®/PLD) a Janssentől szereztük be.

4.13. Lentivirális transzdukció

Második generációs lentivírus vektort és a csomagoló plazmidot (pMD2.G and psPAX2) az Addgene-től (Watertown, Massachusetts, USA) szereztük be. CST sejteket GFP-t (pRRL-EF1-eGFP-WPRE) vagy mCherry-t (pRRL-EF1-mCherry-WPRE) expresszáló lentivírus felülúszóval transzdukáltunk a következők szerint: lentivírus partikulumok előállításához HEK293T sejteket transzfektáltunk kalcium-foszfát ko-precipitációs módszerrel [153].

Röviden, az első napon 10 cm² Petri csészébe ültettünk ki 5×10^6 HEK293T sejtet, majd a következő napon kalcium-foszfát ko-precipitációval transzfektáltuk ezeket, 24 órával később pedig friss médiumot (KnockOut™ Serum Replacement oldattal kiegészítve) raktunk a sejtekre. A transzfekció után 48 órával a lentivírus partikulumokat tartalmazó vírusfelülűszót összegyűjtöttük és 0,45 µm szűrőn átszűrtük, majd -80°C-on tároltuk a további felhasználásig. A CST sejtek transzdukciója 6-lyukú lemezen történt, a transzdukció hatékonyságát áramlási citométerrel ellenőriztük. A lentivirális transzdukciót Kucsma Nóra végezte (TTK, Enzimológiai Intézet).

4.14. Áramlási citometria

A CST-mCherry tumorokat, eltávolítást követően, a 4.2. *Primer tumorsejtek izolálása, fenntartás* pontjában leírtak alapján emésztettük és sejtszuspenziót hoztunk létre. A sejtek szétválogatásához FACS Aria III cell szortert (BD Biosciences, San Jose, California, US) használtunk. EGFP fluoreszcencia méréséhez kék lézert használtunk (excitáció 488 nm, emisszió 530/30 nm) (FITC-A csatorna); az mCherry fluoreszcencia méréséhez sárga-zöld lézert (excitáció 561 nm, emisszió 610/20 nm) (PE-mCherry csatorna). Az áramlási citometriai adatok összegyűjtése és analízise FACSDiva 8.02 szoftverrel történt. A sejtek kiválogatását Dr. Várady György végezte (TTK, Enzimológiai Intézet).

4.15. Szérumkoncentráció mérés

A kísérletben résztvevő egereket intravénásan, egy alkalommal kezeltük DOX-nal (5 mg/kg) vagy PLD-vel (8 mg/kg). A kezelés előtt, majd azt követő 5, 15, 30, 60, 180, 360, 1440 és 2880 percben az állatoktól altatást követően szív punkcióval vérmintát gyűjtöttünk. A vérsavót centrifugálással szeparáltuk 4000 rpm-en, 15 percig 4°C-on. A felülűszót steril csőben, -20°C-on tároltuk a tömeg spektrometriai mérésig. A kontrollként használt DOX és PLD oldatokat metanol és víz 1:1 arányú keverékében oldottuk 1 mg/ml-es koncentrációban. A DOX törzsoldat vízzel történő tovább hígításával állítottuk elő a kalibráláshoz szükséges standard sorban (50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000 ng/ml) használt oldatokat. 100 µl

levett mintához 300 µl extrakciós oldószert (metanol) adtunk, az oldatot vortexeltük, majd 10 percig centrifugáltuk 13300 rpm fokozaton. A deproteinizált felülúszót (100 µl) 200 µl-es csövekbe töltöttük mérés előtt. Az LC-MS/MS analízishez egy electrospray módban működő Turbo V ionforrással (AB Sciex) és egy Perkin Elmer Series 200 mikroLC rendszerrel felszerelt QTRAP 6500 tripla négyszeres – lineáris ioncsapdás tömeg spektrométert használtunk. Az adatgyűjtést és feldolgozást az Analyst 1.6.2 szoftverrel végeztük (AB Sciex). A kromatográfiás elválasztás egy Agilent Zorbax SB C18 oszlopon (75 mm × 4,6 mm, 3,5µm) történt. A mintát A oldószer (0,1% hangyasav vízben) és B oldószer (0,1% hangyasav acetonitrilben) gradiensevel eluáltuk. Az áramlás sebességét 0,8 ml/percre állítottuk. A szeparáció először 1 percig 10% B oldószerrel történt, amit lineáris gradiens követett 90% B oldószerrel 4 percig. Az 5.-től a 8. percig maradt a 90% B oldószer, majd a 8 és 8,5 perc között a kezdeti kondíciókat állítottuk vissza, ami a 13,5. percig maradt. Az oszlopot szobahőmérsékleten tartottuk, az injekciós térfogat pedig 10 µl volt. A tömegspektrometriai méréseket Dr. Imre Tímea és Dr. Szabó Pál végezték (TTK, MS Metabolomika Kutatócsoport).

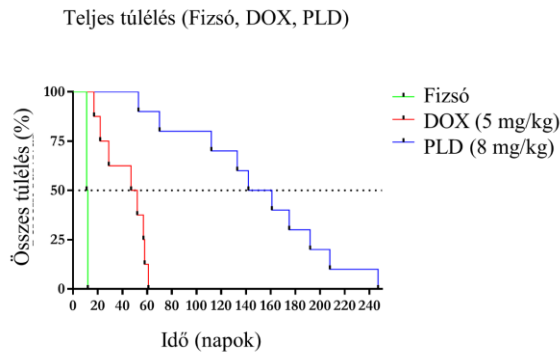
5. EREDMÉNYEK

5.1. Pegilált liposzómális doxorubicin (PLD) terápiás hatásának vizsgálata *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőtumor modellen

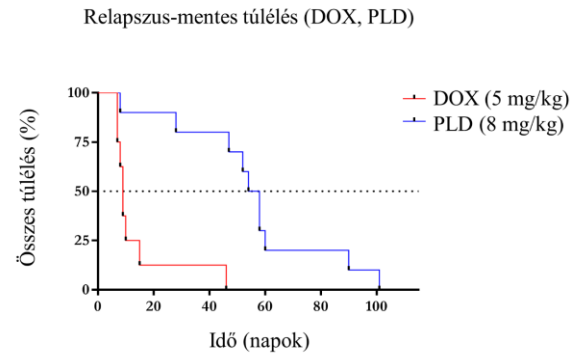
A PLD hatását több preklinikai tumor modellben (vastagbélrák, emlőrák, petefészekrák, tüdőrák, limfóma, leukémia, hólyag és prosztaták) is vizsgálták [70] doxorubicinnel összehasonlítva. A klinikai tanulmányok alapján a PLD és a DOX hatása metasztatikus emlőrák esetében megegyezőnek bizonyult [154], azonban *BRCA1*-deficiens emlőrtumorokon a PLD terápia hatása egyelőre nem ismert.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk *K14cre;Brcal*^{F/F}; *p53*^{F/F} egérmodellben kialakuló *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} tumorok PLD-re adott válaszát, ortotopikus transzplantáció révén vad típusú FVB egerek tejlécébe 1-2 mm átmérőjű tumordarabokat ültettünk. A 200 mm³ mérethatár elérését követően az állatokat maximálisan tolerálható dózisu DOX (8 állat, 5 mg/kg) vagy pegilált liposzómális doxorubicinnel (PLD) (10 állat, 8 mg/kg) kezeltük, illetve létrehoztunk egy kontroll csoportot is, mely fiziológiás sóoldatot kapott. A DOX kezelés az állatok medián túlélését 49.5 napra emelte a kontroll csoporthoz (fiziológiás sóoldat) képest, míg a PLD-vel történő kezelés hatására a medián teljes túlélés háromszorosára, 151.5 napra nőtt (6. ábra A) [155]. A PLD kezelés hatását a relapszus-mentes túlélésre a 6. ábra B része mutatja.

A

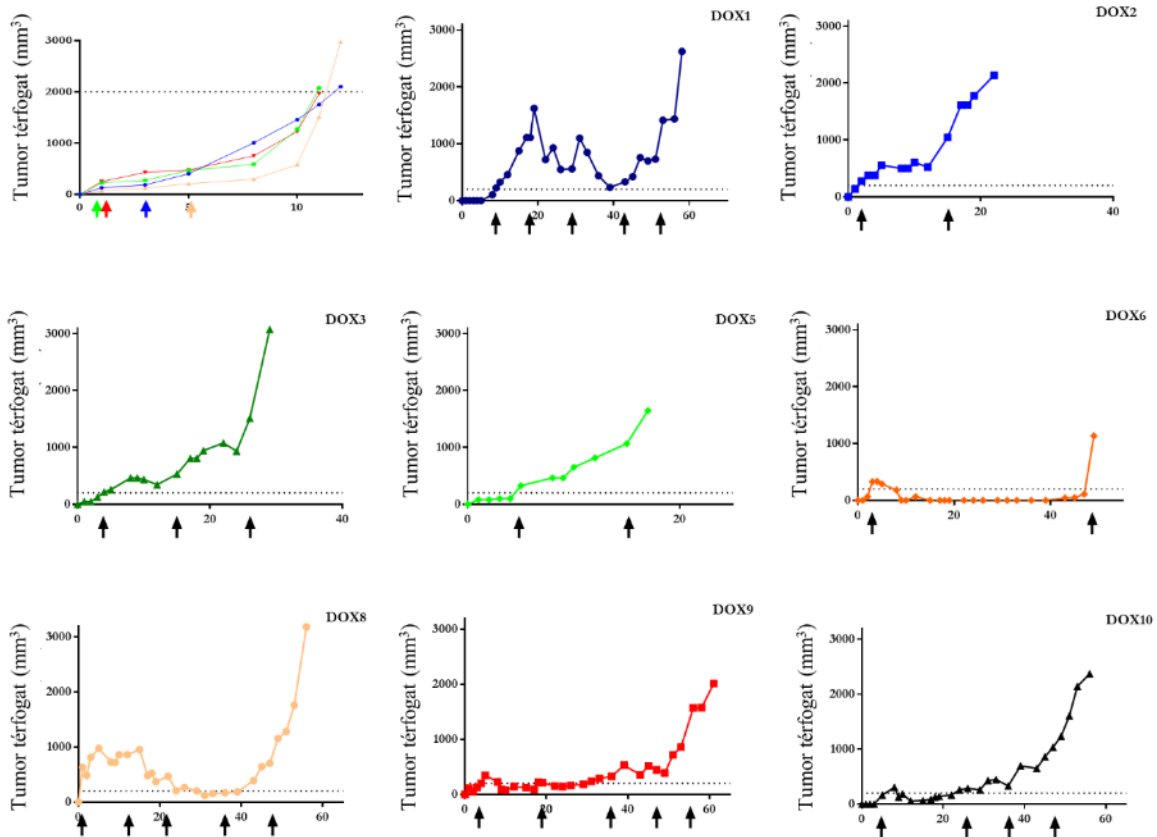


B



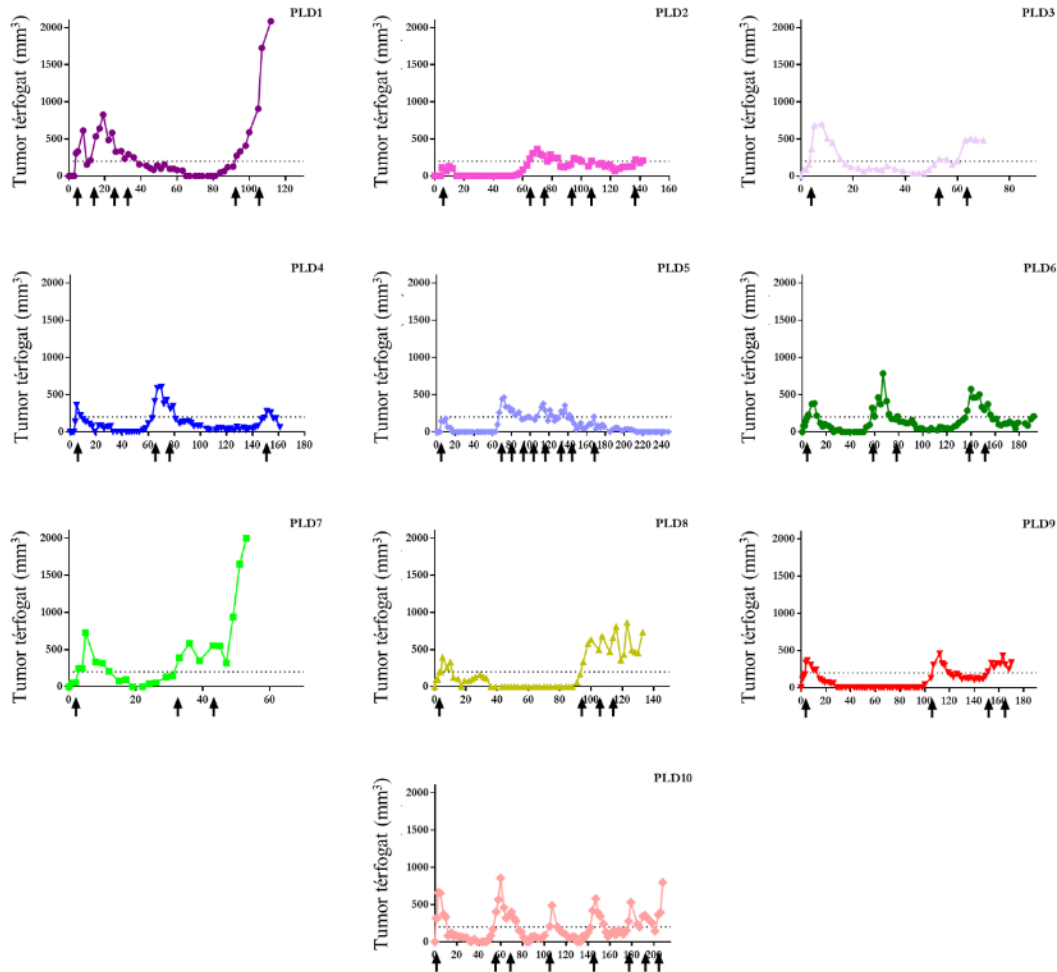
6. ábra DOX és PLD kezelés hatásának vizsgálata *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőtumor modellben. PLD hatására a teljes túlélés és a relapszus-mentes túlélés is szignifikánsan meghosszabbodott. A) DOX (5 mg/kg iv, n=8) és PLD (8 mg/kg iv, n=10) kezelt csoportok relapszus-mentes túlélése. B) A fiziológiás sóoldat (n=4), a DOX (5 mg/kg iv, n=8) és a PLD (8 mg/kg iv, n=10) kezelt csoportok teljes túlélése. [155]

A két vizsgált kemoterápiás szer hatása a tumorok növekedésére különböző volt, a DOX kezdetben képes gátolni a tumor méretének növekedését, azonban minden esetben kialakult a rezisztencia (7. ábra), mely során a kezelés hatástalanná vált, a tumorok nem reagáltak a kezelésre, méretük a kezelés ellenére folyamatosan nőtt, míg elérte a kritikus mérethatárt melynél az állatokat eutanáziában kellett részesítenünk.



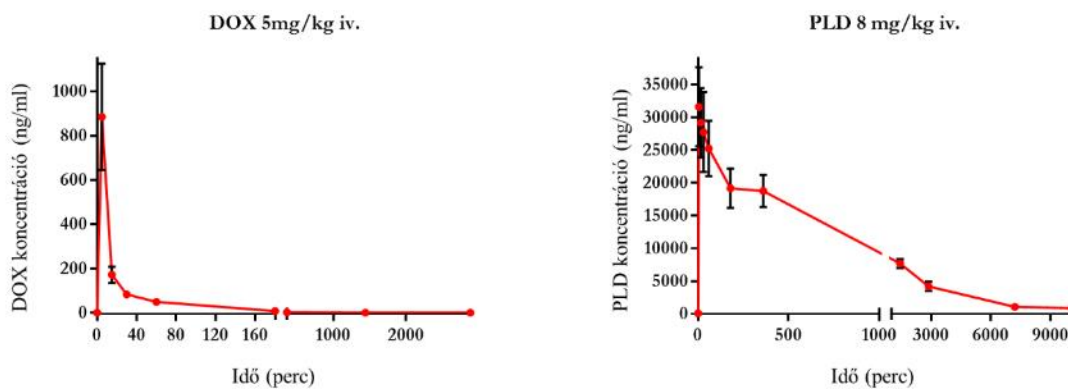
7. ábra DOX kezelés kezdetben képes lassítani a tumor növekedését, később azonban hatástalanná válik, kialakul a rezisztencia. Kontroll csoport: az egyedi tumorok növekedése látható, a színes nyilak jelzik a fiziológiás sóoldattal történő kezeléseket (bal felső ábra). DOX1-10 elnevezésű görbék, a doxorubicinnal kezelt állatokban az egyedi tumornövekedést mutatják, az elnevezés a kezelésre és az adott állat számára (1,2,3,5,6,8,9,10) utal. A doxorubicin kezelést a fekete nyilak jelzik (5mg/kg), az x tengelyen az idő (napok) látható. [155]

A PLD kezelés hatására a tumorméret csökken, megnövelve ezzel a relapszus-mentes és a teljes túlélést. PLD kezelésre tízből öt esetben kialakult részleges (PLD3, 8, 10) vagy teljes drog rezisztencia (PLD1, 7) (8. ábra). Kutatócsoportunk kimutatta továbbá a drog rezisztens (DOX és PLD esetén is) tumorokban a P-glikoprotein fehérjét kódoló *Abcb1a* és *Abcb1b* gének fokozott expresszióját [155].



8. ábra PLD kezelés hatására a tumor térfogata csökken, rezisztencia a vizsgált tumorok felében alakult ki. A PLD kezeléseket (8 mg/kg) a fekete nyilak jelzik, az x tengelyen az idő (napok) látható. [155]

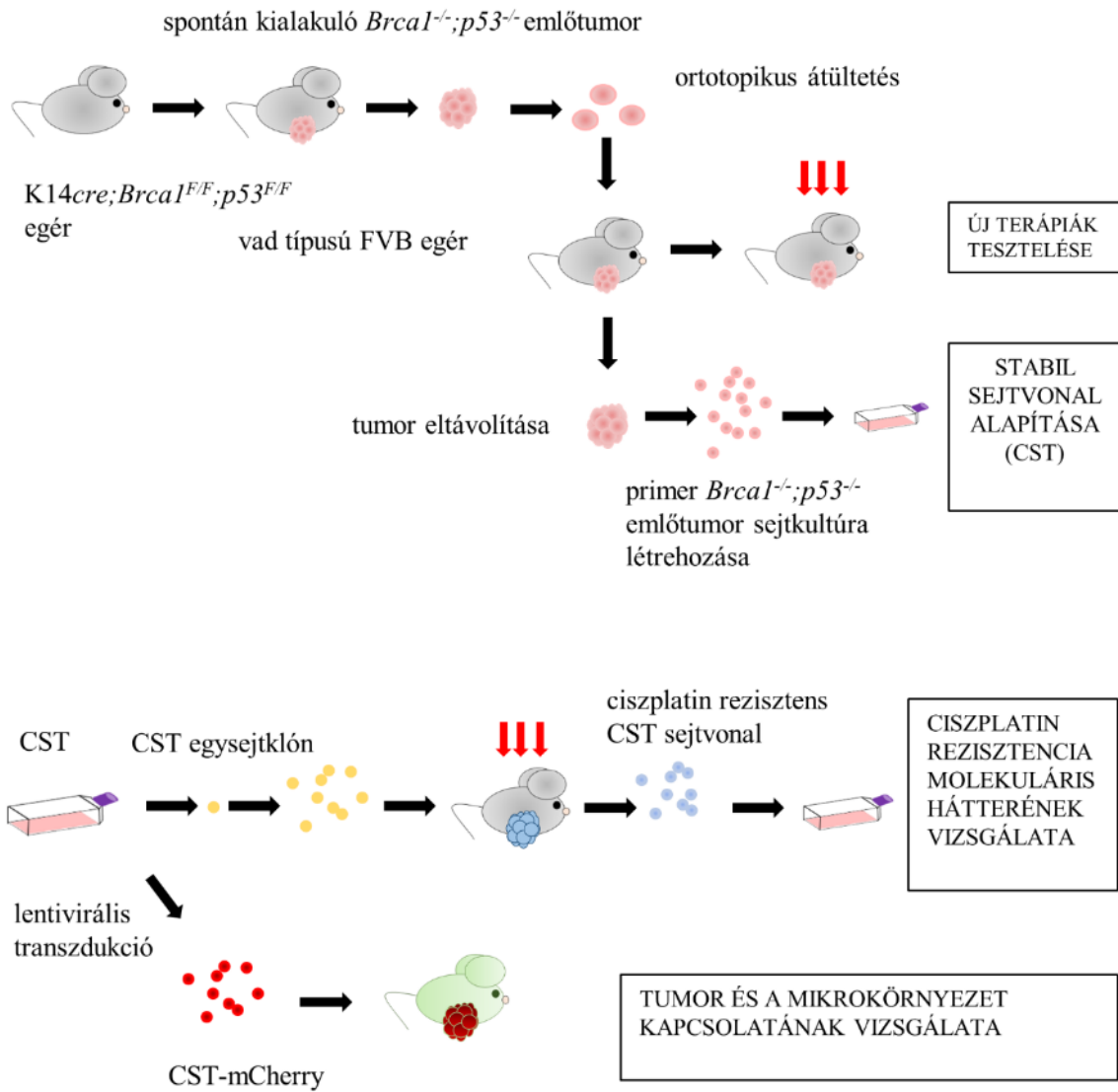
PLD hatékonyságának megértése céljából megvizsgáltuk a két vegyület farmakokinetikai tulajdonságait. A doxorubicin formulációja révén létrehozott PLD lehetővé tette a 60%-kal magasabb MTD alkalmazását, amely így a beadást követően 35-ször nagyobb maximális csúcs koncentrációhoz vezetett a beadás után 5 perccel (DOX koncentráció 885.67 ± 240 ng/μl, illetve PLD koncentráció 31600 ± 6023 ng/μl) (9. ábra). A beadást követően a DOX szintje hamar csökkenni kezdett, míg a PLD koncentrációja még 7 napon keresztül olyan magas maradt, amely a DOX maximális csúcs koncentrációjával összevethető. Így az AUC érték ~2600-szor magasabb volt a PLD esetében, mint a DOX-nál (4.47×10^7 vs 1.7×10^4 ng×h/ml). A PLD tehát magas koncentrációban adható és hosszú ideig marad a keringési rendszerben.



9. ábra A DOX és a PLD szérumszintje. Az egerek DOX (5 mg/kg) vagy PLD (8mg/kg) kezelését kaptak (0 óra) majd a különböző kezelőanyagok szérumszintjét az adott időpillanatban tömegspektroszkópia révén határoztuk meg. A pontok 3 különböző mérés átlagát jelölik \pm SD. [155]

5.2. Rezisztencia vizsgálata *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőtumor sejtvonalon

Munkánk során a következő célunk a *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} tumorokban kialakuló ciszplatin rezisztencia vizsgálata volt. A ciszplatin, széleskörben alkalmazott platina alapú kemoterápiás szer, melyet *BRCA1* mutációt hordozó tumorok kezelése során is használnak. Míg a klinikumban, a humán *BRCA1*-hiányos emlőtumorok ciszplatin kezelése a kezdeti sikereket követően, szinte minden esetben rezisztenciához vezet, addig a *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} egérmodellen végzett korábbi kísérletek során nem sikerült ciszplatin rezisztenciát kialakítani [133]. A ciszplatin rezisztencia molekuláris hátterének feltárásához a *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőtumorból sejtvonalat alapítottunk, melyet karakterizáltunk, majd, egysejt klónok létrehozásával kialakított homogén populáció révén lehetőséget teremtettünk a ciszplatin kezelés hatására kialakuló genetikai változások részletes tanulmányozására teljes genom szekvenálás által. A munkafolyamatot a 10. ábra foglalja össze.

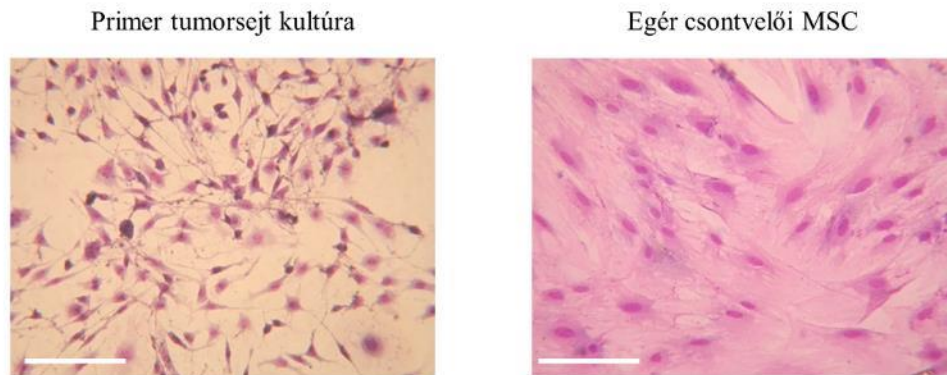


10. ábra $K14cre;Brca1^{F/F};p53^{F/F}$ egérmodellből származó $Brca1^{-/-};p53^{-/-}$ egér emlőtumor alkalmazására épülő kísérleti rendszerünk sematikus összefoglaló ábrája.

5.2.1. *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőtumor sejtek és egér csontvelői mesenchymalis őssejtek izolálása

A ciszplatin rezisztencia molekuláris hátterének vizsgálatához az első lépés a stabil sejtvonal létrehozása volt. A sejtek izolálásához, az ortotopikus transzplantáció révén létrehozott, *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} emlőtumorok 20-30 nap elteltével elérték a 200 mm³ méretet, ekkor az állatokat eutanáziában részesítettük, a tumorokat kiműtöttük. A tumorokat nagyjából 5 mm³-es darabokra vágtuk, majd kollagenázt és diszpázt tartalmazó emésztő médiummal (DMEM) 37°C-on, folyamatos vortexeléssel emésztettük, majd a sejtuszpenziót tenyésztő edényben szélesztettük.

A le nem tapadó sejteket médiumcserével eltávolítottuk. A kezdeti heterogén sejtpopuláció egyaránt tartalmazott nagyobb méretű, fibroblaszt-szerű morfológiát mutató stróma sejteket és kisebb, gyorsan osztódó tumorsejteket. 3-4 hét elteltével homogén, tumorsejteket tartalmazó kultúrát kaptunk (11. ábra). Az izolált tumorsejteket szeretnénk volna összehasonlítani egészséges egér sejtekkel, ezért mesenchymalis őssejteket (MSC) izoláltunk vad típusú FVB egerek csontvelőjéből (lásd Anyagok és Módszerek). Az izolált MSC-k 100% konfluenciánál kisebb denzitásban kiterülő, hosszú nyúlványokat képező sejtek (11. ábra).



11. ábra Primer *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} tumorsejt kultúra (3 hét tenyésztést követően) és az egér csontvelői mesenchymalis őssejtek morfológiája (Giemsa festés).

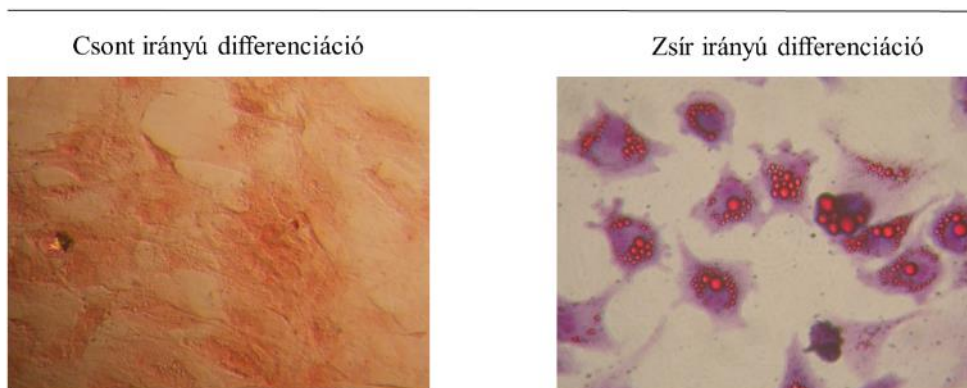
5.2.2. Az izolált egér csontvelői mesenchymalis őssejtek jellemzése

Az MSC-k izolálását a Peister és munkatársai [146] által leírt módszerrel végeztük (lásd Anyagok és Módszerek). A mesenchymalis stróma sejtek meghatározására 2006-ban az International Society for Cellular Therapy (ISCT) három kritériumot fogalmazott meg [156]: a sejtek a tenyésztőedény aljához kitapadva növekednek (adherensek) és fibroblaszt-szerű morfológiát mutatnak; CD44, CD73, CD90 és CD105 expressziót mutatnak, de nem hordoznak semmilyen, vérből származó ősejtekre, a különböző vörösvérsejtfejlődési sorokra, illetve az endotél sejtekre jellemző felszíni markereket; valamint csont-, porc- és zsírsejteké egyaránt képesek differenciálódni in vitro [156]. A humán MSC-kre meghatározott kritériumok az egér sejtekre is alkalmazhatók, annyi különbséggel, hogy az egér MSC-k marker mintázata a humánétól eltérő [157]. Az általunk izolált egér MSC-k műanyagra letapadtak és osztódtak, nem expresszálnak FLK1(VEGFR2) endothel sejt markert, F4/80 makrofág markert és CD90.1 T-limfocita markerre is negatívak, pozitívítást mutatnak viszont a következőkre: Sca-1 (őssejt antigén-1), CD24, CD44, CD73 (4. táblázat). Valamint képesek differenciálódni zsír- és csontirányba (12. ábra).

4. táblázat Egér MSC-k marker mintázata.

Vizsgált markerek								
	CD44	CD90.1	CD24	CD73	FLK1	F4/80	SCA1	CD146
MSC	+	-	+	+	-	-	+	-

Egér csontvelői MSC kultúrák

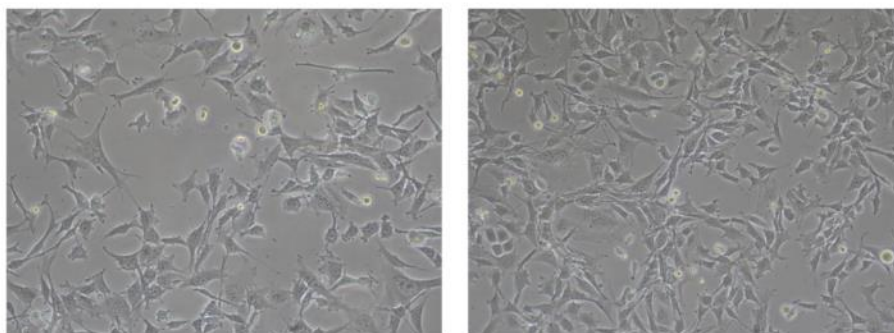


12. ábra Az egér MSC kultúra *in vitro* csont és zsírsejt irányú differenciációja. A csont irányú differenciáltatott MSC kultúrákban a felhalmozódó kalciumot Alizarin Red festéssel mutattuk ki (bal oldali kép), a zsírsejt irányba differenciáltatott MSC-ben a kialakuló lipidcseppeket a pedig Oil Red O festékkel tettük láthatóvá (jobb oldali kép).

5.2.3. *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőtumorból stabil sejtvonal (CST) létrehozása

A tumorsejt kultúrát, mely a következő hónapok során folyamatosan osztódó, stabil sejtvonallá vált, a CST-nek neveztük el. A CST sejtek morfológiája a primer tenyészetéhez képest eltérő, a sejtek mesenchymalis sejtekre jellemző morfológiát mutatnak (13. ábra).

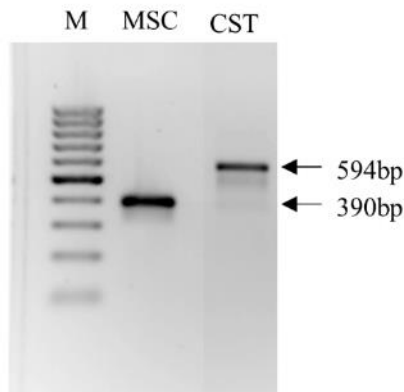
CST sejtvonal



13. ábra CST sejtvonal morfológiája (reprezentatív fotó). A képek 10x objektívvel, Eclipse TS100 inverz mikroszkóppal készültek.

5.2.4. A CST sejtek genetikai hátterének igazolása

A CST sejtek tumor eredetének igazolása céljából megvizsgáltuk a *Brcal* gén delécióját, hiszen az eredeti tumor a *Brcal* és a *p53* deléciója következtében alakul ki. A deléció továbbá a kondicionális génkiütés következtében szövetspecifikus, a CK14⁺ hámsejtekben történik meg. A detektáláshoz 4 különböző primert használtunk. A PCR-t követően a mintákat 1% agaróz gélen futtatva a P1-P4 primerek 594bp hosszúságú terméke a deletált *Brcal* allél jelenlétét igazolta a CST sejtekben, míg a kontrollként használt MSC sejtekben a vad típusú *Brcal*, a P1-P2 primerek 390bp hosszú terméke volt kimutatható (14. ábra).



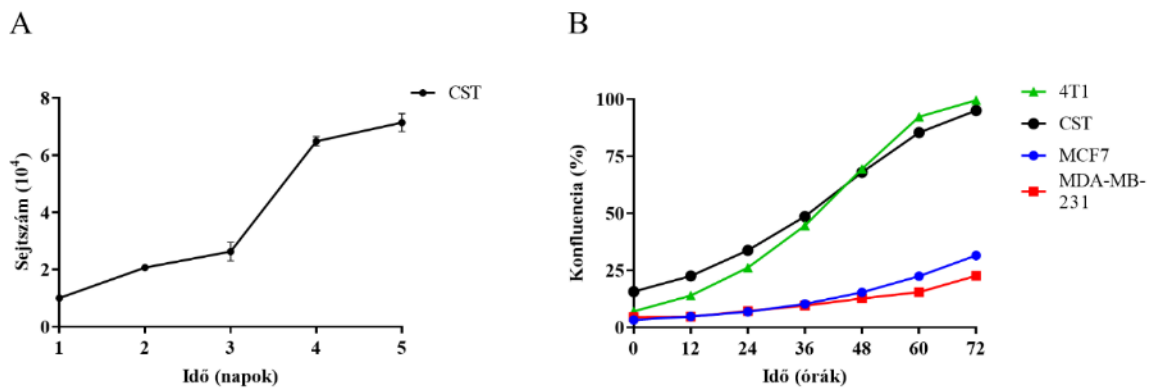
14. ábra A CST sejtvonal *Brcal* deléciót hordoz. A CST sejtekben a deletált *Brcal* allél jelenlétét a hosszabb 594bp hosszúságú primer termék igazolta, míg a kontrollként használt egér csontvelői MSC sejtekben (MSC) a rövidebb (390bp) primer termék volt kimutatható, mely a vad típusú *Brcal* jelenlétét jelzi. M – marker.

5.2.5. A létrehozott *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} (CST) sejtvonal karakterizálása

A mesenchymalis morfológiájú, de igazoltan epithelialis háttérrel rendelkező CST sejtvonalak karakterizálása során azt vizsgáltuk, hogy a CST sejtek milyen mértékben ötvözik a tumorsejtek jellemzőit (gyors osztódás, invazív fenotípus stb.), a mesenchymalis sejtek tulajdonságaival (mesenchymalis markerek, motilitás). A CST karakterizálás során kontrollként humán (MCF7, MDA-MB-231) és egy egér (4T1) emlőtumor sejtvonalat is vizsgáltam.

5.2.5.1. A CST sejtek a tumorsejtekre jellemzően gyorsan osztódnak

A CST sejtek növekedését két különböző módszerrel is megvizsgáltuk. A kétszerezési idő (DT: doubling time) kiszámításához a sejteket 6-lyukú lemezre ültettük ki, majd a második naptól kezdve naponta megszámloltuk (15. ábra A). A CST sejtek kétszereződési ideje 34 óra. A konfluencia változás megállapítására videomikroszkópia alapján növekedési görbét vettünk fel és megállapítottuk, hogy a humán emlőtumor sejtvonalakhoz képest, amelyek 72 óra alatt alig érték el a 25%-os konfluenciát a CST sejtek gyors osztódásuk révén 3 nap alatt elfoglalták a rendelkezésre álló teret (15. ábra B). A 4T1 sejtek szintén gyorsan osztódtak.

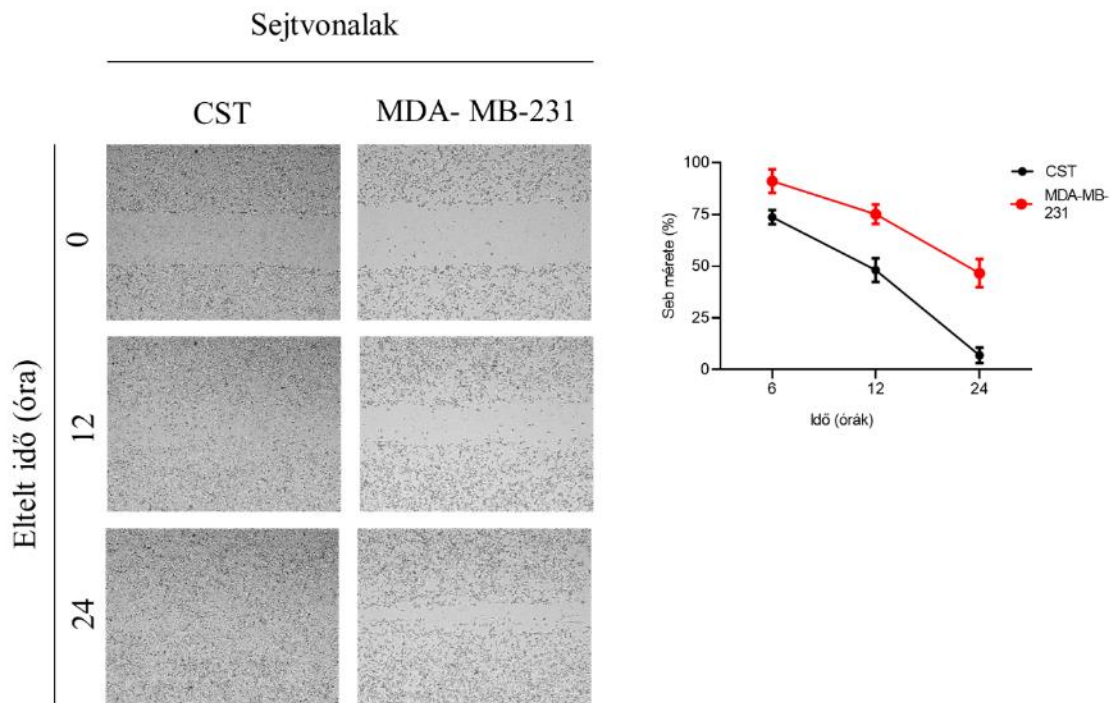


15. ábra CST sejtek növekedési görbéi. A) CST sejtek növekedésének görbéje sejtszámlálás révén. B) CST sejtek növekedésének összehasonlítása humán (MCF7, MDA-MB-231) és egy egér (4T1) emlőtumor sejtvonallal videomikroszkópia segítségével számított konfluencia alapján 72 órán keresztül. Videomikroszkóp: JuLi Stage Real-Time Cell History Recorder (NanoEnTek).

5.2.5.2. A CST sejteket fokozott motilitás jellemzi

A CST sejtek motilitásának vizsgálatára sebgyógyulás (wound healing) esszét használtunk, mely során egy vékony vonalat karcolunk a konfluens sejtenyészetbe és 24 órán keresztül video mikroszkóp segítségével detektáltuk a karcolt „seb” méretének változását. A CST sejtek fokozott motilitását humán mesenchymalis emlőtumor sejtvonallal (MDA-MB-231)

hasonlítva igazoltuk. A CST sejtek 24 óra alatt a karcolt területre vándoroltak, amely sebzáródáshoz vezetett, míg az MDA-MB-231 sejtek esetében 1 nap alatt a „seb” mérete 50%-ra csökkent (16. ábra).

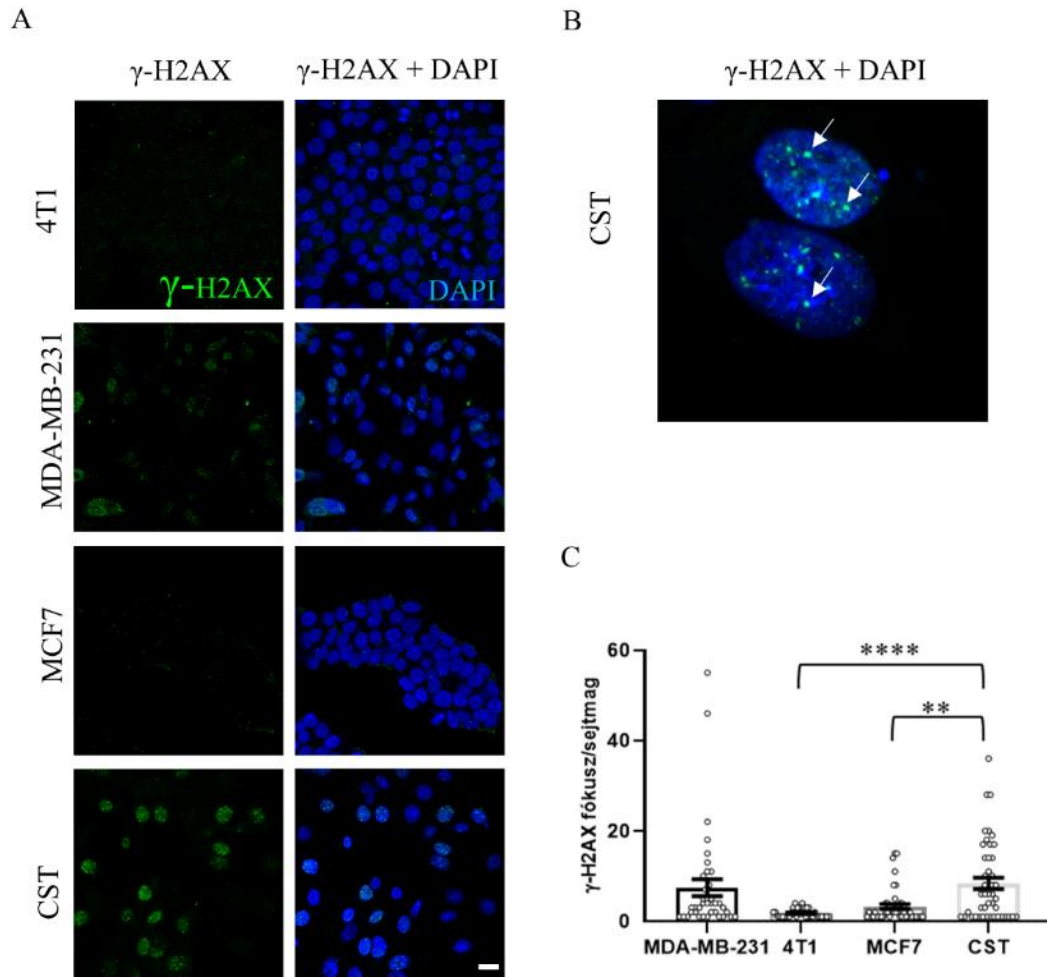


16. ábra A CST sejteket fokozott motilitás jellemzi. A sejtek motilitását videomikroszkópia segítségével vizsgáltuk. A konfluens CST és MDA-MB-231 konfluens tenyészetekbe karcolt „sebről” fényképet készítettünk, majd a „seb” méretének csökkenését ábrázoltuk. Videomikroszkóp: JuLi Stage Real-Time Cell History Recorder (NanoEnTek).

5.2.5.3. A CST sejtvonal genomjában nagyszámú kettős szálú DNS törés mutatható ki

A DNS kettős lánc-törések kimutatására foszforilált-H2AX fehérje (γ -H2AX) immuncitokémiai kimutatását, majd kvantifikálását végeztük el. A DNS két szálát érintő törés esetén a H2AX (H2A hiszton változata) C-terminálisának 139-ik szerinjén foszforilálódik és a törés helyén fókuszokba tömörül [158], így a γ -H2AX fókuszok mennyisége, a kettős szálú törések számával összefüggésbe hozható. A γ -H2AX fókuszok magas száma detektálható a CST sejtekben, amely a HR hiányával, így a kettős szálú DNS

törések felhalmozódásával magyarázható (17. ábra). A CST sejtekben az MCF7 és a 4T1 sejtekben mérthez képest szignifikánsan magasabb volt a fókuszok száma, míg az MDA-MB-231 sejtekben kimutatott nagy számú γ -H2AX fókusz a p53 mutációval magyarázható [159].

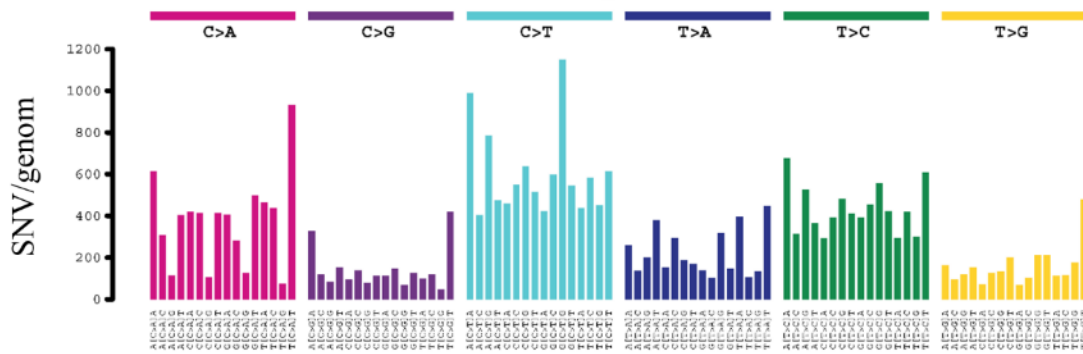


17. ábra A CST sejtekben magas a γ -H2AX fókuszok száma a vizsgált sejtvonalakhoz képest. A) γ -H2AX (zöld) immuncitokémiai jelölése CST, MCF7, MDA-MB-231 és 4T1 sejtekben. Sejtmag jelölése DAPI-val (kék) történt, mérce = 20 μ m. B) A γ -H2AX fókuszok (zöld) CST sejtmagokban (DAPI – kék). 15x nagyított kép. C) A γ -H2AX fókuszok számának kvantifikálása CST, MCF7, MDA-MB-231 és 4T1 sejtekben. A fókuszok számszerűsítését ImageJ FindFoci alkalmazásával végeztük. Az oszlopok a fókuszok átlagát \pm SEM mutatják, a pontok az egyedi fókusz számokat/sejtmag. A statisztikai analízishez Student's unpaired t-tesztet végeztünk, **: $p < 0,01$ és ****: $p < 0,0001$.

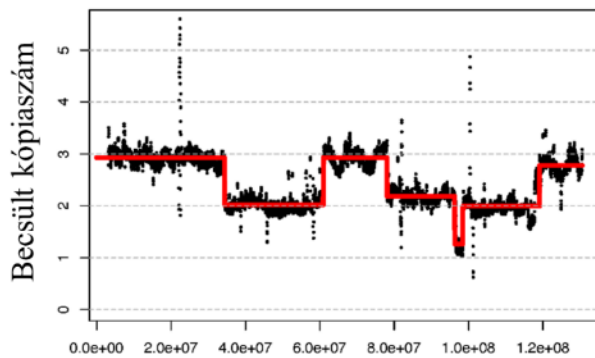
5.2.6. A CST sejt vonal instabil genommal rendelkezik és BRCA1-hiányos sejtekre jellemző mutációs mintázatot mutat

Teljes genom szekvenálás révén további bizonyítékokra tettünk szert a CST genomjának instabilitásáról. A genom DNS preparálását a CST-ből létrehozott egysejt klónból végeztük, a szekvenálás Illumina HiSeq X Ten készülékkel történt (átlag lefedettség 32). 125415 pont mutációt, 383672 indelt azonosítottunk. FVB egér genomjával összehasonlítva a CST genomot, kimutattuk a SNV-k magas számát és a gyakori kópiaszám változást (copy number variations = CNV) (18. ábra A, B). Az SNV-k további analizéséhez, a mutációs spektrum meghatározásához a daganatokra jellemző szomatikus mutációkat tartalmazó adatbázist, a COSMIC-ot használtuk. Megállapítottuk, hogy a HR elégtelen működésére jellemző mutációs mintázatok (signature) [160] jelen vannak (signature 3 és signature 8), akárcsak a különböző tumorokban, köztük emlőrák esetében is kimutatható, oxidatív stresszt jelentő signature 18 (18. ábra C).

A

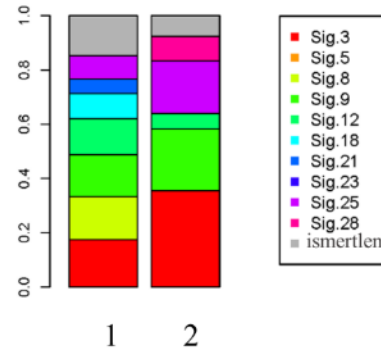


B



Pozíció a 10-es kromoszóma mentén

C



18. ábra CST sejtek genom analízise. A) Heterozigóta mutációk triplet bázisszubsztitúciós spektruma CST sejtekben. B) Kópiaszám változás és kromoszóma instabilitás a 10-es kromoszómán. C) Mutációs mintázatok a CST-ben, a COSMIC adatbázis alapján, heterozigóta (1) és homozigóta (2) SNV-k esetében.

5.2.7. A CST sejtek drog érzékenysége a Brca1-hiányos sejtekéhez hasonló

A CST sejtek drog érzékenységét in vitro citotoxicitási esszével teszteltük, majd a PrestoBlue esszével megállapított IC_{50} értékeket a szakirodalomban megtalálható maximális plazma koncentrációkkal vetettük össze (5. táblázat). A tesztelt vegyületek különböző hatásmechanizmussal rendelkező kezelőanyagok közül kerültek ki: topoizomeráz gátlók (SN38, doxorubicin, etopozid, epirubicin), mikrotubulus működését befolyásoló vegyületek (paclitaxel), antimetabolitok (gemcitabin), platina vegyületek (ciszplatin) és négy PARP

inhibitor (olaparib, veliparib, talazoparib, rucaparib). A CST sejtek az összes tesztelt vegyületre érzékenynek bizonyultak (az IC₅₀ értékek 0.02-1.2µM között voltak), *Brcal*-hiányuk miatt a vártak megfelelően a platina vegyületek közé tartozó ciszplatinra és a PARP inhibitorokra nagyobb érzékenységet mutattak.

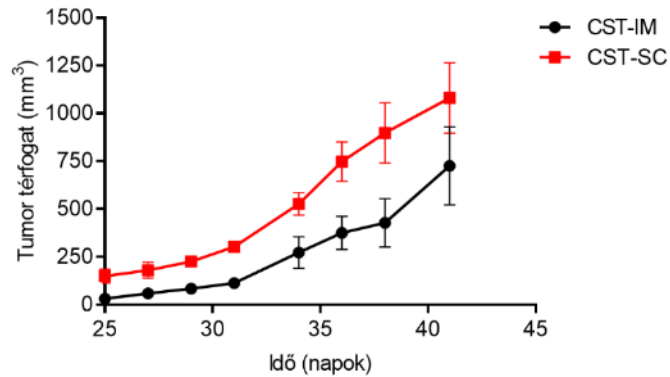
5. táblázat CST sejteken vizsgált kemoterápiás szerek IC₅₀ értékei és maximális plazmakoncentrációja [161-163].

<i>Tesztelt vegyületek</i>	<i>IC₅₀ (µM)</i>	<i>C_{max} (µM)</i>
<i>Doxorubicin</i>	0.2	6.73
<i>Ciszplatin</i>	1.1	14.40
<i>Epirubicin</i>	0.1	16.60
<i>Paclitaxel</i>	1.2	4.24
<i>Etopozid</i>	0.2	33.40
<i>SN38</i>	0.01	0.14
<i>Gemcitabin</i>	0.1	89.30
<i>Olaparib</i>	0.5	13.10
<i>Veliparib</i>	4.4	7.04
<i>Rucaparib</i>	0.2	6.00
<i>Talazoparib</i>	0.007	0.036

5.2.8. A CST sejtek tumorképző potenciáljának vizsgálata

A CST sejtek tumorképző potenciálját megvizsgáltuk hetero- és ortotopikus transzplantáció révén is. A CST sejteket (1.5×10^6) származási szövetüktől eltérő és azzal megegyező helyre GFP-t expresszáló FVB egér (FVB.Cg-Tg(CAG-EGFP)B5Nagy/J bőre alá (subcutan (SC)) és emlőjébe (intramammary (IM)) is beültettük. A CST sejtek a beültetés helyétől függetlenül, 100% tumorigénnek bizonyultak. A kialakuló tumorok növekedését a 19. ábra mutatja.

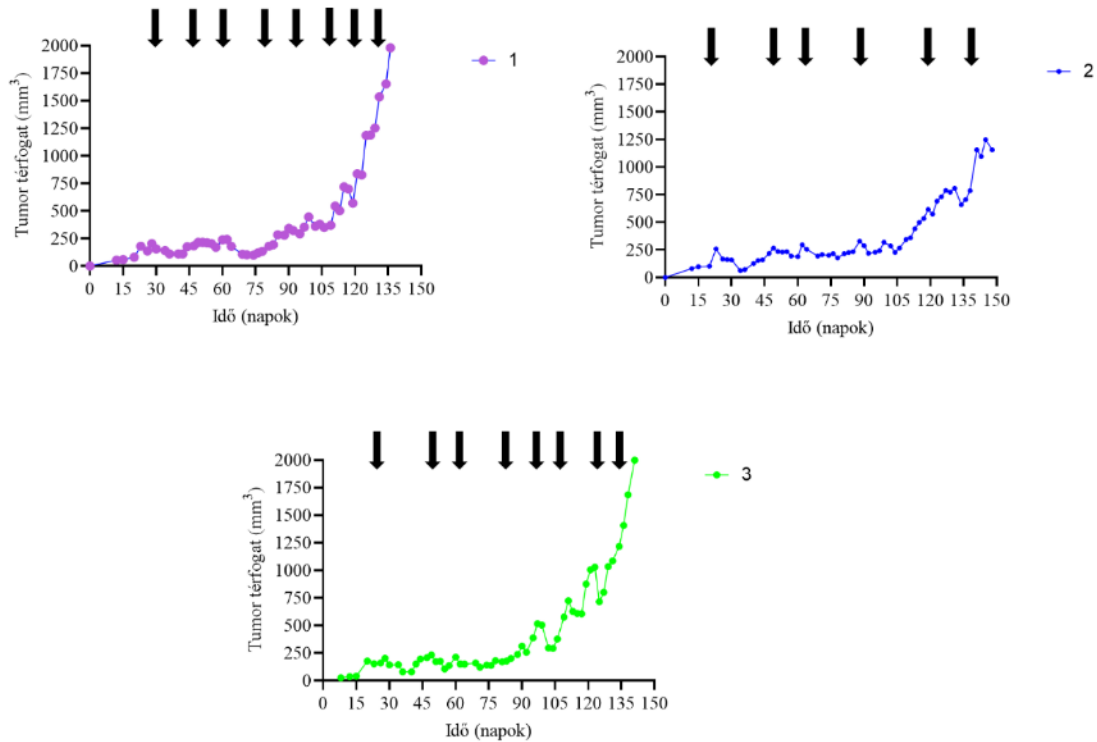
CST sejtek tumorképző potenciálja



19. ábra A CST sejtek a beültetés helyétől függetlenül megőrizték tumorképző potenciáljukat. CST sejtek GFP-t expresszáló FVB egér emlőjébe (IM) és bőr alá (SC) ültetve is tumort hoztak létre. A görbék a tumor térfogatának változását mutatják az idő függvényében, az adatok a tumorméretetek átlagát \pm SEM mutatják, $n=5$.

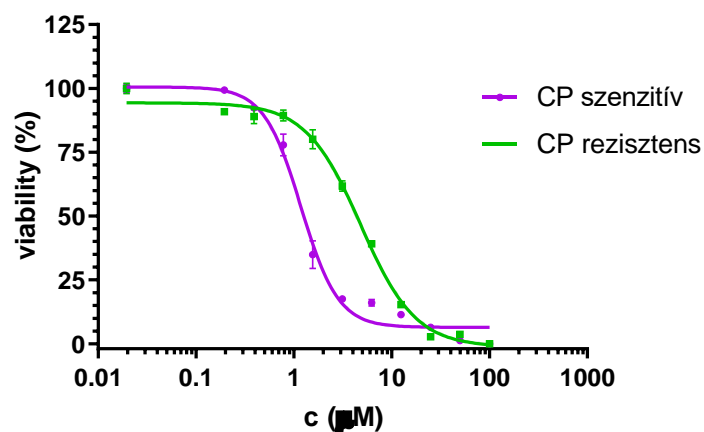
5.2.9. A CST sejtekből kialakuló tumorok ciszplatin kezelés hatására rezisztenssé válnak

Humán betegek esetében ciszplatin kezelés hatására az esetek nagyrésztében kialakul a rezisztencia, ezt azonban a *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} tumorok esetében nem sikerült reprodukálni. A CST sejtvonal megalapításával lehetőségünk nyílt arra, hogy *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} tumorsejtből kialakuló tumorokon teszteljük a ciszplatin hatását, és az esetlegesen kialakuló rezisztencia mögött álló genetikai és epigenetikai folyamatokat is feltárhassuk. A CST sejtekből egysejt klónokat hoztunk létre majd GFP-t expresszáló FVB egerekben, emlőtumorok kialakulását indukáltuk, a tumorokat pedig a Rottenberg és munkatársai által használt protokoll [133] alapján MTD ciszplatinnal kezeltük. Az egysejt klónokból kialakuló CST tumorok (1, 2, 3) 8 illetve 6 ciszplatin kezelés hatására rezisztenssé váltak (20. ábra). A 6 kezelésben részesülő 2-es állat tumorának mérete ugyan nem érte el a 2000 mm³-t viszont az állat testsúlya folyamatosan csökkent, ezért döntöttünk a terminálás mellett.



20. ábra Ciszplatin rezisztencia kialakulása CST egysejt klónból létrejövő emlőtumorokban. A CST egysejt klón felszaporítását követően 1.5×10^6 sejtet ültettünk be GFP-t expresszáló FVB egerek emlőszövetébe, majd 6 mg/kg ciszplatinnal kezeltük az állatokat. A tumorok 8 (1-es, 3-as) illetve 6 (2-es) kezelés hatására rezisztenssé váltak ciszplatinra. A kezeléseket a fekete nyilak jelzik. (Hámori et al., előkészületben)

A ciszplatin rezisztens CST tumorokat ezután műtéti úton eltávolítottuk, az állatokat pedig eutanáziában részesítettük. Az in vivo ciszplatin kezelés hatására rezisztenssé vált tumorokból primer kultúrát hoztunk létre és in vitro citotoxicitási esszével bizonyítottuk, hogy a ciszplatin terápiára már nem reagáló tumorokból alapított sejtvonalak in vitro körülmények között is megtartották ciszplatin rezisztenciájukat (21. ábra).



21. ábra Ciszplatin koncentráció-hatás görbéje ciszplatin rezisztens (CP rezisztens) és szenzitív (CP szenzitív) sejteken. (Hámori et al., előkészületben)

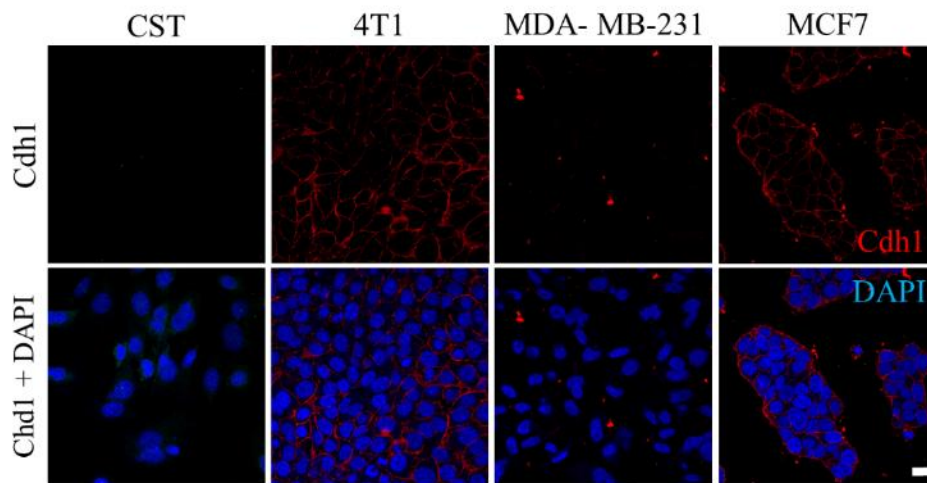
A kialakult ciszplatin rezisztencia mögött álló molekuláris mechanizmusok tanulmányozására, amennyiben azokat mutáció okozza, genom szekvenálás révén lehetőségünk nyílik. Létrehoztunk tehát egy új, in vivo indukált ciszplatin rezisztencia modellt, mely lehetőséget biztosít a ciszplatin rezisztencia további vizsgálatára a későbbi kutatások során.

5.3. Az EMT-MET vizsgálata a létrehozott CST sejtvonalon

A rezisztencia kialakulásában jelentős szerepet játszik a tumorsejtek plaszticitása. A CST sejtek mesenchymalis morfológiája, fokozott motilitása, tumorképző potenciáljának megőrzése, osztódó képessége, valamint a genetikai instabilitás mind arra engednek következtetni, hogy a CST sejtek őssejtekre jellemző tulajdonságokkal rendelkeznek, így akár differenciálódni is képesek, illetve MET révén akár az eredeti, epithelialis sejtekre jellemző morfológiát is visszanyerhetik.

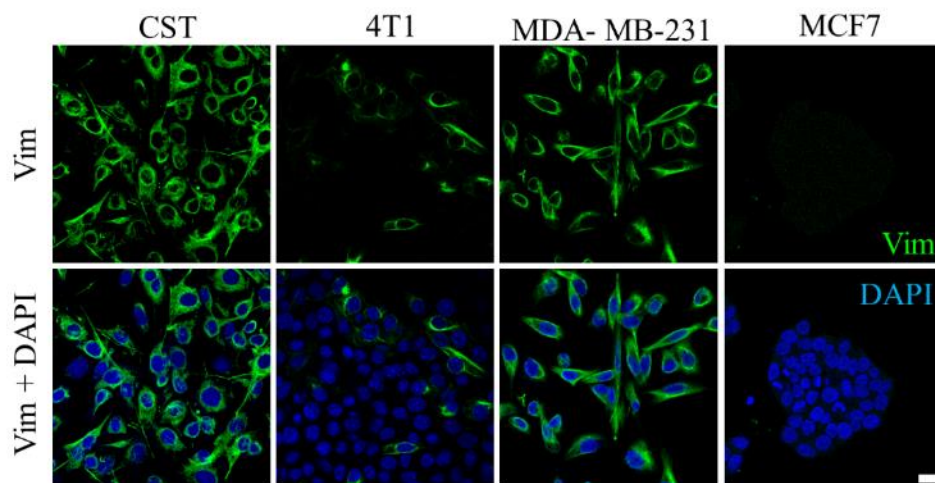
5.3.1. A CST sejtek mesenchymalis markereket expresszálnak

A CST sejtek mesenchymalis karakterisztikájának további igazolása céljából, immuncitokémia segítségével megvizsgáltuk a CST sejtek expressziós mintázatát. A vizsgálatokat humán és 4T1 egér emlőtumor vonalakon is elvégeztük, Cadherin-1 (Cdh1) más néven E-cadherin háms sejtekre jellemző marker expressziót a CST sejteken nem tudtunk detektálni, 4T1 és MCF7 epithelialis morfológiájú sejteken viszont kimutattuk ezek jelenlétét (22. ábra).



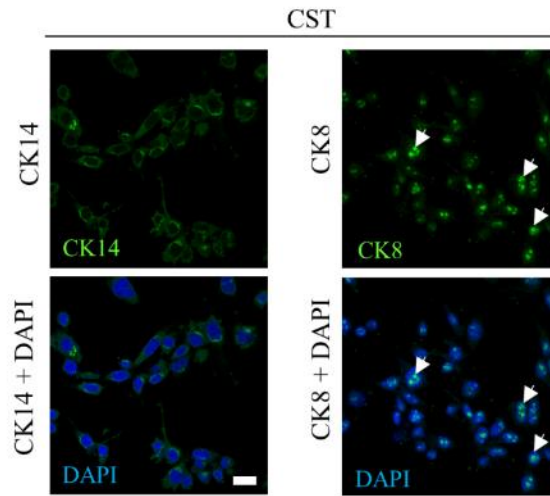
22. ábra A CST sejtek nem expresszálnak E-cadherint. E-cadherin (Cdh1 - piros) immuncitokémiai jelölése CST, MCF7, MDA-MB-231 és 4T1 sejtekben. Sejtmag jelölése DAPI-val (kék) történt, mérce = 20 μ m.

Mesenchymalis sejtekre jellemző intermedier filamentum, a vimentin expressziója ugyanakkor detektálható volt a CST és az MDA-MB-231 sejtekben is (23. ábra).



23. ábra A CST sejtek mesenchymalis sejtekre jellemző markert, vimentint expresszálnak. Vimentin (Vim - zöld) immuncitokémiai jelölése CST, MCF7, MDA-MB-231 és 4T1 sejtekben. Sejtmag jelölése DAPI-val (kék) történt, mérce = 20 μ m.

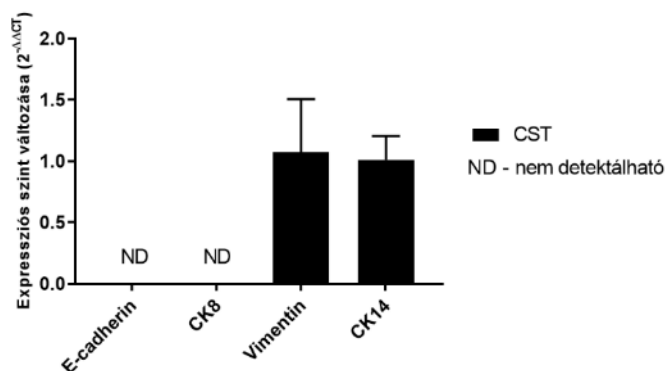
Megvizsgáltuk továbbá két epithelialis sejtekre jellemző intermedier filamentum, citokeratin 8 (CK8) és 14 (CK14) jelenlétét is CST sejtekben. CK8 expressziót érdekes módon a sejtmagban észleltünk (24. ábra).



24. ábra CST sejtek citokeratin expressziója. Immuncitokémiai jelölés alapján a citokeratin 14 (CK14) fehérje expresszió a CST sejtek citoplazmájában kimutatható, citokeratin 8 (CK8) viszont a sejtmagban lokalizálódik. Sejtmag jelölése DAPI-val (kék) történt, mérce = 20 μ m.

CST sejteken elvégeztük az E-cadherin, vimentin, CK8 és CK14 mRNS szintjeinek a vizsgálatát is, az expressziós szintek kiszámításához 4T1 sejtet használtunk kontrollnak. A kvantitatív Real-Time PCR eredményei az immuncitokémia során megfigyeltekkel egybecsengtek, a CST sejtekben a vimentin és a CK14 expresszió detektálható volt, míg E-cadherin és CK8 nem (25. ábra).

Epithelialis és mesenchyhalis markerek mRNS szintje CST
sejtekben



25. ábra Az *E-cadherin*, a *CK8*, a *CK14* és a *vimentin* mRNS expressziója CST sejtekben. A CST sejtek nem expresszálják *E-cadherint* és *CK8-t*, *CK14* és *vimentin* expresszió azonban kimutatható.

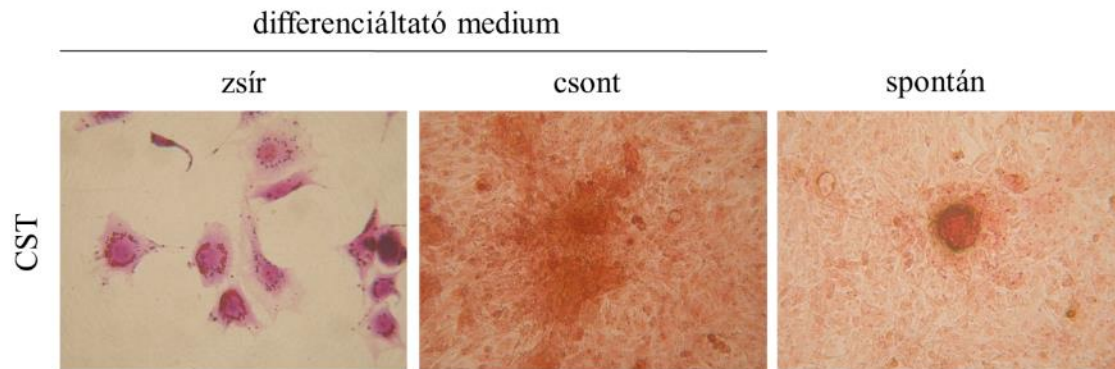
5.3.2. A CST sejtek differenciációs képességgel rendelkeznek

A hám eredetű tumorsejtek mesenchymalis fenotípusa mögött korai EMT állhat. Szakirodalmi adatok alapján az EMT révén létrejött sejtek és az MSC-k, marker mintázatukat tekintve számos egyezést mutattak [164, 165]. Ennek vizsgálata céljából összehasonlítottuk a CST sejtek marker mintázatát a korábban bemutatott, vad típusú FVB egér csontvelőjéből izolált MSC-kével. Ez alapján a CST sejtek expressziós mintázata az MSC-vel megegyezett, kivéve a CD146 expressziót (6. táblázat).

6. táblázat CST és MSC sejtek marker mintázata. (Hámori et al., előkészületben)

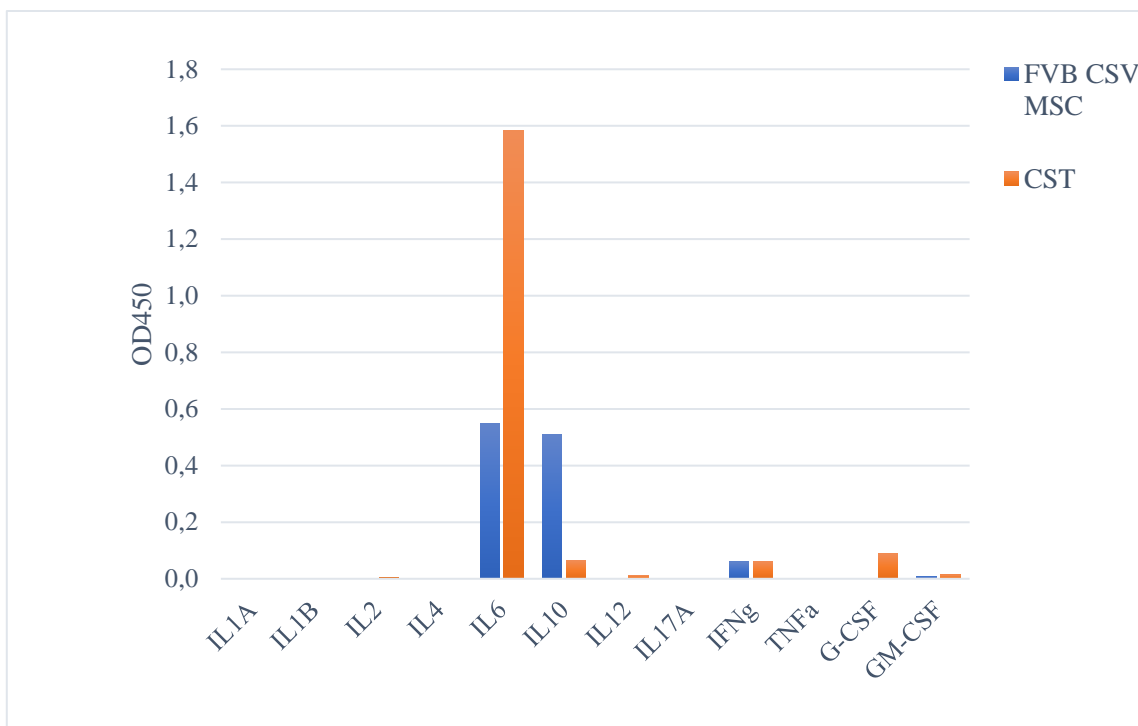
	Vizsgált markerek							
	CD44	CD90.1	CD24	CD73	FLK1	F4/80	SCA1	CD146
MSC	+	-	+	+	-	-	+	-
CST	+	-	+	+	-	-	+	+

A marker mintázat arra utal, hogy a CST sejtek rendelkezhetnek őssejt tulajdonságokkal. Ennek a feltevésnek a további igazolása céljából a CST sejteket differenciáltattuk. A CST sejtek zsír- és csont irányba is képesek voltak differenciálódni. Emellett a primer CST tenyészetben spontán csontirányú differenciációját is sikerült detektálnunk (26. ábra).



26. ábra CST sejtek csont és zsírsejt irányú differenciációja. A CST sejtek differenciáltatása az MSC-ken végzett protokoll alapján történt, csont irányú differenciáltatott CST kultúrákban a felhalmozódó kalciumot Alizarin Red festéssel mutattuk ki, a zsírsejt irányba differenciáltatott MSC-ben a kialakuló lipidcseppeket pedig Oil Red O festéssel láthatóvá tettük. (Hámori et al., előkészületben)

Megvizsgáltuk továbbá a CST és az MSC sejtek citokin expresszióját ELISA esszé segítségével (IL-1A, IL-1B, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, IFN γ , TNF α , G-CSF, GM-CSF). A CST sejtek és a mesenchymalis őssejtek citokin expressziója is hasonlóan bizonyult, csupán két citokinben találtunk jelentős eltérést, a G-CSF (immunsejtek éréseire ható citokin) és IL-6 (gyulladást elősegítő hatású citokin) szint magasabb volt CST sejtekben (27. ábra).

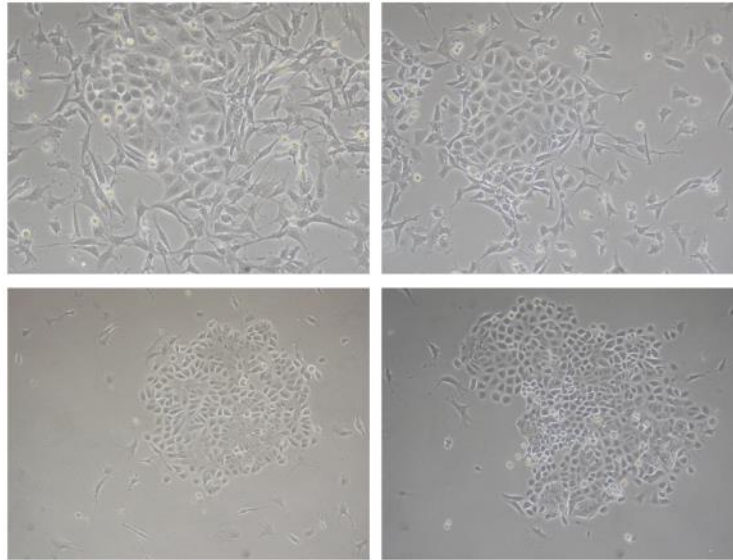


27. ábra Citokin szintek vizsgálata CST és FVB CSV MSC sejteken ELISA esszével. Y tengely OD450 = optikai denzitás 450 nm hullámhosszon mérve, x tengely a különböző citokinek, a diagram egy mérés alapján készült. (Hámori et al., előkészületben)

5.3.3. A CST sejtek képesek mesenchymalis-epithelialis átalakulásra

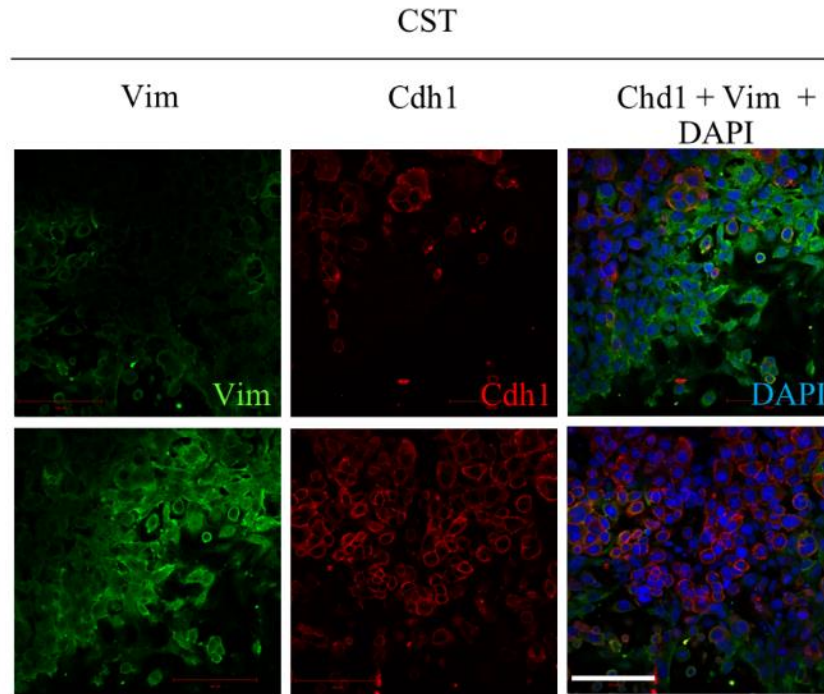
A CST sejtvonal tenyésztése során időről-időre megfigyeltünk epithelialis telepeket (28. ábra). A telepek a sejtek fenntartása során megjelentek, passzálást követően is megmaradtak. A jelenség, amelyet detektáltunk, a mesenchymalis-epithelialis átalakulás (MET), amely a sejtek normál körülmények közt tartása során végbement és a CST sejtek plasztikusságának igen erős bizonyítékául szolgált.

Epithelialis morfológiát mutató CST sejtek



28. ábra CST sejtek epithelialis morfológiája. A képek 10x objektívvel, Eclipse TS100 inverz mikroszkóppal készültek. (Hámori et al., előkészületben)

Immuncitokémiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a kultúrában egyszerre van jelen epithelialis és mesenchymalis morfológiájú sejt. A kialakuló epithelialis telep, E-cadherin expressziót mutatott, míg az azt körülvevő mesenchymalis sejtek továbbra is vimentin pozitívok voltak (29. ábra).

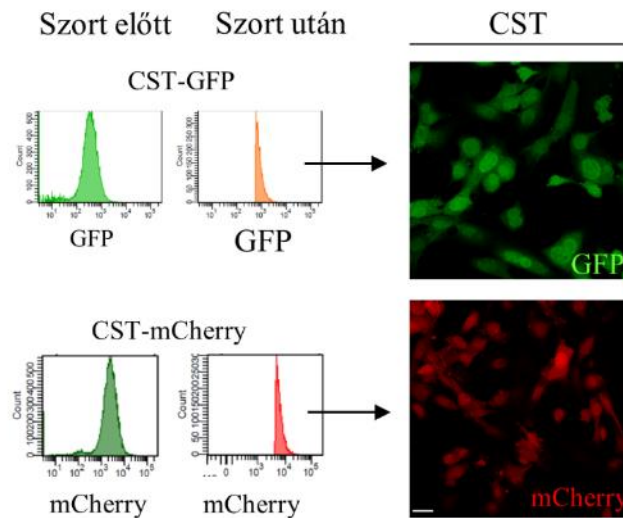


29. ábra CST sejtek tenyésztése során egyidejűleg vannak jelen *E-cadherint* expresszálló epithelialis sejtek és vimentin-pozitív mesenchymalis sejtek. CST sejtek immuncitokémiai jelölése, *E-cadherin* (*Cdh1* – piros), vimentin (*vim*- zöld) és DAPI, mérce = 100 μm . (Hámori et al., előkészületben)

5.4. *Brcal*^{-/-},*p53*^{-/-} tumorok genetikai módosítása CST sejtvonal lentivirális transzdukciója révén

5.4.1. Fluoreszcens fehérjét expresszáló CST sejtek létrehozása és karakterizálása

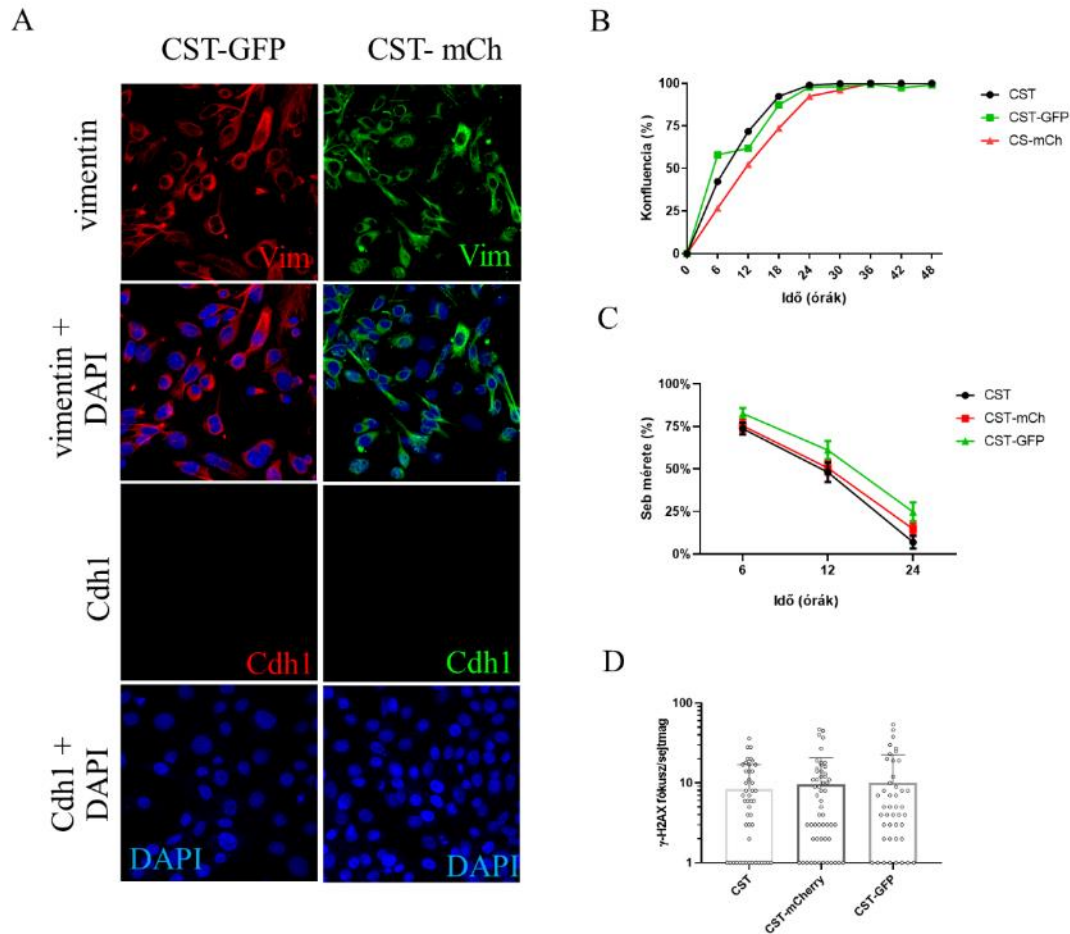
A CST sejteket fluoreszcens fehérjét (GFP vagy mCherry) kódoló lentivírus vektorral (pRRL-EF1-eGFP-WPRE vagy pRRL-EF1-mCherry-WPRE) fertőztük meg. A fluoreszcens fehérjét kifejező sejtek arányát FACS segítségével ellenőriztük, majd annak érdekében, hogy a fluoreszcens fehérje expresszió 100% legyen a sejteket kétszer szortoltuk (30. ábra). Az expressziót ezután konfokális mikroszkóppal is ellenőriztük. Az így előállított CST-GFP és CST-mCherry sejteket további vizsgálatokra alkalmasnak bizonyultak, a fluoreszcens fehérje expresszió stabil volt.



30. ábra *Lentivirális transzdukcióval előállított CST-mCherry és CST-GFP sejtek fluoreszcenciájának ellenőrzése. A fluoreszcens tumorsejtek szortolása révén 100% GFP/mCherry populációt kaptunk. A fluoreszcenciát továbbá konfokális mikroszkóppal is ellenőriztük. Mércse = 20 μ m.*

A CST-GFP és CST-mCherry sejteket az alap sejtvonalhoz hasonlóan karakterizáltuk, annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy a lentivirális transzdukció nem változtatta

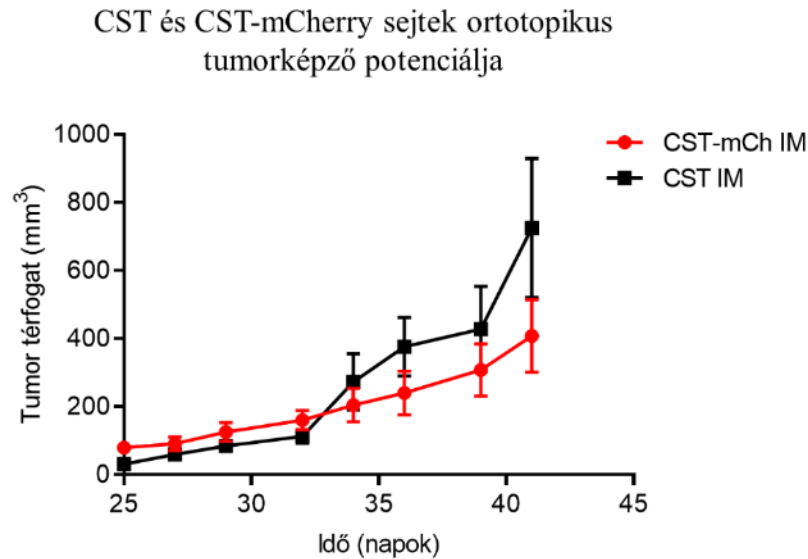
meg a sejtek tulajdonságait. A parentális CST sejtvonálhoz hasonlóan a fluoreszcens fehérjét expresszáló CST sejtek is pozitív festődést mutattak vimentinre, és negatívak voltak E-cadherinre. Növekedési görbéjük és motilitásuk a CST sejtvonáléhoz hasonló volt és a γ H2AX fókuszok száma sem tért el szignifikánsan (31. ábra). A genetikai módosítás tehát nem befolyásolta a CST sejtek tulajdonságait.



31. ábra Lentivirális transzdukcióval előállított CST-GFP és CST-mCherry sejtek karakterisztikája a parentális sejtvonáléval megegyező. A) Immuncitokémiai vizsgálat alapján CST-GFP és CST-mCherry sejtek is vimentin-pozitivitást mutatnak, de nem expresszálnak E-cadherint. B) Növekedési tulajdonságaik az eredeti sejtvonáléhoz hasonlóak. C) Sebgyógyulási esszében CST-GFP és CST-mCherry sejtek a parentális sejthez hasonló motilitást mutatnak. A „seb” mérete %-ban az eltelt idő függvényében. D) A γ -H2AX fókuszok száma alapján a genetikai módosítás nem okozott több DNS kettős szál törést a fluoreszcens fehérjét expresszáló CST sejtekben.

5.4.2. A CST-mCherry sejtek megtartották tumorképző potenciáljukat

A karakterizálást követően a CST-mCherry sejtek tumorképző potenciáljának vizsgálata céljából GFP-t expresszáló FVB egér emlőszövetébe ültettük a sejteket. A CST sejtekhez hasonlóan az mCherry-t expresszáló sejtek is tumort képeztek az emlőben, ugyan az CST-mCherry sejtekből kialakuló tumorok lassabban növekedtek, a különbség nem szignifikáns (32. ábra).

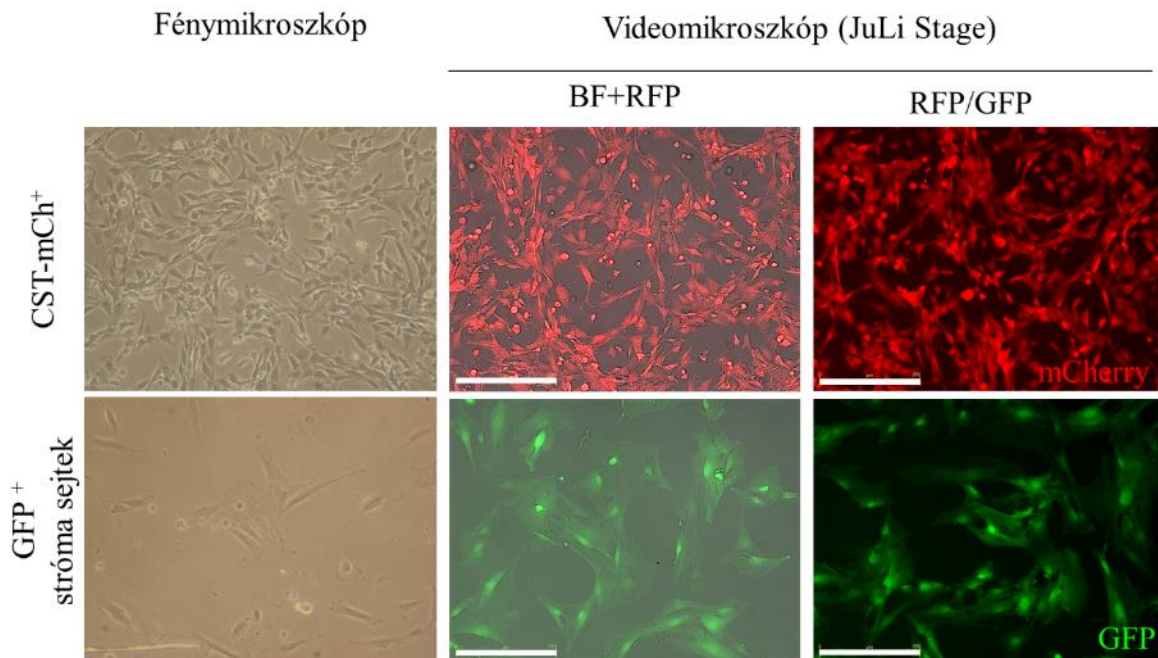


32. ábra CST és CST-mCherry (CST-mCh) sejtek ortotopikus tumorképző potenciáljának vizsgálata. A CST és CST-mCh sejtek tumorigén hatásának vizsgálata céljából 1.5×10^6 sejtet ültettünk be GFP-t expresszáló FVB egerek emlőszövetébe (IM). Az adatok a tumorméreteket átlagát \pm SEM mutatják, $n=5$.

5.4.3. A CST-mCherry sejtek megőrizték drog érzékenységüket, így a modell alkalmas a ciszplatin kezelés hatására bekövetkező, az mCherry⁺ tumorsejtek és a mikroenvironment kölcsönhatását érintő, változások tanulmányozására

A lentivirális transzdukció révén genetikailag módosított és karakterizált *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} tumorsejtek lehetővé teszik a tumorsejtek és a mikroenvironment kapcsolatának vizsgálatát, akár kezelés hatására kialakuló rezisztencia során is.

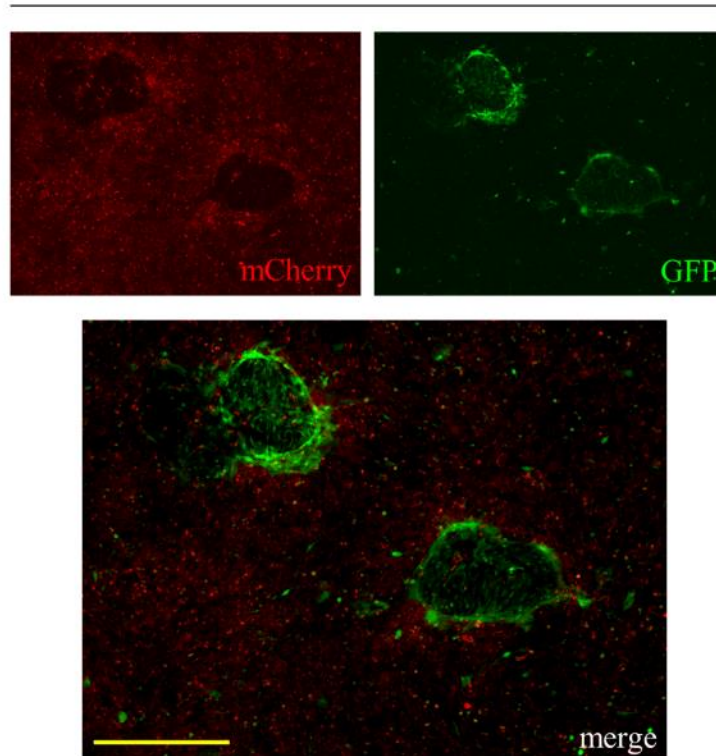
A CST-mCherry sejtek GFP-t expresszáló FVB egérbe ültetése révén lehetőségünk nyílt a tumor és a stróma sejtek egyidejű vizsgálatára. A kezeletlen kontroll tumorok 60 nap elteltével elérték a kritikus méretet, így az állatokat eutanáziában részesítettük és a tumorokat eltávolítottuk, majd tovább vizsgáltuk. A tumorsejtek és stróma sejtek arányának megállapításához a tumorokból enzimatis emésztés révén sejtuszpenziót hoztunk létre és a sejteket FACS segítségével szortoltuk. A szortolás eredményeként kaptunk egy mCherry pozitív tumorsejt populációt és egy GFP pozitív populációt, mely a host (GFP⁺ FVB egér) sejtjeit tartalmazta (33. ábra). A GFP pozitív sejtek egyértelműen stróma sejtek, a korábban FVB egér csontvelőjéből izolált MSC-hez hasonló morfológiát mutatnak, nagy méretű, elterülő sejtek, melyek lassan osztódnak. A tumorsejtek ezzel szemben jóval kisebbek, gyorsan osztódnak. A tumorsejtek megőrizték fluoreszcens fehérje expressziójukat, valamint morfológiájuk sem változott.



33. ábra A CST-mCh⁺ tumorsejtek és a GFP⁺ strómasejtek szortolást követően. A tumor FACS által történő szétválogatása után az mCherry-pozitív CST sejtek és a GFP-pozitív strómasejtek morfológiájának vizsgálata fénymikroszkóppal és JuLi Stage által. Mércse = 250 μ m. BF – áteső fény, RFP – vörös fluoreszcens csatorna, GFP – zöld fluoreszcens csatorna.

Az izolált sejtek egy részét szortálás nélkül tenyésztettük tovább. A kokultúrában a tumorsejtek és a stróma sejtek egy ideig együtt növekedtek, ezalatt a stróma sejtek fészekszerű struktúrákat hoztak létre (34. ábra). Passzálással azonban a stróma sejtektől a kultúra nagyjából két hét alatt megtisztítható, a megtisztított mCherry-pozitív tumorsejt kultúra ezután hetekig fenntartható. A szortolást követően a stróma sejtek és a tumorsejtek monokultúrában hetekig tenyészthetők.

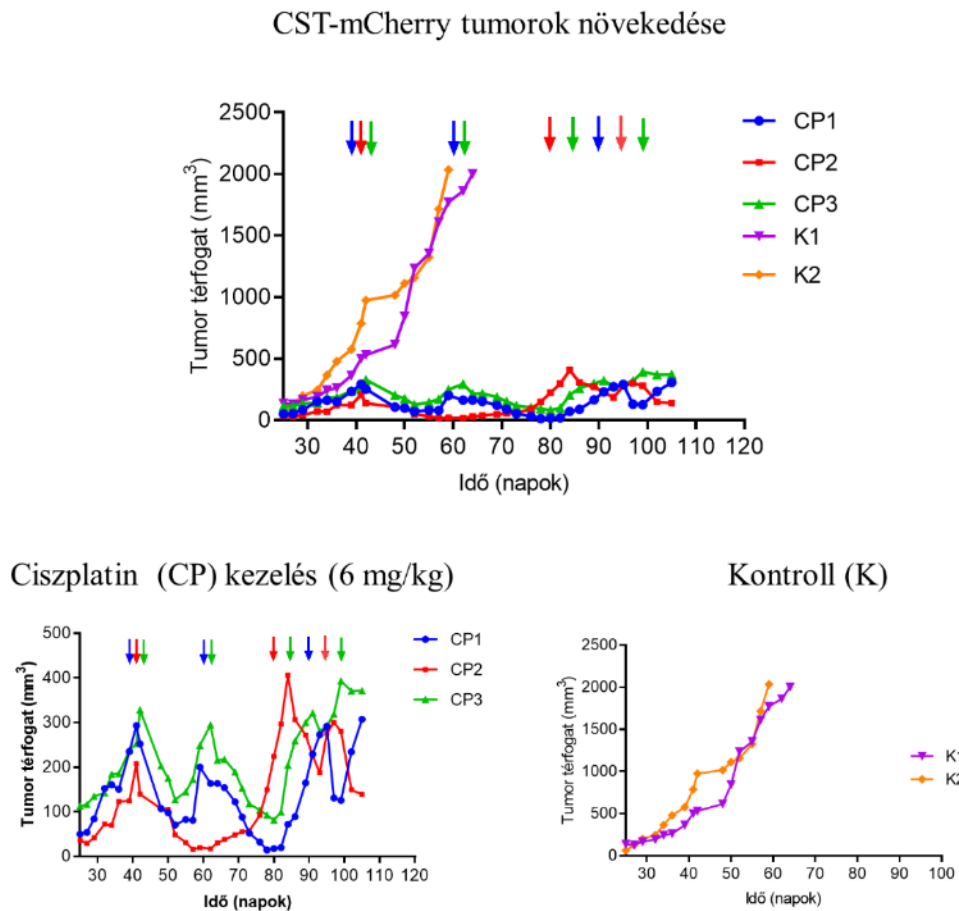
CST-mCh⁺ tumorsejtek és GFP⁺ stróma sejtek



34. ábra A CST-mCherry tumorokból létrehozott primer kultúra GFP-pozitív strómasejteket tartalmaz. Képek JuLi Stage használatával készültek, mérce = 500 μ m.

A GFP-t expresszáló FVB egerek emlőszövetébe ültetett CST-mCherry sejtekből (1.5×10^6 sejt) kialakuló tumorokat, amikor azok elérték a 200 mm³ mérethatárt, maximálisan tolerálható dózissal (6 mg/kg) ciszplatinnal kezeltük. A kezelést 14 naponta ismételtük,

amennyiben azonban a tumorok mérete 200 mm^3 alá csökkent, csak akkor kaptak újabb kezelést, ha a méretük ismét elérte a határértéket. Míg a kezeletlen kontroll állatok esetében a tumorok a 60. npra elérték a 2000 mm^3 -t, amelynél az állatokat terminálni kellett, addig a ciszplatinnal kezelt tumorok reagáltak a kezelésre, a 100. napon, csupán 3 kezelést követően sem érték el az 500 mm^3 -t (35. ábra).



35. ábra Ciszplatin kezelés hatásának vizsgálata CST-mCherry tumorokon. GFP-t expresszáló FVB egér emlőszövetébe ültetett, mCh^+ CST sejtekből kialakuló tumorok mérete ciszplatin kezeléssel (6 mg/kg, $n=3$) kontrollálható. A kontroll csoportban ugyanakkor a tumorméret 60 nap alatt elérte a kritikus határt ($n=2$). Ábrázolt adatok: tumorméretetek átlaga \pm SEM. A kezeléseket a nyilak jelzik, CP – ciszplatin, K – kontroll.

A karakterizálás során kiderült tehát, hogy a lentivirális transzdukció tehát nem módosította a tumorsejtek tulajdonságait, az állatkísérletek pedig bebizonyították, hogy a CST-mCherry sejtek megőrizték tumorképző potenciáljukat és drogérzékenységüket. A kialakuló mCherry-pozitív tumorok ciszplatin kezelés hatására remisszió következett be az 1-es (CP1) és a 2-es (CP2) állat esetében, amely a klinikumban megfigyelhető, xenograft modellek esetében azonban ritkán fordul elő. A lentivirálisan módosított, fluoreszcens fehérjével megjelölt CST tumorok tehát alkalmasak a ciszplatin kezelés hatásának vizsgálatára, klinikailag releváns modellként szolgálnak és lehetővé teszik a terápiára adott válasz további tanulmányozását.

6. MEGBESZÉLÉS

A *BRCA1*-hiányos tripla-negatív tumorok kezelése megfelelő target hiányában rendkívül nehéz feladat, a kezelés sikerességét rontja a terápiás szerekkel szemben fellépő rezisztencia. Munkánk során a humán *BRCA1*-hez köthető emlődaganatok klinikailag releváns egérmódeljén vizsgáltuk a kezelés hatására kialakuló rezisztenciát.

A pegilált liposzómális doxorubicin lehetőséget kínál a doxorubicin esetében bizonyított kedvező tumorelles hatás kifejtésére, a formulációnak köszönhetően a mellékhatások (kardiotoxicitás) csökkentése mellett. A PLD kedvező hatásáról több daganat típus, köztük petefészek rák és előrehaladott és metasztatikus emlőrák esetében is beszámoltak [166, 167], PLD-re kialakuló rezisztencia vizsgálatáról azonban szinte nem található adat. Kutatócsoportunk *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőtumor modellen igazolta a PLD hatását. A PLD megnövelte az állatok teljes és relapszus mentes túlélését. DOX kezelés hatására minden esetben Pgp-függő rezisztencia alakult ki, míg PLD kezelést követően csak a tumorok felében detektáltunk rezisztenciát, illetve jóval hosszabb idő kellett a kialakulásához. A PLD kezelés hatására kialakuló rezisztens tumorokban kutatócsoportunk kimutatta az *Abcb1a* és *Abcb1b* gének (Pgp-t egérben két gén kódolja) fokozott expresszióját. Sikeresen igazoltuk továbbá, hogy a korábban DOX kezelésre rezisztenssé vált tumorokra a PLD kezelés hatékonynak bizonyult [155]. A PLD hatását, a megemelkedett P-glikoprotein expresszió ellenére, többek között a kedvező farmakokinetikája magyarázhatja, hatékonyságát okozhatja a magas plazmakoncentráció és hosszabb keringési idő. Eredményeinkkel megegyező megfigyelésekről számoltak be metasztatikus emlőrákkal diagnosztizált betegek esetében is, ahol antraciklin-rezisztencia kialakulását követően a tumorok PLD-re szenzitívek maradtak [168, 169], de ezek a tanulmányok a kialakuló rezisztencia hátterét nem vizsgálják, illetve *BRCA1*-hiányos, nem metasztatikus emlőrákon alkalmazott PLD terápiáról szóló publikáció azonban jelenleg nem áll rendelkezésre.

A *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőtumor modellen végzett kísérleteink alapján tehát a PLD kezelés lehetőséget nyújthat terápia rezisztens *BRCA1*-negatív emlőrák kezelésére, valami a modell alkalmas új terápiák tesztelésére és rezisztencia vizsgálatokra.

A ciszplatin széleskörben alkalmazott kemoterápiás szer malignus tumorok első és másodvonalbeli kezelésében, azonban a terápia során kialakuló rezisztencia jelentős problémát jelent a klinikumban [170], melyre a mai napig nem sikerült megoldást találni. A több évtizede zajló kutatásoknak köszönhetően számos mechanizmust sikerült azonosítani. A ciszplatin citotoxikus hatását a DNS szálainak keresztkötése révén fejti ki, gátolva ezzel a replikációt és a transzkripciót. A rezisztencia kialakulásában számos genetikai és epigenetikai változás játszik szerepet, melyek befolyásolják a kezelőanyag sejtbe történő bejutását, olyan jelátviteli útvonalakat aktiválnak, amelyek a sejt túlélését segítik, hozzájárulnak a DNS hibajavításához vagy éppen apoptotikus útvonalakat gátolnak. A hatóanyag intracelluláris térbe való bejutását segítő fehérjék funkciójának csökkenése, platinavegyületek esetében például a réz transzporter CTR1 csökkent expressziója és a rezisztencia közötti összefüggést többek között petefészekrák [171], vastagbélrák [172] esetében is igazolták, illetve betegmintákon végzett elemzése révén kimutatták, hogy a CTR1 fokozott expressziója kedvezőbb prognózissal társul platina-alapú kezelést követően tüdőrák esetében [173]. A kezelőanyag sejten belüli felhalmozódását aktív ellenirányú transzport is gátolhatja, betegmintákon végzett kísérletek során az ATP7A, P-típusú ATP-áz emelkedett expressziója valamint ciszplatin kezelés kedvezőtlen kimenetele közötti összefüggést petefészek [174] és nyelőcsőrák [175] esetében kimutatták.

A ciszplatin a DNS szálaihoz kötve platina-DNS adduktokat hoz létre, melyek eltávolításában, a hibajavításban a NER fontos szerepet játszik a HR mellett. Az ERCC1 a NER útvonal egyik kulcsfontosságú fehérjéje, több tanulmány is bemutatta az ERCC1 emelkedett expressziója és a ciszplatin terápiára adott kedvezőtlen válasz összefüggését tüdőrák [176] és petefészekrák [177] esetében.

Munkánk során egy olyan modellt dolgoztunk ki, amely lehetővé teszi az in vivo kialakuló ciszplatin rezisztencia vizsgálatát *BRCA1*-negatív emlőrák esetében sejtbiológiai és genomi szinteken is. *Brcal*^{-/-};*p53*^{-/-} egér emlőtumorból stabil sejtvonalat hoztunk létre, melyet CST-nek neveztünk el. A CST sejtek *Brcal*^{-/-} hámsajt (CK14-hez kötött kondicionális deléción) hátterét igazoltuk, a sejteket karakterizáltuk. A CST sejtek teljes genom szekvenálása révén bizonyítottuk a BRCA1-sejtekre jellemző genom instabilitás és mutációs mintázatok jelenlétét.

A *BRCA1*-deficiens sejtekben nem megfelelően működő HR következtében ezek a sejtek érzékenyek a platinavegyületekre, melyet citotoxicitási vizsgálat révén a CST sejteken is igazoltuk. Annak érdekében, hogy a rezisztenciát genomi változások szintjén is vizsgálni tudjuk, a CST sejtekből klónozással izogenikus vonalat hoztunk létre, majd ezeket az egysejt klónokat GFP-t expresszáló FVB egerek emlőszövetébe ültettük. A kialakuló tumorerő megőrizték ciszplatin érzékenységüket és a klinikumban megfigyeltekkel megegyező terápiást választ sikerült detektálnunk: a kezdeti hatékonyságot követően 6, illetve 8 kezelést követően a tumorerő rezisztenssé váltak ciszplatinra. Az így kialakított in vivo rezisztens tumorerő teljes exom szekvenálása révén a továbbiakban lehetőségünk nyílik a ciszplatin kezelés hatására bekövetkező mutációk elemzésére.

A *BRCA1* mutációt hordozó tumorsejtekben a ciszplatin kezelés hatására kialakuló rezisztencia oka lehet, ha a *BRCA1* funkció valamilyen módon helyreáll, például egy második mutáció eredményeként [178]. A második mutáció lehet a kezelés során felhalmozódó mutációk eredménye, de elképzelhető az is, hogy már a kezelést megelőzően létezik egy olyan tumorsejtpopuláció, amelyben a *BRCA1* funkció már korábban helyreállt. A CST sejtekben a *Brcal* gén 5-13 exonjának hiánya okozza a *Brcal*-deficienciát [124], így ebben az esetben a HR helyreállása második mutáció következtében nem lehetséges.

A CST sejtekből kialakuló tumorerő ciszplatin rezisztenciája azonban epigenetikai folyamatok eredménye is lehet. A ciszplatin a DNS szálai között hoz létre keresztkötéseket, így a kromatin állapot is meghatározza a ciszplatin kezelés sikerét, hiszen a nyitott kromatinstruktúra hozzáférhetőbbé teszi a drog számára a DNS-t [179, 180]. Ciszplatin kezelés hatására a DNS metilációs mintázat és a transzkriptom megváltozását [181, 182], illetve hiszton-deacetiláz expresszió emelkedését is kimutatták ciszplatin rezisztens petefészekrák sejtvonalakon [183, 184].

További fontos aspektusa a rezisztencia vizsgálatának az epithelialis-mesenchymalis átalakulás tanulmányozása. A CST sejtvonal karakterizálása során bemutattuk, hogy a bizonyítottan hám eredetű tumorerő mesenchymalis sejtekre jellemző morfológiát és tulajdonságokat mutatnak. RT-PCR és immuncitokémiai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a CST sejtek vimentint expresszálnak mRNA és fehérje szinten, E-cadherin viszont nem volt

detektálható. Az E-cadherin elvesztése a vimentin expresszióval az epithelialis-mesenchymalis átalakulás kulcsfontosságú lépései [5, 6, 83, 85], klinikai adatok is bizonyítják, hogy bizonyos tumorok esetében a karcinómasejtek korai EMT-n mennek keresztül, mely összefüggésbe hozható az agresszív fenotípusú, rossz prognózisú tumorok kialakulásával és a metasztázis képzéssel [93, 98, 99]. A *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőrák tumorokban bekövetkező, korai EMT eredménye lehet a CST sejtek mesenchymalis jellege. Szakirodalom alapján az EMT révén kialakuló sejtek és a mesenchymalis őssejtek, marker mintázatukat tekintve számos egyezést mutatnak [164, 165], ebből kiindulva megvizsgáltuk a CST sejtek expressziós mintázatát az általunk izolált csontvelői MSC-hez hasonlítva. A CST sejtek marker mintázata a mesenchymalis őssejtekével megegyezett, egyetlen eltérést állapítottunk meg, mégpedig a CD146 fehérje jelenlétét CST sejtek felszínén. A CD146 szerepe összefüggésbe hozható az EMT-vel és tripla negatív emlőrákokra jellemző invazív fenotípussal is. Az emlőráksejtekben a CD146 overexpressziója, az epithelialis markerek leszabályozása és a mesenchymalis markerek expressziója elősegíti a sejtek migrációját és invazív fenotípust idéz elő, valamint őssejt-szerű tulajdonságokat idéz elő [185]. Zeng és munkatársai azt is megállapították, hogy a CD146 által indukált EMT-t a RhoA útvonal szabályozza, az EMT egyik kulcsfontosságú transzkripciós faktora a SLUG révén [185].

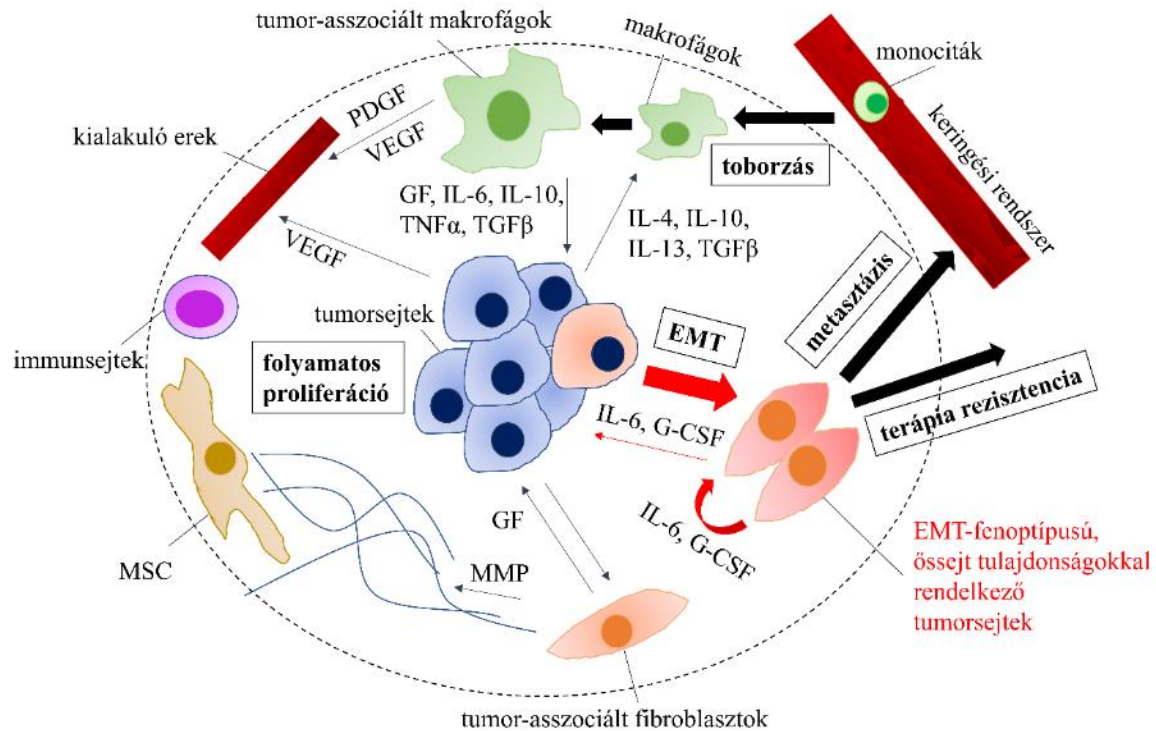
Egyre több adat támasztja alá a tumorsejt populációkban a rák őssejtek (cancer stem cell (CSC)) jelenlétét, amelyek őssejt tulajdonságokkal rendelkező, önmegújításra képes, multipotens sejtek, a rák kialakulásától kezdve, az áttétképzésben és a drog rezisztenciában is szerepet játszhatnak. Emlőrák esetében emlőrák őssejtek (breast cancer stem cell (BCSC)), melyek azonosítására a CD44⁺/CD24⁻ fenotípus szolgál [164, 165, 186]. A CST sejtekre jellemző a CD44 emelkedett expressziója, azonban CD24 szintje is magas, akár csak a normál őssejtek esetében. A CST sejtek őssejt jellegét erősíti, hogy zsír- és csont irányba is képes differenciálódni megfelelő körülmények között, illetve a csont irányú differenciáció spontán módon is megtörténik, amely egybeesik az emlőrákokra jellemző mikrokalcifikáció jelenségével [187].

A CST sejtek plaszticitását tovább erősítette a spontán MET-re való képessége. Az őssejt jellegek illet az EMT-MET átmenetek alapján következtethetünk arra, hogy a CST

sejtek az epithelialis (E) és mesenchymalis (M) állapotok közötti átmeneti állapotban vannak, ez teszi lehetővé számunkra, hogy egyszerre rendelkezzenek mesenchymalis és hámsejt jellemzőkkel. Az immuncitokémiai festések során bemutattuk, hogy a sejtpopulációban egyszerre vannak jelen vimentint és E-cadherint expresszáló sejtek, azonban a hibrid állapot igazolásához szükséges lenne génexpressziós vizsgálatokat végezni, nehézséget jelent ugyanakkor megfelelő „markert” találni a kettős állapot jellemzésére. Mindenesetre a hibrid állapotra jellemző markerek azonosítása lehetővé tenné a célzott terápiát.

A mesenchymalis és rák őssejt jellemzők és az E/M állapot mind az intratumorális heterogenitást és celluláris plaszticitást igazolják, a tumorsejtek túlélésében, a tumor progressziójában és a rezisztenciában is jelentős szerepe van a tumor mikrokörnyezetének. A tumor mikrokörnyezetét alkotó heterogén sejtpopuláció között folyamatos kapcsolat van, többek között citokinek révén. Az IL-6, gyulladási citokin, képes EMT-t indukálni emlőrák sejtekben, valamint serkenti a tumorsejtek CD44 expresszióját, ezzel hozzájárulva a rák őssejt-szerű tulajdonságok kifejeződéséhez [188, 189]. Lehetséges, hogy a CST sejtek esetében detektált IL-6 emelkedett szintje (MSC esetében mért érték háromszorososa), annak az eredménye, hogy a CST sejtek önmaguk részére biztosítják az IL-6 állandó koncentrációját, ezzel pedig fenntartják mesenchymalis és rák őssejt fenotípust, mely abban is szerepet játszhat, hogy megteremtsék saját mikrokörnyezetüket.

Egy másik citokin, az G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) szintje a CST sejtekben szintén magasabbnak bizonyult, mint az MSC-k esetében, de ennek mért értéke 17-szer alacsonyabb az IL-6 értékénél. G-CSF és IL-6 expressziót kimutattak néhány tüdőrák és nyelőcsőrák esetében [190], illetve ionizáló sugárzás hatására nem kissejtes tüdőrák sejtek esetében szintén kimutatható a G-CSF termelődése, mely EMT-hez vezet, növelve ezzel a sejtek inváziós és migrációs képességét [191]. Eredményeinket összefoglalva, a tumorsejtek változásait, és feltételezhető kapcsolatukat a mikrokörnyezetükkel a 36. ábra mutatja be.



36. ábra Összefoglaló ábra a tumorsejtek és a mikroenvironment kapcsolatáról. MSC – mesenchymalis őssejt, ECM – extracelluláris mátrix, GF – növekedési faktor, MMP – mátrix metalloproteáz, PDGF – podocita növekedési faktor, VEGF – vaszkuláris endotél növekedési faktor, IL-interleukin, EMT- epithelialis-mesenchymalis átalakulás. (Son, B. és munkatársai, 2017. nyomán) [109].

A drug rezisztencia mögött rejlő folyamatok tanulmányozása során szintén érdemes a tumorsejtek és a mikroenvironment kapcsolatát is vizsgálni, modellrendszerünk erre is lehetőséget biztosít. Az utóbbi tíz évben számos publikáció jelent meg, melyek a tumor mikroenvironmentét vizsgálják, azonban a *BRCA1* mutációt hordozó tumorsejtek és mikroenvironmentük kapcsolatáról, valamint annak drug rezisztenciában betöltött szerepéről szinte nem áll rendelkezésünkre adat. A tumor mikroenvironmente fizikai barrierként működhet, mely csökkenti a hatóanyag tumorsejtekben történő felhalmozódását [192], az ECM komponensei csökkenthetik a diffúziót valamint a tumorsejtek túlélését elősegítő jelutakat indukálhat [193], illetve a tumor mikroenvironmentében fellépő hipoxiás állapot szintén hozzájárulhat a drug rezisztenciához [194]. Annak érdekében, hogy a *BRCA1-KO* tumorsejtek és a stróma sejtek közötti kölcsönhatásokat vizsgálni tudjuk, lentivirális transzdukció révén mCherry-t expresszáló *BRCA1-KO* sejteket hoztunk létre (CST-mCh). A

sejtvonal transzdukciója lehetővé tette a kialakuló tumorok genetikai módosítását anélkül, hogy új GEMM-t kellett volna előállítani. A transzdukált sejteket az eredeti sejtvonalhoz hasonlóan karakterizáltuk, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a fehérje expresszió stabil, illetve a genetikai módosítás nem okozott változásokat a sejtek legfontosabb tulajdonságait illetően. A CST-mCherry sejteket ortotopikusan GFP-t expresszáló FVB egerek emlőjébe ültettük, így a kialakuló tumorokban lehetőségünk nyílt az mCherry-pozitív tumorsejtek és a GFP-pozitív host sejtek vizsgálatára. A tumorokból primer kultúrát hoztunk létre, melyben egyszerre voltak jelen GFP⁺ stróma sejtek és mCh⁺ tumorsejtek. A GFP⁺ strómasejtek morfológia alapján is elkülöníthetőek voltak a tumorsejtektől: nagyobb méretű, lassan osztódó sejtek, fészekszerű struktúrát hoztak létre, míg a tumorsejtek jóval kisebb, gyorsan osztódó mCh⁺ sejtek. Az, hogy a primer kultúrában jelen voltak strómasejtek, bizonyítja, hogy a CST tumorsejtek az egészséges szöveti sejtek bevonásával alakítják ki mikrokörnyezetüket, viszont a GFP⁺ sejtek alacsony száma utalhat arra a felvetésre, hogy a CST sejtek képesek megteremteni saját maguk számára a mikrokörnyezetüket. A fluoreszcens fehérje expresszió továbbá lehetővé teszi a sejtek szortolással történő különválogatását, így a tumorsejtek és a stróma sejtek egyszerre vizsgálhatók kokultúrában és külön-külön is.

A különböző sejtek különböző fluoreszcens fehérje expressziója lehetővé teszi, hogy a strómasejtek és a tumorsejtek közvetlen kapcsolatát is vizsgálni tudjuk. 2016-ban Barthos és munkatársai számoltak be arról, hogy függőcsepp kultúrában együtt tenyésztett humán emlőtumorsejtek és csontvelői MSC-k esetén, a tumorsejtek „elfogyasztják” az MSC-ket, majd alvó állapotba kerülnek [195]. A különböző típusú sejtek, különböző fluoreszcens fehérjével történő megjelölése, lehetővé tette a sejtek közötti interakciók megfigyelését, az általunk létrehozott modell ezen túlmenően arra is lehetőséget biztosít, hogy a sejtek közötti kapcsolatokat *in vivo* vizsgáljuk.

A kettős-jelölt rendszer drog kezelés hatásának vizsgálatára is alkalmasnak bizonyult, a CST-mCh sejtekből kialakuló emlőtumorok megtartották ciszplatin érzékenységüket, illetve 3/2 tumor esetében remisszió következett be MTD ciszplatin kezelés hatására, amely a xeno-, allograft modellek esetében nem jellemző, általában a növekedési ráta változása figyelhető meg. A továbbiakban tervezzük a kezelt és kezeletlen tumorok mCh⁺/GFP⁺ sejt

arányának összehasonlítását és a sejtek további karakterizálását, annak érdekében, hogy a kezelés hatására bekövetkező változásokat detektálni tudjuk.

Munkánk során egy olyan új modellrendszer kidolgozását végeztük el, amely *Brcal*-hiányos tumorokban lehetőséget biztosít új terápiás szerek tesztelésére, rezisztencia vizsgálatára és a rendszerünkben használt *Brcal*^{-/-};*p53*^{-/-} tumorok további genetikai módosítására is megoldást kínáltunk. A modellrendszernek természetesen limitációi is vannak. Az általunk használt modell a *BRCA1*-hiányos emlődaganatok vizsgálatára alkalmas, mely nem túl gyakori, öröklődő ráktípus, így ez limitálja az eredmények relevanciáját. A BRCAness koncepció alapján azonban deléciónélkül is kialakulhat a *BRCA1*-deficiens sejtekre jellemző fenotípus sporadikus daganatoknál, mely lehet *BRCA1* szomatikus mutáció, más géneket érintő mutáció vagy a DNS kettősszál törését javító funkciók sérülése miatt [196]. Bizonyos petefészekrákok, előrehaladott hasnyálmirigy- és prosztatatarák esetében ismert a BRCAness fenotípus, modellrendszerünk tehát ezekben az esetekben szintén megfelelő eredményeket tud biztosítani. A GEMM számos előnnyel rendelkezik, a tumor spontán alakul ki, kezdetektől vizsgálható, az állat immunrendszere intakt, viszont a fajok közti különbségeket nem lehet figyelmen kívül hagyni. A limitációkat figyelembe véve a modell megfelelő platformot biztosít *BRCA1*-deficiens emlőtumork tanulmányozására.

7. KÖVETKEZTETÉS

1. Bebizonyítottuk, hogy pegilált liposzómális doxorubicin (PLD) kezelés megnövelte a relapszus mentes és teljes túlélést *BRCA1*-hez köthető öröklődő emlődaganat klinikailag releváns egér modelljén.
2. *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőtumorból sikeresen alapítottunk sejtvonalat (CST), melyet karakterizáltunk, igazoltuk tumorképző potenciálját és további terápiák tesztelésére való alkalmasságát.
3. CST sejtekből ciszplatin rezisztens tumorokat hoztunk létre, ezzel megalkottunk egy új, klinikailag releváns, in vivo indukált ciszplatin rezisztencia modellt, amely alkalmas a ciszplatin rezisztencia molekuláris mechanizmusainak tanulmányozására.
4. A CST sejtek plaszticitását több szinten is igazoltuk. Bemutattuk, hogy a CST sejtek tumorsejtekre jellemző tulajdonságaik mellett (tumorigének, gyorsan osztódnak), mesenchymalis sejtekre jellemző karakterisztikával rendelkeznek: mesenchymalis sejt markert (vimentin) expresszálnak, hámsejtekre jellemző markereket (E-cadherin, CK8) ellenben nem. Igazoltuk továbbá, hogy a CST sejtek, a mesenchymalis őssejtekre jellemző marker mintázattal jellemezhetők, valamint képesek zsír- és csont irányba is differenciálódni, tehát multipotens sejtek.
5. *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} tumorokat genetikailag módosítottuk. Létrehoztunk egy olyan rendszert a CST sejtek lentivirális transzdukciója révén, mely lehetővé teszi az mCherry-t expresszáló *Brcal-KO* tumorsejtek (CST-mCh) és a mikrokoznyezetet alkotó GFP⁺ stróma sejtek kapcsolatának vizsgálatát. A rendszer továbbá alkalmas a különböző terápiás anyagok tumor-mikrokoznyezetre kifejtett hatásának vizsgálatára, ezáltal a drog rezisztencia kutatására is.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során egy olyan modellrendszert hoztunk létre, amely lehetővé teszi a *BRCA1*-deficiens emlőtumor tanulmányozását, különös tekintettel a terápia során kialakuló rezisztenciára.

A kísérletekhez egy, a humán *BRCA1*-hez köthető öröklődő emlődaganat klinikailag releváns modelljét használtuk. A *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőtumor modell segítségével bebizonyítottuk, hogy a pegilált liposzómális doxorubicinnel (PLD) történő kezelés, megnövelte a relapszus mentes és teljes túlélést a doxorubicinhez képest, azonban a tumorok rezisztenssé váltak a PLD-re, amely a P-glikoprotein fokozott expressziójához köthető.

A terápia során kialakuló rezisztencia molekuláris hátterének tanulmányozásához, a *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlőtumorból sejtvonalat (CST) alapítottunk. A CST sejtek megőrizték drog érzékenységüket, valamint tumorképző potenciáljukat, így ortotopikus transzplantáció révén kialakuló tumorok alkalmasak drog kezelés hatásának vizsgálatára. A ciszplatin kezelés klinikumban való alkalmazása során a kezdeti kedvező hatást követően rezisztencia kialakítása gátolja a beteg gyógyulását. A CST sejtekből kialakuló tumorok ciszplatin kezelésre azonban a klinikumban megfigyeltékhez hasonlóan reagáltak, többszöri kezelést követően kialakult a rezisztencia. A ciszplatin rezisztens tumorokból sikeresen alapítottunk sejtvonalat, mely szekvenálás révén lehetőséget biztosít, a kezelés hatására kialakult genomi változások detektálására. Létrehoztunk tehát egy új, klinikailag releváns in vivo modellt, mely alkalmas a ciszplatin rezisztencia vizsgálatára.

A CST sejtek további karakterizálása révén igazoltuk a tumorsejtek plaszticitását. Bemutattuk, hogy a CST sejtekre egyidejűleg jellemző tumor- és mesenchymalis sejt karakterisztika. Illetve a CST sejtek lentivirális transzdukcióval történő genetikai módosítása révén egy olyan rendszert alakítottunk ki, mely lehetővé teszi az mCherry-t expresszáló *Brcal*-KO tumorsejtek (CST-mCh) és a mikrokoznyezetet alkotó GFP⁺ stróma sejtek kapcsolatának vizsgálatát, a különböző terápiás anyagok tumor-mikrokoznyezetre kifejtett hatásának, illetve a drog rezisztenciának a tanulmányozását.

9. SUMMARY

We established a new model system for the study of drug resistance mechanisms of *BRCA1*-deficient mammary tumors. Using a clinically relevant mouse model of human *BRCA1*-associated hereditary breast cancer, we showed that pegylated liposomal doxorubicin (PLD) significantly increases relapse-free and overall survival times in comparison with doxorubicin treatment. Eventually, tumors became resistant to PLD by means of overexpressing the efflux transporter P-glycoprotein.

Long-term clinical efficacy of cisplatin therapy is often limited by drug resistance. To study molecular mechanisms underlying cisplatin resistance we established and characterized a new murine cancer cell line from *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} mouse breast tumor, designated as CST. CST cells retained drug sensitivity as well as tumorigenic potential, indicating that CST-derived tumors may provide an opportunity to study drug resistance mechanisms. Indeed, tumors arising from CST cells showed initial sensitivity to cisplatin, but the tumors could not be eradicated. However, several cycles of cisplatin treatment led to drug resistant disease. We established a new cell line from treatment refractory tumors, which provided an opportunity to study genomic changes associated with cisplatin resistance via whole genome sequencing. The new, clinically relevant in vivo model will allow us to understand mechanisms underlying resistance to cisplatin.

Further characterization revealed the high level of plasticity of CST cells. CST cells possess both cancer cell and mesenchymal stem cell properties. With genetic modifications of CST cells via lentiviral transduction we created a model system to study the interactions between mCherry-expressing *Brcal*-KO tumor cells (CST-mCh) and GFP⁺ stromal cells. These dually-labeled tumors derived from CST cells and host stroma will provide an important tool for the study of the role of the stromal compartment in drug response, therapy resistance and relapse.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Samadder NJ, Giridhar KV, Baffy N, Riegert-Johnson D, and Couch FJ (2019) *Hereditary Cancer Syndromes-A Primer on Diagnosis and Management: Part 1: Breast-Ovarian Cancer Syndromes*. Mayo Clin Proc, 94:1084-1098.
2. Shintani Y, Okimura A, Sato K, Nakagiri T, Kadota Y, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Ikeda N, Kawahara K, Matsumoto T, Matsuura N, Ohta M, and Okumura M (2011) *Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity to chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer*. Ann Thorac Surg, 92:1794-1804; discussion 1804.
3. Davis FM, Stewart TA, Thompson EW, and Monteith GR (2014) *Targeting EMT in cancer: opportunities for pharmacological intervention*. Trends Pharmacol Sci, 35:479-488.
4. Thiery JP and Sleeman JP (2006) *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 7:131-142.
5. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, and Nieto MA (2009) *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 139:871-890.
6. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, and Thiery JP (2016) *Emt: 2016*. Cell, 166:21-45.
7. Hajdu SI (2011) *A note from history: landmarks in history of cancer, part I*. Cancer, 117:1097-1102.
8. Faguet GB (2015) *A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database*. Int J Cancer, 136:2022-2036.
9. Willis RA *Pathology of tumours*. Butterworths, 1967.
10. Sharma S, Kelly TK, and Jones PA (2010) *Epigenetics in cancer*. Carcinogenesis, 31:27-36.
11. Hanahan D and Weinberg RA (2011) *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 144:646-674.

12. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, Gavin A, Visser O, and Bray F (2018) *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018*. Eur J Cancer, 103:356-387.
13. Howlader N NA, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016*. 2019.
14. Waks AG and Winer EP (2019) *Breast Cancer Treatment: A Review*. JAMA, 321:288-300.
15. Cardoso F, Loibl S, Paganì O, Graziottin A, Panizza P, Martincich L, Gentilini O, Peccatori F, Fourquet A, Delaloge S, Marotti L, Penault-Llorca F, Kotti-Kitromilidou AM, Rodger A, Harbeck N, and Specialists ESoBC (2012) *The European Society of Breast Cancer Specialists recommendations for the management of young women with breast cancer*. Eur J Cancer, 48:3355-3377.
16. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ, and members P (2013) *Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013*. Ann Oncol, 24:2206-2223.
17. Himanshu Joshi MFP EMC Kirby I. Bland, V. Suzanne Klimberg, William J. Gradishar, *Molecular Oncology of Breast Cancer*. Elsevier, 2018: 282-307.e285.
18. Zhou J, Yi Q, and Tang L (2019) *The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: a focused review*. J Exp Clin Cancer Res, 38:250.
19. Ménard S, Fortis S, Castiglioni F, Agresti R, and Balsari A (2001) *HER2 as a prognostic factor in breast cancer*. Oncology, 61 Suppl 2:67-72.
20. Lumachi F, Brunello A, Maruzzo M, Basso U, and Basso SM (2013) *Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer*. Curr Med Chem, 20:596-604.
21. Eeckhoutte J, Carroll JS, Geistlinger TR, Torres-Arzayus MI, and Brown M (2006) *A cell-type-specific transcriptional network required for estrogen regulation of cyclin D1 and cell cycle progression in breast cancer*. Genes Dev, 20:2513-2526.
22. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, Pegram M, Oh DY, Diéras V, Guardino E, Fang L, Lu MW, Olsen S, Blackwell K, and Group ES (2012)

- Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer.* N Engl J Med, 367:1783-1791.
23. Perez EA, Barrios C, Eiermann W, Toi M, Im YH, Conte P, Martin M, Pienkowski T, Pivot XB, Burris HA, Petersen JA, De Haas S, Hoersch S, Patre M, and Ellis PA (2019) *Trastuzumab emtansine with or without pertuzumab versus trastuzumab with taxane for human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced breast cancer: Final results from MARIANNE.* Cancer, 125:3974-3984.
 24. Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK, Carey LA, and Perou CM (2013) *Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer.* Oncologist, 18:123-133.
 25. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, and Botstein D (2003) *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 100:8418-8423.
 26. Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, Dumay A, Poirot B, Porcher R, Turpin E, Plassa LF, de Roquancourt A, Bourstyn E, de Cremoux P, Janin A, Giacchetti S, Espié M, and de Thé H (2013) *p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy.* Breast, 22 Suppl 2:S27-29.
 27. Sporikova Z, Koudelakova V, Trojanec R, and Hajduch M (2018) *Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer.* Clin Breast Cancer, 18:e841-e850.
 28. Anders CK and Carey LA (2009) *Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer.* Clin Breast Cancer, 9 Suppl 2:S73-81.
 29. Al-Mahmood S, Sapiezynski J, Garbuzenko OB, and Minko T (2018) *Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options.* Drug Deliv Transl Res, 8:1483-1507.
 30. Fasching PA, Loibl S, Hu C, Hart SN, Shimelis H, Moore R, Schem C, Tesch H, Untch M, Hilfrich J, Rezai M, Gerber B, Costa SD, Blohmer JU, Fehm T, Huober J, Liedtke C, Weinshilboum RM, Wang L, Ingle JN, Müller V, Nekljudova V, Weber KE, Rack B, Rübner M, von Minckwitz G, and Couch FJ (2018) *BRCA1/2 Mutations and Bevacizumab in the Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer: Response and*

- Prognosis Results in Patients With Triple-Negative Breast Cancer From the GeparQuinto Study.* J Clin Oncol, 36:2281-2287.
31. Byrski T, Gronwald J, Huzarski T, Grzybowska E, Budryk M, Stawicka M, Mierzwa T, Szwiec M, Wisniowski R, Siolek M, Dent R, Lubinski J, and Narod S (2010) *Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy.* J Clin Oncol, 28:375-379.
 32. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, Bonnefoi H, Cameron D, Gianni L, Valagussa P, Swain SM, Prowell T, Loibl S, Wickerham DL, Bogaerts J, Baselga J, Perou C, Blumenthal G, Blohmer J, Mamounas EP, Bergh J, Semiglazov V, Justice R, Eidtmann H, Paik S, Piccart M, Sridhara R, Fasching PA, Slaets L, Tang S, Gerber B, Geyer CE, Pazdur R, Ditsch N, Rastogi P, Eiermann W, and von Minckwitz G (2014) *Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis.* Lancet, 384:164-172.
 33. Garber JE and Offit K (2005) *Hereditary cancer predisposition syndromes.* J Clin Oncol, 23:276-292.
 34. Rahner N and Steinke V (2008) *Hereditary cancer syndromes.* Dtsch Arztebl Int, 105:706-714.
 35. McBride KA, Ballinger ML, Killick E, Kirk J, Tattersall MH, Eeles RA, Thomas DM, and Mitchell G (2014) *Li-Fraumeni syndrome: cancer risk assessment and clinical management.* Nat Rev Clin Oncol, 11:260-271.
 36. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, and Ding W (1994) *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.* Science, 266:66-71.
 37. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, Jervis S, van Leeuwen FE, Milne RL, Andrieu N, Goldgar DE, Terry MB, Rookus MA, Easton DF, Antoniou AC, McGuffog L, Evans DG, Barrowdale D, Frost D, Adlard J, Ong KR, Izatt L, Tischkowitz M, Eeles R, Davidson R, Hodgson S, Ellis S, Nogues C, Lasset C, Stoppa-Lyonnet D, Fricker JP, Faivre L, Berthet P, Hooning MJ, van der Kolk LE, Kets CM, Adank MA, John EM, Chung WK, Andrulis IL, Southey M, Daly MB, Buys SS, Osorio A, Engel C, Kast K, Schmutzler RK, Caldes T,

- Jakubowska A, Simard J, Friedlander ML, McLachlan SA, Machackova E, Foretova L, Tan YY, Singer CF, Olah E, Gerdes AM, Arver B, Olsson H, and Consortium BaBC (2017) *Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers*. JAMA, 317:2402-2416.
38. Thompson D, Easton DF, and Consortium BCL (2002) *Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers*. J Natl Cancer Inst, 94:1358-1365.
39. Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE, Nathanson KL, and Weber BL (2002) *Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program*. J Natl Cancer Inst, 94:1365-1372.
40. Gowen LC, Johnson BL, Latour AM, Sulik KK, and Koller BH (1996) *Brcal deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities*. Nat Genet, 12:191-194.
41. Welsh PL and King M-C (2001) *BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer*. Human Molecular Genetics, 10:705-713.
42. Kandel MJ, Stadler Z, Masciari S, Collins L, Schnitt S, Harris L, Miron A, Richardson A, and Garber JE (2006) *Prevalence of BRCA1 mutations in triple negative breast cancer (BC)*. Journal of Clinical Oncology, 24:508-508.
43. Roy R, Chun J, and Powell SN (2011) *BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection*. Nat Rev Cancer, 12:68-78.
44. Yun MH and Hiom K (2009) *CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle*. Nature, 459:460-463.
45. Fabbro M, Savage K, Hobson K, Deans AJ, Powell SN, McArthur GA, and Khanna KK (2004) *BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage*. J Biol Chem, 279:31251-31258.
46. Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, and Brody LC (2002) *BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage*. Nat Genet, 30:285-289.

47. Sharma B, Preet Kaur R, Raut S, and Munshi A (2018) *BRCA1 mutation spectrum, functions, and therapeutic strategies: The story so far*. *Curr Probl Cancer*, 42:189-207.
48. Network CGA (2012) *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*, 490:61-70.
49. Chatterjee N and Walker GC (2017) *Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis*. *Environ Mol Mutagen*, 58:235-263.
50. Crook T, Crossland S, Crompton MR, Osin P, and Gusterson BA (1997) *p53 mutations in BRCA1-associated familial breast cancer*. *The Lancet*, 350:638-639.
51. Holstege H, Joosse SA, van Oostrom CT, Nederlof PM, de Vries A, and Jonkers J (2009) *High incidence of protein-truncating TP53 mutations in BRCA1-related breast cancer*. *Cancer Res*, 69:3625-3633.
52. Kubbutat MH, Jones SN, and Vousden KH (1997) *Regulation of p53 stability by Mdm2*. *Nature*, 387:299-303.
53. Sionov RV and Haupt Y (1999) *The cellular response to p53: the decision between life and death*. *Oncogene*, 18:6145-6157.
54. Vousden KH and Lu X (2002) *Live or let die: the cell's response to p53*. *Nat Rev Cancer*, 2:594-604.
55. Weber AM and Ryan AJ (2015) *ATM and ATR as therapeutic targets in cancer*. *Pharmacol Ther*, 149:124-138.
56. Quinn JE, James CR, Stewart GE, Mulligan JM, White P, Chang GK, Mullan PB, Johnston PG, Wilson RH, and Harkin DP (2007) *BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy*. *Clin Cancer Res*, 13:7413-7420.
57. Byrski T, Gronwald J, Huzarski T, Grzybowska E, Budryk M, Stawicka M, Mierzwa T, Szwiec M, Wiśniowski R, Siolek M, Narod SA, Lubinski J, and Consortium PHBC (2008) *Response to neo-adjuvant chemotherapy in women with BRCA1-positive breast cancers*. *Breast Cancer Res Treat*, 108:289-296.
58. Kriege M, Jager A, Hooning MJ, Huijskens E, Blom J, van Deurzen CH, Bontenbal M, Collee JM, Menke-Pluijmers MB, Martens JW, and Seynaeve C (2012) *The*

- efficacy of taxane chemotherapy for metastatic breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers.* Cancer, 118:899-907.
59. Isakoff SJ, Mayer EL, He L, Traina TA, Carey LA, Krag KJ, Rugo HS, Liu MC, Stearns V, Come SE, Timms KM, Hartman AR, Borger DR, Finkelstein DM, Garber JE, Ryan PD, Winer EP, Goss PE, and Ellisen LW (2015) *TBCRC009: A Multicenter Phase II Clinical Trial of Platinum Monotherapy With Biomarker Assessment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer.* J Clin Oncol, 33:1902-1909.
 60. Tutt A, Tovey H, Cheang MCU, Kernaghan S, Kilburn L, Gazinska P, Owen J, Abraham J, Barrett S, Barrett-Lee P, Brown R, Chan S, Dowsett M, Flanagan JM, Fox L, Grigoriadis A, Gutin A, Harper-Wynne C, Hatton MQ, Hoadley KA, Parikh J, Parker P, Perou CM, Roylance R, Shah V, Shaw A, Smith IE, Timms KM, Wardley AM, Wilson G, Gillett C, Lanchbury JS, Ashworth A, Rahman N, Harries M, Ellis P, Pinder SE, and Bliss JM (2018) *Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial.* Nat Med, 24:628-637.
 61. Byrski T, Huzarski T, Dent R, Marczyk E, Jasiowka M, Gronwald J, Jakubowicz J, Cybulski C, Wisniowski R, Godlewski D, Lubinski J, and Narod SA (2014) *Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients.* Breast Cancer Res Treat, 147:401-405.
 62. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, and Ashworth A (2005) *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy.* Nature, 434:917-921.
 63. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, and Helleday T (2005) *Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase.* Nature, 434:913-917.
 64. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, Delaloge S, Li W, Tung N, Armstrong A, Wu W, Goessl C, Runswick S, and Conte P (2017) *Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation.* N Engl J Med, 377:523-533.

65. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz SA, Gonçalves A, Lee KH, Fehrenbacher L, Yerushalmi R, Mina LA, Martin M, Roché H, Im YH, Quek RGW, Markova D, Tudor IC, Hannah AL, Eiermann W, and Blum JL (2018) *Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation*. *N Engl J Med*, 379:753-763.
66. Gottesman MM (2002) *Mechanisms of cancer drug resistance*. *Annu Rev Med*, 53:615-627.
67. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, and Gottesman MM (2006) *Targeting multidrug resistance in cancer*. *Nat Rev Drug Discov*, 5:219-234.
68. Nidhi, Rashid M, Kaur V, Hallan SS, Sharma S, and Mishra N (2016) *Microparticles as controlled drug delivery carrier for the treatment of ulcerative colitis: A brief review*. *Saudi Pharm J*, 24:458-472.
69. Gabizon A, Shmeeda H, and Barenholz Y (2003) *Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies*. *Clin Pharmacokinet*, 42:419-436.
70. Vail DM, Amantea MA, Colbern GT, Martin FJ, Hilger RA, and Working PK (2004) *Pegylated liposomal doxorubicin: proof of principle using preclinical animal models and pharmacokinetic studies*. *Semin Oncol*, 31:16-35.
71. Ali S, Rasool M, Chaoudhry H, N Pushparaj P, Jha P, Hafiz A, Mahfooz M, Abdus Sami G, Azhar Kamal M, Bashir S, Ali A, and Sarwar Jamal M (2016) *Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer*. *Bioinformation*, 12:135-139.
72. Hosford SR and Miller TW (2014) *Clinical potential of novel therapeutic targets in breast cancer: CDK4/6, Src, JAK/STAT, PARP, HDAC, and PI3K/AKT/mTOR pathways*. *Pharmgenomics Pers Med*, 7:203-215.
73. Alajati A, Sausgruber N, Aceto N, Duss S, Sarret S, Voshol H, Bonenfant D, and Bentires-Alj M (2013) *Mammary tumor formation and metastasis evoked by a HER2 splice variant*. *Cancer Res*, 73:5320-5327.

74. Díaz-Rodríguez E, Pérez-Peña J, Ríos-Luci C, Arribas J, Ocaña A, and Pandiella A (2019) *TRAIL receptor activation overcomes resistance to trastuzumab in HER2 positive breast cancer cells*. *Cancer Lett*, 453:34-44.
75. Shibue T and Weinberg RA (2017) *EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications*. *Nat Rev Clin Oncol*, 14:611-629.
76. Dongre A and Weinberg RA (2019) *New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20:69-84.
77. Gupta PB, Pastushenko I, Skibinski A, Blanpain C, and Kuperwasser C (2019) *Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance*. *Cell Stem Cell*, 24:65-78.
78. Lamouille S, Xu J, and Derynck R (2014) *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15:178-196.
79. Greenburg G and Hay ED (1982) *Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells*. *J Cell Biol*, 95:333-339.
80. Hay ED (1995) *An overview of epithelio-mesenchymal transformation*. *Acta Anat (Basel)*, 154:8-20.
81. Horikoshi Y, Suzuki A, Yamanaka T, Sasaki K, Mizuno K, Sawada H, Yonemura S, and Ohno S (2009) *Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells*. *J Cell Sci*, 122:1595-1606.
82. Etienne-Manneville S (2008) *Polarity proteins in migration and invasion*. *Oncogene*, 27:6970-6980.
83. Moreno-Bueno G, Portillo F, and Cano A (2008) *Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer*. *Oncogene*, 27:6958-6969.
84. Lawson CD and Ridley AJ (2018) *Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion*. *J Cell Biol*, 217:447-457.
85. Yilmaz M and Christofori G (2009) *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. *Cancer Metastasis Rev*, 28:15-33.

86. Anderson JM and Van Itallie CM (2009) *Physiology and function of the tight junction*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 1:a002584.
87. Mège RM and Ishiyama N (2017) *Integration of Cadherin Adhesion and Cytoskeleton at*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 9.
88. Johnson JL, Najor NA, and Green KJ (2014) *Desmosomes: regulators of cellular signaling and adhesion in epidermal health and disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 4:a015297.
89. Schneider MR and Kolligs FT (2015) *E-cadherin's role in development, tissue homeostasis and disease: Insights from mouse models: Tissue-specific inactivation of the adhesion protein E-cadherin in mice reveals its functions in health and disease*. Bioessays, 37:294-304.
90. Rosso M, Majem B, Devis L, Lapyckyj L, Besso MJ, Llauradó M, Abascal MF, Matos ML, Lanau L, Castellví J, Sánchez JL, Pérez Benavente A, Gil-Moreno A, Reventós J, Santamaria Margalef A, Rigau M, and Vazquez-Levin MH (2017) *E-cadherin: A determinant molecule associated with ovarian cancer progression, dissemination and aggressiveness*. PLoS One, 12:e0184439.
91. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, and Weinberg RA (2008) *Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways*. Cancer Res, 68:3645-3654.
92. Gan WJ, Wang JR, Zhu XL, He XS, Guo PD, Zhang S, Li XM, Li JM, and Wu H (2016) *RAR γ -induced E-cadherin downregulation promotes hepatocellular carcinoma invasion and metastasis*. J Exp Clin Cancer Res, 35:164.
93. Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, and Akslen LA (2007) *A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer*. Clin Cancer Res, 13:7003-7011.
94. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, and Suyama K (2004) *Cadherin switch in tumor progression*. Ann N Y Acad Sci, 1014:155-163.
95. Heuberger J and Birchmeier W (2010) *Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2:a002915.

96. Marcus Mareel KV, Stefan Vermeulen , Marc Bracke and Frans Van Roy (1992) *E-Cadherin expression: a counterbalance for cancer cell invasion*. BULLETIN DU CANCER, 79:347-355.
97. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, and Nieto MA (2000) *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2:76-83.
98. Soltermann A, Tischler V, Arbogast S, Braun J, Probst-Hensch N, Weder W, Moch H, and Kristiansen G (2008) *Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 14:7430-7437.
99. Rasheed ZA, Yang J, Wang Q, Kowalski J, Freed I, Murter C, Hong SM, Koorstra JB, Rajeshkumar NV, He X, Goggins M, Iacobuzio-Donahue C, Berman DM, Laheru D, Jimeno A, Hidalgo M, Maitra A, and Matsui W (2010) *Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma*. J Natl Cancer Inst, 102:340-351.
100. Seyfried TN and Huysentruyt LC (2013) *On the origin of cancer metastasis*. Crit Rev Oncog, 18:43-73.
101. Chaffer CL and Weinberg RA (2011) *A perspective on cancer cell metastasis*. Science, 331:1559-1564.
102. Chaffer CL, San Juan BP, Lim E, and Weinberg RA (2016) *EMT, cell plasticity and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 35:645-654.
103. Jolly MK, Somarelli JA, Sheth M, Biddle A, Tripathi SC, Armstrong AJ, Hanash SM, Bapat SA, Rangarajan A, and Levine H (2019) *Hybrid epithelial/mesenchymal phenotypes promote metastasis and therapy resistance across carcinomas*. Pharmacol Ther, 194:161-184.
104. Bierie B, Pierce SE, Kroeger C, Stover DG, Pattabiraman DR, Thiru P, Liu Donaher J, Reinhardt F, Chaffer CL, Keckesova Z, and Weinberg RA (2017) *Integrin- β 4 identifies cancer stem cell-enriched populations of partially mesenchymal carcinoma cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences.

105. Yamashita N, Tokunaga E, Iimori M, Inoue Y, Tanaka K, Kitao H, Saeki H, Oki E, and Maehara Y (2018) *Epithelial Paradox: Clinical Significance of Coexpression of E-cadherin and Vimentin With Regard to Invasion and Metastasis of Breast Cancer*. Clin Breast Cancer, 18:e1003-e1009.
106. Hanahan D and Coussens LM (2012) *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment*. Cancer Cell, 21:309-322.
107. Santamaría PG, Moreno-Bueno G, and Cano A (2019) *Contribution of Epithelial Plasticity to Therapy Resistance*. J Clin Med, 8.
108. Quail DF and Joyce JA (2013) *Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis*. Nat Med, 19:1423-1437.
109. Son B, Lee S, Youn H, Kim E, Kim W, and Youn B (2017) *The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance*. Oncotarget, 8:3933-3945.
110. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, and Takeyama H (2015) *Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth*. Cancers (Basel), 7:2443-2458.
111. Paget S (1889) *THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST*. The Lancet, 133:571-573.
112. Hart IR FI (1980) *Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma*. Cancer Research, 40:2281-2287.
113. Akhtar M, Haider A, Rashid S, and Al-Nabet ADMH (2019) *Paget's "Seed and Soil" Theory of Cancer Metastasis: An Idea Whose Time has Come*. Adv Anat Pathol, 26:69-74.
114. Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G, Psaila B, Kaplan RN, Bromberg JF, Kang Y, Bissell MJ, Cox TR, Giaccia AJ, Ertler JT, Hiratsuka S, Ghajar CM, and Lyden D (2017) *Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases*. Nat Rev Cancer, 17:302-317.
115. Kitamura T, Qian BZ, and Pollard JW (2015) *Immune cell promotion of metastasis*. Nat Rev Immunol, 15:73-86.
116. Chin AR and Wang SE (2016) *Cancer Tills the Premetastatic Field: Mechanistic Basis and Clinical Implications*. Clin Cancer Res, 22:3725-3733.

117. Kawaguchi T, Foster BA, Young J, and Takabe K (2017) *Current Update of Patient-Derived Xenograft Model for Translational Breast Cancer Research*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 22:131-139.
118. Ibrahim YH, García-García C, Serra V, He L, Torres-Lockhart K, Prat A, Anton P, Cozar P, Guzmán M, Grueso J, Rodríguez O, Calvo MT, Aura C, Díez O, Rubio IT, Pérez J, Rodón J, Cortés J, Ellisen LW, Scaltriti M, and Baselga J (2012) *PI3K inhibition impairs BRCA1/2 expression and sensitizes BRCA-proficient triple-negative breast cancer to PARP inhibition*. *Cancer Discov*, 2:1036-1047.
119. Park HS, Lee JD, Kim JY, Park S, Kim JH, Han HJ, Choi YA, Choi AR, Sohn JH, and Kim SI (2019) *Establishment of chemosensitivity tests in triple-negative and BRCA-mutated breast cancer patient-derived xenograft models*. *PLoS One*, 14:e0225082.
120. Kersten K, de Visser KE, van Miltenburg MH, and Jonkers J (2017) *Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine*. *EMBO Mol Med*, 9:137-153.
121. Day C-P, Merlino G, and Van Dyke T (2015) *Preclinical Mouse Cancer Models: A Maze of Opportunities and Challenges*. *Cell*, 163:39-53.
122. Singh M, Murriel CL, and Johnson L (2012) *Genetically engineered mouse models: closing the gap between preclinical data and trial outcomes*. *Cancer Res*, 72:2695-2700.
123. Dine J and Deng CX (2013) *Mouse models of BRCA1 and their application to breast cancer research*. *Cancer Metastasis Rev*, 32:25-37.
124. Liu X, Holstege H, van der Gulden H, Treur-Mulder M, Zevenhoven J, Velds A, Kerkhoven RM, van Vliet MH, Wessels LF, Peterse JL, Berns A, and Jonkers J (2007) *Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:12111-12116.
125. Selbert S, Bentley DJ, Melton DW, Rannie D, Lourenço P, Watson CJ, and Clarke AR (1998) *Efficient BLG-Cre mediated gene deletion in the mammary gland*. *Transgenic Res*, 7:387-396.

126. Wagner KU, Wall RJ, St-Onge L, Gruss P, Wynshaw-Boris A, Garrett L, Li M, Furth PA, and Hennighausen L (1997) *Cre-mediated gene deletion in the mammary gland*. *Nucleic Acids Res*, 25:4323-4330.
127. Shakya R, Szabolcs M, McCarthy E, Ospina E, Basso K, Nandula S, Murty V, Baer R, and Ludwig T (2008) *The basal-like mammary carcinomas induced by Brca1 or Bard1 inactivation implicate the BRCA1/BARD1 heterodimer in tumor suppression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:7040-7045.
128. Xu X, Wagner KU, Larson D, Weaver Z, Li C, Ried T, Hennighausen L, Wynshaw-Boris A, and Deng CX (1999) *Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation*. *Nat Genet*, 22:37-43.
129. Brodie SG and Deng CX (2001) *BRCA1-associated tumorigenesis: what have we learned from knockout mice?* *Trends Genet*, 17:S18-22.
130. Brodie SG, Xu X, Qiao W, Li WM, Cao L, and Deng CX (2001) *Multiple genetic changes are associated with mammary tumorigenesis in Brca1 conditional knockout mice*. *Oncogene*, 20:7514-7523.
131. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, Fridlyand J, Sahin A, Agarwal R, Joy C, Liu W, Stivers D, Baggerly K, Carey M, Lluch A, Monteagudo C, He X, Weigman V, Fan C, Palazzo J, Hortobagyi GN, Nolden LK, Wang NJ, Valero V, Gray JW, Perou CM, and Mills GB (2009) *Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics*. *Cancer Res*, 69:4116-4124.
132. Yakan S, Sari E, Erkan N, Yildirim M, Vardar E, Coşkun A, Çetin DA, and Eliyatkin N (2014) *Breast Carcinosarcomas*. *J Breast Health*, 10:161-165.
133. Rottenberg S, Nygren AO, Pajic M, van Leeuwen FW, van der Heijden I, van de Wetering K, Liu X, de Visser KE, Gilhuijs KG, van Tellingen O, Schouten JP, Jonkers J, and Borst P (2007) *Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:12117-12122.

134. Füredi A, Tóth S, Hámori L, Nagy V, Tóvári J, and Szakács G (2015) *[Relevance of animal models in the development of compounds targeting multidrug resistant cancer]*. *Magy Onkol*, 59:338-345.
135. Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Zander SA, Derksen PW, de Bruin M, Zevenhoven J, Lau A, Boulter R, Cranston A, O'Connor MJ, Martin NM, Borst P, and Jonkers J (2008) *High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:17079-17084.
136. Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A, Blanpain C, Bock C, Borowski C, Caldas C, Califano A, Doherty M, Elsner M, Esteller M, Fitzgerald R, Korbel JO, Lichter P, Mason CE, Navin N, Pe'er D, Polyak K, Roberts CW, Siu L, Snyder A, Stower H, Swanton C, Verhaak RG, Zenklusen JC, Zuber J, and Zucman-Rossi J (2015) *Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity*. *Nat Med*, 21:846-853.
137. Tabassum DP and Polyak K (2015) *Tumorigenesis: it takes a village*. *Nat Rev Cancer*, 15:473-483.
138. Tellez-Gabriel M, Ory B, Lamoureux F, Heymann MF, and Heymann D (2016) *Tumour Heterogeneity: The Key Advantages of Single-Cell Analysis*. *Int J Mol Sci*, 17.
139. Meacham CE and Morrison SJ (2013) *Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity*. *Nature*, 501:328-337.
140. Imamura T, Saitou T, and Kawakami R (2018) *In vivo optical imaging of cancer cell function and tumor microenvironment*. *Cancer Sci*, 109:912-918.
141. Jiguet-Jiglaire C, Cayol M, Mathieu S, Jeanneau C, Bouvier-Labit C, Ouafik L, and El-Battari A (2014) *Noninvasive near-infrared fluorescent protein-based imaging of tumor progression and metastases in deep organs and intraosseous tissues*. *J Biomed Opt*, 19:16019.
142. Doh SJ, Yamakawa M, Santosa SM, Montana M, Guo K, Sauer JR, Curran N, Han KY, Yu C, Ema M, Rosenblatt MI, Chang JH, and Azar DT (2018) *Fluorescent reporter transgenic mice for in vivo live imaging of angiogenesis and lymphangiogenesis*. *Angiogenesis*, 21:677-698.

143. Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A, Andreeff M, and Marini FC (2012) *Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma*. PLoS One, 7:e30563.
144. Yang M, Jiang P, and Hoffman RM (2007) *Whole-body subcellular multicolor imaging of tumor-host interaction and drug response in real time*. Cancer Res, 67:5195-5200.
145. Bősze P (2015) *A szaknyelvi csoportnevek írása a magyar orvosi nyelvben - javaslat megvitátásra*. MAGYAR ORVOSI NYELV, 15:47-71.
146. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, and Prockop DJ (2004) *Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential*. Blood, 103:1662-1668.
147. Andrews S. *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. 2010 [cited 2019 12. 28.]; Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
148. Bolger AM, Lohse M, and Usadel B (2014) *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. Bioinformatics, 30:2114-2120.
149. Li H and Durbin R (2009) *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform*. Bioinformatics, 25:1754-1760.
150. Rosenthal R, McGranahan N, Herrero J, Taylor BS, and Swanton C (2016) *DeconstructSigs: delineating mutational processes in single tumors distinguishes DNA repair deficiencies and patterns of carcinoma evolution*. Genome Biol, 17:31.
151. Pedersen BS, Collins RL, Talkowski ME, and Quinlan AR (2017) *Indexcov: fast coverage quality control for whole-genome sequencing*. Gigascience, 6:1-6.
152. Terry Therneau BA. *rpart: Recursive Partitioning and Regression Trees. R package version 4.1-13*. 2018 [cited 2019. 12. 28.]; Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=rpart>.
153. Graham FL and van der Eb AJ (1973) *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. Virology, 52:456-467.

154. O'Shaughnessy JA (2003) *Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer*. Clin Breast Cancer, 4:318-328.
155. Füredi A, Szabó P, Tóth S, Cserepes M, Hámori L, Nagy V, Karai E, Vajdovich P, Imre T, Szabó P, Szüts D, Tóvári J, and Szakács G (2017) *Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer*. J Control Release, 261:287-296.
156. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, and Horwitz E (2006) *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 8:315-317.
157. Szabó E, Fajka-Boja R, Kriston-Pál É, Hornung Á, Makra I, Kudlik G, Uher F, Katona RL, Monostori É, and Czibula Á (2015) *Licensing by Inflammatory Cytokines Abolishes Heterogeneity of Immunosuppressive Function of Mesenchymal Stem Cell Population*. Stem Cells Dev, 24:2171-2180.
158. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, and Bonner WM (1998) *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 273:5858-5868.
159. Yu T, MacPhail SH, Banáth JP, Klovov D, and Olive PL (2006) *Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability*. DNA Repair (Amst), 5:935-946.
160. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Børresen-Dale AL, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjörd JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Hutter B, Ilicic T, Imbeaud S, Imielinski M, Imielinsk M, Jäger N, Jones DT, Jones D, Knappskog S, Kool M, Lakhani SR, López-Otín C, Martin S, Munshi NC, Nakamura H, Northcott PA, Pajic M, Papaemmanuil E, Paradiso A, Pearson JV, Puente XS, Raine K, Ramakrishna M, Richardson AL, Richter J, Rosenstiel P, Schlesner M, Schumacher TN, Span PN, Teague JW, Totoki Y, Tutt AN, Valdés-Mas R, van Buuren MM, van 't Veer L, Vincent-Salomon A, Waddell N, Yates LR, Zucman-Rossi J, Futreal PA, McDermott U, Lichter P, Meyerson M, Grimmond SM,

- Siebert R, Campo E, Shibata T, Pfister SM, Campbell PJ, Stratton MR, Initiative APCG, Consortium IBC, Consortium IM-S, and PedBrain I (2013) *Signatures of mutational processes in human cancer*. *Nature*, 500:415-421.
161. Dhawan MS, Bartelink IH, Aggarwal RR, Leng J, Zhang JZ, Pawlowska N, Terranova-Barberio M, Grabowsky JA, Gewitz A, Chien AJ, Moasser M, Kelley RK, Maktabi T, Thomas S, and Munster PN (2017) *Differential Toxicity in Patients with and without DNA Repair Mutations: Phase I Study of Carboplatin and Talazoparib in Advanced Solid Tumors*. *Clin Cancer Res*, 23:6400-6410.
162. Liston DR and Davis M (2017) *Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies*. *Clin Cancer Res*, 23:3489-3498.
163. Somlo G, Frankel PH, Arun BK, Ma CX, Garcia AA, Cigler T, Cream LV, Harvey HA, Sparano JA, Nanda R, Chew HK, Moynihan TJ, Vahdat LT, Goetz MP, Beumer JH, Hurria A, Mortimer J, Piekarz R, Sand S, Herzog J, Van Tongeren LR, Ferry-Galow KV, Chen AP, Ruel C, Newman EM, Gandara DR, and Weitzel JN (2017) *Efficacy of the PARP Inhibitor Veliparib with Carboplatin or as a Single Agent in Patients with Germline*. *Clin Cancer Res*, 23:4066-4076.
164. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, and Wicha MS (2003) *Stem cells in normal breast development and breast cancer*. *Cell Prolif*, 36 Suppl 1:59-72.
165. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, and Weinberg RA (2008) *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. *Cell*, 133:704-715.
166. Ansari L, Shieh-zadeh F, Taherzadeh Z, Nikoofal-Sahlabadi S, Momtazi-Borojeni AA, Sahebkar A, and Eslami S (2017) *The most prevalent side effects of pegylated liposomal doxorubicin monotherapy in women with metastatic breast cancer: a systematic review of clinical trials*. *Cancer Gene Ther*, 24:189-193.
167. Hollis RL, Meynert AM, Churchman M, Rye T, Mackean M, Nussey F, Arends MJ, Sims AH, Semple CA, Herrington CS, and Gourley C (2018) *Enhanced response rate to pegylated liposomal doxorubicin in high grade serous ovarian carcinomas harbouring BRCA1 and BRCA2 aberrations*. *BMC Cancer*, 18:16.

168. Al-Batran SE, Bischoff J, von Minckwitz G, Atmaca A, Kleeberg U, Meuthen I, Morack G, Lerbs W, Hecker D, Sehouli J, Knuth A, and Jager E (2006) *The clinical benefit of pegylated liposomal doxorubicin in patients with metastatic breast cancer previously treated with conventional anthracyclines: a multicentre phase II trial*. Br J Cancer, 94:1615-1620.
169. Al-Batran SE, Güntner M, Pauligk C, Scholz M, Chen R, Beiss B, Stopatschinskaja S, Lerbs W, Harbeck N, and Jäger E (2010) *Anthracycline rechallenge using pegylated liposomal doxorubicin in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis using individual data from four prospective trials*. Br J Cancer, 103:1518-1523.
170. Amable L (2016) *Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine*. Pharmacol Res, 106:27-36.
171. Holzer AK, Samimi G, Katano K, Naerdemann W, Lin X, Safaei R, and Howell SB (2004) *The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells*. Mol Pharmacol, 66:817-823.
172. Noordhuis P, Laan AC, van de Born K, Losekoot N, Kathmann I, and Peters GJ (2008) *Oxaliplatin activity in selected and unselected human ovarian and colorectal cancer cell lines*. Biochem Pharmacol, 76:53-61.
173. Yang T, Chen M, Chen T, and Thakur A (2015) *Expression of the copper transporters hCtr1, ATP7A and ATP7B is associated with the response to chemotherapy and survival time in patients with resected non-small cell lung cancer*. Oncol Lett, 10:2584-2590.
174. Samimi G, Varki NM, Wilczynski S, Safaei R, Alberts DS, and Howell SB (2003) *Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients*. Clin Cancer Res, 9:5853-5859.
175. Li ZH, Zheng R, Chen JT, Jia J, and Qiu M (2016) *The role of copper transporter ATP7A in platinum-resistance of esophageal squamous cell cancer (ESCC)*. J Cancer, 7:2085-2092.

176. Villalobos M, Czapiewski P, Reinmuth N, Fischer JR, Andreas S, Kortsik C, Serke M, Wolf M, Neuser P, Reuss A, Schnabel PA, and Thomas M (2018) *ERCC1 assessment in upfront treatment with and without cisplatin-based chemotherapy in stage IIIB/IV non-squamous non-small cell lung cancer*. *Med Oncol*, 35:106.
177. Du P, Wang Y, Chen L, Gan Y, and Wu Q (2016) *High ERCC1 expression is associated with platinum-resistance, but not survival in patients with epithelial ovarian cancer*. *Oncol Lett*, 12:857-862.
178. Swisher EM, Sakai W, Karlan BY, Wurz K, Urban N, and Taniguchi T (2008) *Secondary BRCA1 mutations in BRCA1-mutated ovarian carcinomas with platinum resistance*. *Cancer Res*, 68:2581-2586.
179. Almeida LO, Abrahao AC, Rosselli-Murai LK, Giudice FS, Zagni C, Leopoldino AM, Squarize CH, and Castilho RM (2014) *NFκB mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)*. *FEBS Open Bio*, 4:96-104.
180. Li J, Hao D, Wang L, Wang H, Wang Y, Zhao Z, Li P, Deng C, and Di LJ (2017) *Epigenetic targeting drugs potentiate chemotherapeutic effects in solid tumor therapy*. *Sci Rep*, 7:4035.
181. Lund RJ, Huhtinen K, Salmi J, Rantala J, Nguyen EV, Moulder R, Goodlett DR, Lahesmaa R, and Carpén O (2017) *DNA methylation and Transcriptome Changes Associated with Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer*. *Sci Rep*, 7:1469.
182. Zeller C, Dai W, Steele NL, Siddiq A, Walley AJ, Wilhelm-Benartzi CS, Rizzo S, van der Zee A, Plumb JA, and Brown R (2012) *Candidate DNA methylation drivers of acquired cisplatin resistance in ovarian cancer identified by methylome and expression profiling*. *Oncogene*, 31:4567-4576.
183. Jin KL, Pak JH, Park JY, Choi WH, Lee JY, Kim JH, and Nam JH (2008) *Expression profile of histone deacetylases 1, 2 and 3 in ovarian cancer tissues*. *J Gynecol Oncol*, 19:185-190.
184. Sun X, Wang S, Gai J, Guan J, Li J, Li Y, Zhao J, Zhao C, Fu L, and Li Q (2019) *SIRT5 Promotes Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer by Suppressing DNA*

- Damage in a ROS-Dependent Manner via Regulation of the Nrf2/HO-1 Pathway.* Front Oncol, 9:754.
185. Zeng Q, Li W, Lu D, Wu Z, Duan H, Luo Y, Feng J, Yang D, Fu L, and Yan X (2012) *CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 109:1127-1132.
 186. Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, Martin-Trevino R, Shang L, McDermott SP, Landis MD, Hong S, Adams A, D'Angelo R, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Clouthier SG, Birnbaum D, Wong ST, Zhan M, Chang JC, and Wicha MS (2014) *Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts.* Stem Cell Reports, 2:78-91.
 187. Nalawade YV (2009) *Evaluation of breast calcifications.* Indian J Radiol Imaging, 19:282-286.
 188. Zheng X, Lu G, Yao Y, and Gu W (2019) *An Autocrine IL-6/IGF-1R Loop Mediates EMT and Promotes Tumor Growth in Non-small Cell Lung Cancer.* Int J Biol Sci, 15:1882-1891.
 189. Xie G, Yao Q, Liu Y, Du S, Liu A, Guo Z, Sun A, Ruan J, Chen L, Ye C, and Yuan Y (2012) *IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures.* Int J Oncol, 40:1171-1179.
 190. Yoshida Y, Sibusa T, Ishii Y, Akino K, Kikuchi T, Mita H, Adachi Y, Nakamura M, Kato Y, and Endo T (2019) *Granulocyte Colony-stimulating Factor- and Interleukin-6-producing Large-cell Carcinoma of the Lung with Sarcomatoid Changes Suggestive of Epithelial-mesenchymal Transition: An Autopsy Case Report.* Intern Med, 58:3305-3311.
 191. Cui YH, Suh Y, Lee HJ, Yoo KC, Uddin N, Jeong YJ, Lee JS, Hwang SG, Nam SY, Kim MJ, and Lee SJ (2015) *Radiation promotes invasiveness of non-small-cell lung cancer cells through granulocyte-colony-stimulating factor.* Oncogene, 34:5372-5382.
 192. Minchinton AI and Tannock IF (2006) *Drug penetration in solid tumours.* Nat Rev Cancer, 6:583-592.

193. Senthebane DA, Jonker T, Rowe A, Thomford NE, Munro D, Dandara C, Wonkam A, Govender D, Calder B, Soares NC, Blackburn JM, Parker MI, and Dzobo K (2018) *The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: 3D Extracellular Matrices as Accomplices*. Int J Mol Sci, 19.
194. Jing X, Yang F, Shao C, Wei K, Xie M, Shen H, and Shu Y (2019) *Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment*. Mol Cancer, 18:157.
195. Bartosh TJ, Ullah M, Zeitouni S, Beaver J, and Prockop DJ (2016) *Cancer cells enter dormancy after cannibalizing mesenchymal stem/stromal cells (MSCs)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 113:E6447-E6456.
196. Turner N, Tutt A, and Ashworth A (2004) *Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers*. Nat Rev Cancer, 4:814-819.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Lilla Hámori, Gyöngyi Kudlik, Kornélia Szebényi, Nóra Kucsma, Bálint Szeder, Ádám Póti, Ferenc Uher, György Várady, Dávid Szüts, József Tóvári and András Füredi, Gergely Szakács, *Establishment and Characterization of a Brca1^{-/-}, P53^{-/-} Mouse Mammary Tumor Cell Line*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21** (4)

IF: 4,183

András Füredi, Kornélia Szebényi, Szilárd Tóth, Mihály Cserepes, **Lilla Hámori**, Veronika Nagy, Edina Karai, Tímea Imre, Pál Szabó, Dávid Szüts, József Tóvári, Gergely Szakács: *Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer*. Journal of Controlled Release, 2017 Sep 10;261:287-296

IF: 7,877

11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Bálint Szeder, Júlia Tárnoki-Zách, Dóra Lakatos, Virág Vas, Gyöngyi Kudlik, Balázs Merő, Kitti Koprivanacz, László Bányai, **Lilla Hámori**, Gergely Róna, András Czirók, András Füredi, László Buday; *Absence of the Tks4 Scaffold Protein Induces Epithelial-Mesenchymal Transition-Like Changes in Human Colon Cancer Cells*. Cells, 2019. **8** (11).

IF: 5,656

Magyar közlemény

Füredi András, Tóth Szilárd, **Hámori Lilla**, Nagy Veronika, Tóvári József, Szakács Gergely, *Állatmodellek szerepe a multidrogrezisztens tumorokat célzó kemoterápia fejlesztésében*. Magyar Onkológia 59:338–345, 2015

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Dr. Szakács Gergelynek, aki témavezetőmként irányította a munkámat és lehetővé tette, hogy ez a disszertáció megszülethessen. Örömmel tölt el, hogy a nehézségek ellenére megtaláltuk a közös hangot, ami rendkívül eredményes évekhez vezetett.

Hálás vagyok Dr. Füredi Andrásnak, akitől a laboratóriumi munka mellett a tudományos gondolkodást is megtanultam. Az első pillanattól az utolsóig segítette és irányította a munkámat, és arra is megtanított, hogy tudósnak lenni hivatás, amit teljes szívvel érdemes művelni.

Köszönöm kollégáimnak, Mohos Krisztinek, Karai Edinának és Dr. Tóth Szilárdnak, hogy bearanyozták a mindennapokat.

Köszönet illeti Kucsma Nórát a rengeteg szakmai segítségért, amit az évek során tőle kaptam és a kedves szavakért.

Szeretném megköszönni Nagy Veronikának az együtt eltöltött hallgatói éveket és a Membrán Fehérje Kutatócsoport valamennyi jelenlegi és korábbi tagjának, a segítséget és a támogatást, amit tőlük kaptam.

Köszönettel tartozom Dr. Tóvári Józsefnek, aki lehetővé tette, hogy az állatkísérletes munkák megvalósulhassanak, valamint Bodrogi-Mayer Irénnek és Hídvégi Anitának az állatkísérletek során nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti szakmai segítségükért Dr. Szabó Kornéliát, Dr. Uher Ferencet, Dr. Kudlik Gyöngyit, Szeder Bálintot, Dr. Szüts Dávidot, Póti Ádámot és Dr. Várady Györgyöt.

Hálás vagyok a barátaimnak, különösen Virágnak, Vikinek és Szandinak, amiért elviseltek, mindig meghallgattak és támogattak.

Köszönetet szeretnék mondani Vikornak, aki szeretett, mellettem állt és segített átvészelni a nehezebb időszakokat.

És végül a legnagyobb köszönet a családomat illeti, akik lehetővé tették, hogy tanulhassak, mindig hittek bennem, támogattak és szerettek.



Article

Establishment and Characterization of a *Brca1*^{-/-}, *p53*^{-/-} Mouse Mammary Tumor Cell Line

Lilla Hámori ¹, Gyöngyi Kudlik ¹, Kornélia Szebényi ^{1,2}, Nóra Kucsma ¹, Bálint Szeder ¹,
Ádám Póti ¹, Ferenc Uher ³, György Várady ¹, Dávid Szüts ¹, József Tóvári ⁴, András Füredi ^{1,2,*}
and Gergely Szakács ^{1,2,*}

¹ Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, 1117 Budapest, Hungary; hamori.lilla@ttk.mta.hu (L.H.); kudlik.gyongyi@ttk.hu (G.K.); ks863@cam.ac.uk (K.S.); kucsma.nora@ttk.hu (N.K.); szeder.balint@ttk.hu (B.S.); poti.adam@ttk.hu (Á.P.); varady.gyorgy@ttk.hu (G.V.); szuts.david@ttk.hu (D.S.)

² Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria

³ Central Hospital of Southern Pest—National Institute of Hematology and Infectious Diseases, 1097 Budapest, Hungary; uher.ferenc@gmail.com

⁴ Department of Experimental Pharmacology, National Institute of Oncology, 1122, Budapest, Hungary; tozsi@oncol.hu

* Correspondence: andras.fueredi@meduniwien.ac.at (A.F.); gergely.szakacs@meduniwien.ac.at (G.S.)

Received: 30 December 2019; Accepted: 1 February 2020; Published: 11 February 2020

Abstract: Breast cancer is the most commonly occurring cancer in women and the second most common cancer overall. By the age of 80, the estimated risk for breast cancer for women with germline BRCA1 or BRCA2 mutations is around 80%. Genetically engineered BRCA1-deficient mouse models offer a unique opportunity to study the pathogenesis and therapy of triple negative breast cancer. Here we present a newly established *Brca1*^{-/-}, *p53*^{-/-} mouse mammary tumor cell line, designated as CST. CST shows prominent features of BRCA1-mutated triple-negative breast cancers including increased motility, high proliferation rate, genome instability and sensitivity to platinum chemotherapy and PARP inhibitors (olaparib, veliparib, rucaparib and talazoparib). Genomic instability of CST cells was confirmed by whole genome sequencing, which also revealed the presence of COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) mutation signatures 3 and 8 associated with homologous recombination (HR) deficiency. In vitro sensitivity of CST cells was tested against 11 chemotherapy agents. Tumors derived from orthotopically injected CST-mCherry cells in FVB-GFP mice showed sensitivity to cisplatin, providing a new model to study the cooperation of BRCA1-KO, mCherry-positive tumor cells and the GFP-expressing stromal compartment in therapy resistance and metastasis formation. In summary, we have established CST cells as a new model recapitulating major characteristics of BRCA1-negative breast cancers.

Keywords: breast cancer; BRCA1; cancer cell line; genetically engineered mouse model

1. Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide, affecting approximately one in eight women, and showing a heterogeneous population of tumors with different morphological and molecular features, prognoses and response to therapy [1,2]. In case of hormone- or growth factor-dependent breast cancers expressing ER (estrogen receptor), PR (progesterone receptor) and/or epidermal growth factor receptor 2 (HER2) targeted treatment options can significantly increase quality of life and survival. Conversely, triple negative breast cancer (TNBC), accounting for 15–20% of all breast cancer cases, carry a poor prognosis, as these tumors are insensitive to most available hormonal or targeted therapeutic agents [3–5].

Germline mutations in BRCA1 are responsible for a large proportion of inherited predispositions to breast and ovarian cancer. Women who carry mutations in BRCA1 or BRCA2 face 60% to 80% elevated lifetime risk to develop breast cancer by the age of 80 [6–9]. Germline mutations in BRCA1/2 occur in approximately 10% of TNBC patients [7], and mutations in further genes involved in the maintenance of genomic integrity and DNA repair, such as ATM (ataxia-telangiectasia), CHEK2 (Checkpoint kinase 2), and TP53 are also common [10, 11]. BRCA-related mammary tumors are considered a distinct subtype due to their unique mutation profile (“BRCAness”) [12,13]. Breast cancers with BRCA1 or BRCA2 mutations are characterized by different gene expression patterns, highlighting the influence of heritable mutations on the phenotype and chemosensitivity of cancer [14,15].

In lack of targeted therapeutic options, chemotherapy remains the most effective treatment for TNBC. Neoadjuvant chemotherapy regimens containing taxanes and anthracyclines achieve complete response (CR) in 30% to 50% of patients with TNBC [16,17]. Unfortunately, TNBC patients with mutated BRCA1 are resistant to taxane therapy [18–20]. Conversely, drugs that induce DNA double-strand breaks and thereby increase genomic instability, represent a promising strategy for the treatment of TNBC with BRCA1/2 mutations [16,21,22]. Clinical studies have shown that platinum-based neoadjuvant chemotherapy is highly effective in TNBC patients with BRCA1 gene mutations [23,24]. Since 2018, patients relapsing after previous chemotherapy in the neoadjuvant, adjuvant, or metastatic setting are eligible to treatment with PARP inhibitors such as olaparib and talazoparib, inducing synthetic lethality in BRCA1 or BRCA2 cancers [21,25–27].

Preclinical cancer research has relied on animal models for the development of effective treatment for different cancer types. In particular, xenograft cancer models, where human cancer cells are transplanted in immunocompromised mice, offer an easy to use, inexpensive, and reproducible method. However, xenografts bear little resemblance with the molecular complexity and tumor heterogeneity of the original tumors; the vascularization of the heterotopic xenografts is often poor, and the stroma-tumor interactions in the immunocompromised hosts are very different from those influencing naturally occurring cancers in humans. For these reasons, while xenografts have been the most commonly used *in vivo* tumor models, their predictive value for therapeutic success has remained limited [28]. Genetically engineered mouse models of cancer (GEMMC) recapitulate molecular and histopathological features of the human disease and therefore provide a more sophisticated approach. GEMM of breast cancer captures at least some of the heterogeneity of human breast cancer [29]. Since the therapeutic efficacy of several anticancer agents relies on their capacity to influence the tumor-host interaction and anti-tumor immune responses [30], models with an intact immune system are important for the development of novel therapeutic strategies [29]. GEMMC have been successfully used for the preclinical evaluation of novel therapeutics, the study of the response of real tumors to therapy, and the identification of resistance mechanisms [31,32].

Over 20 distinct mutations, including null, hypomorphic, isoform, conditional, and point mutations, have been engineered in mice to study the relevance of Brca1 in mammary development and tumorigenesis [33]. Since germ-line deletion of Brca1 proved to be lethal during embryogenesis, and its heterozygous loss did not initiate tumorigenesis [34–36], development of genetically engineered mouse models of Brca1-related cancer required tissue-specific conditional knockout systems based on the cytokeratin 14 (CK14), β -lactoglobulin, MMTV-LTR or WAP driven expression of the Cre recombinase [37–40]. Loss of BRCA1 in epithelial tissues leads to mammary tumors, with long latency and low frequency [41,42]. Additional deletion of p53 significantly increases the incidence of breast cancer in these animals [43,44]. CK14-Cre driven somatic deletion of Brca1 and p53 resulted in solid carcinomas resembling high-grade IDC-NOS (invasive ductal carcinoma not otherwise specified) in humans. Significantly, these mammary tumors are highly proliferative, show ER-negativity and a high degree of genomic instability, similarly to human BRCA1-mutated hereditary breast cancers and sporadic basal-like breast cancers [37].

Over the years, the K14cre; Brca1^{F/F}; p53^{F/F} mouse model of hereditary breast cancer has proved to be a useful tool to study tumor response and acquired therapy resistance of BRCA1-deficient breast cancers [45–49]. Brca1^{-/-}, p53^{-/-} tumors show initial response to therapy, but eventually all tumors

acquire resistance to doxorubicin, docetaxel [50] and olaparib [45] but not to cisplatin [50, 51]. Preclinical studies in K14cre; Brca1^{F/F}; p53^{F/F} mice revealed several mechanisms of resistance, such as elevated levels of drug efflux transporters and restoration of HR [45,46,52,53]. GEM models also possess limitations, as the synchronous overexpression or inactivation of potent oncogenes and tumor suppressor genes, respectively, often bypasses major bottlenecks to malignant transformation, resulting in reduced clonal heterogeneity [54,55]. Also, the generation of GEM models is expensive, and species differences must be carefully considered in experimental designs and interpretations.

Spontaneous tumors developing in K14cre; Brca1^{F/F}; p53^{F/F} mice can be serially transplanted, offering a more convenient, cost effective and reproducible model for tumor intervention studies. Orthotopically transplanted tumor pieces give rise to tumors with the same basal-like phenotype, gene expression profile, initial sensitivity and acquired resistance to anticancer agents [37].

In vitro tumor models are widely used to study molecular mechanisms of tumor cell biology. Cell lines are important tools for cancer research and serve as low-cost screening platforms for drug development. Cells are easy to grow, and they provide an unlimited supply of material bypassing ethical concerns associated with the use of animal and human tissue [56].

In this study, we describe the phenotypic features and in vivo tumorigenicity of a new murine cell line derived from Brca1^{-/-}; p53^{-/-} mammary tumors.

2. Results

2.1. Establishment of a Brca1^{-/-}, p53^{-/-} Mouse Mammary Tumor Cell Line

Tumor pieces obtained from K14cre; Brca1^{F/F}; p53^{F/F} mice [37] were orthotopically transplanted into the 4th mammary fat pad of female wild-type FVB mice [50]. When the tumors reached 200 mm³, the animals were sacrificed, and the tumors were removed. The tumor was cut into pieces, and following digestion with collagenase and dispase, the cells were seeded in primary culture medium as described in Materials and Methods. Initially, the tissue culture consisted of large fibroblast-like stromal cells and smaller, rapidly dividing cancer cells. To compare cancer cells to non-cancerous tissue derived from the same host, we isolated mesenchymal stem cells (MSC) from wild-type FVB mice (Figure 1A). As shown on Figure S1, the established cell line fulfills criteria commonly used for defining multipotent mouse mesenchymal stem/stromal cells, including adherence to plastic surface, specific cell-surface marker pattern and differentiation capability [57–59]. To favour cancer cells, horse serum, which is needed for the maintenance of primary fibroblasts, was removed. As a result, after approximately three passages (~3 weeks), fibroblasts disappeared from the flasks, and the primary cultures exhibited a uniform morphology corresponding to cancer cells (Figure 1B). During the following months, the initial morphology observed in the primary cell cultures gradually changed. The established cell line, designated as CST, consists of adherent cells exhibiting filopodial and lamellipodial structures related to mesenchymal morphology (Figure 1C). Despite their mesenchymal phenotype, CST cells are of epithelial origin, as evidenced by the truncation of Brca1 gene that occurred in the mammary epithelium of K14cre; Brca1^{F/F}; p53^{F/F} mice (Figure 1D).

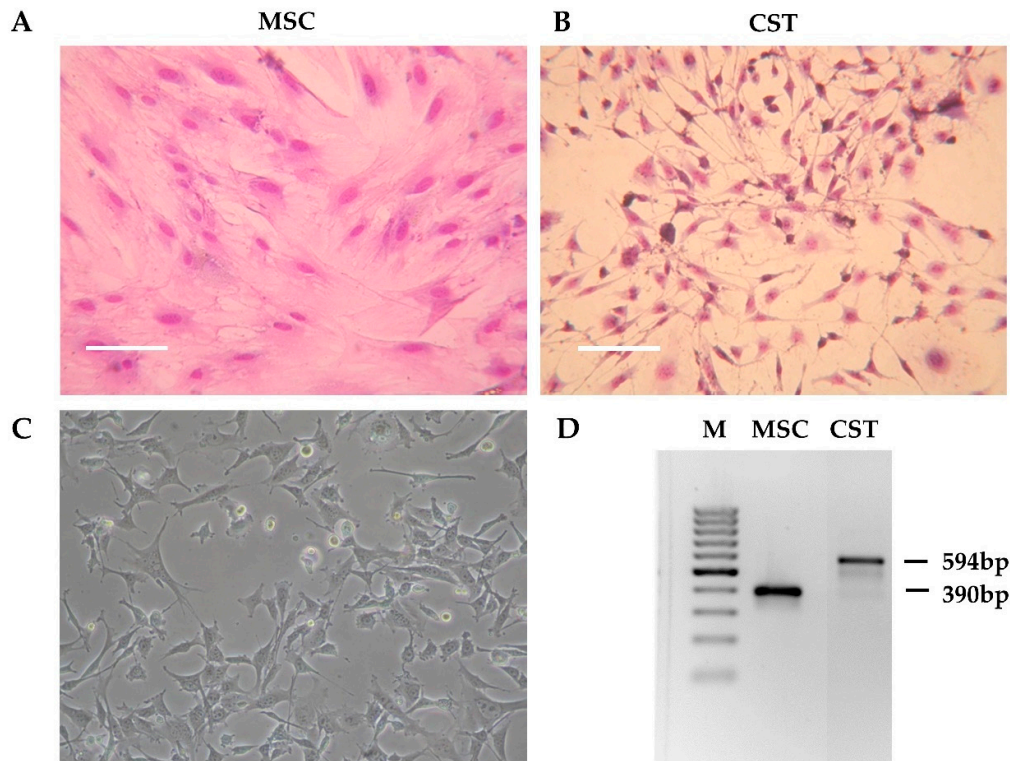


Figure 1. Preliminary characteristics of the CST cell line. (A) Morphology of mesenchymal stem cells (MSC) derived from the bone marrow of wild-type FVB mice. (B) Primary *Brca1*^{-/-}, *p53*^{-/-} tumor cells after 3 weeks in culture (CST) (Giemsa staining). Digital photos were taken by a Nikon Coolpix 4500 digital camera (Nikon GmbH, Düsseldorf, Germany) connected to an Olympus CK2 inverted microscope (Olympus, Tokyo, Japan) with 10x objective. (C) Established CST cell line (representative image). Microscopy pictures were acquired using 10x/0.25 Plan-Fluor objective with an Eclipse TS100 Inverted Microscope (Nikon, Japan). (D) PCR-based genotyping of mesenchymal stem cells (MSC) and CST cells (M—marker). The *Brca1*-deleted allele yields a 594-bp fragment, whereas wild-type *Brca1* is detected by a shorter product (390 bp).

2.2. Characterization of CST Cells

CST cells were kept in culture for up to 40 passages (~5 months) without any sign of senescence. Following expansion and cryopreservation at early passages, CST cells were further characterized in the context of epithelial and mesenchymal breast cancer cell lines (Figure 2). MCF7 cells (established from human Luminal A, ER+, PR+, HER2- breast cancer [60]) express high levels of the epithelial cell marker E-cadherin (also known as Cadherin-1). 4T1 cells, derived from a murine mammary carcinoma [61], exhibit epithelial morphology, E-cadherin expression, and also some degree of vimentin positivity. MDA-MB-231 is a human mesenchymal breast cancer cell line (triple-negative subtype: ER-, PR-, HER2-, claudin-low [60]), lacking E-cadherin expression and showing 100% vimentin positivity. As shown in Figure 2A, CST cells express vimentin, a prominent marker of the mesenchymal phenotype, whereas the expression of E-cadherin in CST cells is undetectable. Expression of cytokeratin 8 (CK8) and 14 (CK14) were also investigated (Figure S2). CST cells were positive for both, however, in contrast to the pattern revealed by immunohistochemical staining of tissue sections of *K14cre; Brca1*^{F/F}; *p53*^{F/F} tumors [37], we observed nuclear localization of CK8 in CST cells.

In vitro proliferation of CST cells was characterized by live-cell microscopy. Based on the assessment of relative confluency and cell numbers, the estimated doubling time of CST cells is 34 h,

similarly to the well-characterized 4T1 cell line, whose doubling time is 22.9 h [62] (Figure 2B, Figure S3A). Mesenchymal tumor cells are expected to exhibit increased motility and migratory capability. Cellular motility of the two mesenchymal cell lines were compared in a wound healing assay, with cell migration upon wounding assessed over a period of 24 h. As shown in Figure 2C, CST cells migrated within 24 h across the initial wound. By contrast, MDA-MB-231 cells exhibited lower levels of migration closing only 50% of the wound during the same time period (Figure S1B).

Chromosomal integrity of the cell lines was characterized by quantifying γ -H2AX foci, which is an accepted measure of the number of DNA double-strand breaks in single cells. In line with the increased genomic instability of BRCA1-deleted cells [63], CST cells exhibited high numbers of spontaneous γ -H2AX foci. The high number of γ -H2AX foci in MDA-MB-231 is linked to the low constitutive expression of p21^{WAF1} (Figure 2D, Figure S4).

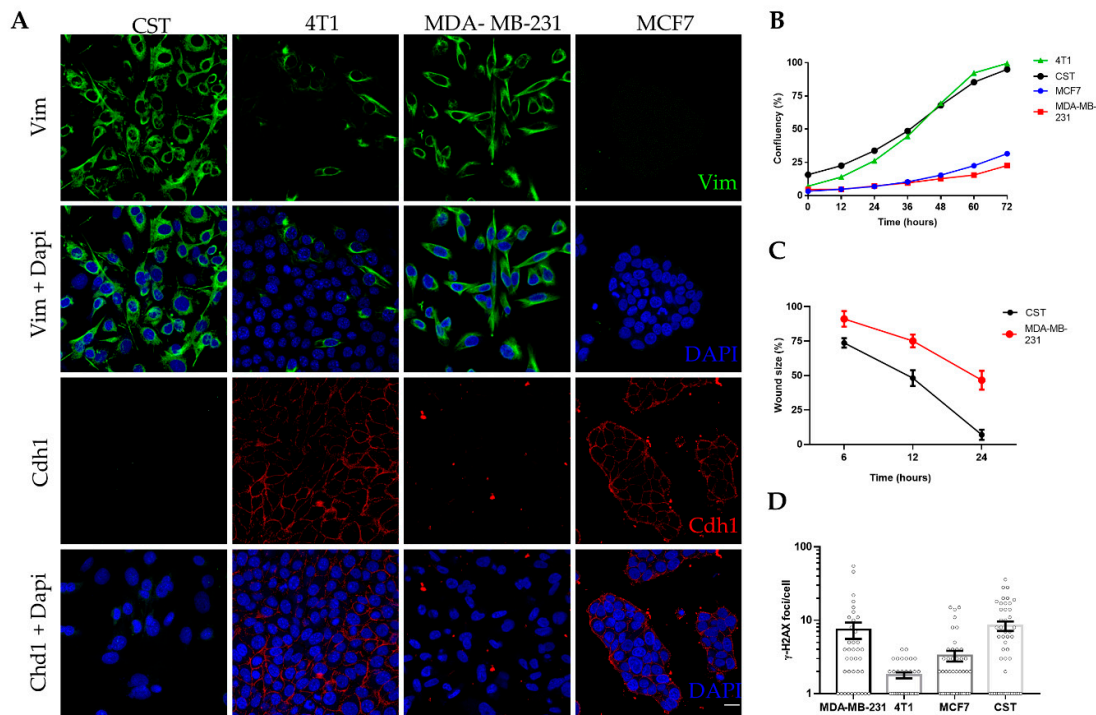


Figure 2. Characteristics of the CST cell line. (A) Immunofluorescent detection of vimentin (Vim) (green) and Cadherin-1 (Cdh1) (red); nuclei were stained with Dapi (blue), microscopy pictures were acquired using ZEISS LSM-710 system (Carl Zeiss microscopy GmbH, Jena, Germany) with 40x/1.4 Plan-Apochromat oil immersion objective (images were processed with ZEN (Carl Zeiss microscopy GmbH, Jena, Germany)). Scale bar = 20 μ m. (B) Cell growth curves of four breast cancer cell lines. Confluency (%) was determined by live cell microscopy, with a JuLI Stage Real-Time Cell History Recorder (NanoEnTek) in bright field. (C) Wound healing assay performed with CST and MDA-MB-231 cells. Relative wound size (compared to initial size at the start of the experiment) is shown. Data points represent mean \pm SD of 3 experiments. (D) Mean number of γ -H2AX foci per cell. Data represent mean \pm SEM of γ -H2AX loci per cell nucleus; foci were counted with FindFoci, an automated ImageJ plugin, based on confocal images shown in Supplementary Figure S4.

Genomic instability of CST cells was confirmed by whole genome sequencing, which revealed a very high number of single nucleotide variations (SNVs) compared to the FVB mouse genome, and frequent copy number changes indicating chromosomal instability. Genomic DNA was prepared from a single CST cell cloned population and sequenced on an Illumina HiSeq X Ten instrument with a mean coverage of 32. We identified 125,415 point mutations and 383,672 indels relative to the

background mouse strain, of which 95156 and 268,669 were heterozygous and homozygous, respectively. A deconstruction of the SNV spectrum into COSMIC mutational signatures derived from cancer sequences detected the presence of mutation signatures 3 and 8 associated with HR deficiency [64], as well as signature 18, which was described in different cancer types including breast cancer, in association with oxidative damage [65] (Figure 3C). In addition to single base substitution signatures, we also predicted the copy number status in 16 kbp bins, which revealed significant copy number changes and genome-wide chromosomal instability (Figure 3B, Figure S5), corroborating our results of γ -H2AX quantification. The multiple copy number changes we detected on each chromosome indicated similar chromosomal instability as was observed in tumor samples from the same mouse model (Figure S5) [66].

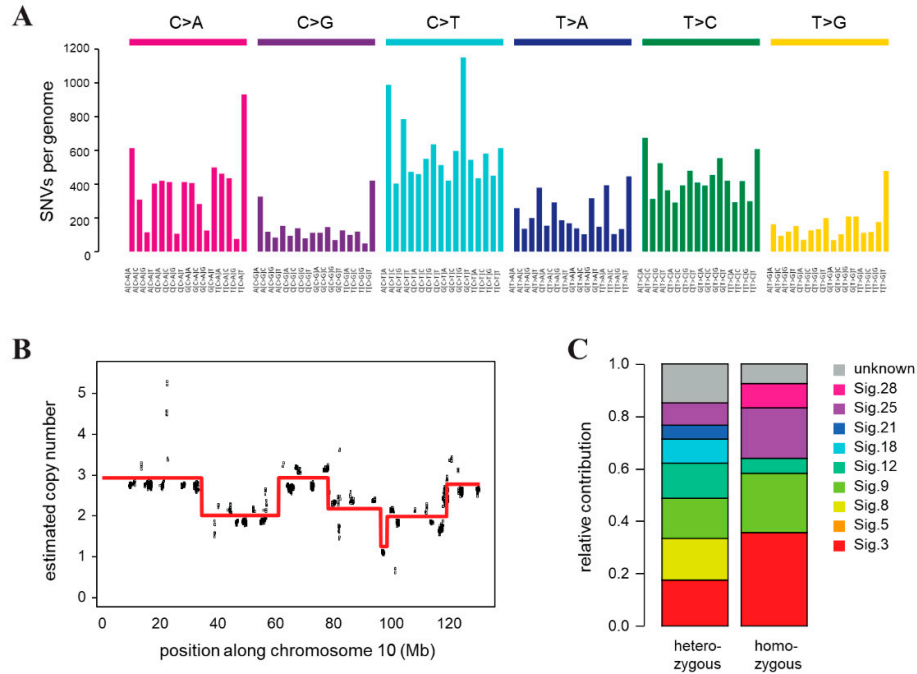


Figure 3. Genomic features of the CST cell line. **(A)** Triplet base substitution spectra of heterozygous mutations in CST. Base changes are summed according to the preceding and following positions, as shown below the panel. All positions marked as SNPs in the FVB mouse genome in dbSNP are filtered out. **(B)** An example of the copy number variations and ongoing chromosomal instability in the CST genome (chromosome 10 only). Estimated coverages in 16 kb windows (black) and the associated ploidy level predictions (red) are shown. **(C)** Decomposition of the spectrum of heterozygous and homozygous SNVs into COSMIC mutational signatures (sig.).

2.3. In Vitro Chemosensitivity of CST Cells

In vitro sensitivity of CST cells was tested against 11 chemotherapy agents used in the treatment of breast cancers. Table 1 shows the IC_{50} values obtained with PrestoBlue[®] assays, as well as the reference plasma concentrations of the chemotherapeutic agents (see also Figure S6). In general, CST cells show sensitivity to the tested drugs (IC_{50} values were between 0.02–1.2 μ M). In line with the clinical efficiency of the tested drugs, CST cells are highly sensitive to SN38, which is the pharmacologically active metabolite of irinotecan; cisplatin, and the PARP inhibitors olaparib, veliparib, rucaparib and talazoparib.

Table 1. IC₅₀ values and maximum plasma concentrations (C_{max}) of the tested chemotherapeutic agents [67–69].

Chemotherapeutic agents	IC ₅₀ (μM)	C _{max} (μM)
Doxorubicin	0.2	6.73 ^[67]
Cisplatin	1.1	14.40 ^[67]
Epirubicin	0.1	16.60 ^[67]
Paclitaxel	1.2	4.24 ^[67]
Etoposide	0.2	33.40 ^[67]
SN38	0.01	0.14 ^[67]
Gemcitabine	0.1	89.30 ^[67]
Olaparib	0.5	13.10 ^[67]
Veliparib	4.4	7.04 ^[68]
Rucaparib	0.2	6.00 ^[67]
Talazoparib	0.007	0.036 ^[69]

2.4. Lentivirally Transduced CST Sublines are Suitable to Study Tumor Formation, Anticancer Drug Response and Tumor-Stroma Interactions

Fluorescent protein expressing CST sublines were established by introducing either green fluorescent protein (GFP) or mCherry coding plasmids through lentiviral transduction (Figure S7A). Stable expression of the fluorescent proteins did not change the phenotype of CST cells (Figure S7B–D, Figure S8). To study the tumorigenic potential of the newly established CST lines, 1.5×10^6 cells were orthotopically transplanted into the 4th fat pad of wild-type female FVB mice. CST cells proved to be tumorigenic in ~100% of the inoculated mice ($n = 60$). Mammary tumor formation was detected after 20 days (Figure 4A). Growth kinetics of the CST derived tumors were similar to the rates observed with the serial orthotopic transplantation of tumor pieces [45]. Tumor formation potential of the CST lines expressing GFP or mCherry was also evaluated. 25 days after inoculation, CST-mCherry tumors became apparent and continued to grow until the experimental endpoint (Figure 4B).

Tumors derived from orthotopically transplanted tumor pieces show sensitivity to cisplatin [50]. To test the *in vivo* drug response of CST cells, 1.5×10^6 CST-mCherry cells were orthotopically injected into FVB-GFP mice (FVB.Cg-Tg(CAG-EGFP) B5Nagy/J). When the tumors reached 200 mm³, mice were treated with the maximum tolerable dose (6mg/kg) of cisplatin with 2-week intervals. Similarly to results obtained with orthotopically transplanted tumor pieces, CST-derived tumors responded well to cisplatin, relapsing tumors remained sensitive to cisplatin, but the tumors were not eradicated (Figure 4C).

The fluorescence of CST cells offers a tool to investigate tumor-stroma interactions. To allow efficient separation of tumor and stroma cells, 1.5×10^6 CST-mCherry cells were orthotopically injected into GFP-positive FVB mice. When the tumors reached 200 mm³, the animals were sacrificed, and the tumors were removed. Following digestion with collagenase and dispase, the cells were seeded in primary culture medium as described in Materials and Methods. In these primary cultures, GFP-positive host fibroblast cells form nests in the midst of cancer cells expressing mCherry (Figure 4D). Next, the cells were sorted based on mCherry/GFP expression, and sorted cells were cultured separately. As shown in Figure 4E, mCherry-positive CST cells preserved the characteristic mesenchymal morphology, while GFP-positive fibroblasts are larger, and exhibit a flat, polygonal, stellate-like morphology with formed lamellipodia.

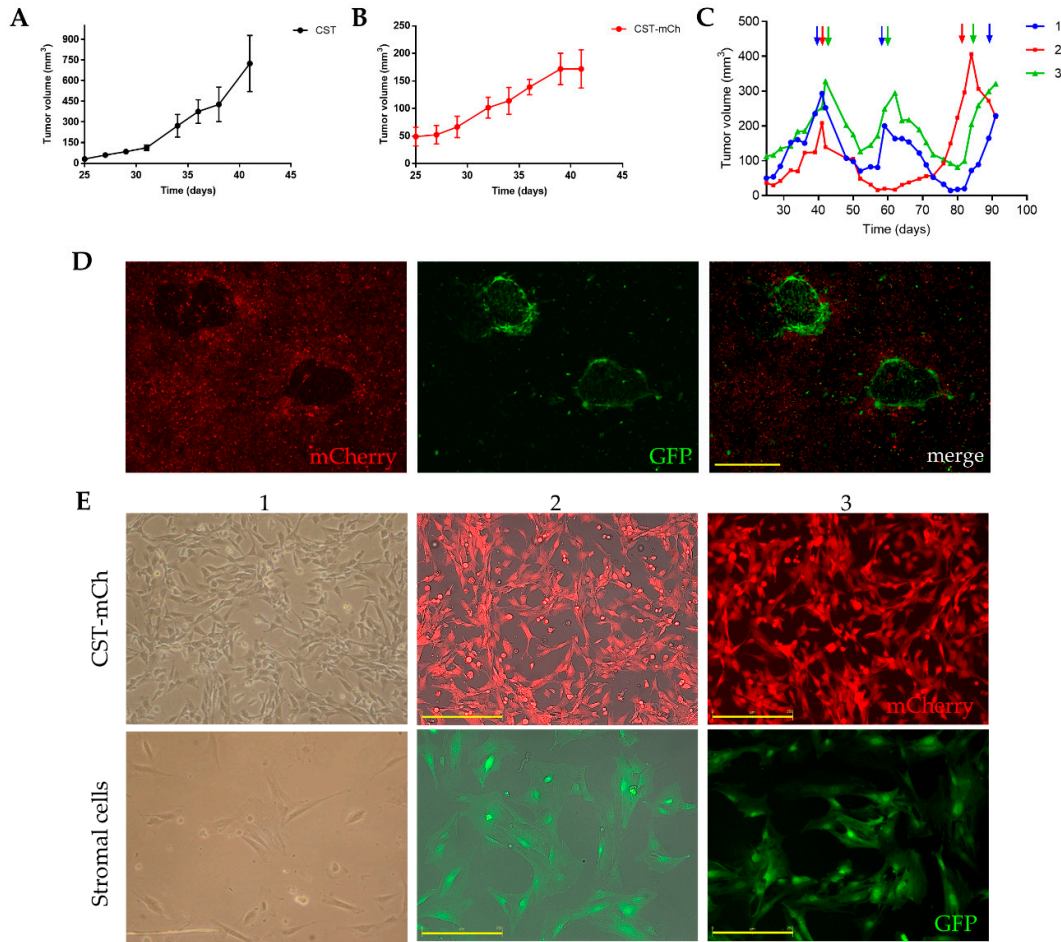


Figure 4. Lentivirally transduced fluorescent CST sublines offer a model system to study tumor formation, anticancer drug response and tumor-stroma interactions. (A) Growth kinetics of tumors derived from CST cells (1.5×10^6 cells/mouse). Data represent mean tumor volumes \pm SEM ($n = 5$). (B) Growth kinetics of tumors derived from mCherry expressing CST cells (1.5×10^6 cells/mouse). Data represent mean tumor volumes \pm SEM ($n = 5$). (C) Cisplatin treatment of orthotopically injected CST-mCherry tumor cells into GFP-expressing FVB mice. When the tumors reached 200 mm³, cisplatin was administered at the maximum tolerable dose (6mg/kg) as indicated by the arrows. (D) Primary culture of CST-mCherry derived tumor cells containing GFP-positive host cells. Scale bar = 500 μ m. (E) Cultures of sorted mCherry-positive CST cells and GFP-positive stromal cells. 1—light microscopy 2—JuLi Stage bright field, RFP merge, 3—JuLi Stage RFP. Scale bar = 250 μ m. Microscopy pictures were either acquired using JuLi™ Stage (NanoEnTek Inc., Korea) with 4x/0.16 U Plan S-Apo objective (Figure 4D), 10x/0.3 U Plan FLN objective (E2, E3) or using Nikon Eclipse TS100 Inverted Microscope (Nikon, Japan) with 10x/0.25 Plan-Fluor objective (E1).

3. Discussion

Whereas tumors grow vigorously *in vivo*, continuously bypassing cellular obstacles such as cell cycle regulation or apoptosis, the establishment of cancer cell lines is not a straightforward process. *In vitro*, cells have to adapt to the lack of the original microenvironment consisting of stromal and immune cells, the different oxygen levels, the diverse composition of growth factors, and they have to adhere to the plastic surface of the tissue flask. Due to changes occurring during the *in vitro* adaptation process, stabilization and characterization of a new cell line should follow published

guidelines, demonstrating the immortality, neoplasticity, origin, contamination-free background and scientific significance of the newly established cell line [70,71].

Here we present a new murine cancer cell line, designated as CST, which was isolated from a genetically engineered *Bra1*^{-/-}; *p53*^{-/-} mouse model of hereditary breast cancer. The role of BRCA1 in familial breast and ovarian cancer is well documented [72,73], but in recent years its importance in several other malignancies has been also discovered. Mutations in the *Bra1* gene were found in urothelial tumors [74], pancreatic cancer [75], and prostate malignancies [76].

CST cells show mesenchymal morphology and express mesenchymal markers; and the rapid growth rate and increased motility also indicate an aggressive phenotype, a characteristic of the original mouse tumor as well, from which CST cells were derived [37]. CST cells share several features with BRCA1-mutant human breast cancer cell lines (HCC1937, MDA-MB-436, SUM1315MO2, and SUM149PT [77–79]). For example, the BRCA1-mutation was shown to deregulate the expression of E-cadherin [78], keratin 8 and vimentin [80], and reduced BRCA1 function often results in increased proliferation, cellular migration and invasion [81]. These features correspond to human BRCA1-deficient basal-like breast cancers, which are characterized by high proliferation index, triple-negative subtype, high degree of genomic instability and expression of basal epithelial markers [37]. Patients with basal-like tumors have poor outcome, short survival and relatively high mortality rate [82].

The extensive DNA damage observed in untreated CST cells (Figure 2D) is in line with the defective homologous recombination due to loss of BRCA1 [83]. This is also supported by whole genome sequencing: both the presence of COSMIC signatures 3 and 8 and the elevated levels of copy number changes are characteristic of reduced homologous recombination in cells lacking BRCA1 (Figure 3). As a result, CST cells show high sensitivity to DNA damaging compounds (Table 1). In particular, topoisomerase inhibitors (doxorubicin, etoposide, SN38 and epirubicin) strongly inhibit the growth and viability of CST cells, with IC₅₀ values around 100 nM, corresponding to the in vitro, in vivo and clinical hypersensitivity of BRCA1-deficient tumors to anthracyclines [49,84–86]. In contrast, cells with mutated BRCA1 usually show increased tolerance to microtubule targeting drugs, which is explained by the role of BRCA1 in mitotic-spindle assembly and the JNK pathway linking damage of the microtubule network to apoptosis [87–89]. CST cells are about 10-fold resistant to paclitaxel compared to most BRCA1-proficient breast cancer cell lines [90,91]. On the other hand, impaired homologous recombination due to dysfunctional BRCA1 creates a targetable dependency on Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) activity and sensitizes cells to platinum drugs. As expected, CST cells are sensitive to cisplatin, a first-line platinum chemotherapy drug in BRCA1-mutated breast tumors, and to a panel of PARP inhibitors (olaparib, veliparib, rucaparib and talazoparib) designed to exploit the synthetic lethality of BRCA1-linked cancers.

While the cellular consequences of BRCA1-mutations are well characterized, the interaction between cancer cells lacking BRCA1 and their microenvironment is less studied. To establish in vitro and in vivo models for the study of the cooperation between BRCA1-KO tumor cells and the stromal compartment, we transduced CST cells with lentiviral plasmids encoding GFP (CST-GFP) or mCherry (CST-mCh). Since stable expression of the fluorescent proteins did not change the phenotype of CST cells (Figure S7 and S8), in vivo tumor formation and chemosensitivity was evaluated in GFP-positive FVB mice orthotopically engrafted with CST-mCh cells. This experimental model gave rise to mammary tumors containing mCh-positive cancer cells and GFP-positive stromal cells (Figure 4). Primary cultures established from these tumors revealed GFP-expressing nests of fibroblasts surrounding mCherry-positive cancer cells. Following sorting by FACS, mCherry expressing CST cells could be cultured separately from GFP-positive stromal cells showing the usual characteristics of fibroblast/mesenchymal stem cells. Dual coloring of cancerous and healthy cells will allow further experiments addressing the complexity of the tumor microenvironment [92]. Using a similar approach, Kidd et al. [92] showed that while fibroblast/mesenchymal stem cells originate from the bone marrow, vascular and fibrovascular support is derived from the local fat tissue. The widely used xenograft and allograft models of cancer rarely go into remission after treatment, usually only changes in the initial growth rates are observed. In contrast, the dually-labeled tumors derived from

CST cells and host stroma show complete response to cisplatin treatment, a first-line therapy of BRCA1-mutated breast cancers. (Figure 4). Future studies will address the role of the stromal compartment in drug response, therapy resistance and relapse.

In summary, we have established CST cells as a new in vitro model recapitulating major characteristics of BRCA1-negative breast cancers. Thus, the CST cell line could become an important tool for the research of BRCA1-mutated cancers.

4. Materials and Methods

4.1. Isolation of Tumor Cells, Maintenance of Cell Lines

Tumor pieces obtained from K14cre; Brca1^{F/F}; p53^{F/F} mice (a kind gift from Sven Rottenberg, University of Bern) were orthotopically transplanted into the 4th mammary fat pad of female wild-type FVB mice [50]. The original tumor model was established in FVB mice [93], therefore, all in vivo experiments were performed with FVB mice. When the tumors reached 200 mm³, the animals were sacrificed, and the tumors were removed. The tumor tissue was cut into pieces, washed with 1 X PBS and was digested with collagenase (200 U/mL) and dispase (0.6 U/mL) in DMEM for 30 min at 37 °C in a 50 mL Falcon tube while vortexed for 1 min every 10 min. The suspension was filtered through a 40 µm cell strainer to remove remaining extracellular matrix and the collected cell suspension was centrifuged. Cells were resuspended using primary culture medium (DMEM/F12 + 10% FBS + 10 % horse serum + 1% penicillin–streptomycin) and transferred to a culture flask overnight in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂. Mesenchymal stem cells were isolated from the bone marrow of FVB mice. Isolation and characterization of these cells were carried out as described earlier [57,94].

4T1 (a kind gift from Ágnes Csiszár from the Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna) and CST cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) supplemented with 10% FBS and 50 units/mL penicillin and streptomycin (Life Technologies). MDA-MB-231, MCF7 were obtained from the National Cancer Institute's Developmental Therapeutics Program (National Institutes of Health) and were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium supplemented with 10% FBS, 5 mM glutamine, and 50 units/mL penicillin and streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). All cell lines were cultivated at 37 °C with 5% CO₂.

4.2. Genotyping Brca1-Deleted Allele by PCR

Genotyping of Brca1- allele was performed as described by Liu et al. [33]. Detection of Brca1-deleted allele with primers P1 and P4 yielded a 594-bp fragment. Wild-type Brca1 was detected by the product of P1-P2 primers (390 bp). The primer sequences were as follows: P1, 5'-TAT CAC CAC TGA ATC TCT ACC G -3'; P2, 5'-GAC CTC AAA CTC TGA GAT CCA C -3'; and P4, 5'-TCC ATA GCA TCT CCT TCT AAA C -3'. For all PCR reactions, thermocycling conditions consisted of 30 cycles of 30 sec at 94 °C, 30 sec at 58 °C, and 50 sec at 72 °C. Reactions contained 100 ng of template DNA, 0.4 µM primers, 100 mM dNTPs, 2.5 units of TaqDNA polymerase, 2.5 mM MgCl₂, and 10 x PCR buffer in a 20-mL volume. After the electrophoresis of PCR products on 1% agarose gel, the gel was stained with ethidium bromide.

4.3. Live-Cell Microscopy, Growth and Motility Assay

Doubling time (T_d) was obtained using the following formula: $T_d = \ln 2 / K$, where K is the constant rate calculated from $N_t = N_0 \times e^{K \times t}$ where N_t is the cell number at time t ; N_0 is the cell number at the initial time point. The cell number was determined using automated cell counter every day for 4 days. To evaluate growth rates, cells were plated at a density of 2×10^4 cells per well in 24-well culture plates. Images were taken every 12 h for 3 days. For the motility assay, cells were seeded in a 6-well plate at 10^6 cells/well density. The wound was created by scratching a confluent monolayer with a 200 µl pipette tip, and wound healing was followed for 48 h by taking images every 6 h. All images were taken using the JuLI Stage Real-Time Cell History Recorder (NanoEnTek, Seoul, Korea) with a

bright channel, 4x/0.16 U Plan S-Apo objective.. Wound closure was quantified using the ImageJ plugin MRI Wound Healing tool (Volker Baecker, Montpellier RIO Imaging, Montpellier, France).

4.4. Drugs

Cytotoxic drugs were purchased directly from the manufacturers. The compounds used in the CST cytotoxicity assays were purchased from Accord Healthcare (cisplatin, epirubicin), Selleckchem (olaparib), Sigma-Aldrich (paclitaxel, SN-38, doxorubicin), TEVA (etoposide), Tocris (veliparib), Merk (gemcitabine) and MedChemExpress (talazoparib, rucaparib).

4.5. In Vitro Cytotoxicity Assay

Viability was assessed using the PrestoBlue® assay (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were plated in 96-well plates and treated in the given concentration range with the indicated compounds for 120 h. Viability of the cells was measured spectrophotometrically using an EnSpire microplate reader (Perkin Elmer). Data were normalized to untreated cells; curves were fitted by the GraphPad Prism 5 software (GraphPad, San Diego, California, USA) using the sigmoidal dose–response model. Curve fit statistics were used to determine mean concentrations of the selected drugs required to inhibit cell proliferation by 50% (IC₅₀).

4.6. Lentiviral Transfection

2nd generation lentiviral vectors and packaging plasmids (pMD2.G and psPAX2) were obtained from Addgene. CST cells were transduced with GFP (pRRL-EF1-eGFP-WPRE) or mCherry (pRRL-EF1-mCherry-WPRE) expressing lentiviral supernatants prepared as follows: lentiviral particles were produced in HEK293T cells transfected by the calcium phosphate co-precipitation method [95]. On the starting day, 5×10^6 HEK293T cells were plated in a 10 cm² Petri dish. Calcium phosphate transfection was performed the following day. 24 h later, the medium was replaced with fresh medium, supplemented with KnockOut serum replacement (Gibco). The supernatant, containing the lentiviral particles, was harvested 48 h after transfection, filtered through a 0.45 µm syringe filter, and then stored at –80°C until further use. The multiplicity of infection was determined by flow cytometry. Transduction of target CST cells was carried out on 6 well plates. After the transduction, cell lines were tested and sorted by flow cytometry.

4.7. Immunocytochemistry and γ -H2AX Foci Number Analysis

Cells were seeded into 8-well µ-slides (Ibidi) at a density of 80000 cells/well. After overnight incubation, cells were washed with pre-warmed PBS, fixed with 4% formaldehyde solution for 15 min at room temperature, washed, and then blocked with complete blocking solution (0.5% BSA, 0.1% TritonX-100, 5% goat serum in sterile PBS) for one hour at room temperature. Next, samples were incubated overnight at 4°C with the relevant primary antibodies (anti-E-Cadherin antibody (ab11512-Abcam), anti-Vimentin Antibody (V9) (sc-6260-SantaCruz), anti-gamma H2A.X (phospho S139) antibody (ab11174-Abcam) anti-cytokeratin 8 (ab53280-Abcam) and anti-cytokeratin 14 (ab7800-Abcam). After incubation, the cells were washed with PBS, and the secondary antibodies (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555) were added in complete blocking solution, followed by incubation for two hours at room temperature. Nuclei were labeled with DAPI. Imaging was carried out using a ZEISS LSM-710 system (Carl Zeiss microscopy GmbH, Jena, Germany) with a 40x/1.4 Plan-Apochromat oil immersion objective. Images were processed with ZEN (Carl Zeiss microscopy GmbH, Jena, Germany). γ -H2AX foci were counted with FindFoci, an automated ImageJ plugin [96].

4.8. Animal Experiments

All animal protocols were approved by the Hungarian Animal Health and Animal Welfare Directorate according to the EU's most recent directives. All surgical procedures were performed

according to the Committee on the Care and Use of Laboratory Animals of the Council on Animal Care at the Institute of Enzymology, RCNS in Budapest, Hungary (001/2574–6/2015). Tumor cells (CST or CST-mCherry cells) (1.5×10^6 /animal) were injected into the mammary fat pad of 6–8 weeks old female FVB or GFP expressing FVB mice. The tumor size was monitored at least 3 times per week by caliper measurements after the tumors became palpable. Tumor volume was calculated using the $V = \text{length} \times (\text{width}^2/2)$ formula. When the tumors volume reached 200 mm^3 , mammary tumors were either removed (control group) or treated with maximum tolerable dose of cisplatin (MTD, 6 mg/kg iv. respectively). Treatments using the MTD were repeated every 14 days. Animals were sacrificed when the tumor volume reached $\sim 2000 \text{ mm}^3$.

4.9. Cell Sorting

Tumors were removed from the untreated control group. Removed tumors pieces were digested and filtered as described above. Sorting was performed using a FACSAria III cell sorter (BD Biosciences, San Jose, California, US) equipped with four lasers. EGFP fluorescence was measured using blue laser excitation (488 nm) and 530/30 nm emission (FITC-A channel); mCherry fluorescence was measured using yellow-green laser excitation (561 nm) and 610/20 nm emission (PE-mCherry channel). Flow cytometry data was collected and analysis was performed using FACSDiva 8.02 software.

4.10. Whole Genome Sequencing and Genomic Data Analysis

Whole genome sequencing of a single cell CST clone was done at Novogene, Beijing, China. The sequencing reads were quality controlled by FastQC [97], and filtered for bad quality and Illumina adapter containing sequences by Trimmomatic [98]. Sequence alignment was conducted using BWA MEM [99] against the GRCm38.p6 reference genome. Mutations were called by the GATK pipeline [100] using HaplotypeCaller with the mouse dbSNP142 for positive training. Single nucleotide variants were filtered for a minimum coverage of 10 and categorized according to COSMIC classification scheme. Heterozygous and homozygous spectra were separately refitted to the 30 COSMIC v2 mutational signatures using the deconstructSigs R package [101] with default settings. Large scale copy number levels in 16kb bins were estimated by goleft indexcov [102] and the ploidy was predicted by piecewise constant fitting using the rpart R package [103]. Copy number profiles of K14cre; Brca1^{F/F}; p53^{F/F} mouse tumors [66] were downloaded from GEO accession GSE122076; ploidy levels were predicted by piecewise constant fitting of aCGH values, and positive and negative ploidy levels were averaged for each probe separately.

Whole genome sequence data obtained in this project is available from the European Nucleotide Archive under study accession number PRJEB36418.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, **Figure S1:** Characterization of mesenchymal stem cells (MSC) derived from bone marrow of FVB mice. **(A)** Isolated MSCs are positive to mesenchymal stem cell markers (Sca-1, CD44) and negative to CD90.1, macrophage marker F4/80 and Flk1, endothelial cell marker. **(B)** Osteogenic and adipogenic differentiation of isolated MSCs. Extracellular matrix mineralization was evaluated by using Alizarin Red staining (osteogenic differentiation) and in case of adipogenic differentiation, cells were stained with Oil Red O to visualize the lipid droplets, and dimethyl methylene blue to stain the cytoplasm. Digital photos were taken by a Nikon Coolpix 4500 digital camera (Nikon GmbH, Düsseldorf, Germany) connected to an Olympus CK2 inverted microscope (Olympus, Tokio, Japan) with 10x objective (osteogenic differentiation) and 20x objective (adipogenic differentiation). **Figure S2:** Immunofluorescent detection of cytokeratins. **(A)** Cytokeratin 8 (CK8) (Alexafluor488 – green) was detected in the cell nuclei. **(B)** Cytokeratin 14 (CK14) (Alexafluor488 – green) localization. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar = 20 μm . Microscopy pictures were acquired using ZEISS LSM-710 system (Carl Zeiss microscopy GmbH, Jena, Germany) with 40x/1.4 Plan-Apochromat oil immersion objective (images were processed with ZEN (Carl Zeiss microscopy GmbH, Jena, Germany)). Consistently with the basal-like phenotype of BRCA1-mutated breast cancers, CST cells express markers that are typical for basal/myoepithelial cells, such as the basal cytokeratin CK14 [104]. Interestingly, we observe nuclear localization of cytokeratin 8 in CST cells. Nuclear localization of keratins has been described [105] and in particular CK8 has been shown to play a role as a nuclear matrix-attachment region-binding protein involved in the organization of nuclear DNA [106]. **Figure S3:** **(A)** Cell

growth assay. To evaluate the growth of the established CST cell line, cells were plated at a density of 2×10^4 cells per well (24-well culture plate). Cells were counted using an automated cell counter every day for 4 days. Data represent the mean of three independent experiments (mean \pm SEM). **(B)** Wound healing. Images were acquired using JuLi™ Stage (NanoEnTek Inc., Korea) with 4x/0.16 U Plan S-Apo objective. **Figure S4:** Immunofluorescence of the S139 phosphorylated form of histone H2A (H2AX) (green fluorescence (Alexa Fluor 488): CST, CST-mCh, MDA-MB-231, MCF7, 4T1, red fluorescence (Alexa Fluor 546): CST-GFP) as a measure of DNA damage. Representative confocal microscopy images show nuclear foci of phosphorylated H2AX. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 20 μ m. Microscopy pictures were acquired using ZEISS LSM-710 system (Carl Zeiss microscopy GmbH, Jena, Germany) with 40x/1.4 Plan-Apochromat oil immersion objective (images were processed with ZEN (Carl Zeiss microscopy GmbH, Jena, Germany)). **Figure S5:** Copy number status of CST compared to K14cre; Brca1^{F/F}; p53^{F/F} mouse tumors. In each row, ploidy levels were determined for a single chromosome. Left panels: averaged positive and negative log₂ ploidy changes for the 18 mouse tumour samples from [66], right panels: estimated coverages in 16 kb windows and the associated ploidy level predictions. **Figure S6:** *In vitro* toxicity (IC₅₀) of selected compounds, measured with PrestoBlue assay. IC₅₀ values were obtained by sigmoidal curve fitting using the GraphPad Prism software. **Figure S7:** **(A)** Transduction efficiencies were measured by flow cytometry for both GFP and mCherry protein expression. After sorting transduced CST cells twice, 90% GFP+ and 95% mCherry+ cell were detected. **(B)** Cell growth assay. To evaluate the growth of the established CST cell line, cells were plated at a density of 2×10^4 cells per well (24-well culture plate). Cells were counted using an automated cell counter every day for 4 days. Data represent the mean of three independent experiments (mean \pm SEM). **(C)** Wound healing. Images were acquired using JuLi™ Stage (NanoEnTek Inc., Korea) with 4x/0.16 U Plan S-Apo objective. **Figure S8:** Lentiviral vector-mediated gene transduction has no effect on CST cell viability, growth, motility and protein expression. **(A)** Cell growth assay. **(B)** Wound healing assay of parental CST cells compared to CST-GFP, CST-mCh. **(C)** Immunofluorescent detection of fluorescent proteins (GFPmCh) and E-cadherin (Cdh-1) (Alexafluor555-red) and vimentin (Alexafluor488 – green), nuclei were stained with DAPI. Scale bar = 20 μ m. Microscopy pictures were acquired using ZEISS LSM-710 system (Carl Zeiss microscopy GmbH, Jena, Germany) with 40x/1.4 Plan-Apochromat oil immersion objective (images were processed with ZEN (Carl Zeiss microscopy GmbH, Jena, Germany)). **(D)** Quantification of γ -H2AX expression. Number of γ -H2AX loci per cell nucleus are presented as mean values \pm SEM.

Author Contributions: Conceptualization A.F., G.S. and L.H.; methodology L.H. and A.F.; validation L.H., A.F., F.U., G.K., B.S., K.S., Á.P., D.S.; investigation L.H., A.F., N.K., K.S., G.K., B.S., Á.P.; resources, F.U., D.S., J.T., G.S.; writing—original draft preparation, L.H. and A.F.; writing—review and editing, L.H., A.F., G.S.; visualization, L.H., A.F., G.K., B.S., N.K., Á.P., G.V.; supervision, A.F. and G.S.; project administration, L.H., A.F.; funding acquisition, G.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary (2019-1.3.1-KK-2019-00007 to G.S. and A.F., K_124881 to D.S., and K116295 to J.T.) and a Momentum Grant from the Hungarian Academy of Sciences (G.S.). Financial support from the 2019 Thematic Excellence Program (TUDFO/51757/2019-ITM) is also acknowledged.

Acknowledgments: We thank Sven Rottenberg for providing us tumor pieces from K14cre; Brca1^{F/F}; p53^{F/F} mice; Ágnes Csiszár for the 4T1 cell line, Irén Bodrogi-Mayer, Anita Hídvégi and Annamária Tóth for excellent technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

BRCA1	breast cancer susceptibility gene 1
MSC	mesenchymal stem cell
HER2	epidermal growth factor receptor 2
ER	estrogen receptor
PR	progesterone receptor
TNBC	triple negative breast cancer
GEMM	genetically engineered mouse model
GEMMC	genetically engineered mouse model of cancer
pCR	pathologic complete response
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
CK14	cytokeratin 14

IDC-NOS	invasive carcinoma-of no special type
MMTV-LTR	mouse mammary tumor virus—long terminal repeat
WAP	whey acidic protein
HR	homologous recombination
PCR	polymerase chain reaction
SNP	single nucleotide polymorphism
GFP	green fluorescent protein
MTD	maximum tolerable dose
FACS	fluorescence activated cell sorting
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer

References

1. Sørlie, T. C.M. Perou; R. Tibshirani; T. Aas; S. Geisler; H. Johnsen; T. Hastie; M.B. Eisen; M. van de Rijn; S.S. Jeffrey; et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10869–10874.
2. Higgins, M.J.; J. Baselga. Targeted therapies for breast cancer. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 3797–3803.
3. Anders, C.K.; L.A. Carey. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin. Breast Cancer* **2009**, *9 Suppl 2*, S73–81.
4. Al-Mahmood, S.; J. Sapiezynski; O.B. Garbuzenko; T. Minko. Metastatic and triple-negative breast cancer: Challenges and treatment options. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2018**, *8*, 1483–1507.
5. Fasching, P.A.; S. Loibl; C. Hu; S.N. Hart; H. Shimelis; R. Moore; C. Schem; H. Tesch; M. Untch; J. Hilfrich; et al. BRCA1/2 Mutations and Bevacizumab in the Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer: Response and Prognosis Results in Patients With Triple-Negative Breast Cancer From the GeparQuinto Study. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 2281–2287.
6. Ford, D.; D.F. Easton; D.T. Bishop; S.A. Narod; D.E. Goldgar. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* **1994**, *343*, 692–695.
7. Foulkes, W.D.; I.M. Stefansson; P.O. Chappuis; L.R. Bégin; J.R. Goffin; N. Wong; M. Trudel; L.A. Akslén. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, *95*, 1482–1485.
8. Kuchenbaecker, K.B.; J.L. Hopper; D.R. Barnes; K.A. Phillips; T.M. Mooij; M.J. Roos-Blom; S. Jervis; F.E. van Leeuwen; R.L. Milne; N. Andrieu; et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA* **2017**, *317*, 2402–2416.
9. Bray, F.; J. Ferlay; I. Soerjomataram; R.L. Siegel; L.A. Torre; A. Jemal. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424.
10. Buys, S.S.; J.F. Sandbach; A. Gammon; G. Patel; J. Kidd; K.L. Brown; L. Sharma; J. Saam; J. Lancaster; M.B. Daly. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer* **2017**, *123*, 1721–1730.
11. Godet, I.; D.M. Gilkes. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integr. Cancer Sci. Ther.* **2017**, *4*, 1–7.
12. Larsen, M.J.; T.A. Kruse; Q. Tan; A.V. Lænkholm; M. Bak; A.E. Lykkesfeldt; K.P. Sørensen; T.V. Hansen; B. Ejlersten; A.M. Gerdes; et al. Classifications within molecular subtypes enables identification of BRCA1/BRCA2 mutation carriers by RNA tumor profiling. *PLoS One* **2013**, *8*, e64268.
13. Byrum, A.K.; A. Vindigni; N. Mosammamarast. Defining and Modulating 'BRCAness'. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 740–751.
14. Hedenfalk, I.; D. Duggan; Y. Chen; M. Radmacher; M. Bittner; R. Simon; P. Meltzer; B. Gusterson; M. Esteller; O.P. Kallioniemi; et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 539–548.
15. Póti, Á.; H. Gyergyák; E. Németh; O. Ruzs; S. Tóth; C. Kovácsházi; D. Chen; B. Szikriszt; S. Spisák; S. Takeda; et al. Correlation of homologous recombination deficiency induced mutational signatures with sensitivity to PARP inhibitors and cytotoxic agents. *Genome Biol.* **2019**, *20*, 240.
16. Byrski, T.; J. Gronwald; T. Huzarski; E. Grzybowska; M. Budryk; M. Stawicka; T. Mierzwa; M. Szwiec; R. Wisniowski; M. Siolek; et al. Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 375–379.

17. Cortazar, P.; L. Zhang; M. Untch; K. Mehta; J.P. Costantino; N. Wolmark; H. Bonnefoi; D. Cameron; L. Gianni; P. Valagussa; et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: The CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* **2014**, *384*, 164–172.
18. Quinn, J.E.; C.R. James; G.E. Stewart; J.M. Mulligan; P. White; G.K. Chang; P.B. Mullan; P.G. Johnston; R.H. Wilson; D.P. Harkin. BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 7413–7420.
19. Byrski, T.; J. Gronwald; T. Huzarski; E. Grzybowska; M. Budryk; M. Stawicka; T. Mierzwa; M. Szwiec; R. Wiśniowski; M. Siolek; et al. Response to neo-adjuvant chemotherapy in women with BRCA1-positive breast cancers. *Breast. Cancer Res. Treat.* **2008**, *108*, 289–296.
20. Kriege, M.; A. Jager; M.J. Hoening; E. Huijskens; J. Blom; C.H. van Deurzen; M. Bontenbal; J.M. Collee; M.B. Menke-Pluijmers; J.W. Martens; et al. The efficacy of taxane chemotherapy for metastatic breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Cancer* **2012**, *118*, 899–907.
21. Farmer, H.; N. McCabe; C.J. Lord; A.N. Tutt; D.A. Johnson; T.B. Richardson; M. Santarosa; K.J. Dillon; I. Hickson; C. Knights; et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **2005**, *434*, 917–921.
22. Byrski, T.; R. Dent; P. Blecharz; M. Foszczynska-Kloda; J. Gronwald; T. Huzarski; C. Cybulski; E. Marczyk; R. Chrzan; A. Eisen; et al. Results of a phase II open-label, non-randomized trial of cisplatin chemotherapy in patients with BRCA1-positive metastatic breast cancer. *Breast. Cancer Res.* **2012**, *14*, R110.
23. Isakoff, S.J.; E.L. Mayer; L. He; T.A. Traina; L.A. Carey; K.J. Krag; H.S. Rugo; M.C. Liu; V. Stearns; S.E. Come; et al. TBCRC009: A Multicenter Phase II Clinical Trial of Platinum Monotherapy With Biomarker Assessment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1902–1909.
24. Tutt, A.; H. Tovey; M.C.U. Cheang; S. Kernaghan; L. Kilburn; P. Gazinska; J. Owen; J. Abraham; S. Barrett; P. Barrett-Lee; et al. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: The TNT Trial. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 628–637.
25. Bryant, H.E.; N. Schultz; H.D. Thomas; K.M. Parker; D. Flower; E. Lopez; S. Kyle; M. Meuth; N.J. Curtin; T. Helleday. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **2005**, *434*, 913–917.
26. Robson, M.; S.A. Im; E. Senkus; B. Xu; S.M. Domchek; N. Masuda; S. Delaloge; W. Li; N. Tung; A. Armstrong; et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 523–533.
27. Litton, J.K.; H.S. Rugo; J. Ettl; S.A. Hurvitz; A. Gonçalves; K.H. Lee; L. Fehrenbacher; R. Yerushalmi; L.A. Mina; M. Martin; et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 753–763.
28. Becher, O.J.; Holland, E.C. Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3355–3358.
29. Yang, Y.; H.H. Yang; Y. Hu; P.H. Watson; H. Liu; T.R. Geiger; M.R. Anver; D.C. Haines; P. Martin; J.E. Green; et al. Immunocompetent mouse allograft models for development of therapies to target breast cancer metastasis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 30621–30643.
30. Zitvogel, L.; L. Galluzzi; M.J. Smyth; G. Kroemer. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: Reinstating immunosurveillance. *Immunity* **2013**, *39*, 74–88.
31. Singh, M.; Murriel, C.L.; Johnson, L. Genetically engineered mouse models: Closing the gap between preclinical data and trial outcomes. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 2695–2700.
32. Kersten, K.; K.E. de Visser; M.H. van Miltenburg; J. Jonkers. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO Mol Med.* **2017**, *9*, 137–153.
33. Dine, J.; Deng, C.X. Mouse models of BRCA1 and their application to breast cancer research. *Cancer Metastasis Rev.* **2013**, *32*, 25–37.
34. Gowen, L.C.; B.L. Johnson; A.M. Latour; K.K. Sulik; B.H. Koller. Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat. Genet.* **1996**, *12*, 191–194.
35. Hakem, R.; J.L. de la Pompa; C. Sirard; R. Mo; M. Woo; A. Hakem; A. Wakeham; J. Potter; A. Reitmair; F. Billia; et al. The tumor suppressor gene Brca1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell* **1996**, *85*, 1009–1023.
36. Liu, C.Y.; A. Flesken-Nikitin; S. Li, Y. Zeng; W.H. Lee. Inactivation of the mouse Brca1 gene leads to failure in the morphogenesis of the egg cylinder in early postimplantation development. *Genes Dev.* **1996**, *10*, 1835–1843.

37. Liu, X.; H. Holstege; H. van der Gulden; M. Treur-Mulder; J. Zevenhoven; A. Velds; R.M. Kerkhoven; M.H. van Vliet; L.F. Wessels; J.L. Peterse; et al. Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12111–12116.
38. Selbert, S.; D.J. Bentley; D.W. Melton; D. Rannie; P. Lourenço; C.J. Watson; A.R. Clarke. Efficient BLG-Cre mediated gene deletion in the mammary gland. *Transgenic Res.* **1998**, *7*, 387–396.
39. Wagner, K.U.; R.J. Wall; L. St-Onge; P. Gruss; A. Wynshaw-Boris; L. Garrett; M. Li; P.A. Furth; L. Hennighausen. Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4323–4330.
40. Jonkers, J.; R. Meuwissen; H. van der Gulden; H. Peterse; M. van der Valk; A. Berns. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat. Genet.* **2001**, *29*, 418–425.
41. Shakya, R.; M. Szabolcs; E. McCarthy; E. Ospina; K. Basso; S. Nandula; V. Murty; R. Baer; T. Ludwig. The basal-like mammary carcinomas induced by Brca1 or Bard1 inactivation implicate the BRCA1/BARD1 heterodimer in tumor suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7040–7045.
42. Xu, X.; K.U. Wagner; D. Larson; Z. Weaver; C. Li; T. Ried; L. Hennighausen; A. Wynshaw-Boris; C.X. Deng. Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 37–43.
43. Brodie, G. S.; Deng, C.X. BRCA1-associated tumorigenesis: What have we learned from knockout mice? *Trends Genet.* **2001**, *17*, S18–S22.
44. Brodie, S.G.; X. Xu; W. Qiao; W.M. Li; L. Cao; C.X. Deng. Multiple genetic changes are associated with mammary tumorigenesis in Brca1 conditional knockout mice. *Oncogene* **2001**, *20*, 7514–7523.
45. Rottenberg, S.; J.E. Jaspers; A. Kersbergen; E. van der Burg; A.O. Nygren; S.A. Zander; P.W. Derksen; M. de Bruin; J. Zevenhoven; A. Lau; et al. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17079–17084.
46. Jaspers, J.E.; A. Kersbergen; U. Boon; W. Sol; L. van Deemter; S.A. Zander; R. Drost; E. Wientjens; J. Ji; A. Aly; et al. Loss of 53BP1 causes PARP inhibitor resistance in Brca1-mutated mouse mammary tumors. *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 68–81.
47. Zander, S.A.; A. Kersbergen; E. van der Burg; N. de Water; O. van Tellingen; S. Gunnarsdottir; J.E. Jaspers; M. Pajic; A.O. Nygren; J. Jonkers; et al. Sensitivity and acquired resistance of BRCA1;p53-deficient mouse mammary tumors to the topoisomerase I inhibitor topotecan. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1700–1710.
48. Zander, S.A.; W. Sol; L. Greenberger; Y. Zhang; O. van Tellingen; J. Jonkers; P. Borst; S. Rottenberg. EZN-2208 (PEG-SN38) overcomes ABCG2-mediated topotecan resistance in BRCA1-deficient mouse mammary tumors. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e45248.
49. Füredi, A.; K. Szebényi; S. Tóth; M. Cserepes; L. Hámori; V. Nagy; E. Karai; P. Vajdovich; T. Imre; P. Szabó; et al. Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer. *J. Control. Release* **2017**, *261*, 287–296.
50. Rottenberg, S.; A.O. Nygren, M. Pajic; F.W. van Leeuwen; I. van der Heijden; K. van de Wetering; X. Liu; K.E. de Visser; K.G. Gilhuijs; O. van Tellingen; et al. Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12117–12122.
51. Fong, P.C.; D.S. Boss; T.A. Yap; A. Tutt; P. Wu; M. Mergui-Roelvink; P. Mortimer; H. Swaisland; A. Lau; M.J. O'Connor; et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 123–134.
52. Henneman, L.; M.H. van Miltenburg; E.M. Michalak; T.M. Braumuller; J.E. Jaspers; A.P. Drenth; R. de Korte-Grimmerink; E. Gogola; K. Szuhai; A. Schlicker; et al. Selective resistance to the PARP inhibitor olaparib in a mouse model for BRCA1-deficient metaplastic breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 8409–8414.
53. Xu, G.; J.R. Chapman; I. Brandsma; J. Yuan; M. Mistrik; P. Bouwman; J. Bartkova; E. Gogola; D. Warmerdam; M. Barazas; et al. REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition. *Nature* **2015**, *521*, 541–544.
54. Alizadeh, A.A.; V. Aranda; A. Bardelli; C. Blanpain; C. Bock; C. Borowski; C. Caldas; A. Califano; M. Doherty; M. Elsner; et al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 846–853.

55. Tabassum; D; Polyak, K. Tumorigenesis: It takes a village. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 473–483.
56. Katt, M.E.; A.L. Placone; A.D. Wong; Z.S. Xu; P.C. Searson. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Front Bioeng. Biotechnol.* **2016**, *4*, 12.
57. Szabó, E.; R. Fajka-Boja; É. Kriston-Pál; Á. Hornung; I. Makra; G. Kudlik; F. Uher; R.L. Katona; É. Monostori; Á. Czibula. Licensing by Inflammatory Cytokines Abolishes Heterogeneity of Immunosuppressive Function of Mesenchymal Stem Cell Population. *Stem Cells Dev.* **2015**, *24*, 2171–2180.
58. Hu, Y.; B. Lou; X. Wu; R. Wu; H. Wang; L. Gao; J. Pi; Y. Xu. Comparative Study on. *Stem. Cells Int.* **2018**, *2018*, 6704583.
59. Dominici, M.; K. Le Blanc; I. Mueller; I. Slaper-Cortenbach; F. Marini; D. Krause; R. Deans; A. Keating; D. Prockop; E. Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, **2006**, *8*, 315–317.
60. Mota, A.L.; A.F. Evangelista; T. Macedo; R. Oliveira; C. Scapulatempo-Neto; R.A. Vieira; M.M.C. Marques. Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. *Oncol Lett*, **2017**, *13*, 4708–4712.
61. Pulaski, B.A.; S. Ostrand-Rosenberg. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol.* **2001**, *20*, 20.2.1–20.2.16.
62. Yerlikaya, A; N. Erin. Differential sensitivity of breast cancer and melanoma cells to proteasome inhibitor Velcade. *Int. J. Mol. Med.* **2008**, *22*, 817–823.
63. Záborszky, J.; B. Szikriszt; J.Z. Gervai; O. Pipek; Á. Póti; M. Krzystanek; D. Ribli; J.M. Szalai-Gindl; I. Csabai; Z. Szallasi; et al. Loss of BRCA1 or BRCA2 markedly increases the rate of base substitution mutagenesis and has distinct effects on genomic deletions. *Oncogene* **2017**, *36*, 5085–5086.
64. Alexandrov, L.B.; S. Nik-Zainal; D.C. Wedge; S.A. Aparicio; S. Behjati; A.V. Biankin; G.R. Bignell; N. Bolli; A. Borg; A.L. Børresen-Dale; et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **2013**, *500*, 415–421.
65. Pilati, C.; J. Shinde; L.B. Alexandrov; G. Assié; T. André; Z. Hélias-Rodzewicz; R. Ducoudray; D. Le Corre; J. Zucman-Rossi; J.F. Emile; et al. Mutational signature analysis identifies MUTYH deficiency in colorectal cancers and adrenocortical carcinomas. *J. Pathol.* **2017**, *242*, 10–15.
66. Hollern, D.P.; C.M. Contreras; S. Dance-Barnes; G.O. Silva; A.D. Pfefferle; J. Xiong; D.B. Darr; J. Usary; K.R. Mott; C.M. Perou. A mouse model featuring tissue-specific deletion of p53 and Brca1 gives rise to mammary tumors with genomic and transcriptomic similarities to human basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat* **2019**, *174*, 143–155.
67. Liston; R, D.; Davis, M. Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 3489–3498.
68. Somlo, G.; P.H. Frankel; B.K. Arun; C.X. Ma; A.A. Garcia; T. Cigler; L.V. Cream; H.A. Harvey; J.A. Sparano; R. Nanda; et al. Efficacy of the PARP Inhibitor Veliparib with Carboplatin or as a Single Agent in Patients with Germline. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 4066–4076.
69. Dhawan, M.S.; I.H. Bartelink; R.R. Aggarwal; J. Leng; J.Z. Zhang; N. Pawlowska; M. Terranova-Barberio; J.A. Grabowsky; A. Gewitz; A.J. Chien; et al. Differential Toxicity in Patients with and without DNA Repair Mutations: Phase I Study of Carboplatin and Talazoparib in Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 6400–6410.
70. Matsuo; Y; Drexler, H.G. Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. *Leuk Res.* **1998**, *22*, 567–579.
71. Geraghty, R.J.; A. Capes-Davis; J.M. Davis; J. Downward; R.I. Freshney; I. Knezevic; R. Lovell-Badge; J.R. Masters; J. Meredith; G.N. Stacey; et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br. J. Cancer* **2014**, *111*, 1021–1046.
72. Easton, D.F.; D. Ford; D.T. Bishop. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am. J. Human Genet.* **1995**, *56*, 265–271.
73. Welsh, P.L.; M.K. Lee; R.M. Gonzalez-Hernandez; D.J. Black; M. Mahadevappa; E.M. Swisher; J.A. Warrington; M.C. King. BRCA1 transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7560–7565.
74. Carlo, M.I.; V. Ravichandran; P. Srinivasan; C. Bandlamudi; Y. Kemel; O. Ceyhan-Birsoy; S. Mukherjee; D. Mandelker; J. Chaim; A. Knezevic; et al. Cancer Susceptibility Mutations in Patients With Urothelial Malignancies. *J. Clin. Oncol.* **2019**, JCO1901395.

75. Lowery, M.A. Genotype-phenotype correlation in BRCA1/2 mutation-associated pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* **2019**, *122*, 293–294.
76. Pritchard, C.C.; J. Mateo; M.F. Walsh; N. De Sarkar; W. Abida; H. Beltran; A. Garofalo; R. Gulati; S. Carreira; R. Eeles; et al. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 443–453.
77. Tomlinson, G.E.; T.T. Chen; V.A. Stastny; A.K. Virmani; M.A. Spillman; V. Tonk; J.L. Blum; N.R. Schneider; I.I. Wistuba; J.W. Shay; et al. Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1 mutation carrier. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 3237–3242.
78. Yasmeen, A.; W. Liu; H. Dekhil; A. Kassab; R. Aloyz; W.D. Foulkes; A.E. Al Moustafa. BRCA1 mutations contribute to cell motility and invasion by affecting its main regulators. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 3781–3783.
79. Elstrodt, F.; A. Hollestelle; J.H. Nagel; M. Gorin; M. Wasielewski; A. van den Ouweland; S.D. Merajver; S.P. Ethier; M. Schutte. BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 41–45.
80. Mackinder, M.A.; C.A. Evans; J. Chowdry; C.A. Staton; B.M. Corfe. Alteration in composition of keratin intermediate filaments in a model of breast cancer progression and the potential to reverse hallmarks of metastasis. *Cancer Biomark* **2012**, *12*, 49–64.
81. Promkan, M.; G. Liu; P. Patmasiriwat; S. Chakrabarty. BRCA1 modulates malignant cell behavior, the expression of survivin and chemosensitivity in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 2820–2828.
82. Rakha, E.A.; Reis-Filho, J.S.; Ellis, I.O. Basal-like breast cancer: A critical review. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 2568–2581.
83. Konishi, H.; M. Mohseni; A. Tamaki; J.P. Garay; S. Croessmann; S. Karnan; A. Ota; H.Y. Wong; Y. Konishi; B. Karakas; et al. Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 17773–17778.
84. Ignatov, T.; A. Poehlmann; A. Ignatov; A. Schinlauer; S.D. Costa; A. Roessner; T. Kalinski; J. Bischoff. BRCA1 promoter methylation is a marker of better response to anthracycline-based therapy in sporadic TNBC. *Breast. Cancer Res. Treat.* **2013**, *141*, 205–212.
85. Chappuis, P.O.; J. Goffin; N. Wong; C. Perret; P. Ghadirian; P.N. Tonin; W.D. Foulkes. A significant response to neoadjuvant chemotherapy in BRCA1/2 related breast cancer. *J. Med. Genet.* **2002**, *39*, 608–610.
86. Chalasani, R.; Livingston, R. Differential chemotherapeutic sensitivity for breast tumors with “BRCAness”: A review. *Oncologist* **2013**, *18*, 909–916.
87. Lafarge, S.; V. Sylvain; M. Ferrara; Y.J. Bignon. Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. *Oncogene* **2001**, *20*, 6597–6606.
88. Quinn, J.E.; R.D. Kennedy; P.B. Mullan; P.M. Gilmore; M. Carty; P.G. Johnston; D.P. Harkin. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6221–6228.
89. Tassone, P.; P. Tagliaferri; A. Perricelli; S. Blotta; B. Quaresima; M.L. Martelli; A. Goel; V. Barbieri; F. Costanzo; C.R. Boland; et al. BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells. *Br. J. Cancer* **2003**, *88*, 1285–1291.
90. Tommasi, S.; A. Mangia; R. Lacalamita; A. Bellizzi; V. Fedele; A. Chiriatti; C. Thomssen; N. Kendzierski; A. Latorre; V. Lorusso; et al. Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: The role of beta-tubulins. *Int. J. Cancer* **2007**, *120*, 2078–2085.
91. Klopp, A.H.; A. Gupta; E. Spaeth; M. Andreeff; F. Marini. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: Do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem. Cells* **2011**, *29*, 11–19.
92. Kidd, S.; E. Spaeth; K. Watson; J. Burks; H. Lu; A. Klopp; M. Andreeff; F.C. Marini. Origins of the tumor microenvironment: Quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30563.
93. Taketo, M., A.C. Schroeder, L.E. Mobraaten, K.B. Gunning, G. Hanten, R.R. Fox, T.H. Roderick, C.L. Stewart, F. Lilly, and C.T. Hansen, *FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(6): p. 2065-9.
94. Sági, B.; P. Maraghechi; V.S. Urbán; B. Hegyi; A. Szigeti; R. Fajka-Boja; G. Kudlik; K. Némét; E. Monostori; E. Gócza; et al. Positional identity of murine mesenchymal stem cells resident in different organs is determined in the postsegmentation mesoderm. *Stem Cells Dev.* **2012**, *21*, 814–828.
95. Graham, L.F.; van der Eb, A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **1973**, *52*, 456–467.

96. Herbert, A.D.; Carr, A.M.; Hoffmann, E. FindFoci: A focus detection algorithm with automated parameter training that closely matches human assignments, reduces human inconsistencies and increases speed of analysis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114749.
97. Andrews, S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available online: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (accessed on 2019/12/28).
98. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120.
99. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1754–1760.
100. McKenna, A.; Hanna, M.; Banks, E.; Sivachenko, K.; Cibulskis, A.; Kernytsky, K.; Garimella, D.; Altshuler, S.; Gabriel, M.; Daly, M.; et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **2010**, *20*, 1297–1303.
101. Rosenthal, R.; McGranahan, J.; Herrero, B.S.; Taylor, C.; Swanton. DeconstructSigs: Delineating mutational processes in single tumors distinguishes DNA repair deficiencies and patterns of carcinoma evolution. *Genome Biol.* **2016**, *17*, 31.
102. Pedersen, B.S.; Collins, R.L.; Talkowski, M.E.; Quinlan, A.R. Indexcov: Fast coverage quality control for whole-genome sequencing. *Gigascience* **2017**, *6*, 1–6.
103. Terry Therneau, B.A. Rpart: Recursive Partitioning and Regression Trees. R package version 4.1-13. 2018. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=rpart> (accessed on 2019/12/28).
104. Lakhani, S.R.; Reis-Filho, J.S.; Fulford, L.; Penault-Llorca, F.; van der Vijver, M.; Parry, S.; Bishop, T.; Benitez, C.; Rivas, Y.J.; Bignon, Y.J.; et al., Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 5175–5180.
105. Hobbs, R.P.; Jacob, J.T.; Coulombe, P.A. Keratins Are Going Nuclear. *Dev. Cell.* **2016**, *38*, 227–233.
106. Spencer, V.A.; Coutts, A.S.; Samuel, S.K.; Murphy, L.C.; Davie, J.R. Estrogen regulates the association of intermediate filament proteins with nuclear DNA in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 29093–29097.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer



András Füredi^{a,b}, Kornélia Szabó^b, Szilárd Tóth^a, Mihály Cserepes^{a,c}, Lilla Hámori^a, Veronika Nagy^a, Edina Karai^{a,d}, Péter Vajdovich^d, Tímea Imre^a, Pál Szabó^a, Dávid Szüts^a, József Tóvári^c, Gergely Szakács^{a,b,*}

^a Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, P.O.B. 286, Budapest 1519, Hungary

^b Institute of Cancer Research, Medical University Vienna, Vienna, Austria

^c Department of Experimental Pharmacology, National Institute of Oncology, Budapest, Hungary

^d Department of Clinical Pathology and Oncology, Faculty of Veterinary Science, Szent István University, Budapest, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Breast cancer
Multidrug resistance
Pegylated liposomal doxorubicin
P-glycoprotein
Genetically engineered mouse model

ABSTRACT

Success of cancer treatment is often hampered by the emergence of multidrug resistance (MDR) mediated by P-glycoprotein (ABCB1/Pgp). Doxorubicin (DOX) is recognized by Pgp and therefore it can induce therapy resistance in breast cancer patients. In this study our aim was to evaluate the susceptibility of the pegylated liposomal formulation of doxorubicin (PLD/Doxil[®]/Caelyx[®]) to MDR. We show that cells selected to be resistant to DOX are cross-resistant to PLD and PLD is also ineffective in an allograft model of doxorubicin-resistant mouse B-cell leukemia. In contrast, PLD was far more efficient than DOX as reflected by a significant increase of both relapse-free and overall survival of *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} mammary tumor bearing mice. Increased survival could be explained by the delayed onset of drug resistance. Consistent with the higher Pgp levels needed to confer resistance, PLD administration was able to overcome doxorubicin insensitivity of the mouse mammary tumors. Our results indicate that the favorable pharmacokinetics achieved with PLD can effectively overcome Pgp-mediated resistance, suggesting that PLD therapy could be a promising strategy for the treatment of therapy-resistant breast cancer patients.

1. Introduction

Chemotherapy remains the principal therapeutic modality in cancer treatment. Despite recent successes, such as the discovery of the BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia (CML), all-trans retinoic acid (ATRA) in acute promyelocytic leukemia (APL) and other advances in testicular cancer, pediatric leukemias and Hodgkin's lymphomas, which have demonstrated striking effects on patients survival [1], resistance and relapse remains a major obstacle [2].

Breast cancer is the most common malignancy in women. Approximately 60% of the breast cancer patients diagnosed at an early stage of the disease receive chemotherapy, but only a minor fraction of patients actually benefit from it [3]. 30% of women diagnosed with early stage breast cancer will progress to metastatic disease where there are only few treatment options [4]. Response to anthracycline- or taxane-based treatment regimens is overall weak and not long-lasting [5]. A study concluded that 50–70% of relapsing tumors from surgically removed adenocarcinomas were already drug resistant [6].

Resistance to anticancer agents is based on several mechanisms. Cancer cells can downregulate the drug target, tune down pathways leading to apoptosis, upregulate DNA repair mechanisms or increase the metabolism of drug molecules [7]. One of the most frequent and most investigated mechanisms of cellular drug resistance relies on the active efflux of the chemotherapeutic compounds from the cells. P-glycoprotein (ABCB1/Pgp), a member of the ATP Binding Cassette (ABC) transporter family was shown to extrude numerous, structurally unrelated chemotherapeutic drugs from resistant cancer cells [8]. There is ample evidence to prove the link between the activity of Pgp and clinical anticancer drug resistance. Pgp expression is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia (AML) [9,10] and acute nonlymphoblastic leukemia (ANLL) [11]. Pgp function in tumor cells shows negative correlation with response to the treatment and reliably predicts therapy response in AML [12].

Recently, genetically engineered mouse models (GEMMs) have been introduced to the study of drug resistance mechanisms. GEMMs closely mimic cancer in human patients and therefore offer a unique

* Corresponding author at: P.O.B. 286, Budapest 1519, Hungary.

E-mail addresses: szakacs.gergely@ttk.mta.hu, szakacs.gergely@meduniwien.ac.at (G. Szakács).

opportunity to study the evolution of drug resistance. In particular, conditional deletion of the *Bra1* and *p53* genes was shown to give rise to mammary carcinomas that mimic many aspects of the human disease [13]. In contrast to the xenograft models, these spontaneous tumors become drug resistant as a result of the treatment [14]. Like most human cancers, *Bra1*^{-/-}; *p53*^{-/-} tumors show initial sensitivity to doxorubicin, topotecan, cisplatin [15], and the poly(ADP-ribose)-polymerase (PARP) inhibitor olaparib, which induce synthetic lethality in BRCA1- or BRCA2-deficient cells [16]. However, the tumors always acquire resistance to docetaxel, doxorubicin, topotecan or olaparib [17,18], based on the increased expression of the *Abcb1* or *Abcg2* genes. Inhibition of ABCB1 using tariquidar successfully reversed drug resistance [19], and the relevance of the efflux-based drug resistance was also confirmed in ABC transporter-deficient tumors [18].

While there is a constant need for finding new targets, the efficacy of existing drugs could also be restored by eliminating resistance mechanisms. Unfortunately, attempts to circumvent reduced drug accumulation by inhibiting drug efflux have failed in clinical trials, because inhibition of Pgp altered the pharmacokinetic properties of the coadministered cytotoxic compounds [20]. Because selective modulation of Pgp in cancer cells remains difficult to achieve, attempts to circumvent MDR rely on further strategies such as targeting the paradoxical hypersensitivity of MDR cancer [21–24]. Another possibility is to develop drugs that bypass efflux either through the chemical modification of the cytotoxic compounds or through novel formulations of existing therapeutics [25].

Doxorubicin (DOX) is still one of the most effective chemotherapeutic agents used in lung, breast, ovarian, uterine cancers and in lymphomas and leukemias [26–28]. The pegylated liposomal formulation of doxorubicin (PLD/Doxil®/Caelyx®) was developed to overcome DOX's dose limiting cardiotoxicity and myelosuppression [29]. PLD has the ability to avoid the reticuloendothelial system (“stealthness”) [30], and as a result of the enhanced permeability and retention (EPR) effect, PLD is “passively” targeted to tumors [31,32]. PLD's efficacy was evaluated in several allo- and xenograft models of colon [33], breast [34], ovarian [35], lung [36], leukemia [37], lymphoma [38], bladder [39] and prostate cancer [40]. These studies have convincingly demonstrated that PLD has an equal or even better performance than DOX (reviewed in [41]). Clinical trials comparing PLD to DOX in patients with metastatic breast cancer (MBC) proved that both treatments are comparably efficient [42].

DOX is recognized by Pgp and therefore it can induce therapy resistance in breast cancer patients [43]. In this study our aim was to evaluate the susceptibility of PLD to MDR. We show that cells selected to be resistant to DOX are cross-resistant to PLD. However, in contrast to doxorubicin, PLD treatment results in a durable response of BRCA1-deficient mammary tumors, and PLD remains effective in DOX-resistant ABCB1-expressing tumors.

2. Materials and methods

2.1. Drugs

Cytotoxic drugs doxorubicin (dox, teva), pegylated liposomal doxorubicin Caelyx® (PLD, Janssen) and cisplatin (CDDP, Accord Healthcare) were purchased directly from the manufacturers. The compounds used in the DT40 cytotoxicity assays were purchased from Selleckchem (olaparib), Sigma-Aldrich (paclitaxel, SN-38, doxorubicin) or Accord Healthcare (PLD, 5-FU) or TEVA (etoposide). Daunorubicin was a kind gift from Dr. Gábor Mező (ELTE, Hungary).

2.2. Cell lines

The human uterine sarcoma cell lines MES-SA and the doxorubicin selected MES-SA/Dx5 were obtained from ATCC (MES-SA: No. CRL-1976™, MES-SA/Dx5: No. CRL-1977™). The human mammary

carcinoma cell lines MCF7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-468, Hs578T, BT-549, the mouse leukemia cell line P388 and its doxorubicin selected subline P388/ADR were obtained from the National Cancer Institute's Developmental Therapeutics Program (National Institutes of Health). P388/ADR and Dx5 cells were maintained in 800 and 500 nM doxorubicin (Adriamycin), respectively. The human breast cancer and the mouse leukemia cell lines were cultured in RPMI media (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum, 5 mM glutamine, and 50 units/ml penicillin and streptomycin (Life Technologies). MES-SA and MES-SA/Dx5 cells were cultured in supplemented DMEM media (Life Technologies). The chicken B-cell line DT40 was grown in RPMI-1640 medium supplemented with 7% fetal bovine serum, 3% chicken serum, 50 μM 2-mercaptoethanol and penicillin/streptomycin. Wild-type DT40 clone18 cells [44] and a BRCA1 null mutant line [45] were used. All cell lines were cultured at 37 °C, 5% CO₂.

2.3. In vitro cytotoxicity assay

Viability was assessed by the PrestoBlue® assay (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were plated in 96- or 384-well plates, treated in the given concentration range with the indicated compounds for 120 h or 72 h in case of DT40 cells. Viability of the cells was measured spectrophotometrically using an EnSpire microplate reader (Perkin Elmer). Data were normalized to untreated cells; curves were fitted by the Graph Pad Prism 5 software using the sigmoidal dose–response model. Curve fit statistics were used to determine IC₅₀ values.

2.4. Immunohistochemistry

Snap-frozen tissues were cut with a cryostat into 5 μm sections. The tissue slices were transferred onto microscope slides and fixed with ice-cold methanol for 10 min. Tissue sections were then washed in PBS, blocked with 3% bovine serum in PBS (1 h), stained with hematoxylin and eosin and then the sections were mounted with ProLong Gold (Life Technologies). Immunohistochemistry images were examined by an Eclipse TS100 microscope (Nikon).

2.5. RNA isolation and RT-PCR

Snap-frozen tumor samples were pulverized under liquid nitrogen and were homogenized in TRIzol™ Reagent (Life Technologies). Total RNA was isolated from tissue samples using Direct-zol® MiniPrep kit (Zymo Research) according to the manufacturer's guidelines. In-column DNase I treatment was applied to prevent DNA contamination. cDNA samples were prepared from 300 ng total RNA using the Promega Reverse Transcription System Kit. The Pre-Developed TaqMan® assay Actin β (Actβ) (Life Technologies) was used as endogenous control in real-time PCR (RT-PCR) experiments; for quantifying *Abcb1a* and *Abcb1b* mRNA levels the respective TaqMan® primers were used. RT-PCR analyses were carried out using the StepOne™ Real-Time PCR System (Life Technologies); mRNA fold changes were determined using the 2^{-ΔΔCt} method. Relative mRNA levels were presented as mean values ± S.E.M. of 3 independent experiments.

2.6. Animal experiments

All animal protocols were approved by the Hungarian Animal Health and Animal Welfare Directorate according to the EU's most recent directives. All surgical procedures were performed according to the Committee on the Care and Use of Laboratory Animals of the Council on Animal Care at the Institute of Enzymology, RCNS in Budapest, Hungary (22.1/2291/3/2010).

P388 and P388/ADR cells (1 × 10⁶/animal) were injected into the intraperitoneal cavity of 6–8 weeks old male BDF1 mice and 48 h later a

single dose of saline, doxorubicin (3 mg/kg) or PLD (3 or 5 mg/kg) were administered intraperitoneally. The animals were weighted 3 times per week and monitored multiple times per day for any sign of pain. MTD was determined based on the weight loss of healthy FVB mice. Drug resistance of tumor implants was induced as described by Rottenberg et al. [17]. Briefly, tissue pieces (1–2 mm in diameter) obtained from *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} FVB mouse mammary tumors (a kind gift from Sven Rottenberg, NKL) were transplanted orthotopically into the mammary fat pad of wild type FVB mice (Harlan) under anesthesia (20 mg/kg zolazepam, 12.5 mg/kg xylazine, 3 mg/kg butorphanol, 20 mg/kg tiletamine). The tumor size was monitored at least 3 times per week by caliper measurements after the tumors became palpable. Tumor volume was calculated using the $V = \text{length} \times (\text{width}^2/2)$ formula. When the volume of the tumors reached $\sim 200 \text{ mm}^3$, DOX and PLD treatment was initiated using the maximum tolerable dose (MTD, 5 and 8 mg/kg iv. respectively). Treatments using the MTD were repeated every 10 days unless the size of the tumors decreased to 50% of its original volume. In that case treatment was repeated when the tumor relapsed to its original size. Animals were sacrificed when the tumor volume reached $\sim 2000 \text{ mm}^3$.

2.7. Measurement of serum and tumoral doxorubicin levels after DOX or PLD treatment

FVB mice were treated with a single dose of intravenous doxorubicin (5 mg/kg) or PLD (8 mg/kg). Blood samples were taken before administration and after 5, 15, 30, 60, 180, 360, 1440, 2880 min by cardiac puncture of euthanized animals. Blood serum was separated by centrifugation at 4000 rpm for 15 min at 4 °C. For the determination of tumoral doxorubicin levels tumor pieces obtained from *Brcal*^{-/-}; *p53*^{-/-} FVB mouse mammary tumors were transplanted orthotopically into the mammary fat pad of wild type FVB mice. When the volume of the tumors reached $\sim 200 \text{ mm}^3$, DOX and PLD treatment was initiated using the maximum tolerable dose (MTD, 5 and 8 mg/kg iv. respectively). Animals were sacrificed after 24, 48 and 72 h; the tumors were mechanically homogenized in phosphate-buffered saline ($\sim 200 \text{ mg/ml}$) and subjected to acetonitrile protein precipitation. LC–MS/MS analysis was performed using a QTRAP 6500 triple quadrupole – linear iontrap mass spectrometer, equipped with a Turbo V Source in electrospray mode (AB Sciex, CA, USA) and a Perkin Elmer Series 200 micro LC system (Massachusetts, USA). Chromatographic separation was achieved using an Agilent Zorbax SB C18 column (75 mm \times 4.6 mm, 3.5 μm). Sample was eluted with a gradient of solvent A (0.1% formic acid in water) and solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile). Quantitation of doxorubicin was performed using multiple reaction monitoring mode (MRM) with the transitions of m/z 544 \rightarrow 361 (quantifier) and m/z 544 \rightarrow 130 (qualifier).

3. Results

3.1. PLD does not overcome ABCB1-mediated doxorubicin resistance in vitro

To evaluate the effect of pegylated liposomal formulation on the in vitro toxicity of doxorubicin, we compared the toxicity of DOX and PLD in the NCI-60 breast cancer cell lines. Whereas DOX showed strong toxicity in all six cell lines, the IC₅₀ values of PLD were on average 51-fold higher (Table 1). MDA-MB-468 cells were relatively more sensitive to both cisplatin and PLD, in line with the loss of PTEN expression in this cell line [46]. Next, we evaluated the susceptibility of DOX and PLD to Pgp-mediated MDR, using pairs of drug-sensitive and multidrug resistant cell lines. As expected, A431-B1, MESS-SA/Dx5 and P388/ADR cells expressing Pgp were resistant to DOX as compared to their sensitive counterparts. Pgp expression also conferred resistance to PLD, which was virtually nontoxic to A431-B1, MESS-SA/Dx5 and P388/ADR cells. Addition of the Pgp-inhibitor tariquidar restored sensitivity,

Table 1

In vitro toxicity (IC₅₀) of DOX, PLD and cisplatin (μM) in six breast cancer cell lines (top) and in parental and Pgp-expressing MDR cells (bottom). Values represent the average of at least three independent experiments. RR: Resistance ratio (IC₅₀ resistant cell/IC₅₀ sensitive cell). TQ: Pgp inhibitor tariquidar.

Cell line	DOX	DOX + TQ	PLD	PLD + TQ	Cisplatin
BT-549	0,02	–	1,68	–	7,62
Hs578T	0,08	–	5,65	–	16,93
MDA-MB-231	0,01	–	0,59	–	6,42
MCF-7	0,13	–	3,63	–	48,75
T47D	0,03	–	1,21	–	10,79
MDA-MB-468	0,02	–	0,49	–	0,71
A431	0,33	–	12,30	–	19,50
A431-B1	8,52	0,32	> 250	7,14	23,10
RR	25,8	–	> 20,3	–	–
MES-SA	0,07	–	4,00	–	7,58
MES-SA/Dx5	2,88	0,02	> 250	0,10	12,52
RR	41,1	–	> 62,5	–	–
P388	0,00015	–	0,00075	–	0,61
P388/ADR	2,04	0,00069	10,19	0,00230	1,18
RR	13,600	–	13,587	–	–

proving that P-glycoprotein can protect cells against doxorubicin despite its stealth formulation (Table 1). ABCG2, another well-characterized multidrug transporter, did not confer resistance against PLD (Supplementary Table S1).

3.2. PLD is ineffective in an allograft model of doxorubicin-resistant mouse B-cell leukemia

In real tumors, the efficacy of treatment is also influenced by extracellular factors, such as tissue distribution or the cross-talk between microenvironment and cancer cells [47]. In the next set of experiments we monitored the effect of DOX or PLD treatment on the survival of BDF1 mice bearing drug-sensitive (P388) or drug-resistant (P388/ADR) intraperitoneal ascites tumors (Fig. 1). In line with its reduced toxicity, PLD could be administered at significantly higher doses. P388 tumors responded well to DOX and PLD, which was reflected in a significant increase in the median survival (DOX: 29 days; PLD (3 mg/kg): 28 days; PLD (5 mg/kg): > 63 days as compared to saline (15.5 days)), while the same treatment failed to prolong survival of mice inoculated with resistant P388/ADR cells (DOX: 12.5 days; PLD (3 mg/kg): 13 days). Whereas P388 tumors showed a dose-dependent response to PLD, the Abcb1-expressing P388/ADR tumors were completely resistant even at a higher PLD dose (PLD (5 mg/kg): 16 days). Thus, in line with the *in vitro* data, this particular *in vivo* model indicates that, despite the stealth formulation, PLD cannot be considered as an effective solution for the treatment of multidrug resistant tumors.

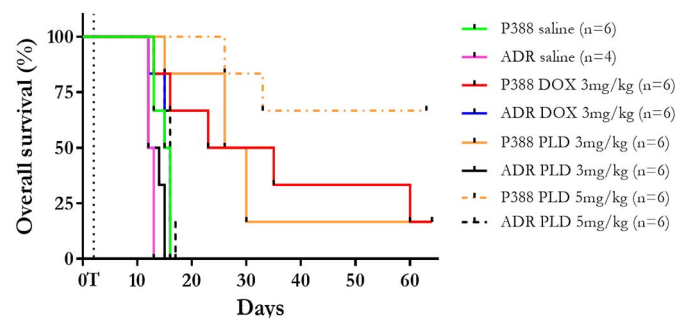


Fig. 1. DOX and PLD are ineffective in an ascites model of resistant leukemia. Drug-naive P388 or drug resistant P388/ADR tumor bearing mice were treated with saline (green and pink), 3 mg/kg of DOX (red and blue) or PLD (orange and black) or 5 mg/kg of PLD (dashed dotted orange and black). The dotted vertical line indicates the time of treatment (T) at Day 2. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

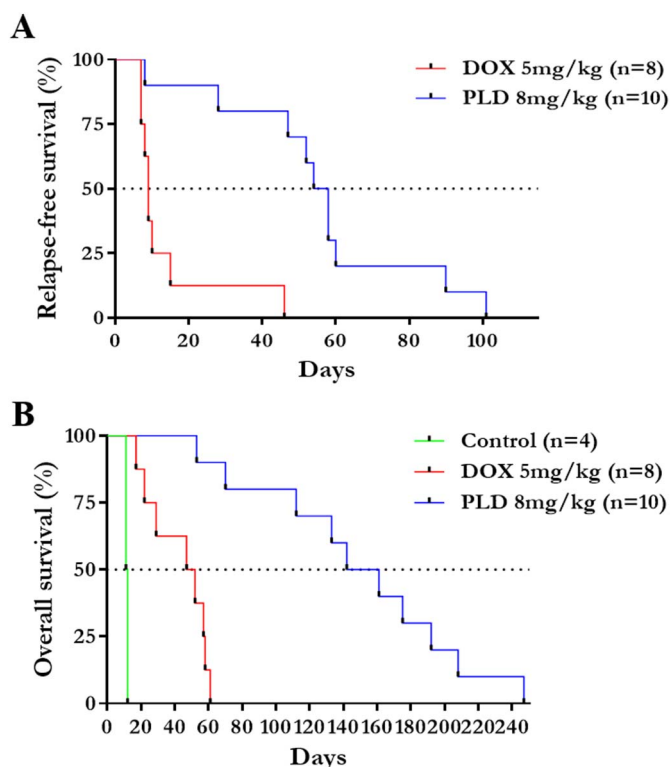


Fig. 2. PLD is superior to DOX in a clinically relevant mouse model of breast cancer. A. Relapse-free and B. Overall survival of DOX (5 mg/kg iv.) and PLD (8 mg/kg iv.) treated groups. C. Growth kinetics of saline (upper left panel), DOX (DOX1-10) and D. PLD (PLD1-10) treated individual tumors. Arrows indicate treatment. D. Growth kinetics of PLD treated individual tumors (PLD1-10). Arrows indicate treatment.

3.3. PLD prolongs relapse-free and overall survival in a *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} tumor model of hereditary mammary cancer

To test the therapeutic value of PLD in a more relevant model, we treated mice bearing orthotopically transplanted mammary tumors obtained from *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} mice [17,18]. Again, PLD could be administered at higher doses than DOX (8 mg/kg and 5 mg/kg, respectively). Whereas saline-treated mice had to be sacrificed within 12 days, treatment with the maximum tolerated dose (MTD) of doxorubicin increased the median survival of mice to 49.5 days. As compared to doxorubicin, treatment with the MTD of PLD resulted in a 6-fold increase in median relapse-free survival, and a 3-fold increase in median overall survival (9 vs 56 days and 49.5 vs 151.5 days, respectively) with the longest survival of 247 days (Fig. 2A, B). Growth kinetics of individual tumors revealed fundamental differences between the DOX and PLD groups (Fig. 2C and D). Saline-treated animals had to be sacrificed by day 12 because the tumor volume reached the limit of ~2000mm³ (Fig. 2C, upper left graph). In some tumors, treatment with the MTD of DOX resulted in an initial response, but eventually all tumors relapsed and became resistant to therapy within 60 days (Fig. 2C). In contrast, 8 of the 10 tumors treated with the MTD of PLD were efficiently contained and only two tumors became refractory to treatment (PLD 1 and 7) (Fig. 2D). However, responding tumors could not be completely eradicated before the mice had to be euthanized due to the cumulating side effects of the PLD treatment. Immunohistochemical characterization of tumor sections from the 3 treatment groups revealed increased necrosis in the PLD treated tumors. There were no further morphological or structural differences, nor a change in the number of infiltrating immune cells, suggesting that the superior efficacy of PLD is not due to an elevated immune response (Supplementary Fig. S1).

3.4. Resistance to doxorubicin can be overcome by PLD in the *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} tumor model of hereditary mammary cancer

Although PLD proved ineffective against doxorubicin-resistant cell lines *in vitro* (Table 1) and *in vivo* (Fig. 1), we also wanted to evaluate the potential of PLD against doxorubicin resistant mammary cancer using the model described above. Doxorubicin-resistant tumors (Fig. 2C) were re-transplanted into the mammary fat pad of wild-type mice. After the tumors became palpable, mice were treated with the MTD of either DOX or PLD. As expected, doxorubicin treatment was largely ineffective (median overall survival was 27 days, as opposed to the median survival of 49.5 days observed when DOX was used in drug-sensitive tumors, Fig. 2B). Surprisingly, all the DOX resistant tumors responded to PLD treatment (Fig. 3B). Although the relapse-free period was significantly shorter (RFS of 56 vs 15 days, in first- and second-line PLD treatment groups, Fig. 2A and Fig. 3B, respectively), PLD treatment was able to significantly prolong the overall survival of mice bearing DOX-resistant tumors (OS of 151 vs 142 days, in the first- (Fig. 2B) and second-line (Fig. 3C) PLD treatment groups, respectively). Complete remission was achieved with one mouse (PLD16), which has been tumor-free for over 200 days. Only one of the 8 re-transplanted tumors became refractory to PLD treatment; all the others were efficiently contained until the experiment had to be stopped due to the cumulating toxicity associated with PLD treatment (Fig. 3A and Supplementary Fig. S2).

3.5. PLD-resistant tumors show 20–400 fold higher expression of *Abcb1a* and *Abcb1b*

Pgp expression conferred resistance to PLD in cytotoxicity experiments and in the P388 MDR ascites tumor model. Also, as described by Rottenberg and colleagues, in the case of DOX, treatment failure was due to a moderately increased expression of *Abcb1a* and *b* [19]. Strikingly, PLD-resistant tumors (PLD1 and 7) showed extremely high *Abcb1a* and *b* mRNA levels (20–400 fold increase as compared to the saline-treated group). Similarly, tumors showing signs of resistance towards the end of the experiment (PLD 3, 8, 10) exhibited very high *Abcb1a* and *Abcb1b* levels. Tumor tissue could not be extracted from responders (PLD 2, 4, 5, 9), except for PLD 6, which however did not overexpress any of the *Abcb1* genes (Fig. 4).

3.6. Superior activity of PLD over DOX can be explained by increased tumoral doxorubicin levels

Liposomal formulation of doxorubicin allowed a 60% increase of the MTD (8 mg/kg vs 5 mg/kg for PLD and DOX, respectively), which resulted in a 35-fold increase in the maximum peak doxorubicin concentration (31,600 ± 6023 ng/μl vs 885.67 ± 240, measured 5 min after administration). Following intravenous injection of DOX, doxorubicin plasma levels decayed rapidly, whereas 7 days after treatment with a single dose of PLD, doxorubicin concentrations were still comparable to maximum levels observed in DOX-treated mice (Fig. 5A). Consequently, the AUC value was ~2600-fold higher for PLD as compared to DOX (4.47 × 10⁷ vs 1.7 × 10⁴ ng × h/ml). As expected based on the EPR effect, elevated plasma doxorubicin levels resulted in a significant increase of the tumoral drug load in the PLD-treated mice (Fig. 5B). Despite sustained high doxorubicin plasma concentrations, treatment with PLD was not limited by signs of pain, serious side effects or weight loss (see Supplementary Fig. S4 for the histological analysis of vital organs). Long-term (> 120 days) treatment with PLD however resulted in ulcerations reminiscent of the palmar-plantar erythrodysesthesia (“hand-foot syndrome”) observed in patients [48].

3.7. *BRCA1* knock-out cells show increased sensitivity to DOX and PLD

The surprising efficacy of PLD in treatment-naïve and DOX-resistant

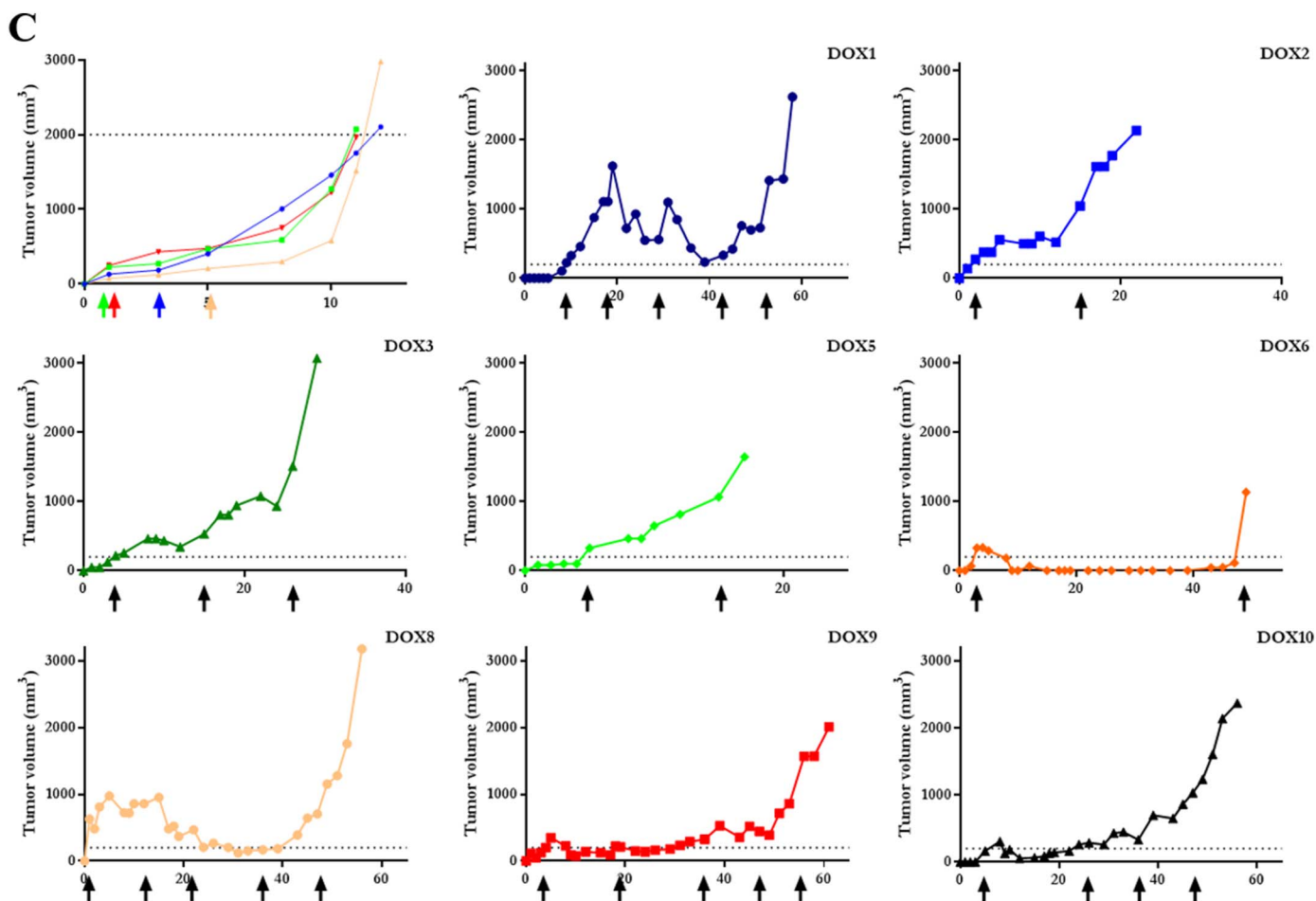


Fig. 2. (continued)

Brcal-negative mammary tumors prompted us to investigate the relevance of defective homology-directed DNA repair. We compared the sensitivity of wild-type and a BRCA1-null DT40 cells against a panel of cytotoxic compounds used in the treatment of breast cancer. BRCA1 is not essential for survival of DT40 cells, which is likely due to p53 deficiency [49]. As expected, BRCA1-KO DT40 cells were hypersensitive to olaparib and SN-38, but not to 5-fluorouracil (5-FU) or paclitaxel. Surprisingly, BRCA1-deficient cells were also more sensitive to topoisomerase II inhibitors. In particular, lack of BRCA1 resulted in a 3.3- and 2.8-fold higher sensitivity to DOX and PLD, respectively (Table 2).

4. Discussion

Effective treatment of cancer requires the use of toxic chemotherapy. In most cases, multiple drugs are used, as resistance to single agents occurs almost universally. One of the best studied mechanisms of multidrug resistance relies on the ability of P-glycoprotein to prevent drugs from reaching a toxic concentration inside cancer cells. Unfortunately, clinical efforts to inhibit efflux-mediated resistance have failed, due to unwanted side effects associated with the toxicity of the concomitantly administered chemotherapy [20]. A simple alternative to transporter inhibition would be to increase intracellular drug accumulation by elevating the dose of chemotherapy. However, while this approach may prove viable *in vitro*, even a slight increase in chemotherapy dosages can result in lethal side effects in patients. PLD was developed with the aim to overcome the dose-limiting cardiotoxicity and myelosuppression of doxorubicin [29]. Currently, PLD is approved for AIDS-related Kaposi's sarcoma, ovarian cancer (after failure of platinum-based therapy), and multiple myeloma (in combination with

bortezomib in patients who have not previously received bortezomib and have received at least one prior therapy). In addition, several reports showed benefit in advanced, metastatic and recurrent breast cancers [50,51] even with prolonged dose intervals [52]. Interestingly, only a small number of studies were performed using PLD as a neoadjuvant treatment in locally advanced breast cancer patients [53]. To our knowledge there are no studies focusing on PLD-resistance in any kind of cancer.

Since Pgp extrudes its substrates from the membrane bilayer (hydrophobic vacuum cleaner model [54]), liposomal formulations may bypass the transporter as they shuttle their cargo into the cells. Several studies suggested that nanomedicines can overcome MDR to some extent [55–59], but a systematic analysis found that the overall benefit may be quite small [60]. In our hands, the *in vitro* toxicity of PLD was significantly reduced in sensitive cells, and Pgp-expressing cells were completely resistant (Table 1). However, in the case of PLD (but not DOX), we observed a gradual increase in the sensitivity and drug uptake of drug-sensitive cells. In contrast, MDR cells were resistant to both PLD and DOX even at later time points, and did not show any drug uptake unless Pgp was inhibited by tariquidar (Supplementary Figs. S3 and S5). These results are consistent with the slow extracellular release of free doxorubicin from PLD [61]. Since extracellularly released doxorubicin cannot cross the plasma membrane due to preemptive efflux by Pgp, MDR cells remain dim and resistant even at later time points.

PLD was also inefficient against drug resistant P388/ADR cells in an ascites tumor model despite the dose-dependent response of the Abcb1-negative tumors. Extrapolation of these results suggested that Doxil treatment would not be effective in treatment-refractory patients. However, failure of the clinical trials conducted with transporter

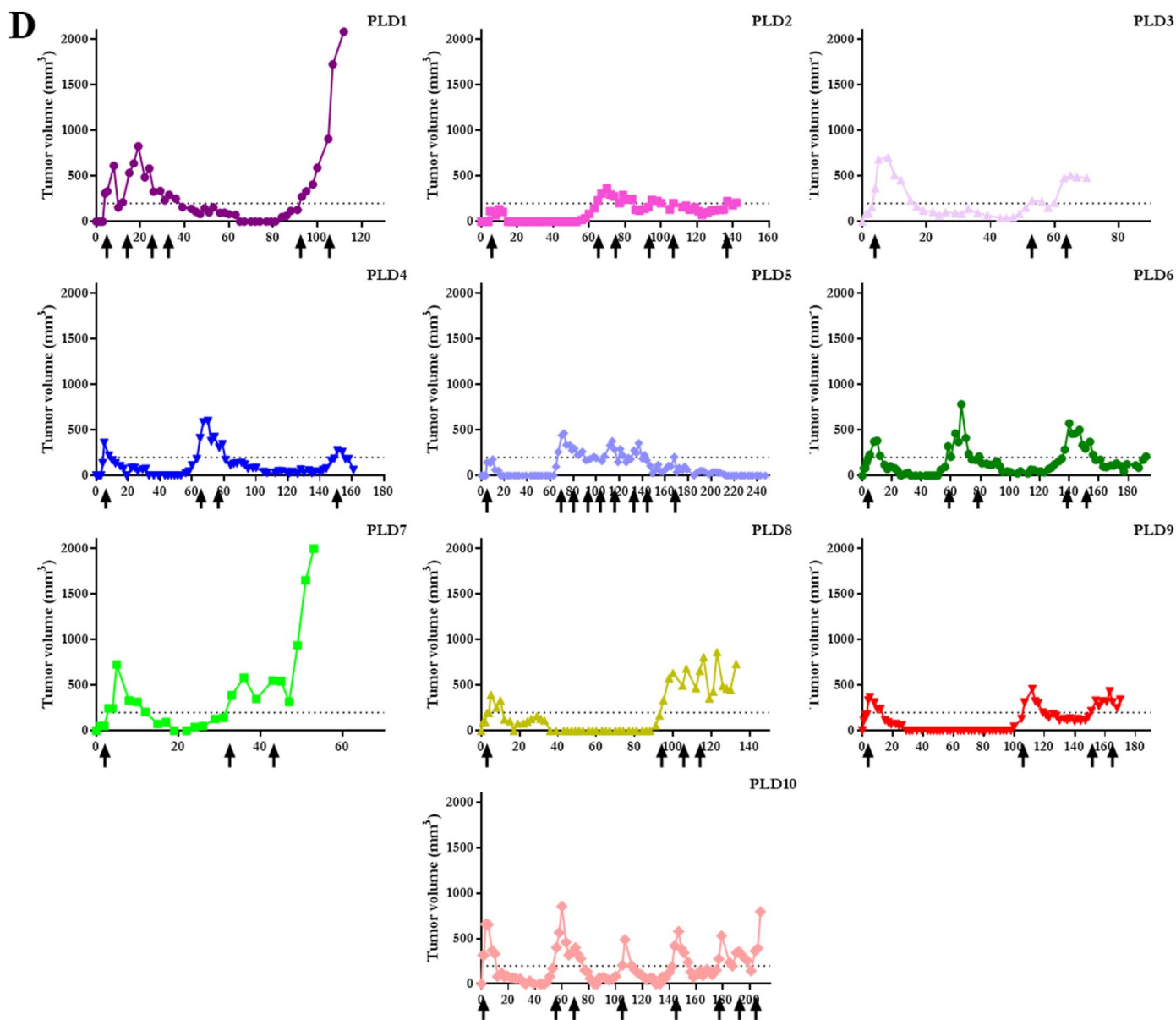


Fig. 2. (continued)

inhibitors has shown the complexity of translating knowledge gained from *in vitro* models. The evolution of cancer drug resistance is a multi-step process, which is best modeled with clinically relevant mouse models of cancer [14]. To evaluate the clinical potential of PLD in treatment-naïve and therapy-resistant triple-negative breast cancer, we used a GEMM in which mammary tumors arise due to the tissue specific disruption of *Brca1* and *p53*[13]. An advantage of this model is that mammary tumors obtained from *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} mice can be transplanted orthotopically into female wild-type FVB mice without the loss of histomorphological features, molecular characteristics and the drug sensitivity profile [17]. Although the incidence of BRCA1-deficient hereditary breast cancer is relatively low, the high prevalence of BRCA1 dysfunction identified in sporadic breast cancer [62][63] could also be exploited. Reduced BRCA1 function as a result of gene silencing by hypermethylation was observed in sporadic breast and ovarian cancer [64,65], and BRCA1/2-deficiency is also present in non-gynecological malignancies [66].

In line with Phase 1 studies, we found that the circulation time, maximum peak concentration and AUC of doxorubicin were significantly higher in PLD treated groups as compared to DOX treatment

[30,53,67]. PLD was far more efficient than DOX as reflected by a significant increase of both relapse-free and overall survival of *Brca1*-negative mammary tumor bearing mice (the relapse-free survival in the PLD treatment group (56 days) was longer than the overall survival of the DOX treated group (49.5 days)). Improved survival was clearly due to the delayed onset of drug resistance, suggesting that the increased cytotoxic payload could overwhelm the transporters expressed at relatively low levels. This result also highlights the shortcomings of typically used resistance models, which are based on the comparative study of sensitive and resistant cell lines *in vitro* and xenograft experiments [60]. PLD was ineffective in the doxorubicin-resistant MES-SA/Dx5 [68] or P388/ADR cells and the retrovirally transduced A431-B1 cells because Pgp expression in these routinely used MDR cell lines is exceedingly high, whereas resistance of *Brca1*-negative mammary tumors to DOX was caused by a moderate overexpression of Abcb1/Pgp. The functional relevance of moderate transporter levels in conferring resistance to DOX or olaparib has been previously established by demonstrating restoration of drug sensitivity with the addition of the Pgp antagonist tariquidar [17,19]. Strikingly, Abcb1/Pgp expression levels needed to confer resistance to PLD were 20 to 400 fold higher than

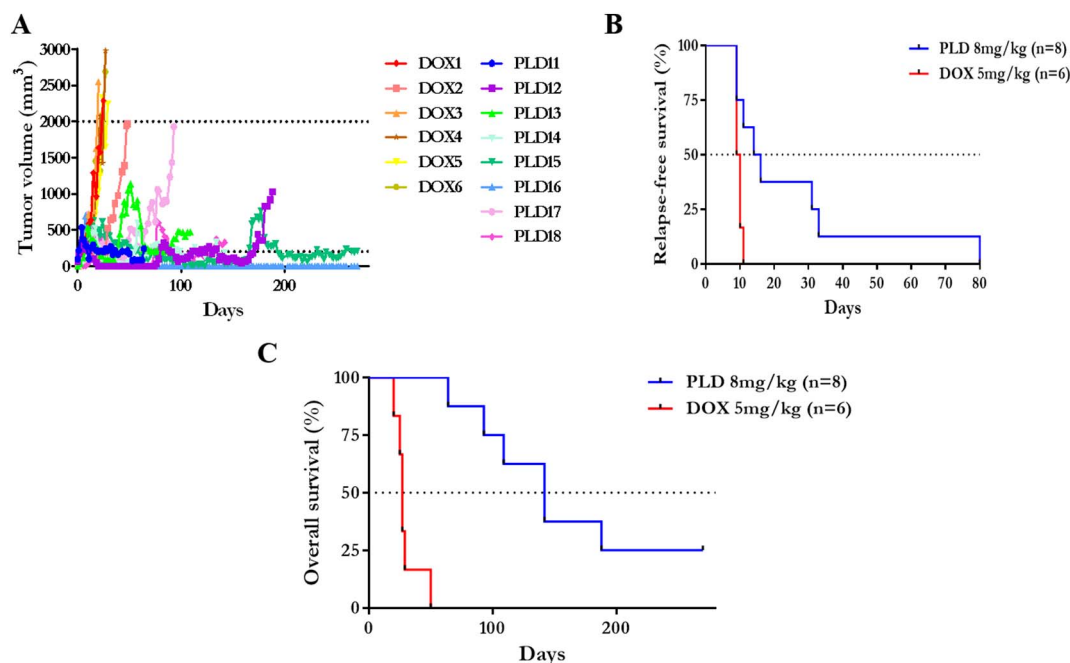


Fig. 3. PLD treatment of DOX-resistant tumors is remarkably effective A. Growth kinetics, B. Relapse-free survival and C. Overall survival of DOX-resistant tumors treated with DOX (5 mg/kg iv.) or PLD (8 mg/kg iv.).

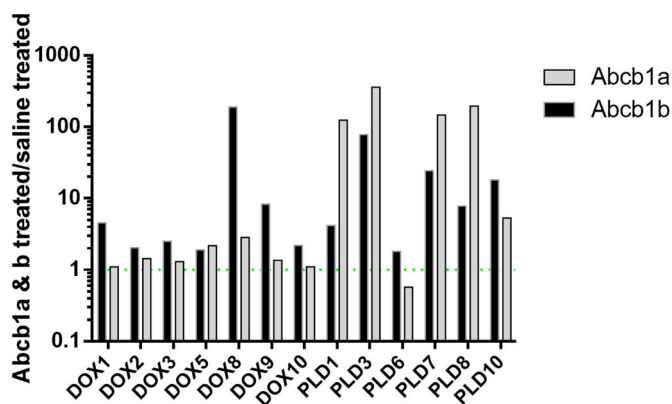


Fig. 4. Normalized *Abcb1a* and *Abcb1b* mRNA expression levels in tumors treated with saline, DOX or PLD.

those that conferred doxorubicin resistance, offering an explanation for the delayed and less frequent emergence of PLD resistance. The possible involvement of Pgp in limiting human breast cancer therapy is still controversial. While the level of Pgp needed to confer clinical resistance in human tumors has never been established due to the insensitivity of the methods, our results suggest that PLD-refractory patients express high Pgp levels that may be readily detected even in a routine clinical diagnostic setting.

Consistent with the higher Pgp levels needed to confer resistance, PLD administration was able to overcome doxorubicin insensitivity of the mouse mammary tumors. This may explain the result of the meta-analysis of four prospective trials, which proved that anthracycline re-challenge using PLD is effective in patients with metastatic breast cancer regardless of resistance, cumulative dose or time since prior conventional anthracycline therapy [69]. Likewise, a multicenter phase II study conducted on 79 MBC patients previously treated with anthracyclines found that PLD was as effective as other commonly used salvage regimens (eg. capecitabine) [70]. PLD was also found to be efficient in BRCA-related ovarian cancer (OC) even after resistance to platinum based treatments have emerged [71]. Strikingly, comparison of PLD and olaparib in heavily pretreated BRCA-heterozygous OC

patients demonstrated similar efficacy, suggesting that PLD may also be advantageous in *BRCA1*-negative cancers [72]. Although olaparib has potent antitumor activity in BRCA-negative cancers, not all patients with cancer who carry *BRCA1* or *BRCA2* mutations respond to PARPi therapy, and the analysis of *BRCA1*-mutated mouse mammary tumors suggested that olaparib resistance is also due to the moderate over-expression of Pgp [73]. In light of our results, the clinical benefit of PLD re-challenge may be explained by the ability of PLD to overcome Pgp-mediated resistance that limits the efficiency of anthracycline-, taxane- or olaparib-based regimens.

While the effectiveness of PARP inhibitors for BRCA-deficient cells makes these the preferred agents for tumors harboring such cells, the choice of “cytotoxic” agent to use in the therapy of BRCA-deficient cells is less clear. Persuasive basic science suggests a topoisomerase I inhibitor should be the preferred agent [74,75] but clinically cisplatin has often been administered in drug combinations with evidence of benefit [76–81]. As expected, our *in vitro* studies demonstrate that BRCA-deficient cells are markedly sensitive to olaparib. Whereas drug uptake was not effected by *BRCA1* (Supplementary Fig. S3), we also found collateral sensitivity to doxorubicin and PLD, suggestive of some level of synthetic lethality. Furthermore, our *in vivo* experiments demonstrated a nearly 6-fold prolongation of disease free-recurrence and a 3-fold increase of overall survival with PLD compared to doxorubicin. By stabilizing the topoisomerase II complex after it has broken the DNA chain for replication, doxorubicin prevents the resealing of the DNA double helix, stops replication and leads primarily to DNA double strand breaks. This may explain the sensitivity of BRCA1 mutant cells to DOX and PLD, as *BRCA1* plays an important role in DNA double strand break repair [82]. Whether this might render BRCA-deficient tumors more sensitive to doxorubicin will need to be more clearly established, but in our view it may be worthy of consideration given liposomal doxorubicin is used often in the therapy of ovarian cancer and less often in breast cancer.

This possible selectivity to BRCA1-deficient tumors, the high serum concentrations, the prolonged circulation time and the indirect targeting of tumor tissue by damaged blood vessel integrity could explain PLD's significant success over conventional DOX treatment. In addition, we show that the favorable pharmacokinetics achieved with PLD—a remarkable 2600-fold higher AUC and a concomitant increase of the

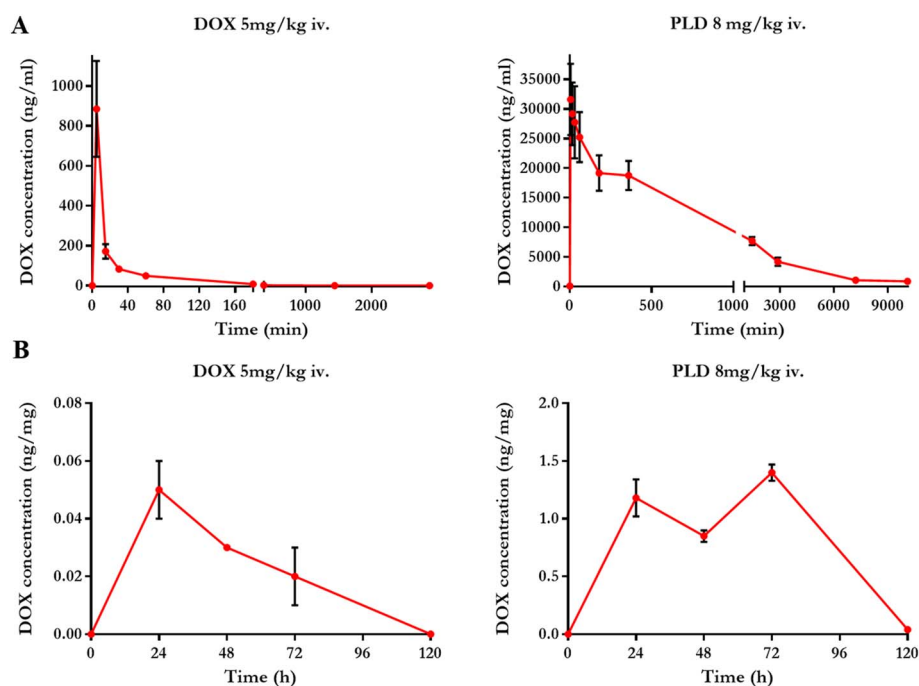


Fig. 5. Serum (A) and tumoral (B) doxorubicin concentrations in mice receiving DOX or PLD treatment. Mice were injected (time 0) with either doxorubicin at a dose of 5 mg/kg (left panels) or PLD at a dose of 8 mg/kg (right panels). Doxorubicin levels were determined at the indicated time points by mass spectroscopy. Points represent means of triplicate aliquots from 3 mice per time point; error bars represent \pm SD.

Table 2

Cytotoxicity (IC_{50}) of chemotherapeutics (nM) used in the clinical treatment of breast cancer. Selectivity > 1 indicates that the compound kills BRCA1-KO DT40 cells more effectively than parental DT40 cells.

Mechanism of action	Compound	WT	BRCA1 -/-	Selectivity	
PARP-inhibitor	Olaparib	3080	30	104.1**	
	Topoisomerase II inhibitor	PLD	229.4	82.9	2.8**
		Doxorubicin	8.45	2.57	3.3**
		Daunorubicin	4.68	2.51	1.9*
		Etoposide	51.0	29.3	1.7*
Topoisomerase I inhibitor	SN-38	4.60	0.49	9.4**	
Antimetabolite	5-FU	2.86	2.98	0.96	
Microtubule-stabilizing agent	Paclitaxel	384.5	448.2	0.86	

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

tumoral drug load—can effectively overcome Pgp-mediated DOX resistance. In response to the critical shortage of PLD, the US Food and Drug Administration (FDA) allowed temporary importation of non-FDA-approved second-generation liposomal doxorubicin. With the expiry of the PLD patent, it is likely that several generics will be approved, which may also lead to the expansion of the current indications [29]. Considering the clinical failure of the many Pgp inhibitors that were previously developed and that were often encumbered by the need to reduce the doses of the concomitantly administered chemotherapy, novel formulations – liposomal, or nanoparticle – might offer a better alternative at reversing transporter mediated resistance. This is especially relevant given the heightened interest in such formulations as evidenced by four US FDA and EMA approvals in the recent past – including nanoparticle-albumin bound paclitaxel, doxorubicin hydrochloride liposome injection, irinotecan liposome injection and vincristine sulfate liposome injection. Approval is also expected for the first liposomal fixed drug combination of cytarabine and daunorubicin that will be used in AML [83].

5. Conclusion

Pegylated liposomal formulation of doxorubicin has a significant impact on the evolution of drug resistance in cancer. While treatment with doxorubicin becomes rapidly inefficient, pegylated liposomal

doxorubicin dramatically increases relapse-free and overall survival due to the delayed onset of multidrug resistance. Our results also show that P-glycoprotein is able to confer resistance against liposomal drug formulations, albeit at significantly higher levels that may not be readily achieved in patients. Consistent with the higher Pgp levels needed to confer resistance, PLD administration was able to overcome doxorubicin insensitivity of the mouse mammary tumors, suggesting that encapsulated doxorubicin can successfully evade moderate Pgp levels associated with acquired resistance to anthracyclines or olaparib. Our data suggest that PLD therapy could be a promising strategy in breast cancer, not only in the metastatic stage, but also as a neoadjuvant treatment.

Funding

G.Sz. was supported by a Momentum Grant from the Hungarian Academy of Sciences (LP-2010-003/2015) and the ERC Starting grant 260572. Funding from the Austrian Science FundSFB35 (GSzakács) is also acknowledged.

Author contributions

Designed the experiments: A.F. and G.Sz. *In vitro* experiments: A.F., K.Sz., Sz.T., V.N., L.H., E.K.; *in vivo* studies: A.F., E.K., M.Cs., J.T.; tumor sample characterization: A.F., K.Sz., L.H., Cs.M., P.V.; mass spectrometry: I.T., P.Sz.; wrote the manuscript: A.F. and G.Sz.

Competing interests

The authors declare no competing interests

Acknowledgement

We thank Irén Bodrogi-Mayer, Anita Hídvégi and Annamária Tóth, Ibolya Kurkó for the excellent technical assistance; and Dr. Tito Fojo for useful comments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx>.

doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.010.

References

- [1] R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal, Cancer statistics, 2012, *CA Cancer J. Clin.* 62 (2012) 10–29, <http://dx.doi.org/10.3322/caac.20138>.
- [2] T.R. Wilson, P.G. Johnston, D.B. Longley, Anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in cancer, *Curr. Cancer Drug Targets* 9 (2009) 307–319.
- [3] P.-E. Colombo, F. Milanezi, B. Weigelt, J.S. Reis-Filho, Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction, *Breast Cancer Res. BCR.* 13 (2011) 212, <http://dx.doi.org/10.1186/bcr2890>.
- [4] J. O'Shaughnessy, Extending survival with chemotherapy in metastatic breast cancer, *Oncologist* 10 (Suppl. 3) (2005) 20–29, <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.10-90003-20>.
- [5] J. Cortes, J. Baselga, Targeting the microtubules in breast cancer beyond taxanes: the epothilones, *Oncologist* 12 (2007) 271–280, <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.12.3-271>.
- [6] M. Castells, B. Thibault, J.-P. Delord, B. Couderc, Implication of tumor micro-environment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 9545–9571, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms13089545>.
- [7] M.M. Gottesman, Mechanisms of cancer drug resistance, *Annu. Rev. Med.* 53 (2002) 615–627, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103929>.
- [8] M.M. Gottesman, T. Fojo, S.E. Bates, Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 48–58.
- [9] R. Pirker, J. Wallner, M. Götzl, A. Gsur, K. Geissler, L. Havelec, W. Knapp, O. Haas, W. Linkesch, K. Lechner, MDR1 RNA expression is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia, *Blood* 80 (1992) 557–559.
- [10] C. Doxani, M. Voulgarelis, E. Zintzaras, MDR1 mRNA expression and MDR1 gene variants as predictors of response to chemotherapy in patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis, *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 18 (2013) 425–435, <http://dx.doi.org/10.3109/1354750X.2013.808263>.
- [11] L. Campos, D. Guyotat, E. Archimbaud, P. Calmard-Oriol, T. Tsuruo, J. Troncy, D. Treille, D. Fiere, Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis, *Blood* 79 (1992) 473–476.
- [12] E. Karasz, K. Jakab, L. Homolya, G. Szakacs, Z. Hollo, B. Telek, A. Kiss, L. Rejtó, S. Nahajevszky, B. Sarkadi, Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia, *Br. J. Haematol.* 112 (2001) 308–314.
- [13] X. Liu, H. Holstege, H. van der Gulden, M. Treur-Mulder, J. Zevenhoven, A. Velds, R.M. Kerkhove, M.H. van Vliet, L.F. Wessels, J.L. Peterse, Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 12111–12116.
- [14] S. Rottenberg, P. Borst, Drug resistance in the mouse cancer clinic, *Drug Resist. Updat.* 15 (2012) 81–89, <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2012.01.001>.
- [15] S. Rottenberg, J. Jonkers, Modeling therapy resistance in genetically engineered mouse cancer models, *Drug Resist. Updat.* 11 (2008) 51–60, <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2007.11.002>.
- [16] P.C. Fong, D.S. Boss, T.A. Yap, A. Tutt, P. Wu, M. Mergui-Roelvink, P. Mortimer, H. Swaisland, A. Lau, M.J. O'Connor, A. Ashworth, J. Carmichael, S.B. Kaye, J.H.M. Schellens, J.S. de Bono, Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers, *N. Engl. J. Med.* 361 (2009) 123–134, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0900212>.
- [17] S. Rottenberg, A.O.H. Nygren, M. Pajic, F.W.B. van Leeuwen, I. van der Heijden, K. van de Wetering, X. Liu, K.E. de Visser, K.G. Gilhuijs, O. van Tellingen, J.P. Schouten, J. Jonkers, P. Borst, Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 12117–12122, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0702955104>.
- [18] S.A.L. Zander, A. Kersbergen, E. van der Burg, N. de Water, O. van Tellingen, S. Gunnarsdottir, J.E. Jaspers, M. Pajic, A.O.H. Nygren, J. Jonkers, P. Borst, S. Rottenberg, Sensitivity and acquired resistance of BRCA1;p53-deficient mouse mammary tumors to the topoisomerase I inhibitor topotecan, *Cancer Res.* 70 (2010) 1700–1710, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3367>.
- [19] M. Pajic, J.K. Iyer, A. Kersbergen, E. van der Burg, A.O.H. Nygren, J. Jonkers, P. Borst, S. Rottenberg, Moderate increase in Mdr1a/1b expression causes in vivo resistance to doxorubicin in a mouse model for hereditary breast cancer, *Cancer Res.* 69 (2009) 6396–6404, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0041>.
- [20] G. Szakacs, J.K. Paterson, J.A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M.M. Gottesman, Targeting multidrug resistance in cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 219–234.
- [21] G. Szakacs, J.-P. Annereau, S. Lababidi, U. Shankavaram, A. Arciello, K.J. Bussey, W. Reinhold, Y. Guo, G.D. Kruh, M. Reimers, J.N. Weinstein, M.M. Gottesman, Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells, *Cancer Cell* 6 (2004) 129–137, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.026>.
- [22] D. Türk, M.D. Hall, B.F. Chu, J.A. Ludwig, H.M. Fales, M.M. Gottesman, G. Szakacs, Identification of compounds selectively killing multidrug-resistant cancer cells, *Cancer Res.* 69 (2009) 8293–8301, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2422>.
- [23] A. Füredi, S. Tóth, K. Szabó, V.F.S. Pape, D. Türk, N. Kucsma, L. Cervenák, J. Tóvári, G. Szakacs, Identification and validation of compounds selectively killing resistant cancer: delineating cell line specific effects from P-glycoprotein-induced toxicity, *Mol. Cancer Ther.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0333-T> molcanther.0333.2016.
- [24] G. Szakacs, M.D. Hall, M.M. Gottesman, A. Boumendjel, R. Kachadourian, B.J. Day, H. Baubichon-Cortay, A. Di Pietro, Targeting the achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance, *Chem. Rev.* 114 (2014) 5753–5774, <http://dx.doi.org/10.1021/cr4006236>.
- [25] L. Fang, G. Zhang, C. Li, X. Zheng, L. Zhu, J.J. Xiao, G. Szakacs, J. Nadas, K.K. Chan, P.G. Wang, D. Sun, Discovery of a daunorubicin analogue that exhibits potent antitumor activity and overcomes P-gp-mediated drug resistance, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 932–941, <http://dx.doi.org/10.1021/jm050800q>.
- [26] R.B. Weiss, The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin. Oncol.* 19 (1992) 670–686.
- [27] Handbook of Cancer Chemotherapy 8th edition - Textbooks.com. <http://www.textbooks.com/Handbook-of-Cancer-Chemotherapy-8th-Edition/9781608317820/Roland-T-Skeel-and-Samir-Khleif.php>, (2011) (9781608317820, accessed January 2, 2017).
- [28] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: molecular advances and pharmacological developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev.* 56 (2004) 185–229, <http://dx.doi.org/10.1124/pr.56.2.6>.
- [29] Y. Barenholz, Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 160 (2012) 117–134, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
- [30] A. Gabizon, R. Catane, B. Uziely, B. Kaufman, T. Safra, R. Cohen, F. Martin, A. Huang, Y. Barenholz, Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes, *Cancer Res.* 54 (1994) 987–992.
- [31] H. Hashizume, P. Baluk, S. Morikawa, J.W. McLean, G. Thurston, S. Roberge, R.K. Jain, D.M. McDonald, Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 1363–1380, [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65006-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65006-7).
- [32] R. Bassermann, Changes of vascular pattern of tumors and surrounding tissue during different phases of metastatic growth, *Recent Results Cancer Res. Fortschritt Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer.* 100 (1986) 256–267.
- [33] S.K. Huang, K.D. Lee, K. Hong, D.S. Friend, D. Papahadjopoulos, Microscopic localization of sterically stabilized liposomes in colon carcinoma-bearing mice, *Cancer Res.* 52 (1992) 5135–5143.
- [34] J. Vaaga, E. Mayhew, D. Lasic, F. Martin, Therapy of primary and metastatic mouse mammary carcinomas with doxorubicin encapsulated in long circulating liposomes, *Int. J. Cancer* 51 (1992) 942–948.
- [35] J. Vaaga, D. Donovan, E. Mayhew, R. Abra, A. Huang, Therapy of human ovarian carcinoma xenografts using doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes, *Cancer* 72 (1993) 3671–3675.
- [36] G.T. Colbern, A.J. Hiller, R.S. Musterer, E. Pegg, I.C. Henderson, P.K. Working, Significant increase in antitumor potency of doxorubicin Hc1 by its encapsulation in pegylated liposomes, *J. Liposome Res.* 9 (1999) 523–538, <http://dx.doi.org/10.3109/08982109909035551>.
- [37] P.K. Working, A.D. Dayan, Pharmacological-toxicological expert report. CAELYX. (stealth liposomal doxorubicin HCl), *Hum. Exp. Toxicol.* 15 (1996) 751–785.
- [38] A. Cabanes, D. Tzemach, D. Goren, A.T. Horowitz, A. Gabizon, Comparative study of the antitumor activity of free doxorubicin and polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin in a mouse lymphoma model, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc* 4 (1998) 499–505.
- [39] R. Mazurchuk, D. Glaves, D. Raghavan, Magnetic resonance imaging of response to chemotherapy in orthotopic xenografts of human bladder cancer, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc* 3 (1997) 1635–1641.
- [40] J. Vaaga, E. Barberá-Guillem, R. Abra, A. Huang, P. Working, Tissue distribution and therapeutic effect of intravenous free or encapsulated liposomal doxorubicin on human prostate carcinoma xenografts, *Cancer* 73 (1994) 1478–1484.
- [41] D.M. Vail, M.A. Amantea, G.T. Colbern, F.J. Martin, R.A. Hilger, P.K. Working, Pegylated liposomal doxorubicin: proof of principle using preclinical animal models and pharmacokinetic studies, *Semin. Oncol.* 31 (2004) 16–35.
- [42] J.A. O'Shaughnessy, Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer, *Clin. Breast Cancer.* 4 (2003) 318–328.
- [43] E. Mechetner, A. Kyshtoobayeva, S. Zonis, H. Kim, R. Stroup, R. Garcia, R.J. Parker, J.P. Fruehauf, Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc* 4 (1998) 389–398.
- [44] J.M. Buerstedde, C.A. Reynaud, E.H. Humphries, W. Olson, D.L. Ewert, J.C. Weill, Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line, *EMBO J.* 9 (1990) 921–927.
- [45] C.J. Vandenberg, F. Gergely, C.Y. Ong, P. Pace, D.L. Mallery, K. Hiom, K.J. Patel, BRCA1-independent ubiquitination of FANCD2, *Mol. Cell* 12 (2003) 247–254.
- [46] L.H. Saal, S.K. Gruberger-Saal, C. Persson, K. Lövgren, M. Jumppanen, J. Staaf, G. Jönsson, M.M. Pires, M. Maurer, K. Holm, S. Koujak, S. Subramaniyam, J. Vallon-Christersson, H. Olsson, T. Su, L. Memeo, T. Ludwig, S.P. Ethier, M. Krogh, M. Szabolcs, V.V.V.S. Murty, J. Isola, H. Hibshoosh, R. Parsons, A. Borg, Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair, *Nat. Genet.* 40 (2008) 102–107, <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2007.39>.
- [47] G. Szakacs, M.M. Gottesman, Comparing solid tumors with cell lines: implications for identifying drug resistance genes in cancer, *Mol. Interv.* 4 (2004) 323, <http://dx.doi.org/10.1124/mi.4.6.5>.
- [48] D. Lorusso, A. Di Stefano, V. Carone, A. Fagotti, S. Pisconti, G. Scambia, Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythrodysesthesia (“hand-foot” syndrome), *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 18 (2007) 1159–1164, <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdl477>.
- [49] R.W. Martin, B.J. Orelli, M. Yamazoe, A.J. Minn, S. Takeda, D.K. Bishop, RAD51 up-regulation bypasses BRCA1 function and is a common feature of BRCA1-deficient

- breast tumors, *Cancer Res.* 67 (2007) 9658–9665, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0290>.
- [50] J.A. Sparano, A.N. Makhson, V.F. Semiglazov, S.A. Tjulandin, O.I. Balashova, I.N. Bondarenko, N.V. Bogdanova, G.M. Manikhas, G.P. Oliynychenko, V.A. Chatikhine, S.H. Zhuang, L. Xiu, Z. Yuan, W.R. Rackoff, Pegylated liposomal doxorubicin plus docetaxel significantly improves time to progression without additive cardiotoxicity compared with docetaxel monotherapy in patients with advanced breast cancer previously treated with neoadjuvant-adjuvant anthracycline therapy: results from a randomized phase III study, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27 (2009) 4522–4529, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.20.5013>.
- [51] A.T. Perez, G.H. Domenech, C. Frankel, C.L. Vogel, Pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) for metastatic breast cancer: the Cancer Research Network, Inc., experience, *Cancer Investig.* 20 (Suppl. 2) (2002) 22–29.
- [52] A. Hamilton, L. Biganzoli, R. Coleman, L. Mauriac, P. Hennebert, A. Awada, M. Nooij, L. Beex, M. Piccart, I. Van Hoorebeeck, P. Bruning, D. de Valeriola, EORTC 10968: a phase I clinical and pharmacokinetic study of polyethylene glycol liposomal doxorubicin (Caelyx, Doxil) at a 6-week interval in patients with metastatic breast cancer. European Organization for Research and Treatment of Cancer, *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 13 (2002) 910–918.
- [53] J. Lao, J. Madani, T. Puértolas, M. Alvarez, A. Hernández, R. Pazo-Cid, A. Artal, A. Antón Torres, Liposomal Doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review, *J. Drug Deliv.* 2013 (2013) 456409, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/456409>.
- [54] I. Pastan, M.M. Gottesman, Multidrug resistance, *Annu. Rev. Med.* 42 (1991) 277–286.
- [55] A.L.B. Seynhaeve, B.M. Dicheva, S. Hoving, G.A. Koning, T.L.M. ten Hagen, Intact Doxil is taken up intracellularly and released doxorubicin sequesters in the lysosome: evaluated by in vitro/in vivo live cell imaging, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 172 (2013) 330–340, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.034>.
- [56] M.L. Krieger, A. Konold, M. Wiese, U. Jaehde, G. Bendas, Targeted doxorubicin-liposomes as a tool to circumvent P-gp-mediated resistance in ovarian carcinoma cells, *ResearchGate* 48 (2010) 442–444, <http://dx.doi.org/10.5414/CP448442>.
- [57] E.V. Batrakova, S. Li, A.M. Brynskikh, A.K. Sharma, Y. Li, M. Boska, N. Gong, R.L. Mosley, V.Y. Alakhov, H.E. Gendelman, A.V. Kabanov, Effects of pluronic and doxorubicin on drug uptake, cellular metabolism, apoptosis and tumor inhibition in animal models of MDR cancers, *J. Control. Release* 143 (2010) 290–301, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.004>.
- [58] A.K. Iyer, A. Singh, S. Ganta, M.M. Amiji, Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 1784–1802, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.012>.
- [59] M. Lelle, C. Freidel, S. Kaloyanova, I. Tabujew, A. Schramm, M. Mushev, C. Niehrs, K. Müllen, K. Peneva, Overcoming drug resistance by cell-penetrating peptide-mediated delivery of a doxorubicin dimer with high DNA-binding affinity, *Eur. J. Med. Chem.* 130 (2017) 336–345, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.056>.
- [60] S. Kunjachan, A. B?au?, D. M?ckel, B. Theek, F. Kiessling, T. Etrych, K. Ulbrich, L. van Bloois, G. Storm, G. Bartosz, B. Rychlik, T. Lammers, Overcoming cellular multidrug resistance using classical nanomedicine formulations, *Eur. J. Pharm. Sci.* 45 (2012) 421–428, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2011.08.028>.
- [61] A.A. Gabizon, Y. Patil, N.M. La-Beck, New insights and evolving role of pegylated liposomal doxorubicin in cancer therapy, *Drug Resist. Updat.* 29 (2016) 90–106, <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2016.10.003>.
- [62] M.E. Thompson, R.A. Jensen, P.S. Obermiller, D.L. Page, J.T. Holt, Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression, *Nat. Genet.* 9 (1995) 444–450, <http://dx.doi.org/10.1038/ng0495-444>.
- [63] N.C. Turner, J.S. Reis-Filho, A.M. Russell, R.J. Springall, K. Ryder, D. Steele, K. Savage, C.E. Gillett, F.C. Schmitt, A. Ashworth, A.N. Tutt, BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer, *Oncogene* 26 (2007) 2126–2132, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210014>.
- [64] N. Turner, A. Tutt, A. Ashworth, Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers, *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 814–819, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1457>.
- [65] M. Esteller, J.M. Silva, G. Dominguez, F. Bonilla, X. Matias-Guiu, E. Lerma, E. Bussaglia, J. Prat, I.C. Harkes, E.A. Repasky, E. Gabrielson, M. Schutte, S.B. Baylin, J.G. Herman, Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors, *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (2000) 564–569.
- [66] C.C. Pritchard, J. Mateo, M.F. Walsh, N. De Sarkar, W. Abida, H. Beltran, A. Garofalo, R. Gulati, S. Carreira, R. Eeles, O. Elemento, M.A. Rubin, D. Robinson, R. Lonigro, M. Hussain, A. Chinnaiyan, J. Vinson, J. Filipenko, L. Garraway, M.-E. Taplin, S. Aldubayan, G.C. Han, M. Beightol, C. Morrissey, B. Nghiem, H.H. Cheng, B. Montgomery, T. Walsh, S. Casadei, M. Berger, L. Zhang, A. Zehir, J. Vijai, H.I. Scher, C. Sawyers, N. Schultz, P.W. Kantoff, D. Solit, M. Robson, E.M. Van Allen, K. Offit, J. de Bono, P.S. Nelson, Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer, *N. Engl. J. Med.* 375 (2016) 443–453, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1603144>.
- [67] M.E.R. O'Brien, N. Wigler, M. Inbar, R. Rosso, E. Grischke, A. Santoro, R. Catane, D.G. Kieback, P. Tomczak, S.P. Ackland, F. Orlandi, L. Mellars, L. Alland, C. Tendler, CAELYX Breast Cancer Study Group, Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer, *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 15 (2004) 440–449.
- [68] W.G. Harker, F.R. MacKintosh, B.I. Sikic, Development and characterization of a human sarcoma cell line, MES-SA, sensitive to multiple drugs, *Cancer Res.* 43 (1983) 4943–4950.
- [69] S.-E. Al-Batran, M. Güntner, C. Pauligk, M. Scholz, R. Chen, B. Beiss, S. Stopatschinskaja, W. Lerbs, N. Harbeck, E. Jäger, Anthracycline rechallenge using pegylated liposomal doxorubicin in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis using individual data from four prospective trials, *Br. J. Cancer* 103 (2010) 1518–1523, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605961>.
- [70] S.-E. Al-Batran, J. Bischoff, G. von Minckwitz, A. Atmaca, U. Kleeberg, I. Meuthen, G. Morack, W. Lerbs, D. Hecker, J. Sehouli, A. Knuth, E. Jager, The clinical benefit of pegylated liposomal doxorubicin in patients with metastatic breast cancer previously treated with conventional anthracyclines: a multicentre phase II trial, *Br. J. Cancer* 94 (2006) 1615–1620, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6603158>.
- [71] T. Safra, L. Borgato, M.O. Nicoletto, L. Rolnitzky, S. Pelles-Avraham, R. Geva, M.E. Donach, J. Curtin, A. Novetsky, T. Grenader, W.-C.V. Lai, A. Gabizon, L. Boyd, F. Muggia, BRCA mutation status and determinant of outcome in women with recurrent epithelial ovarian cancer treated with pegylated liposomal doxorubicin, *Mol. Cancer Ther.* 10 (2011) 2000–2007, <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0272>.
- [72] S.B. Kaye, J. Lubinski, U. Matulonis, J.E. Ang, C. Gourley, B.Y. Karlan, A. Ammon, K.M. Bell-McGuinn, L.-M. Chen, M. Friedlander, T. Safra, I. Vergote, M. Wickens, E.S. Lowe, J. Carmichael, B. Kaufman, Phase II, open-label, randomized, multicenter study comparing the efficacy and safety of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, and pegylated liposomal doxorubicin in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30 (2012) 372–379, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2011.36.9215>.
- [73] S. Rottenberg, J.E. Jaspers, A. Kersbergen, E. van der Burg, A.O.H. Nygren, S.A.L. Zander, P.W.B. Derksen, M. de Bruin, J. Zevenhoven, A. Lau, R. Boulter, A. Cranston, M.J. O'Connor, N.M.B. Martin, P. Borst, J. Jonkers, High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 17079–17084, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0806092105>.
- [74] J. Murai, S.N. Huang, B.B. Das, T.S. Dexheimer, S. Takeda, Y. Pommier, Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) repairs DNA damage induced by topoisomerases I and II and base alkylation in vertebrate cells, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 12848–12857, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.333963>.
- [75] J. Murai, Y. Zhang, J. Morris, J. Ji, S. Takeda, J.H. Doroshow, Y. Pommier, Rationale for poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in combination therapy with camptothecins or temozolomide based on PARP trapping versus catalytic inhibition, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 349 (2014) 408–416, <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.113.210146>.
- [76] I. Lohse, A. Borgida, P. Cao, M. Cheung, M. Pintilie, T. Bianco, S. Holter, E. Ibrahimov, R. Kumareswaran, R.G. Bristow, M.-S. Tsao, S. Gallinger, D.W. Hedley, BRCA1 and BRCA2 mutations sensitize to chemotherapy in patient-derived pancreatic cancer xenografts, *Br. J. Cancer* 113 (2015) 425–432, <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.220>.
- [77] J.L. Lesnock, K.M. Darcy, C. Tian, J.A. Deloia, M.M. Thrall, C. Zahn, D.K. Armstrong, M.J. Birrer, T.C. Krivak, BRCA1 expression and improved survival in ovarian cancer patients treated with intraperitoneal cisplatin and paclitaxel: a Gynecologic Oncology Group Study, *Br. J. Cancer* 108 (2013) 1231–1237, <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.70>.
- [78] O.A. Stefansson, A. Villanueva, A. Vidal, L. Martí, M. Esteller, BRCA1 epigenetic inactivation predicts sensitivity to platinum-based chemotherapy in breast and ovarian cancer, *Epigenetics* 7 (2012) 1225–1229, <http://dx.doi.org/10.4161/epi.22561>.
- [79] N.C. Turner, A.N.J. Tutt, Platinum chemotherapy for BRCA1-related breast cancer: do we need more evidence? *Breast Cancer Res. BCR.* 14 (2012) 115, <http://dx.doi.org/10.1186/bcr3332>.
- [80] T. Byrski, J. Gronwald, T. Huzarski, E. Grzybowska, M. Budryk, M. Stawicka, T. Mierzwa, M. Szwiec, R. Wisniewski, M. Siolek, R. Dent, J. Lubinski, S. Narod, Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28 (2010) 375–379, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.20.7019>.
- [81] T. Byrski, R. Dent, P. Blecharz, M. Foszczynska-Kloda, J. Gronwald, T. Huzarski, C. Cybulski, E. Marczyk, R. Chrzan, A. Eisen, J. Lubinski, S.A. Narod, Results of a phase II open-label, non-randomized trial of cisplatin chemotherapy in patients with BRCA1-positive metastatic breast cancer, *Breast Cancer Res. BCR.* 14 (2012) R110, <http://dx.doi.org/10.1186/bcr3231>.
- [82] K.W. Caestecker, G.R. Van de Walle, The role of BRCA1 in DNA double-strand repair: past and present, *Exp. Cell Res.* 319 (2013) 575–587, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.11.013>.
- [83] L.S. Raut, Novel formulation of cytarabine and daunorubicin: a new hope in AML treatment, *South Asian J. Cancer* 4 (2015) 38–40, <http://dx.doi.org/10.4103/2278-330X.149950>.