

HUNPROTEXC



TERÁPIA-REZISZTENCIÁHOZ VEZETŐ VÁLTOZÁSOK TUMOROKBAN

Monostory Katalin, Szakács Gergely

Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet

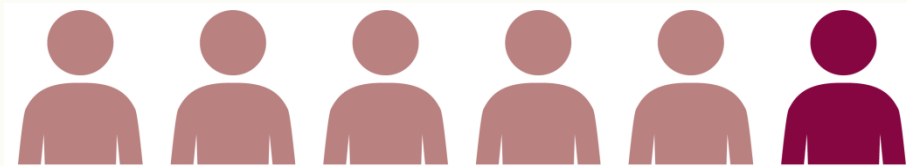


NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT

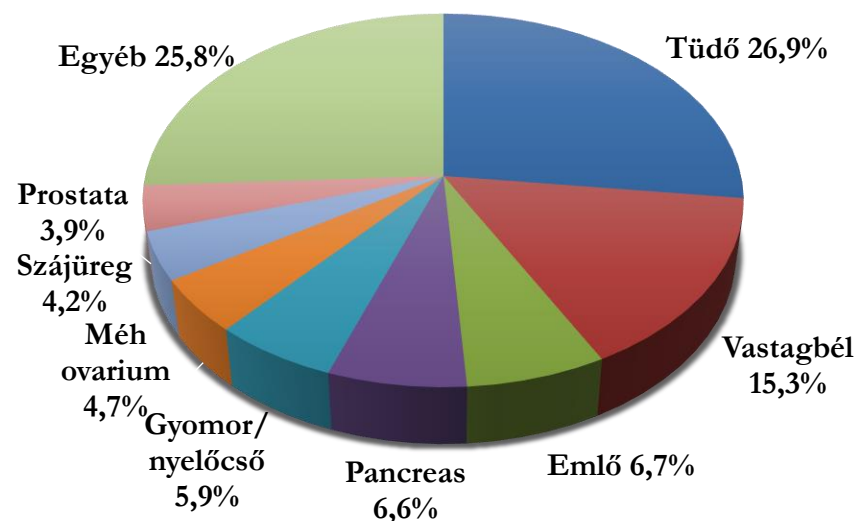
Daganatos megbetegedések – Szomorú statisztika (WHO)

- Halálozás 2. leggyakoribb oka
- Minden 6. haláletet oka daganatos megbetegedés

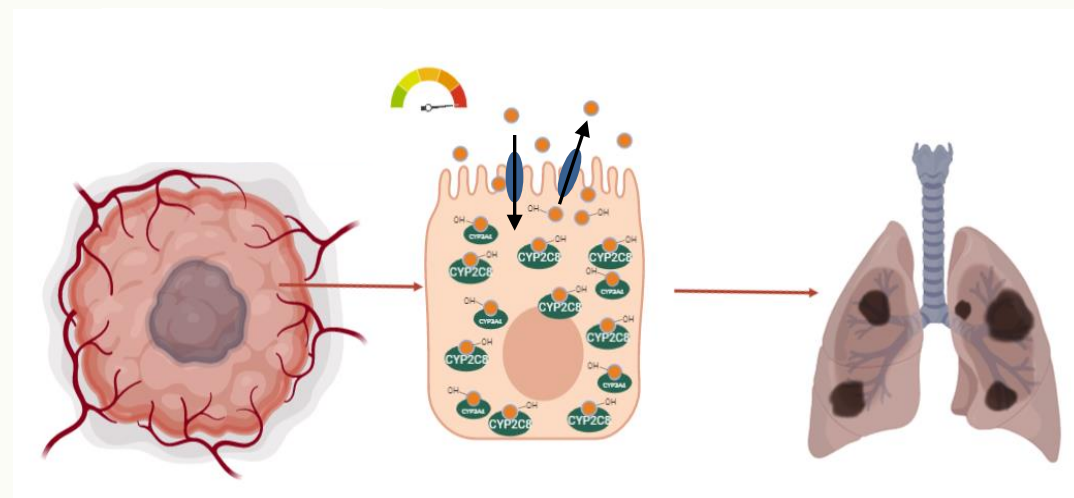
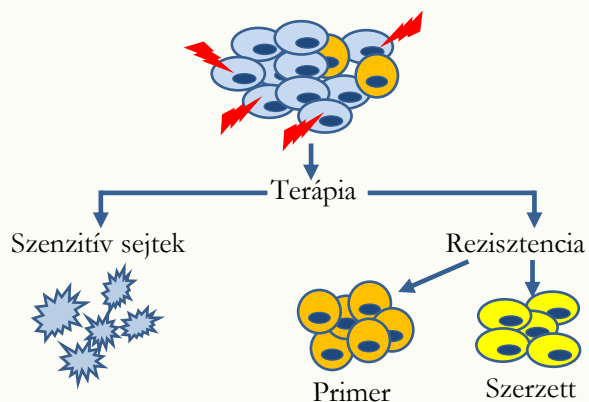


- Európa: 3,7 millió új eset évente
- 1,9 millió halálozás évente
- 90%-ban terápia-rezisztencia
(Wang et al. 2019)

Magyarország 2016 (WHO)



Terápia-rezisztencia – megváltozott hatóanyag elimináció



Fokozott osztódás → Genomiális változások:

- Kromoszóma átrendeződések,
- Géndeléción/multiplikáció

Megváltozott hatóanyag elimináció:

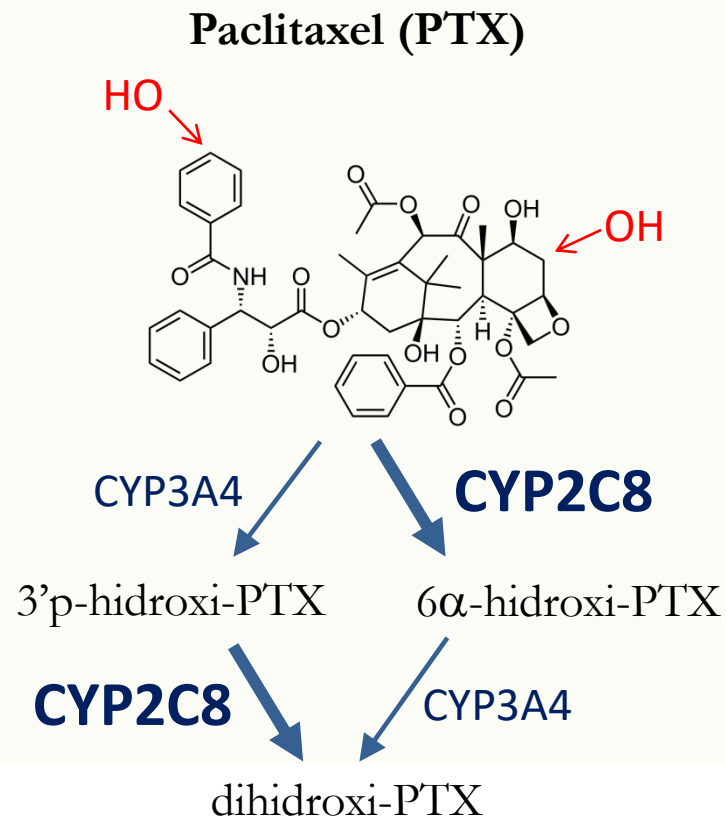
- Fokozott efflux transzport
- **CYP gének kópiaszám változása**

- **Megváltozott gyógyszer-metabolizmus és transzport**
- Gyógyszer-célpont változásai
- Hibás apoptózis szabályzás
- Fokozott DNS hiba javítás
- ...

Célkitűzések - Megváltozott gyógyszer-elimináció

- Gyógyszer metabolizmus és transzport megváltozása
 - metabolizmus: citokróm P450 (CYP) kópiaszám/expresszió változása
 - transzport: ABCB1 (Pgp) kópiaszám/expresszió változása
- Betegekből származó tüdő adenocarcinoma minták
 - CYP/ABCB1 kópiaszám meghatározás: módszer-fejlesztés
 - CYP/ABCB1 expresszió változás - terápia (paclitaxel) kimenetele
- Adenocarcinoma sejt-modell
 - nem rezisztens és kísérletesen rezisztenssé tett sejtvonalak létrehozása
 - sejtvonalak jellemzése
 - paclitaxel érzékenysége

Paclitaxel metabolizmus megváltozása adenocarcinoma sejtekben



- Kópiaszám változás kimutatása
módszer-fejlesztés – **CYP2C8** és **CYP3A4** kópiaszám
- Tüdő adenocarcinoma minták
 - **Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet**
(Moldvay Judit, Harkó Tünde)
 - Paclitaxel kezelés előtt álló betegek primer tumor mintáiban a **CYP2C8** és **CYP3A4** kópiaszám
 - Paclitaxel kezelés – megbetegedés kimenetele



Moldvay Judit

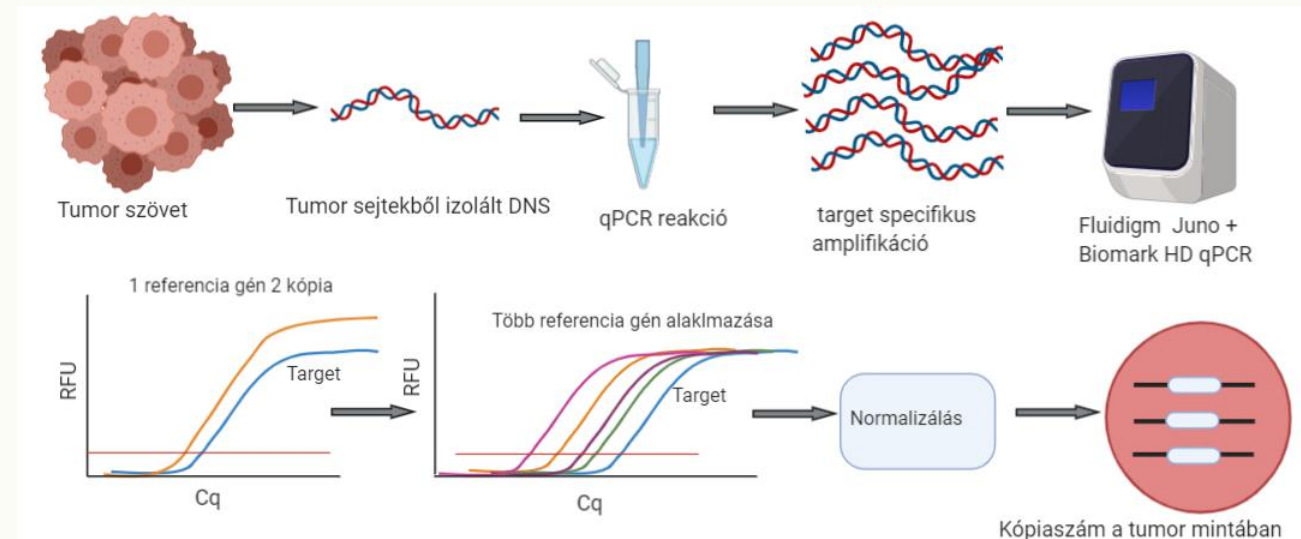
CYP kópiaszám meghatározás tüdő adenocarcinoma mintákban

- Gének mennyiségi meghatározása

- PCR alapú, relatív mennyiségi meghatározás
- 2 kópiában lévő gén(ek)-hez viszonyítva
- Target gének: CYP2C8 és CYP3A4
- Referencia gének: ALB, B2M, BCKDHA, F5, CD36, MPO, TBP, RNase P
- gén kópiaszám a tumorban – egészséges szövet kópiaszámához viszonyítva, tumor-tartalommal korrigálva
- validálás: szekvenálással

- High-throughput PCR módszer

- nagyszámú gén, nagyszámú minta
- kis szövet-minta mennyiség

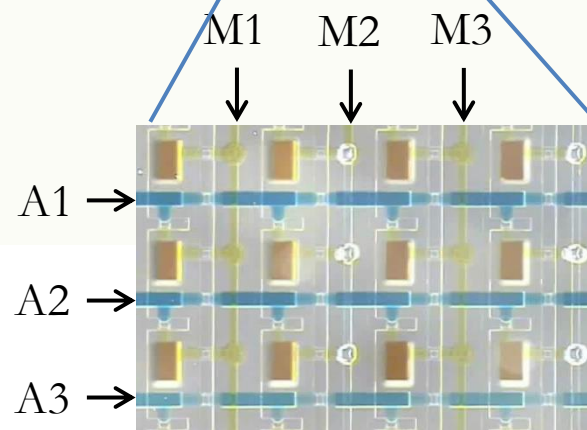
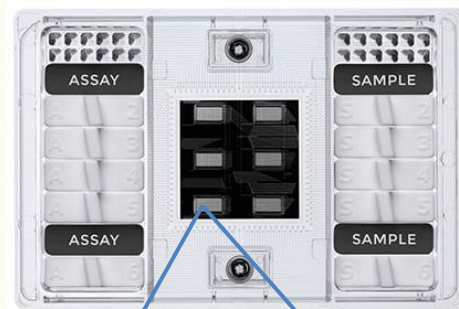


Kópiaszám meghatározás – HT-PCR, Biomark HD + Juno

Microfluidikai chip technológia

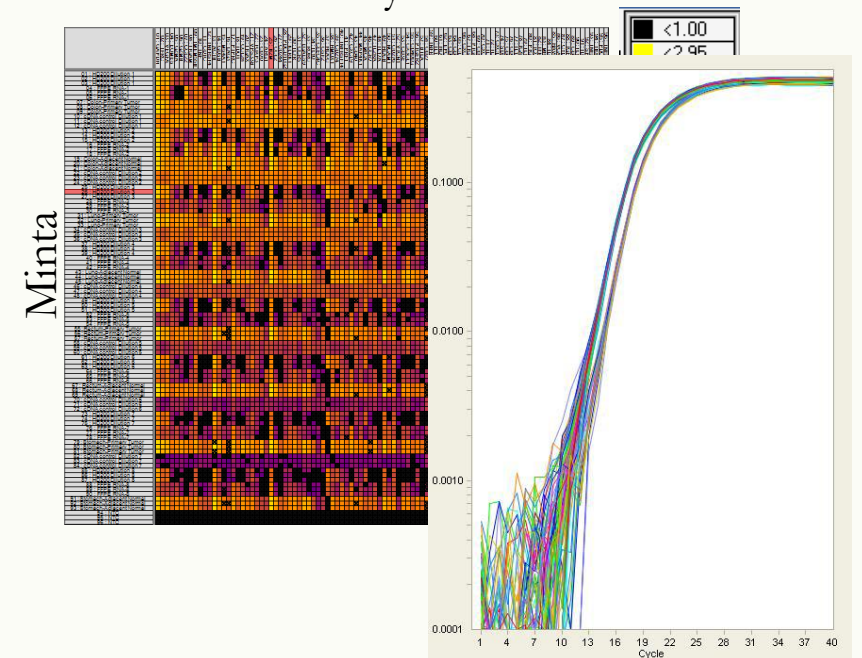


Biomark HD + Juno
(Fluidigm)



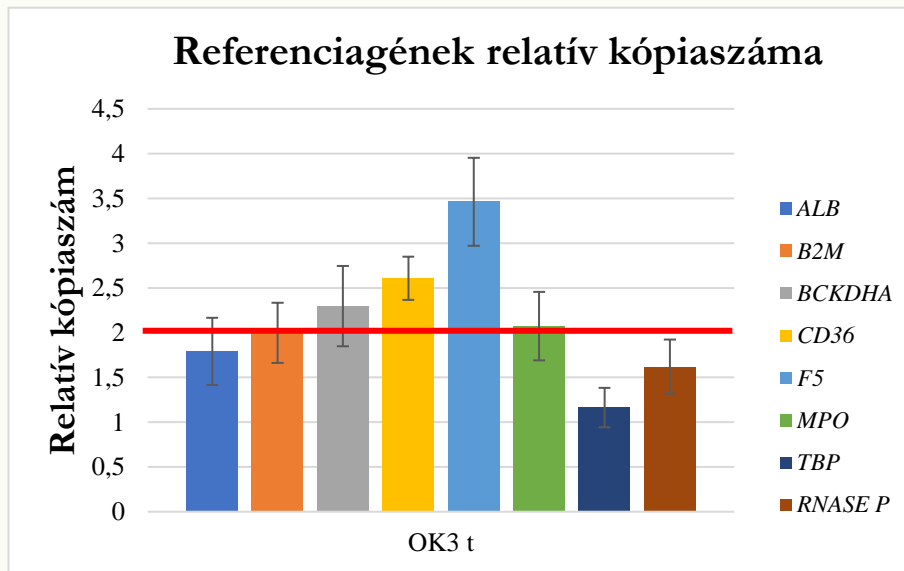
Kiértékelés

Assay

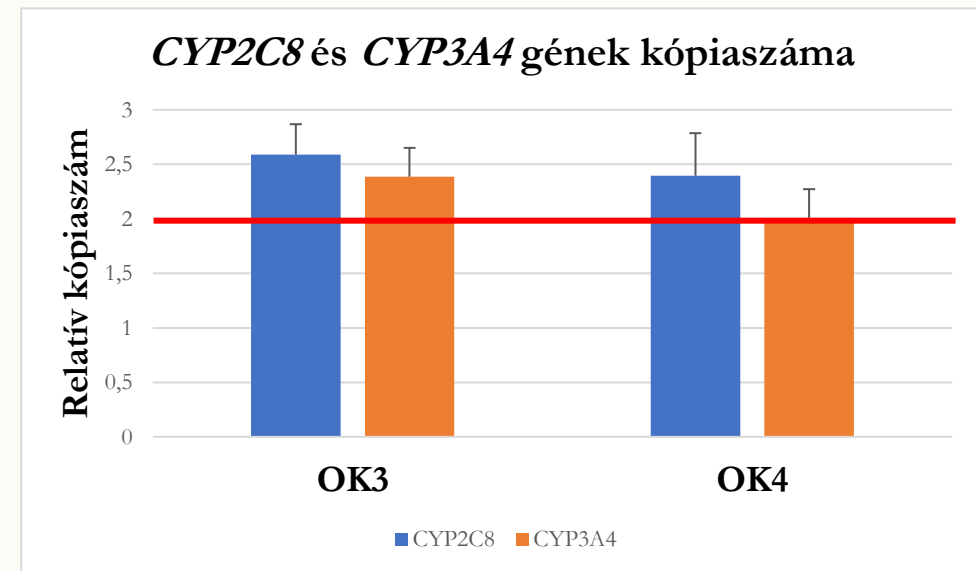


CYP kópiaszám meghatározás tüdő adenocarcinoma mintákban

- Referenciagének

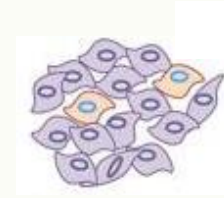


- CYP kópiaszám



- gén kópiaszám a tumorban – egészséges szövet kópiaszámához viszonyítva, tumor-tartalommal korrigálva
- validálás: szekvenálással

Terápia-rezisztencia - paclitaxel metabolizmus megváltozása



- Tüdő adenocarcinoma sejt-modell

Adenocarcinoma sejtvonala: EKVX, HOP-62, A549

Nem rezisztens (parentális) sejtek: CYP2C8, CYP3A4 és ABCB1 gének 2 kópiában

Rezisztens sejtek létrehozása: Membrán fehérje kutatócsoport

CYP2C8 overexpresszió – CYP2C8 transzdukcióval

CYP2C8 gén több kópiában → fokozott CYP2C8 expresszió

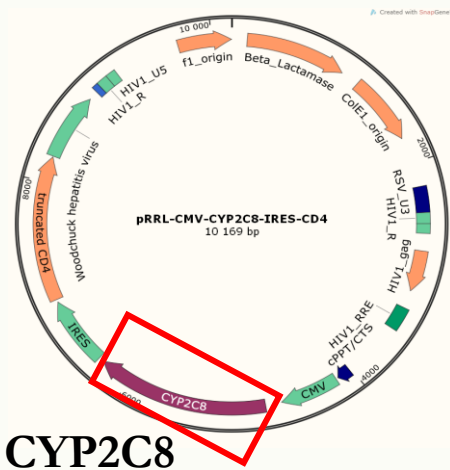


NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT

Kísérletesen létrehozott rezisztencia - *In vitro* adenocarcinoma sejt-modell

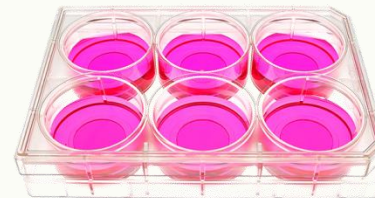
CYP2C8 cDNS*
Tusnady Éva



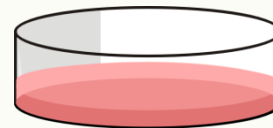
pRRL-CMV-CYP2C8-IRES-CD4
lentivírus plazmid

*Wolf R (University of Dundee, UK) ajándéka

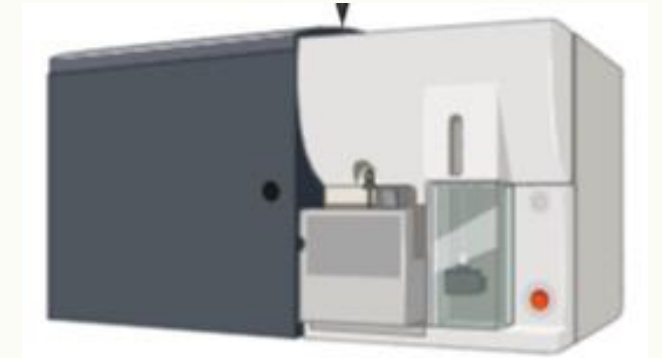
Kucsma Nóra



EKVX sejtek transzfektálása



Lentivírus felszaporítása
HEK293T sejtekben

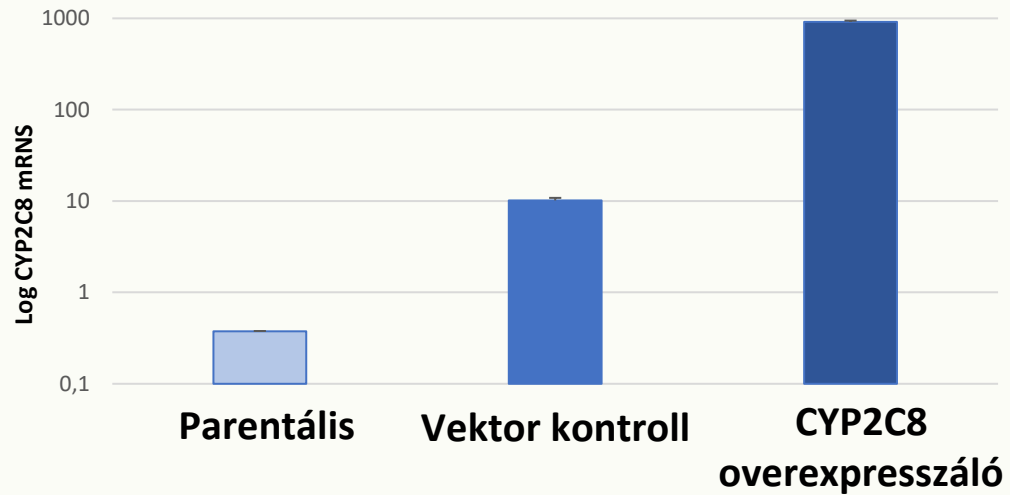


CYP2C8-t overexpresszáló sejtek
kiválogatása áramlási citometriával

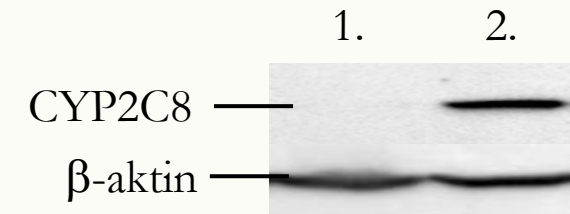


In vitro sejt-modell jellemzése

EKVX sejtek CYP2C8 mRNS expressziója



EKVX sejtek CYP2C8 fehérje expressziója



1. Vektor kontroll;
2. CYP2C8 overexpresszáló



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT

Összegzés – további tervek

- High-throughput PCR módszer kópiaszám változás meghatározására
 - CYP2C8 és CYP3A4 kópiaszám változás PTX kezelés előtt álló betegek adenocarcinoma mintáiban
 - PTX kezelés / megbetegedés kimenetele
- CYP2C8 overexpresszáló sejt-modell létrehozása
 - Fokozott CYP2C8 mRNS és enzim-fehérje szint
 - PTX érzékenység meghatározása
 - CYP3A4 overexpresszáló sejt-modell létrehozása



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT

Kutatásban résztvevők

- TTK Enzimológiai Intézet

Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások kutatócsoport

Gabri Evelyn

Mangó Katalin

Kiss Ádám Ferenc

Jármi Lili

Vaffler Lilla

- Országos Korányi és Tbc Pulmonológiai Intézet

Moldvay Judit

Harkó Tünde

Membrán fehérje Kutatócsoport

Füredi András

Tóth Szilárd

Kucsma Nóra

Bakos Éva



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT